

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М.В. ЛОМОНОСОВА»

ФИЗИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ
КАФЕДРА ОБЩЕЙ ФИЗИКИ

БАКАЛАВРСКАЯ РАБОТА

**«ТРИПТОФАНОВАЯ ФЛУОРЕСЦЕНЦИЯ БЕЛКОВ В
ИССЛЕДОВАНИИ КОМПЛЕКСООБРАЗОВАНИЯ
СЫВОРОТОЧНЫХ АЛЬБУМИНОВ С НЕИОННЫМИ
ПОВЕРХНОСТНО-АКТИВНЫМИ ВЕЩЕСТВАМИ»**

Выполнила студентка 405 группы:
Михеева Есения Юрьевна

подпись студента

Научный руководитель:
кандидат физ.-мат. наук, старший преподаватель
Власова Ирина Михайловна

подпись научного руководителя

Допущена к защите «___»«_____» 2015г.

Зав. кафедрой

профессор Салецкий А.М. _____

подпись зав.кафедрой

Москва
2015

ОГЛАВЛЕНИЕ

Введение	3
Глава 1. Применение флуоресцентной спектроскопии в исследованиях структуры и свойств молекул белков (литературный обзор)	5
§1.1. Структура и основные свойства белковых молекул.....	5
§1.2. Сывороточные альбумины плазмы крови.....	7
§1.3. Детергенты: ионные и нейтральные.....	10
§1.4. Физические основы флуоресцентной спектроскопии.....	12
§1.5. Применение флуоресцентного анализа в исследованиях белковых макромолекул.....	17
Глава 2. Методическая часть экспериментов	22
§2.1. Приготовление растворов белка – бычьего сывороточного альбумина (БСА) / сывороточного альбумина человека – и детергента – Тритона X-100 / Твина 20.....	22
§2.2. Методика экспериментов для исследования триптофановой флуоресценции БСА / САЧ в растворах с Тритоном X-100 / Твином 20.....	22
Глава 3. Исследование взаимодействия нейтрального детергента Тритона X-100 с сывороточными альбуминами – бычьим сывороточным альбумином (БСА) и сывороточным альбумином человека (САЧ)	23
§3.1. Тушение триптофановой флуоресценции БСА и САЧ в растворах при добавлении Тритона X-100.....	23
§3.2. Определение констант связывания детергента Тритона X-100 с молекулами БСА и САЧ.....	26
Глава 4. Исследование взаимодействия нейтрального детергента Твина-20 с сывороточными альбуминами – бычьим сывороточным альбумином (БСА) и сывороточным альбумином человека (САЧ)	32
§4.1. Тушение триптофановой флуоресценции БСА и САЧ в растворах при добавлении Твина 20.....	32
§4.2. Определение констант связывания детергента Твина-20 с молекулами БСА и САЧ.....	35
Основные результаты и выводы работы	39
Список цитируемой литературы	40

ВВЕДЕНИЕ

Данная работа посвящена исследованию методами флуоресцентного анализа комплексообразования молекул сывороточных альбуминов (бычьего сывороточного альбумина и сывороточного альбумина человека) и неионных (нейтральных) поверхностно-активных веществ (Тритона X-100 и Твина 20).

Бычий сывороточный альбумин (БСА) и сывороточный альбумин человека (САЧ) – глобулярные белки семейства альбуминов (изоэлектрическая точка БСА – pI 4,9 и САЧ – pI 4,7).

Первичная структура сывороточных альбуминов определяется единственной полипептидной цепью каждого из белков, состоящей из 582 (БСА) и 585 (САЧ) аминокислотных остатков. Вторичная структура БСА и САЧ состоит из α -спиральных участков и участков хаотической укладки при физиологическом значении pH (7,4), тогда как содержание β -складчатых структур незначительно. Третичная структура обоих белков определяется тремя доменами. Оба белка имеют схожее строение с небольшими различиями, в частности, в отличие от САЧ, имеющего один остаток триптофана (Trp 214), БСА имеет два остатка триптофана – Trp 135 и Trp 214.

Выбор БСА и САЧ в данной работе как модельных белков обусловлен важной ролью этих белков в плазме крови, определяемой широким разнообразием функций этих белков: альбумины обеспечивают коллоидно-осмотическое давление крови, альбумины регулируют вместе с другими белками pH крови, альбумины служат переносчиком различных метаболитов.

В исследовании белков широко применяются детергенты. Детергенты представляют собой органические соединения, состоящие из гидрофобного углеводородного фрагмента и гидрофильной головной группы. При растворении в воде молекулы детергента образуют мицеллы, с гидрофобной частью внутри мицеллы и головной частью снаружи мицеллы. Минимальная концентрация детергента, при которой мицеллы обнаруживаются, называется критической концентрацией мицеллообразования (ККМ).

Различают несколько видов детергентов по типу гидрофильных групп – ионные и неионные (нейтральные). Ионные детергенты диссоциируют в растворе на ионы, одни из которых поверхностно активны, а другие (противоионы) – нет. Нейтральные детергенты отличаются от ионных тем, что их головная гидрофильная группа не заряжена. Они считаются мягкими поверхностно-активными веществами, так как большинство из них не вызывает денатурации белков, лишь связывались с гидрофобными участками белковых молекул. Белки в растворах нейтральных детергентов могут быть растворены и изолированы в своей естественной и активной форме с сохранением белковых взаимодействий.

Среди нейтральных детергентов, часто применяющихся в биохимических и медицинских исследованиях, можно выделить Тритон X-100 (ККМ 0,25 мМ при 25⁰ С) и Твин 20 (ККМ 0,09 мМ при 25⁰С), которые широко применяются при обработке белков в иммуноферментном анализе, в иммуногистохимии, для растворения образцов в вестерн-блоттинге, что и указывает на актуальность исследования взаимодействия этих детергентов с основными транспортными белками плазмы крови – БСА и САЧ.

Целью данной работы является исследование комплексообразования сывороточных альбуминов (БСА и САЧ) с нейтральными детергентами (Тритоном X-100 и Твином 20) по оценке триптофановой флуоресценции белков в растворах детергентов. Исследование триптофановой флуоресценции белков широко применяется для оценки структурного состояния белковых молекул и для анализа их взаимодействия с лигандами.

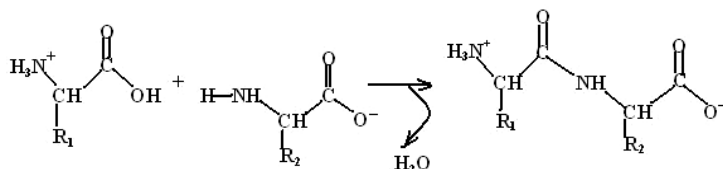
В рамках данной цели работы были поставлены следующие задачи: 1) исследовать триптофановую флуоресценцию БСА и САЧ при добавлении в растворы нейтрального детергента – или Тритона X-100 или Твина 20; 2) определить константы тушения флуоресценции БСА и САЧ при добавлении детергента – или Тритона X-100 или Твина 20 (т.е. константы связывания белков с детергентами); 3) исследовать комплексообразование молекул БСА и САЧ с Тритоном X-100 и Твином 20 в зависимости от значения рН.

ГЛАВА 1. Применение флуоресцентной спектроскопии в исследованиях структуры и свойств молекул белков (литературный обзор)

§1.1. Структура и основные свойства белковых молекул

Белки представляют собой один из классов биомакромолекул, присутствующих в живых клетках [1, 2]. Все белки во всех организмах, независимо от их функции и биологической активности, построены из одного и того же основного набора 20 стандартных аминокислот. Структура белков представлена молекулами, которые образуют очень длинные полипептидные цепи, построенные из остатков α -аминокислот. Белки отличаются друг от друга тем, что каждый имеет свою, характерную для него последовательность аминокислот. Биологические свойства белков определяются в основном аминокислотным составом, порядком чередования аминокислот в полипептидной цепи.

Наиболее важной реакцией, в которой участвуют аминокислоты, является образование пептидных связей, при этом карбоксильная группа одной аминокислоты соединяется с аминогруппой другой аминокислоты.



Когда карбоксильная группа и аминогруппа двух аминокислот объединяются, образуя пептидную связь, соответствующие аминокислоты превращаются в аминокислотные остатки. При связывании аминокислот пептидной связью в цепи образуются белки и пептиды: пептиды – если количество аминокислотных остатков в цепи меньше 100, белки – если количество аминокислотных остатков больше 100.

Линейная последовательность аминокислот в полипептидной цепи называется первичной структурой белка. Для белков существует определенное значение рН, соответствующее изоэлектрической точке белка рI (в этой точке суммарный заряд белка равен нулю). Заряд белка меняется в

зависимости от концентрации протонов H^+ в растворе (т.е. от рН раствора). Например, при рН раствора, равном изоэлектрической точке белка pI , молекулы белка в целом не несут электрического заряда. При $pH > pI$ белок обладает суммарным отрицательным зарядом, при $pH < pI$ белок имеет суммарный положительный заряд.

Структура большинства белков стабилизируется двумя классами прочных связей (пептидных и дисульфидных $-S-S-$) и тремя классами слабых связей (водородных, гидрофобных, электростатических).

Различают следующие уровни структурной организации белков:

1. первичная структура – последовательность аминокислот в полипептидной цепи и положение дисульфидных связей;

2. вторичная структура – стерическая взаимосвязь между расположенными близко друг к другу вдоль цепи аминокислотами. Вторичная структура может быть регулярной (α -спираль, β -складчатый слой) или не обнаруживать никаких признаков регулярности (хаотический клубок). Витки спирали укрепляются водородными связями, возникающими между карбоксильными группами и аминогруппами.

3. Третичная структура – укладка полипептидных цепей в глобулы, возникающая в результате возникновения химических связей (водородных, ионных, дисульфидных) и установления гидрофобных взаимодействий между радикалами аминокислотных остатков. В водных растворах гидрофобные радикалы стремятся спрятаться от воды, группируясь внутри глобулы, в то время как гидрофильные радикалы в результате гидратации стремятся оказаться на поверхности молекулы. Под третичной структурой понимают стерические взаимосвязи между аминокислотными остатками, далеко отстоящими друг от друга по цепи.

4. Четвертичная структура характерна для сложных белков, молекулы которых образованы двумя и более глобулами. Субъединицы удерживаются в молекуле благодаря ионным, гидрофобным и электростатическим взаимодействиям.

Вторичная и третичная структуры белка формируются самопроизвольно и определяются первичной структурой его полипептидной цепи.

Аминокислотный состав и структура белковой молекулы определяют свойства белка. Наиболее характерными из них являются оптическая активность, подвижность в электрическом поле, низкое осмотическое давление и высокое онкотическое давление, способность к поглощению УФ-лучей при 280 нм. Белки сочетают в себе основные и кислотные свойства, определяемые радикалами аминокислот: чем больше кислых аминокислот в белке, тем ярче выражены его кислотные свойства. Способность отдавать и присоединять H^+ определяют буферные свойства белков; один из самых мощных буферов – гемоглобин в эритроцитах, поддерживающий рН крови на постоянном уровне. Есть белки растворимые (фибриноген), есть нерастворимые (фиброин, кератин, коллаген). Есть белки активные в химическом отношении (ферменты), есть химически неактивные, есть устойчивые к воздействию различных условий внешней среды и есть крайне неустойчивые.

Внешние факторы (нагревание, ультрафиолетовое излучение, тяжелые металлы и их соли, изменения рН, радиация, обезвоживание) могут вызывать нарушение структурной организации молекулы белка. Процесс утраты трехмерной конформации, присущей данной молекуле белка, называют денатурацией. Изменение пространственной конфигурации приводит к изменению свойств белка и, как следствие, делает невозможным выполнение белком свойственных ему биологических функций.

