

ПОЛУЧЕНИЕ ФЛУОРЕСЦЕНТНО-МЕЧЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ БЫЧЬЕГО СЫВОРОТОЧНОГО АЛЬБУМИНА И ОПРЕДЕЛЕНИЕ ИХ СПЕКТРАЛЬНЫХ ХАРАКТЕРИСТИК

О. А. ЗАВАДСКАЯ¹⁾, Я. В. ФАЛЕТРОВ¹⁾, Н. С. ФРОЛОВА¹⁾, Е. В. РУДАЯ¹⁾, В. М. ШКУМАТОВ¹⁾

¹⁾Учреждение БГУ «Научно-исследовательский институт физико-химических проблем», ул. Ленинградская, 14, 220030, г. Минск, Республика Беларусь

Бычий сывороточный альбумин был модифицирован двумя типами флуоресцентных меток, а именно 4-хлоро-7-нитробензофуразаном и N-гидроксисукцинимидным эфиром 4,4-дифтор-4-боро-3а,4а-диаза-s-индацен пропионозой кислоты. Спектры поглощения и эмиссии флуоресценции полученных модифицированных белков характеризовались $\lambda_{\text{погл. max}} = 470$ нм и $\lambda_{\text{эм. max}} = 560$ нм для конъюгата с 4-хлоро-7-нитробензофуразаном, а также $\lambda_{\text{погл. max}} = 510$ нм и $\lambda_{\text{эм. max}} = 520$ нм – для конъюгата с N-гидроксисукцинимидным эфиром 4,4-дифтор-4-боро-3а,4а-диаза-s-индацен пропионозой кислоты. Сравнительный флуориметрический анализ и анализ методом гель-электрофореза полученных образцов подтверждают, что в случае реакции с N-гидроксисукцинимидным эфиром 4,4-дифтор-4-боро-3а,4а-диаза-s-индацен пропионозой кислоты происходит частичное нековалентное связывание (20 %) данного реагента с бычьим сывороточным альбумином за счет гидрофобных взаимодействий. Полученные данные позволяют заключить, что в ковалентном взаимодействии бычьего сывороточного альбумина с обеими флуоресцентными метками участвуют остатки Lys.

Ключевые слова: бычий сывороточный альбумин; 4-хлоро-7-нитробензофуразан; N-гидроксисукцинимидный эфир 4,4-дифтор-4-боро-3а,4а-диаза-s-индацен пропионозой кислоты.

PREPARATION OF FLUORESCENT-LABELED BOVINE SERUM ALBUMIN AND DETERMINATION OF ITS SPECTRAL CHARACTERISTICS

O. A. ZAVADSKAYA^a, Y. V. FALETROV^a, N. S. FROLOVA^a, E. V. RUDAYA^a, V. M. SHKUMATOV^a

^aResearch Institute for Physical Chemical Problems of the Belarusian State University, Leningradskaya street, 14, 220030, Minsk, Republic of Belarus

Bovine serum albumin was modified by two various types of fluorescent labels, namely 4-chloro-7-nitrobenzofurazan and N-hydroxysuccinimide ester of 4,4-difluor-4-boro-3a,4a-diaza-s-indazeryl propionic acid. Absorption and fluorescence emission spectra of the modified bovine serum albumin characterized by $\lambda_{\text{abs. max}} = 470$ nm and $\lambda_{\text{em. max}} = 560$ nm for the conjugate with namely

Образец цитирования:

Завадская О. А., Фалетров Я. В., Фролова Н. С., Рудая Е. В., Шкуматов В. М. Получение флуоресцентно-меченых препаратов бычьего сывороточного альбумина и определение их спектральных характеристик // Вестн. БГУ. Сер. 2, Химия. Биология. География. 2016. № 2. С. 12–17.

For citation:

Zavadskaya O. A., Faletrov Y. V., Frolova N. S., Rudaya E. V., Shkumatova V. M. Preparation of fluorescent-labeled bovine serum albumin and determination of its spectral characteristics. *Vestnik BGU. Ser. 2, Khimiya. Biol. Geogr.* 2016. No. 2. P. 12–17 (in Russ.).

Авторы:

Ольга Анатольевна Завадская – стажер младшего научного сотрудника.

Ярослав Вячеславович Фалетров – кандидат химических наук; старший научный сотрудник.

Нина Степановна Фролова – научный сотрудник.

Елена Викентьевна Рудая – кандидат биологических наук; старший научный сотрудник.

Владимир Макарович Шкуматов – член-корреспондент НАН Беларуси, доктор биологических наук, профессор; заведующий лабораторией биохимии лекарственных препаратов.

