

МИНОБРНАУКИ РОССИИ

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ  
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ  
«САРАТОВСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ  
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ  
ИМЕНИ Н.Г.ЧЕРНЫШЕВСКОГО»

Кафедра оптики и биофотоники

Анализ термической устойчивости бычьего сывороточного альбумина при  
воздействии негреющего переменного магнитного поля методом  
дифференциальной сканирующей флуориметрии

АВТОРЕФЕРАТ МАГИСТЕРСКОЙ РАБОТЫ

студента 2 курса 2223 группы

направления 03.04.02 «Физика»  
профиль «Квантовые технологии»  
Института физики

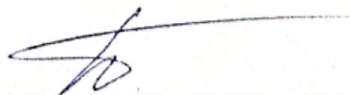
Калиновой Александры Евгеньевны

Научный руководитель  
Проф., д.ф.-м.н., чл.-корр. РАН  
должность, ученая степень, уч. звание

  
\_\_\_\_\_   
подпись, дата

В.В. Тучин  
Инициалы Фамилия

Зав. кафедрой оптики и биофотоники  
Проф., д.ф.-м.н., чл.-корр. РАН  
должность, ученая степень, уч. звание

  
\_\_\_\_\_   
подпись, дата

В.В. Тучин  
Инициалы Фамилия

Саратов 2026 г.

**ВВЕДЕНИЕ.** Белки участвуют в образовании клеточных и внеклеточных структур, передаче сигналов, иммунной защите и многих других фундаментальных процессах. Структурная и функциональная целостность белков напрямую зависит от их стабильности – способности сохранять свёрнутую структуру и выполнять свои функции в различных условиях окружающей среды. Изучение стабильности белков имеет огромное значение. Так как оно позволяет глубже понять механизмы сворачивания и деградации белков, что важно для раскрытия природы заболеваний, связанных с нарушением их структуры. Также контроль стабильности белков важен в биотехнологии, фармацевтике и пищевой промышленности, где белки используются в качестве лекарственных препаратов, ферментов, биосенсоров и пищевых добавок.

В составе квантовой системы белок является ключом к внедрению квантовых технологий в живой объект как наименее инородного объекта из ныне возможных. Также, т.к. некоторые белки обладают автофлуоресценцией или хорошо связываются с дополнительными метками, то они более перспективны в качестве биосенсоров нежели, чем квантовые точки, к примеру.

При повышении температуры усиливается тепловое движение, водородные связи разрываются, гидрофобные ядра раскрываются, и белок теряет структуру (денатурирует).

НаноДСФ – разновидность метода дифференциальной сканирующей флуориметрии, используемого для определения конформационной стабильности белка с помощью собственной флуоресценции триптофана или тирозина, в отличие от использования внешних флуорогенных красителей, которые обычно отслеживаются с помощью полимеразной цепной реакции в реальном времени (qPCR). Анализ наноДСФ также известен как разновидность анализа термического сдвига.

Проанализировать полученные данные возможно, опираясь на классические представления о процессе сворачивания/разворачивания белка. Однако, классические представления на сегодняшний день не позволяют углубиться и

качественно или количественно оценить энергию стабилизации, саму структуру после разворачивания или после нескольких циклов ренатурации.

В силу ограниченности классических вычислительных методов перспективу обретают квантовые принципы, которые могут углубить наше понимание неправильного сворачивания белков в процессе развития заболеваний

Таким образом, целью исследования было комплексное изучение стабильности бычьего сывороточного альбумина в зависимости от внешних условий. Задачи, выполняемые в ходе работы:

- 1) анализ термической и изотермической стабильности белка в различных средах с варьируемой концентрацией;
- 2) анализ стабильности белка после воздействия негреющего переменного магнитного поля и ультразвука;
- 3) исследование стабильности меченого белка в тех же условиях;
- 4) анализ литературы с целью поиска квантовых моделей, применимых для исследования и прогнозирования стабильности белка в зависимости от его структуры и т.д.

Впервые в работе было продемонстрировано влияние магнитного поля на флуоресценцию триптофана в белке как степень его денатурации. Помимо этого, впервые было проанализировано влияние дополнительных флуоресцирующих меток на естественную флуоресценцию триптофана, а также избирательное действие негреющего магнитного поля.

