

UNIVERSITATEA "BABEȘ-BOLYAI" CLUJ-NAPOCA

FACULTATEA DE FIZICĂ

SPECIALIZAREA FIZICĂ MEDICALĂ

LUCRARE DE LICENȚĂ

Coordonator științific

Conf. dr. Dana Maniu

Absolvent

Karla-Antonia Venczel

2024

UNIVERSITATEA "BABEȘ-BOLYAI" CLUJ-NAPOCA

FACULTATEA DE FIZICĂ

SPECIALIZAREA FIZICĂ MEDICALĂ

LUCRARE DE LICENȚĂ

STUDIUL SPECTROSCOPIC AL PROTEINEI BSA

Coordonator științific

Conf. dr. Dana Maniu

Absolvent

Karla-Antonia Venczel

2024

ABSTRACT

Serum albumins, the most abundant proteins in plasma, have an important role in binding and transporting fatty acids, bilirubin, steroids, etc.. Bovine serum albumin (BSA) is a type of serum albumin that comes from bovines, and is widely used in labs due to its similarities in structure and chemical composition with the human serum albumin (HSA).

The focus of this study is to observe BSA's characteristics, namely size and fluorescence, in relation to temperature (from 25°C to 60°C) and pH (equal to 2, 5, 7, 8 and 10). Firstly, dynamic light scattering (DLS) was used in order to measure the size of the protein, which helped to justify the structural changes it undergoes. According to previous research, BSA tends to form sizeable aggregates at lower temperatures which get reduced in size and number the more the temperature increases, and it takes on a relatively compact form at neutral pH, increasing in size the more acidic or basic the solution is. Secondly, the fluorescence of the intrinsic fluorophores from within BSA's structure (tryptophan and tyrosine) was investigated using fluorescence spectroscopy. The luminescence of the tryptophan is more apparent compared to the tyrosine's, but the amount of tyrosine residues is much greater, so their luminescence is comparable.

All in all, the results show that at lower temperatures the sizes of the protein range from around 10 nm to even 6000 nm, proving that aggregates are not only numerous but also quite large, and at high temperatures the sizes range from around 3 nm to 100 nm, where aggregates are less in number and much smaller. In terms of pH, aggregate sizes also show an expected behaviour: at neutral pH the size range is usually smaller compared to a more acidic or basic pH. When it comes to fluorescence, it was found that BSA can be excited with a wavelength of 280 nm and will emit at 340 nm, having a more intense fluorescence at a neutral pH compared to an acidic or basic pH.

Cuprins

1. Introducere.....	4
1.1. Aplicații ale proteinei BSA	5
1.2. Proprietăți ale proteinei BSA	6
2. Tehnici utilizate.....	8
2.1 Dynamic light scattering	8
2.1.1. Mărimea particulei	8
2.1.2. Efectuarea unei măsurători DLS	10
2.2. Spectroscopia de fluorescență	12
2.2.1. Spectrul de fluorescență	13
2.2.2. Legea lui Beer și efectele concentrației	14
2.2.3. Echipamente utilizate în studiul fluorescenței	14
3. Comportamentul proteinei BSA în funcție de diferiți parametri	16
3.1. Efectul variației temperaturii	16
3.2. Efectul variației pH-ului	17
3.3. Efectul variației altor parametri.....	18
4. Fluorescența proteinei BSA	19
5. Modul de lucru.....	21
5.1. Pregătirea probei.....	21
5.2. Efectuarea măsurătorilor.....	21
5.3. Determinarea spectrului de fluorescență.....	22
6. Rezultate obținute	23
6.1 Determinarea dimensiunilor proteinei BSA	23
6.2. Determinarea spectrului de fluorescență a proteinei BSA	33
Concluzii	35
Bibliografie.....	36

1. INTRODUCERE

Proteinele au o importanță incontestabilă pentru ființele vii. Din această categorie fac parte albuminele, proteinele cele mai abundente din plasmă, având rol în legarea și transportul acizilor grași, a bilirubinei, steroizilor, etc [1].

Albumina serică bovină (eng. Bovine Serum Albumin – BSA) e o albumină serică provenită de la vaci (bovine). Structura primară a acesteia conține 583 de reziduuri de amino acid în forma sa matură, are masa moleculară egală cu 66,5 kDa [5], având și fragmente de triptofan (în pozițiile 134 și 212), tirozină și fenilalanină [1]. Din punct de vedere al structurii secundare, BSA prezintă preponderent structuri de tip alfa-helix [28]. Aceste structuri sunt ilustrate în figura 1.1 .

BSA este utilizată în laborator datorită similarității sale cu albumina serică umană (Human Serum Albumine – HSA), în proporție de 76% din punct de vedere al structurii și al compoziției chimice. Printre avantajele utilizării BSA se numără și faptul că aceasta poate fi izolată în formă extrem de pură, este relativ ieftină, foarte stabilă și ușor de obținut [3].

Într-un context comercial, BSA este obținută prin precipitare cu alcool, o metodă dezvoltată de E. J. Cohn și asociații săi în anii 1940 (în urma acestui procedeu se obține albumina BSA cu o puritate de 96%), sau prin tratament termic. Alte metode pentru îndepărtarea impurităților sunt cristalizarea, electroforeza preparativă, cromatografia cu schimb ionic sau de afinitate (elimină glicoproteinele), tratamentul termic (elimină globulinele), tratamentul cu pH scăzut, tratamentul cu cărbune, precipitarea cu solvenți organici (de exemplu, izooctan) și tratamentul la temperatură scăzută. Tratamentul cu cărbune și precipitarea cu solvent organic îndepărtează acizii grași [6].

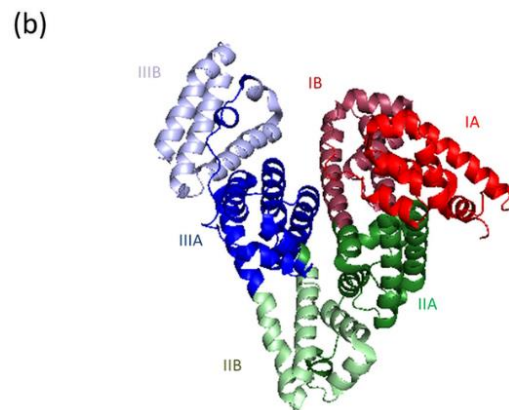
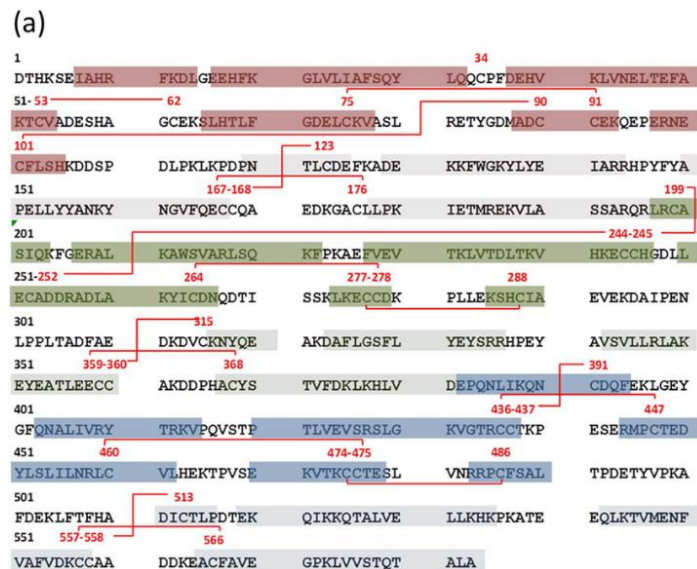


Fig. 1.1: Structura primară (a) și cea secundară (b) a proteinei BSA
https://www.researchgate.net/figure/Bovine-serum-albumin-primary-a-and-secondary-b-structures-the-latter-with-indication_fig2_281821304

1.1. Aplicații ale proteinei BSA

Datorită capacității sale de a se lega de diferiți compuși și de a-i transporta în corp prin intermediul sistemului circulator, BSA este utilizată în numeroase aplicații biochimice. Fiind o proteină mică, stabilă și oarecum nereactivă cu alte proteine, e deseori utilizată ca blocker în imunohistochimie. Astfel, blocker-ul BSA, prin reactivitatea sa scăzută, va determina ca anticorpii să se lege de antigenii de interes, îmbunătățind sensibilitatea prin reducerea zgomotului de fundal. De asemenea, aceasta mai este utilizată ca nutrient în culturile celulare și microbiene, pentru a determina cantitățile altor proteine prin compararea unor cantități necunoscute ale acestora cu cantități cunoscute de BSA, ca izolator temporar pentru substanțele ce blochează activitatea unei enzime, sau ca șablon pentru sintetizarea nanostructurilor [5].

1.2. Proprietăți ale proteinei BSA

a) Capacitatea de legare

BSA se leagă cu ușurință de moleculele prezente în mediul în care se află (acizi grași, hormoni, peptide), facilitând astfel transportul acestor molecule. De asemenea, proprietățile sale antioxidante determină reducerea stresului celular, a deteriorărilor și la captarea radicalilor liberi nocivi [4].

b) Capacitatea de blocking

Proteina BSA, fiind în general nefosforilată, este adesea recomandată pentru testele care implică anticorpi anti-fosfoproteină. Anticorpul anti-fosfoproteină pot lega proteinele fosforilate găsite în blockerii laptelui (ex. cazeina). Cu toate acestea, este puțin probabil ca anticorpul anti-fosfoproteină să se lege de BSA, reducând astfel fondul [4].

c) Stabilizare

BSA poate fi utilizată ca stabilizator în vaccinuri, precum și în alte produse biologice pentru a preveni degradarea [6].

d) Solubilitate

Albuminele sunt foarte solubile în apă, putând fi precipitate doar de concentrații mari de săruri neutre. Stabilitatea soluției de BSA este foarte bună, motiv pentru care este folosită pentru stabilizarea altor proteine solubilizate [6].

e) Sensibilitate la temperatură și Ph

Denaturarea proteinei BSA prin creșterea temperaturii determină modificări ireversibile (imposibilitatea de a se renatura) și duce la oligomerizarea proteinei, fiind obținuți astfel monomeri ce vor adera mult mai ușor la alte molecule [7].

pH-ul determină sarcina la suprafața moleculei și, implicit, comportamentul moleculelor de BSA. Acestea își mențin structura nativă cât timp pH-ul are o valoare între 4 și 8, în caz contrar modificându-și structura. La pH-uri apropiate de 4 (ex. 4,5), moleculele de BSA formează agregate, iar la pH-uri mai ridicate (ex. 8 sau 10), acestea tind să se stabilizeze, fiind prevenită agregarea [9].

f) Fluorescență

BSA prezintă o fluorescență intrinsecă datorită celor două reziduuri de triptofan, care emit în domeniul UV. Fluorescența proteinei BSA poate fi influențată de interacțiunile cu alte molecule, fapt care ajută la studierea anumitor legături din structura proteinei [10].

2. TEHNICILE UTILIZATE

2.1. Dynamic light scattering

Tehnica DLS (eng. Dynamic Light Scattering - împrăștierea dinamică a luminii) se bazează pe interacțiunea luminii cu câmpul electric al unei particule mici sau al unei molecule [15], intensitatea luminii împrăștiată fiind înregistrată de un detector. Undele împrăștiate vor fi fie în antifază, anulându-se reciproc, fie în fază, producând un semnal detectabil. Corelația dintre intensitatea cu care fluctuează lumina împrăștiată și timp (de ordinul ns- μ s), este analizată cu scopul de a determina cât de repede fluctuează aceasta și, implicit, pentru a afla informații despre macromoleculele studiate [17].

2.1.1. Mărimea particulei

Particula, fiind un corp tridimensional, poate fi descrisă printr-un singur număr prin utilizarea unui diametru sferic echivalent. În funcție de tehnica de măsurare folosită, pot fi obținute mărimi diferite pentru aceeași probă, conform figurii 2.1 [15].

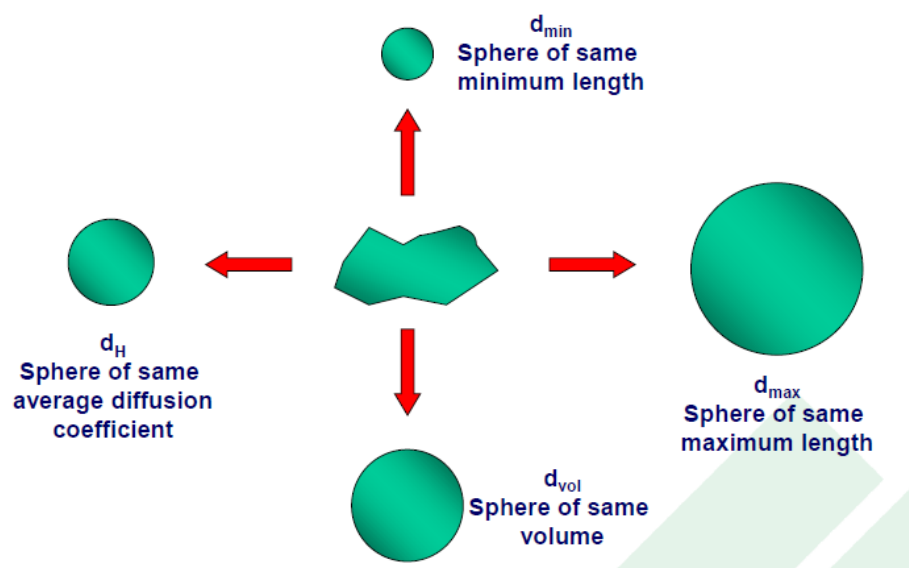


Fig. 2.1: Dimensiunile sferelor echivalente

[15]

Mărimea particulei măsurată prin intermediul unui instrument DLS este diametrul sferei ce difuzează în același interval de timp în care este efectuată măsurătoarea. Mai precis, tehnica DLS se folosește de mișcarea Browniană a particulelor pentru a le determina dimensiunea [16].