Authors:

Olga Zavadskaya, trainee junior researcher.

helzstaf@gmail.com

Yaroslav Faletrov, PhD (chemistry); senior researcher.

biopharm@bsu.by

Nina Frolova, researcher.

biopharm@bsu.by

Elena Rudaya, PhD (biology); senior researcher.

biopharm@bsu.by

Vladimir Shkumatov, corresponding member of the National Academy of Sciences of Belarus, doctor of science (biology), full professor; head of the laboratory of biochemistry of drugs. vlad.shkumatov@tut.by

4-chloro-7-nitrobenzofurazan as well as $\lambda_{\text{abs. max}} = 510 \text{ nm}$ and $\lambda_{\text{em. max}} = 520 \text{ nm}$ for the conjugate with N-hydroxysuccinimide ester of 4,4-difluor-4-boro-3a,4a-diaza-s-indazeryl propionic acid. Comparative fluorimetric analysis and gel electrophoresis of the samples confirms partial non-covalent binding of N-hydroxysuccinimide ester of 4,4-difluor-4-boro-3a,4a-diaza-s-indazeryl propionic acid (20 %) with bovine serum albumin by hydrophobic interactions. The data allow us to conclude that the covalent interaction between bovine serum albumin and both fluorescent labels realized through Lys residues.

Key words: bovine serum albumin; 4-chloro-7-nitrobenzofurazan; N-hydroxysuccinimide ester of 4,4-difluor-4-boro-3a,4a-diaza-s-indazeryl propionic acid.

Альбумины являются основными белками плазмы крови, которые могут выполнять функции регуляции осмотического давления, транспорта липофильных соединений (гормонов, лекарств) [1], антиоксидантную [2] и некоторые другие. Бычий сывороточный альбумин (БСА) – коммерчески доступный белок, часто используемый в качестве модели для изучения процессов белок-лигандного взаимодействия [1], протеолиза и окисления белков [3], а также как стандарт при гель-хроматографическом и электрофоретическом анализе протеинов. С другой стороны, ковалентная модификация белков реагентами, обладающими флуоресценцией в видимой области, – современный подход, позволяющий чувствительно и селективно детектировать нужный белок, а также регистрировать процессы изменения его структуры и связывания с лигандом [3, 4]. Собственная флуоресценция белков, обусловленная остатками триптофана, используется для аналогичных целей, однако ее максимум в ультрафиолетовой области и небольшой квантовый выход в ряде случаев не позволяют исследовать сложные объекты.

В лаборатории биохимии лекарственных препаратов ранее проведены исследования флуоресцирующих аналогов холестерина в качестве субстратов белков холестериндегидрогеназы, холестериноксидазы и цитохрома P450scs [5–7], а также флуоресцирующих 7-нитробензофуразановых – производных эстрогена [8] и аминокислот [9]. Цель настоящей работы – получение и определение некоторых свойств флуоресцентно-меченых препаратов БСА с использованием двух типов флуорофоров.

Материалы и методы исследования

При исследовании в качестве флуоресцентных меток применялись 4-хлоро-7-нитробензофуразан (NBD-Cl) (*Sigma-Aldrich*, США) и BODIPY FL (4,4-дифтор-4-боро-3a,4a-диаза-s-индацен, BDP) N-гидроксисукцинимидный эфир (BDP NHS) (*Lumiprobe*, США). Белком-мишенью служил БСА (*AppliChem*, Германия). В работе также использовались лизина моногидрохлорид (Lys) и 2-меркаптоэтанол (*Ferak*, Германия), натрия холат, натрия фосфат двухосновный безводный, натрия фосфат одноосновный безводный, натрия бикарбонат, натрия додецилсульфат (SDS), красители бромфеноловый синий и кумасси бриллиантовый синий G-250, этанол (*Sigma-Aldrich*, США) и ацетонитрил марки LiChrosolv (*Merck Millipore*, Германия).

Изучение взаимодействий БСА с флуоресцентными метками NBD-Cl и BDP NHS проводили в 0,1 моль/л фосфатном буфере с pH 8. Измерения флуоресценции выполняли на спектрофлуориметре Solar CM2203 (Беларусь). Параметры записи спектров испускания флуоресценции представлены в табл. 1.

Таблица 1

Параметры записи спектров флуоресценции

Флуоресцентная метка	Длина волны возбуждения флуоресценции (λ_{ex}), нм	Диапазон записи спектров, нм
NBD-Cl	470	480–590
BDP NHS	503	510–680

Определение концентраций исходных растворов флуоресцентных меток (NBD-Cl – в этаноле и BDP NHS – в ацетонитриле) и белка, а также степени связывания белка с NBD-Cl и BDP NHS осуществлялось по спектрам поглощения соединений в 0,1 моль/л фосфатном буфере, записанным на спектрофотометре Solar PB2201 (Беларусь).

