

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

ФИЗИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ
КАФЕДРА ОБЩЕЙ ФИЗИКИ

БАКАЛАВРСКАЯ РАБОТА

**«ТРИПТОФАНОВАЯ ФЛУОРЕСЦЕНЦИЯ В ИССЛЕДОВАНИИ
ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ БЫЧЬЕГО СЫВОРОТОЧНОГО АЛЬБУМИНА С
НЕИОННЫМ ПОВЕРХНОСТНО-АКТИВНЫМ ВЕЩЕСТВОМ ТВИН-20»**

Выполнил студент 405 группы:
Грапендаал Григорий Робович

подпись студента

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

подпись научного руководителя

Допущен к защите «__» «_____» 2018 г.

Зав. кафедрой

профессор Салецкий А.М. _____

подпись зав.кафедрой

Москва
2018

Оглавление

Введение	3
Глава 1. Применение флуоресцентной спектроскопии в исследованиях молекул белков (литературный обзор)	5
§1.1. Структура и основные свойства белковых молекул. Бычий сывороточный альбумин.....	5
§1.2. Нейтральные (неионные) детергенты. Твин-20.....	8
§1.3. Физические основы флуоресцентной спектроскопии.....	9
§1.4. Теория вращательной деполяризации флуоресценции.....	14
§1.5. Тушение флуоресценции в рамках модели Штерна – Фольмера.....	17
§1.6. Применение флуоресцентной спектроскопии в исследованиях молекул белков.....	18
Глава 2. Методическая часть экспериментов	22
§2.1. Приготовление растворов БСА и Твин-20 для анализа тушения неполяризованной флуоресценции белка.....	22
§2.2. Приготовление растворов БСА и Твин-20 для анализа поляризованной флуоресценции белка.....	22
§2.3. Методика экспериментов для исследования тушения неполяризованной флуоресценции БСА в растворах с Твин-20.....	22
§2.4. Методика экспериментов для исследования поляризованной флуоресценции БСА в растворах с Твин-20.....	23
Глава 3. Исследование взаимодействия детергента Твин-20 с БСА по тушению триптофановой флуоресценции БСА в растворах и определение констант связывания Твин-20 с БСА.....	24
Глава 4. Исследование вращательной диффузии комплексов БСА-Твин по анализу поляризованной триптофановой флуоресценции БСА при вариации значений рН.....	33
Основные результаты и выводы.....	43
Список цитируемой литературы	44

Введение

Данная дипломная работа посвящена изучению взаимодействия белка плазмы крови – бычьего сывороточного альбумина (БСА) – с неионным поверхностно-активным веществом Твин-20.

Исследования взаимодействия поверхностно-активных веществ (ПАВ) с белками представляет интерес для коллоидной, биологической и физической химии, а также для современных промышленных технологий (в частности, при производстве косметических и лекарственных продуктов с ферментами). Большую роль анализ взаимодействия ПАВ-белок играет в фармацевтической промышленности – при разработке носителей лекарственных средств с регулируемой «адресной» доставкой.

Одним из направлений физической химии сейчас является разработка механизмов стабилизации различных дисперсных систем смесями ПАВ-белок. Но основные принципы взаимодействия ПАВ с белками в настоящее время еще не до конца изучены. В основном этот вопрос касается нетоксичных неионных ПАВ, использование которых в комплексе с белками представляет интерес для медицины и фармакологии, потому что ионные ПАВ вызывают повреждение и денатурацию белков. Результаты исследований взаимодействий неионных ПАВ с белками перспективы для разработки новых лекарственных форм и косметической продукции.

Твин 20 (полисорбат 20) – неионогенное (неионное) ПАВ, являющееся эмульгатором и солюбилизатором жиров в составе косметических и лекарственных средств. Существует несколько видов полисорбатов: монолаурат (Твин-20), монопальмитат (Твин-40), моностеарат (Твин-60) и моноолеат (Твин-80). Полисорбаты имеют натуральное происхождение, т. к. основаны на сорбите, который получают из фруктов, и на жирных кислотах из базовых масел (Твин-20 из кокосового масла). Чем ниже номер полисорбата, тем значение его ГЛБ (гидрофильно-липофильного баланса) становится больше, т. е. гидрофильных групп молекул в таком эмульгаторе

больше, чем гидрофобных. Для Твин-20 значение ГЛБ 16,7, критическая концентрация мицеллообразования Твин-20 (ККМ при 25 С⁰) это 0,08 мМ. Поэтому средства с Твин-20 получаются более жидкими и легкими, тогда как с Твин-80 – более вязкими и плотными. Все полисорбаты легко разлагаются в природе, что является хорошим для них экологическим показателем.

Помимо косметической промышленности, Твин-20 используется в иммуноферментном анализе (Вестерн-блот), в качестве солюбилизирующего агента мембранных белков, для стабилизации очищенных водорастворимых белков, используемых в иммунопрофилактике, а также при производстве лекарственных препаратов для получения наносфер определенного размера в качестве носителей лекарств.

Выбор БСА в качестве модельного белка обусловлен тем, что данный белок широко применяется в лабораторной практике, в связи с доступностью исходного материала, стабильностью методик выделения и хорошей изученностью его свойств. БСА применяется в качестве стандарта в различных методах количественного определения белков, в качестве стандарта молекулярной массы белков в хроматографии и электрофорезе.

Целью данной работы является исследование взаимодействия БСА с нейтральным ПАВ (детергентом) Твин-20 по анализу триптофановой флуоресценции БСА в растворах Твин-20. Исследование триптофановой флуоресценции белков широко применяется для оценки структурного состояния белковых молекул и для анализа их взаимодействия с лигандами.

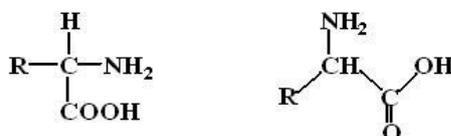
В рамках данной цели работы были поставлены следующие задачи: 1) исследовать неполяризованную триптофановую флуоресценцию БСА при добавлении в растворы Твин-20; 2) определить константы тушения флуоресценции БСА при добавлении Твин-20 (т.е. фактически константы взаимодействия/связывания БСА с Твин); 3) исследовать поляризованную триптофановую флуоресценцию БСА в растворах Твин-20; 4) определить параметры вращательной диффузии (коэффициент диффузии и эффективный радиус) образующихся комплексов БСА-Твин при вариации значений рН.

Глава 1. Применение флуоресцентной спектроскопии в исследованиях молекул белков (литературный обзор)

§1.1. Структура и основные свойства белковых молекул. Бычий сывороточный альбумин

Белки являются биополимерными молекулами, построенными из мономерных единиц – аминокислот [1, 2]. Белки помимо аминокислот могут содержать и другие компоненты, однако структура белков, и, следовательно, их биологические свойства определяются в основном аминокислотным составом, порядком чередования аминокислот в полипептидной цепи и, как следствие, их взаимным пространственным расположением.

Аминокислоты содержат в качестве функциональных групп аминогруппу (NH_2) и карбоксильную группу (COOH), в α -аминокислотах обе они связаны с одним и тем же α -углеродным атомом.



Одни и те же 20 α -аминокислот присутствуют в белковых молекулах всех форм жизни – растений, животных и микроорганизмов.

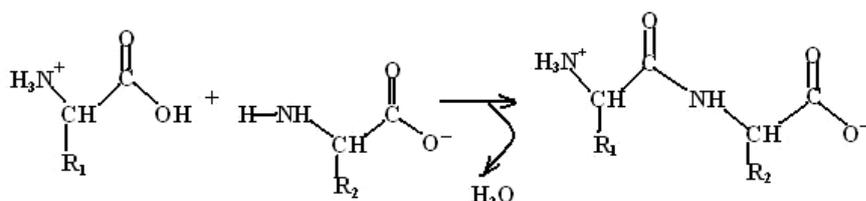
Благодаря тетраэдрическому расположению четырех разных групп (аминогруппы, карбоксильной группы, R-характерного радикала аминокислоты и атома водорода) относительно α -углеродного атома аминокислота обладает оптической активностью (способностью поворачивать плоскость поляризации плоскополяризованного света). Одни аминокислоты, входящие в состав белков, являются правовращающими, а другие – левовращающими.

Аминокислоты несут две слабо ионизируемые группы: аминогруппу и карбоксильную группу. В растворе эти группы находятся в двух формах,

заряженной и незаряженной, между которыми поддерживается протонное равновесие:



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



При связывании аминокислот пептидной связью в цепи образуются белки и пептиды: пептиды – если количество аминокислотных остатков в цепи < 100 , белки – если количество аминокислотных остатков > 100 .

Линейная последовательность аминокислот в полипептидной цепи называется первичной структурой белка. Для белков существует определенное значение pH, соответствующее изоэлектрической точке белка pI (в этой точке суммарный заряд белка равен нулю). При $\text{pH} > \text{pI}$ белок обладает суммарным отрицательным зарядом, при $\text{pH} < \text{pI}$ белок имеет суммарный положительный заряд.

Структура большинства белков стабилизируется двумя классами прочных связей (пептидных и дисульфидных) 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);

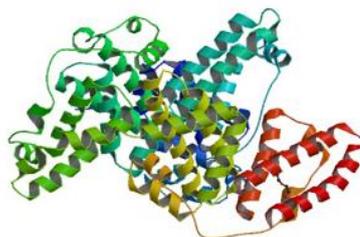
3. третичная структура – общее расположение, взаимная укладка различных областей, доменов и отдельных аминокислотных остатков одиночной полипептидной цепи (глобулярные или фибриллярные белки). Под третичной структурой понимают стерические взаимосвязи между аминокислотными остатками, далеко отстоящими друг от друга по цепи.

4. четвертичная структура – возникает в случае, если белок состоит из двух и более полипептидных цепей, связанных между собой нековалентными связями. Подобные белки называют олигомерами, а составляющие их индивидуальные полипептидные цепи – мономерами или субъединицами.

Аминокислотный состав и структура белковой молекулы определяют свойства белка. Наиболее характерными из них являются оптическая активность, высокое онкотическое давление, способность к поглощению УФ-лучей при 280 нм благодаря наличию ароматических аминокислот – триптофана, тирозина и фенилаланина.

Универсальной системы классификации белков не существует, но обычно белки классифицируют в соответствии с их биологическими функциями – структурные, каталитические, транспортные.

Одним из транспортных белков является бычий сывороточный альбумин (БСА). Бычий сывороточный альбумин, помимо поддержания онкотического давления крови и белкового резерва организма, выполняет 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.