Работа содержит введение, 3 основных раздела, заключение, апробацию научного исследования, список использованных источников и 1 приложение. Основные разделы рассматривают влияние стабильности белка на его свойства и структуру, значение наличия дополнительных меток для качества результата наноДСФ, условия проведения исследования, а также анализ полученных данных. Работа представлена на 87 страницах, содержит 61 источник, оригинальность составила 94.34 % по результатам проверки с помощью сервиса Руконтекст.

**ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ.** В 1 разделе представлен обзор научной литературы преимущественно за последние 10 лет. В 1 подразделе 1 раздела представлены источники по теме устойчивости различных белков под влиянием внешних факторов, принципа наноДСФ. Во 2 подразделе 1 раздела собраны примеры, демонстрирующие важность формирования белковых систем ко-визуализации и их анализа.

Во 2 разделе работы приведены условия проведения экспериментов. Для анализа был выбран бычий сывороточный альбумин (БСА) как модельный белок, цианиновые флуорофоры Cy5.5, Cy7 и Cy7.5, а также дополнительные компоненты для приготовления растворов веществ и буферных систем. Крайне низкочастотное переменное магнитное поле (КНЧ-ПМП) создавалось при помощи магнитометра TOR 04/17 Combo setup (Nanomaterials, Тамбов, Россия). Ультразвуковое воздействие осуществлялось с помощью ультразвукового гомогенизатора Bandelin Sonopuls. Измерение интенсивности поглощения растворов конъюгатов белка и комплексов красителей проводилось на спектрофотометре CLARIOstar (Оффенбург, Германия). Все измерения интенсивности естественной флуоресценции белков осуществляли при помощи системы анализа стабильности белков PSA-16 (Bestscience&technology, Пекин, Китай).

В 3 разделе приведён анализ полученных экспериментальных результатов. Главными характеристиками являются интенсивность флуоресценции при 350 нм (F350) и при 330 нм (F330), их отношение (F350/F330), а также первая производная от этого отношения ( $d(F350/F330)$ ). Первая производная в данном случае рассчитывается по основному определению производной, т.е. согласно следующей формуле:

$$\frac{dI_{ij}}{dt_{ij}^{\circ}} = \frac{I_j - I_i}{t_j^{\circ} - t_i^{\circ}} \quad (1)$$

где  $I_i$ ,  $I_j$  – значения интенсивности флуоресценции триптофана в текущий и следующий моменты времени;

$t_i^{\circ}$ ,  $t_j^{\circ}$  – значения рабочей температуры в текущий и следующий моменты времени;

$\frac{dI_{ij}}{dt_{ij}}$  – первая производная значения интенсивности от температуры.

В 1 подразделе 3 раздела исследуется процесс денатурации БСА в различных буферных системах и при различных концентрациях при нагревании. В результате были построены графики (Рисунки 1 и 2), демонстрирующие температуры плавления БСА и его устойчивость в целом.

