

Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова

физический факультет

кафедра общей физики

ДИПЛОМНАЯ РАБОТА

студентки 605 группы

Журавлёвой Валерии Валерьевны

**ФЛУОРЕСЦЕНТНЫЙ АНАЛИЗ В ИССЛЕДОВАНИИ ДЕНАТУРАЦИИ
СЫВОРОТОЧНОГО АЛЬБУМИНА ЧЕЛОВЕКА ПОД ДЕЙСТВИЕМ
ИОННЫХ ДЕТЕРГЕНТОВ**

Научный руководитель:

кандидат физ.-мат. наук,

ст. преп. И.М. Власова

Допущена к защите

«22» декабря 2010 г.

Заведующий кафедрой

общей физики

доктор физ.-мат. наук

профессор _____ А.М. Салецкий

Москва – 2010

Содержание

| | |
|---|-----------|
| Введение | 4 |
| Глава 1. Применение флуоресцентной спектроскопии в исследованиях структуры и свойств молекул белков | 7 |
| §1.1. Физические основы флуоресцентной спектроскопии | 7 |
| §1.2. Теоретические аспекты поляризованной флуоресценции..... | 9 |
| §1.3. Деполяризация флуоресценции и параметры вращательной диффузии флуорофоров..... | 11 |
| §1.4. Ионные детергенты..... | 13 |
| §1.5. Применение флуоресцентного анализа в исследованиях белковых макромолекул..... | 16 |
| Глава 2. Методическая часть экспериментов | 22 |
| §2.1. Приготовление растворов сывороточного альбумина человека и ДСН для анализа триптофановой флуоресценции белка..... | 22 |
| §2.2. Приготовление растворов сывороточного альбумина человека и ЦТАБ для анализа триптофановой флуоресценции белка..... | 22 |
| §2.3. Методика экспериментов для исследования стационарной и поляризованной триптофановой флуоресценции сывороточного альбумина человека в растворах с ДСН..... | 23 |
| §2.4. Методика экспериментов для исследования стационарной и поляризованной триптофановой флуоресценции сывороточного альбумина человека в растворах с ЦТАБ..... | 23 |
| Глава 3. Исследование денатурации сывороточного альбумина человека под действием ионных детергентов по анализу триптофановой флуоресценции белка | 24 |
| §3.1. Денатурация сывороточного альбумина человека под действием анионного детергента додецилсульфата натрия (ДСН) при различных значениях рН растворов по анализу стационарной и поляризованной триптофановой флуоресценции белка..... | 24 |

| | |
|---|-----------|
| <i>§3.2. Денатурация сывороточного альбумина человека под действием катионного детергента цетилтриметиламмонийбромида (ЦТАБ) при различных значениях pH растворов по анализу стационарной и поляризованной триптофановой флуоресценции белка.....</i> | <i>43</i> |
| <i>§3.3. Сравнительный анализ денатурирующего действия ионных детергентов на сывороточный альбумин человека</i> | <i>54</i> |
| Основные результаты и выводы работы..... | 56 |
| Список цитируемой литературы | 57 |

Введение

Данная дипломная работа посвящена применению методов флуоресцентного анализа для исследования конформационных перестроек сывороточного альбумина человека под действием ионных детергентов.

Сывороточный альбумин (66,4 кДа) представляет собой глобулярный белок плазмы крови человека [1]. Уникальная способность молекулы сывороточного альбумина человека связывать обширный круг органических и неорганических лигандов определяет одну из основных функций этого белка – транспорт физиологических метаболитов. Исследование денатурации этого белка чрезвычайно важно в связи с его физиологическими функциями в крови, т.к. позволяет делать выводы об уровне сохранения нативной конформации белка и, следовательно, об уровне сохранности его физиологических свойств в различных условиях. Это обуславливает актуальность работы.

Основой взаимодействий молекулы сывороточного альбумина человека с лигандами является структурная подвижность этой белковой молекулы, обеспеченная уникальной петлевой укладкой единственной полипептидной цепи белка из 585 аминокислотных остатков.

Вторичная структура сывороточного альбумина человека, стабилизируемая водородными связями между пептидными группами аминокислотной цепи, состоит из α -спиральных участков и участков хаотической укладки. Около 50 – 67 % аминокислотных остатков уложены в α -спирали при физиологическом значении pH (7,4).

В настоящее время принята доменная модель структуры альбумина, согласно которой молекула сывороточного альбумина человека состоит из 3 практически одинаковых доменов. Каждый из доменов содержит 10 α -спиралей, обозначаемых h1 – h10. Соседние домены I-II и II-III связаны между собой двумя большими α -спиралями, которые являются соединенными между собой вытянутыми N- и C- концевыми участками каждого из двух доменов – спирали h10(I) – h1(II) и h10(II) – h1(III)

соответственно. Таким образом, общее число α -спиральных структур в молекуле сывороточного альбумина человека составляет 28.

На сегодняшний день утвердилась модель «сердца» третичной структуры сывороточного альбумина человека, домены в этой модели расположены под углом друг к другу. Стабильность третичной структуры зависит не только от системы нековалентных взаимодействий внутри белковой глобулы, но и дополнительно стабилизируется ковалентными дисульфидными связями, сохраняющимися в денатурированном белке.

Денатурацией называют существенное изменение вторичной и третичной структуры белка, т.е. нарушение, разупорядочивание системы нековалентных взаимодействий, не затрагивающее его ковалентной структуры [1]. Денатурация, как правило, сопровождается утратой белком функциональных свойств, что обуславливает интерес к изучению механизмов белковой денатурации.

Эффективными денатурирующими агентами являются ионные детергенты, среди которых в биохимической практике особенно часто используют анионный детергент додецилсульфат натрия (ДСН) и катионный детергент цетилтриметиламмонийбромид (ЦТАБ, цетавлон) [2].

Целью данной работы является исследование механизма денатурации молекул сывороточного альбумина человека под действием ионных детергентов. Для реализации цели были поставлены следующие задачи:

1. Исследовать действие различных концентраций анионного детергента ДСН и катионного детергента ЦТАБ на сывороточный альбумин человека при различных значениях рН методами флуоресцентного анализа по изучению неполяризованной собственной белковой триптофановой флуоресценции.

2. Исследовать действие различных концентраций анионного детергента ДСН и катионного детергента ЦТАБ на сывороточный альбумин человека при различных значениях рН методами флуоресцентного анализа

по изучению поляризованной собственной белковой триптофановой флуоресценции.

Исследование собственной флуоресценции белков, обусловленной свечением триптофана, широко применяется в настоящее время для оценки конформационного состояния молекул белка. По изменению спектральных характеристик флуоресценции триптофана альбумина можно судить о конформационном состоянии глобул альбумина в растворах с денатурирующими агентами (ДСН, ЦТАБ).

Глава 1. Применение флуоресцентной спектроскопии в исследованиях структуры и свойств молекул белков

§1.1. Физические основы флуоресцентной спектроскопии

Полную энергию E молекулярной системы можно представить в виде суммы электронной $E_э$, колебательной $E_к$ и вращательной $E_в$ составляющих:

$$E = E_э + E_к + E_в;$$

$$E_э \gg E_к \gg E_в.$$

Переходы между энергетическими состояниями сопровождаются поглощением или испусканием излучения, частота которого определяется

$$\nu = (E_n - E_m)/h = \Delta E_э/h + \Delta E_к/h + \Delta E_в/h.$$

Люминесценция – широко распространенный в природе вид излучения [3]. Она возникает в результате поглощения веществом энергии возбуждения и перехода его частиц из основного в возбужденное состояние. Таким образом, люминесценция – свечение вещества, возникающее в результате электронного перехода в этих частицах при их возвращении из возбужденного в основное состояние (рис. 1.1). Если возбуждение происходило за счет поглощения электромагнитного излучения в оптической области, то испускание носит название фотолюминесценции.

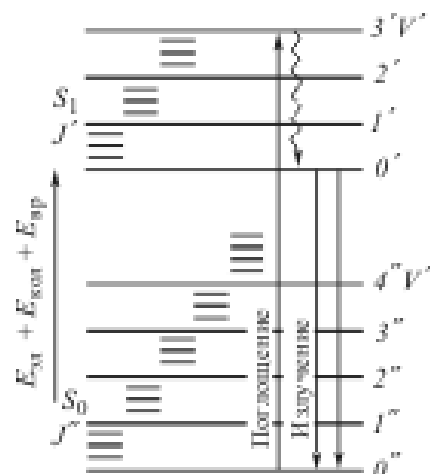


Рис. 1.1. Электронные (S_0, S_1), колебательные (V'', V'') и вращательные (J'', J) уровни двухатомной молекулы

Широкая возможность переходов между всей совокупностью электронно-колебательно-вращательных уровней и обуславливает возникновение сложных полосатых (полосато-линейчатых) или сплошных молекулярных спектров поглощения и люминесценции.

В зависимости от мультиплетности электронного состояния, из которого происходил переход в основное состояние, люминесценцию подразделяют на флуоресценцию и фосфоресценцию (рис. 1.2.). Фосфоресценция возникает при переходе из триплетного возбужденного в основное синглетное состояние, а флуоресценция при переходе из синглетного возбужденного в основное синглетное. Флуоресценция является мгновенно затухающим свечением: ее длительность составляет $\sim 10^{-9}$ с.

Спектр люминесценции — это функция распределения излучаемой веществом энергии по длинам волн или частотам. Каждой полосе поглощения первого электронного возбужденного состояния соответствует полоса флуоресценции.

Фотолюминесценция возникает за счет поглощаемой энергии возбуждающего света. Но лишь ее часть превращается в энергию люминесценции. Эффективность этого

процесса характеризуется выходом люминесценции. Различают энергетический и квантовый выход люминесценции. Энергетическим выходом люминесценции называют отношение энергии, испускаемой в виде люминесценции E_l , к энергии поглощенного возбуждающего света E_n

Квантовым выходом люминесценции называют отношение числа испущенных квантов люминесценции N_l к числу поглощенных квантов возбуждающего света N_n :

$$B = N_l / N_n$$

На практике наиболее удобным является измерение величины квантового выхода флуоресценции методом эталонного красителя, когда

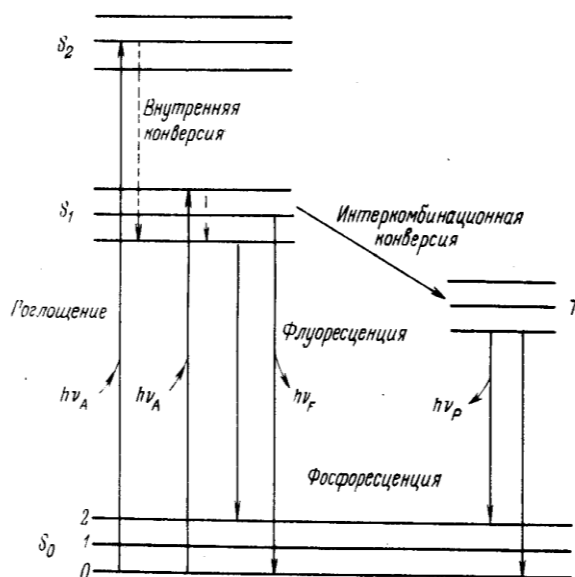


Рис. 1.2. Диаграмма Яблонского для энергетических уровней молекулы.

используется соединение, для которого квантовый выход ранее уже был измерен с хорошей точностью.

Значение квантового выхода исследуемого раствора Φ рассчитывается по формуле

$$B = B_{stand} (K_{sample} / K_{stand.}),$$

где $B_{stand.}$ – значение квантового выхода флуоресценции эталонного красителя; K_{sample} , K_{stand} – для исследуемого соединения и эталонного красителя тангенсы углов наклона линейной аппроксимации зависимостей интегральной по спектру интенсивности испускания флуоресценции от значения оптической плотности на длине волны возбуждения $I_{fluo} (D_\lambda)$ при различных концентрациях.

§1.2. Теоретические аспекты поляризованной флуоресценции

Молекулы люминесцирующих веществ оптически анизотропны, поэтому люминесцентное излучение каждой молекулы частично поляризовано. Однако, если анизотропные молекулы ориентированы хаотично, как, например, в растворах сложных органических соединений, то вещество в целом становится изотропным, а его люминесценция неполяризованной.

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. То есть, при взаимодействии поляризованного света с веществом преимущественно возбуждаются молекулы, обладающие наиболее близкой ориентацией по отношению к направлению колебаний электрического вектора

возбуждающего света. Следовательно, в таких условиях электрический вектор света люминесценции также должен обладать преимущественным направлением.

Интенсивность флуоресценции в произвольном направлении можно представить в виде суммы двух световых потоков I_{\parallel} и I_{\perp} , поляризованных по двум взаимно перпендикулярным направлениям, где I_{\parallel} и I_{\perp} - интенсивности флуоресценции, измеренные через поляризатор, электрическая ось которого направлена параллельно и перпендикулярно поляризации возбуждающего света (рис. 1.3.).