Această mișcare a macromoleculor este influențată de mărimea lor, de temperatură și de vâscozitatea solventului. Comportamentul macromoleculor este determinat de dimensiunea pe care o au astfel: moleculele mari vor difuza mai lent, neschimbându-și poziția prea mult în timp, pe când particulele mici își vor schimba poziția într-un timp scurt (acest comportament este ilustrat în figura 2.2) [17].

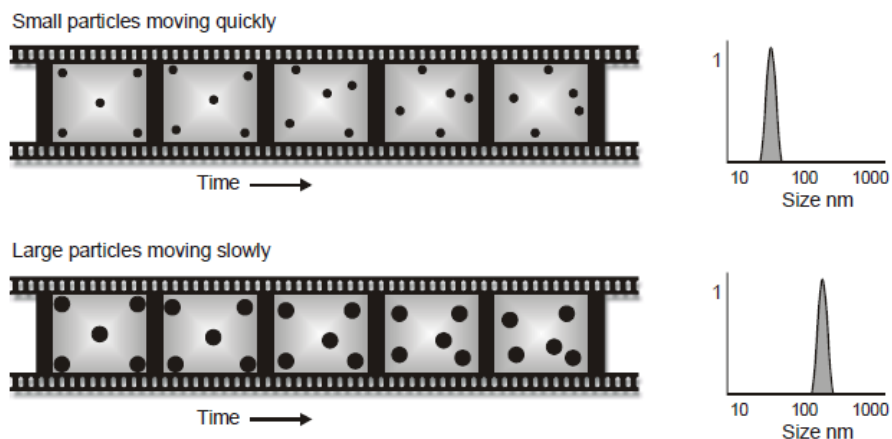


Fig. 2.2: Modul în care mărimea particulelor determină mișcarea acestora [16]

Viteza mișcării Browniene este descrisă cu ajutorul coeficientului de difuzie D , care poate descrie dimensiunea unei particule prin intermediul ecuației Stokes-Einstein:

$$d_H = \frac{kT}{3\pi\eta D}$$

unde d_H = diametrul hidrodinamic, k = constanta Boltzmann, T = temperatura absolută, η = vâscozitatea și D = coeficientul de difuzie [15].

2.1.2. Efectuarea unei măsurători DLS

În figura 2.3 sunt prezentate componentele principale ale unui instrument DLS.

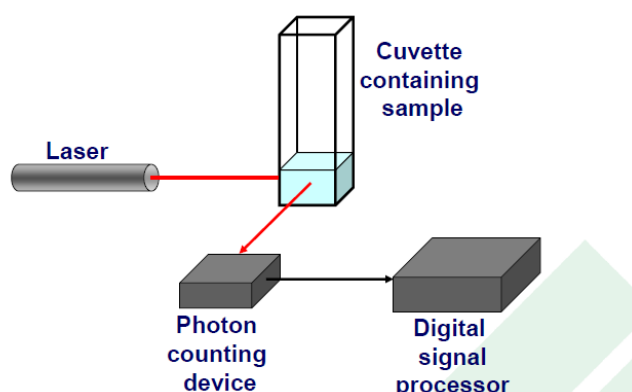


Fig. 2.3: Componentele unui instrument DLS [15]

Instrumentele DLS pot avea detectorul fie la 90° (figura 2.3), fie la 173° sau la 158° , caz în care se folosește un sistem de detectare a retroîmprăștierii. Comparativ cu detecția la 90° , la unghiurile pentru care împrăștieria e mai mare, contribuția efectelor difuziei rotaționale poate fi neglijată în profilele de autocorelare observate, putând astfel să obținem coeficientul de difuzie D . Pe de altă parte, prin detecția la unghiuri mai mari pot fi analizate probele de concentrații mai mari sau probe care au particule de praf sau alte impurități [17].

Intensitatea luminii împrăștiată este descrisă ca funcție de timp. Mișcarea Browniană a particulelor implică variația acestei intensități: particulele mici difuzează mai rapid decât particulele mari, variația intensității fiind mai prevalentă în cazul acestora. În figura 2.4 este ilustrată corelația dintre mărimea particulelor și intensitatea detectată [18].

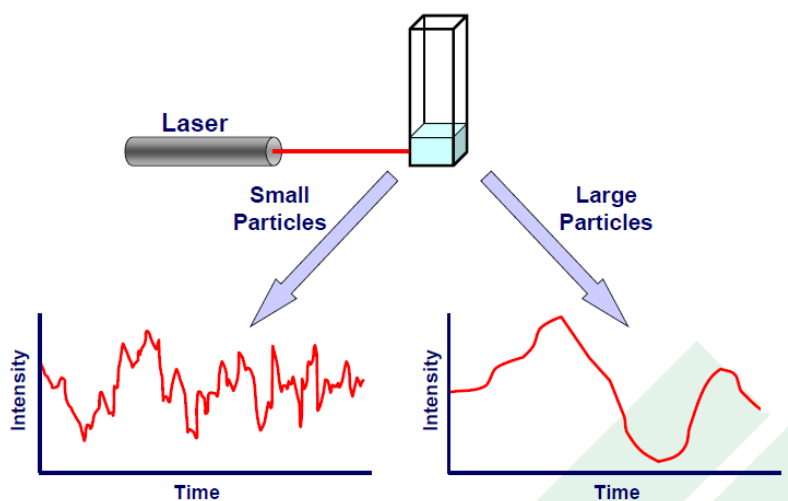


Fig. 2.4: Corelația dintre mărimea particulelor și intensitatea detectată [15]

Pentru procesarea datelor în DLS, este examinată corelația dintre semnalul detectat și el înșuși în intervale scurte de timp: semnalul este defazat cu un timp de întârziere τ , calculând raportul dintre semnalul original și semnalul întârziat.

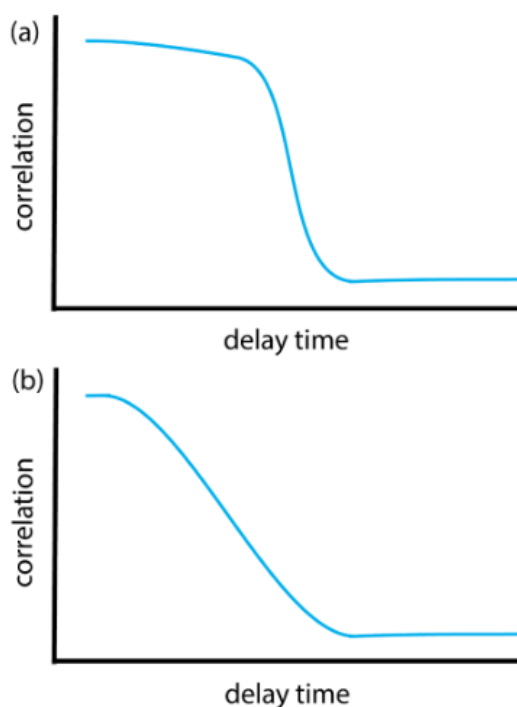


Fig. 2.5: Corelograme pentru particule mici (a) și mari (b)

[https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Analytical_Chemistry/Instrumental_Analysis_\(LibreTexts\)/34%3A_Particle_Size_Determination/34.05%3A_Measuring_Particle_Size_Using_Light_Scattering](https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Analytical_Chemistry/Instrumental_Analysis_(LibreTexts)/34%3A_Particle_Size_Determination/34.05%3A_Measuring_Particle_Size_Using_Light_Scattering)

Dacă τ este mic, raportul tinde spre 1, deoarece particulele nu au avut timp să se deplaseze, iar pentru un τ mai mare, raportul tinde spre 0, fiindcă particulele s-au deplasat pe o distanță semnificativă. Între aceste limite, corelația suferă o scădere exponențială (efect ilustrat în figura 2.5), dată de funcția de corelație $G(\tau)$, având formula:

$$G(\tau) = A[1 + Be^{-2\Gamma\tau}]$$

unde:

$$\Gamma = Dq^2$$

și

$$q = (4\pi n/\lambda_0)\sin(\theta/2)$$

În ecuațiile precedente:

A reprezintă linia de bază a semnalului (baseline-ul),

B reprezintă interceptul funcției,

D este coeficientul de difuzie,

n este indicele de refracție,

λ_0 este lungimea de undă a laserului

θ este unghiul sub care este captată lumina împrăștiată [18].

2.2. Spectroscopia de fluorescență

Fluorescența este fenomenul prin care se emit fotoni ca urmare a absorbției undelor electromagnetice ("lumina") din domeniul UV-Vis. Emisia de fluorescență apare după un timp foarte scurt de la absorbție, iar aceasta se inițiază totdeauna pe nivelul vibrațional fundamental al primei stări excitate electronic de singlet.

Spectroscopia de fluorescență e un tip de spectroscopie ce analizează fluorescența emisă de către molecule, prin intermediul unui aparat numit fluorimetru/spectrofluorimetru. În cadrul acestei tehnici spectroscopice sunt vizate modificările ce apar în stările electronice și vibraționale ale moleculelor, mai precis, molecula va avea o stare electronică fundamentală, de energie mică, și o stare electronică excitată, având o energie mai mare [22].

Fluorescența este un tip de luminescență cauzată de excitarea unui electron de către un foton, urmată de emisia unui alt foton odată cu dezexcitarea acestuia [20]. Adică, molecula absoarbe energie la o lungime de undă la care prezintă moment de dipol de tranziție. Acea energie va determina tranziția moleculei pe nivelul fundamental vibrațional ($v = 0$) al stării electronice fundamentale până pe un nivel excitat vibrațional ($v \neq 0$) al unei stări electronice excitate de singlet, după care va avea loc o relaxare vibrațională până la nivelul fundamental vibrațional ($v = 0$) al stării electronice excitate de singlet. În cele din urmă, molecula se va dezexcita la unul dintre diferitele nivele vibraționale ale stării electronice fundamentale, proces care rezultă în emisia unui foton [22]. Aceste procese sunt ilustrate în diagrama Jablonski (figura 2.6).

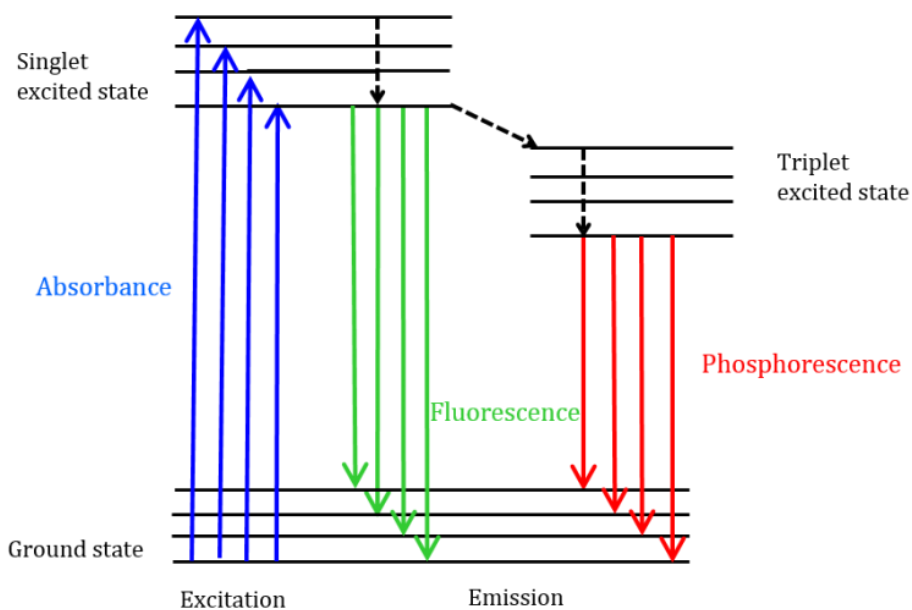


Fig. 2.6: Diagrama Jablonski ce ilustrează diferitele tranziții între stările energetice ale unei molecule.

<https://jascoinc.com/learning-center/theory/spectroscopy/fluorescence-spectroscopy/>

2.2.1. Spectrul de fluorescență

Pentru obținerea unui spectru de fluorescență, moleculele sunt excitate cu o sursă de lumină (de obicei din domeniul UV [22]), cauzând astfel emisia de fluorescență a acestora, iar fotonii emiși (intensitatea emisie de fluorescență) sunt detectați ca funcție de lungimea de undă.