Методика получения БСА, меченного BDP NHS (БСА-BDP). Раствор БСА (1 мл, 4 мг/мл в 0,1 моль/л фосфатном буфере, pH 8) смешивали с 42 мкл раствора BDP NHS (0,8 мг/мл в ацетонитриле) и выдерживали реакционную смесь 1 ч при комнатной температуре в защищенном от света месте. После этого образец сконцентрировали ультрацентрифугированием (VIVASPIN 6, 30 000 Да, 3000 г, 10 мин). Для связывания избытка BDP NHS образец обрабатывали 500 мкл раствора Lys (0,5 мг/мл в 0,1 моль/л фосфатном буфере, pH 8) в течение 10 мин. Затем образец снова ультрацентрифугировали, Lys-BDP NHS удалили и дважды промыли образец 0,1 моль/л фосфатным буфером.

Методика получения БСА, меченного NBD-Cl (БСА-NBD). К раствору БСА (2 мл, 1 мг/мл в 0,1 моль/л фосфатном буфере, pH 8) последовательно добавляли 200 мкл карбонатного буфера (100 ммоль/л, pH 8,32), 40 мкл 10 % (мас./об.) водного раствора холата натрия и 150 мкл раствора NBD-Cl (1 мг/мл в этаноле). После тщательного перемешивания реакцию смесь выдерживали 1 ч при 20 °С в защищенном от света месте, концентрировали и отмывали от избытка NBD-Cl, как описано для БСА-BDP.

Полученные образцы меченого БСА анализировали методом электрофореза в полиакриламидном геле по Лэммли. Использовали 10 % концентрирующий и 3 % разделяющий гели. После завершения полимеризации геля в трубочках их погружали в заполненные буферным раствором резервуары с платиновыми электродами. По окончании концентрирования образцов ток в системе поднимали с 20 до 40 мА и поддерживали постоянным до завершения разделения.

Компьютерный анализ структуры БСА и его нековалентного взаимодействия с BDP NHS. Расчет липофильных участков, числа остатков лизина (Lys) и цистеина (Cys) и определение наиболее выгодного сайта связывания BDP NHS осуществлялись с использованием доступной структуры БСА (pdb id: 4OR0), как приведено в статье [6].

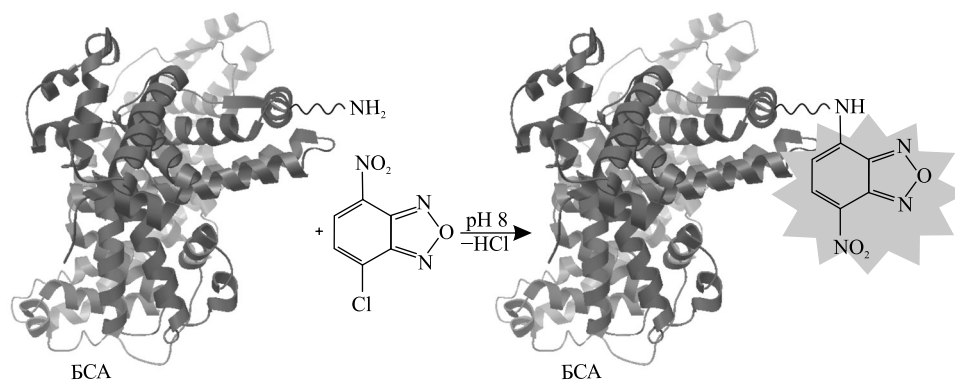
Результаты исследования и их обсуждение

По представленным выше методикам были получены образцы БСА, который модифицировался двумя различными типами флуоресцентных меток – NBD-Cl и BDP NHS. В случае использования NBD-Cl происходило постепенное увеличение флуоресценции при 560 нм. Известно, что данное соединение не обладает собственной флуоресценцией, тогда как при взаимодействии с NH_2 - или SH-группами соединений оно образует флуоресцентные продукты присоединения [10], что и наблюдалось в эксперименте. Описанные в литературе продукты взаимодействия NBD-Cl с аминами, аминокислотами, пептидами, белками [9–12] обладают характерными спектрами флуоресценции с $\lambda_{\text{ex}} = 470$ нм и максимумом эмиссии в диапазоне 530–550 нм. На рис. 1, а, схематично изображено взаимодействие NBD-Cl с остатками Lys в структуре БСА.