Бычий сывороточный альбумин

Первичная структура БСА определяется единственной полипептидной цепью из 582 аминокислотных остатков. Вторичную структуру БСА на 50-68% составляют α -спирали. Третичная структура БСА определяется тремя доменами, каждый из которых подразделяется на два субдомена. БСА имеет в своей аминокислотной цепи два остатка ароматического триптофана – Trp 135 и Trp 214. БСА – глобулярный белок плазмы крови с молекулярной массой 69 кДа, изоэлектрическая точка БСА (pI) равна 4,9. Выделяют несколько центров связывания лигандов и лекарственных препаратов на молекуле БСА.

§1.2. Нейтральные (неионные) детергенты. Твин-20

Детергенты, используемые в биологических лабораториях представляют собой поверхностно-активные вещества, которые используются для разрушения мембраны клеток (лизиса клеток) и для разрушения межбелковых, белково-липидных и межлипидных связей, денатурации белковых структур.

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

При растворении при определённой концентрации и температуре молекулы детергента образуют мицеллы, с гидрофобной частью внутри мицеллы и головной группой на наружной стороне мицеллы. Количество молекул детергента в мицелле называется числом агрегации.

Минимальная концентрация детергентов, при которой мицеллы обнаруживаются при данной температуре, называется критической концентрацией мицеллообразования (ККМ).

У неионных детергентов 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. Белки с помощью нейтральных детергентов могут быть растворены в своей естественной и активной форме с сохранением белковых взаимодействий. Среди нейтральных детергентов следует выделить Твин-20.

Твин-20 относится к нейтральным (неионным) поверхностно-активным веществам. Твин-20 (ККМ при 25⁰С равна 0,06 мМ) является мягким поверхностно-активным веществом, эффективным для выделения белка в активной форме.

§1.3. Физические основы флуоресцентной спектроскопии

Методы электронной спектроскопии [5], охватывающие не только ультрафиолетовую область, но и видимую область, связаны с переходами между различными электронными состояниями атомов и молекул. Электронные спектры многоатомных молекул обычно исследуются как абсорбционные спектры (спектры поглощения) и спектры люминесценции. Абсорбционные спектры возникают в результате переходов из основного электронного состояния в возбужденные за счёт поглощения квантов электромагнитного излучения. Спектры люминесценции возникают в результате перехода молекулы из возбужденного состояния в основное с испусканием электромагнитного излучения. Если возбуждение происходило за счёт поглощения электромагнитного излучения в оптической области, то испускание излучения в процессе релаксации носит название фотолюминесценции.

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

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).

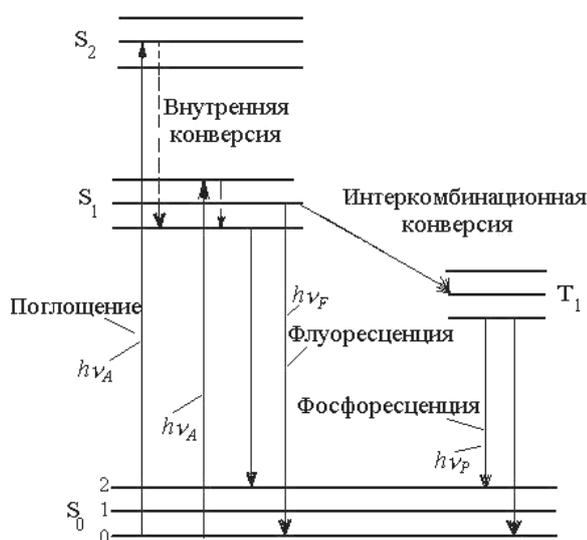


Рис.1.1. Излучательные и безызлучательные переходы между состояниями одинаковой и различной мультиплетности.

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.

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.

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 первого электронного возбужденного состояния 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.

Для неравновесных систем, т.е. для систем со временем релаксации ($\tau_{\text{рел}}$), превосходящим время жизни возбужденного состояния ($\tau_{\text{фл}}$), наблюдается эффект неоднородного уширения спектров, выражающийся в зависимости положения спектра флуоресценции от длины волны возбуждающего света.

Зависимость или независимость спектра флуоресценции от длины волны возбуждающего света позволяет определить, насколько быстро происходит релаксация системы по отношению ко времени жизни флуоресценции. В случае независимости положения спектра флуоресценции от длины волны возбуждающего света релаксационные движения в окружении хромофора можно считать быстрыми ($\tau_{\text{рел}} < \tau_{\text{фл}}$), и полярность окружения хромофора описывается моделью жидких систем. Если же

наблюдается эффект неоднородного уширения спектров, выражающийся в зависимости положения спектра флуоресценции от длины волны возбуждающего света, то релаксацию системы следует считать медленной ($\tau_{rel} > \tau_{fl}$), а окружение хромофора – жестким.

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:

$$I = I_0 e^{-t/\tau},$$

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, или длительность возбужденного состояния.

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.

Явление приближенной зеркальной симметрии спектров поглощения и люминесценции 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. 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 $E_{погл}$:

$$\Gamma = E_{исп} / E_{погл} .$$

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

$$\gamma = N_{исп} / N_{погл} .$$

Энергетический и квантовый выходы люминесценции связаны между собой соотношением:

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

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

С.И. Вавилов установил зависимость энергетического выхода люминесценции от длины волны возбуждающего света, в соответствии с которой энергетический выход люминесценции первоначально растет пропорционально длине волны возбуждающего света, затем в некотором интервале длин волн остается постоянным, после чего резко падает. Эта зависимость получила название закона Вавилова.

Во всем спектральном интервале, где энергетический выход люминесценции пропорционален длине волны возбуждения, квантовый выход свечения сохраняет постоянное значение. Следовательно, независимо от величины частоты возбуждающих квантов в этой спектральной области в излучение преобразуется их постоянное число.

Выход люминесценции чувствителен к внешним воздействиям, которые могут приводить к тушению свечения. Тушение люминесценции

может вызываться различными способами: посторонними примесями, температурным воздействием, высокими концентрациями.

§1.4. Теория вращательной деполяризации флуоресценции

Довольно большое внимание в люминесцентном анализе уделяется исследованию поляризованной люминесценции [5]. Молекулы люминесцирующих веществ оптически анизотропны, поэтому люминесцентное излучение каждой молекулы частично поляризовано. Однако, если анизотропные молекулы ориентированы хаотично, то вещество в целом становится изотропным, а его люминесценция – неполяризованной. Для возникновения поляризации люминесценции необходима анизотропия ориентационного распределения излучателей.

При возбуждении вещества линейно-поляризованным светом его поглощение осуществляется молекулами, у которых поглощающий осциллятор параллелен электрическому вектору падающего света; поглощение полностью отсутствует у молекул, поглощающий осциллятор которых перпендикулярен электрическому вектору возбуждающего света. Молекулы, ориентированные промежуточным образом, обладают некоторыми промежуточными значениями вероятности поглощения. Иными словами, при взаимодействии поляризованного света с веществом преимущественно возбуждаются молекулы, обладающие наиболее близкой ориентацией по отношению к направлению колебаний электрического вектора возбуждающего света. Естественно, что в таких условиях электрический вектор света флуоресценции также должен обладать преимущественным направлением. Интенсивность флуоресценции в произвольном направлении можно представить в виде суммы двух световых потоков $I_{||}$ и I_{\perp} , поляризованных по двум взаимно перпендикулярным направлениям, где $I_{||}$ и I_{\perp} - интенсивности флуоресценции, измеренные через

поляризатор, электрическая ось которого направлена параллельно или перпендикулярно поляризации возбуждающего света.

Для количественной оценки поляризованной флуоресценции вводится понятие степень поляризации флуоресценции:

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

где $I_{||}$ и I_{\perp} - соответственно параллельная и перпендикулярная электрическому вектору возбуждающего света составляющие поляризованной флуоресценции.

Используется и иная характеристика поляризованной флуоресценции – степень анизотропии излучения:

$$r = \frac{I_{||} - I_{\perp}}{I_{||} + 2I_{\perp}}.$$

Между степенью поляризации флуоресценции P и степенью анизотропии излучения r существует простая связь:

$$r = \frac{2P}{3 - P}.$$

Степень поляризации люминесценции зависит от частоты возбуждения и испускания люминесценции ($\nu_{возб}$ и $\nu_{набл}$). Зависимость $P(\nu_{возб})$ при фиксированной частоте наблюдения $\nu_{набл} = const$ (чаще всего наблюдение проводится в максимуме спектра люминесценции) была названа С.И. Вавиловым поляризационным спектром, иногда её называют поляризационным спектром возбуждения. Зависимость $P(\nu_{набл})$ при фиксированном $\nu_{возб}$ называется поляризационным спектром испускания. Поскольку изменение степени поляризации при изменении $\nu_{набл}$ для многих соединений аналогично, то под поляризационным спектром часто подразумевается $P(\nu_{возб})$. Поляризационные спектры во многих случаях могут быть гораздо чувствительнее к небольшим вариациям химического состава изучаемого соединения, чем его спектры поглощения и люминесценции.

Метод поляризованной флуоресценции позволяет оценивать параметры вращательной диффузии флуорофоров [5, 6]. Количественная теория вращательной деполяризации была предложена В. Л. Левшиным и Ф. Перреном с использованием модели вращательной диффузии. На основе этой теории было получено выражение для степени поляризации P флуоресценции:

$$\frac{1}{P} = \frac{1}{P_0} + \left(\frac{1}{P_0} - \frac{1}{3} \right) \cdot \frac{kT\tau_0}{V\eta},$$

где T – абсолютная температура, η – вязкость раствора, V – объем, k – постоянная Больцмана, τ_0 – среднее время жизни возбужденных молекул, P_0 – предельная степень поляризации флуоресценции.

Данная зависимость получила название формулы Левшина – Перрена. Таким образом меняя либо вязкость растворов, либо их температуру, и откладывая на оси ординат $1/P$, а по оси абсцисс T/η получаем прямую линию, которая отсекает на оси ординат отрезок, равный $1/P_0$.