Spectrele de fluorescență pot fi de două tipuri: de emisie sau de excitație. În cazul spectrelor de emisie, lungimea de undă de excitație λ_{exc} este fixă, în timp ce lungimile de undă emise sunt detectate și transpuse într-un grafic al intensității emisie de fluorescență în funcție de lungimea de undă la care a fost emisă λ_{em} . Pe de altă parte, pentru obținerea spectrelor de excitație, lungimea de undă de emisie λ_{em} este fixă, spectrul rezultat reprezintă dependența intensității emisie de fluorescență de lungimea de undă a radiației cu care a fost excitată proba λ_{exc} . Spectrele de emisie și de excitație pentru același fluorofor au aceeași formă în oglindă, spectrul de emisie apărând la lungimi de undă mai mari (pentru care energia e mai mică), comparativ cu cel de excitație.

Cele două tipuri de spectre sunt utilizate cu scopul de a studia modul în care o probă suferă modificări odată cu variația temperaturii, a concentrației, a pH-ului, a polarității, a unor anumite concentrații ionice sau a interacțiunilor cu moleculele din mediul în care se află [20].

2.2.2. Legea lui Beer și efectele concentrației

Deoarece procesul de relaxare de la o stare excitată la cea fundamentală este mult mai lent decât cel de emisie, fluorescența poate oferi mai multe informații referitoare la interacțiunile unui fluorofor cu solvenții și cu moleculele din jur, comparativ cu absorbția.

Astfel, avem formula intensității fluorescenței:

$$F = 2.303 \cdot K \cdot I_0 \cdot \epsilon \cdot b \cdot c$$

unde **K** este o constantă dată de geometria instrumentului, **I₀** este intensitatea luminii de excitație, **ε** este absorbivitatea molară a fluoroforului, **b** este lățimea cuvei, iar **c** este concentrația.

Din moment ce fluorescența nu se raportează la intensitatea luminii incidente precum în cazul absorbției, sensibilitatea acesteia este mult mai mare, nefiind limitată de capacitatea instrumentului de a diferenția între intensitățile detectate și cele incidente. Prin urmare, este nevoie de o cantitate mai mică de substanță pentru a obține un semnal detectabil. În consecință, se pot detecta concentrații mai mici ale substanțelor studiate [21].

2.2.3. Echipamente utilizate în studiul fluorescenței

Pentru înregistrarea spectrelor de fluorescență se folosesc două tipuri de echipamente: fluorimetre cu filtru, care utilizează filtre pentru a separa lumina incidentă de cea fluorescentă, și spectrofluorimetre, care folosesc monocromatoare cu rețele de difracție în locul filtrelor.

În ciuda diferențelor, ambele funcționează pe baza aceluiași principiu: lumina provenită de la o sursă de excitație trece printr-un filtru sau monocromator, după care ajunge la probă. O fracțiune din lumina incidentă e absorbită de către probă, în timp ce unele molecule din aceasta prezintă fluorescență. Apoi, va avea loc emisia de fluorescență în toate direcțiile, o parte din aceasta ajungând la un al doilea filtru sau monocromator, poziționat de obicei la 90° față de raza de lumină incidentă, apoi, la un detector [22]. În figura 2.7 este prezentată schema simplificată a unui fluorimetru.

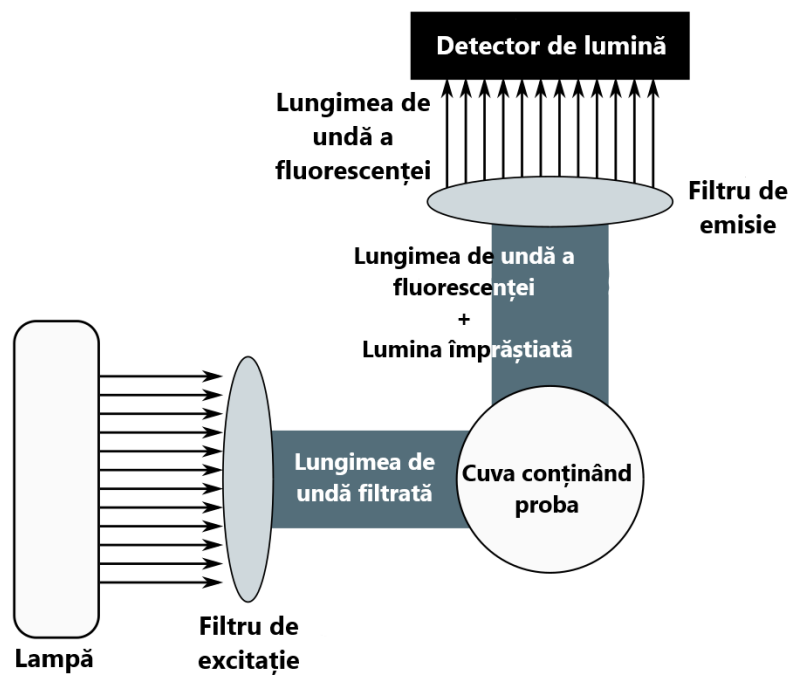


Fig. 2.7: Schema simplificată a unui fluorimetru

<https://practicalninja.com/resources.html>

3. COMPORTAMENTUL PROTEINEI BSA ÎN FUNCȚIE DE DIFERIȚI PARAMETRI

Principalul obiectiv al acestei lucrări este studierea comportamentului proteinei BSA în funcție de temperatură și pH.

3.1. Efectul variației temperaturii

Concentrându-ne strict pe efectul variației temperaturii, proteina trece prin diferite stadii, schimbându-și proprietățile. La temperaturi relativ mici, pot fi observate două procese: formarea de agregate monomer-monomer și formarea de agregate agregat-agregat. Primul proces descrie tendința monomerilor de a se lega unul de celălalt, unindu-se astfel sub forma unui singur agregat de dimensiuni mari. Pe de altă parte, al doilea proces prezintă reacția dintre agregatele deja formate, rezultând în creșterea rapidă a dimensiunilor particulelor [8]. Odată cu creșterea temperaturii, agregatele își reduc atât numărul cât și dimensiunile.

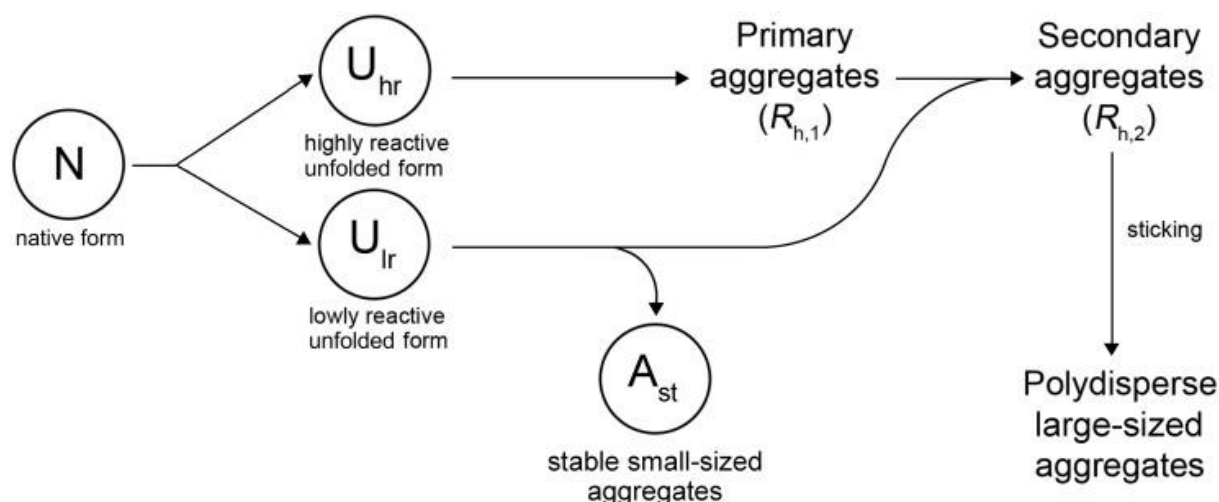


Fig. 3.1: Mecanismul de agregare a proteinei BSA la temperaturi mari (>60°C) [8].

La temperatura de 60°C, are loc denaturarea formei native de BSA, ce rezultă în două tipuri de proteine care se comportă diferit: proteine cu reactivitate mare și proteine cu reactivitate mică (fig. 3.1). Odată cu creșterea temperaturii la 70°C, cele cu reactivitate mare tind să formeze agregate cu ușurință, rezultând în agregate primare, iar celelalte, având reactivitate mică, formează agregate stabile de dimensiuni reduse, care se vor lega ulterior de agregatele primare, rezultând în agregate secundare. La 80°C, are loc cuplarea agregatelor secundare, cu formarea agregatelor de dimensiuni mari.

Important este de menționat faptul că procesul de formare a acestor agregate are loc datorită creșterii constante a temperaturii. Dacă proteina este menținută la aproximativ 60°C,

viteza cu care aceasta se va denatura nu va ramâne proporțională cu viteza de formare a noilor agregate, ci va crește, ducând la denaturarea completă a proteinei [8].

3.2. Efectul variației pH-ului

De asemenea, proteina BSA este puternic influențată și de pH. Aceasta își menține structura nativă între $\text{pH} = 4$ și $\text{pH} = 8$, iar în afara acestui interval își va schimba conformația de pliere. La $\text{pH} = 4,5$, sarcina netă la suprafață devine 0, iar moleculele de BSA vor agrega. Odată cu creșterea pH-ului, va crește și sarcina, repulsia electrostatică dominantă stabilizând moleculele și prevenind agregarea [9].

Dacă dorim să descriem efectul pH-ului la nivel intramolecular, va trebui să începem cu faptul că proteina BSA prezintă 17 legături disulfid care îi dau rigiditatea, dar, în același timp îi permit o modificare semnificativă a formei și a mărimii acesteia în funcție de diverse condiții externe, și un grup sulfhidril (Cys-34). La un pH neutru, legăturile disulfid nu sunt expuse la solvent, aflându-se în interiorul moleculei, în timp ce cisteina liberă (Cys-34) se află într-un „buzunar” hidrofob al moleculei de BSA [8].

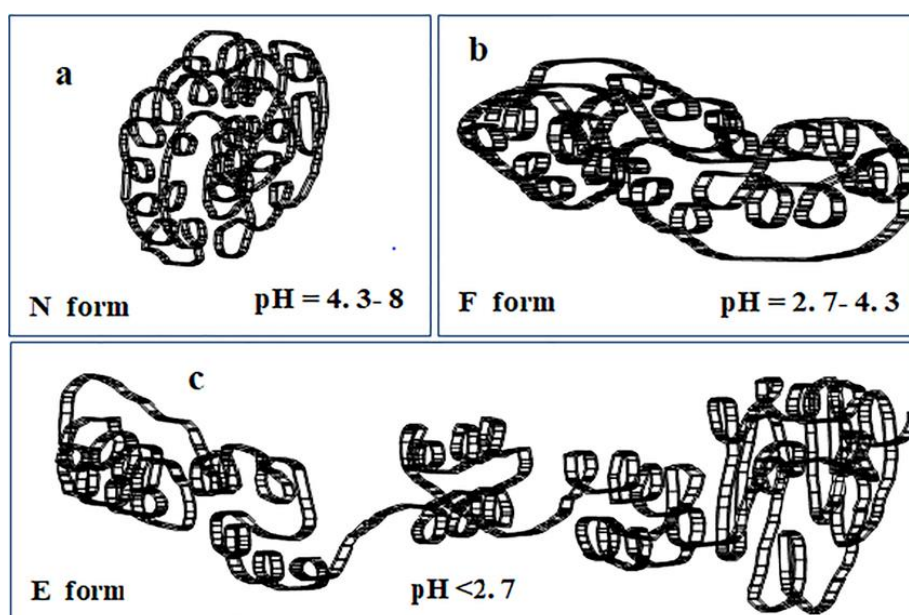


Fig. 3.2: Diagramă schematică a schimbărilor conformaționale ale structurii proteinei BSA în funcție de pH. (a) forma N = Nativă, (b) forma F = Rapidă (eng. Fast), (c) forma E = Expandată

https://www.researchgate.net/figure/Schematic-diagram-of-conformational-changes-of-BSA-structure-as-a-function-of-pH-a-N_fig1_377355716

Molecula de BSA suferă o izomerizare conformațională reversibilă în funcție de pH. Formele pe care aceasta le poate adopta sunt: forma „N” este cea mai compactă și predomină la pH-uri neutre (între 8 și 4,3), forma „F” descrie structura mai extinsă a formei „N”, având dimensiuni mai mari decât aceasta (apărând la pH-uri între 4,3 și 2,7), și forma „E”, ce reprezintă forma cea mai extinsă a proteinei, fiind cea mai mare ca dimensiuni (la pH-uri mai mici de 2,7). De asemenea, odată cu trecerea proteinei de la forma „F” la forma „E”, aceasta va avea o creștere semnificativă a vâscozității intrinseci [25].