Кроме того, NBD-Cl может вступать в реакцию с тиольными соединениями, в том числе с остатками цистеина (Cys) в пептидах и белках. Такие NBD-S-производные, как и NBD-NH-производные, флуоресцируют. Максимумы эмиссии обоих типов производных практически совпадают, в то время как в спектрах возбуждения флуоресценции наблюдаются существенные отличия: для NBD-S-производных характерен пик с максимумом в диапазоне 420–450 нм, в спектрах NBD-NH наблюдается пик с максимумом около 470 нм [2, 10]. В цепи мономера БСА имеется 59 остатков Lys и большая их часть расположена на внешней поверхности глобулы. С другой стороны, из 35 остатков Cys данного белка лишь один (Cys34) не образует внутримолекулярный дисульфидный мостик с каким-либо другим остатком Cys в последовательности, поэтому он доступен для взаимодействия с NBD-Cl. Следовательно, можно предположить, что в реакцию с данным реагентом будут вступать предпочтительно остатки Lys. Кроме того, в условиях эксперимента pH реакционной среды (8) была выше изоэлектрической точки БСА (~5,6), т. е. остатки Lys в основном не протонированы, следовательно, они способны вступать во взаимодействие с электрофильным агентом NBD-Cl. Экспериментальным подтверждением этого является наличие пика с $\lambda_{\text{max}} = 470$ нм в спектре возбуждения флуоресценции, записанном для меченого БСА-NBD.

Флуоресцентная метка BDP NHS изначально обладает собственной флуоресценцией в отличие от NBD-Cl, спектры поглощения и эмиссии флуоресценции которого характеризуются достаточно узкими пиками с максимумами при 503 и 509 нм соответственно. Отметим, что в спектре испускания флуоресценции полученным препаратом БСА-BDP максимум наблюдается при 520 нм, что может быть связано с изменением микроокружения флуорофора в составе препарата. Реагент BDP NHS предназначен для ковалентного связывания с белками посредством селективного взаимодействия с остатками Lys [13], как показано на рис. 1, б. Однако существует возможность «мечения» БСА этим реагентом за счет гидрофобных взаимодействий между флуоресцирующим бородинпиррометеновым фрагментом этого соединения и данным белком. Известно, что на поверхности глобулы БСА имеются липофильные «карманы», которые могут выступать в качестве сайтов связывания различных соединений (лекарств, красителей) [1, 14]. С помощью компьютерного моделирования определено, что молекула БСА обладает приблизительно 20 липофильными участками на своей поверхности, причем для одного из них связывание BDP NHS характеризуется расчетной константой диссоциации около 200 нмоль/л (рис. 2), что может обеспечить прочное связывание этого соединения с белком без образования ковалентной связи.