§1.2. Сывороточные альбумины плазмы крови

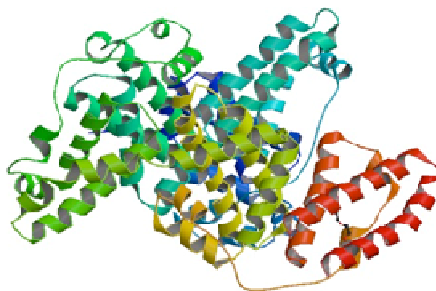
Сывороточные альбумины – сывороточный альбумин человека (САЧ) и бычий сывороточный альбумин (БСА) – представляют собой белки плазмы крови [1, 2]. Способность их молекул связывать обширный круг лигандов определяет одну из основных функций этих белков – транспорт физиологических метаболитов в крови.

Сывороточный альбумин, помимо поддержания осмотического давления крови и белкового резерва организма, выполняют важную функцию, осуществляя транспорт эндогенных и экзогенных субстанций. В основе транспортной функции альбумина лежит способность к обратимому связыванию лигандов различной химической структуры, таких как биологически активные вещества, жирные кислоты, неорганические ионы, а также лекарственные вещества и их метаболиты. Благодаря связыванию повышается растворимость лигандов в плазме крови, снижается их токсичность, осуществляется защита связанных соединений от ферментативной и окислительной деградации. Вместе с тем, связывание лекарственных веществ с альбумином вносит существенный вклад в фармакокинетику препаратов, оказывая влияние на параметры их распределения и элиминации. В связи с этим молекулярные аспекты лиганд-альбуминовых взаимодействий неизменно находятся в поле зрения специалистов, занимающихся проблемами фармакокинетики, лекарственных взаимодействий, а также разработкой новых лекарственных препаратов.

Первичная структура сывороточных альбуминов определяется единственной полипептидной цепью каждого из белков, состоящей из 585 (САЧ) и 582 (БСА) аминокислотных остатков. Третичная структура обоих белков (САЧ и БСА) определяется тремя доменами. Оба белка являются типичными представителями белков семейства альбуминов и имеют схожее строение с небольшими различиями, в частности, в отличие от САЧ, имеющего один остаток триптофана (Trp 214), БСА имеет в своей аминокислотной цепи два остатка триптофана – Trp 135 и Trp 214.

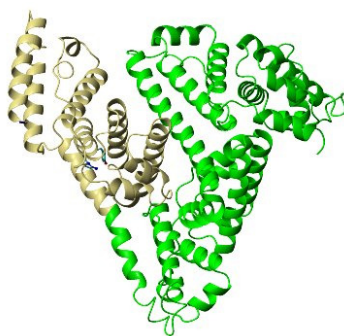
БСА – глобулярный белок плазмы крови с молекулярной массой 69 кДа, изоэлектрическая точка БСА (pI) равна 4,9. Бычий сывороточный альбумин представляет собой глобулу в форме сплюснутого эллипсоида вращения с полуосями 17 на 42 Å. БСА обладает достаточно сложной пространственной структурой, образующих три домена, каждый из которых, в свою очередь подразделяется на два поддомена (А-В и С). Каждый поддомен можно разбить

на 3 спирали X, Y и Z. Вторичную структуру БСА по данным ЯМР на 50-68% составляют α -спирали.



Бычий сывороточный альбумин

САЧ является одноцепочечным белком и имеет молекулярную массу 66,5 кДа. Кристаллографический анализ САЧ и его рекомбинантных форм показал, что полипептидная цепь образует асимметричную глобулу в форме сердца с размерами приблизительно $80 \times 80 \times 30$ Å. Вторичную структуру САЧ по данным ЯМР на 67% составляют α -спирали. Рентгеноструктурный анализ показал, что белок состоит из трех похожих доменов (I–III), каждый из которых включает по два субдомена (А и В). Субдомен А образован шестью, а субдомен В – четырьмя α -спиралями, связанными в гибкие петли.



Сывороточный альбумин человека

Несмотря на многообразие переносимых веществ, существует ограниченное число типов мест связывания на молекулах альбуминов. Выделяют несколько (шесть) центров связывания лигандов на молекуле альбумина, наиболее важные для связывания лекарственных препаратов из которых центры I и II.

В кристаллической структуре САЧ центр I имеет вид кармана в субдомене IIА и содержит единственный в молекуле САЧ остаток

триптофана – Trp-214. Типичные лиганды I центра связывания представляют собой дикарбоновые кислоты и гетероциклические молекулы. Центр I является довольно обширным, поскольку связывает такие крупные молекулы, как билирубин. Кроме того, описаны случаи одновременного связывания центром I двух и более различных лигандов.

Центр II локализован в субдомене IIIA и представляет собой карман с катионной группой на поверхности, которая образована остатками Lys-194 и Arg-145. Среди аминокислотных остатков в нем важную роль играют Arg-410 и Tyr-411. Для связывания с центром II важную роль играют размеры молекулы, при этом положительный заряд лиганда препятствует связыванию, однако наличие отрицательного заряда не является обязательным.

§1.3. Детергенты: ионные и нейтральные

Детергенты, используемые в биологических и биохимических лаборатории представляют собой мягкие поверхностно-активные вещества, которые используются для разрушения мембраны клеток (лизиса клеток) и трансформации внутриклеточного материала в растворимую форму. Детергенты используются в основном для разрушения межбелковых, белково-липидных и межлипидных связей, денатурации белковых структур.

Детергенты представляют собой органические амфифильные соединения, молекулы которых имеют гидрофильные и гидрофобные участки [3, 4]. По типу гидрофильных групп различают несколько типов детергентов – ионные и неионные (нейтральные).

Ионные детергенты диссоциируют в растворе на ионы, одни из которых поверхностно активны, а другие (противоионы) – нет. В зависимости от знака заряда поверхностно-активного иона ионные детергенты делят на анионные, катионные и амфотерные.

При растворении при определённой концентрации и температуре молекулы детергента образуют мицеллы, с гидрофобной частью внутри мицеллы и головной группой на наружной стороне мицеллы. Таким образом,

гидрофобное ядро мицеллы связывается с гидрофобными участками белков. Количество молекул детергента в мицелле называется числом агрегации.

Минимальная концентрация детергентов, при которой мицеллы обнаруживаются при данной температуре, называется критической концентрацией мицеллообразования (ККМ). При концентрации ниже ККМ, наблюдаются только мономеры; при концентрациях выше ККМ, мицеллы и мономеры сосуществуют с другими немиецеллярной фазами.

Среди ионных детергентов следует особо выделить додецилсульфат (ДСН) и цетилтриметиламмонийбромид (ЦТАБ).

Додецилсульфат натрия (ДСН) – анионный детергент, является очень эффективным поверхностно-активным веществом, его ККМ при 25° С примерно равна 7-10 мМ. ДСН разрушает нековалентные связи белков, таким образом, вызывая их денатурацию, что приводит к потере их нативной конформации и функции. ДСН широко используется для обработки белков перед электрофорезом в полиакриламидном геле.

Цетилтриметиламмонийбромид (ЦТАБ) представляет собой катионный детергент, растворимый в H₂O и легко растворимый в спирте. При низкой концентрации NaCl (<0,6 М) ЦТАБ образует прочные комплексы с ДНК и поэтому используется для депротенизации (удаления молекул белка) и осаждения ДНК.

Неионные детергенты отличаются от ионных тем, что их головная группа не заряжена и гидрофильна. Они считаются мягкими поверхностно-активными веществами, так как они разрушают белково-липидные и межлипидные, но не межбелковые взаимодействия и большинство из них не вызывает денатурации белков. Таким образом, белки с помощью нейтральных детергентов могут быть растворены и изолированы в своей естественной и активной форме с сохранением белковых взаимодействий. Среди нейтральных детергентов следует выделить Тритон X-100 и Твин-20.

Тритон X-100 является наиболее характерным примером неионного поверхностно-активного вещества, предпочтительного для большинства

экспериментов. Тритон X-100 (ККМ при 25^0 С равна 0,2 – 0,9 мМ) используется для солюбилизации белков, липополисахаридов и других гидрофобных молекул, а также при электрофорезе белков.

Твин-20 относится к нейтральным поверхностно-активным веществам. Твин-20 (ККМ при 25^0 С равна 0,06 мМ) является мягким поверхностно-активным веществом, не влияющим на активность белка и эффективным для выделения белка в активной форме.

§1.4. Физические основы флуоресцентной спектроскопии

Свечение атомов, молекул, ионов и других более сложных комплексов, возникающее в результате электронного перехода в этих частицах при их возвращении из возбужденного состояния в основное состояние, называется люминесценцией [5, 6]. Люминесценция возникает в результате поглощения веществом энергии возбуждения и перехода его частиц из основного в возбужденное электронное состояние. Таким образом, люминесценцией является свечение, возникающее в результате электронного перехода в этих частицах при их возвращении из возбужденного состояния в основное.

Люминесценция подразделяется на два вида (флуоресценцию и фосфоресценцию) в зависимости от характера электронного состояния, из которого молекулы переходят в основное состояние с испусканием электромагнитного излучения (рис. 1.1).

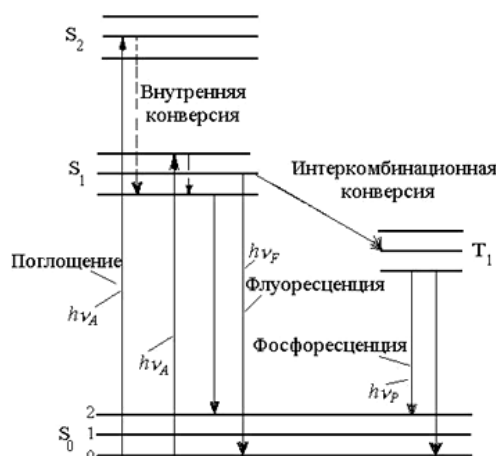


Рис. 1.1 Излучательные и безызлучательные переходы между состояниями одинаковой и различной мультиплетности.

При переходе с испусканием излучения между состояниями, имеющими одинаковую мультиплетность, наблюдается флуоресценция: обычно между синглетными первым возбужденным и основным состояниями $S_1 \rightarrow S_0$. Среднее время жизни молекулы в возбужденном синглетном состоянии мало, и явление флуоресценции связано с высокой вероятностью перехода молекул в основное синглетное состояние. Флуоресценция представляет собой свечение, мгновенно затухающее после прекращения возбуждения ($\sim 10^{-9}$ с).

Оптические переходы с испусканием излучения между электронными состояниями разной мультиплетности, обычно нижним возбужденным триплетным и основным синглетным $T_1 \rightarrow S_0$, приводят к явлению фосфоресценции. По причине большого естественного времени жизни триплетного состояния и очень малой вероятности данного перехода константа скорости затухания фосфоресценции мала, что и объясняет длительное «послесвечение» фосфоресценции. Фосфоресценция представляет собой свечение, продолжающееся заметный промежуток времени (больше 10^{-6} с) после прекращения возбуждения.

Возможные безызлучательные переходы между различными электронными состояниями одной и той же мультиплетности называются внутренней конверсией. Возможные безызлучательные переходы между различными электронными состояниями разной мультиплетности называются интеркомбинационной конверсией.