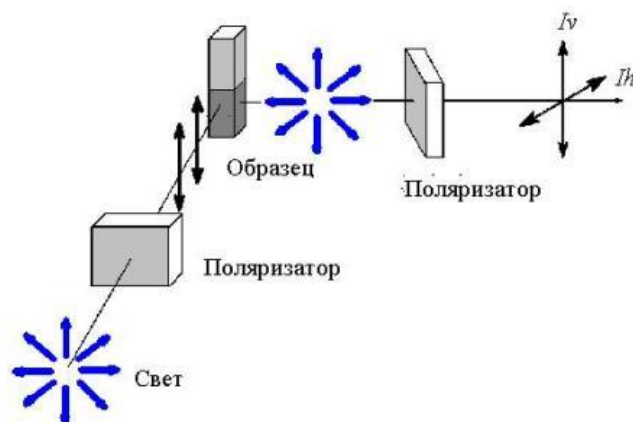


Рис. 1.3. Схема измерения поляризованной флуоресценции

Для количественной оценки поляризованной флуоресценции вводится понятие степень поляризации флуоресценции [3]:

$$P = (I_{\parallel} - I_{\perp}) / (I_{\parallel} + I_{\perp}),$$

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

В настоящее время обычно используется другая характеристика поляризованной флуоресценции – степень анизотропии излучения:

$$r = (I_{\parallel} - I_{\perp}) / (I_{\parallel} + 2I_{\perp}).$$

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

$$r = 2P / (3 - P).$$

Для описания теории поляризационной люминесценции используется модель полностью анизотропных осцилляторов, которая позволяет описать все основные закономерности поляризованной люминесценции растворов сложных органических молекул.

Согласно этой модели процессы поглощения света и люминесценции определяются диполями, расположенными под некоторым углом α друг к другу. Модель молекул с различным направлением диполей поглощения и люминесценции может иметь два варианта: статический (поглощают и излучают различные осцилляторы, жестко ориентированные относительно осей молекулы) и кинематический (поглощает и излучает один и тот же диполь, который за время нахождения молекулы в возбужденном состоянии успевает повернуться на угол α относительно молекулярных осей). Расчет степени поляризации на основе осцилляторной модели впервые был проведен В.Л. Левшиным, позднее Ф. Перреном. Эта зависимость получила название формулы Левшина–Перрена:

$$P = (3\cos^2\alpha - 1)/(3 + \cos^2\alpha).$$

Она устанавливает связь между степенью поляризации люминесценции, возбуждаемой линейно-поляризованным светом, и углом α между диполями, ответственными за поглощение и излучение

В обозначениях анизотропии излучения формула Левшина–Перрена принимает вид:

$$r = 1/5(3\cos^2\alpha - 1).$$

Итак, если возбуждается совокупность молекул, то флуоресценция их будет полностью поляризована, если их дипольные моменты параллельны. Во всех других случаях люминесценция будет частично поляризованной.

§1.3. Деполяризация флуоресценции и параметры вращательной диффузии флуорофоров

Классическая осцилляторная модель позволила развить теорию вращательной деполяризации люминесценции, которая имеет место в жидких средах. Молекулы, находящиеся в жидких растворах, совершают броуновские движения, которые можно разделить на поступательные перемещения и вращения молекулы. При возбуждении вещества поляризованным светом создается анизотропия в распределении

возбужденных молекул (диполей). За счет процессов броуновского вращения (поступательное броуновское движение не оказывает влияния на поляризацию люминесценции) происходит уничтожение преимущественной ориентации возбужденных осциллятором молекул. Поэтому при достаточно малой вязкости раствора к моменту излучения света молекулами их распределение может оказаться изотропным и, как следствие этого, люминесценция будет неполяризованной. В этом случае обычно говорят, что люминесценция оказывается полностью деполаризованной.

Количественная теория вращательной деполаризации впервые была предложена В.Л. Левшиным и позднее Перреном с использованием модели вращательной диффузии (случай сферически-симметричных молекул).

В общем случае степень анизотропии в любой момент времени равна

$$r(t) = (I_{\parallel}(t) - I_{\perp}(t)) / (I_{\parallel}(t) + 2I_{\perp}(t)).$$

При $t = 0$, $r(0)$ определяется по формуле Левшина–Перрена.

А. Яблонским было показано, что $r(t)$ описывается экспоненциальной функцией:

$$r(t) = r_0 \exp(-6D_d t),$$

где D_d — вращательный коэффициент диффузии. Учитывая, что при стационарном возбуждении закон затухания люминесценции также является экспоненциальным, получим

$$r = \frac{r_0}{\tau_0} \int_0^{\infty} \exp\left(-\frac{t}{\tau_0}\right) (1 + 6D_d \tau_0) dt = r_0 / (1 + 6D_d \tau_0), \quad (*)$$

где τ_0 — среднее время жизни возбужденных молекул. Коэффициент вращательной диффузии D_d , определенный в рамках модели Эйнштейна–Дебая–Стокса (гидродинамическое приближение), имеет вид

$$D_d = kT / 6\eta V,$$

где T — абсолютная температура, η — вязкость раствора, V — объём молекулы, k — постоянная Больцмана. Учитывая эту формулу, соотношение (*) можно переписать в виде

$$\frac{1}{r} = \frac{1}{r_0} \left(1 + \frac{kT}{\eta V} \tau_0 \right)$$

В обозначениях степени поляризации получим

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

где P_0 — предельная степень поляризации люминесценции. Эта зависимость также получила название формулы Левшина–Перрена. Она устанавливает линейную связь между величинами $1/P$ и T/η . Полученная прямая линия отсекает на оси ординат отрезок, равный $1/P_0$, а тангенс угла наклона этой прямой к оси абсцисс равен

$$\operatorname{tg}\varphi = (1/P_0 - 1/3)k\tau_0/V .$$

Данная формула при известном значении среднего времени жизни возбужденных молекул позволяет определить величину молекулярного объема.

Деполяризация будет тем большей, чем выше температура, ниже вязкость растворителя, меньше размеры исследуемых молекул и чем больше средняя длительность их возбужденного состояния.

§1.4. Ионные детергенты

Детергенты (от лат. *detergere* – мыть, очищать) представляют собой поверхностно-активные вещества с моющим действием, которое обусловлено их способностью образовывать в воде устойчивые коллоидные растворы. Поверхностная активность детергентов, то есть способность адсорбироваться на границе раздела фаз, связана с амфифильностью их молекул. Амфифильными (от греч. *фило* – любящий и *амфи* – обоим) называют вещества, в молекулах которых имеются четко разграниченные

гидрофильные и гидрофобные области, благодаря чему такие молекулы обладают сродством не только по отношению к воде, но и к неполярным органическим растворителям[4].

В воде молекулы детергентов стремятся ассоциировать друг с другом, образуя мицеллы [5]. Данные агрегаты состоят из большого числа детергентных молекул (обычно от нескольких десятков до нескольких сот), ориентированных в мицелле таким образом, что их неполярные группы формируют внутреннее гидрофобное ядро мицеллы, а гидрофильные полярные группировки находятся на ее поверхности и контактируют с окружающими молекулами воды. Именно благодаря наличию гидрофобного ядра мицеллы способны сольбилизовать, то есть переводить в раствор неполярные вещества, практически нерастворимые в воде.

В качестве параметров, характеризующих способность детергентов к мицеллообразованию, обычно используют критическую концентрацию мицеллообразования (ККМ) и число агрегации. ККМ – это та концентрация, при которой детергент начинает образовывать мицеллы. До этого он находится в воде в мономерной форме в состоянии истинного раствора. Число агрегации показывает, сколько молекул детергента приходится на одну мицеллу.

В настоящее время известно несколько сот различных детергентов. Все они разделяются на два основных класса: ионные и неионные детергенты, в зависимости от наличия или отсутствия заряженных групп в гидрофильной области их молекул [6].

Неионные ПАВ растворяются в воде, не ионизируясь. Растворимость неионных ПАВ в воде обуславливается наличием в них функциональных групп. Как правило, они образуют клатраты в водном растворе вследствие возникновения водородных связей между молекулами воды и атомами кислорода полиэтиленгликолевой части молекулы ПАВ. К ним относятся: полигликолевые эфиры жирных спиртов и кислот, полигликолевые эфиры амидов жирных кислот, ацилированные или алкилированные поли

гликолевые эфиры алкиламидов. Ярким представителем неионогенных ПАВ является Тритон X-100 (рис. 1.4.). Добавление этого сурфактанта в раствор зачастую улучшает растворимость белка, при этом не вызывая его денатурацию [2].

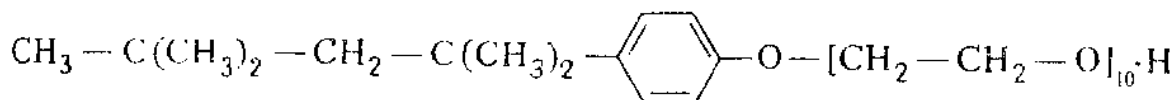


Рис. 1.4. Структурная формула Тритона X-100

Ионные детергенты по типу заряда делятся на катионные, анионные, и цвиттер-ионные (амфотерные).

Анионные ПАВ – это соединения, которые в водных растворах диссоциируют с образованием анионов, обуславливающих поверхностную активность. Среди них наибольшее значение имеют линейный алкилбензосульфат, сульфаты и сульфозэфиры жирных кислот. В данной работе исследовалось взаимодействие белка с таким анионным детергентом, как додецилсульфат натрия (рис. 1.5.).

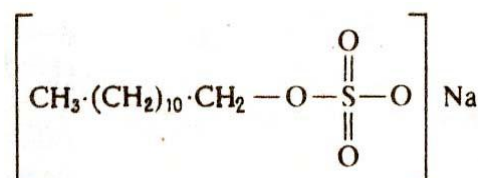


Рис. 1.5. Структурная формула додецилсульфата натрия

Катионные ПАВ в водном растворе диссоциируют с образованием катионов, определяющих поверхностную активность.

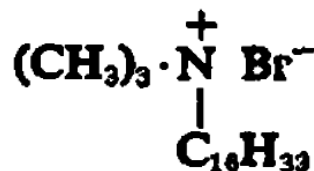


Рис. 1.6. . Структурная формула цетилтриметиламмонийбромид

Среди катионных ПАВ наибольшее значение имеют четвертичные аммониевые соединения, имидазаины и жирные амины. Одним из ярких представителей катионных детергентов является цетавлон (ЦТАБ) (рис.1.6.), взаимодействие белка с которым исследовалось в данной работе.

Широкое применение сурфактанты нашли в электрофоретических исследованиях [6]. Электрофорез занимает важное место среди методов исследования белков и нуклеиновых кислот. Данный метод позволяет разделять макромолекулы, различающиеся по таким параметрам, как

размеры, пространственная конфигурация, вторичная структура и электрический заряд. В настоящее время наиболее часто проводятся электрофоретические исследования белков в полиакриамидном геле [2]. Исключительную гибкость методу придает возможность вариации концентрации геля, рН буферов и введения денатурирующих агентов или детергентов.

Детергенты изменяют конформацию белка [7], в связи с этим исследование взаимодействия сывороточного альбумина человека с такими ПАВ, как ДСН и ЦТАБ, является важной задачей.

§1.5. Применение флуоресцентного анализа в исследованиях белковых макромолекул

Изучение люминесцентных свойств вещества нередко позволяет узнать о нем ценную информацию, которую часто невозможно получить никакими другими способами [1]. Поэтому люминесцентные методы являются весьма результативными при изучении различных физических, химических и биологических процессов.

Широкое распространение методы флуоресцентного анализа получили в исследованиях биологических систем [8-31]. Применение данных методов в биологии имеет ряд положительных аспектов, таких как возможность использования водных растворов, бесконтактность методов. Результаты исследований, проведенных флуоресцентными методами, хорошо согласуются с результатами, полученными иными способами.

Так, в [9] изучено взаимодействие сывороточного альбумина (БСА и САЧ) с ионными поверхностно-активными веществами (ПАВ) такими, как SDS, HPS, СТАС. Исследования проводились методом кругового дихроизма, а также изучалась собственная триптофановая флуоресценция. При взаимодействии всех ПАВ с БСА при низких концентрациях сурфактантов наблюдалось тушение флуоресценции белка. Также были определены эффективные константы связывания белков со всеми ПАВ с помощью

соотношения Штерна-Фольмера. Анализ спектра испускания флуоресценции позволил различить 3 состояния белка в растворе: нативный белок, комплекс белок-ПАВ, частично денатурировавший белок.