а



б

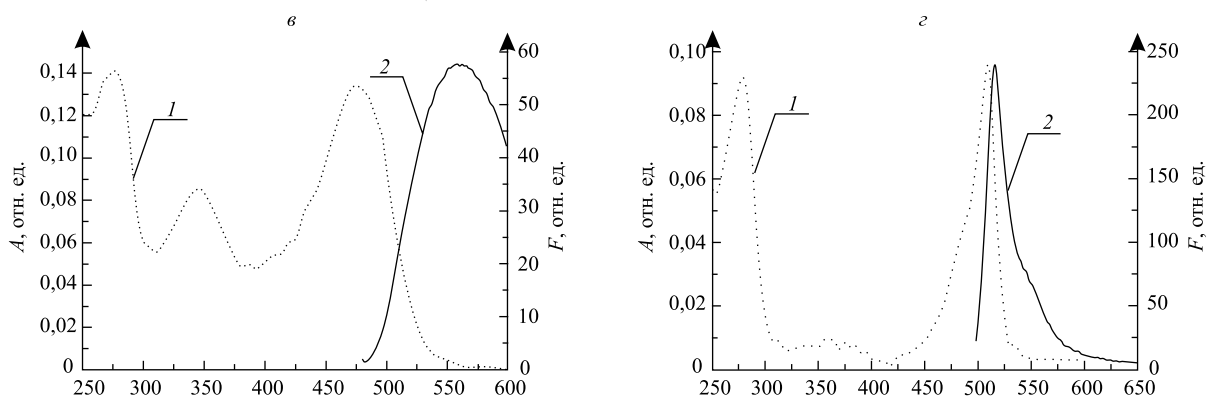
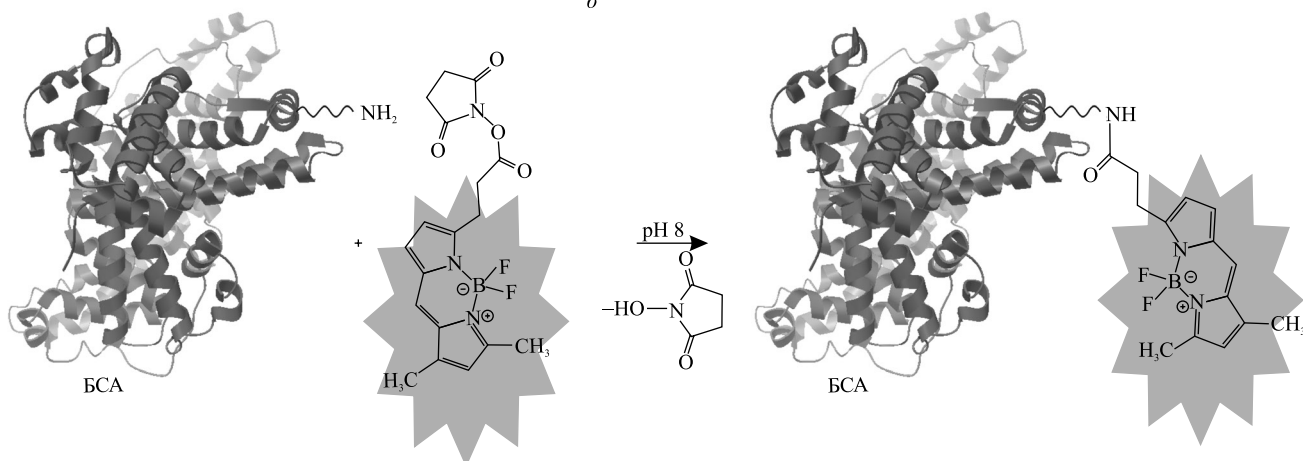


Рис. 1. Схема получения и спектры препаратов флуоресцентно-меченого БСА:

а – взаимодействие БСА с NBD-Cl; б – взаимодействие БСА с BDP NHS;

в – спектры поглощения (1) и флуоресценции (2) БСА-NBD; г – спектры поглощения (1) и флуоресценции (2) БСА-BDP;

A – светопоглощение; F – флуоресценция

В целях количественной оценки соотношения, ковалентно и не ковалентно связанного с белком BDP NHS, часть полученного препарата БСА-BDP обрабатывалась 0,2 % SDS. Непосредственно после обработки образец был подвергнут ультрацентрифугированию (VIVASPIN 6, 30 000 Да, 3000 g, 10 мин), в результате чего получены две флуоресцирующие фракции (рис. 3, а).

Методом сравнительного флуориметрического анализа было установлено, что 80 % флуоресценции опосредовано белковым препаратом, содержащим ковалентно связанный BDP. Также был проведен анализ полученного препарата БСА-BDP методом гель-электрофореза. Результаты анализа представлены на рис. 3, в. Полное совпадение участка, прокрашенного красителем «Кумасси G-250», и флуоресцирующего участка гель-трубочки подтверждает, что основная часть BDP NHS прочно связана с белком за счет ковалентных взаимодействий. Ввиду окислительно-восстановительной активности β-меркаптоэтанола можно было ожидать, что под его воздействием произойдет деградация флуоресцентной метки, однако в эксперименте этого не наблюдалось.