Существует другой тип классификации, в основу которого были положены различные виды возбуждения люминесценции. В случае возбуждения вещества световыми квантами возникающее свечение стали называть фотолюминесценцией. Свечение, возникающее под действием катодных лучей, было названо катодолюминесценцией. При возбуждении свечения рентгеновскими лучами возникает рентгенолюминесценция. Существуют и другие виды люминесценции.

Остановимся теперь на рассмотрении люминесцентно – спектральных характеристик сложных молекул:

1. Спектр люминесценции представляет собой функцию распределения излучаемой веществом энергии по длинам волн или частотам. Каждой полосе поглощения соответствует полоса флуоресценции.

2. Спектр возбуждения представляет собой относительную эффективность различных длин волн возбуждающего света вызывать флуоресценцию. Иными словами, это функция распределения излучаемой веществом энергии в зависимости от длины волны возбуждения.

В принципе форма спектра возбуждения должна быть идентична форме спектра поглощения молекул и не зависеть от длины волны, при которой измеряют флуоресценцию. Однако это выполняется очень редко. Дело в том, что спектры поглощения и возбуждения могут отличаться из-за различия химических и физических свойств молекулы в возбужденном состоянии по сравнению с основным.

Одним из важных свойств люминесценции является различие её длительности у разных излучающих систем. Длительность свечения вещества обычно представляет собой средний промежуток времени, в течение которого молекулы остаются в возбужденном состоянии. Затухание флуоресценции происходит по экспоненциальному закону:

$$I = I_0 e^{-t/\tau}, \quad (1.1)$$

где I – интенсивность флуоресценции спустя время t после прекращения облучения; I_0 – постоянная интенсивность флуоресценции во время облучения; τ – среднее время затухания, за которое интенсивность флуоресценции уменьшается от исходной величины в e раз (величина порядка 10^{-4} - 10^{-9} с), или длительность возбужденного состояния.

Если спонтанный радиационный переход представляет единственный процесс, путем которого дезактивируется возбужденное состояние, то естественное среднее время жизни этого состояния τ^0 совпадает со средним временем затухания τ в уравнении (1.1) и обратно пропорционально константе скорости естественного затухания люминесценции $k_{\text{люм}}$:

$$\tau^0 = 1/k_{\text{люм}}. \quad (1.2)$$

Реальное время жизни люминесцирующего возбужденного состояния, как и среднее время затухания τ , зависит не только от вероятности излучательных переходов или величины константы скорости затухания люминесценции $k_{\text{люм}}$, но и от констант скорости всех других процессов: внутренней ($k_{\text{вн.к}}$) и интеркомбинационной ($k_{\text{ин.к}}$) конверсий и фотохимических реакций ($k_{\text{ф.р}}$):

$$\tau = 1 / (k_{\text{люм}} + k_{\text{вн.к}} + k_{\text{ин.к}} + k_{\text{ф.р}}). \quad (1.3)$$

Взаимное расположение спектров поглощения и люминесценции является важной закономерностью молекулярной люминесценции. Спектр излучения в целом и его максимум всегда сдвинуты по сравнению со спектром поглощения и его максимумом в сторону длинных волн. Эта зависимость получила название закона Стокса – Ломмеля, который может быть записан в следующем виде: $h\nu_{\text{люм}}^{\text{макс}} < h\nu_{\text{погл}}^{\text{макс}}$.

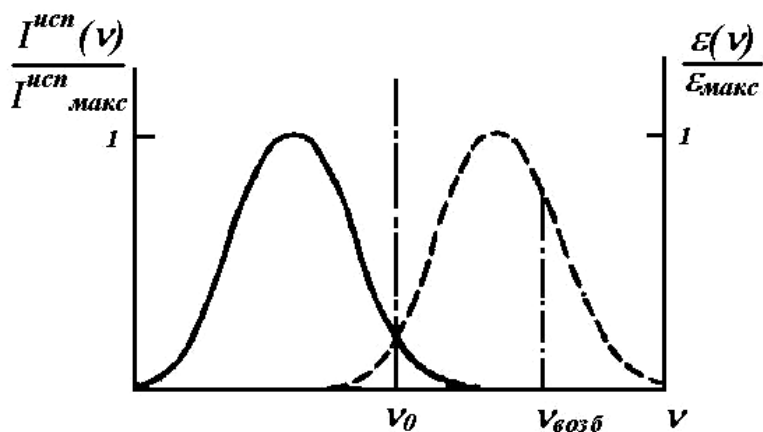


Рис. 1.2 Правило зеркальной симметрии Левшина. Общая схема зеркальной симметрии спектров поглощения (пунктирная линия) и спектров флуоресценции (сплошная линия).

Полосы спектра флуоресценции с низкочастотной стороны 0-0-полосы (перехода между нулевым колебательным уровнем первого возбужденного электронного состояния и нулевым колебательным уровнем основного электронного состояния) расположены зеркально симметрично соответствующим полосам спектра поглощения, расположенным с высокочастотной стороны 0-0-полосы. Явление приближенной зеркальной симметрии спектров поглощения и люминесценции (рис. 1.2) названо по имени его первого исследователя правилом Левшина: нормированные

спектры поглощения и люминесценции зеркально-симметричны относительно прямой, проходящей перпендикулярно к оси частот через точку пересечения спектров.

Фотолюминесценция возникает за счёт поглощаемой энергии возбуждающего света. Однако лишь часть её превращается в энергию люминесценции. Выходом люминесценции называют величину, определяющую долю излучательных переходов по отношению ко всем процессам, приводящим к уменьшению заселенности возбужденного электронного состояния. Выход люминесценции отражает эффективность преобразования веществом возбуждающего излучения в свет люминесценции. Разделяют энергетический и квантовый выходы люминесценции.

Энергетический выход Γ равен отношению испускаемой при люминесценции энергии $E_{исп}$ к поглощенной энергии $E_{погл}$:

$$\Gamma = E_{исп} / E_{погл} . \quad (1.4)$$

Квантовый выход γ равен отношению числа квантов люминесценции, испускаемых единицей объема вещества в единицу времени $N_{исп}$, к числу поглощенных фотонов возбуждающего излучения $N_{погл}$:

$$\gamma = N_{исп} / N_{погл} . \quad (1.5)$$

Энергетический и квантовый выходы люминесценции связаны между собой соотношением:

$$\Gamma = \gamma (\nu_{люм} / \nu_{возб}) , \quad (1.6)$$

где $\nu_{люм}$ – средняя частота полосы люминесценции, $\nu_{возб}$ – частота возбуждающего излучения. Так как $\nu_{люм} < \nu_{возб}$, то энергетический выход люминесценции меньше квантового $\Gamma < \gamma$.

Во всем спектральном интервале, где энергетический выход люминесценции пропорционален длине волны возбуждения, квантовый выход свечения сохраняет постоянное значение. Этот закон Вавилова строго

выполняется для веществ, обладающих свойствами молекулярной люминесценции.

Выход люминесценции чувствителен к внешним воздействиям, которые могут приводить к тушению свечения. Тушение люминесценции может вызываться различными способами: посторонними примесями, температурным воздействием, высокими концентрациями (концентрационное тушение).

Молекулы люминесцирующих веществ оптически анизотропны, поэтому люминесцентное излучение каждой отдельной молекулы частично поляризовано. Однако, если анизотропные молекулы ориентированы хаотично (примером могут служить растворы сложных органических соединений), то вещество в целом становится изотропным, а его люминесценция – неполяризованной. Для количественной оценки поляризованной люминесценции вводится понятие степени поляризации люминесценции:

$$P = \frac{I_{\parallel} - I_{\perp}}{I_{\parallel} + I_{\perp}},$$

где I_{\parallel} и I_{\perp} - соответственно параллельная и перпендикулярная электрическому вектору возбуждающего света составляющие поляризованной люминесценции.

В теории поляризованной люминесценции принято использовать модель анизотропных осцилляторов. Данная модель позволяет описать все основные закономерности поляризованной люминесценции растворов сложных органических молекул.

§1.5. Применение флуоресцентного анализа в исследованиях белковых макромолекул

Спектры люминесценции применяются для качественного и количественного анализа, в структурных исследованиях, для изучения физико – химических свойств биологических объектов [7, 8]. Флуоресценция

нашла широкое применение в различных прикладных биологических и биомедицинских исследованиях.

Структурное конформационное состояние белков и физико-химические свойства молекул белков широко исследуются в настоящее время с помощью флуоресцентной спектроскопии как по собственному поглощению белков в ультрафиолетовой области, так и с помощью молекулярных зондов и меток.

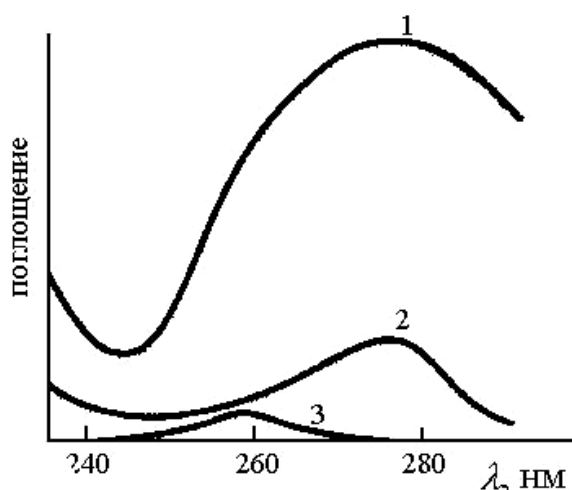


Рис. 1.3.. Спектры поглощения триптофана (1), тирозина (2) и фенилаланина (3) в ультрафиолетовой области.

Ни одна из двадцати аминокислот, входящих в состав белков, не поглощает в видимой области спектра и лишь три аминокислоты из них, а именно тирозин, триптофан и фенилаланин, обладают заметным поглощением в ультрафиолетовой области (рис. 1.3). Именно эти три ароматических аминокислоты и дают собственное поглощение белков и, следовательно, собственную флуоресценцию белков.

Максимумы спектров флуоресценции фенилаланина, тирозина и триптофана (при возбуждении флуоресценции аминокислот в соответствующих максимумах поглощения 258, 275 и 280 нм) лежат при 282, 303 и 348 нм соответственно.

Положение максимума флуоресценции триптофана может изменяться от 348 нм до 359 нм при изменении рН среды [9].

Спектры флуоресценции белков, содержащих триптофан, обладают только одним, характерным для триптофана максимумом спектра

флуоресценции (рис. 1.4). Максимум спектра флуоресценции триптофана в белках сдвинут в более коротковолновую область по сравнению с флуоресценцией свободного триптофана в водном растворе.

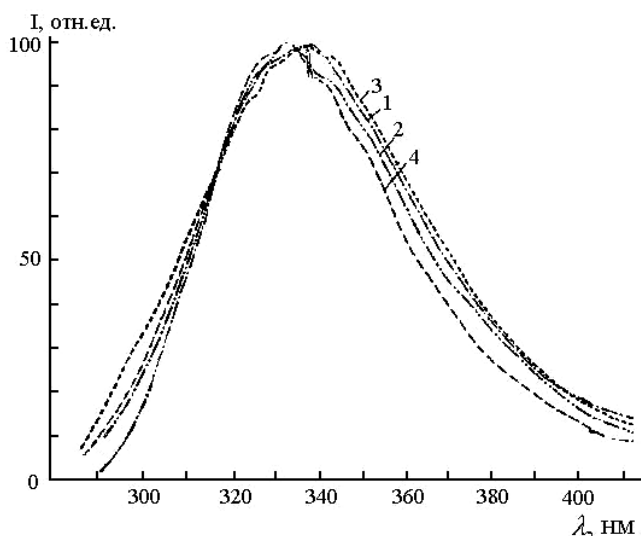


Рис. 1.4. Спектры флуоресценции белков (возбуждение 280 нм) при комнатной температуре: 1 - сывороточный γ -глобулин, 2 - актомиозин (в 0,6 М КСl), 3 - сывороточный альбумин человека, 4 - яичный альбумин. Данные по [9].