В [31] исследовалась флуоресценция бычьего сывороточного альбумина при взаимодействии с катионными ПАВ ЦТАБ и ОДМАХ в водном растворе. Было показано, что флуоресценция тушится. Константа тушения, представляющая собой константу равновесия связывания молекул ПАВ белком и рассчитанная по уравнению Штерна-Фольмера, равна $(4.7 \pm 0.2) \cdot 10^3$ и $(4.3 \pm 0.4) \cdot 10^3 \text{ M}^{-1}$ для ЦТАБ и ОДМАХ соответственно. Было показано, что тушение происходит преимущественно по статическому механизму и обусловлено взаимодействием макромолекул белка с молекулами ПАВ, сопровождающимся образованием комплексов БСА-катионное ПАВ.

Взаимодействие белков с детергентами может изучаться различными методами: дифференциальной сканирующей калориметрией (DSC), с помощью кругового дихроизма, флуоресценции и УФ-спектроскопии поглощения [13]. В [13] объектами исследования выступали бычий сывороточный альбумин и такие анионные детергенты, как додецилсульфат натрия (SDS) и октилсульфат натрия (SOS). Были определены важные параметры: температура денатурации, энтальпия Вант - Гоффа и калориметрическая энтальпия в присутствии ДСН, ОСН и мочевины. Результаты показали, что додецилсульфат натрия играет две совершенно противоположные роли в стабилизации структуры сывороточного альбумина. При низких значениях отношения концентраций ДСН/альбумин, детергент стабилизирует структуру, а при высоких значениях - выступает в роли дестабилизатора: ДСН связывается с белком, вызывая денатурацию.

В [21] исследовалась динамика денатурации лизоцима с помощью флуориметрии временного разрешения. Было показано, что добавление ДСН к белку приводит к денатурации, а добавление к комплексу детергент-белок антиоксиданта DTT (dithiothreitol) приводит к разрушению дисульфидных

связей в белке, которые не разрушаются додецилсульфатом натрия. Было проведено сравнение сольвационной динамики нативного белка, комплекса белка-SDS и белка с добавлением SDS и DTT.

В [11] исследовалась триптофановая флуоресценция БСА при связывании с различными веществами (TGG, энцефалиновые метаболиты). Было показано, что TGG и лейцин-энцефалин тушат триптофановую флуоресценцию. По тушению флуоресценции было определено, что для тушения необходим аминокислотный остаток тирозина. Предполагается, что –ОН группа тирозина играет важную роль в механизме тушения. Также было показано, что ионы металлов конкурируют при связывании с белком. Таким образом, по триптофановой флуоресценции можно судить о назначении центров связывания белка.

В [10] исследованно тушение флуоресценции БСА алкил-пиридиновыми катионами. Алкил-пиридиновые ионы легко тушат триптофановую флуоресценцию. 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. Тушение уменьшилось при увеличении концентрации белка и значительно уменьшилось при добавлении фосфатов или мочевины. Данные результаты объясняются тем, что процессы связывания носят гидрофобный характер и имеют электростатическую природу.

В работе [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 показано, что триптофановая флуоресценция тушится и количество α -спиральных участков уменьшается не сильно при низких концентрациях, а при высоких – белок денатурирует. В присутствии полисорбата 80 конформация значительно не изменяется, а синий сдвиг максимума спектра флуоресценции показывает, что триптофан находился в

более гидрофобной окружающей среде, и взаимодействие альбумина с полисорбатом 80 носит гидрофобный характер. Было получено, что изменения рН раствора, 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.

Кроме собственной триптофановой флуоресценции проводятся исследования взаимодействия белка с различными зондами [12], [25]. Так, в [12] 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 работе [25] исследовано взаимодействие альбумина с эозином. Было показано, что флуоресценция эозина тушится в присутствии белка, а также определены константы связывания.

Методами флуоресцентного анализа с помощью зондов можно определять наличие в растворе микрограммовых количеств сывороточного альбумина [23] и даже нанограммовых [20]. В работе [20] в качестве зонда использовались соединения с шиффовыми основаниями. Была определена оптимальная концентрация лиганда для этих целей. В работе [23] измерялась интенсивность флуоресценции бычьего сывороточного альбумина в комплексе с нильским синим. Для увеличения интенсивности в раствор также добавлялся Тритон X-100. Было показано, что зависимость интенсивности от концентрации БСА носит линейный характер и данный метод позволяет определять концентрацию альбумина в растворе вплоть до 0.2 мкг/мл. Также методом Скэтчарда была определена константа связывания красителя с белком.

Измерение тушения флуоресценции альбумина является важным методом изучения связывания различных компонентов с белком. В работе [24] исследовался механизм взаимодействия бычьего сывороточного альбумина с таким биоактивным красителем, как бенгальская роза (RB), методами флуоресцентного анализа, кругового дихроизма, поглощения и с помощью временных измерений. Анализ флуоресцентных данных показал, что в данном процессе присутствует, как статическое, так и динамическое тушение. С помощью соотношения Штерна – Фольмера была получена константа связывания белка с тушителем, а затем по этим данным определены такие важные термодинамические характеристики, как изменение энтропии и энтальпии. Также было получено, что при связывании количество α -спиральных участков в белке уменьшается, т.е. происходят конформационные перестройки. Кроме того, был вычислен радиус Ферстера между БСА (донором) и RB (акцептором).

В [18] 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 [26]. В [14] 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 для искомого отношения, полученные новым методом, хорошо согласуются с результатами, определенными традиционным путем. Таким образом, поляризованная флуоресценция не только может быть

применена для определения молярного отношения концентраций флуорофора и белка, но и является быстрым и надежным методом, который может применяться на практике.

Таким образом, флуоресцентный анализ является широко используемым методом в медицинской и биологической областях науки, и в том числе, дает возможность изучать конформационные изменения в строении белков.

Глава 2. Методическая часть экспериментов

§2.1. Приготовление растворов сывороточного альбумина человека и ДСН для анализа триптофановой флуоресценции белка

Для исследования методом флуоресцентного анализа денатурации сывороточного альбумина человека под действием ДСН были приготовлены растворы сывороточного альбумина человека путем разведения белка до концентрации 0,33 мг/мл (5 мкМ) в двух различных буферных системах:

- 1) 0,1М CH_3COOH – KOH , pH (3,5; 4,0; 4,5; 5,0)
- 2) 0,1М KH_2PO_4 – NaOH , pH (5,5; 6,0)

В белковые растворы добавлялись различные концентрации ДСН - 0,5 мМ; 1,0 мМ; 2,0 мМ; 3,0 мМ; 4,0 мМ; 5,0 мМ; 7,0 мМ, а также для изменения вязкости растворов добавлялись различные концентрации сахарозы – 10мМ, 100 мМ, 200мМ.

§2.2. Приготовление растворов сывороточного альбумина человека и ЦТАБ для анализа триптофановой флуоресценции белка

Для исследования методом флуоресцентного анализа денатурации сывороточного альбумина человека под действием ЦТАБ были приготовлены растворы сывороточного альбумина человека путем разведения белка до концентрации 0,33 мг/мл (5 мкМ) в двух различных буферных системах:

- 1) 0,1М CH_3COOH – KOH , pH (3,5; 4,0; 4,5; 5,0)
- 2) 0,1М KH_2PO_4 – NaOH , pH (5,5; 6,0; 6,5; 7,0; 7,5; 8,0)

В белковые растворы добавлялись различные концентрации ЦТАБ - 0,5 мМ; 1,0 мМ; 2,0 мМ; 3,0 мМ; 4,0 мМ; 5,0 мМ; 7,0 мМ.

§2.3. Методика экспериментов для исследования стационарной и поляризованной триптофановой флуоресценции сывороточного альбумина человека в растворах с ДСН

Растворы сывороточного альбумина человека при различных концентрациях ДСН и при различных значениях рН исследовались методом флуоресцентного анализа по спектрам собственной триптофановой флуоресценции белка. Исследования проводились с помощью спектрофлуориметра LS 55 (Perkin Elmer). Спектрально-флуоресцентные характеристики образцов получены при комнатной температуре. Триптофановая флуоресценция белка возбуждалась светом с длиной волны $\lambda_{\text{возб}} = 295$ нм и регистрировалась в диапазоне 300 – 500 нм. Спектральные щели монохроматора возбуждения и монохроматора эмиссии были равными 2,5 нм. Полученные спектры обрабатывались программой FL Winlab (Perkin Elmer).

§2.4. Методика экспериментов для исследования стационарной и поляризованной триптофановой флуоресценции сывороточного альбумина человека в растворах с ЦТАБ

Растворы сывороточного альбумина человека при различных концентрациях ЦТАБ и различных рН исследовались методом флуоресцентного анализа по спектрам собственной триптофановой флуоресценции белка. Исследования проводились с помощью спектрофлуориметра LS 55 (Perkin Elmer). Спектрально-флуоресцентные характеристики образцов получены при комнатной температуре. Триптофановая флуоресценция белка возбуждалась светом с длиной волны $\lambda_{\text{возб}} = 295$ нм и регистрировалась в диапазоне 300 – 500 нм. Спектральные щели монохроматора возбуждения и монохроматора эмиссии были равными 2,5 нм. Полученные спектры обрабатывались программой FL Winlab (Perkin Elmer).

Глава 3. Исследование денатурации сывороточного альбумина человека под действием ионных детергентов по анализу триптофановой флуоресценции белка

§3.1. Денатурация сывороточного альбумина человека под действием анионного детергента додецилсульфата натрия (ДСН) при различных значениях рН растворов по анализу стационарной и поляризованной триптофановой флуоресценции белка

Для оценки конформационного состояния молекул сывороточного альбумина человека при денатурации под действием ДСН получены спектры триптофановой флуоресценции ($\lambda_{возб} = 295$ нм) альбумина в растворах, содержащих различные концентрации ДСН, при различных значениях рН.

Характер изменений спектров триптофановой флуоресценции альбумина при увеличении концентраций ДСН различался для значений рН (3,5; 4,0; 4,5), меньших изоэлектрической точки альбумина (рI 4,7), и для значений рН (5,0; 5,5; 6,0), больших рI альбумина. В качестве примеров, отражающих характер изменения спектров триптофановой флуоресценции альбумина в присутствии ДСН, представлены спектры флуоресценции альбумина в растворах с различными концентрациями ДСН для рН 4,0 (рис. 3.1.) и для рН 6,0 (рис. 3.2.).

На рис. 3.3. представлены зависимости интенсивности триптофановой флуоресценции сывороточного альбумина человека от рН растворов в отсутствие ДСН. Видно, что при увеличении значения рН происходит увеличение интенсивности триптофановой флуоресценции белка.

На рис. 3.4. изображены зависимости интенсивности в максимуме спектров триптофановой флуоресценции сывороточного альбумина человека от концентрации ДСН для различных значений рН. Видно, что в растворах с ДСН триптофановая флуоресценция сывороточного альбумина человека тушится: интенсивность в максимуме спектров флуоресценции альбумина в

растворах с ДСН меньше, чем в растворах, не содержащих ДСН. Тушение триптофановой флуоресценции белка в растворах с ДСН объясняется его денатурацией, вследствие которой при разворачивании белковых глобул хромофорная группа триптофана альбумина становится более доступной для молекул воды, тушащих её свечение.

Из рис. 3.4. видно, что более сильное тушение собственной триптофановой флуоресценции сывороточного альбумина, наблюдаемое в растворах с ДСН, при одинаковых концентрациях ДСН имеет место при более низких значениях рН. Данная закономерность говорит об электростатическом механизме взаимодействия сывороточного альбумина человека с ДСН. ДСН в растворе диссоциирует на положительно заряженные катионы натрия и додецилсульфат-анионы, которые и взаимодействуют с белком. Молекулы сывороточного альбумина человека в целом заряжены положительно при рН, меньших рI альбумина.

Поэтому при низких значениях рН происходит интенсивное связывание в целом положительно заряженных макромолекул белка с додецилсульфат-анионами, вследствие чего происходит сильное тушение триптофановой флуоресценции альбумина в растворах с ДСН по сравнению с растворами, не содержащими ДСН. По мере увеличения рН в целом положительный заряд макромолекулы альбумина уменьшается, а при рН, больших рI, макромолекулы альбумина приобретают в целом отрицательный заряд. Поэтому при высоких значениях рН (больших рI) происходит слабое связывание додецилсульфат-анионов и в целом отрицательно заряженных молекул альбумина, хотя еще и сохраняющих какие-то положительно заряженные участки на своих поверхностях, вследствие чего в растворах с ДСН происходит слабое тушение триптофановой флуоресценции альбумина. Следовательно, более сильная денатурация белка под действием ДСН имеет место при рН, меньших рI белка.

Установленные из экспериментальных данных зависимости интенсивности в максимуме спектра триптофановой флуоресценции

сывороточного альбумина человека при различных значениях рН от концентрации ДСН (рис. 3.4.) можно объяснить двустадийным механизмом денатурации этого белка в присутствии ДСН. При этом поведение зависимостей интенсивности в максимуме спектра триптофановой флуоресценции альбумина различается в зависимости от того, выше или ниже рI белка находится значение рН раствора.