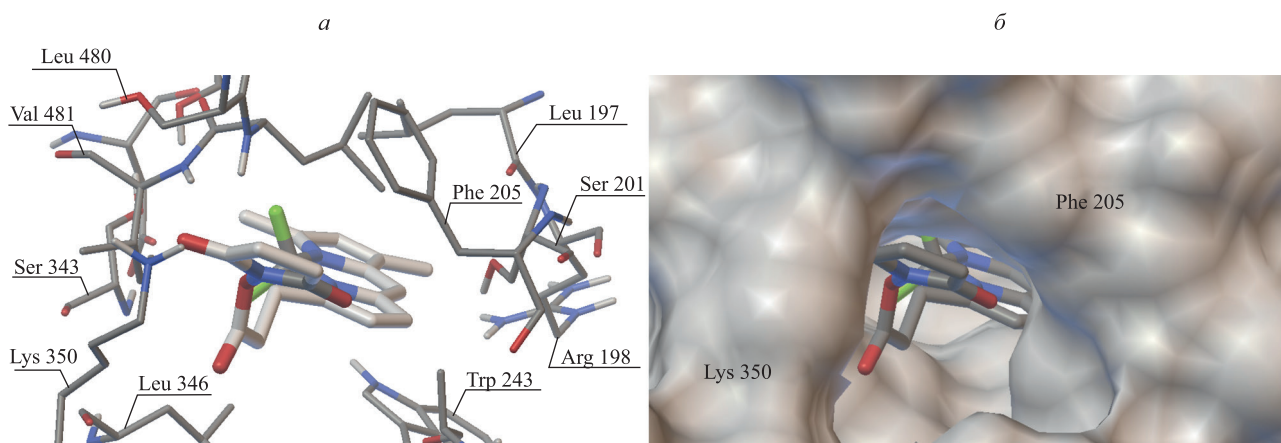


Рис. 2. Рассчитанное положение BDP NHS в липофильном «кармане» БСА:
a – ближайшее аминокислотное окружение молекулы BDP NHS; *б* – расположение BDP NHS относительно поверхности БСА

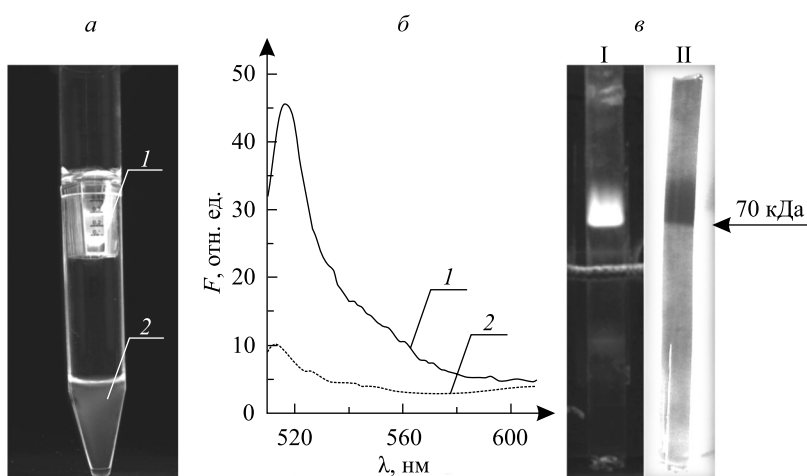


Рис. 3. Доказательства ковалентного присоединения фрагмента BDP к БСА:
a – пробирка после ультрацентрифугирования образца БСА-BDP, обработанного SDS: 1 и 2 – спектр фракций, содержащих соединения с молекулярными массами: $\geq 10\,000$ и $< 10\,000$ отн. ед. соответственно;
б – спектры испускания флуоресценции двух фракций (1 и 2 – в соответствии с рис. 3, *a*);
в – электрофореграмма препарата БСА-BDP, обработанного диссоционной смесью с SDS и β -меркаптоэтанолом:
 I – УФ с длиной волны 365 нм до прокрашивания красителем «Кумасси G-250»; II – в видимом свете после прокрашивания

На основании собственных и литературных данных по коэффициентам молярной экстинкции БСА и флуоресцентных меток были рассчитаны степени связывания белка с NBD-Cl и BDP NHS (табл. 2).

Таблица 2

Спектральные характеристики полученных образцов флуоресцентно-меченого БСА

Образец	λ_{ex} , нм	$\lambda_{\text{em. max}}$, нм	$\lambda_{\text{abs. max}}$, нм	A_{280} , отн. ед.	A_{max} , отн. ед.	Б/М
БСА-NBD	470	560	280, 350, 470	0,142	0,134	1/2
БСА-BDP	510	520	280, 510	0,092	0,096	2/1

Примечания: 1. $\lambda_{\text{em. max}}$ – Длина волны максимума испускания флуоресценции; $\lambda_{\text{abs. max}}$ – длина волны максимума светопоглощения; A_{280} – светопоглощение при длине волны 280 нм; A_{max} – светопоглощение при характеристичной для флуоресцентной метки длине волны (470 либо 510 нм); Б/М – мольное соотношение БСА и флуоресцентной метки в полученных образцах.
 2. В расчетах использовались следующие значения коэффициентов молярной экстинкции: для БСА $\epsilon_{280} = 44\,000 \text{ мол/л}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$, для NBD-NH-производных $\epsilon_{470} = 20\,000 \text{ мол/л}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$, для BDP $\epsilon_{510} = 80\,000 \text{ мол/л}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$.