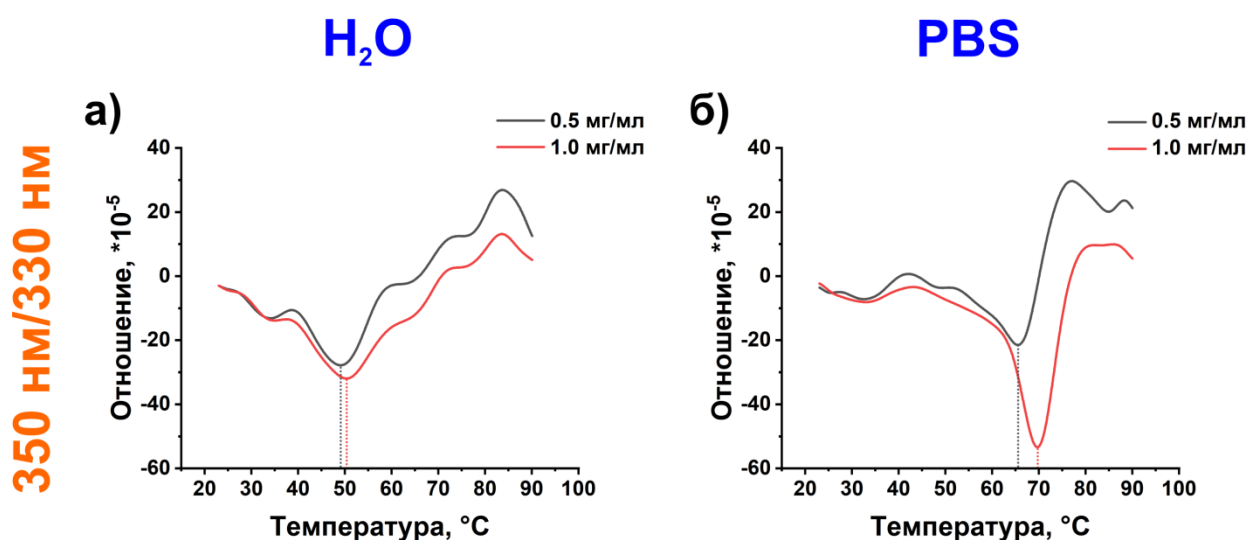


Рисунок 1 – Графики зависимости  $d(F350/F330)$  для а) БСА в деионизате; б) БСА в PBS от температуры.

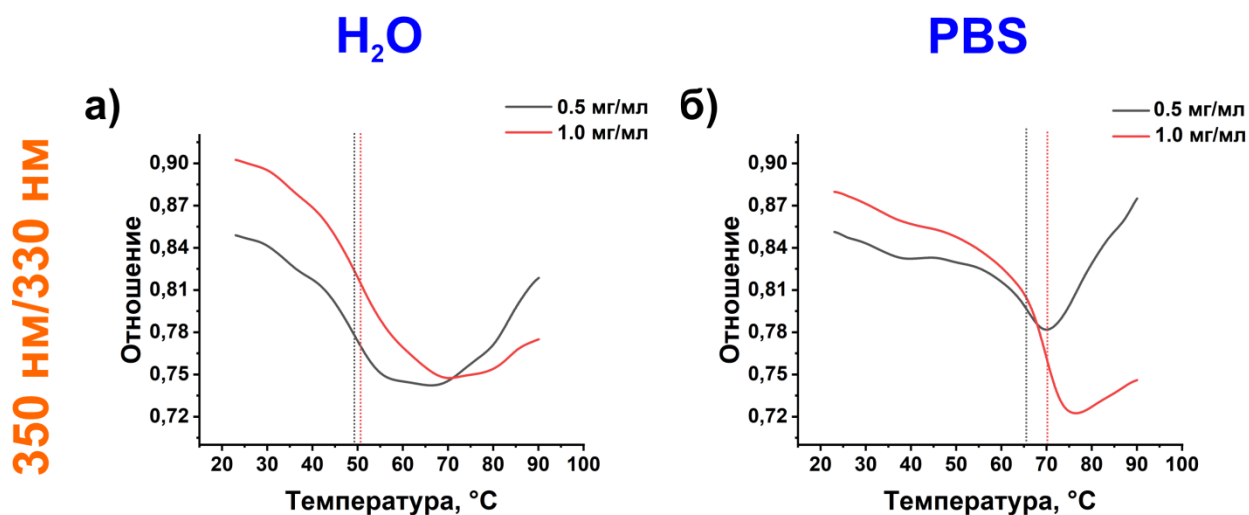


Рисунок 2 – Графики зависимости  $F350/F330$  для а) БСА в деионизованной воде; б) БСА в PBS от температуры.

Графики демонстрируют то, что для БСА характер кривых является убывающим в процессе денатурации, в отличие от большинства других белков. Это обусловлено тем, что, в основном, у белков триптофан скрыт внутри и при

разворачивании и показывается, флуоресцируя. У БСА же триптофан изначально на поверхности, соответственно при денатурации он скрывается за другими аминокислотными остатками, вследствие чего интенсивность флуоресценции снижается.

Для водных образцов температура плавления не зависит от концентрации (Рисунок 1 а), а при смене буфера она вырастает на 15-20 °С. И в PBS зависимость температуры денатурации от концентрации уже существенна (Рисунок 1 б). Если сравнивать образцы по величине  $F_{350}/F_{330}$ , то наиболее устойчивым является 0.5  $\frac{\text{мг}}{\text{мл}}$  БСА в PBS, т.к. крутизна кривой отношения наименьшая (Рисунок 2 б). Несмотря на то, что у двух других образцов точка при начальной температуре находится выше, они более резко разворачиваются, а также ренатурация протекает гораздо медленнее (Рисунок 2 а).