Положение максимума спектра флуоресценции белков изменяется при изменении рН раствора. Исследования рН-зависимостей белковой флуоресценции позволяют установить область нативности белка в шкале рН и изучить возможные рН-индуцируемые конформационные изменения в пределах нативной структуры белка.

Итак, на спектры флуоресценции белков оказывают влияние различные внешние факторы, такие как температура, ионная сила и рН раствора.

На параметры флуоресценции белка также оказывают влияние различные специфические факторы. Это могут быть ионы металлов, низкомолекулярные и высокомолекулярные биологически активные соединения, другие белки и т.п.

Флуоресцентный анализ широко применяется для исследования конформационного состояния белковых молекул. Работа [10] посвящена изучению конформационных перестроек доменов сывороточного альбумина человека в зависимости от значения рН раствора по анализу собственной белковой флуоресценции.

В [11] методом собственной триптофановой флуоресценции изучены изменения конформационных состояний молекул бычьего сывороточного альбумина под действием бидистиллированной модифицированной воды. Бидистиллированная модифицированная вода представляет собой бидистиллят, подвергнутый воздействию статического электрического поля. Наблюдаемый эффект изменения собственной флуоресценции бычьего сывороточного альбумина в бидистиллированной модифицированной воде обусловлен наличием водных кластеров, оказывающих существенное влияние на структурно-функциональные характеристики белковых молекул.

Работы [12, 13] посвящены изучению методами флуоресцентной спектроскопии связывания лекарственных препаратов с молекулами сывороточного альбумина. В [12] исследуется взаимодействие энкефалинов с бычьим сывороточным альбумином. Энкефалины представляют собой пентапептиды, обнаруженные в центральной нервной системе. Энкефалины обладают обезболивающим действием, поэтому предполагается, что они являются эндогенными нейромедиаторами и анальгетиками, к которым не возникает привыкания. В кровотоке энкефалины переносятся сывороточным альбумином. Связывание альбумина с энкефалинами приводит к тушению собственной триптофановой флуоресценции белка.

В [14] исследуется тушение собственной триптофановой флуоресценции бычьего сывороточного альбумина при добавлении в раствор катионного сурфактанта – хлорида цетилпиридиниума. По полученным спектрам флуоресценции определены константы связывания сурфактанта и белка.

В [15] по триптофановой флуоресценции оценивалось взаимодействие молекул бычьего сывороточного альбумина и сывороточного альбумина человека с различными типами сурфактантов.

Методами флуоресцентной спектроскопии в [16] исследованы конформационные изменения молекулы гемоглобина при добавлении перекиси водорода, приводящем к окислению гема с переходом железа в трехвалентное состояние, т.е. в геминую форму.

При изучении строения и физико-химических свойств белков методами флуоресцентной спектроскопии помимо исследований собственной белковой флуоресценции широко используются флуоресцентные красители (зонды и метки) [17, 18]. Использование флуоресцентных зондов и меток в исследованиях белковых макромолекул дает большую информацию о строении белковых молекул. В [19] проводились эксперименты по связыванию индоцианина зеленого с сывороточным альбумином человека с последующим образованием нанокolloидов и их оседанием в лимфатических узлах у пациентов с раком молочной железы.

В [20] изучали процессы изменения структуры белков сыворотки крови человека после употребления алкоголя путем измерения их собственной триптофановой флуоресценции.

Используя метод кругового дихроизма, в [21] изучали эффект взаимодействия АОТ с сывороточным альбумином человека.

В [22] методом кругового дихроизма исследовалось взаимодействие сывороточного альбумина человека с додецилсульфатом натрия (ДСН).

Используя пирен в качестве молекулярного зонда в [23], исследовали взаимодействие бычьего сывороточного альбумина с серией катионных имидазолиевых поверхностно-активных веществ.

В [24, 25] методами флуоресцентного анализа исследованы процессы связывания лекарственных веществ с бычьим сывороточным альбумином и сывороточным альбумином человека.

В [26] использовали ципрофлоксацин, чтобы раскрыть природу связывания лекарственных препаратов с бычьим сывороточным альбумином.

В [27] изучали процессы связывания антибиотика тетрациклина с бычьим сывороточным альбумином (BSA) и с сывороточным альбумином человека (HSA). Большое количество научных работ в настоящее время показывает перспективность флуоресцентного анализа в биомедицинских исследованиях [28-31].

ГЛАВА 2. Методическая часть экспериментов

§2.1. Приготовление растворов белка – бычьего сывороточного альбумина (БСА) / сывороточного альбумина человека (САЧ) – и детергента – Тритона X-100 / Твина-20

Растворы белка (или 5 мкМ БСА, или 5 мкМ САЧ) с различными значениями рН приготовлены в двух буферных системах:

- 1) 0,1 М CH_3COOH – КОН (рН 3,5 – 5,0)
- 2) 0,1 М KH_2PO_4 – 0,1 М NaOH (рН 5,5 – 8,0).

К растворам (рН 3,5 – 8,0) каждого белка (и БСА, и САЧ) добавлены различные концентрации (0,1 – 0,7 мМ) детергента – в одних случаях Тритона X-100 или в других случаях Твина-20.

§2.2. Методика экспериментов для исследования триптофановой флуоресценции БСА / САЧ в растворах с Тритоном X-100 / Твином-20

Флуоресцентные исследования образцов проводились на спектрофлуориметре Perkin Elmer LS55 при комнатной температуре. Скорость сканирования – 300 нм/мин.

Измерения флуоресценции образцов проводились через фиксированный интервал времени после добавления в них детергента – Тритона X-100 или Твина-20.

Триптофановая флуоресценция растворов БСА / САЧ регистрировалась в диапазоне 300 – 600 нм при возбуждении светом с длиной волны $\lambda_{\text{возб}} = 295$ нм. Полученные спектры флуоресценции обрабатывались программой Perkin Elmer FL Winlab.

ГЛАВА 3. Исследование взаимодействия нейтрального детергента Тритона X-100 с сывороточными альбуминами – бычьим сывороточным альбумином (БСА) и сывороточным альбумином человека (САЧ)

§3.1. Тушение триптофановой флуоресценции БСА и САЧ в растворах при добавлении Тритона X-100

В данном параграфе представлены результаты исследований комплексообразования молекул сывороточных альбуминов – или бычьего сывороточного альбумина (БСА) или сывороточного альбумина человека (САЧ) – с нейтральным детергентом Тритоном X-100 (ККМ 0,25 мМ при 25⁰С) при различных значениях рН по анализу тушения триптофановой флуоресценции БСА/САЧ в растворах с детергентом.

Триптофановая флуоресценция БСА и САЧ возбуждалась светом с длиной волны $\lambda = 295$ нм, чтобы не затронуть поглощение Тритона X-100 в области 280 нм. Получены спектры триптофановой флуоресценции БСА и САЧ в растворах с различными концентрациями Тритона X-100 при различных значениях рН (3,5 – 8,0).

В качестве примера на рис. 3.1 представлены спектры триптофановой флуоресценции БСА в растворах с Тритоном X-100 при рН 5,0. На рис. 3.2 представлены спектры триптофановой флуоресценции САЧ в растворах с Тритоном X-100 при рН 7,0 соответственно.

В растворах с Тритоном X-100 наблюдается небольшое синее смещение максимума спектра флуоресценции БСА и САЧ (примерно на 5-7 нм в зависимости от значения рН, например, при рН 5,0 – с 347 нм до 342 нм).

В растворах с Тритоном X-100 в исследованном диапазоне концентраций детергента (0 – 0,7 мМ) происходит практически линейное тушение триптофановой флуоресценции БСА и САЧ при всех значениях рН. Тушение флуоресценции сывороточных альбуминов, происходит как при концентрациях Тритона X-100, меньших его ККМ 250 мкМ, так и при концентрациях Тритона X-100, больших его ККМ.

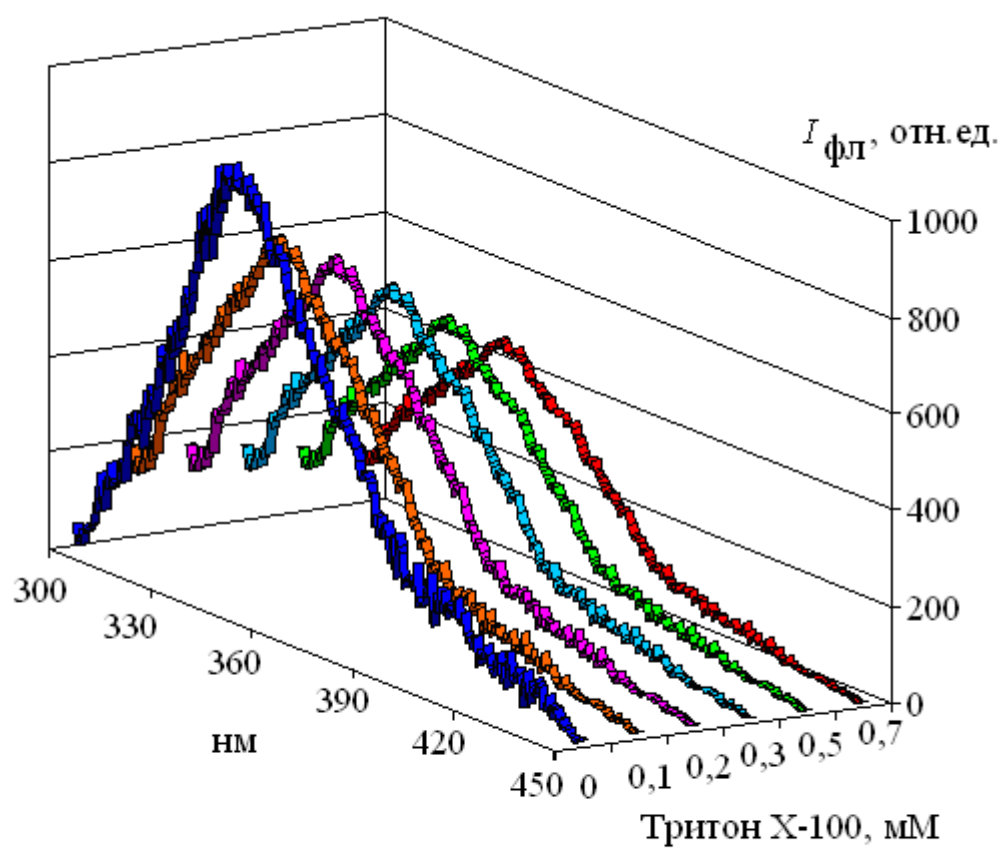


Рис. 3.1.
Спектры триптофановой флуоресценции (возбуждение 295 нм) БСА (5 мкМ) при добавлении в растворы (рН 5,0) различных концентраций Тритона X-100.