Тангенс угла наклона этой прямой к оси абсцисс

$$\operatorname{tg}\varphi = \left(\frac{1}{P_0} - \frac{1}{3} \right) \cdot \frac{k\tau_0}{V}$$

при известном значении τ_0 позволяет определить величину молекулярного объема

$$V = \frac{(3 - P_0) \cdot k \cdot \tau_0}{3 \cdot P_0 \cdot \operatorname{tg}\varphi}.$$

Используя эти данные, можно определить время вращательной релаксации ξ флуорофора по формуле:

$$\xi = \frac{V\eta}{Tk}, \text{ где } V \text{ – молекулярный объем.}$$

Для флуорофоров можно определить коэффициент вращательной диффузии $D_{\text{вращ}}$:

$$D_{\text{вращ}} = \frac{kT}{6\eta V}.$$

§1.5. Тушение флуоресценции в рамках модели Штерна – Фольмера

Выход флуоресценции чувствителен к внешним воздействиям, которые могут приводить к тушению свечения. Механизм тушения обычно связан с развитием безызлучательных процессов потери энергии возбуждения, во-первых, за счёт увеличения числа столкновений частиц, во-вторых, за счёт образования нелюминесцирующих комплексов и т.д. Во флуоресцентном анализе учёт тушения играет важную роль.

Связывание детергентов в качестве низкомолекулярных лигандов с макромолекулами белка описывается в терминах физической химии и определяется по тушению собственной флуоресценции белка добавлением различных концентраций тушителя – детергента.

В качестве характеристики связывания детергентов с макромолекулами белка рассматривается константа связывания детергента с белком (K).

При тушении собственной флуоресценции белка в растворах добавлением различных концентраций тушителя – детергента можно записать уравнение Штерна – Фольмера [6, 7]:

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

F_0 – интенсивность собственной флуоресценции белка в отсутствие тушителя, F – интенсивность собственной флуоресценции белка в присутствии тушителя (детергента), $[Q]$ – концентрация тушителя (детергента), K – эффективная константа связывания детергента (тушителя) с белком (M^{-1}).

График зависимости $(F_0/F) - 1$ от $[Q]$ представляет собой прямую линию с наклоном K в случае одного механизма связывания детергента с белком, а при наличии нескольких механизмов связывания детергента с белком наблюдаются отклонения от линейности.

§1.6. Применение флуоресцентной спектроскопии в исследованиях молекул белков

Многие биологические вещества являются природными или естественными флуорофорами, т.е. веществами, способными флуоресцировать в определенном диапазоне длин волн при соответствующих условиях возбуждения, это, например, белки. Установлено, что флуоресцировать в белках способны только ароматические аминокислоты, обладающие системой сопряженных двойных связей. 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. Именно эти три аминокислоты и дают собственное поглощение белков и, следовательно, собственную флуоресценцию белков [8]. Основным флуоресцирующим компонентом является триптофан, который обуславливает около 90% всей белковой флуоресценции.

Спектр флуоресценции триптофана в водном растворе представляет собой широкую бесструктурную полосу с максимумом при 348 нм и полушириной в 60 нм, а его форма и положение максимума определяются преимущественно индольным кольцом молекулы. Триптофан-содержащие белки поглощают свет вблизи 280 нм, а спектры флуоресценции сдвинуты в коротковолновую сторону по сравнению со спектрами свободного триптофана в воде. Соответственно значения их максимумов могут изменяться от 343 нм (сывороточный альбумин) до 308 нм (азурин). Основной причиной этого является наличие процессов ориентационного взаимодействия, при которых положение спектра определяется полярностью и жесткостью микроокружения хромофора. На спектры флуоресценции белков также оказывают влияние различные внешние факторы, такие как температура, ионная сила и pH. На параметры флуоресценции белка также оказывают влияние различные специфические факторы. Это могут быть

ионы металлов, низкомолекулярные и высокомолекулярные биологически активные соединения, детергенты, другие белки и т.п.

Флуоресценция белков, не содержащих остатков триптофана, но имеющих в своем составе фенилаланин и тирозин, обусловлена только остатками тирозина, который также является природным флуорофором и имеет максимум спектра флуоресценции при 303–304 нм, а его интенсивность на порядок ниже, чем у триптофана. На положении максимума флуоресценции тирозина, в отличие от триптофана, не сказываются конформационные перестройки макромолекулы. Тирозин интенсивно флуоресцирует в растворе и при денатурации белков, сохраняя положение максимума.

Свечение фенилаланина можно наблюдать только у тех немногих белков, которые не содержат других ароматических аминокислот – триптофана и тирозина (например, преальбумин мышц рыбы, гепатокупреин лошади, рибосомальный белок). Спектр флуоресценции фенилаланина имеет максимум при 282 нм, и его квантовый выход еще на порядок ниже, чем у тирозина.

Так, в [9] по анализу собственной белковой флуоресценции изучено взаимодействие сывороточных альбуминов (БСА и САЧ) с ионными поверхностно-активными веществами (ПАВ) такими, как НРS и СТАС.

В [10] исследовалась флуоресценция бычьего сывороточного альбумина при взаимодействии с катионным ПАВ ЦТАБ и ОДМАХ в водном растворе. Было показано, что флуоресценция тушится.

Кроме собственной триптофановой флуоресценции проводятся исследования взаимодействия белка с различными зондами, например в [11] и [12]. В [11] изучен высокоспецифичный флуоресцентный зонд. Было определено значение константы связывания этого зонда с БСА. Уникальные фотофизические свойства этого зонда позволяют исследовать взаимодействие лигандов и лекарственных веществ различной природы с центром связывания альбумина. В [12] исследовано взаимодействие

альбумина с эозином. Было показано, что флуоресценция эозина тушится в присутствии белка, а также определены константы связывания.

В [13] исследовалась динамика денатурации лизоцима с помощью флуориметрии временного разрешения. Было проведено сравнение сольватационной динамики нативного белка, комплекса белка-SDS и белка с добавлением SDS и DTT.

В [14] исследовалась триптофановая флуоресценция БСА при связывании с различными веществами (TGG, энцефалиновые метаболиты). Было показано, что TGG и лейцин-энцефалин тушат триптофановую флуоресценцию.

В [15] исследовалось взаимодействие белка с сурфактантами для оптимизации их использования в качестве стабилизаторов формы белка по интенсивности триптофановой флуоресценции и с помощью кругового дихроизма. Было получено, что изменения pH, температуры влияют на триптофановую флуоресценцию. В присутствии же полисорбата 80 уменьшаются изменения конформации белка. Также в [15] наблюдалась температурная денатурация белка. Было получено, что температура, при которой начинаются необратимые изменения структуры альбумина, повышается при добавлении в раствор полисорбата 80. Таким образом, он стабилизирует сывороточный альбумин человека, препятствуя изменениям конформации.

В [16] исследовано тушение флуоресценции БСА алкил-пиридиновыми катионами. Было обнаружено, что в водном растворе константа Штерна-Фольмера не зависит от длины алкильной цепочки, а значения константы связывания октилпиридиновых ионов в водном растворе и в присутствии мочевины оказались не зависимыми от концентрации белка.

Методами флуоресцентного анализа с помощью зондов можно определять наличие в растворе микрограммовых количеств сывороточного альбумина [17] и даже нанограммовых [18]. В [18] в качестве зонда использовались соединения с шиффовыми основаниями. Была определена

оптимальная концентрация лиганда для этих целей. В [17] измерялась интенсивность флуоресценции БСА в комплексе с нильским синим.

Измерение тушения флуоресценции альбумина является важным методом изучения связывания различных компонентов с белком. В работе [19] исследовался механизм взаимодействия бычьего сывороточного альбумина с таким биоактивным красителем, как бенгальская роза (RB), методами флуоресцентного анализа, кругового дихроизма, поглощения.

В [20] исследовано методами флуоресцентного анализа взаимодействие САЧ с кверцетином. Кверцетин использовался, как зонд. Связывание кверцетина с альбумином приводит к увеличению степени анизотропии и интенсивности флуоресценции. Исследования нативного и частично денатурированного с помощью мочевины белка показали, что молекулы кверцетина связываются с центром связывания, находящимся недалеко от триптофана. Была получена константа связывания зонда с белком и изменение при этом свободной энергии Гиббса.

Поляризованная спектроскопия является важным методом изучения биологических систем [21]. В [22] поляризованная флуоресценция применялась для определения молярного отношения концентраций флуорофора и белка в растворе. В качестве белка использовался бычий сывороточный альбумин, а в качестве флуорофора - флуоресцеин. Оказалось, что результаты, полученные новым методом, хорошо согласуются с результатами, определенными традиционным путем.

Глава 2. Методическая часть экспериментов

§2.1. Приготовление растворов БСА и Твин-20 для анализа тушения неполяризованной флуоресценции белка

Растворы 5 мкМ БСА (Sigma) с различными значениями pH приготовлены в двух буферных системах:

- 1) 0,1 М CH_3COOH – KOH (pH 3,5 – 5,0);
- 2) 0,1 М KH_2PO_4 – 0,1 М NaOH (pH 5,5 – 8,0).

К растворам БСА добавлены различные концентрации Твин-20 (0,1 – 0,7 мМ) при различных значениях pH (3,5 – 8,0).

§2.2. Приготовление растворов БСА и Твин-20 для анализа поляризованной флуоресценции белка

Растворы 5 мкМ БСА (Sigma) приготовлены в двух буферных системах: 0,1 М CH_3COOH – KOH (pH 3,5 – 5,0) и 0,1 М KH_2PO_4 – 0,1 М NaOH (pH 5,5 – 8,0).

К растворам БСА добавлены различные концентрации Твин-20 (0,1 – 0,7 мМ) при различных значениях pH (3,5 – 8,0).

Для варьирования вязкости в итоговые растворы образцов добавлены различные концентрации сахарозы (10 – 200 мМ).

§2.3. Методика экспериментов для исследования тушения неполяризованной флуоресценции БСА в растворах с Твин-20

Флуоресцентные исследования проводились на спектрофлуориметре Perkin Elmer LS55, спектрально-флуоресцентные характеристики приготовленных образцов исследовались при комнатной температуре.

Измерения флуоресценции образцов БСА проводились через фиксированный интервал времени после добавления в них Твин-20.

Триптофановая флуоресценция БСА регистрировалась в диапазоне 300–500 нм при возбуждении светом с длиной волны $\lambda_{\text{возб}} = 295$ нм.

Спектры флуоресценции БСА обрабатывались программой Perkin Elmer FL Winlab.

§2.4. Методика экспериментов для исследования поляризованной флуоресценции БСА в растворах с Твин-20

Флуоресцентные исследования проводились на спектрофлуориметре Perkin Elmer LS55 при комнатной температуре. Триптофановая флуоресценция БСА регистрировалась в диапазоне 300–500 нм при возбуждении светом с длиной волны $\lambda_{\text{возб}} = 295$ нм. Спектральные щели монохроматора возбуждения и монохроматора эмиссии были равными 2,5 нм. Измерения флуоресценции образцов БСА проводились через фиксированный интервал времени после добавления в них Твин-20 и сахарозы.