Во 2 подразделе 3 раздела демонстрируется влияние КНЧ-ППП и ультразвукового воздействия на стабильность образцов. Основные результаты собраны и представлены на Рисунках 3 и 4.

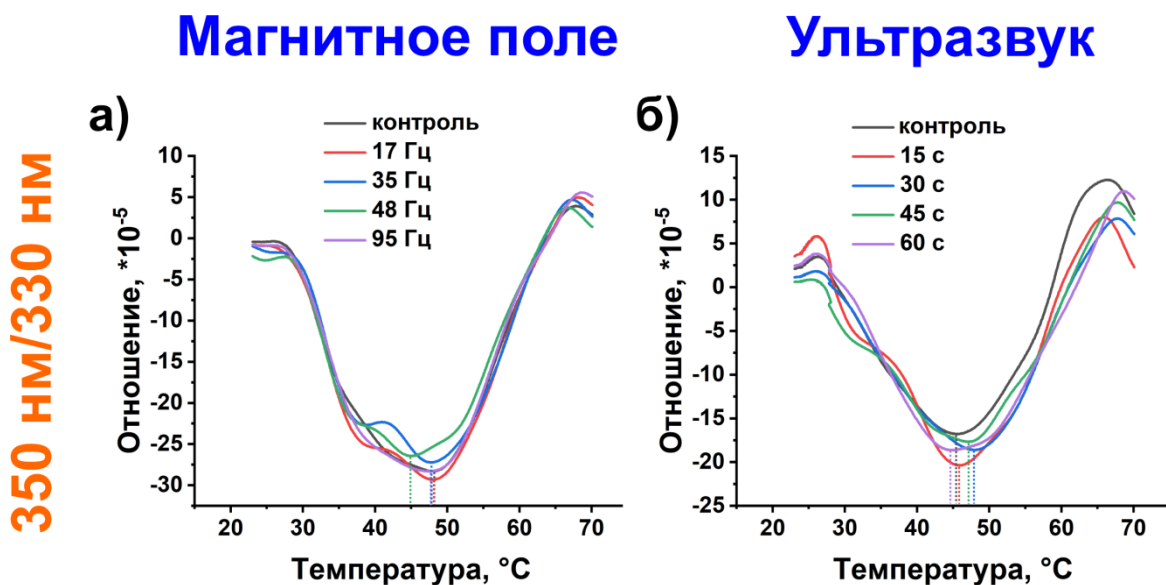


Рисунок 3 – Графики зависимости  $d(F_{350}/F_{330})$  для БСА после а) магнитного воздействия; б) ультразвукового воздействия от температуры.