При значениях рН, меньших рI альбумина (рН 3,5-4,5), видно (рис. 3.4.), что денатурация сывороточного альбумина человека в присутствии ДСН представляет собой не непрерывный одностадийный процесс, а ступенчато – двустадийный. При концентрациях ДСН, меньших 1 мМ, происходит тушение триптофановой флуоресценции альбумина, а затем в области концентраций ДСН от 1 мМ до 2 мМ интенсивность в максимуме спектра триптофановой флуоресценции имеет практически постоянные значения. При этих концентрациях ДСН (до 2 мМ) происходит первая переходная стадия денатурации белка: белковые глобулы разрыхляются, но полного разворачивания еще не произошло. При дальнейшем увеличении концентрации ДСН до 3 мМ происходит дальнейшее тушение триптофановой флуоресценции альбумина, что говорит о том, что белковые молекулы из переходного состояния разрыхленности переходят во вторую стадию денатурации – стадию полного разворачивания. При увеличении концентрации ДСН свыше 3 мМ (до 7 мМ) более сильного тушения триптофановой флуоресценции альбумина не происходит, что указывает на полную денатурацию молекул альбумина. Следовательно, подобное двухэтапное тушение собственной флуоресценции белка при увеличении концентрации ДСН при этих значениях рН, меньших рI белка, объясняется двустадийным механизмом его денатурации и последовательными конформационными перестройками белковой глобулы, приводящими к оголению триптофана и увеличению его доступности для молекул воды, тушащих его флуоресценцию.

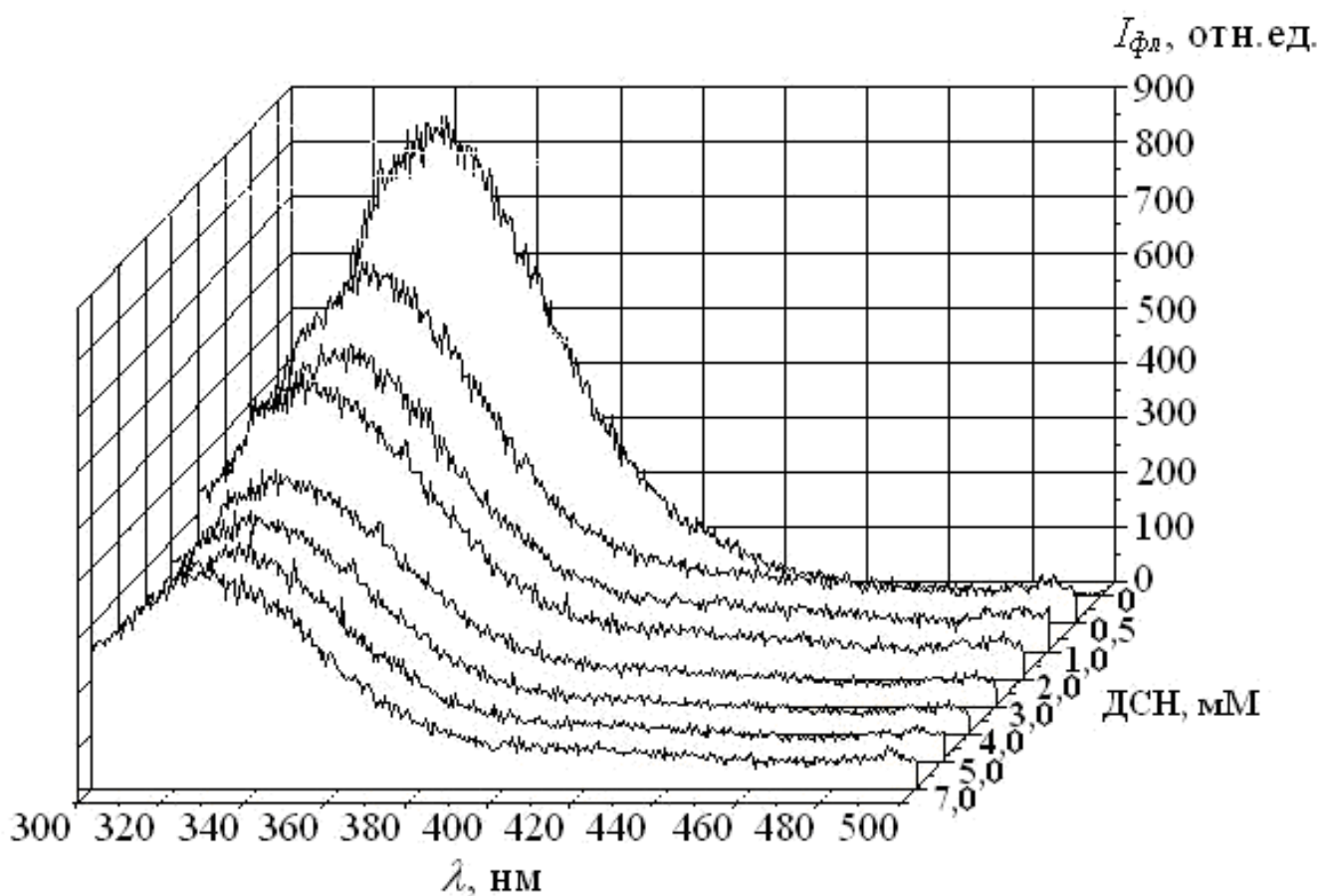


Рис. 3.1. Спектры триптофановой флуоресценции (возбуждение 295 нм) сывороточного альбумина человека (5 мкМ) при добавлении различных концентраций ДСН (0; 0,5; 1,0; 2,0; 3,0; 4,0; 5,0; 7,0 мМ) при рН 4,0

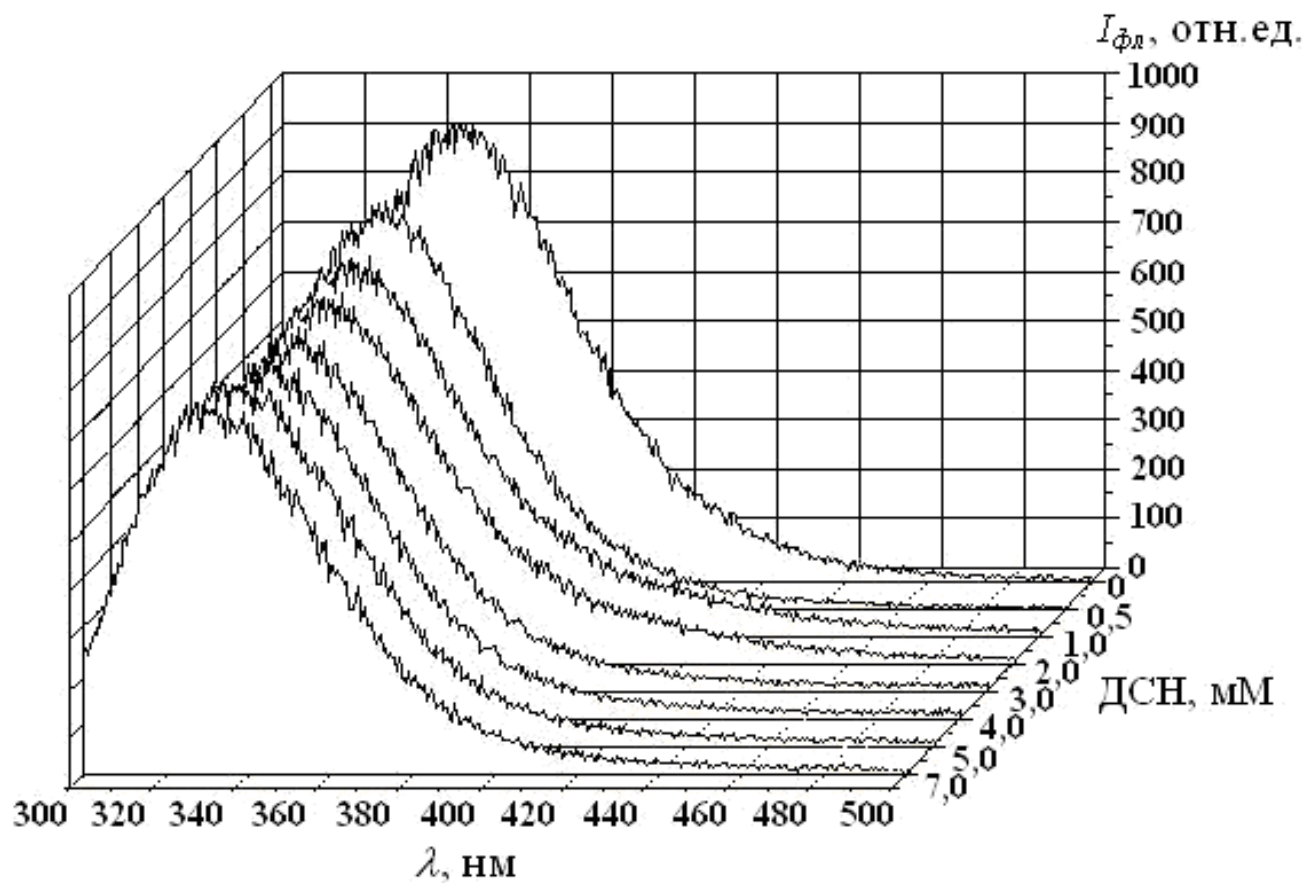


Рис. 3.2. Спектры триптофановой флуоресценции (возбуждение 295 нм) сывороточного альбумина человека (5 мкМ) при добавлении различных концентраций ДСН (0; 0,5; 1,0; 2,0; 3,0; 4,0; 5,0; 7,0 мМ) при рН 6,0

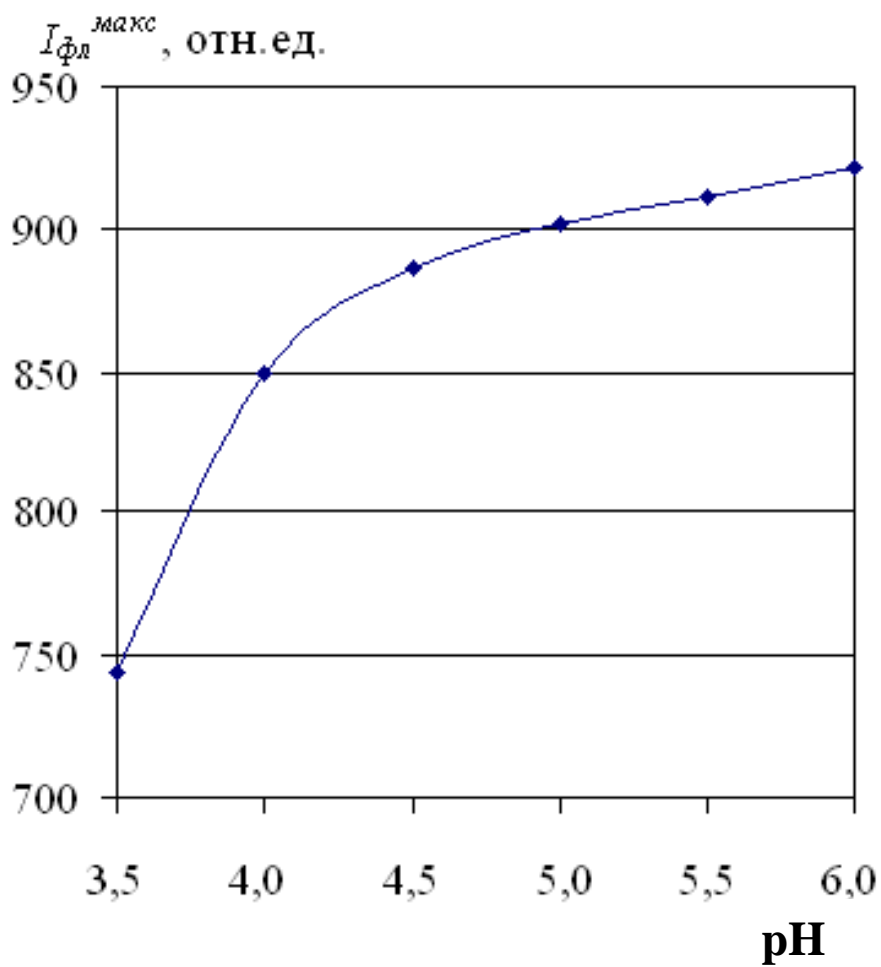


Рис. 3.3. Зависимость интенсивности в максимуме спектра триптофановой флуоресценции (возбуждение 295 нм) сывороточного альбумина человека (5 μM) от pH растворов в отсутствие ДСН