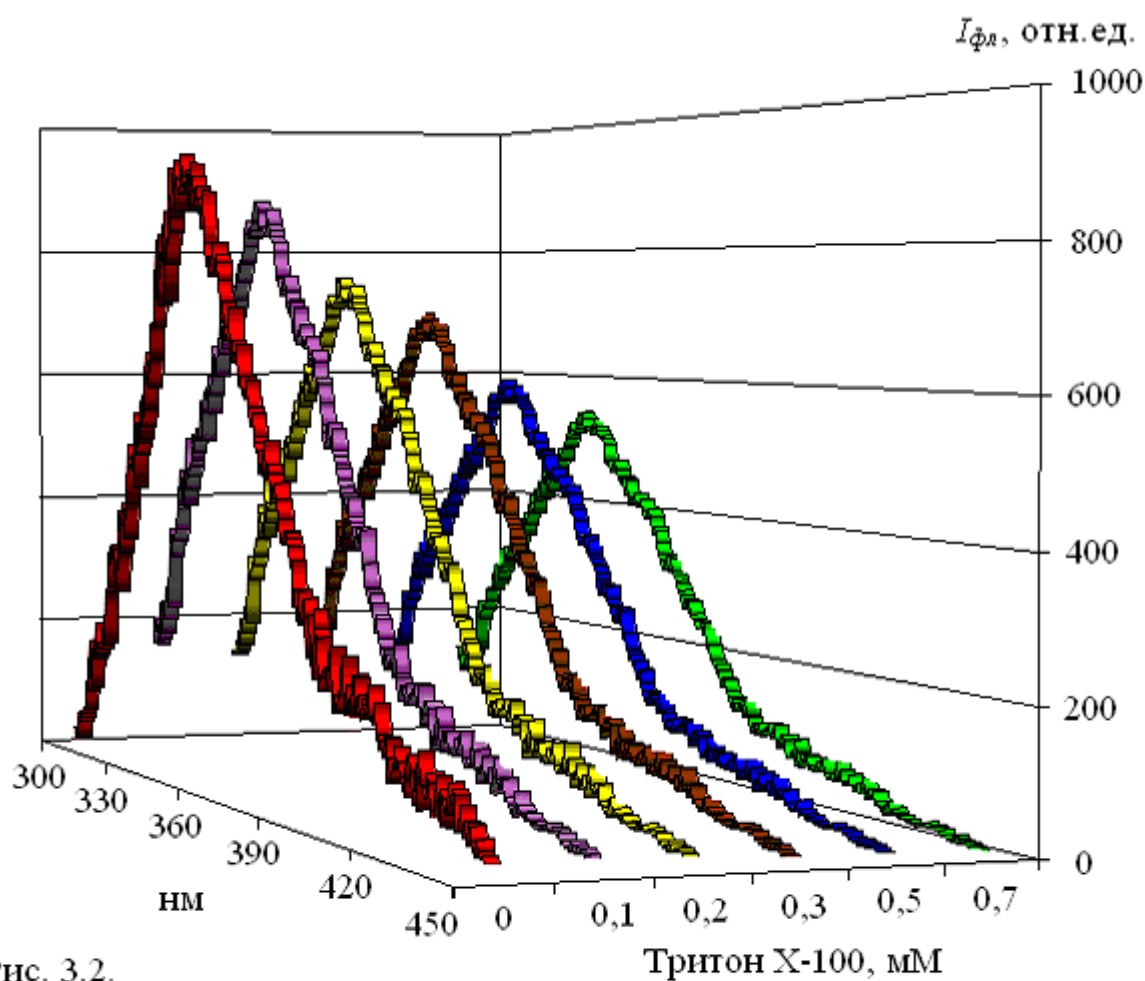


Рис. 3.2.

Спектры триптофановой флуоресценции (возбуждение 295 нм) сывороточного альбумина человека (5 мкМ) при добавлении в растворы (рН 7,0) различных концентраций Тритона X-100.

В области концентраций 0,1 – 0,2 мМ Тритон X-100 находится еще в молекулярной фазе, и молекулы Тритона X-100 взаимодействуют с молекулами БСА/САЧ, образуя комплексы с ними. При концентрациях Тритона X-100 выше его ККМ (в данных измерениях от 0,3 мМ до 0,7 мМ) детергент находится уже в мицеллярной фазе, и мицеллы Тритона X-100 взаимодействуют с молекулами БСА/САЧ, образуя более сложные комплексы с белками.

Тушение флуоресценции триптофана САЧ и триптофанов БСА объясняется комплексообразованием – появлением агрегатов белка и детергента. Тушение флуоресценции белков в растворах Тритона X-100 может быть вызвано уменьшением полярности микроокружения триптофана / триптофанов белков при взаимодействии с фенольной гидрофобной группой Тритона X-100.

§3.2. Определение констант связывания детергента Тритона X-100 с молекулами БСА и САЧ

При тушении флуоресценции белка – БСА или САЧ – в растворах добавлением различных концентраций тушителя – Тритона X-100 в рамках теории Штерна – Фольмера можно записать:

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K \cdot [Q], \text{ где}$$

F_0 – интенсивность флуоресценции БСА/САЧ в отсутствие тушителя (Тритона X-100), F – интенсивность флуоресценции БСА/САЧ в присутствии тушителя (Тритона X-100), $[Q]$ – концентрация тушителя (Тритона X-100), K – константа тушения флуоресценции БСА/САЧ добавлением Тритона X-100 в растворы (M^{-1}).

График зависимости $(F_0/F) - 1$ от $[Q]$ представляет собой прямую линию с наклоном K в случае одного механизма связывания детергента с

белками, а при наличии нескольких механизмов связывания детергента с белками наблюдаются некоторые отклонения от линейности.

По полученным спектрам флуоресценции БСА и САЧ в растворах с различными концентрациями Тритона X-100 при различных значениях рН построены зависимости Штерна – Фольмера $(F_0/F) - 1$ от $[Q]$, где F_0 – интенсивность флуоресценции БСА/САЧ в отсутствие детергента, F – интенсивность флуоресценции БСА/САЧ в присутствии Тритона X-100, $[Q]$ – концентрация Тритона X-100: рис. 3.3 – тушение флуоресценции БСА при рН 3,5 – 5,5, рис. 3.4 – тушение флуоресценции БСА при рН 6,0 – 8,0, рис. 3.5 – тушение флуоресценции САЧ при рН 3,5 – 5,5, рис. 3.6 – тушение флуоресценции САЧ при рН 6,0 – 8,0.

Видно, что зависимость $(F_0/F) - 1$ от $[Q]$ практически линейна (монотонно возрастает) при всех значениях рН, что указывает на один механизм комплексообразования Тритона X-100 с молекулами альбуминов (БСА и САЧ) – на гидрофобный механизм.

По линейной аппроксимации графиков Штерна – Фольмера определены константы тушения флуоресценции БСА и САЧ в растворах с Тритонам X-100 при различных значениях рН (рис. 3.7). Тушение флуоресценции БСА/САЧ в растворах Тритона X-100 вызывается уменьшением полярности микроокружения триптофанов БСА / триптофана САЧ при взаимодействии с фенольной гидрофобной группой Тритона X-100.

Видно (рис. 3.7), что наибольшее тушение триптофановой флуоресценции БСА/САЧ в растворах Тритона X-100 происходит примерно при рН 5,0, что объясняется наиболее сильным комплексообразованием Тритона X-100 с молекулами БСА/САЧ.

Данный факт объясняется тем, что при рН 5,0, лежащем вблизи рI БСА и рI САЧ, молекулы БСА и САЧ в целом электрически нейтральны, и поэтому с ними наиболее интенсивно связываются нейтральные молекулы (при концентрациях 0,1 – 0,2 мМ, т.е. меньше ККМ) или мицеллы (при концентрациях 0,3 – 0,7 мМ, т.е. выше ККМ) Тритона X-100.

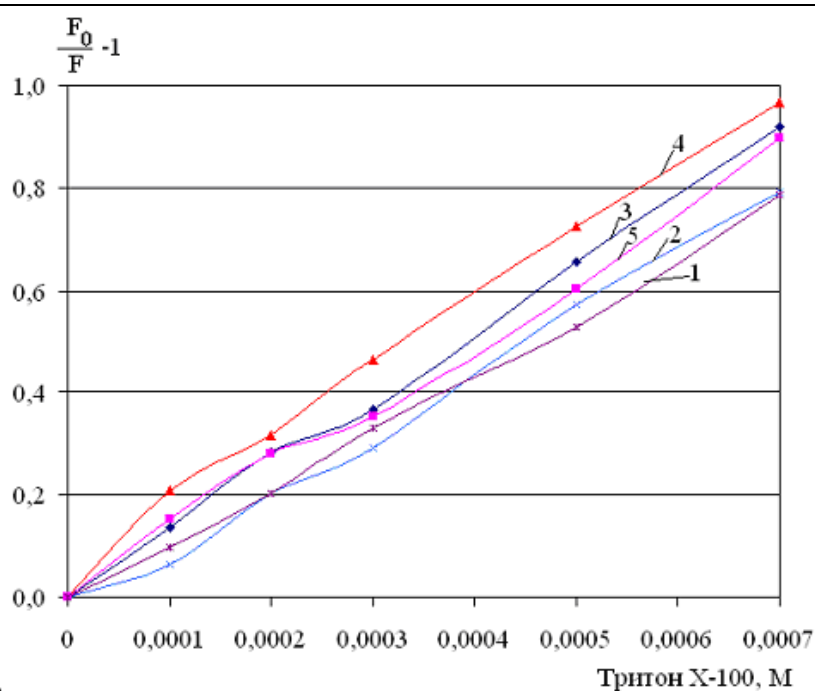


Рис. 3.3.

Графики Штерна-Фольмера тушения триптофановой флуоресценции БСА (5 мкМ) добавлением различных концентраций Тритона X-100 при различных значениях pH: 3,5 (1), 4,0 (2), 4,5 (3), 5,0 (4), 5,5 (5).

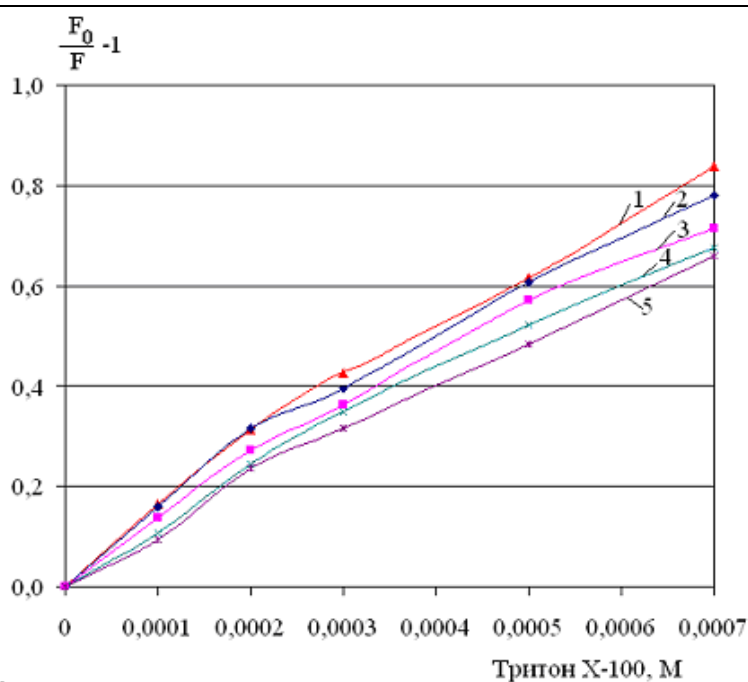


Рис.3.4.

Графики Штерна-Фольмера тушения триптофановой флуоресценции БСА (5 мкМ) добавлением различных концентраций Тритона X-100 при различных значениях pH: 6,0 (1), 6,5 (2), 7,0 (3), 7,5 (4), 8,0 (5).