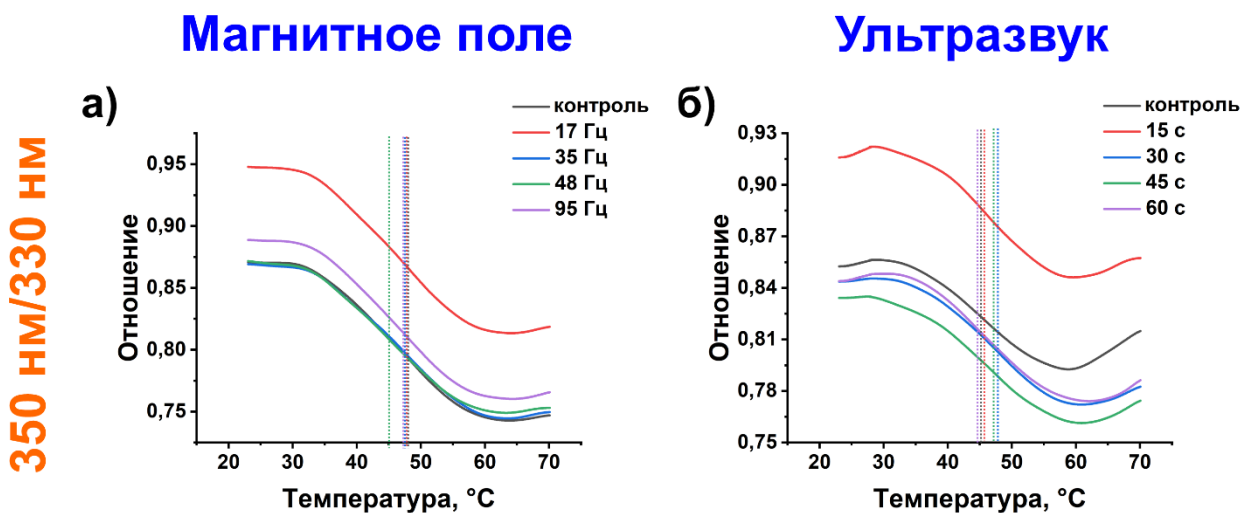


Рисунок 4 – Графики зависимости F350/F330 для БСА после а) магнитного воздействия; б) ультразвукового воздействия от температуры.

Стоит отметить, что характер кривых в случае разного вида физического воздействия остаётся одинаковым, даже температура плавления образцов отличается незначительно – в пределах 5 °С (Рисунок 1). Т.о. магнитное поле не оказало никакого влияния на температуру денатурации белка, за исключением образца, подвергнутого 48-герцовому воздействию – его температура плавления снизилась на 3 °С (Рисунок 1 а). Однако непосредственно на устойчивость белка магнитное поле оказало даже положительное влияние – отношение F350/F330 выросло на 10 %, причём даже по сравнению с контрольным образцом (Рисунок 4 а). Кратковременное воздействие ультразвуком также дало положительный результат (Рисунок 4 б).

Также был проведён анализ изотермической стабильности образцов после воздействия полем, результаты его приведены на Рисунке 5.

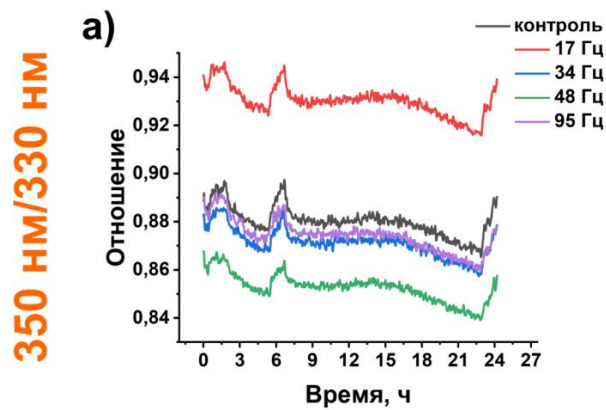


Рисунок 5 – График зависимости F350/F330 для БСА после воздействия магнитного поля с различными параметрами от температуры.

Несмотря на временное отклонение, белок в определённый момент времени всё равно вернулся в своё начальное состояние. И так же образец после 17-герцового воздействия проявил себя наилучшим образом. Но в дальнейшем стоит обратить внимание на характер этих зависимостей, поскольку они являются усреднённым результатом по трём повторностям.

В 3 подразделе 3 раздела продемонстрированы результаты исследования устойчивости БСА, меченого флуорофорами и их комплексами. Графическая визуализация части результатов представлена на Рисунке 6.