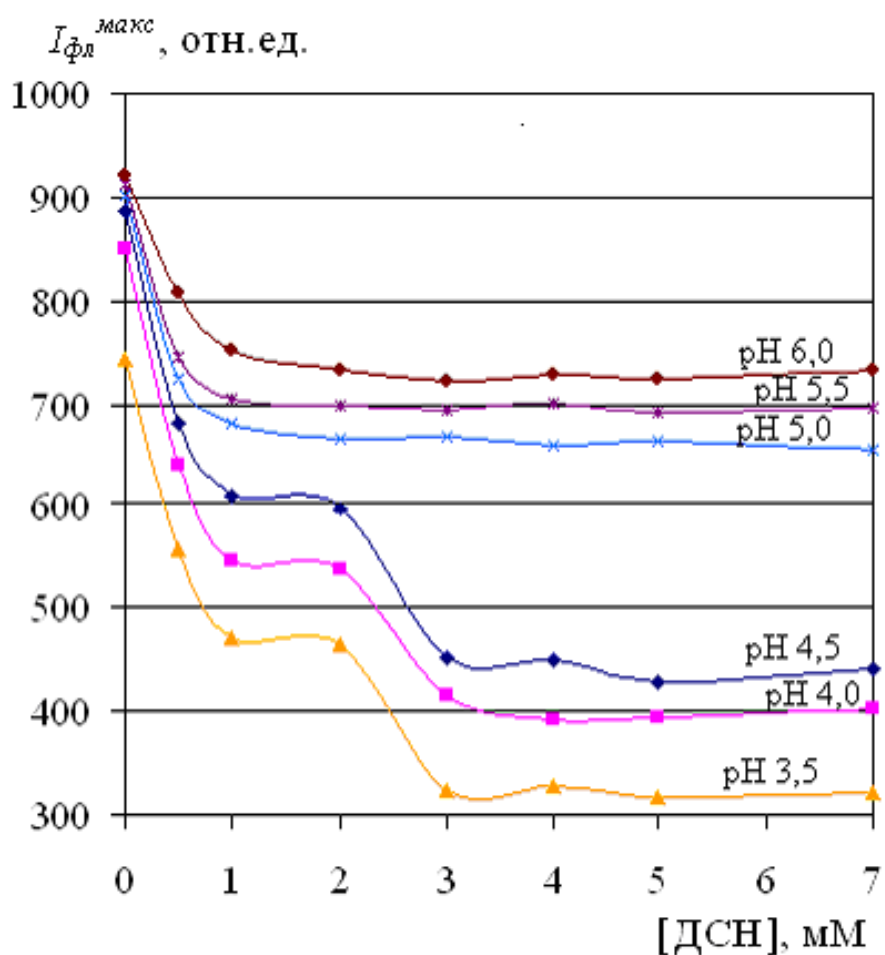


Рис. 3.4. Зависимость интенсивности в максимуме спектра триптофановой флуоресценции сывороточного альбумина человека (5 мкМ) от концентрации ДСН при различных значениях pH растворов

При значениях рН, больших рI альбумина (рН 5,0-6,0), додецилсульфат-анионы плохо связываются с белковыми молекулами. Денатурация сывороточного альбумина человека под действием ДСН при этих значениях рН идет слабо. По форме кривых (рис. 3.4.) видно, что двустадийный процесс денатурации сывороточного альбумина человека в присутствии ДСН при этих значениях рН проходит только одну первую стадию. При увеличении концентрации ДСН до 1 – 2 мМ происходит тушение триптофановой флуоресценции альбумина, т.е. наблюдается денатурационное разрыхление белковых глобул (первая стадия денатурации), приводящее к увеличению доступности триптофана альбумина для тушащих его флуоресценцию молекул воды. Добавление больших концентраций ДСН при этих значениях рН не приводит к дальнейшей второй стадии денатурации, это видно из того, что интенсивность в максимуме спектра триптофановой флуоресценции альбумина слабо меняется. Таким образом, в отличие от значений рН, меньших рI белка, где денатурация под действием ДСН проходит две стадии (разрыхление; полное разворачивание), при рН, больших рI альбумина, денатурация под действием ДСН останавливается на первой стадии (происходит только разрыхление белковых глобул) в интервале исследованных концентраций ДСН.

На рис. 3.5. представлены зависимости квантового выхода триптофановой флуоресценции сывороточного альбумина человека от концентрации ДСН при различных значениях рН растворов. Вид зависимостей повторяет характер зависимостей интенсивности в максимуме спектра триптофановой флуоресценции белка от концентрации ДСН.

На рис. 3.6. представлены зависимости длины волны в максимуме спектра триптофановой флуоресценции сывороточного альбумина человека при различных значениях рН от концентрации ДСН. Следует отметить, что при увеличении рН растворов максимум спектра триптофановой флуоресценции альбумина смещается в сторону больших длин волн, как для растворов с ДСН, так и для растворов, не содержащих ДСН.

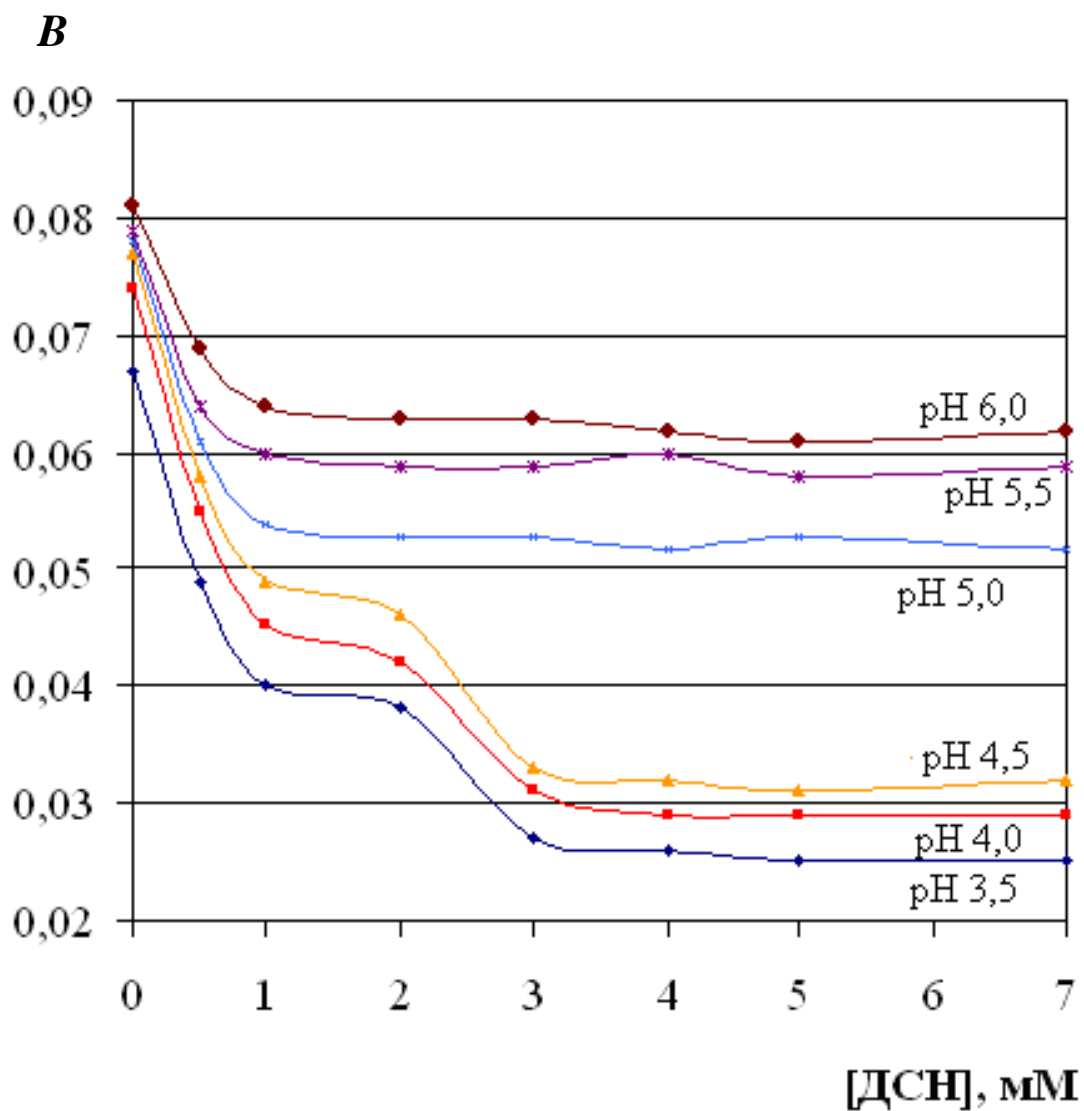


Рис. 3.5. Зависимости квантового выхода триптофановой флуоресценции сывороточного альбумина человека (5 мкМ) от концентрации ДСН при различных значениях рН растворов

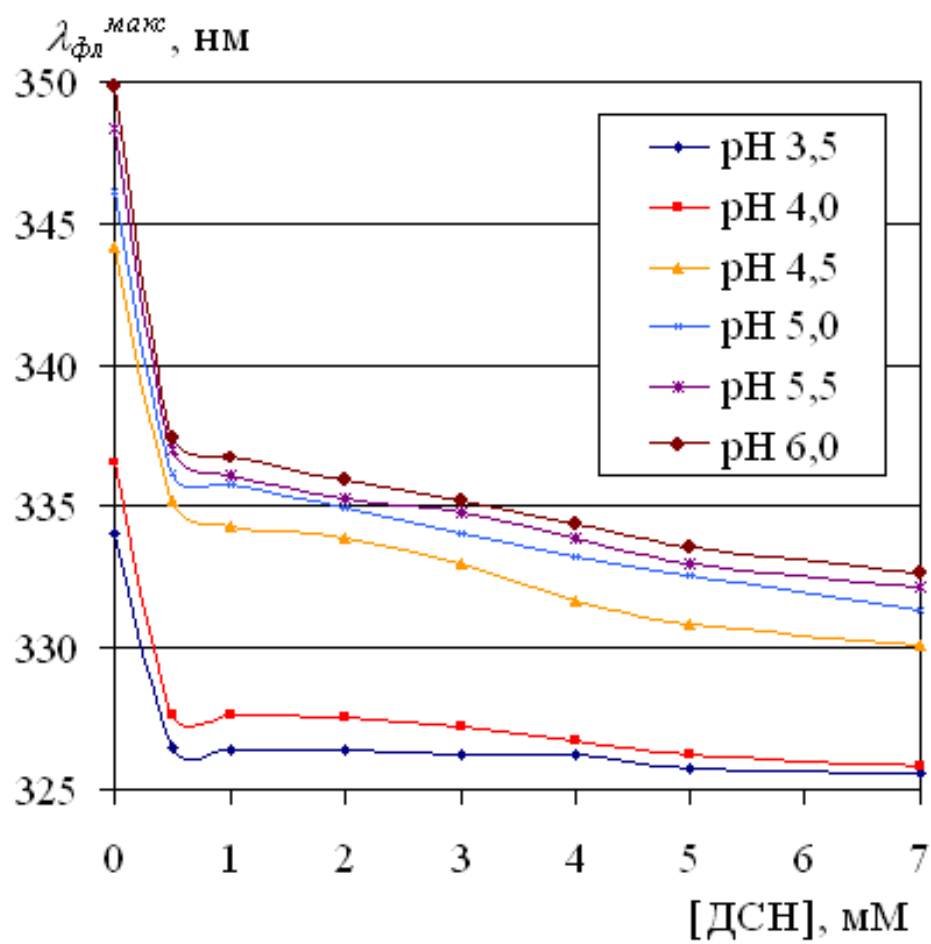


Рис. 3.6. Зависимость длины волны в максимуме спектра триптофановой флуоресценции сывороточного альбумина человека (5 мкМ) от концентрации ДСН при различных значениях рН растворов

В частности, для растворов альбумина, не содержащих ДСН, при увеличении рН от 3,5 до 6,0 происходит красный сдвиг максимума спектра триптофановой флуоресценции альбумина от 334,0 нм до 349,8 нм.

При добавлении в раствор первой концентрации ДСН (0,5 мМ) происходит резкий синий сдвиг (рис. 3.6.) максимума спектра триптофановой флуоресценции альбумина (примерно на 8 – 12 нм в зависимости от рН). Добавление дальнейших увеличивающихся концентраций ДСН (от 0,5 мМ до 7,0 мМ) приводит к уже небольшому синему сдвигу спектров триптофановой флуоресценции альбумина (примерно на 1 – 5 нм в зависимости от рН). Синий сдвиг максимума спектра триптофановой флуоресценции сывороточного альбумина человека в растворах с ДСН объясняется изменением окружения хромофорной группы триптофана альбумина вследствие денатурационной конформационной перестройки глобулы белка.

В работе также исследовалась поляризованная флуоресценция альбумина в растворах с ДСН.

Как известно, изменения поляризации флуоресценции обуславливаются двумя причинами – во-первых, вращательной диффузией флуорофоров и, во-вторых, безызлучательным переносом энергии между флуорофорами. Благодаря подбору экспериментальных условий (исследовались сильно разбавленные растворы белка (5мкМ) и использовано возбуждение флуоресценции триптофана на дальнем длинноволновом крае (295 нм)) вклад от безызлучательного переноса энергии между флуорофорами отсутствует.