Степень поляризации P триптофановой флуоресценции БСА рассчитывалась по значениям $I_{||}$ и I_{\perp} в максимуме спектра испускания флуоресценции белка, где $I_{||}$ и I_{\perp} – интенсивности свечений, поляризованных по двум взаимно перпендикулярным направлениям.

Спектры флуоресценции обрабатывались программой Perkin Elmer FL Winlab.

Глава 3. Исследование взаимодействия детергента Твин-20 с БСА по тушению триптофановой флуоресценции БСА в растворах и определение констант связывания Твин-20 с БСА

Получены спектры неполяризованной триптофановой флуоресценции БСА в растворах с различными концентрациями Твин-20 (0 – 0,7 мМ) при различных значениях рН (3,5 – 8,0).

В растворах с Твин-20 наблюдается синее смещение максимума спектра флуоресценции БСА (на 4 – 9 нм в зависимости от рН): например (рис. 3.1), при рН 5,0 максимум спектра триптофановой флуоресценции БСА смещается с 347 нм до 343 нм при добавлении 0,1 мМ Твин-20 в раствор. Также в растворах с Твин-20 происходит тушение спектра флуоресценции БСА при всех значениях рН.

Согласно теории тушения флуоресценции Штерна – Фольмера:

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

F_0 – интенсивность флуоресценции в отсутствие тушителя, F – интенсивность флуоресценции в присутствии тушителя, $[Q]$ – концентрация тушителя, K – константа тушения флуоресценции (M^{-1}).

График зависимости $(F_0/F) - 1$ от $[Q]$ представляет собой прямую линию с наклоном K в случае одного механизма связывания тушителя с флуорофором, а при наличии нескольких механизмов связывания тушителя с флуорофором наблюдаются некоторые отклонения от линейности.

По полученным спектрам флуоресценции БСА в растворах с Твин-20 при различных значениях рН построены зависимости Штерна – Фольмера $(F_0/F) - 1$ от $[Q]$, где F_0 – интенсивность флуоресценции БСА в отсутствие Твин-20, F – интенсивность флуоресценции БСА в присутствии Твин-20, $[Q]$ – концентрация Твин-20 (в М). На рис. 3.2 представлены зависимости Штерна – Фольмера $(F_0/F) - 1$ для БСА в растворах с различными концентрациями Твин-20 при рН 3,5 – 8,0.

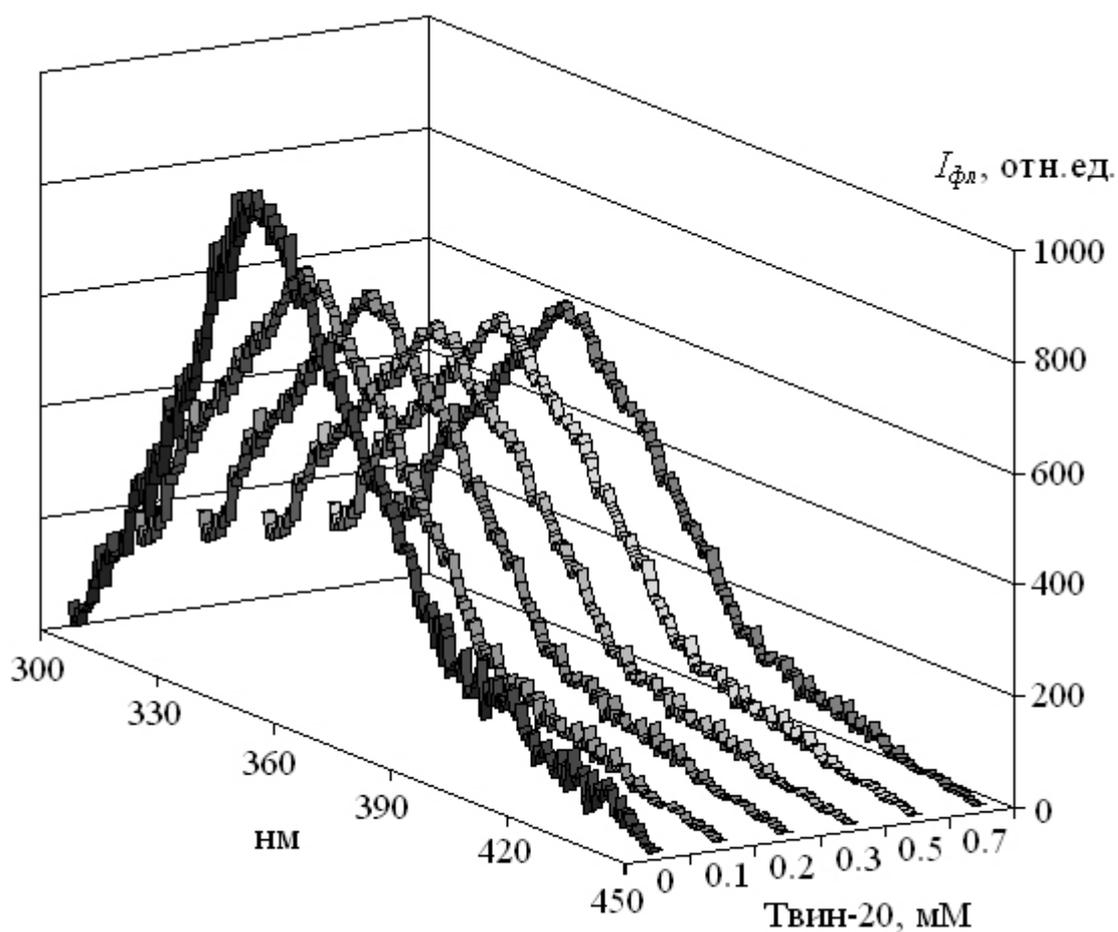


Рис. 3.1. Спектры флуоресценции 5 мкМ БСА (возбуждение 295 нм) в растворах с различными концентрациями Твин-20 при рН 5,0.

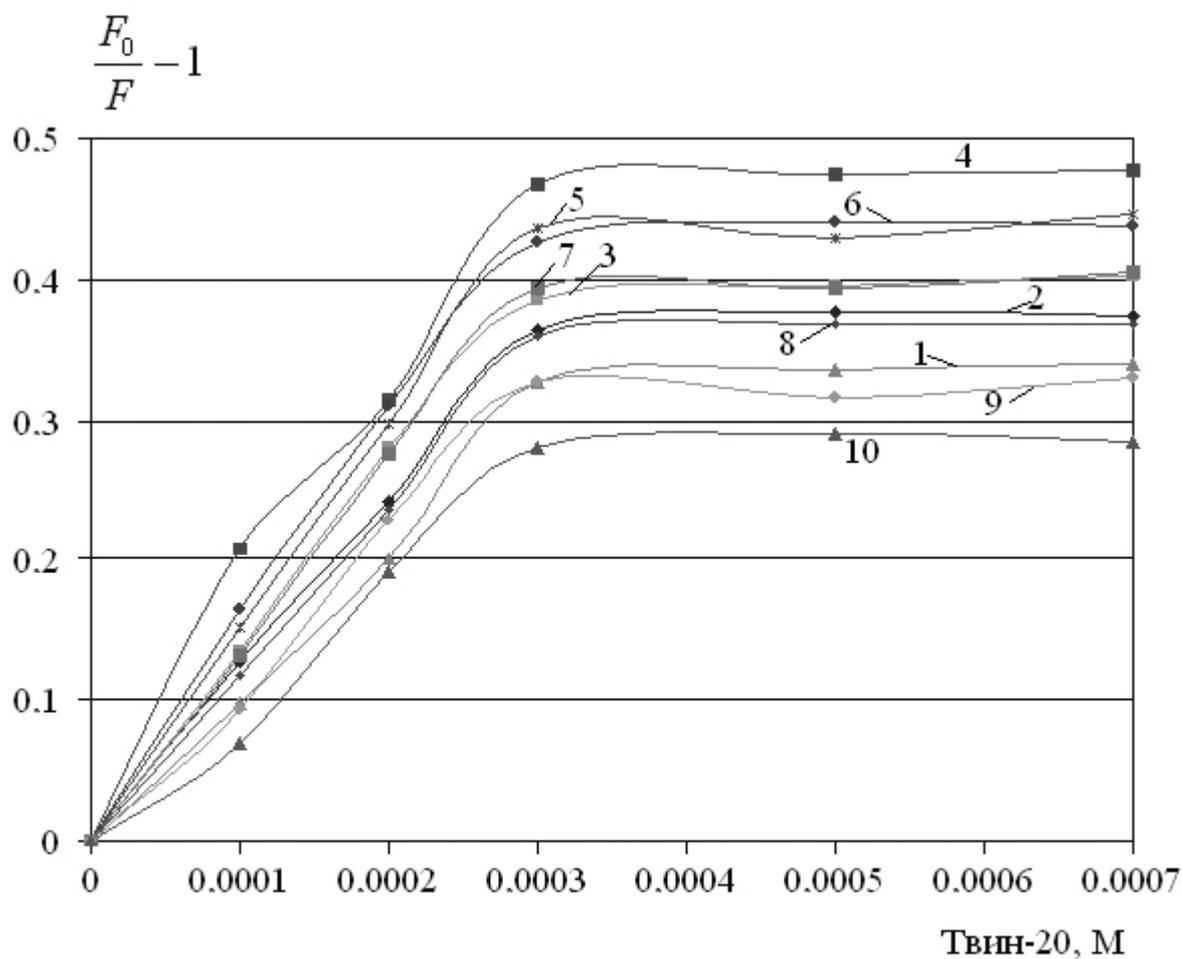


Рис. 3.2. Графики Штерна-Фольмера тушения триптофановой флуоресценции 5 мкМ БСА добавлением различных концентраций Твин-20 при различных значениях рН: 3,5 (1), 4,0 (2), 4,5 (3), 5,0 (4), 5,5 (5), 6,0 (6), 6,5 (7), 7,0 (8), 7,5 (9), 8,0 (10).

Видно, что в растворах с концентрациями Твин-20, не превышающими 0,3 мМ, происходит тушение триптофановой флуоресценции БСА при всех значениях рН, но при более высоких концентрациях Твин-20 (больше 0,3 мМ) дальнейшего тушения триптофановой флуоресценции белка не наблюдается.