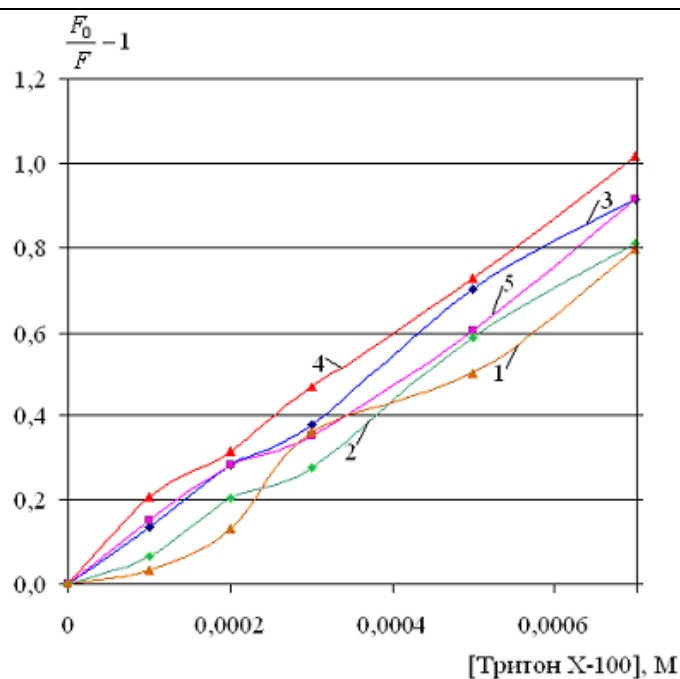


Рис. 3.5. Графики Штерна - Фольмера тушения триптофановой флуоресценции сывороточного альбумина человека (5 мкМ) добавлением различных концентраций Тригона X-100 в растворы с различными значениями рН: 3,5 (1), 4,0 (2), 4,5 (3), 5,0 (4), 5,5 (5).

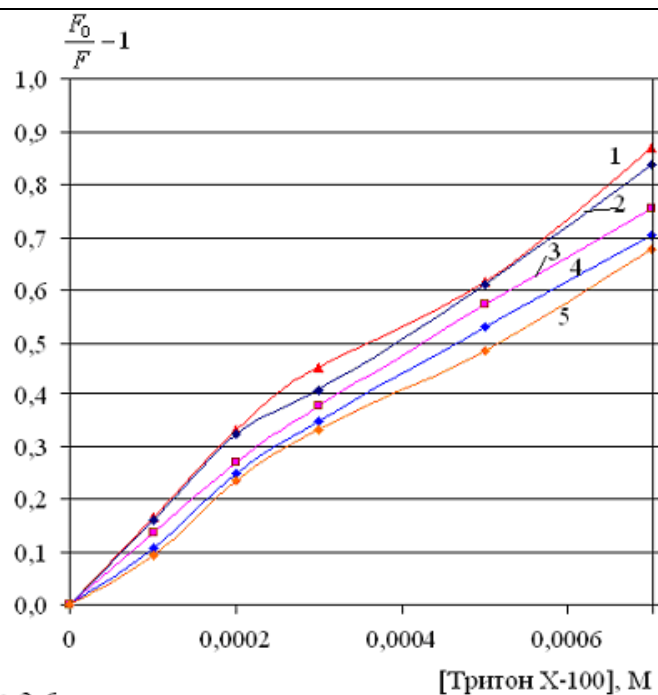


Рис. 3.6. Графики Штерна - Фольмера тушения триптофановой флуоресценции сывороточного альбумина человека (5 мкМ) добавлением различных концентраций Тригона X-100 в растворы с различными значениями рН: 6,0 (1), 6,5 (2), 7,0 (3), 7,5 (4), 8,0 (5).

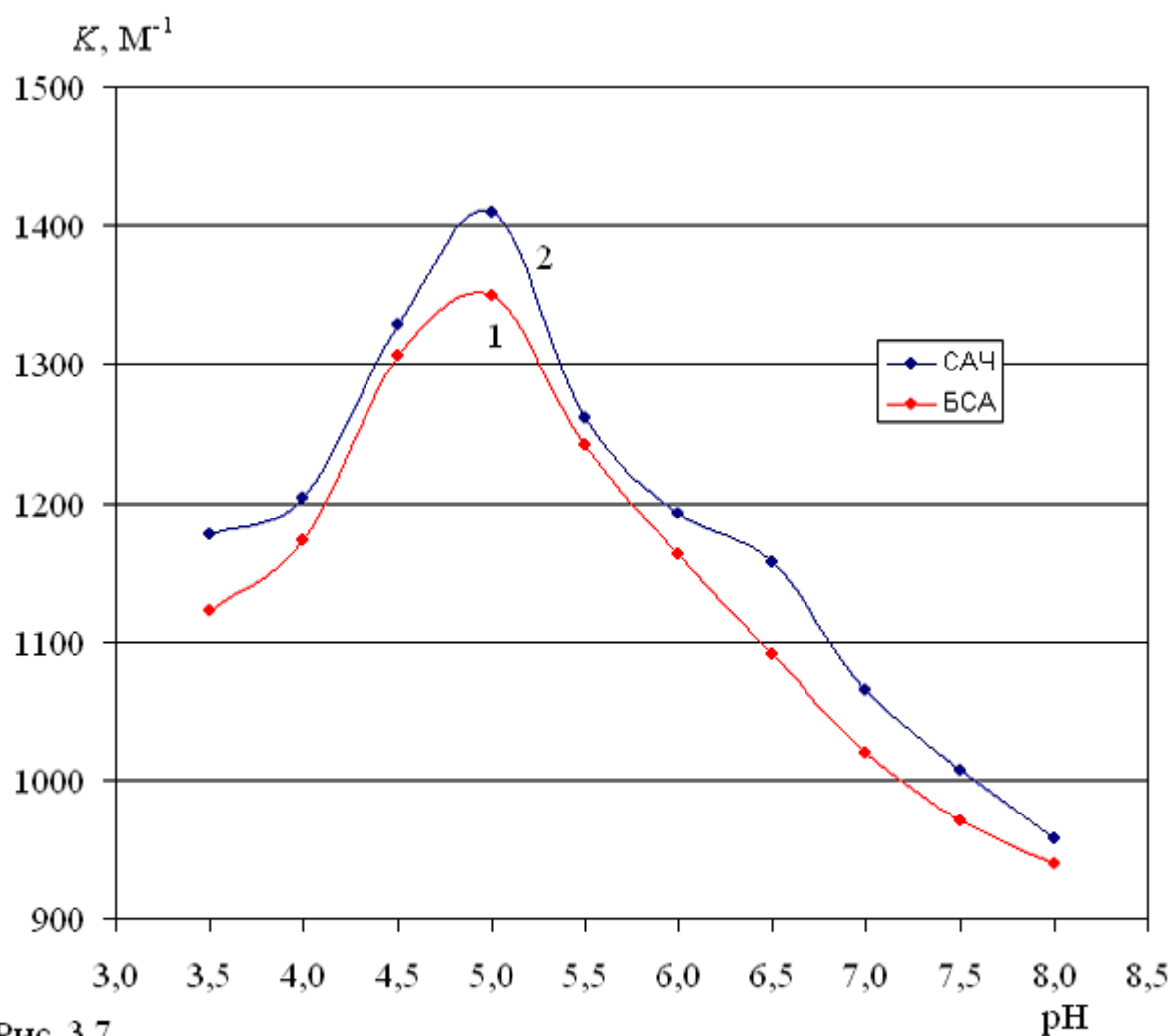


Рис. 3.7.

Константы тушения триптофановой флуоресценции 5 мкМ БСА (1) и 5 мкМ САЧ (2) добавлением Тритона X-100 (0,1 - 0,7 мМ) в растворы при различных значениях рН.

Таким образом, из анализа значений констант тушения флуоресценции БСА и САЧ добавлением Тритона X-100 обнаружена общая черта в комплексообразовании обоих белков с Тритоном X-100: наиболее эффективное комплексообразование обоих сывороточных альбуминов, принадлежащих к одному гомологичному семейству белков, с нейтральным детергентом Тритоном X-100 имеет место при рН 5,0, находящимся вблизи изоэлектрических точек белков.

Комплексообразование сывороточных альбуминов с Тритоном X-100 оказывает влияние на флуоресценцию триптофанов БСА / триптофана САЧ за счет уменьшения полярности микроокружения триптофана / триптофанов белков при взаимодействии с фенольной группой Тритона X-100, что дает возможность использовать флуоресценцию триптофанов в качестве маркера перестроек внутренних гидрофобных областей белков при комплексообразовании с нейтральными детергентами.

ГЛАВА 4. Исследование взаимодействия нейтрального детергента Твина-20 с сывороточными альбуминами – бычьим сывороточным альбумином (БСА) и сывороточным альбумином человека (САЧ)

§4.1. Тушение триптофановой флуоресценции БСА и САЧ в растворах при добавлении Твина 20

В данном параграфе представлены результаты исследований комплексообразования молекул сывороточных альбуминов – бычьего сывороточного альбумина (БСА) и сывороточного альбумина человека (САЧ) – с нейтральным детергентом Твином 20 (ККМ 0,09 мМ при 25⁰С) при различных значениях рН по анализу тушения триптофановой флуоресценции БСА/САЧ. Получены спектры триптофановой флуоресценции БСА и САЧ в растворах с различными концентрациями Твина 20 (больше ККМ Твина 20) при различных значениях рН (3,5 – 8,0).

В растворах с Твином 20 наблюдается небольшое синее смещение максимума спектра флуоресценции БСА и САЧ (примерно на 5-8 нм в зависимости от значения рН, например, при рН 5,0 – с 347 нм до 343 нм).

По полученным спектрам флуоресценции БСА и САЧ в растворах с различными концентрациями Твина 20 при различных значениях рН построены зависимости Штерна – Фольмера (F_0/F) – 1 от $[Q]$, где F_0 – интенсивность флуоресценции БСА/САЧ в отсутствие детергента, F – интенсивность флуоресценции БСА/САЧ в присутствии Твина 20, $[Q]$ – концентрация Твина 20 в молях: рис. 4.1 – тушение флуоресценции БСА при рН 3,5 – 5,5, рис. 4.2 – тушение флуоресценции БСА при рН 6,0 – 8,0, рис. 4.3 – тушение флуоресценции САЧ при рН 3,5 – 5,5, рис. 4.4 – тушение флуоресценции САЧ при рН 6,0 – 8,0.

Видно, что в растворах при 0,1 – 0,3 мМ Твина 20 происходит тушение триптофановой флуоресценции БСА и САЧ при всех значениях рН, но при более высоких концентрациях Твина 20 (больше 0,3 мМ) дальнейшего тушения триптофановой флуоресценции белков не наблюдается.