Таким образом, при данных экспериментальных условиях на поляризацию флуоресценции триптофана сывороточного альбумина человека оказывает влияние только вращательная диффузия флуорофора – триптофанового остатка молекулы белка. Изменения поляризации флуоресценции триптофанового остатка молекулы сывороточного альбумина человека в общем случае обусловлены как вращением целой молекулы белка (броуновское движение), так и вращением домена II белка, содержащего

триптофановый остаток, так и вращением самого хромофора (триптофана) относительно своего ближайшего окружения, связанным с дипольно-ориентационной релаксацией хромофора после возбуждения. Проведенные в данной работе стационарные измерения поляризованной флуоресценции сывороточного альбумина человека позволяют анализировать вращение целой молекулы белка, так как вклад вращения домена, содержащего триптофан, и вращения триптофанового остатка относительно ближайшего окружения считается пренебрежимо малым.

Как видно из рис. 3.7. – 3.8., значения степени анизотропии флуоресценции сывороточного альбумина человека r возрастают в области до 1мМ ДСН для всех значений рН, что указывает на первую стадию денатурации белка – разрыхление белковых глобул: происходит увеличение размеров молекулы белка (увеличение гидратированных молекул белка), что уменьшает вращательную диффузию молекул сывороточного альбумина человека и приводит к увеличению r .

Дальнейшее увеличение (больше 1 мМ) концентрации ДСН при рН, больших рI белка, практически не меняет значений r (рис. 3.8.), что указывает на прекращение изменения размеров молекул и остановку денатурации на первой стадии.

Иной характер зависимости r от концентраций ДСН наблюдается (рис. 3.7.) при рН, меньших рI белка: в области концентраций ДСН от 1 мМ до 2мМ значения r практически постоянны, в области концентраций ДСН от 2 мМ до 4мМ происходит дальнейшее увеличение r , что указывает на увеличение линейно-продольных размеров молекул белка при разворачивании аминокислотной цепи и уменьшение их вращательной диффузии, что, в свою очередь, говорит о том, что молекулы сывороточного альбумина переходят во вторую стадию денатурации – стадию полного разворачивания, а при увеличении концентрации ДСН свыше 4 мМ (до 7 мМ) значения r практически постоянны, что указывает на полную денатурацию молекул сывороточного альбумина человека.

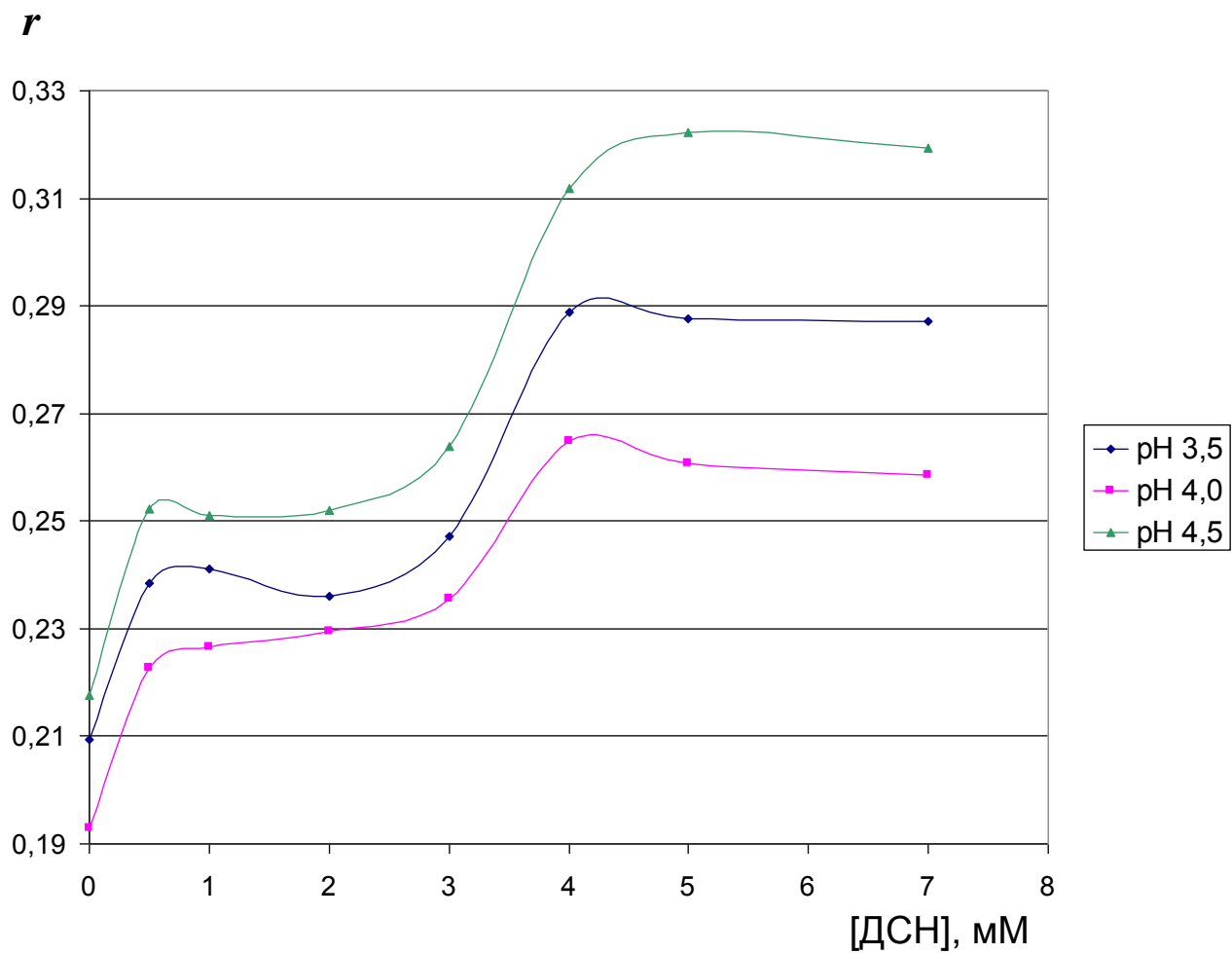


Рис. 3.7. Зависимости степени анизотропии флуоресценции сывороточного альбумина человека от концентрации ДСН при рН, меньших рI белка

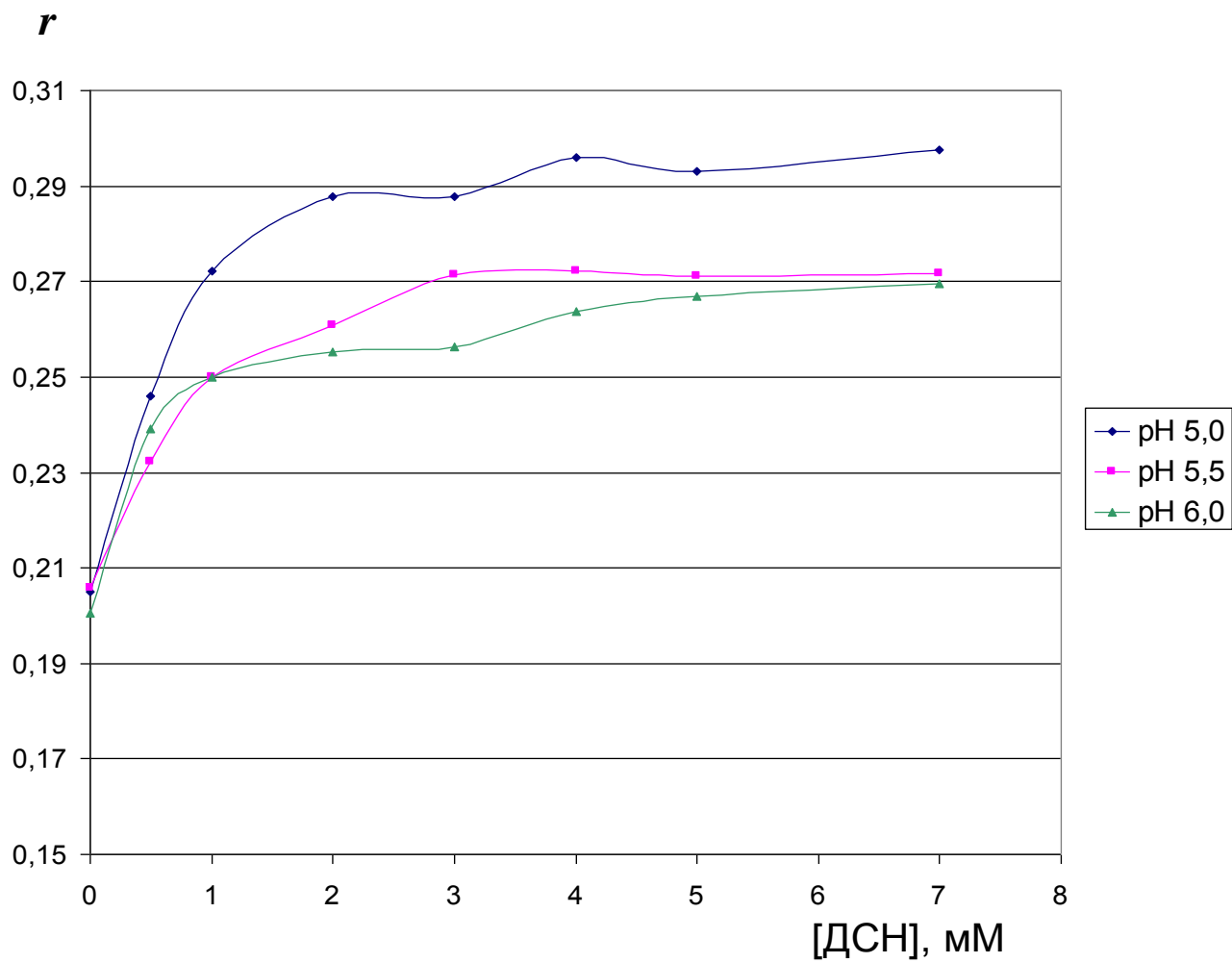


Рис. 3.8. Зависимости степени анизотропии флуоресценции сывороточного альбумина человека от концентрации ДСН при рН, больших рI белка

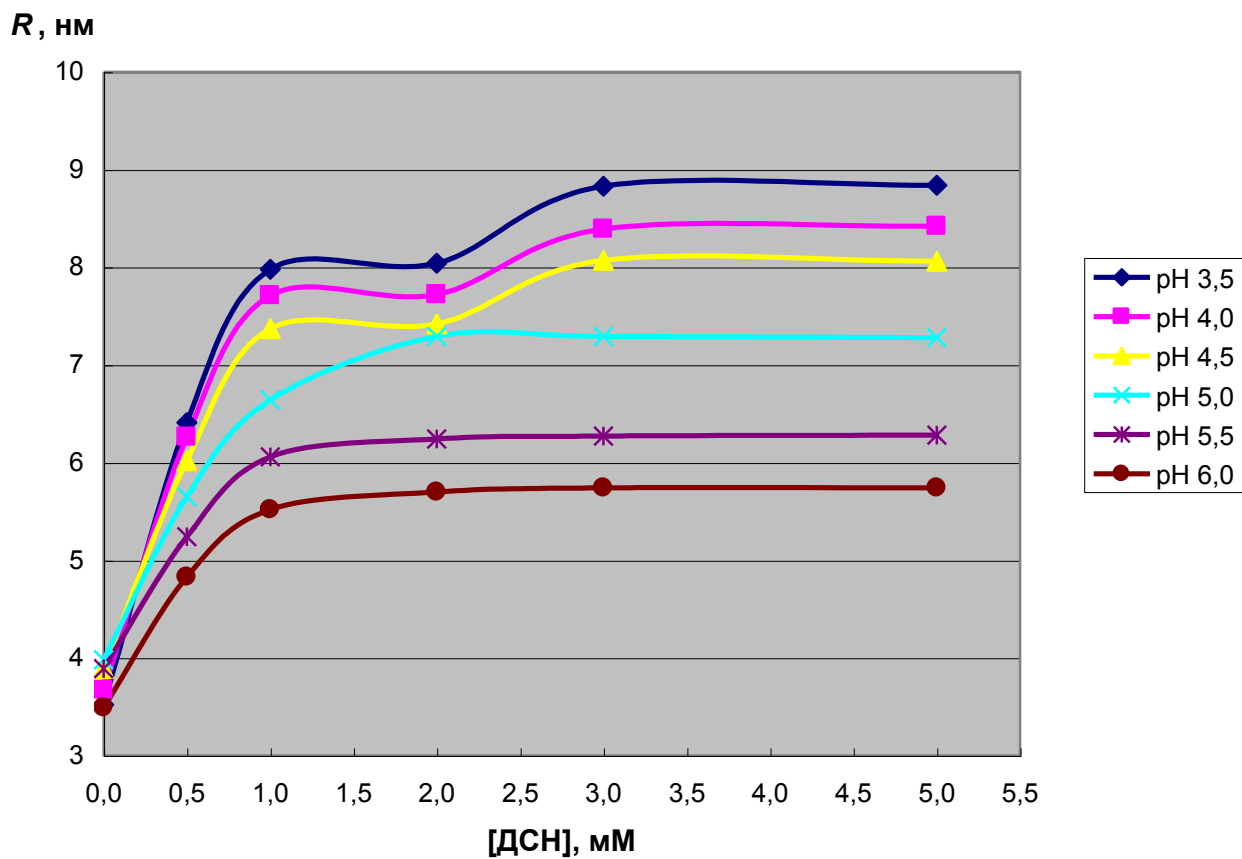


Рис. 3.9. Зависимости эффективного гидродинамического радиуса Эйнштейна молекул сывороточного альбумина человека от концентрации ДСН при различных значениях рН