В исследованном диапазоне концентраций Твин-20 находится в мицеллярной фазе (ККМ 0,06 мМ). Мицеллы Твина-20 взаимодействуют с молекулами БСА, образуя сложные комплексы с белком, что и приводит к тушению триптофановой флуоресценции БСА при 0,1 – 0,3 мМ Твин-20 в растворе. Данное тушение флуоресценции БСА в растворах Твин-20 (до 0,3 мМ) обусловлено изменением микроокружения триптофанов БСА при взаимодействии с мицеллами детергента. При дальнейшем увеличении концентрации Твин-20 в растворе (больше 0,3 мМ) дальнейшего изменения окружения триптофанов в БСА и, соответственно, дальнейшего тушения флуоресценции БСА не происходит.

Видно (рис. 3.2), что при всех значениях рН зависимости $(F_0/F) - 1$ от $[Q]$ имеют нелинейный характер с возникновением эффекта насыщения при концентрациях Твина-20, больших 0,3 мМ.

В данной работе рассмотрены *три различные модели определения констант* тушения флуоресценции БСА при их взаимодействии с Твин-20. Определенные из тушения флуоресценции БСА добавлением различных концентраций Твина-20 константы тушения флуоресценции фактически являются константами связывания БСА с Твином-20.

Модель 1 (классическая модель Штерна – Фольмера):

Как указывалось выше, при тушении флуоресценции БСА 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 БСА, определяющая связывание Твин-20 с этим белком (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}) белка в растворах Твин-20, фактически являющихся константами ассоциации БСА с Твин-20 при различных значениях рН (табл. 1). Определенные по линии тренда зависимостей $(F_0/F) - 1$ от $[Q]$ константы K_{eff} усреднено учитывают все механизмы взаимодействий БСА с мицеллами Твина-20.

Таблица 1. Константы K_{eff} (M^{-1}) связывания БСА с Твин-20, определенные по тушению триптофановой флуоресценции БСА в рамках Модели 1.

рН	БСА
3,5	$0,48 \cdot 10^3$
4,0	$0,52 \cdot 10^3$
4,5	$0,55 \cdot 10^3$
5,0	$0,63 \cdot 10^3$
5,5	$0,60 \cdot 10^3$
6,0	$0,58 \cdot 10^3$
6,5	$0,55 \cdot 10^3$
7,0	$0,51 \cdot 10^3$
7,5	$0,45 \cdot 10^3$
8,0	$0,41 \cdot 10^3$

Из данных табл. 1 видно, что зависимость константы K_{eff} связывания БСА с Твин-20 от значения рН имеет нелинейный параболический вид с максимумом при рН 5,0.

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

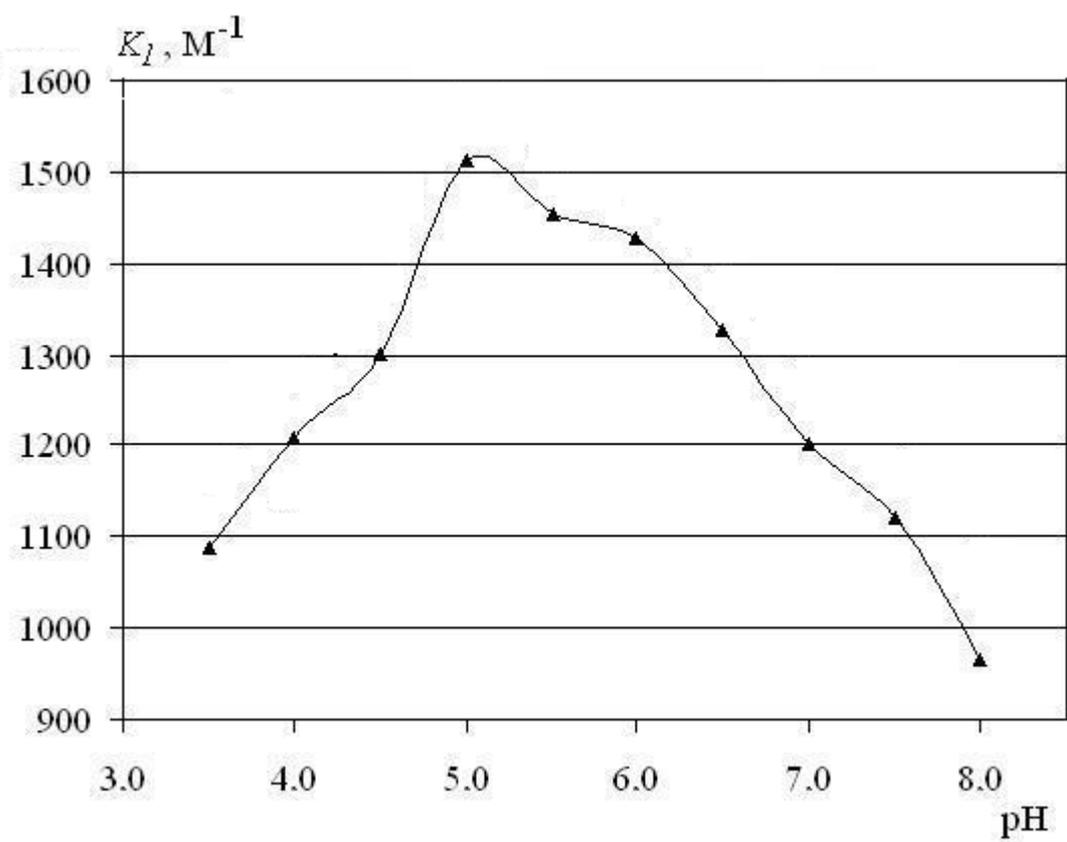


Рис. 3.3. Константа K_1 ассоциации БСА с мицеллами Твин-20 при различных значениях pH в области концентраций Твин-20 < 0,3 мМ.

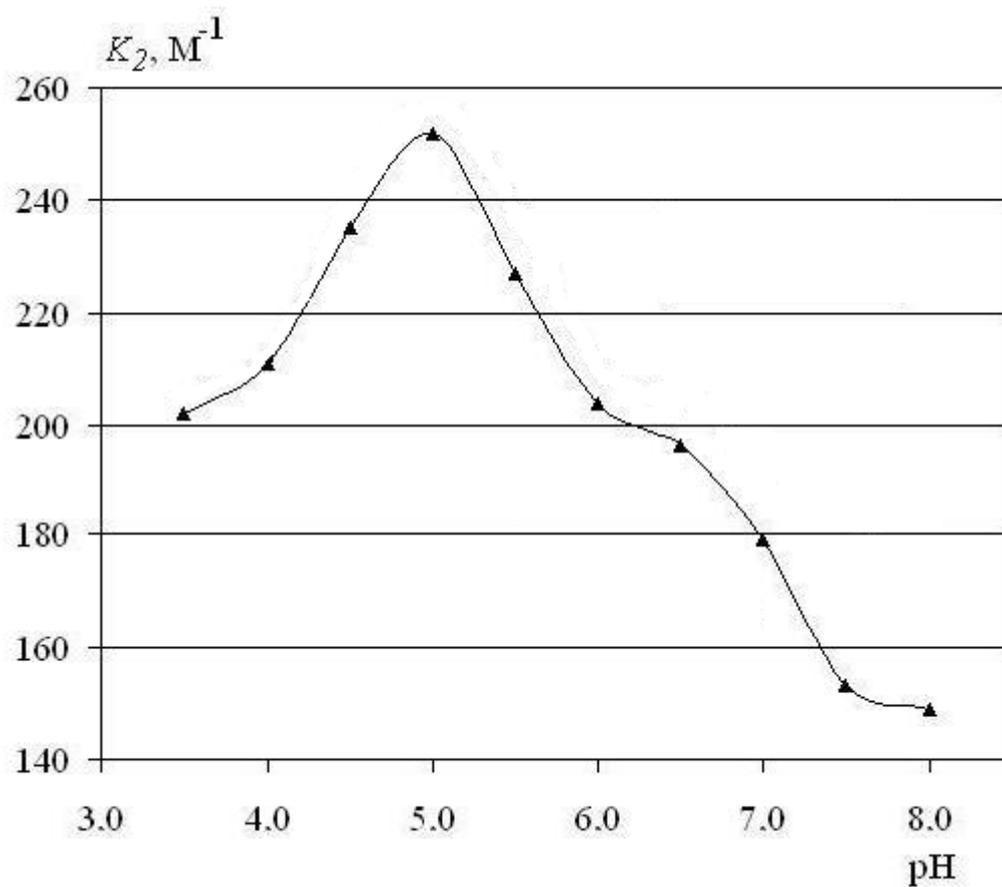


Рис. 3.4. Константа K_2 ассоциации БСА с мицеллами Твин-20 при различных значениях pH в области концентраций Твин-20 > 0,3 мМ.

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-20 меньше 0,3 мМ и в области концентраций Твина-20 больше 0,3 мМ – каждую из которых линейно аппроксимировать и получить, соответственно, две константы тушения флуоресценции БСА, фактически являющиеся константами ассоциации/связывания БСА с мицеллами Твин-20 при различных значениях рН – при концентрациях Твин-20 $< 0,3$ мМ это K_1 (рис. 3.3) и при концентрациях Твин-20 $> 0,3$ мМ это K_2 (рис. 3.4).

Из данных рис. 3.3 и рис. 3.4 видно, что зависимости констант K_1 и K_2 ассоциации БСА с Твин-20 от значения рН имеют нелинейный параболический вид с максимумом при рН 5,0, что повторяет характер зависимости эффективной константы K_{eff} , полученной в Модели 1.

Модель 3 (описание зависимостей $(F_0/F) - 1$ сигмоидальной функцией):

При нелинейном характере зависимости $(F_0/F) - 1$ от $[Q]$ тушение флуоресценции БСА в растворах при добавлении Твин-20 можно записать следующим образом:

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

где n – коэффициент Хилла или коэффициент кооперативности, K_{sigm} – константа тушения флуоресценции БСА, фактически константа ассоциации БСА с Твин-20 (M^{-1}), $K_{sigm} = \sqrt[n]{K}$. В рамках данной Модели 3, основанной на использовании сигмоидальной функции описания тушения флуоресценции БСА, определены константы K_{sigm} ассоциации/связывания БСА с Твин-20 (табл. 2) и коэффициенты кооперативности Хилла (табл. 2).

Из данных табл. 2 видно, как и в предыдущих моделях, что зависимость константы K_{sigm} ассоциации БСА с Твин-20 от значения рН имеет нелинейный параболический вид с максимумом при рН 5,0.

Из данных табл. 2 видно, что в ассоциации мицелл Твин-20 с БСА имеет место явление антикооперативности ($n < 1$).

Антикооперативность ассоциации мицелл детергента с БСА минимальна при рН 5,0 (табл. 2), т.к. коэффициент Хилла при этом значении рН имеет максимальное значение.