3.3. Efectul variației altor parametri

Atât denaturarea proteinei BSA, cât și formarea de agregate la temperaturi înalte, sunt influențate de temperatură, pH, concentrația de proteine, perioada de incubație și concentrația de sare. Odată cu creșterea temperaturii, forma nativă compactă a BSA devine mai flexibilă și mai reactivă [8], în timp ce creșterea pH-ului va determina reducerea numărului de agregate ce se pot forma. Studiile realizate pe această temă, având condiții experimentale și metode diferite, demonstrează că proteina BSA se denaturează într-un interval de temperatură situat între 60°C și 80°C [24].

Denaturarea poate fi încurajată (prin adăugarea de uree) sau prevenită (prin adăugarea de NaCl, glucoză, sucroză sau dodecil sulfat de sodiu - SDS).

Ureea acționează ca un agent denaturant datorită faptului că perturbă legăturile de hidrogen dintre moleculele de apă, reducând astfel stabilitatea stării native a BSA. Astfel, proteina își va modifica structura de la o macromoleculă pliată complet la o formă încolăcită fără structură [30].

NaCl, în schimb, ajută la stabilizarea proteinei BSA. Odată cu adăugarea acesteia, temperatura la care are loc denaturarea este mai ridicată. NaCl are de asemenea relevanță în context fiziologic, având rolul de a menține potențialul membranelor și transducerea semnelor, dar și de a menține concentrația ionică în sânge [31].

Conform experimentelor realizate de către Boye et al., glucoza stabilizează mai eficient denaturarea termică comparativ cu zaharoza. SDS, de altfel, nu doar crește stabilitatea termică a BSA, dar și previne formarea de agregate [32].

4. FLUORESCENȚA PROTEINEI BSA

Proteina BSA prezintă o structură împărțită în trei domenii principale (I, II și III), similare ca structură, care, la rândul lor, sunt împărțite în două subdomenii (A și B) după cum se vede și în figura 4.1. Aceasta prezintă o fluorescență intrinsecă, datorită reziduurilor (aminoacizilor) de triptofan prezente în configurația sa, unul din ele (Trp-134) aflându-se pe suprafața proteinei, în regiunea hidrofilă (regiunea IB), iar celălalt (Trp-212) fiind localizat în „buzunarul” hidrofob de legătură (regiunea IIA) [12] (evidențiate în figura 4.2), dar și cele de tirozină, care sunt distribuite uniform în interiorul structurii [33].

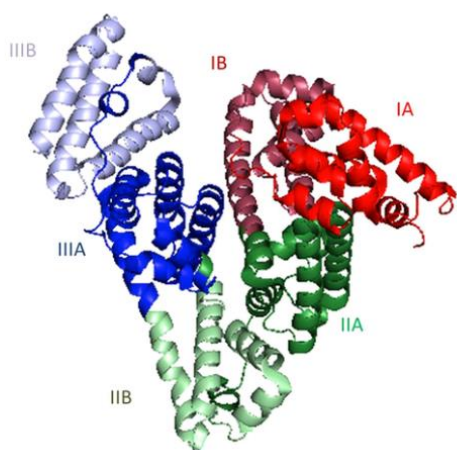


Fig. 4.1: Dispunerea domeniilor și subdomeniilor structurii secundare a proteinei BSA [28]

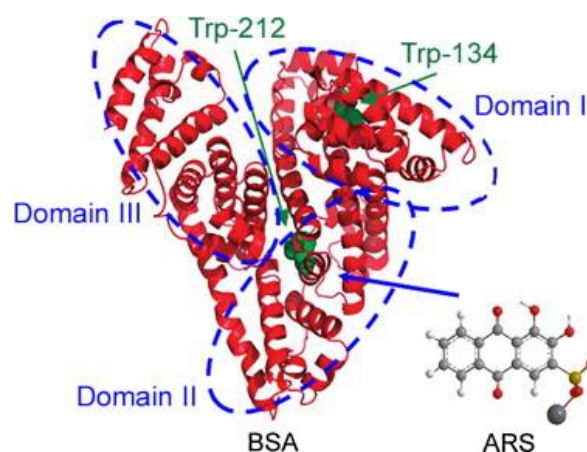


Fig. 4.2: Pozițiile reziduurilor de triptofan în structura terțiară a proteinei BSA [29]

Prin iradierea proteinei la 280 nm, ambele tipuri de reziduuri vor fi excitate, dar dacă se dorește studierea separată a acestora, iradierea la 295 nm rezultă doar în excitarea triptofanului. De asemenea, luminescența acestora când se află în interiorul proteinei diferă. Reziduurile de tirozină au o luminescență mult mai slabă decât cele de triptofan, dar datorită faptului că tirozina se găsește în cantități mai mari, majoritatea luminii de excitație la 280 nm va fi absorbită de aceasta [34].

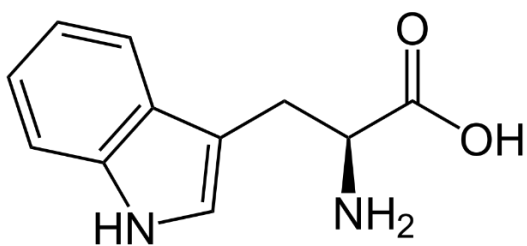


Fig. 4.3: Structura aminoacidului triptofan
<https://ro.wikipedia.org/wiki/Triptofan>

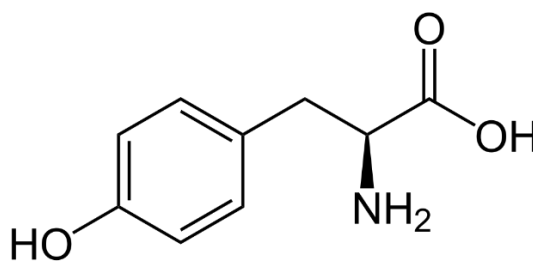


Fig. 4.4: Structura aminoacidului tirozină
<https://ro.wikipedia.org/wiki/Tirozin%C4%83>

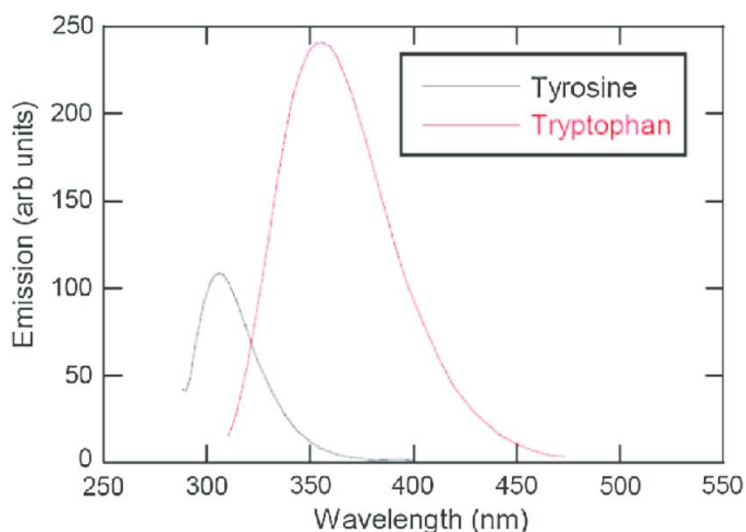


Fig. 4.5: Spectrul de emisie pentru triptofan și tirozină, excitate la 266 nm
https://www.researchgate.net/figure/Emission-spectrum-for-tryptophan-and-tyrosine-excited-at-266-nm_fig4_236967565

Triptofanul poate fi excitat cu lungimi de undă de 230 nm și 280 și prezintă emisie în jur de 350 nm [35], în timp ce tirozina poate fi excitată la 202, 210 și 275 nm, având o emisie la 304 nm [36], fapt care poate fi observat și în figura 4.5.

Intensitatea emisieii de fluorescență este puternic influențată de pH-ul soluției de BSA. Astfel, la pH-uri neutre (de exemplu pH = 7) intensitatea fluorescenței este mai mare, deoarece proteina BSA ia forma N, compactă. La pH-uri mai mici de 3, proteina trece la o formă E, extinsă, și prezintă o fluorescență redusă, dar nu la fel de redusă ca în cazul pH-urilor ridicate. În cazul acestora, mai exact la pH-uri mai mari de 9, proteina se desfășoară, trecând la o formă B (eng. Basic), fenomen ce va determina creșterea potențialului electrostatic, având ca rezultat diminuarea fluorescenței [28].

5. MODUL DE LUCRU

5.1. Pregătirea probei

Am preparat o soluție de concentrație 0,1% de BSA dizolvată în apă astfel: am amestecat 1 mg de proteină cu 1 mL de apă, după care am luat 100 μL din soluție și am adăugat-o la 900 μL de apă, ajungând la concentrația dorită.

Am pipetat 200 μL din soluția de concentrație 0,1% într-o cuvă de model ZEN0112, pe care am introdus-o în aparatul Zetasizer Nano.

5.2. Efectuarea măsurătorilor

Prin intermediul programului „Zetasizer”, am setat parametrii în funcție de măsurătorile dorite: am optat pentru măsurarea dimensiunii moleculelor prin opțiunea "size", am precizat substanța utilizată, "BSA", precum și dispersantul "water"; am setat temperatura la 25° C, după care am realizat 3 seturi de câte 100 de măsurători. Pentru următoarele măsurători, am crescut temperatura cu câte 5 grade până ce am ajuns la temperatura de 60° C, precizând la fiecare un timp de adaptare a substanței la schimbarea de temperatură de 20 s și am realizat câte 3 seturi a câte 30 de măsurători.

Rezultatele obținute au fost prelucrate în programul Origin, cu scopul de a fi analizate.

Am repetat întregul proces pentru diferite pH-uri ale soluției de BSA. În cazul substanței control, pH-ul era egal cu 7, iar pentru următoarele seturi de măsurători am pregătit substanțe cu pH-ul egal cu 2, 5, 8 și 10 astfel: am pregătit câte 10 mL de soluție de HCl 37% 1M și NaOH 1M, după care am pipetat diferite cantități din acestea și le-am amestecat cu câte 200 μL de soluție de BSA. Astfel, pentru a ajunge la pH=2, am adăugat 1 μL soluție de HCl, pentru pH=5, am adăugat 1 μL HCl și 3 μL NaOH, pentru pH=8 am adăugat 1 μL de NaOH, iar pentru pH=10, am adăugat 2 μL de NaOH.

pH	2	5	7	8	10
NaOH	0 μL	3 μL	0 μL	1 μL	2 μL
HCl	1 μL	1 μL	0 μL	0 μL	0 μL

Tabel 5.1: Cantitățile de NaOH și HCl utilizate pentru obținerea fiecărui pH

5.3. Determinarea spectrelor de fluorescență

Am pipetat 700 μL din substanța precedentă, de concentrație 0,1%, într-o cuvă, pe care am introdus-o într-un spectrofluorimetru. Am determinat atât spectrele de emisie, cât și cele de excitație pentru fiecare soluție preparată la diferite pH-uri.

În cazul spectrelor de excitație, excitarea probei s-a făcut cu lungimi de undă din domeniul [200 nm, 335 nm], iar semnalul de fluorescență a fost înregistrat la 341 nm.

În cazul spectrelor de emisie, proba a fost excitată cu o lungime de undă de 280 nm, semnalul de fluorescență fiind înregistrat în domeniul [285 nm, 500 nm].

Spectrele de emisie și de excitație au fost determinate pentru toate soluțiile preparate la diferite pH-uri, lărgimea fantei de intrare fiind setată la 3 mm, iar cea de ieșire de 5 mm.

Pentru măsurători am utilizat o cuvă micro, din cuarț, pentru fluorescență, precum cea din figura 5.1 .

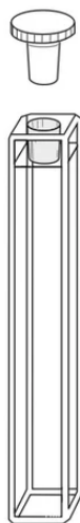


Fig. 5.1: Figura desenată a unei cuve din cuarț pentru fluorescență

<https://whitebearphotonics.com/products/starna-23-3-23-4-23-5-series-square-micro-fluorometer-cells-with-stopper-special-optical-glass-spectrosil-quartz>

6. REZULTATELE OBȚINUTE

Am efectuat măsurători DLS ale dimensiunii moleculelor BSA în soluție la diferite pH-uri și temperaturi. Astfel, am preparat 5 soluții cu diferite pH-uri (2, 5, 7, 8 și 10). Pentru fiecare soluție am efectuat măsurători de tip DLS la diferite temperaturi (de la 25° la 60° C, din 5 în 5° C) pentru a observa modificările conformaționale care apar în urma schimbării condițiilor de mediu (pH și temperatură).

6.1. Determinarea dimensiunilor proteinei BSA

Conform literaturii, proteina BSA are forma unui elipsoid cu dimensiunile de aproximativ 4x4x14 nm [11]. În anumite condiții de temperatura și pH, moleculele de BSA au capacitatea de a se uni, formând agregate de dimensiuni considerabile. Acest fapt se observă și în rezultatele măsurătorilor DLS efectuate.