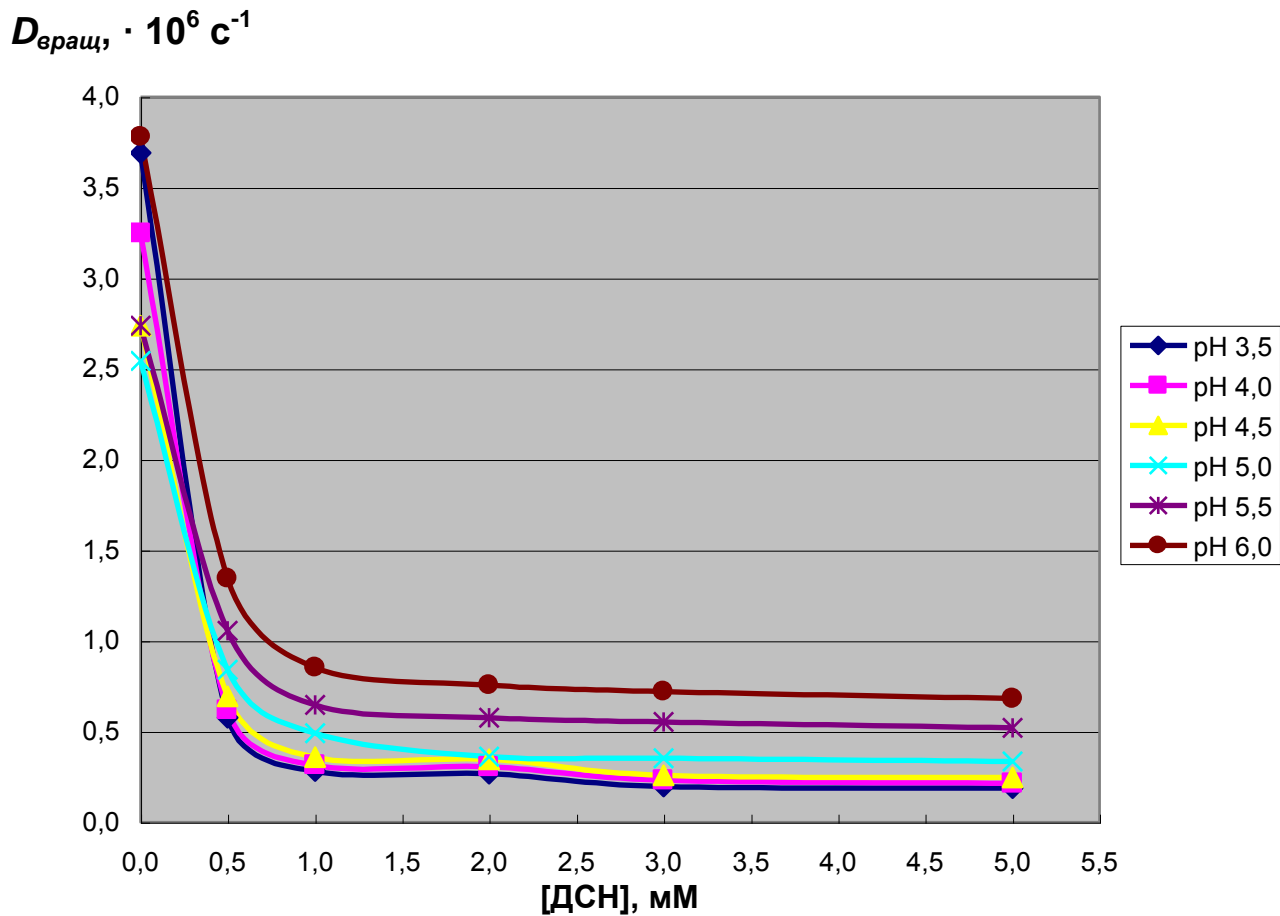


Рис. 3.10. Зависимости коэффициента вращательной диффузии молекул сывороточного альбумина человека от концентрации ДСН при различных значениях pH

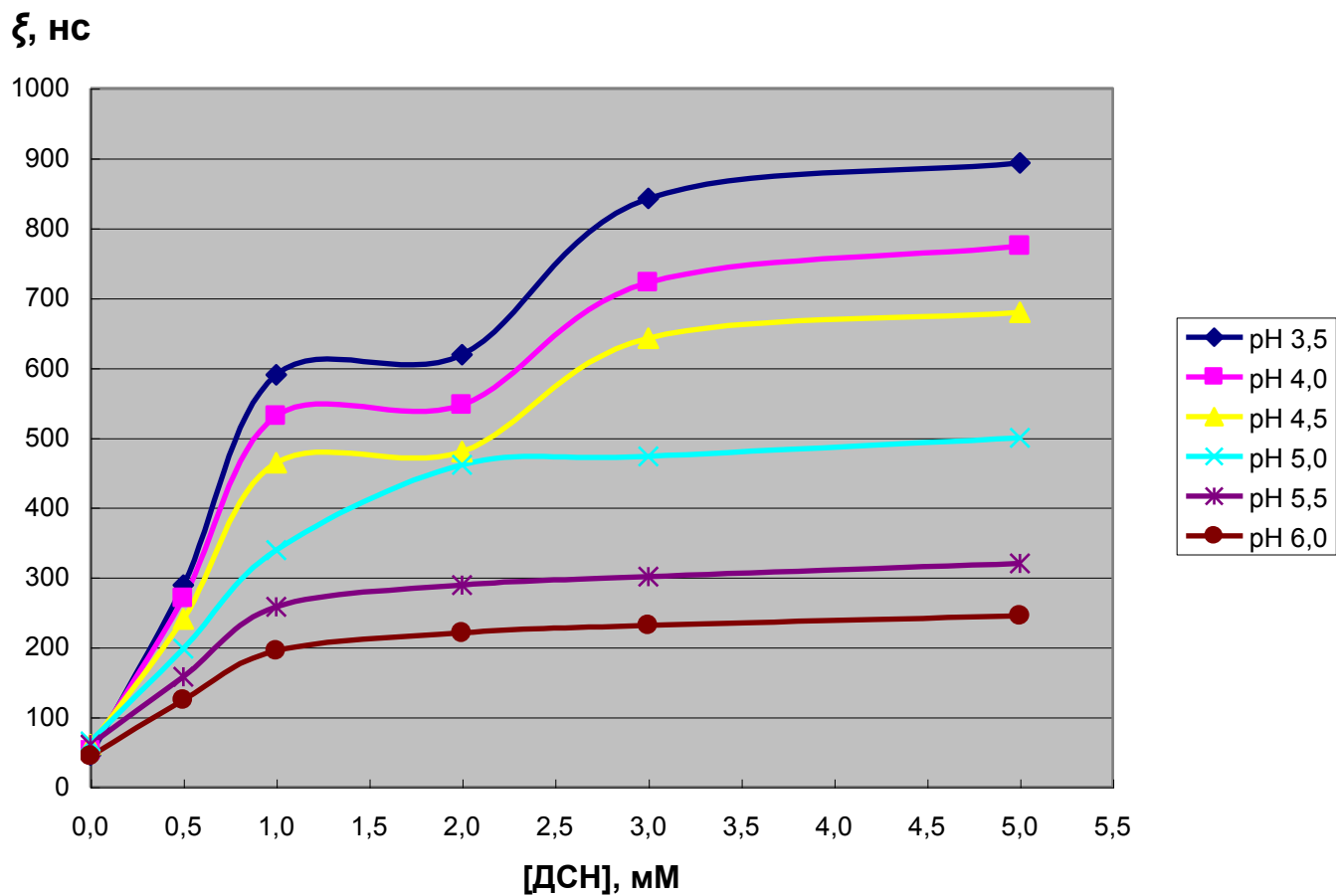


Рис. 3.11. Зависимости времени вращательной релаксации молекул сывороточного альбумина человека от концентрации ДСН при различных значениях рН

Следовательно, по двустадийному увеличению значений r при увеличении концентрации ДСН можно заключить, что при рН, меньших рI белка, денатурация сывороточного альбумина человека в присутствии ДСН представляет собой ступенчато-двустадийный процесс.

В данной работе представлены результаты исследования по анализу деполяризации флуоресценции белка параметров вращательной диффузии альбумина в растворах ДСН.

Благодаря изменению вязкости растворов с помощью сахарозы, был вычислен гидродинамический радиус Эйнштейна (R) молекул сывороточного альбумина человека при добавлении в раствор различных концентраций додецилсульфата натрия (от 0,5 мМ до 7 мМ). На рис. 3.9. представлены графики зависимостей эффективного радиуса Эйнштейна молекул сывороточного альбумина человека от концентрации ДСН при различных значениях рН. При добавлении додецилсульфата натрия гидродинамический радиус увеличивается на всех рН, что свидетельствует о денатурации сывороточного альбумина. Видно, что характер увеличения гидродинамического радиуса белка отличается в зависимости от рН растворов: при рН, меньших изоэлектрической точки белка (рI 4,7), происходит сильное двухэтапное увеличение R ; при рН, больших изоэлектрической точки белка, также происходит увеличение R , но более слабое, в один этап. Данные результаты подтверждают двустадийность процесса денатурации: первая стадия разрыхление глобул (при рН, больших изоэлектрической точки белка, процесс на ней останавливается), вторая – полное разворачивание аминокислотной цепи белка (при рН, меньших изоэлектрической точки белка, процесс проходит через обе стадии)

Также были посчитаны такие параметры вращательной диффузии флуорофоров, как коэффициент вращательной диффузии и время вращательной релаксации молекул альбумина в растворах ДСН. Графики зависимостей этих величин от концентрации ДСН при различных значениях рН растворов представлены на рисунках 3.10 и 3.11 соответственно.

Поведение зависимостей подтверждает предложенную модель о стадийности процесса денатурации сывороточного альбумина человека под действием ДСН.

В отличие от поведения B , r , R , D , ξ , отражающих стадийность процесса денатурации сывороточного альбумина человека под действием ДСН, поведение $\lambda_{\text{фл}}^{\text{макс}}$ чувствительно только к изменению ближайшего окружения триптофана (рис. 3.6.), а изменение B , r , R , D и ξ , несут отпечаток как локальных перестроек ближайшего окружения триптофанового остатка, так и более отдаленных периферийных изменений глобулы сывороточного альбумина человека.

Как известно, триптофан-214 (Trp(214)) расположен в гидрофобном кармане сывороточного альбумина человека, состоящем из « - Lys(212) – Ala(213) – Trp(214) – Ala(215) – Val(216) – Ala(217) – Arg(218) – » и расположенном на поверхности субдомена 4 в домене II. Данный гидрофобный карман, ответственный за связывание органических анионов, содержит 5 неполярных аминокислотных остатков, образующих область, ограниченную полярными катионными (при используемых в работе значениях pH) группами лизина-212 и аргинина-218, расположенными у входа в гидрофобный карман. Именно эти два аминокислотных остатка (Lys(212) и Arg(218)), расположенные на входе в гидрофобный карман, внутри которого находится Trp(214), являются первыми мишенями для додецилсульфат-анионов.

С этой точки зрения при добавлении концентраций ДСН до 1 мМ в результате взаимодействия Lys(212) и Arg(218) с додецилсульфат-анионами происходят сильные изменения ближайшего окружения Trp(214), приводящие, с одной стороны, к синему смещению $\lambda_{\text{фл}}^{\text{макс}}$ и, с другой стороны, к частичному открытию гидрофобного кармана с Trp(214) и к частичному оголению Trp(214) (из-за разрыхления глобулы) для молекул воды, тушащих его флуоресценцию, что приводит к первому сильному уменьшению B (1-ая стадия денатурации), и к увеличению объема

гидратированных молекул белка (это показывает увеличение гидродинамического радиуса R), что приводит к увеличению степени анизотропии r . При добавлении больших концентраций ДСН (больше 1-2 мМ) связывание новых додецилсульфат-анионов приводит в зависимости от рН:

- 1) к полной денатурации (к 2ой стадии) сывороточного альбумина человека при рН, меньших рI белка, состоящей в полном оголении Trp(214) для тушащих его флуоресценцию молекул воды, что приводит ко второму сильному уменьшению B , т.е. к разворачиванию глобул, приводящему к уменьшению вращательной диффузии молекул альбумина, а значит, к увеличению r (при этом ближайшее окружение Trp(214) меняется слабо, т. к. синий сдвиг $\lambda_{фл}^{макс}$ очень мал);
- 2) к отсутствию второй стадии денатурации сывороточного альбумина человека при рН, больших рI белка, при этом происходит только слабое изменение окружения Trp(214), регистрируемое по небольшому синему смещению $\lambda_{фл}^{макс}$.