Таблица 2. Константы тушения триптофановой флуоресценции БСА в растворах Твин-20, отражающие связывание БСА с Твин-20, и коэффициенты кооперативности Хилла в рамках Модели 3.

рН	БСА – Твин-20	
	K_{sigm}, M^{-1}	n
3,5	$0,99 \cdot 10^3$	0,47
4,0	$1,20 \cdot 10^3$	0,48
4,5	$1,18 \cdot 10^3$	0,50
5,0	$1,39 \cdot 10^3$	0,51
5,5	$1,34 \cdot 10^3$	0,49
6,0	$1,31 \cdot 10^3$	0,47
6,5	$1,24 \cdot 10^3$	0,45
7,0	$1,09 \cdot 10^3$	0,43
7,5	$1,03 \cdot 10^3$	0,41
8,0	$0,94 \cdot 10^3$	0,41

Таким образом, исходя из данных трёх моделей, видно, что наибольшее тушение триптофановой флуоресценции БСА в растворах Твин-20 происходит при рН 5,0, следовательно, наиболее эффективная ассоциация (связывание) мицелл Твин-20 с молекулами БСА имеет место при этом значении рН.

Это можно объяснить тем, что при рН 5,0, лежащем вблизи изоэлектрической точки БСА (рI 4,9), молекулы БСА в целом электрически нейтральны, и поэтому с ними наиболее интенсивно связываются нейтральные мицеллы Твин-20, что указывает на то, что гидрофобный механизм ассоциации/связывания мицелл Твин-20 с БСА является определяющим.

Глава 4. Исследование вращательной диффузии комплексов БСА-Твин по анализу поляризованной триптофановой флуоресценции БСА при вариации значений рН

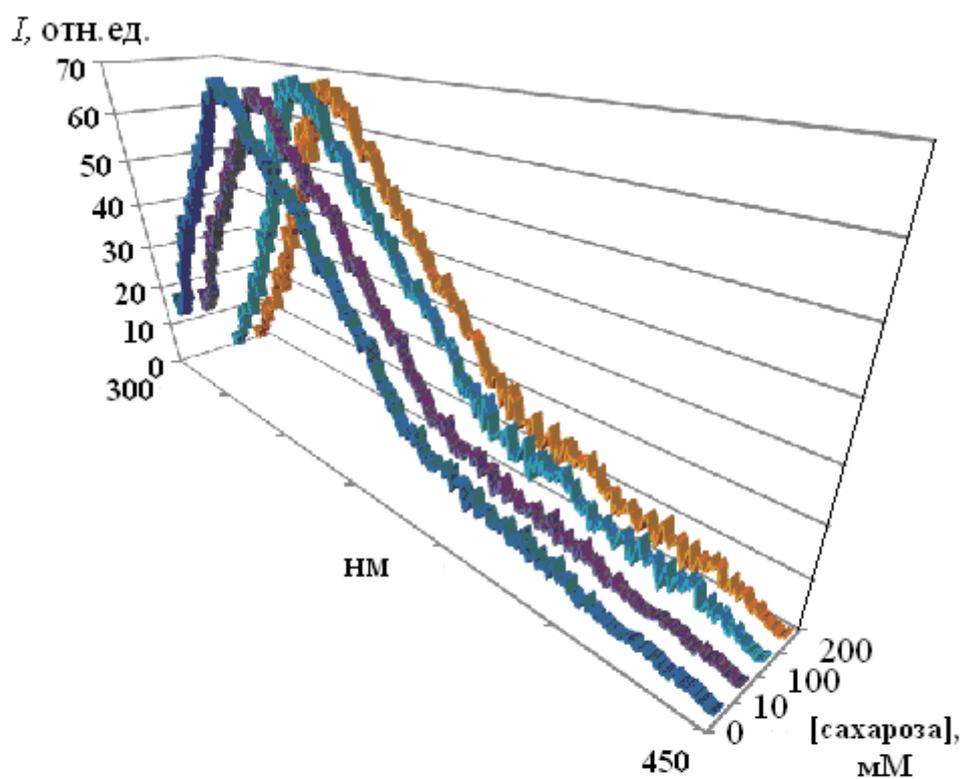
Проведены исследования поляризованной триптофановой флуоресценции БСА в растворах с различными концентрациями Твин-20 при различных значениях рН (в качестве примеров, спектры на рис. 4.1, рис. 4.2).

Получены зависимости степени поляризации (P) триптофановой флуоресценции БСА (рис. 4.3) от концентрации Твин-20 для различных значений рН (в отсутствие сахарозы).

Изменения поляризации флуоресценции обуславливаются вращательной диффузией флуорофоров и безызлучательным переносом энергии между флуорофорами. Благодаря подбору условий (сильно разведенные растворы белка) на поляризацию флуоресценции триптофанов БСА оказывает влияние только вращательная диффузия триптофанов БСА, а не безызлучательный перенос энергии между флуорофорами.

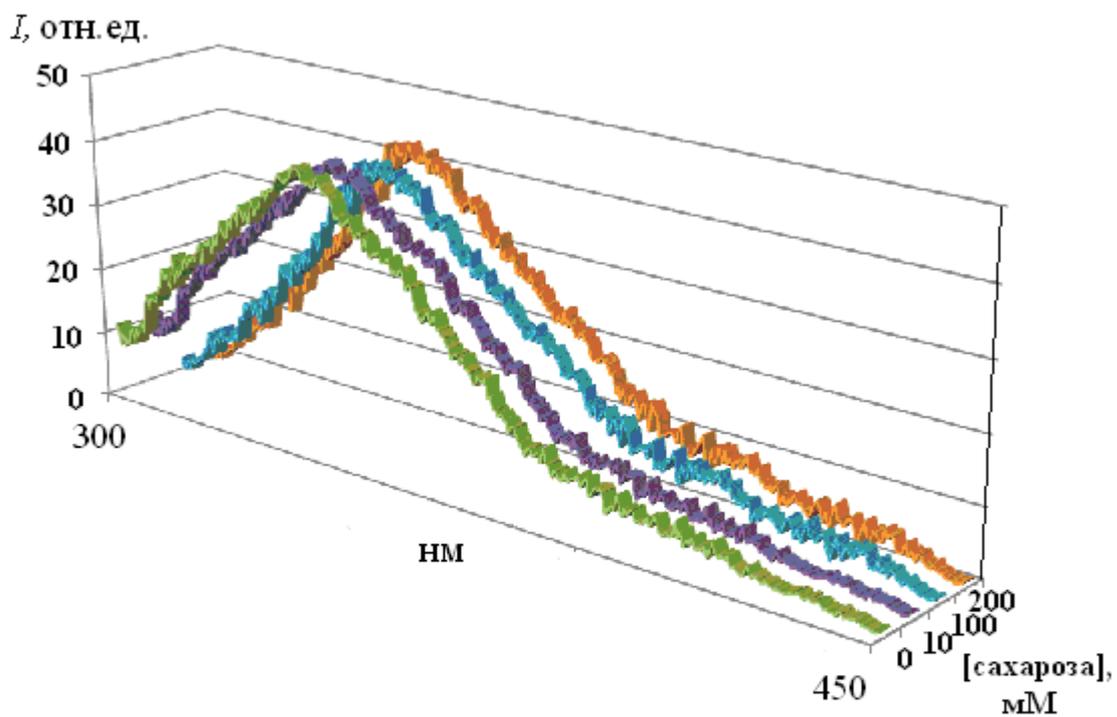
Поляризация флуоресценции двух триптофановых остатков БСА в общем случае обусловлена как вращением целых молекул белка, так и вращением доменов белка, содержащих триптофановые остатки, так и вращением отдельных двух триптофановых остатков БСА относительно своего ближайшего окружения. Проведенные в данной работе стационарные измерения поляризованной флуоресценции БСА позволяют анализировать вращение целых молекул белка, а вклад относительного вращения доменов, содержащих триптофановые остатки, и вращения двух триптофановых остатков БСА относительно ближайшего окружения считается пренебрежимо малым.

Видно (рис. 4.3), что в растворах с Твин-20 значения степени поляризации триптофановой флуоресценции БСА возрастают по сравнению с растворами без детергента при всех значениях рН в области до 0,3 мМ Твин-20, что говорит о комплексообразовании БСА с Твин-20.



Спектры поляризованной (параллельная компонента) триптофановой флуоресценции (возбуждение 295 нм) бычьего сывороточного альбумина (5 мкМ) в растворах с 0,2 мМ Твин-20 при рН 4,5 с различными концентрациями сахарозы.

Рис. 4.1.



Спектры поляризованной (перпендикулярная компонента) триптофановой флуоресценции (возбуждение 295 нм) бычьего сывороточного альбумина (5 мкМ) в растворах с 0,2 мМ Твин-20 при рН 4,5 с различными концентрациями сахарозы.

Рис. 4.2.

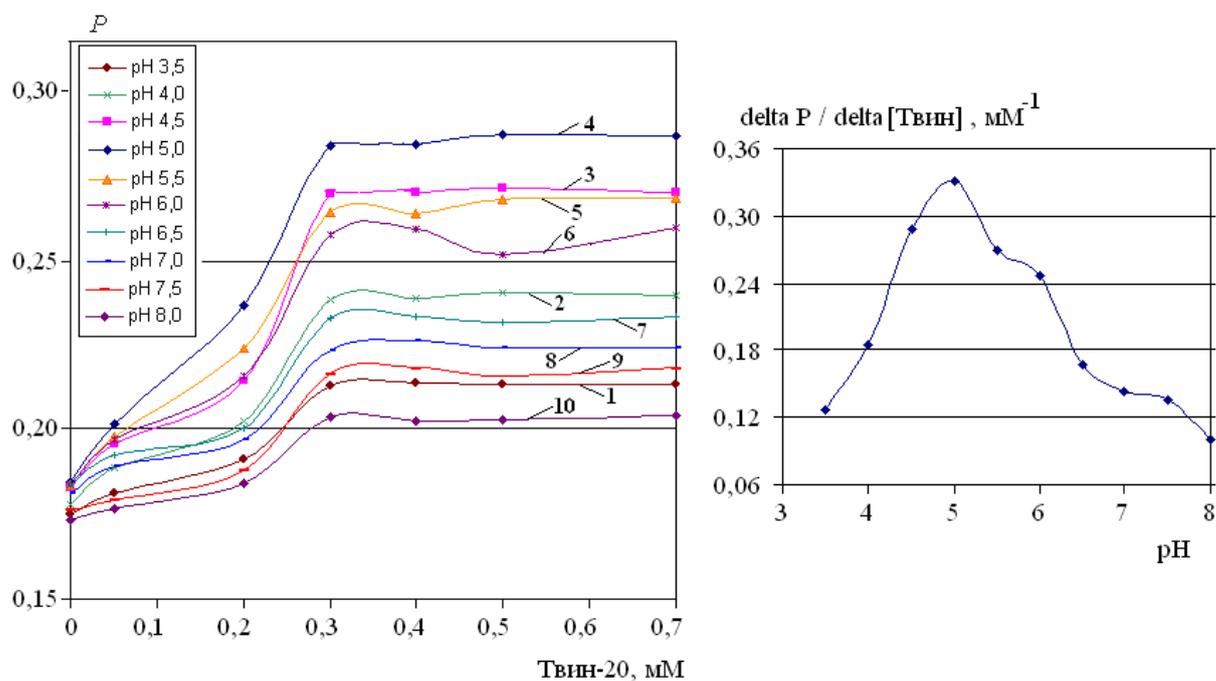


Рис. Слева: зависимость степени поляризации триптофановой флуоресценции БСА от концентрации Твин-20 в растворах с различными значениями pH: 3,5 (1), 4,0 (2), 4,5 (3), 5,0 (4), 5,5 (5), 6,0 (6), 6,5 (7), 7,0 (8), 7,5 (9), 8,0 (10). Справа: среднее изменение степени поляризации триптофановой флуоресценции БСА к изменению концентрации Твин в растворах при различных значениях pH.