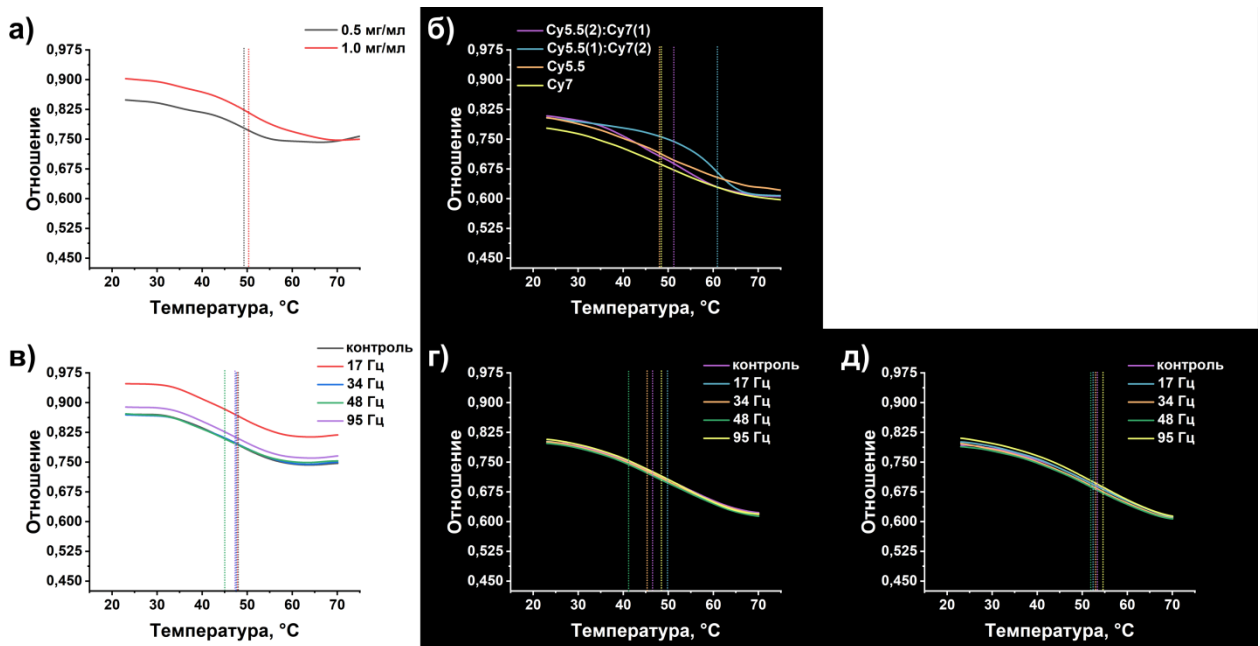


Рисунок 6 – Графики зависимости F350/F330 а) БСА в деионизате; б) БСА, меченого флуорофорами Cy5.5, Cy7 и их комплексами; в) БСА в деионизате после

воздействия КНЧ-ПМП; г) меченого комплексом  $\text{Cu5.5(2):Cu7(1)}$  БСА и д) меченого комплексом  $\text{Cu5.5(1):Cu7(2)}$  БСА после воздействия магнитным полем от температуры.

Отметим, что значения температуры плавления изменились в худшую сторону для БСА, меченого комплексом  $\text{Cu5.5(2):Cu7(1)}$  и облучённого магнитным полем; но ухудшение температуры незначительно (Рисунок 6 г). Такой же незначительный сдвиг в большую сторону был с образцами, мечеными комплексом  $\text{Cu5.5(1):Cu7(2)}$  (Рисунок 6 д). Но наличие меток в целом ухудшило устойчивость белка, судя по значениям  $F350/F330$  (Рисунок 6).

Для ряда меченых образцов после воздействия магнитным полем также провели изотермический тест, результаты которого представлены на Рисунке 7. Он показывает, что в течение всех 24 ч все образцы были стабильны без каких-либо отклонений.

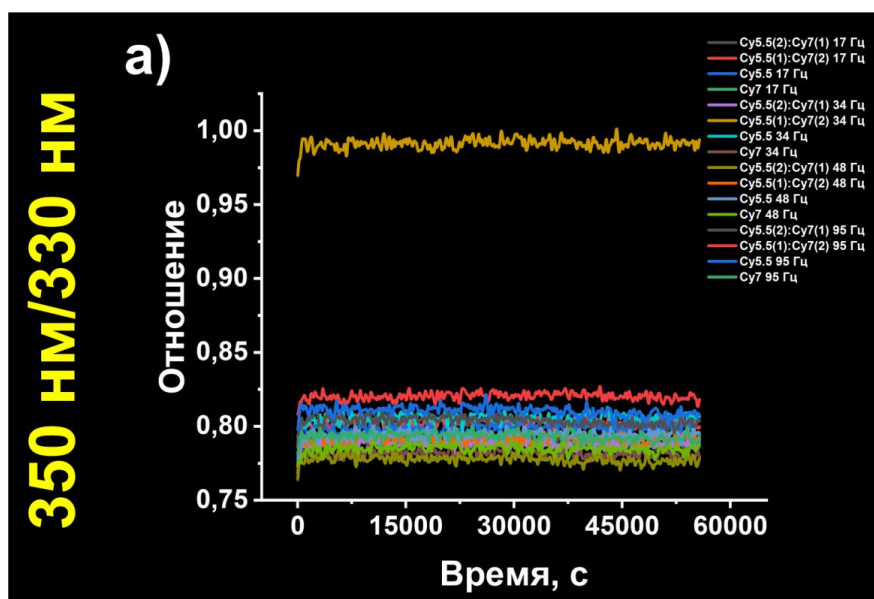


Рисунок 7 – График зависимости  $F350/F330$  меченого БСА после КНЧ-ПМП от времени при постоянной температуре.