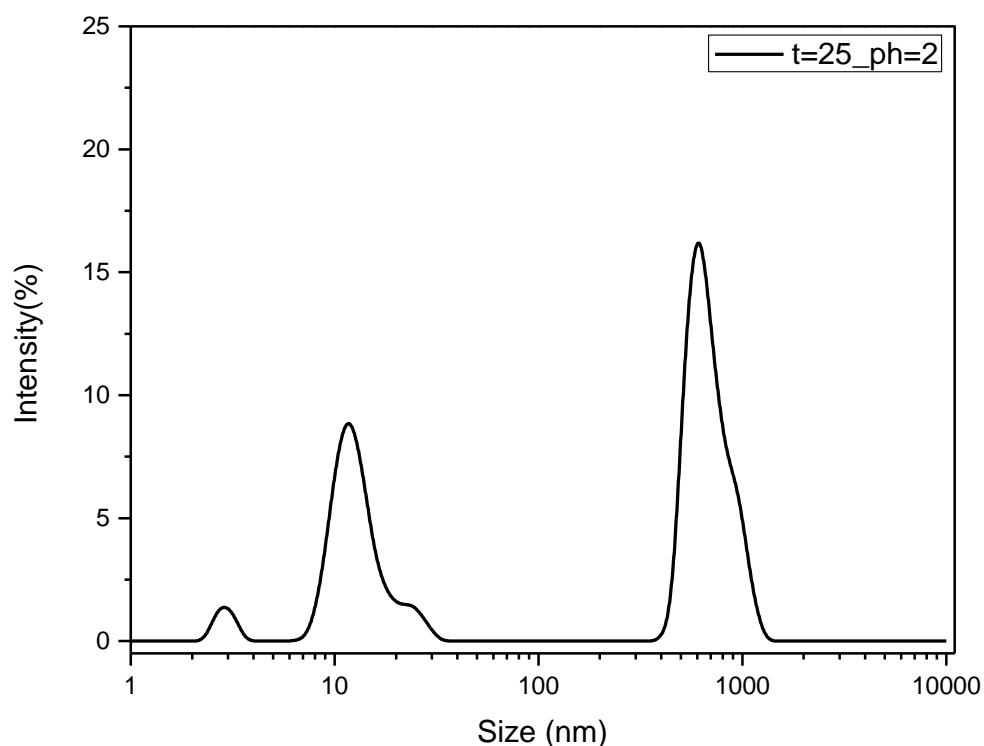


Fig. 6.1: Măsurători realizate utilizând tehnica Dynamic Light Scattering (DLS) ale unei soluții de BSA dizolvată în apă la temperatura $t=25^\circ$ și $\text{pH}=2$. Observăm că proteina prezintă diferite dimensiuni, precum 3, 10 și 500 nm.

Pentru $\text{pH} = 2$, la $t = 25^\circ$ putem observa că numărul de agregate cu dimensiunea de aproximativ 600 nm este mai mare decât numărul de molecule cu dimensiunea de aprox. 12 nm. (figura 6.1), deci agregatele BSA sunt mai numeroase decât moleculele BSA individuale. În plus se observă că agregatele au dimensiuni mari.

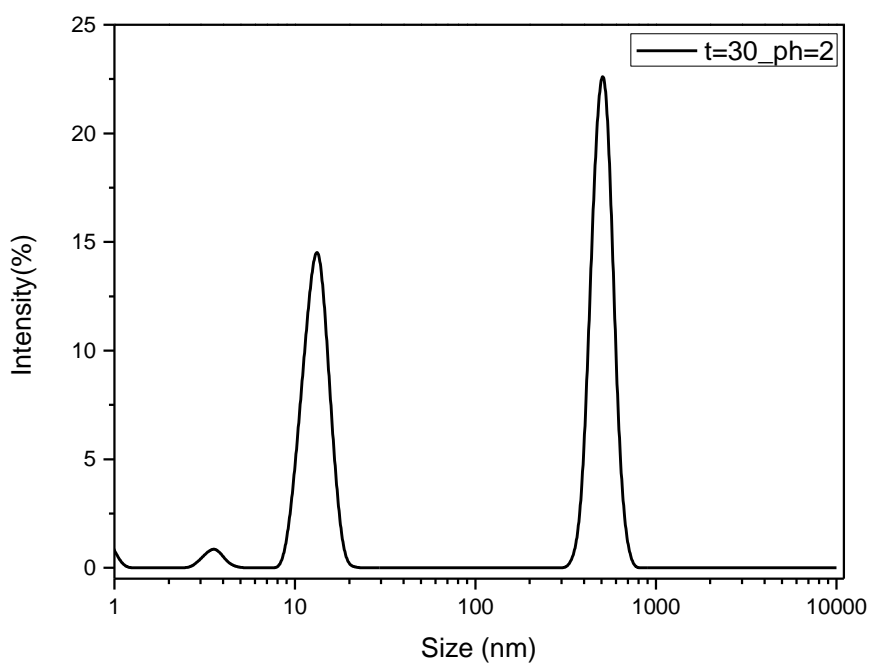


Fig. 6.2: Măsurători DLS realizate la temperatura $t=30^\circ$ și $\text{pH}=2$. Proteina prezintă diferite dimensiuni, precum 3, 10 și 400 nm.

Rezultate similare apar și după ce am crescut temperatura probei cu 5° , după cum se observă în figura 6.2. Există totuși o diferență în dimensiune a agregatelor.

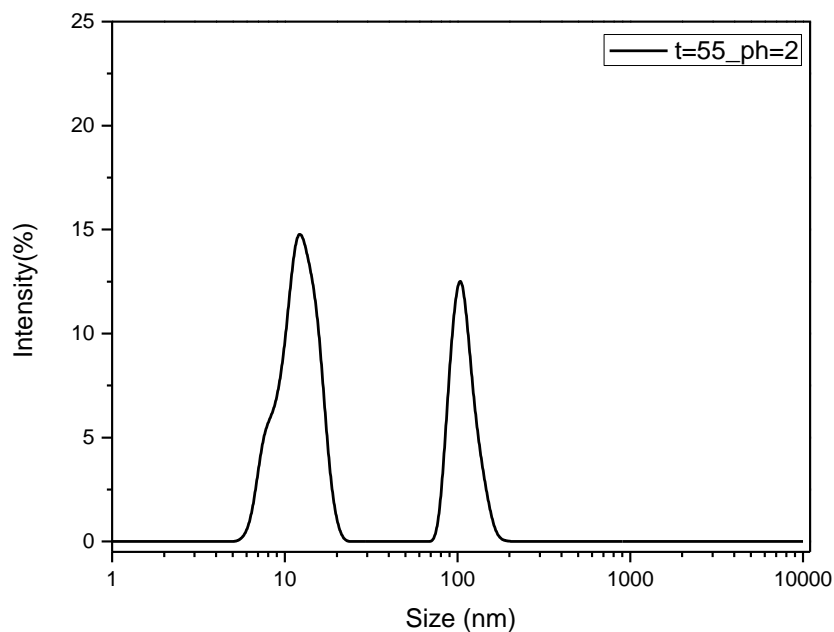


Fig. 6.3: Măsurători DLS realizate la temperatura $t=55^\circ$ și $\text{pH}=2$. Proteina prezintă dimensiunile 10 și 100 nm.

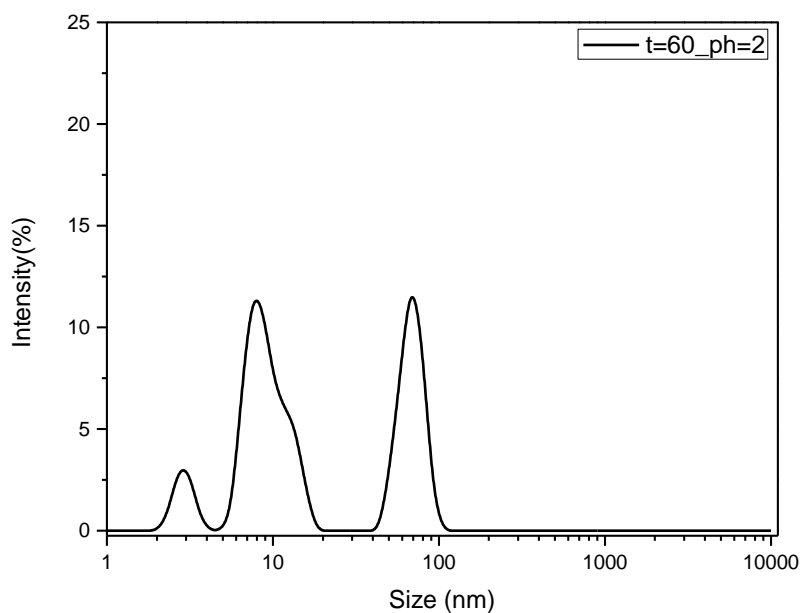


Fig. 6.4: Măsurători DLS realizate la temperatura $t = 60^\circ$ și $\text{pH} = 2$. Proteina prezintă dimensiunile 3, 10 și 70 nm.

Dar, odată cu creșterea temperaturii la $t = 55^\circ$ (figura 6.3) și $t = 60^\circ$ (figura 6.4), sesizăm nu doar că numărul de agregate scade ca rezultat al denaturării proteinei de BSA, ci și că dimensiunea acestora este redusă la aprox. 100 nm, la $t = 60^\circ$ având chiar și o cantitate mai mare de molecule de DSA izolate, cu dimensiuni de 3 nm.

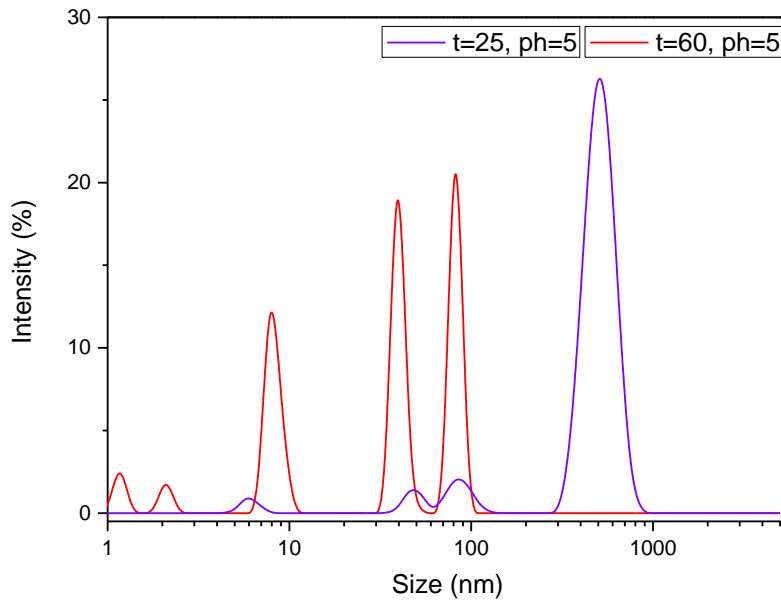


Fig. 6.5: Măsurători DLS realizate la pH = 5, la temperaturile $t = 25^\circ$ și $t = 60^\circ$.

O evoluție mai drastică poate fi observată la modificarea temperaturii în condițiile în care pH-ul soluției este menținut constant, la valoarea pH = 5 (figura 6.5). La $t = 25^\circ$, proteina prezintă diferite dimensiuni precum 6, 50, 90 și 500 nm, fiind predominante agregatele de 500nm, în timp ce la $t=60^\circ$ proteina prezintă dimensiunile 8, 40 și 80 nm, numărul și dimensiunile agregatelor fiind redus din cauza denaturării proteinei.

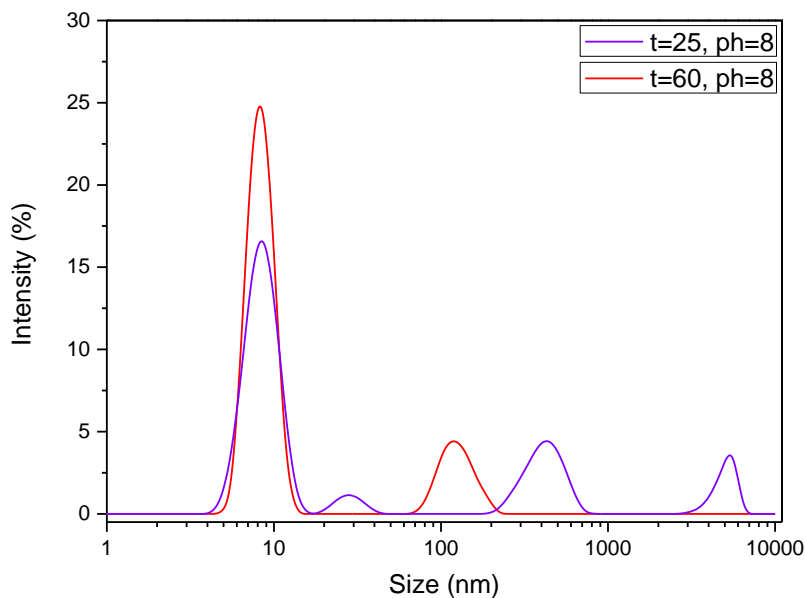


Fig. 6.6: Măsurători DLS realizate la pH = 8, la temperaturile $t = 25^\circ$ și $t = 60^\circ$.