Рис. 4.3.

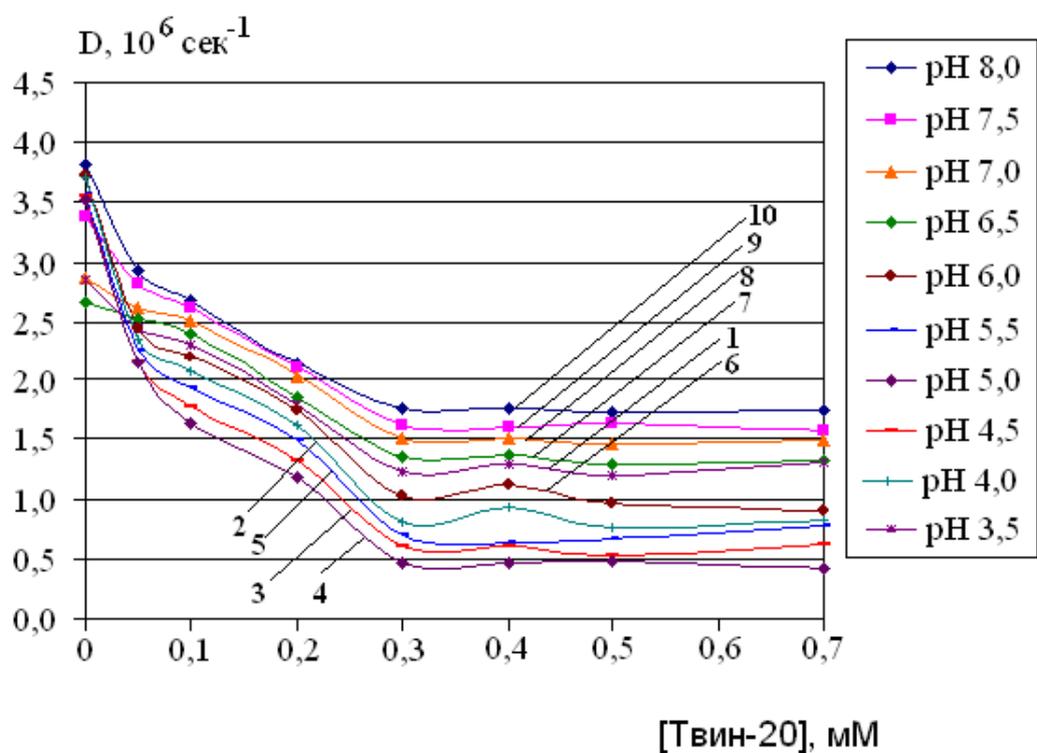


Рис. Зависимость коэффициента вращательной диффузии образующихся комплексов БСА-Твин от концентрации Твин в растворах при различных значениях pH: 3,5 (1), 4,0 (2), 4,5 (3), 5,0 (4), 5,5 (5), 6,0 (6), 6,5 (7), 7,0 (8), 7,5 (9), 8,0 (10).

Рис. 4.4.

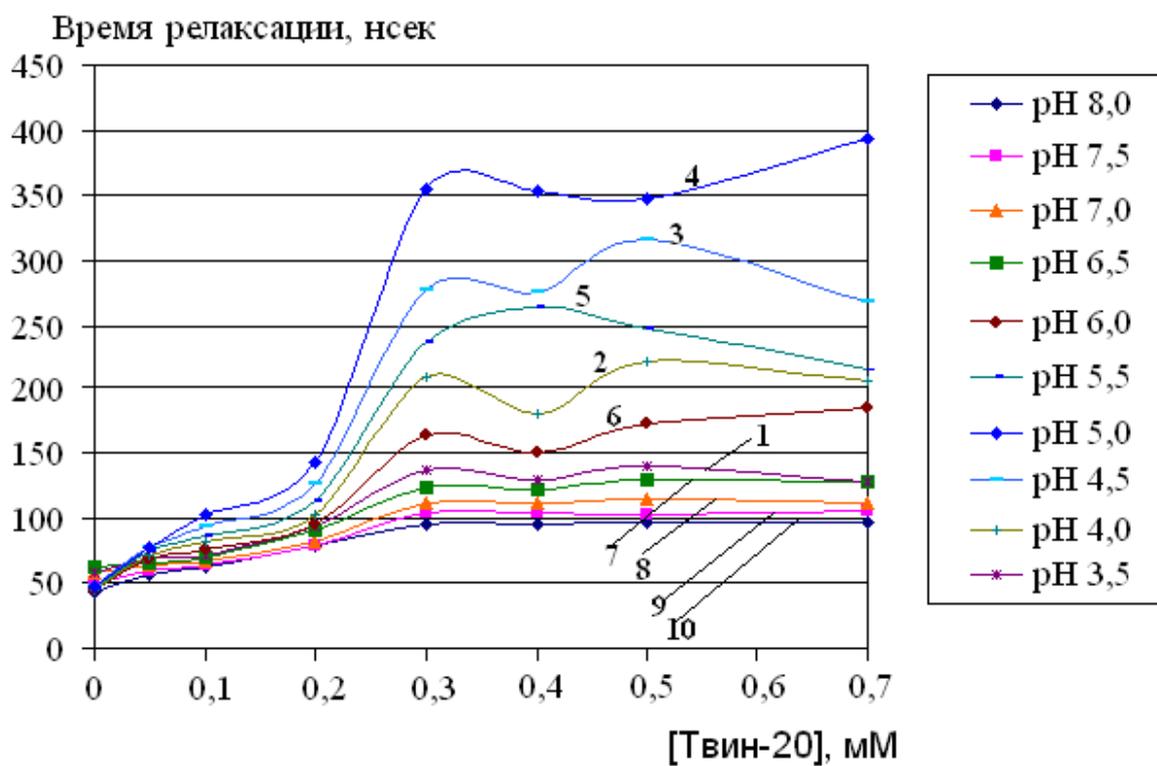


Рис. Зависимость времени вращательной релаксации образующихся комплексов БСА-Твин от концентрации Твин в растворах при различных значениях pH: 3,5 (1), 4,0 (2), 4,5 (3), 5,0 (4), 5,5 (5), 6,0 (6), 6,5 (7), 7,0 (8), 7,5 (9), 8,0 (10).

Рис. 4.5.

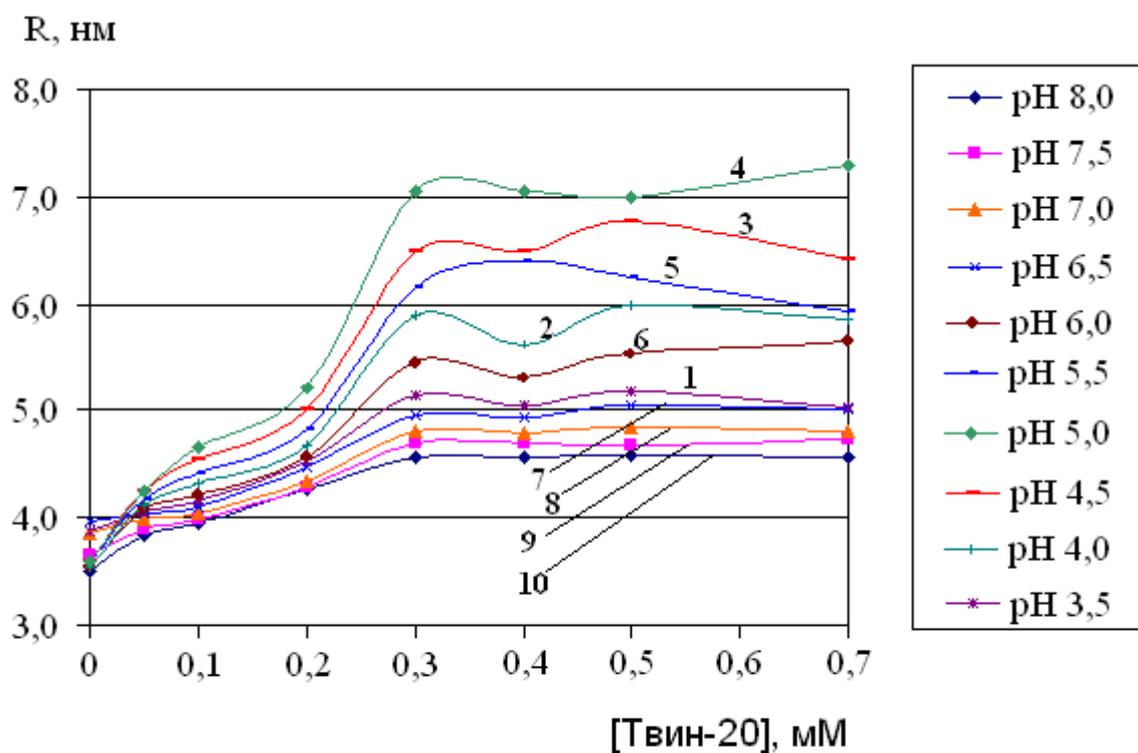


Рис. Зависимость эффективного радиуса образующихся комплексов БСА-Твин от концентрации Твин в растворах при различных значениях pH: 3,5 (1), 4,0 (2), 4,5 (3), 5,0 (4), 5,5 (5), 6,0 (6), 6,5 (7), 7,0 (8), 7,5 (9), 8,0 (10).