Также важным показателем является то, насколько белок остаётся восприимчив к температуре спустя сутки после магнитного воздействия. Часть результатов этого исследования представлена на Рисунке 8.

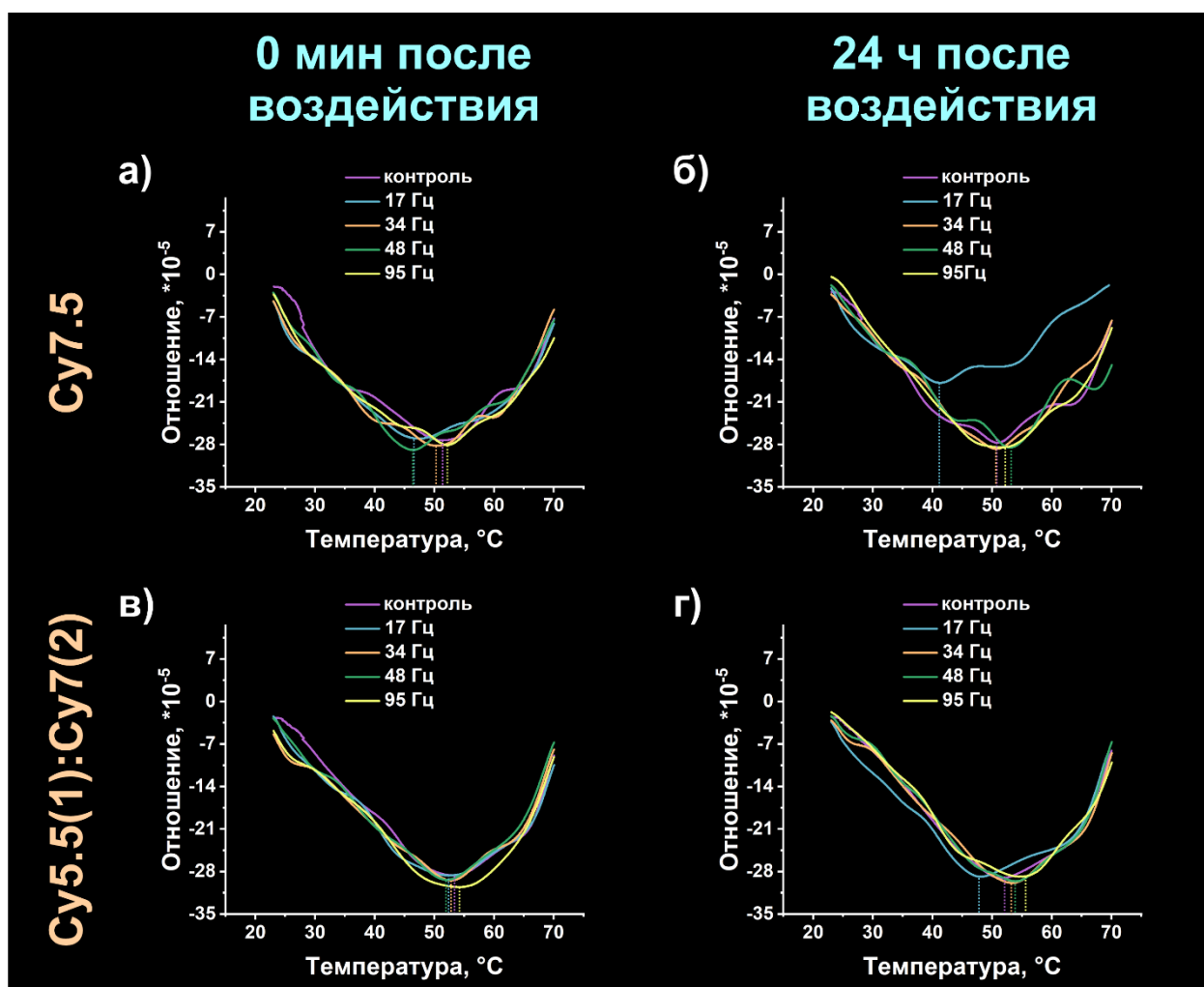


Рисунок 8 – Графики зависимости  $d(F350/F330)$  а) БСА, меченого Су7.5, сразу после воздействия; б) БСА, меченого Су7.5, через 24 ч после воздействия; в) БСА, меченого Су5.5(1):Су7(2), сразу после воздействия; г) БСА, меченого Су5.5(1):Су7(2), через 24 ч после воздействия от температуры.

Оба образца, подвергнутые воздействию поля с частотой 17 Гц, спустя 24 ч после повторного нагревания упали в температуре плавления на 5 °С относительно изначального значения (Рисунок 8). Однако суточное хранение и положительно сказалось на БСА с Су7.5 после 48 Гц воздействия. Его температура плавления повысилась на 7.5 °С (Рисунок 8 б). Но при этом остальные вариации этих двух образцов не претерпели в своей структуре существенных изменений. Также образцы, не представленные на Рисунке 8, не претерпели значительных изменений в своей структуре.

В 4 подразделе 3 раздела представлен обзор подходов и методов к построению и предсказанию структуры белка. Рассмотрены возможные квантовые эффекты в белке, а также различные моменты, связывающие структуру белка и устойчивость его третичной структуры.

В заключении работы приведены краткие выводы из анализа полученных результатов. По итогам проделанной работы можно сделать следующие выводы. Температура плавления БСА зависит от буферной системы, но почти не зависит от концентрации.

При определённых условиях физическое воздействие, такое как негреющее переменное магнитное поле, может положительно сказаться на стабильности белка – 17 Гц и 95 Гц улучшили термическую стабильность белка; также положительно сказалась обработка ультразвуком в течение 15 с.