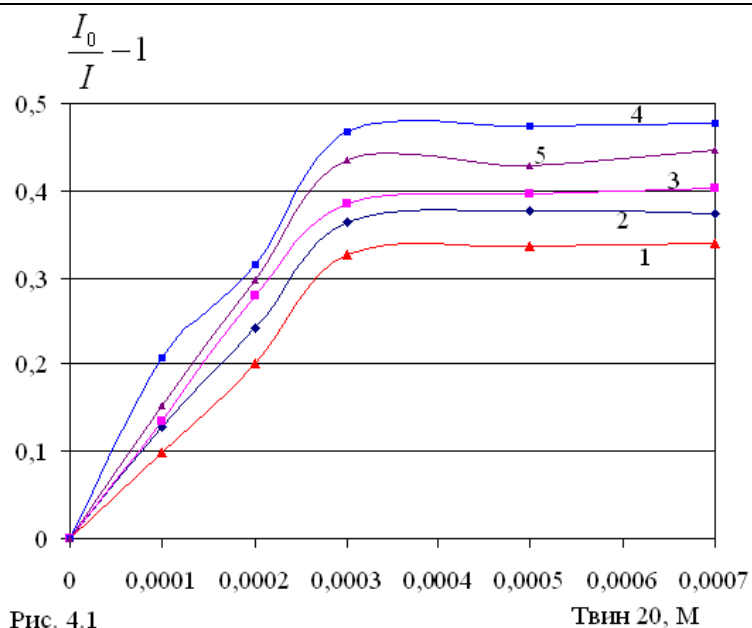


Рис. 4.1
Графики Штерна-Фольмера тушения флуоресценции (возбуждение 295 нм) бычьего сывороточного альбумина (5 мкМ) в растворах Твин 20 при различных значениях рН: 3,5 (1), 4,0 (2), 4,5 (3), 5,0 (4), 5,5 (5).

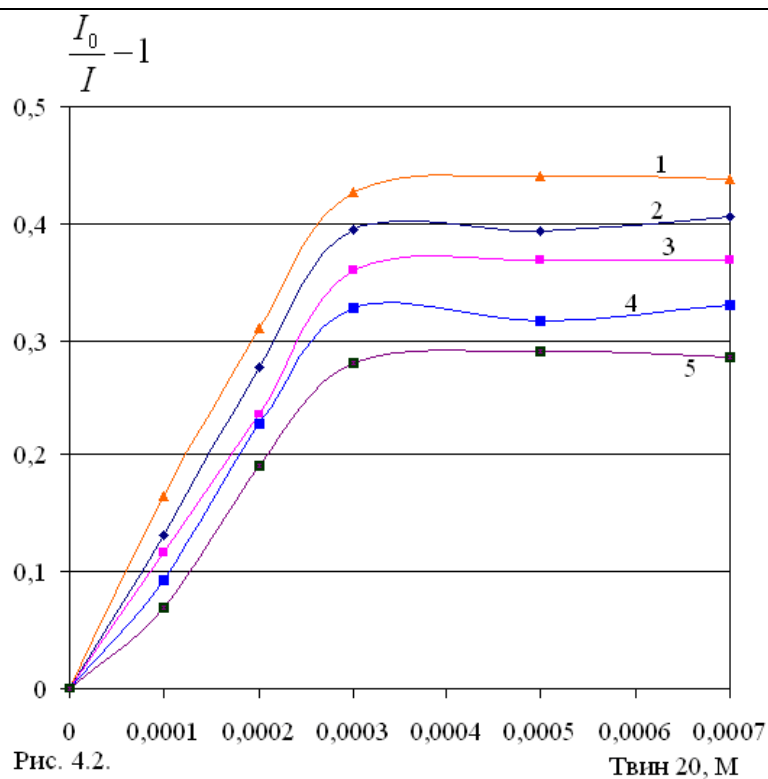


Рис. 4.2.
Графики Штерна-Фольмера тушения флуоресценции (возбуждение 295 нм) бычьего сывороточного альбумина (5 мкМ) в растворах Твин 20 при различных значениях рН: 6,0 (1), 6,5 (2), 7,0 (3), 7,5 (4), 8,0 (5).

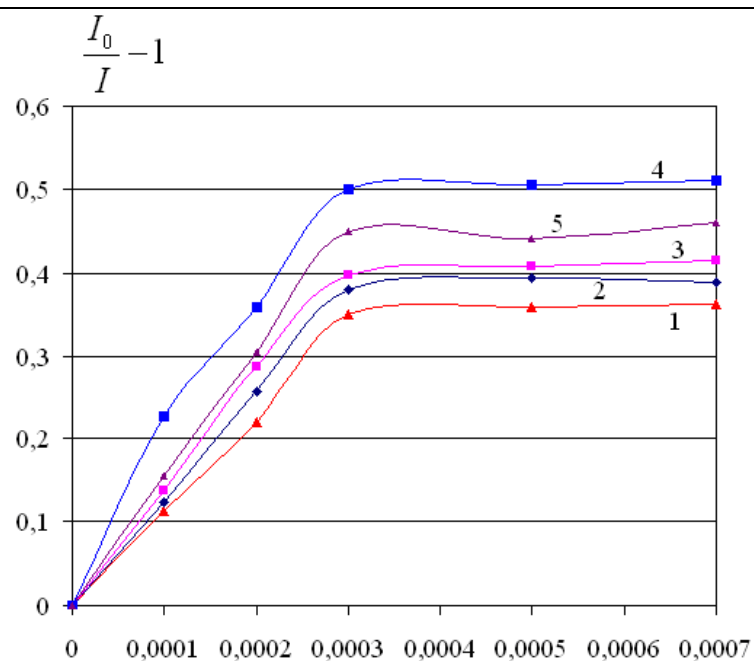


Рис. 4.3. Твин 20, М

Графики Штерна-Фольмера тушения флуоресценции (возбуждение 295 нм) сывороточного альбумина человека (5 мкМ) в растворах Твин 20 при различных значениях рН: 3,5 (1), 4,0 (2), 4,5 (3), 5,0 (4), 5,5 (5).

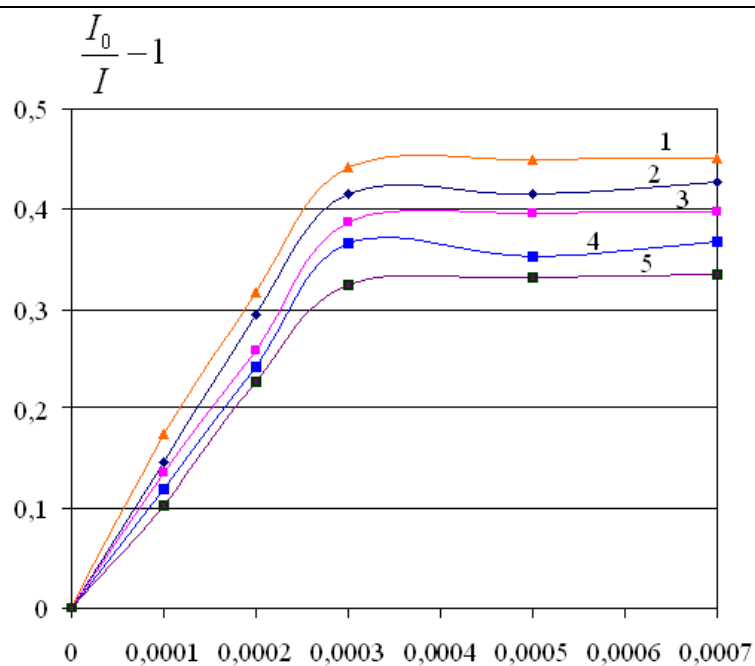


Рис. 4.4. Твин 20, М

Графики Штерна-Фольмера тушения флуоресценции (возбуждение 295 нм) сывороточного альбумина человека (5 мкМ) в растворах Твин 20 при различных значениях рН: 6,0 (1), 6,5 (2), 7,0 (3), 7,5 (4), 8,0 (5).

В исследованном диапазоне концентраций Твин 20 (0,1 – 0,7 мМ) находится в мицеллярной фазе (ККМ 0,09 мМ). Мицеллы Твина 20 взаимодействуют с молекулами БСА/САЧ, образуя сложные комплексы с белками, что и приводит к тушению триптофановой флуоресценции альбуминов при 0,1 – 0,3 мМ Твина 20 в растворе. Данное тушение флуоресценции БСА/САЧ в растворах Твина 20 (при 0,1 – 0,3 мМ) обусловлено уменьшением полярности микроокружения триптофана САЧ / триптофанов БСА при взаимодействии с мицеллами детергента. При дальнейшем увеличении концентрации Твина в растворе (больше 0,3 мМ) дальнейшего изменения полярности микроокружения триптофана / триптофанов в белках и соответственно дальнейшего тушения флуоресценции белков не происходит.

§4.2. Определение констант связывания детергента Твина-20 с молекулами БСА и САЧ

Согласно теории Штерна-Фольмера график зависимости $(F_0/F) - 1$ от $[Q]$ (где F_0 – интенсивность флуоресценции белков в отсутствие тушителя-детергента, F – интенсивность флуоресценции белков в присутствии тушителя-детергента, $[Q]$ – концентрация тушителя-детергента) представляет собой прямую линию с наклоном K в случае одного механизма связывания детергента с белками, а при наличии нескольких механизмов связывания детергента с белками наблюдаются отклонения от линейности.

Видно (рис. 4.1 – 4.4), что зависимости $(F_0/F) - 1$ от $[Q]$ имеют нелинейный характер при всех значениях рН, что указывает на два механизма комплексообразования Твина 20 с молекулами БСА / САЧ.

В данной работе рассмотрено две различные модели определения констант тушения флуоресценции белков при их взаимодействии с Твином 20. Определенные из тушения флуоресценции белков добавлением различных концентраций Твина константы тушения флуоресценции фактически ассоциируются с константами связывания белков с Твином 20.

Таблица 4.1. Константы тушения триптофановой флуоресценции БСА в растворах Твин 20, отражающие связывание БСА с Твин 20.

рН	K_{eff}, M^{-1} (Модель 1)	Модель 2	
		K_1, M^{-1}	K_2, M^{-1}
3,5	$0,48 \cdot 10^3$	$1,09 \cdot 10^3$	$2,02 \cdot 10^2$
4,0	$0,52 \cdot 10^3$	$1,21 \cdot 10^3$	$2,11 \cdot 10^2$
4,5	$0,55 \cdot 10^3$	$1,30 \cdot 10^3$	$2,35 \cdot 10^2$
5,0	$0,63 \cdot 10^3$	$1,51 \cdot 10^3$	$2,52 \cdot 10^2$
5,5	$0,60 \cdot 10^3$	$1,45 \cdot 10^3$	$2,27 \cdot 10^2$
6,0	$0,58 \cdot 10^3$	$1,42 \cdot 10^3$	$2,04 \cdot 10^2$
6,5	$0,55 \cdot 10^3$	$1,33 \cdot 10^3$	$1,96 \cdot 10^2$
7,0	$0,51 \cdot 10^3$	$1,20 \cdot 10^3$	$1,79 \cdot 10^2$
7,5	$0,45 \cdot 10^3$	$1,12 \cdot 10^3$	$1,53 \cdot 10^2$
8,0	$0,41 \cdot 10^3$	$0,97 \cdot 10^3$	$1,49 \cdot 10^2$

Таблица 4.2. Константы тушения триптофановой флуоресценции САЧ в растворах Твин 20, отражающие связывание САЧ с Твин 20.

рН	K_{eff}, M^{-1} (Модель 1)	Модель 2	
		K_1, M^{-1}	K_2, M^{-1}
3,5	$0,51 \cdot 10^3$	$1,16 \cdot 10^3$	$2,05 \cdot 10^2$
4,0	$0,54 \cdot 10^3$	$1,28 \cdot 10^3$	$2,12 \cdot 10^2$
4,5	$0,57 \cdot 10^3$	$1,35 \cdot 10^3$	$2,38 \cdot 10^2$
5,0	$0,66 \cdot 10^3$	$1,64 \cdot 10^3$	$2,56 \cdot 10^2$
5,5	$0,62 \cdot 10^3$	$1,50 \cdot 10^3$	$2,38 \cdot 10^2$
6,0	$0,60 \cdot 10^3$	$1,47 \cdot 10^3$	$2,10 \cdot 10^2$
6,5	$0,57 \cdot 10^3$	$1,40 \cdot 10^3$	$2,05 \cdot 10^2$
7,0	$0,54 \cdot 10^3$	$1,29 \cdot 10^3$	$1,94 \cdot 10^2$
7,5	$0,50 \cdot 10^3$	$1,22 \cdot 10^3$	$1,85 \cdot 10^2$
8,0	$0,46 \cdot 10^3$	$1,10 \cdot 10^3$	$1,68 \cdot 10^2$

Модель 1 (простая модель Штерна – Фольмера):

При тушении флуоресценции белков в растворах добавлением различных концентраций Твина 20 можно согласно теории Штерна – Фольмера записать уравнение:

$\frac{F_0}{F} = 1 + K \cdot [Q]$, где K – константа тушения флуоресценции белков, определяющая связывание белков с Твином 20 (M^{-1}).