Таким образом, данные проведенных экспериментов подтверждают частичное (20 %) связывание BDP NHS с белком за счет гидрофобных взаимодействий, которые разрушаются в присутствии SDS. Представленные данные позволяют заключить, что в ковалентном взаимодействии БСА с флуоресцентными метками NBD-Cl и BDP NHS участвуют остатки Lys. Поскольку полученные препараты

флуоресцентно-меченого БСА характеризуются разным мольным соотношением белка и метки, необходимы дальнейшие исследования с целью оптимизации методик получения флуоресцентно-меченых препаратов БСА с заданным соотношением «белок – метка».

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК (REFERENCES)

1. Brown M. B., Edmonds T. E., Miller J. N., Seare N. J. Use of Nile Red as a long-wavelength fluorophore in dual-probe studies of ligand-protein interactions // *J. Fluoresc.* 1993. Vol. 3. P. 129–130 [Brown M. B., Edmonds T. E., Miller J. N., Seare N. J. Use of Nile Red as a long-wavelength fluorophore in dual-probe studies of ligand-protein interactions. *J. Fluoresc.* 1993. No. 3. P. 129–130 (in Engl.)].
2. Carballal S., Radi R., Kirk M. C., Barnes S., Freeman B. A., Alvarez B. Sulfenic acid formation in human serum albumin by hydrogen peroxide and peroxyxynitrite // *Biochemistry.* 2003. Vol. 42, issue 33. P. 9906–9914 [Carballal S., Radi R., Kirk M. C., Barnes S., Freeman B. A., Alvarez B. Sulfenic acid formation in human serum albumin by hydrogen peroxide and peroxyxynitrite. *Biochemistry.* 2003. No. 42, issue 33. P. 9906–9914 (in Engl.)].
3. Pickering A. M., Davies K. J. A. A simple fluorescent labeling method for studies of protein oxidation, protein modification, and proteolysis // *Free Radic. Biol. Med.* 2012. Vol. 52, issue 2. P. 239–246 [Pickering A. M., Davies K. J. A. A simple fluorescent labeling method for studies of protein oxidation, protein modification, and proteolysis. *Free Radic. Biol. Med.* 2012. Vol. 52, issue 2. P. 239–246 (in Engl.)].
4. Bernal-Perez L. F., Prokai L., Ryu Y. Selective N-terminal fluorescent labeling of proteins using 4-chloro-7-nitrobenzofurazan: A method to distinguish protein N-terminal acetylation // *Anal. Biochem.* 2012. Vol. 428, issue 1. P. 13–15 [Bernal-Perez L. F., Prokai L., Ryu Y. Selective N-terminal fluorescent labeling of proteins using 4-chloro-7-nitrobenzofurazan: A method to distinguish protein N-terminal acetylation. *Anal. Biochem.* 2012. Vol. 428, issue 1. P. 13–15 (in Engl.)].
5. Faletrov Y. V., Bialevich K. I., Edimecheva I. P., Kostsin D. G., Rudaya E. V., Slobozhanina E. I., Shkumatov V. M. 22-NBD-cholesterol as a novel fluorescent substrate for cholesterol-converting oxidoreductases // *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 2013. Vol. 134. P. 59–66 [Faletrov Y. V., Bialevich K. I., Edimecheva I. P., Kostsin D. G., Rudaya E. V., Slobozhanina E. I., Shkumatov V. M. 22-NBD-cholesterol as a novel fluorescent substrate for cholesterol-converting oxidoreductases. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 2013. Vol. 134. P. 59–66 (in Engl.)].
6. Фалетров Я. В., Белевич Е. И., Стреха И. С., Костин Д. Г., Едимичева И. П., Слобожанина Е. И., Шкуматов В. М. Флуоресцентный стероид 22-NBD-холестерин – новый эффектор цитохрома P450sc // *Вестн. БГУ. Сер. 2, Химия. Биология. География.* 2010. № 3. P. 39–42 [Faletrov Y. V., Bialevich K. I., Strekha I. S., Kostsin D. G., Edimecheva I. P., Slobozhanina E. I., Shkumatov V. M. Fluorescent steroid 22-NBD-cholesterol – a new effector of cytochrome P450sc. *Vestnik BGU. Ser. 2, Khimiya. Biol. Geogr.* 2010. No. 3. P. 39–42 (in Russ.)].
7. Фалетров Я. В., Фролова Н. С., Костин Д. Г., Слобожанина Е. И., Шкуматов В. М. 22-NBD-холестерин – новый флуоресцентный субстрат холинэстераз холестерин-оксидаз бактерий // *Химия природ. соед.* 2012. № 1. P. 154–155 [Faletrov Y. V., Frolova N. S., Kostsin D. G., Slobozhanina E. I., Shkumatov V. M. 22-NBD-cholesterol, a new fluorescent substrate of bacterial cholesterol oxidases. *Khimiya prirodnikh soedin. = Chem. Nat. Comp.* 2012. No. 1. P. 154–155 (in Russ.)].