Если появляется флуоресцирующая метка, то результаты измерений становятся неоднозначными. БСА может медленнее, но раньше денатурировать; или напротив, температура плавления сдвигается на несколько градусов в сторону повышения, но при этом белок изначально менее стабилен даже контрольного образца.

После термического цикла спустя сутки хранения в холодильной камере после воздействия КНЧ-ПМП все образцы остались почти неизменны относительно своих состояний сразу после воздействия. Только обработанные 17-герцовым полем образцы продемонстрировали сильно замедленную денатурацию.

В изотермическом цикле абсолютно все образцы проявили себя как стабильные с течением времени белковые структуры.

Все обсуждаемые выводы работы были доказаны с помощью различных методов анализа получаемых образцов.

Апробация научного исследования представлена 5 научными работами и участием в 4 конференциях. Для более глубокого ознакомления с проделанной работой и её результатами предлагается изучить опубликованные тезисы:

- 1) **Калинова А.Е.,** Винокурова М.Д., Анисимов Р.А., Ломова М.В. Исследование термической стабильности бычьего сывороточного альбумина под действием негреющего переменного магнитного поля // Тезисы докладов "Оптические хемо- и биосенсоры" в рамках ежегодной международной конференции Saratov Fall Meeting - 2025, 29 сентября – 3 октября 2025 г., г. Саратов. – Саратов: изд-во Саратовский источник, 2025. – 62 с.
- 2) **Калинова А.Е.,** Винокурова М.Д., Анисимов Р.А., Ломова М.В. Исследование термической стабильности бычьего сывороточного альбумина под действием ненагревающего переменного магнитного поля // Материалы Международного молодёжного научного форума «ЛОМОНОСОВ-2026» / Отв. ред. И.А. Алешковский, А.В. Андриянов, Е.А. Антипов, Е.И. Зимакова. [Электронный ресурс] – М.: МАКС Пресс, 2026.
- 3) **Калинова А.Е.** Исследование свойств белковых систем ко-визуализации // Химия и технология биологически активных веществ для медицины и фармации. VI Школа молодых ученых: тезисы докладов. – М.: РХТУ им. Д. И. Менделеева, 2026. – 247 с.