Рис. 4.6.

Также на рис. 4.3 отображено среднее изменение степени поляризации флуоресценции БСА к изменению концентрации Твин-20 в растворе (в области до 0,3 мМ Твин-20) для различных значений рН. Видно, что зависимость изменения степени поляризации флуоресценции БСА при изменении концентрации Твин-20 от рН имеет нелинейный вид с максимумом при рН 5,0, что указывает на наилучшее комплексообразование БСА-Твин при этом значении рН.

Для исследования комплексообразования БСА с Твин-20 при различных концентрациях детергента в растворах и при различных значениях рН были с помощью метода поляризованной флуоресценции оценены параметры вращательной диффузии белка в растворах с детергентом.

Согласно формуле Левшина – Перрена, меняя вязкость η растворов (добавлением различных концентраций сахарозы) и откладывая на оси ординат $1/P$, а по оси абсцисс T/η , получаем прямую линию, которая отсекает на оси ординат отрезок, равный $1/P_0$. Определив тангенс угла наклона этой прямой к оси абсцисс и значение P_0 при известном τ_0 , в работе был рассчитан эффективный гидродинамический радиус комплексов R .

Таким образом, путем варьирования вязкости растворов определены время вращательной релаксации, коэффициент вращательной диффузии и эффективный радиус комплексов БСА-Твин в растворах с различными концентрациями детергента при различных значениях рН.

На рис. 4.4 представлены зависимости коэффициента вращательной диффузии образующихся комплексов БСА-Твин от концентрации Твин-20 в растворах при различных значениях рН. Видно, что при всех значениях рН в растворах с Твин-20 (до 0,3 мМ Твин-20) происходит уменьшение коэффициента вращательной диффузии по сравнению с растворами без детергента. Дальнейшее увеличение концентрации Твин-20 (больше 0,3 мМ) уже не влияет на коэффициент вращательной диффузии комплексов.

В исследуемой области концентраций Твин-20 находится, в основном, в мицеллярной фазе, и поэтому не только одиночные молекулы Твин-20, но и

мицеллы Твин-20 взаимодействуют с БСА и образуют комплексы с белком, что и приводит к значительному уменьшению значений коэффициента вращательной диффузии в растворах ПАВ.

При рассмотрении значений коэффициента вращательной диффузии комплексов БСА-Твин в растворах с различными значениями рН, но при одной фиксированной концентрации ПАВ в растворе, видно, что коэффициент вращательной диффузии комплексов нелинейно зависит от рН с минимумом при рН 5,0, что указывает на наилучшее комплексообразование молекул ПАВ с БСА при этом рН, лежащем вблизи изоэлектрической точки БСА, когда молекулы БСА в целом нейтральны, и поэтому с ними наиболее интенсивно связываются нейтральные молекулы или мицеллы Твин-20.

На рис. 4.5 представлены зависимости времени вращательной релаксации образующихся комплексов БСА-Твин от концентрации Твин-20 в растворах при различных значениях рН. В растворах с Твин-20 – до 0,3 мМ Твин-20 – происходит увеличение времени вращательной релаксации флуорофоров по сравнению с растворами без ПАВ.

В растворах с Твин-20 время вращательной релаксации комплексов БСА-Твин при фиксированных концентрациях детергента нелинейно зависит от рН с максимумом при рН 5,0, что указывает на наилучшее связывание молекул или мицелл Твин-20 с БСА при этом значении рН.

На рис. 4.6 представлены зависимости эффективного радиуса образующихся комплексов БСА-Твин от концентрации Твин-20 в растворах при различных значениях рН. Эффективный радиус комплексов БСА-Твин, определенный таким образом в сферическом приближении, отражает не реальный геометрический размер комплексов, которые при солубилизации могут иметь не сферическую геометрическую форму, а показывает некий эффективный размер комплексов, меняющийся при вариации концентрации ПАВ и удобный для оценки солубилизации белка под действием ПАВ.

Видно (рис. 4.6), что в растворах с Твин-20 (до 0,3 мМ Твин) происходит увеличение размера комплексов БСА-Твин по сравнению с

растворами без ПАВ. В растворах без Твин-20 полученный эффективный радиус соответствует размерам молекул БСА. В исследуемой области концентраций Твина-20 данный ПАВ находится, в основном, в мицеллярной фазе, что приводит при комплексообразовании с белком к сильному увеличению эффективного радиуса (солюбилизации белка).

Таким образом, показано, что для солюбилизации молекул БСА нейтральный детергент Твин-20 является эффективным. Видно, что уже при 0,3 мМ Твин-20 его мицеллы эффективно солюбилизируют молекулы БСА при различных значениях рН.

Видно, что в растворах с Твин-20 эффективный радиус комплексов БСА-Твин нелинейно зависит от рН с максимумом при рН 5,0, что указывает на наилучшее комплексообразование белка с ПАВ при этом значении рН.

В зависимости от соотношений компонент (белка и ПАВ) возникают, как минимум, два типа комплексов:

1) при низких концентрациях ПАВ, используемых в данной работе, образуются гидрофилизированные комплексы за счет гидрофобных взаимодействий, судя по зависимостям комплексообразования от рН. При равном соотношении БСА и Твин в растворах в равновесии с комплексами БСА-Твин находятся и свободные молекулы БСА, при этом образовавшиеся комплексы растворимы в воде.

2) при высоких концентрациях ПАВ (не рассматриваются в данной работе) образуются уже гидрофобные комплексы, склонные к коагуляции и к выпадению в осадок. В этом случае ПАВ связывается с белком не по гидрофобному механизму, а, как известно, за счет взаимодействия полиоксиэтиленовых групп Твин-20 с гидрофильными участками на БСА.

Основные результаты и выводы

1. По тушению неполяризованной триптофановой флуоресценции БСА определены константы ассоциации (взаимодействия/связывания) БСА с детергентом Твин-20 в водных растворах при рН 3,5 – 8,0.
2. По анализу поляризованной триптофановой флуоресценции БСА получены параметры вращательной диффузии (коэффициент вращательной диффузии, время вращательной релаксации и эффективный радиус) образующихся комплексов БСА-Твин в водных растворах при рН 3,5 – 8,0.
3. Из анализа значений констант связывания в системе «БСА – Твин-20» и из значений параметров вращательной диффузии комплексов БСА-Твин в водных растворах обнаружено, что наиболее эффективное взаимодействие БСА с Твин-20 имеет место при рН 5,0 вблизи изоэлектрической точки БСА. Показано, что комплексообразование БСА с Твин-20 выходит на насыщение при концентрации 0,3 мМ Твин-20.
4. По анализу комплексообразования БСА-Твин при вариации значений рН обнаружено, что при данных низких концентрациях Твин-20, используемых в работе, образуются гидрофилизированные (растворимые в воде) комплексы БСА-Твин за счет гидрофобных взаимодействий.
5. Комплексообразование (ассоциация) БСА с Твин-20 оказывает влияние на флуоресценцию триптофанов в гидрофобных карманах БСА, что дает возможность использовать триптофановую флуоресценцию в качестве маркера перестроек белков при взаимодействии 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. «Люминесценция и ее измерения», Москва, МГУ, 1989.
6. Шмидт В. «Оптическая спектроскопия для химиков и биологов», Москва, Мир, 2007.
7. Тиноко «Физическая химия Применение в биологических науках», Москва, Мир, 2002.
8. Владимиров Ю.А. Фотохимия и люминесценция белков. Москва: Наука, 1965.
9. Gelamo E.L., Tabak M. Spectroscopic studies on the interaction of bovine (BSA) and human (HSA) serum albumins with ionic surfactants. *Spectrochimica Acta Part A*, 56 (2000), 2255-2271.
10. Shashank Deep, Ahluwalia J.C. Interaction of bovine serum albumin with anionic surfactants. *Physical Chemistry Chemical Physics*, V. 3, № 20 (2001), 4583-4594.
11. Sebnem Ercelen, Klymchenko A.S., Demchenko A.P. Novel two color fluorescence probe with extreme specificity to bovine serum albumine. *FEBS Letters*, 538 (2003), 25-28.
12. Birla L., Cristian A.M., Hillebrand M. Absorption and steady state fluorescence study of interaction between eosin and bovine serum albumin. *Spectrochimica Acta Part A*, 60 (2004) 551-556.

13. Partha Dutta, Pratik Sen, Arnab Halder, Saptarshi Mukherjee, Sobhan Sen, Kankan Bhattacharyya. Solvation dynamics in protein-surfactant complex. *Chemical Physics letters*, 377 (2003) 229-235.
14. Sunil Jain, C. Vijaya Kumar, Devendra S. K. Protein-peptide interactions as probed by tryptophan fluorescence: serum albumins and enkephalin metabolites. *Pharmaceutical Research*, V. 9, № 8, (1992) 990-992.
15. Diaz X., Abuin E., Lissi E. Quenching of BSA intrinsic fluorescence by alkylpyridinium cations. Its relationship to surfactant-protein association. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 155(2003), 157-162.
16. Li Zeng D. Investigation of protein surfactant interactions in aqueous solutions. A Dissertation submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree of Doctor of Philosophy at University of Connecticut, 1997.
17. Sang Hak lee, Junk Kee Sub, and Ming Lee. Determination of bovine serum albumin by its enhancement effect of Nile blue fluorescence. *Bull. Korean Chem. Soc*, v. 24, (2003) No 1.
18. H. Yamini Shrivastava, Balachandran Unni Nair. A fluorescence-based assay for nanogram quantification of proteins using a protein binding ligand. *Anal bioanal Chem*, 375, (2003), 169-174.
19. Shaikh S.M.T., Seetharamappa J., Kandagal P.B., Manjunatha D.H., Ashoka S. Spectroscopic investigations on the mechanism of interactions of bioactive dye with bovine serum albumin. *Dyes and pigments*, (2006), 1- 7.
20. Bidisa Sengupta, Pradeep K. Sengupta. The interaction of quercetin with human serum albumin: fluorescence spectroscopic studies. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 299, (2002), 400-403.
21. Lottin H., Motta C., Simard G. Differential effect of glycerol- and sphingolipolysis on human high-density lipoprotein fluidity *Biochimica et biophysica Acta*, 1301, (1996), 127-132.
22. Dong-Hui Li, Qing-Zi Zhu, Dong Ye, Ying Fang, Jin-Gou Hu. Rapid method for the determination of molar ratio of fluorophore to protein by fluorescence anisotropy detection. *Analitica Chimica Acta*, 389, (1999), 85-88.