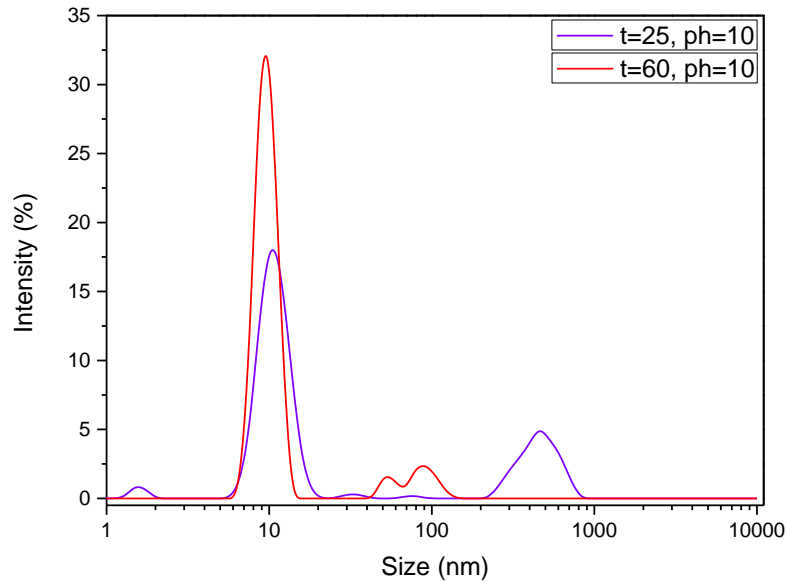


Fig. 6.7: Măsurători DLS realizate la pH=10, la temperaturile $t=25^\circ$ și $t=60^\circ$.

De asemenea, și la pH-uri mai ridicate precum pH=8 și pH=10 am obținut rezultate similare. Pentru pH=8 (figura 6.6), la $t=25^\circ$, proteina prezintă diferite dimensiuni precum 10, 20, 500 și 5000 nm, în timp ce la $t=60^\circ$ proteina prezintă dimensiunile 10 și 100 nm. Pentru pH=10 (figura 6.7), la $t=25^\circ$, proteina prezintă dimensiunile 10 și 500 nm, în timp ce la $t=60^\circ$ proteina prezintă dimensiunile 10, 50 și 100 nm.

În cazul acestora, cantitatea de molecule cu dimensiunea de 10 nm este mult mai semnificativă, datorită faptului că la pH-uri ridicate sarcina la suprafața moleculei crește, repulsia electrostatică prevenind agregarea. [9]

Rezultatele de mai sus sunt sintetizate în următorul tabel:

pH	Temperatură ($^\circ\text{C}$)	Dimensiuni DLS (nm)
2	25	3, 10, 500
	30	3, 10, 400
	55	10, 100
	60	3, 10, 70
5	25	6, 50, 90, 500
	60	8, 40, 80
8	25	10, 250, 500, 5000
	60	10, 100
10	25	10, 500
	60	10, 50, 100

Tabel 6.1: Dimensiunile DLS obținute

În cele din urmă, vom insista asupra efectului pH-ului asupra proteinei BSA la diferite temperaturi.

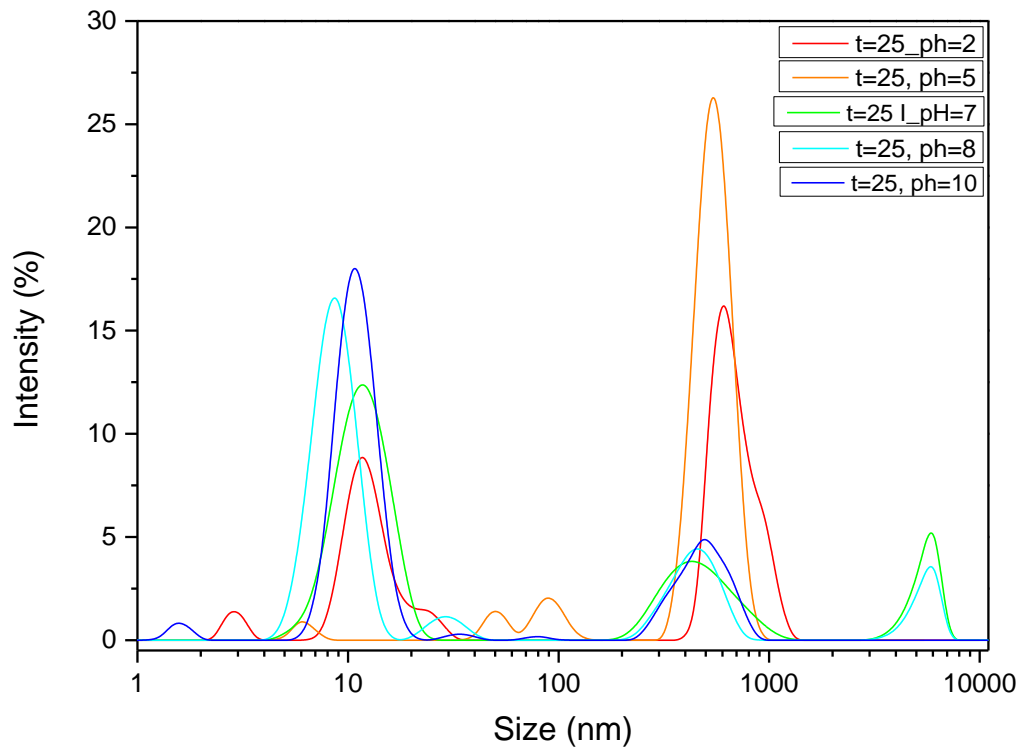


Fig. 6.8: Măsurători DLS realizate la $t=25^\circ$, la diferite pH-uri.

În figura 6.8, se poate observa că dimensiunile cele mai comune, indiferent de pH, sunt cele de 10 și 500 nm. După cum ne așteptam, la pH-uri mai mici (ex. 2 și 5) predomină agregatele de dimensiuni mai mari, precum 500 nm, în timp ce la pH-uri mai mari (ex. 7, 8 și 10) predomină moleculele de dimensiuni mai mici, precum 10 nm.

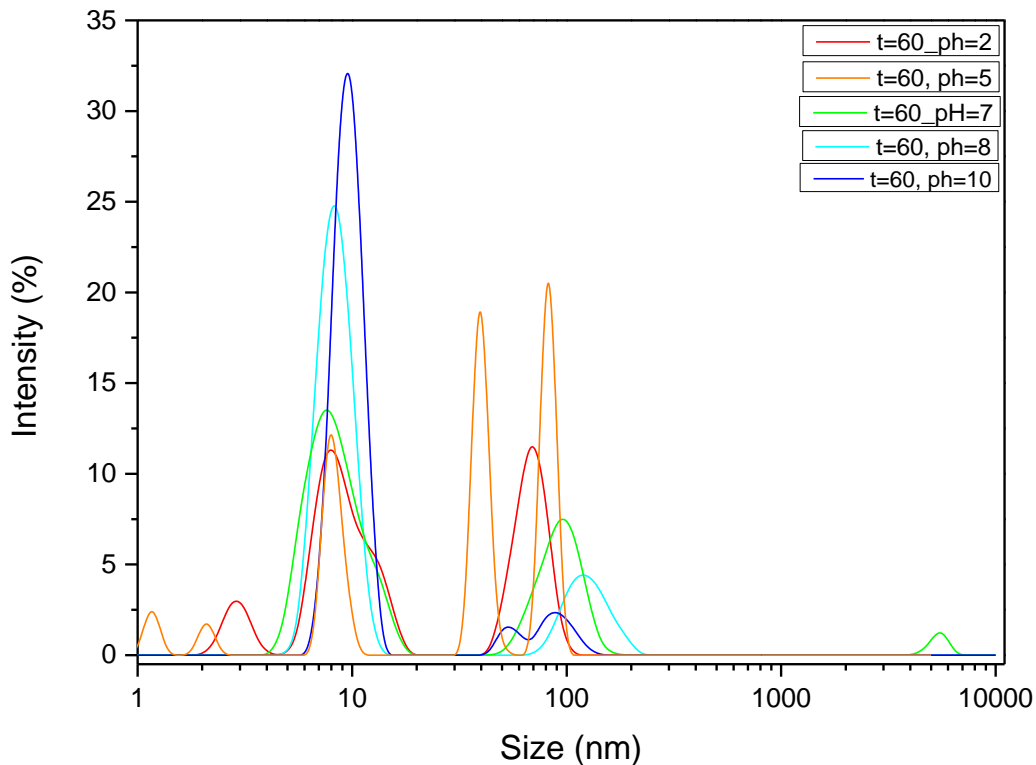


Fig. 6.9: Măsurători DLS realizate la $t=60^\circ$, la diferite pH-uri. Dimensiunile cele mai comune, indiferent de pH, sunt cele de 10 și 100 nm.

La $t=60^\circ$ (figura 6.9) predomină dimensiunile mai mici indiferent de pH, în special cea de 10 nm. Comparativ cu rezultatele obținute la $t=25^\circ$, este evident faptul că agregatele au dimensiuni mai mici și sunt mai reduse ca număr. Deci putem spune că la 60°C este evidentă distrugerea structurii terțiare (sau chiar secundare) a proteinei, datorită ruperii legăturilor de hidrogen (mai slabe) în procesul de denaturare a proteinei BSA.

Distribuția dimensiunilor este destul de haotică la pH-uri mai mici, precum $\text{pH} = 2$ și $\text{pH} = 5$, indiferent de temperatura probei, după cum se poate observa în figurile 6.10 și 6.11. Totuși, la $\text{pH} = 2$ se observă că aproape la toate temperaturile sunt prezente dimensiuni de 10 nm sau foarte apropiate de 10 nm.

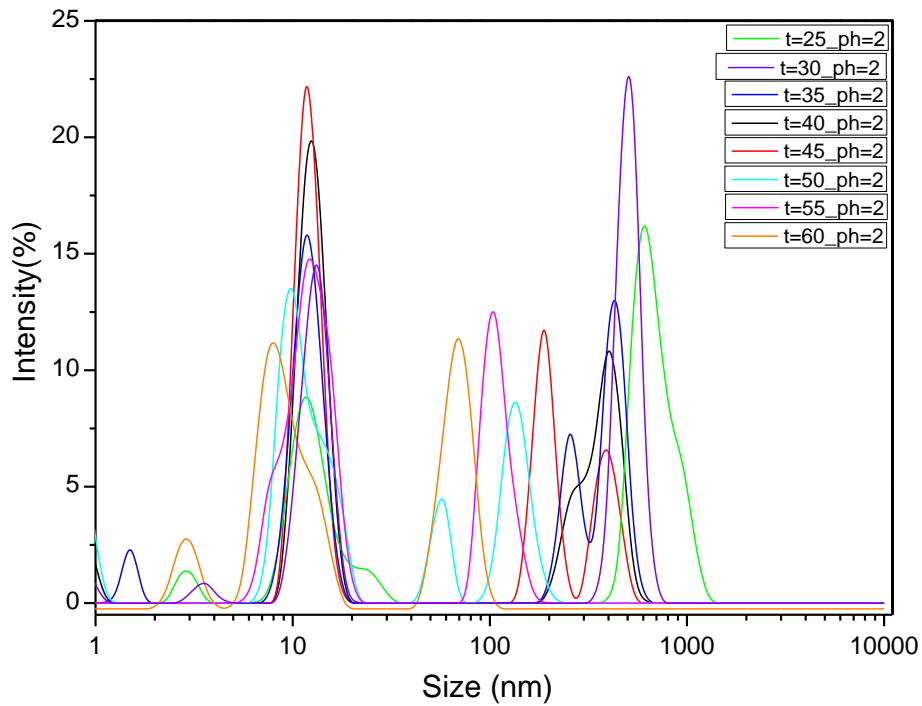


Fig. 6.10: Măsurători DLS realizate la pH=2, la diferite temperaturi. Dimensiunea de 10 nm apare destul de consistent, în rest având o multitudine de dimensiuni, variind de la 50 la 500 nm.