Данная модель описывает линейную зависимость $(F_0/F) - 1$ от $[Q]$, поэтому для сложных нелинейных случаев можно говорить только о линии тренда данных зависимостей и, соответственно, о неких эффективных константах тушения флуоресценции (константах тренда, K_{eff}) белков в растворах Твина 20, отражающих связывание белков с Твином, при различных значениях рН (табл. 4.1 и табл. 4.2). Определенные по линии тренда зависимостей $(F_0/F) - 1$ от $[Q]$ константы K_{eff} усреднено учитывают все механизмы взаимодействий БСА / САЧ с мицеллами Твина 20.

Из данных табл. 4.1 и табл. 4.2 видно, что зависимость константы K_{eff} связывания БСА/САЧ с Твином от значения рН имеет нелинейный параболический вид с максимумом при рН 5,0 для обоих белков.

Модель 2 (Разбивание зависимостей $(F_0/F) - 1$ от $[Q]$ на два линейных случая):

Для более точного описания полученных зависимостей $(F_0/F) - 1$ от $[Q]$ их можно разложить в рамках Модели 2 на две составляющие – в области концентраций Твина меньше 0,3 мМ и в области концентраций Твина больше 0,3 мМ – каждую из которых можно линейно аппроксимировать и получить, соответственно, две константы (табл. 4.1 и табл. 4.2) тушения флуоресценции белков K_1 и K_2 , отражающие различные виды взаимодействий БСА / САЧ с мицеллами Твина 20.

Из данных табл. 4.1 и табл. 4.2 видно, что зависимости констант K_1 и K_2 связывания БСА/САЧ с Твином от значения рН имеют нелинейный параболический вид с максимумом при рН 5,0 для обоих белков, что

повторяет характер зависимости эффективной константы K_{eff} , полученной в Модели 1.

Таким образом, исходя из данных обеих моделей, видно, что наибольшее тушение триптофановой флуоресценции БСА/САЧ в растворах Твина 20 происходит при рН 5,0, следовательно, наиболее эффективное комплексообразование Твина 20 с молекулами БСА/САЧ имеет место при этом значении рН.

Это объясняется тем, что при рН 5,0, лежащем вблизи изоэлектрической точки БСА (рI 4,9) и изоэлектрической точки САЧ (рI 4,7), молекулы БСА и САЧ в целом электрически нейтральны, и поэтому с ними наиболее интенсивно связываются нейтральные мицеллы Твина 20 (исследованы концентрации Твина больше его ККМ).

Обнаруженная общая черта в комплексообразовании обоих белков с Твином 20 – наиболее эффективное комплексообразование обоих сывороточных альбуминов с нейтральным детергентом Твином 20 имеет место при рН 5,0, находящимся вблизи изоэлектрических точек белков, – объясняется принадлежностью БСА и САЧ к одному гомологичному семейству белков.

Также показано, что комплексообразование обоих белков с Твином 20 выходит на насыщение при концентрации 0,3 мМ Твина 20, дальнейшее увеличение концентрации Твина 20 в растворе не приводит к усилению процессов комплексообразования белков с детергентом.

ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ВЫВОДЫ

1. Исследовано тушение триптофановой флуоресценции БСА и САЧ в растворах двух нейтральных детергентов – Тритона X-100 и Твина 20 – и определены константы тушения флуоресценции белков, определяющие взаимодействие БСА и САЧ с каждым из двух детергентов, при различных значениях рН.
2. Из анализа значений констант тушения флуоресценции БСА и САЧ добавлением двух нейтральных детергентов – Тритона X-100 и Твина 20 – обнаружено, что наиболее эффективное комплексообразование обоих сывороточных альбуминов, принадлежащих к одному гомологичному семейству белков, с Тритоном X-100 и с Твином 20 имеет место при рН 5,0, находящимся вблизи изоэлектрических точек белков.
3. Показано, что в исследованном диапазоне концентраций обоих детергентов, в отличие от комплексообразования БСА и САЧ с Тритоном X-100, комплексообразование БСА и САЧ с Твином 20 выходит на насыщение при концентрации 0,3 мМ Твина 20, дальнейшее увеличение концентрации Твина 20 в растворе не приводит к усилению процессов комплексообразования белков с этим детергентом.
4. Комплексообразование сывороточных альбуминов (БСА и САЧ) с двумя нейтральными детергентами – Тритоном X-100 и Твином 20 – оказывает влияние на флуоресценцию триптофанов БСА / триптофана САЧ, что дает возможность использовать флуоресценцию триптофанов в качестве маркера перестроек внутренних гидрофобных областей белков при комплексообразовании с нейтральными детергентами.

СПИСОК ЦИТИРУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ленинджер А. «Биохимия», Москва, Мир, 1973.
2. Шмидт Р., Тевс Г. «Физиология человека», Москва, Мир, 1996.
3. Досон Р., Эллиот Д., Эллиот У., Джонс К. «Справочник биохимика», Москва, Мир, 2003.
4. Остерман Л.А. «Методы исследования белков и нуклеиновых кислот», Москва, 2002.
5. Левшин Л.В., Салецкий А.М. «Оптические методы исследования молекулярных систем», Москва, МГУ, 1994.
6. Левшин Л.В., Салецкий А.М. «Люминесценция и ее измерения», Москва, МГУ, 1989.
7. Тиноко «Физическая химия Применение в биологических науках», Москва, Мир, 2002.
8. Шмидт В. «Оптическая спектроскопия для химиков и биологов», Москва, Мир, 2007.
9. Владимиров Ю.А. Фотохимия и люминесценция белков. Москва: Наука, 1965.
10. Dockal M., Carter D.C., Ruker F. Conformational transitions of the three recombinant domains of human serum albumin depending on pH. Journ. Biological Chemistry, 2000, v. 275, № 5, p. 3042-3050.
11. Кувичкин В.В., Новиков В.В., Алюшев Ф.К., Еремин С.М., Марков И.А., Тен Ю.А. Действие бидистиллированной модифицированной воды на конформационное состояние бычьего сывороточного альбумина. Оценка методами флуоресцентной спектроскопии. Биофизика, 2001, т. 46, № 1, с. 43-45.
12. Jain S., Kumar C.V., Kalonia D.S. Protein-peptide interactions as probed by tryptophan fluorescence: serum albumins and enkephalin metabolites. Pharmaceutical Research, 1992, v. 9, № 8, p. 990-992.

13. Trynda-Lemiesz L., Luczkowski M. Human serum albumin: spectroscopic studies of the paclitaxel binding and proximity relationships with cisplatin and adriamycin. *Journ. Inorg. Biochem.*, 2004, v. 98, № 11, p. 1851-1856.
14. Diaz X., Abuin E., Lissi E. Quenching of BSA intrinsic fluorescence by alkylpyridinium cations. Its relationship to surfactant – protein association. *Journ. of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 2003, v. 155, p. 157-162.
15. Gelamo E.L., Silva C.H.T.P., Imasato H., Tabak M. Interaction of bovine (BSA) and human (HSA) serum albumins with ionic surfactants: spectroscopy and modelling. *BBA*, 2002, v. 1594, p. 84-99.
16. Chiu D.T.-Y., Berg J., Kuypers F.A., Hung I.-J., Wei J.-S., Liu T.-Z. Corelation of membrane lipid peroxidation with oxidation of hemoglobin variants: possibly related to the rates of hemin release. *Free Radical Biology & Medicine*, 1996, v. 21, № 1, p. 89-95.
17. Sun C., Yang J., Li L., Wu X., Liu Y., Liu S. Advanced in the study of luminescence probes for proteins. Review. *Journ. of Chromatography B*, 2004, v. 803, p. 173-190.
18. Meadows F., Narayanan N., Patonay G. Determination of protein – dye association by near infrared fluorescence-detected circular dichroism. *Talanta*, 2000, v. 50, p. 1149-1155.
19. Merian J., Gravier J., Navarro F., Texier I. Fluorescent nanoprobe dedicated to in vivo imaging: from preclinical validations to clinical translation. *Molecules*, 2012, v. 17, p. 5564-5591.
20. Gorinstein S., Goshev I., Moncheva S., Zemser M., Weisz M., Caspi A., Libman I., Tzvi Lerner H., Trakhtenberg S., Martín-Belloso O. Intrinsic tryptophan fluorescence of human serum proteins and related conformational changes. *Journal of Protein Chemistry*, 2000, v. 19, №. 8.
21. Moriyama Y., Takeda K. Protective effects of small amounts of bis-(2-ethylhexyl) sulfosuccinate on the helical structures of human and bovine serum albumins in their thermal denaturations. *Langmuir*, 2005, v. 21, p. 5524–5528.

22. Anand U., Jash C., Mukherjee S. Spectroscopic probing of the microenvironment in a protein–surfactant assembly. *Journal Physical Chemistry B*, 2010, v. 114, p. 15839–15845.
23. Gull N., Sen P., Khan R.H., Kabir-ud-Din. Spectroscopic studies on the comparative interaction of cationic single-chain and gemini surfactants with human serum albumin. *Journal Biochemistry*, 2009, v. 145, p. 67–77.
24. Peters Jr. T., Serum albumin, *Adv. Protein Chemistry*, 1985, v. 37, p. 161–245.
25. Ercelen S., Klymchenko A.S., Mély Y., Demchenko A.P. The binding of novel two-color fluorescence probe FA to serum albumins of different species, *Int. Journal Biomacromol.*, 2005, v. 35, p. 231–242.
26. Anand U., Kurup L., Mukherjee S. Deciphering the role of pH in the binding of ciprofloxacin hydrochloride to bovine serum albumin. *Chemical Physics*, 2012, v. 14, p. 4250-4258.
27. Anand U., Jash C., Boddepalli R.K., Shrivastava A., Mukherjee S. Exploring the mechanism of fluorescence quenching in proteins induced by tetracycline. *Journal Physical Chemistry B*, 2011, v. 115, p. 6312-6320.
28. Royer C. A. Probing protein folding and conformational transitions with fluorescence. *Chemical Reviews*, 2006, v. 106, p. 1769-1784.
29. Кудряшова Е. В., Гладилин А. К., Левашов А. В. Белки в надмолекулярных ансамблях: исследование структуры методом разрешенно-временной флуоресцентной анизотропии. *Успехи биологической химии*, 2002, т. 42, 257-294.
30. Ostergaard J., Larsen C. Bioreversible derivatives of phenol. 1. The role of human serum albumin as related to the stability and binding properties of carbonate esters with fatty acid-like structures in aqueous solution and biological media. *Molecules*, 2007, v. 12, p. 2380-2395.
31. Chakraborty A., Seth D., Setua P., Sarkar N. Photoinduced electron transfer in a protein–surfactant complex: probing the interaction of SDS with BSA. *Journal Physical Chemistry B*, 2006, v. 110, p. 16607–16617.