8. Faletrov Y. V., Zavadskaya V. A., Horetski M. S., Rudaya E. V., Frolova N. S., Shkumatov V. M. New NBD-labeled fluorescent steroids as molecular probes for mammalian steroid-converting enzymes: in silico evaluation // *Sviridov readings – 2015 : 7th Int. conf. on chemistry and chemical education (Minsk, 7–11 April 2015).* Minsk, 2015. P. 130 [Faletrov Y. V., Zavadskaya V. A., Horetski M. S., Rudaya E. V., Frolova N. S., Shkumatov V. M. New NBD-labeled fluorescent steroids as molecular probes for mammalian steroid-converting enzymes: in silico evaluation. *Sviridov readings – 2015 : 7th Int. conf. on chemistry and chemical education (Minsk, 7–11 April 2015).* Minsk, 2015. P. 130 (in Engl.)].
9. Завадская О. А., Фалетров Я. В., Рудая Е. В., Фролова Н. С., Шкуматов В. М. Разработка анализа аминокислот серина и глицина методом капиллярного электрофореза // *Свободные радикалы в химии и жизни : сб. тез. докл. междунар. конф. (Минск, 25–26 июня 2015 г.).* Минск, 2015. С. 90 [Zavadskaya V. A., Faletrov Y. V., Rudaya E. V., Frolova N. S., Shkumatov V. M. Razrabotka analiza aminokislot serina i glitsina metodom kapilyarnogo elektroforeza. *Free radicals in chemistry and life : book of abstracts of the int. conf. (Minsk, 25–26 June 2015).* Minsk, 2015. P. 90 (in Russ.)].
10. Houk T. W., Ovnich M., Karipides S. pH and polymerization dependence of the site of labeling of actin by 7-chloro-4-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazole // *J. Biol. Chem.* 1983. Vol. 258, issue 9. P. 5419–5423 [Houk T. W., Ovnich M., Karipides S. pH and polymerization dependence of the site of labeling of actin by 7-chloro-4-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazole. *J. Biol. Chem.* 1983. Vol. 258, issue 9. P. 5419–5423 (in Engl.)].
11. Matsushita Y., Takahashi M., Moriguchi I. Binding of fluorescent 7-amino-4-nitrobenzoxadiazole derivatives to bovine serum albumin // *Chem. Pharm. Bull.* 1986. Vol. 34. P. 333–339 [Matsushita Y., Takahashi M., Moriguchi I. Binding of fluorescent 7-amino-4-nitrobenzoxadiazole derivatives to bovine serum albumin. *Chem. Pharm. Bull.* 1986. Vol. 34. P. 333–339 (in Engl.)].
12. Imai K., Watanaba Y., Toyo'oka T. Fluorometric assay of amino acids and amines by use of 7-fluoro-4-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazole(NBD-F) in high-performance liquid chromatography // *Chromatographia.* 1982. Vol. 16, issue 1. P. 214–215 [Imai K., Watanaba Y., Toyo'oka T. Fluorometric assay of amino acids and amines by use of 7-fluoro-4-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazole(NBD-F) in high-performance liquid chromatography. *Chromatographia.* 1982. Vol. 16, issue 1. P. 214–215 (in Engl.)].
13. Wang C., Wang Y., Li Y., Bodemann B., Zhao T., Ma X., Huang G., Hu Z., DeBerardinis R. J., White M. A., Gao J. A nanobuffer reporter library for fine-scale imaging and perturbation of endocytic organelles // *Nat. Commun.* 2015. Vol. 6. 8524 [Wang C., Wang Y., Li Y., Bodemann B., Zhao T., Ma X., Huang G., Hu Z., DeBerardinis R. J., White M. A., Gao J. A nanobuffer reporter library for fine-scale imaging and perturbation of endocytic organelles. *Nat. Commun.* 2015. Vol. 6. 8524 (in Engl.)].
14. Watanabe S., Tani T., Watanabe S., Seno M. Transport of steroid hormones by bovine serum albumin as carrier // *Yakugaku Zasshi.* 1989. Vol. 109, № 1. P. 7–12 [Watanabe S., Tani T., Watanabe S., Seno M. Transport of steroid hormones by bovine serum albumin as carrier. *Yakugaku Zasshi.* 1989. Vol. 109, No. 1. P. 7–12 (in Engl.)].

Статья поступила в редакцию 08.02.2016.
Received by editorial board 08.02.2016.