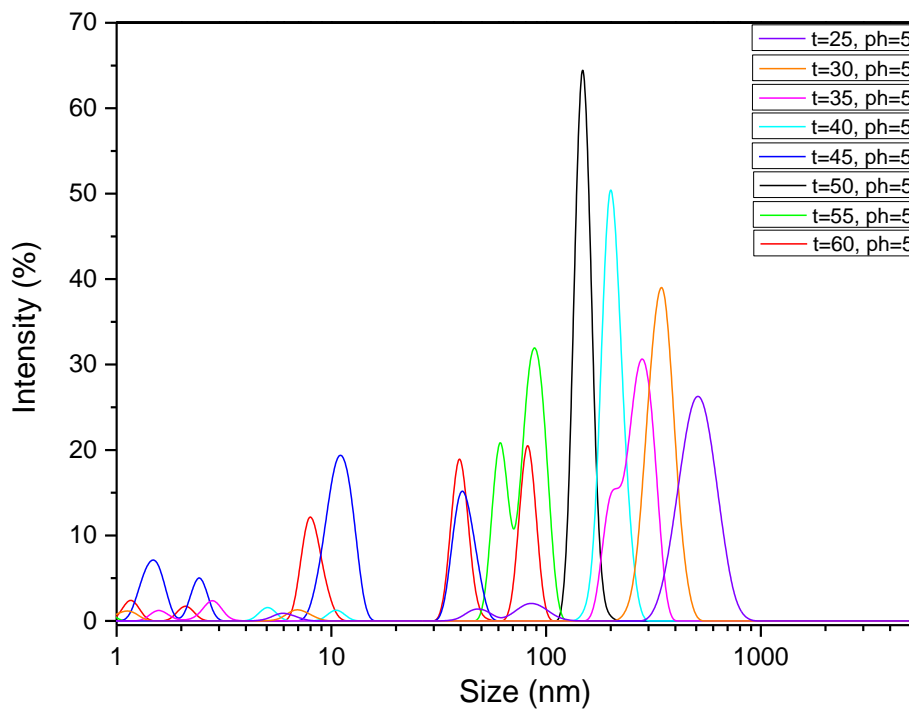


Fig. 6.11: Măsurători DLS realizate la pH=5, la diferite temperaturi. Proteina prezintă o multitudine de dimensiuni.

Pe de altă parte, cu cât pH-ul este mai mare, cu atât spectrele devin mai uniforme (figurile 6.12, 6.13 și 6.14),

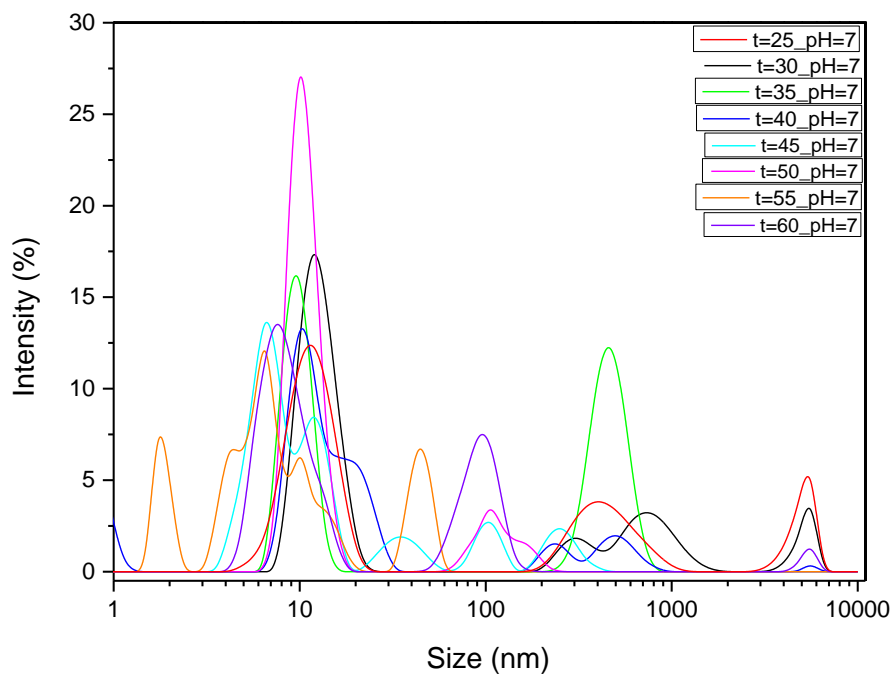


Fig. 6.12: Măsurători DLS realizate la pH=7, la diferite temperaturi.

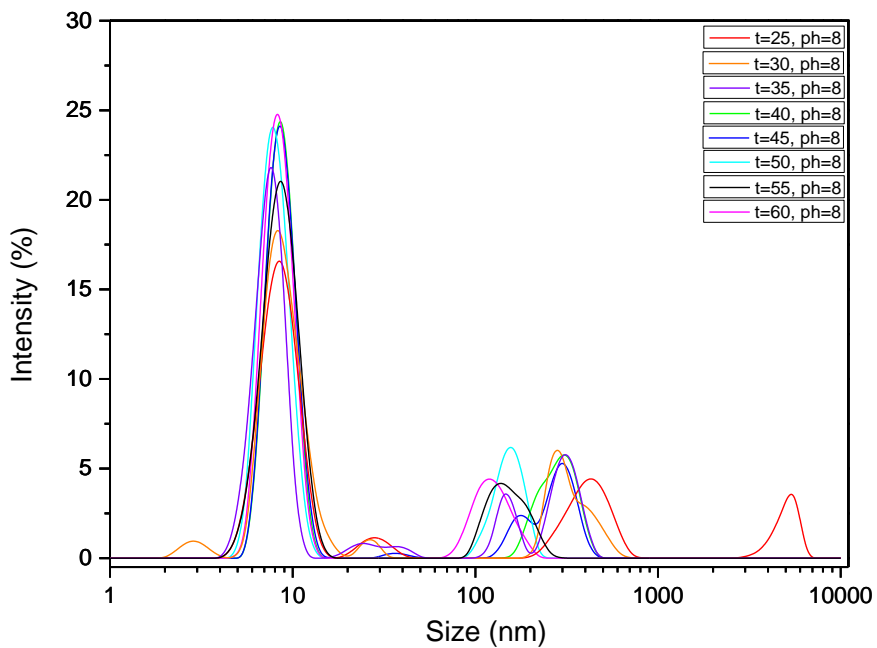


Fig. 6.13: Măsurători DLS realizate la pH=8, la diferite temperaturi.

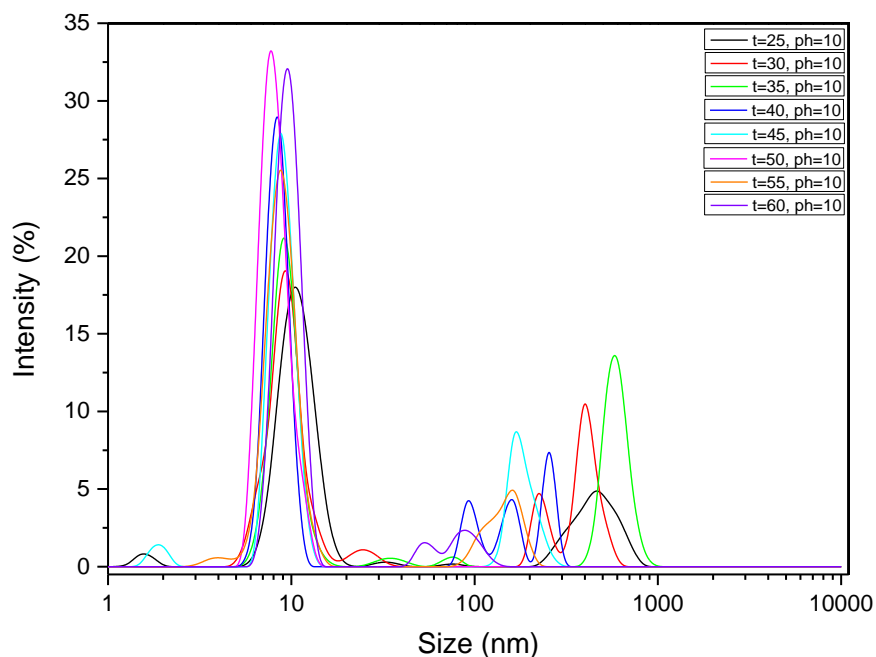


Fig. 6.14: Măsurători DLS realizate la pH=10, la diferite temperaturi.

Conform figurilor 6.12, 6.13 și 6.14 dimensiunea de 10 nm apare mult mai consistent, iar în cazul agregatelor, acestea au un număr redus și o variație în dimensiune între 100 și 600 nm.

Rezultatele de mai sus sunt sintetizate în tabelul 6.2.

Temperatură (°C)	pH	Dimensiuni DLS (nm)
25	2	3, 10, 600
	5	5, 50, 90, 500
	7	10, 400, 6000
	8	8, 30, 500, 5000
	10	2, 10, 500
30	2	3, 10, 500
	5	1, 7, 300
	7	10, 300, 700, 5000
	8	3, 8, 20, 300
	10	10, 20, 200, 400
55	2	10, 100
	5	60, 90
	7	2, 6, 10, 40
	8	9, 100
	10	9, 150
60	2	3, 8, 70
	5	1, 2, 8, 40, 80
	7	70, 100, 5000
	8	70, 100
	10	9, 50, 90

Tabel 6.2: Dimensiunile DLS obținute

Multitudinea de dimensiuni apar din cauza faptului că aparatul Zetasizer sesizează diferite diametre hidrodinamice în funcție de cum sunt orientate moleculele sau agregatele din soluția BSA. Când sunt detectate 2-3 dimensiuni mai mari de 4 nm și 14 nm dar nu peste 30 nm, știm că proteina apare sub formă de monomeri, iar dacă sunt detectate dimensiuni de 30-100 nm e vorba de dimeri/trimeri. Dacă se obțin dimensiuni mai mari de 100 nm, în proba analizată sunt prezente agregate, sau chiar și agregate secundare (de dimensiuni mult mai mari comparativ cu agregatele menționate anterior).

Când pH-ul soluției este neutru, agregatele au o formă sferică, compactă, iar de aceea ar trebui să apară mai puține dimensiuni mari. În schimb, la pH acid sau bazic, forma agregatelor este alungită, deci ar trebui să se obțină mai multe tipuri de dimensiuni mari și foarte mari. Astfel, la pH=7 și pH=8 (figurile 6.12 și 6.13) peak-urile pentru dimensiunile mai mari de 100 nm au intensități mai mici (majoritatea sub 5), în timp ce la pH=2, pH=5 și pH=10 (figurile 6.10, 6.11 și 6.14) peak-urile au intensități mai mari (în jur de 10 sau chiar și peste 60 la pH=5).

6.2. Determinarea spectrului de fluorescență a proteinei BSA

În ceea ce privește fluorescența, proteina BSA prezintă fluorescență intrinsecă datorită celor două reziduuri de triptofan pe care le are în structură. Astfel, prin excitarea probei cu diferite lungimi de undă din domeniul UV, putem afla spectrul de emisie al proteinei. Conform diferitor surse ([12], [13], [14], [22]), triptofanul are o lungime de undă de absorbție maximă de 280 nm și un peak de emisie ce variază între 300 și 350 nm, în funcție de polaritatea mediului.

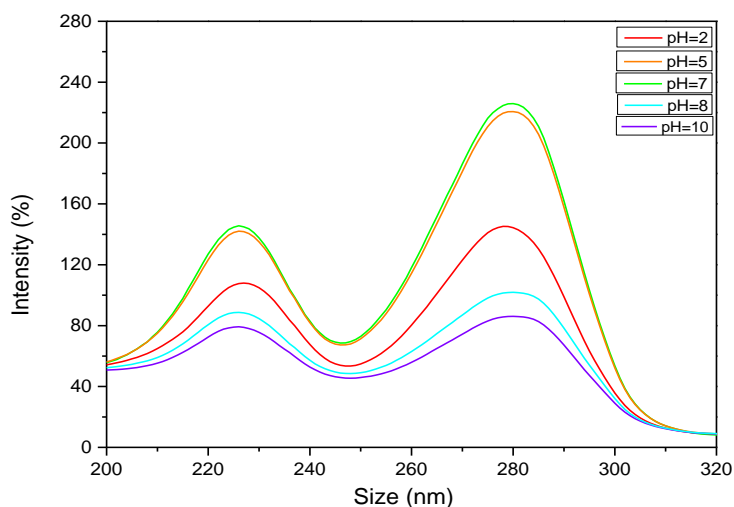


Fig. 6.15: Spectrele de excitație ale unor soluții de BSA la diferite pH-uri și $t=35^{\circ}$.

Din figura 6.15 rezultă faptul că, pentru a avea o emisie la 341 de nm, proba poate fi excitată cu o lungime de undă fie de aproximativ 230 nm, fie de 280 nm.

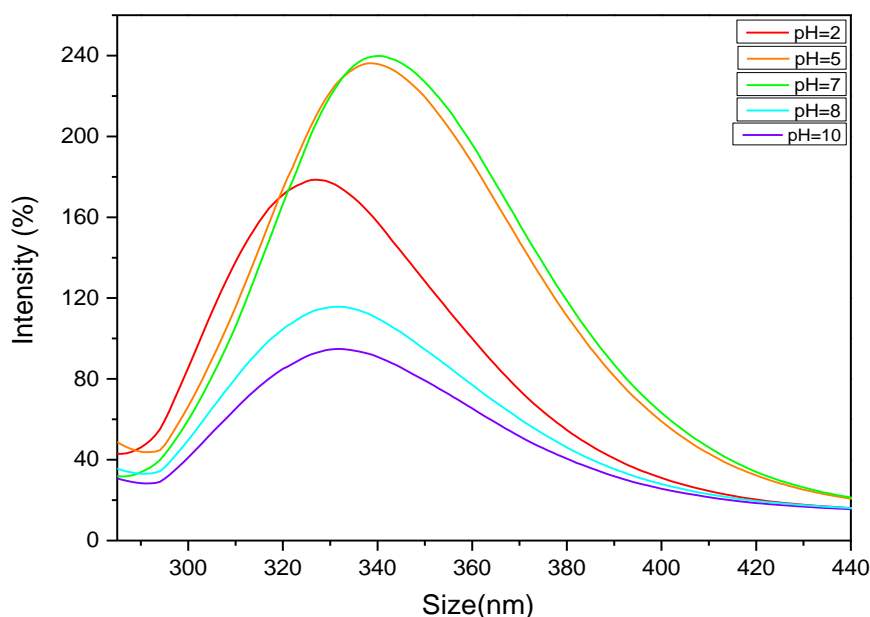


Fig. 6.16: Spectrele de emisie ale unor soluții de BSA la diferite pH-uri și $t=35^{\circ}$. Excitația la 280 nm.

Excitarea probei cu lungimea de undă de 280 nm (figura 6.16) confirmă acest fapt, datorită faptului că emisia de fluorescență a proteinei rezultă ca fiind în intervalul [330,350] nm. Se observă modificarea atât a lungimii de undă a maximului de emisie de fluorescență cât și a intensității acestui maxim, odată cu schimbarea pH-ului soluției de BSA. Cea mai intensă emisie de fluorescență o au probele cu pH 5 și 7. Atât în mediu acid (pH = 2), cât și în mediu bazic (pH = 8, pH = 10), intensitatea emisie de fluorescență scade, iar maximul de fluorescență se deplasează spre lungimi de undă mai mici.

CONCLUZII

Conform măsurătorilor DLS, conformația moleculei de BSA este puternic influențată atât de pH cât și de temperatură. La temperaturi și pH-uri scăzute ($t=25^\circ$, $\text{pH}=2$), moleculele tind să agrege, în timp ce la temperaturi și pH-uri ridicate ($t=60^\circ$, $\text{pH}=10$), numărul de agregate este redus semnificativ, dovadă că a început denaturarea proteinei.

Din punct de vedere al fluorescenței, proteina BSA poate fi excitată cu o lungime de undă de 280 nm și va emite la 340 nm. De asemenea, se poate observa că intensitatea fluorescenței este mai mare la pH-uri neutre ($\text{pH}=5$ și $\text{pH}=7$), datorită formei compacte a proteinei, și mai redusă atât la pH-uri mici ($\text{pH}=2$), cât și la pH-uri mari ($\text{pH}=8$ și $\text{pH}=10$), datorită formei extinse sau desfășurate a acesteia. Deoarece emisia de fluorescență este mare în condiții echivalente biologice ($\text{pH}=7$ și temperatura $t=35^\circ$), BSA poate fi utilizată în aplicații biologice de senzorică, precum facilitarea detecției unor anumite molecule prin creșterea intensității fluorescenței în urma formării unor legături cu acestea (de exemplu, îmbunătățirea emisiei de fluorescență a proteinei DPP-10 datorată interacțiunilor electrostatice ce au loc între aceasta și proteina BSA, ducând la creșterea vizibilității celulelor investigate [26]).

BIBLIOGRAFIE

- [1] Aswathy Ravindran, Anupam Singh, Ashok M. Raichur, N. Chandrasekaran, Amitava Mukherjee, *Studies on interaction of colloidal Ag nanoparticles with Bovine Serum Albumin (BSA)*, Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, **76**, 32-37, 2010
- [2] Brotati Chakraborty, Samita Basu, *Interaction of BSA with proflavin: A spectroscopic approach*, Journal of Luminescence, **129**, 34-39, 2009
- [3] Zhiyong Tian, Fenglei Zang, Wen Luo, Zhonghua Zhao, Yueqiao Wang, Xuejun Xu, Chaojie Wang, *Spectroscopic study on the interaction between mononaphthalimide spermidine (MINS) and bovine serum albumin (BSA)*, Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology, **142**, 103-109, 2015
- [4] <https://www.thermofisher.com/ro/en/home/life-science/cell-culture/mammalian-cell-culture/media-supplements/bovine-serum-albumin.html> (accesat la data 17.03.2024)
- [5] https://en.wikipedia.org/wiki/Bovine_serum_albumin (accesat la data 17.03.2024)
- [6] <https://www.sigmaaldrich.com/RO/en/technical-documents/technical-article/cell-culture-and-cell-culture-analysis/cell-culture-media-preparation/albumin-from-bovine-serum> (accesat la data 17.03.2024)
- [7] K. Takeda , A. Wada, K. Yamamoto, Y. Moriyama, K. Aoki, *Conformational change of bovine serum albumin by heat treatment*, Journal of Protein Chemistry, **8**, 653-659, 1989
- [8] Vera A. Borzova, Kira A. Markossian, Natalia A. Chebotareva, Sergey Yu Kleymenov, Nikolay B. Poliansky, Konstantin O Muranov, Vita A Stein-Margolina, Vladimir V Shubin, Denis I Markov, Boris I Kurganov, *Kinetics of Thermal Denaturation and Aggregation of Bovine Serum Albumin*, 2016
- [9] Vikram Singh Raghuwanshi , Brendan Yu , Christine Browne, Gil Garnier, *Reversible pH Responsive Bovine Serum Albumin Hydrogel Sponge Nanolayer*, Frontiers in Bioengineering and Biotechnology, **8**, 2020
- [10] Mingxiong Tan, Weijiang Liang, Xujian Luo, Yunqiong Gu, *Fluorescence Spectroscopy Study on the Interaction between Evodiamine and Bovine Serum Albumin*, Journal of Chemistry, **2013**, 2013
- [11] A. K. Wright, M. R. Thompson, *Hydrodynamic structure of bovine serum albumin determined by transient electric birefringence*, Biophysical Journal, **15**, 137–141, 1975
- [12] Otávio Augusto Chaves, Breno A. Soares, Maria Aparecida M. Maciel, Carlos Maurício R. Sant'Anna, José Carlos Netto-Ferreira, Dari Cesarin-Sobrinhoa, Aurélio B. B. Ferreira, *A Study of the Interaction Between trans-Dehydrocrotonin, a Bioactive Natural 19-nor-Clerodane, and Serum Albumin*, Journal of the Brazilian Chemical Society, **27**, 1858-1865, 2016
- [13] Sohini Sarkar, Abhigyan Sengupta, Partha Hazra, Pankaj Mandal, *Blue Emission in Proteins*, 2014

- [14] M. Alagesan, P. Sathyadevi, P. Krishnamoorthy, N. S. P. Bhuvanesh, N. Dharmaraj, *DMSO containing ruthenium (II) hydrazone complexes: in vitro evaluation of biomolecular interaction and anticancer activity*, Dalton Transactions, **43(42)**, 2014
- [15] <https://www.chem.uci.edu/~dmitryf/manuals/Fundamentals/DLS%20concept.pdf> (accesat la data 24.03.2024)
- [16] <https://www.chem.uci.edu/~dmitryf/manuals/Malvern%20Zetasizer%20ZS%20DLS%20user%20manual.pdf> (accesat la data 24.03.2024)
- [17] Jörg Stetefeld, Sean A. McKenna, Trushar R. Patel, *Dynamic light scattering: a practical guide and applications in biomedical sciences*, Biophysical Reviews, **8**, 409–427, 2016
- [18] [https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Analytical_Chemistry/Instrumental_Analysis_\(LibreTexts\)/34%3A_Particle_Size_Determination/34.05%3A_Measuring_Particle_Size_Using_Light_Scattering](https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Analytical_Chemistry/Instrumental_Analysis_(LibreTexts)/34%3A_Particle_Size_Determination/34.05%3A_Measuring_Particle_Size_Using_Light_Scattering) (accesat la data 24.03.2024)
- [19] https://hmn.wiki/ro/Excitation_spectrum (accesat la data 24.03.2024)
- [20] <https://www.horiba.com/int/scientific/technologies/fluorescence-spectroscopy/what-is-fluorescence-spectroscopy/> (accesat la data 24.03.2024)
- [21] <https://jascoinc.com/learning-center/theory/spectroscopy/fluorescence-spectroscopy/> (accesat la data 24.03.2024)
- [22] https://en.wikipedia.org/wiki/Fluorescence_spectroscopy (accesat la data 24.03.2024)
- [23] <https://practicalninja.com/resources.html> (accesat la data 12.06.2024)
- [24] <https://pubs.rsc.org/en/content/articlehtml/2020/cp/d0cp01857k> (accesat la data 26.04.2024)
- [25] Moustafa Tadjine, Fatima Bouzidi, Abderrezak Berbri, Hamid Nehmar, Ahmed Bouhekka, *In situ Fourier transform infrared-attenuated total reflection spectroscopy and modeling investigation of protein adsorption: Case of expanded bovine serum albumin on titanium dioxide anatase*, Biointerphases, **19**, 2024
- [26] Yabei Chen, Ke Li, Shensong Zhang, Pan Xu, Bo Song, *Turn-on fluorescence probe for BSA detection and selective cell imaging*, Dyes and Pigments, **202**, 2022
- [27] Tess M. Carlson, Kevin W. Lam, Carol W. Lam, Jimmy Z. He, James H. Maynard, and Silvia Cavagnero, *Naked-Eye Detection of Reversible Protein Folding and Unfolding in Aqueous Solution*, Journal of Chemical Education, **94**, 2016
- [28] Ine Rombouts, Bert Lagrain, Katharina A. Scherf, Marlies A. Lambrecht, Peter Koehler & Jan A. Delcour, *Formation and reshuffling of disulfide bonds in bovine serum albumin demonstrated using tandem mass spectrometry with collision-induced and electron-transfer dissociation*, Scientific Reports, **5**, 2015
- [29] Hai Wu, Po Wang, Xiao Hu, Zong Dai, Xiaoyong Zou, *Site-selective probe for investigating the asynchronous unfolding of domains in bovine serum albumin*, Talanta, **84**, 881-886, 2011
- [30] Jonathan Munoz-Enano, Olivia Peytral-Rieu, Paris Velez, David Dubuc, Katia Grenier, et al., *Characterization of the Denaturation of Bovine Serum Albumin (BSA) Protein by Means of*

a Differential Mode Microwave Microfluidic Sensor Based on Slot Resonators, IEEE Sensors Journal, **22**, 14075 – 14083, 2022

[31] Olga Matsarskaia, Lena Bühl, Christian Beck, Marco Grimaldo, Ralf Schweins, Fajun Zhang, Tilo Seydel, Frank Schreiber, Felix Roosen-Runge, *Evolution of the structure and dynamics of bovine serum albumin induced by thermal denaturation*, Physical Chemistry Chemical Physics, **22**, 18507-18517, 2020

[32] Joyce I. Boye, Inteaz Alli, and Ashraf A. Ismail, Interactions Involved in the Gelation of Bovine Serum Albumin, Journal of Agricultural and Food Chemistry, **44**, 996-1004, 1996

[33] N.G. Zhdanova, E.G. Maksimov, A.M. Arutyunyan, V.V. Fadeev, E.A. Shirshin, *Tyrosine fluorescence probing of conformational changes in tryptophan-lacking domain of albumins*, Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, **174**, 223-229, 2017

[34] Radoslaw Starosta, Filipa C. Santos, Rodrigo F.M. de Almeida, *Human and bovine serum albumin time-resolved fluorescence: Tryptophan and tyrosine contributions*, effect of DMSO and rotational diffusion, Journal of Molecular Structure, **1221**, 2020

[35] Deepti Joshi, Deepak Kumar, Anil K. Maini, Ramesh C. Sharma, *Detection of biological warfare agents using ultra violet-laser induced fluorescence LIDAR*, Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, **112**, 446-456, 2013

[36] YANG Hui, XIAO Xue, ZHAO Xuesong, WU Yan, *Intrinsic Fluorescence Spectra of Tryptophan, Tyrosine and Phenylalanine*, Advances in Engineering Research, 2015

DECLARAȚIE PE PROPRIE RĂSPUNDERE

Subsemnatul, Venczel Karla-Antonia, declar că Lucrarea de licență/diplomă/disertație pe care o voi prezenta în cadrul examenului de finalizare a studiilor la Facultatea de Fizică, din cadrul Universității Babeș-Bolyai, în sesiunea iulie 2024, sub îndrumarea Conf. dr. Dana Maniu, reprezintă o operă personală. Menționez că nu am plagiat o altă lucrare publicată, prezentată public sau un fișier postat pe Internet. Pentru realizarea lucrării am folosit exclusiv bibliografia prezentată și nu am ascuns nici o altă sursă bibliografică sau fișier electronic pe care să le fi folosit la redactarea lucrării.

Prezenta declarație este parte a lucrării și se anexează la aceasta.

Data,

23.06.2024

Nume,

Venczel Karla-Antonia

Semnătură