§3.2. Денатурация сывороточного альбумина человека под действием катионного детергента цетилтриметиламмонийбромида (ЦТАБ) при различных значениях рН растворов по анализу стационарной и поляризованной триптофановой флуоресценции белка

Для оценки конформационного состояния молекул сывороточного альбумина человека при денатурации под действием ЦТАБ получены спектры триптофановой флуоресценции ($\lambda_{возб} = 295$ нм) альбумина в растворах, содержащих различные концентрации ЦТАБ, при различных значениях рН.

На рис. 3.12., для примера, приведены спектры флуоресценции альбумина в растворах с различными концентрациями ЦТАБ при рН 7,0. Видно, что в растворах ЦТАБ происходит тушение флуоресценции альбумина.

$I_{\text{фл}}$, отн. ед.

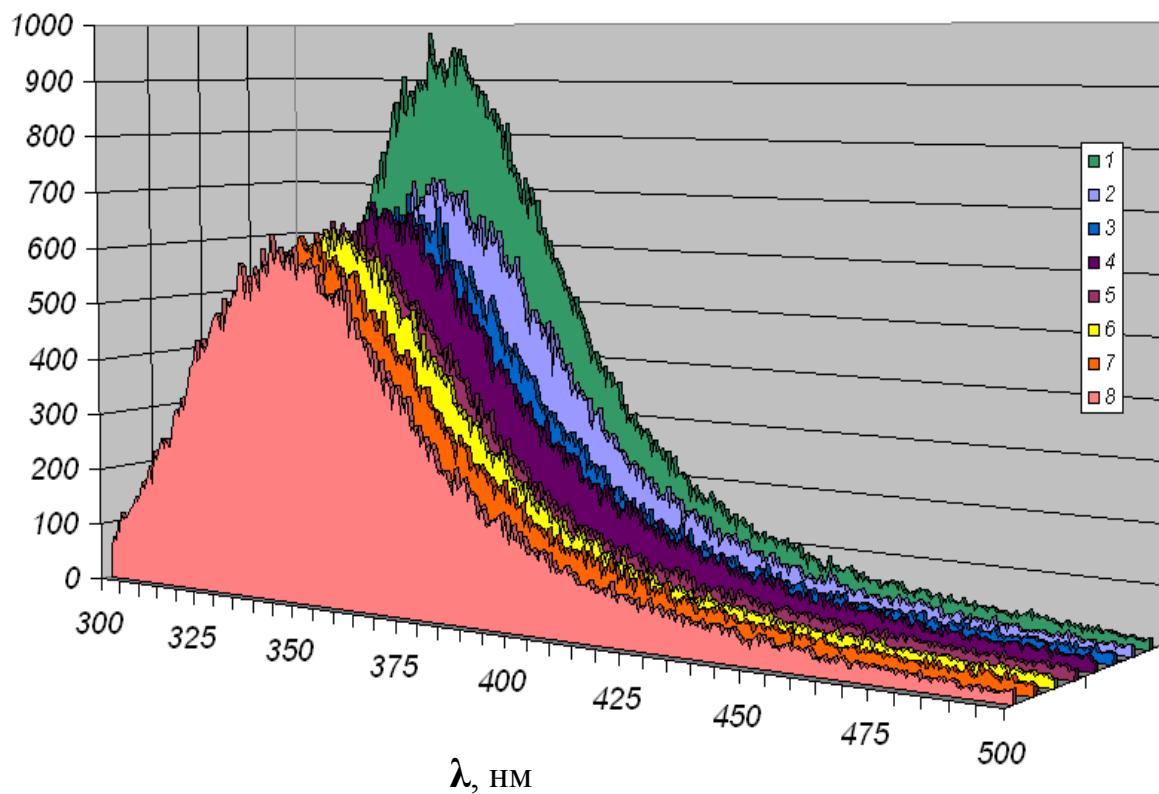


Рис. 3.12. Спектры триптофановой флуоресценции (возбуждение 295 нм) сывороточного альбумина человека (5 мкМ) при добавлении различных концентраций ЦТАБ: 0 мМ (1); 0,5 мМ (2); 1,0 мМ (3); 2,0 мМ (4); 3,0 мМ (5); 4,0 мМ (6); 5,0 мМ (7); 7,0 мМ (8) при рН 7,0

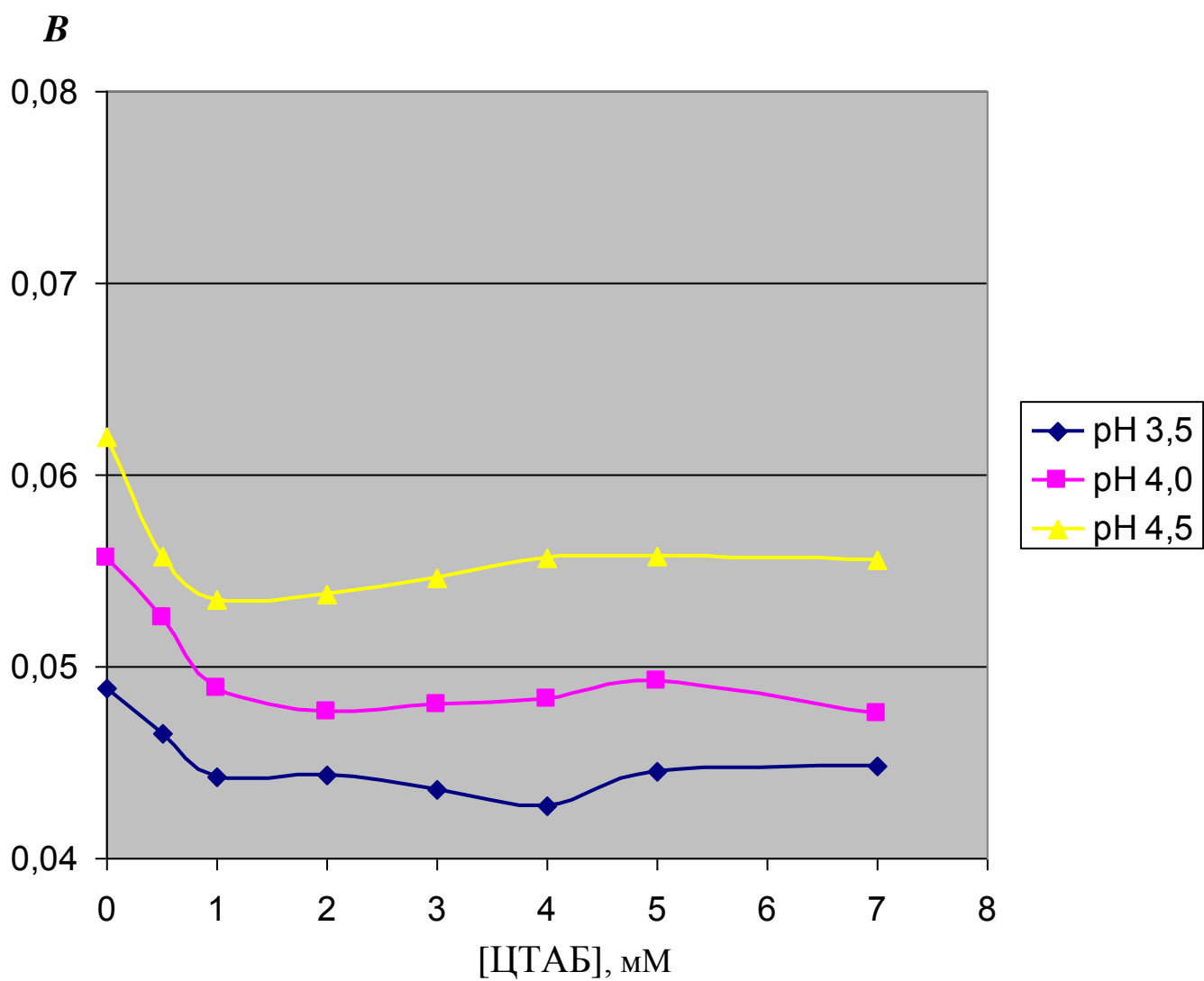


Рис. 3.13. Зависимости квантового выхода триптофановой флуоресценции сывороточного альбумина человека (5 мкМ) от концентрации ЦТАБ при рН, меньших рI белка.

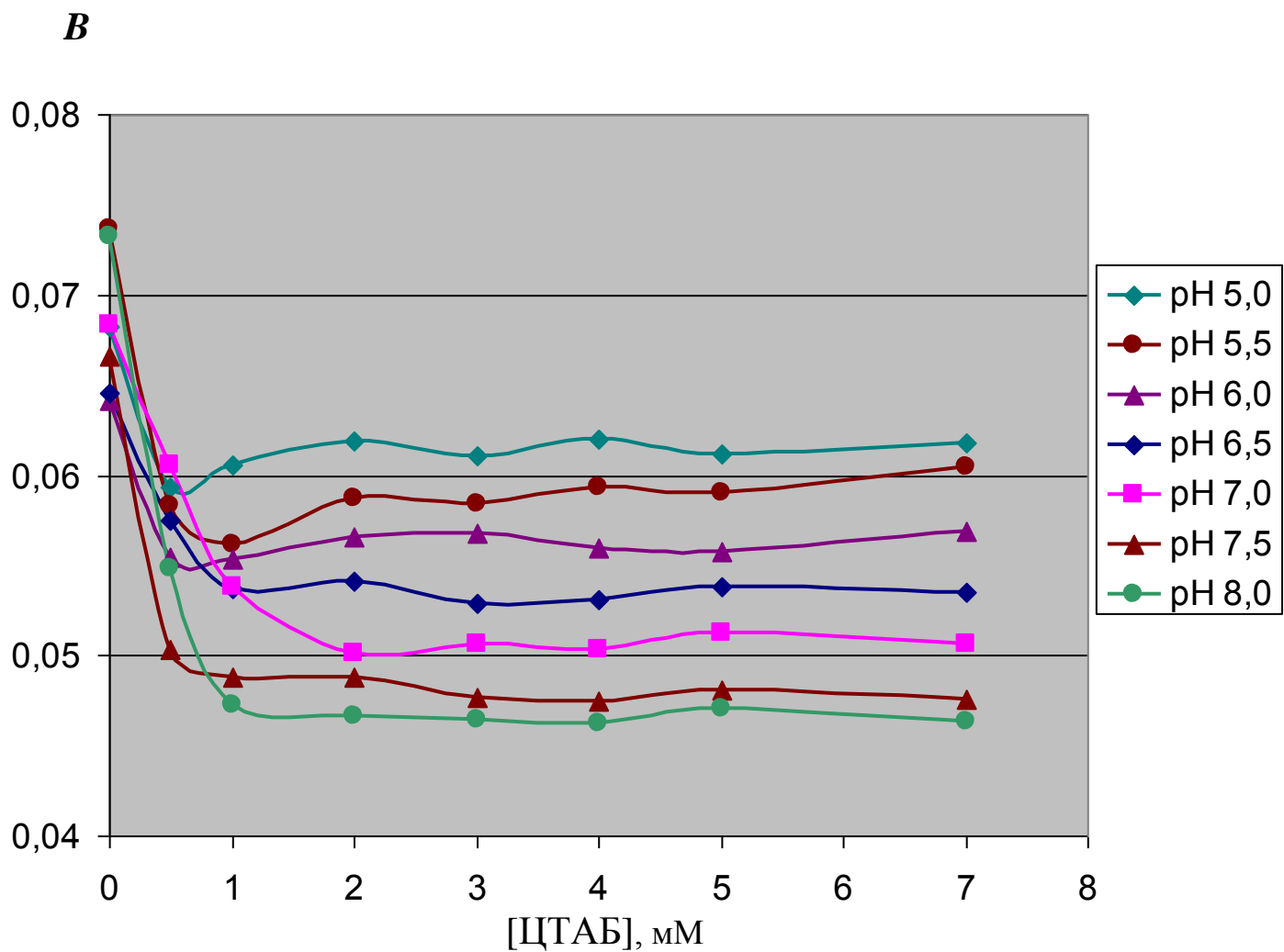


Рис. 3.14. Зависимости квантового выхода триптофановой флуоресценции сывороточного альбумина человека (5 мкМ) от концентрации ЦТАБ при рН, больших рI белка.

$\Delta B/\Delta[\text{ЦТАБ}]$

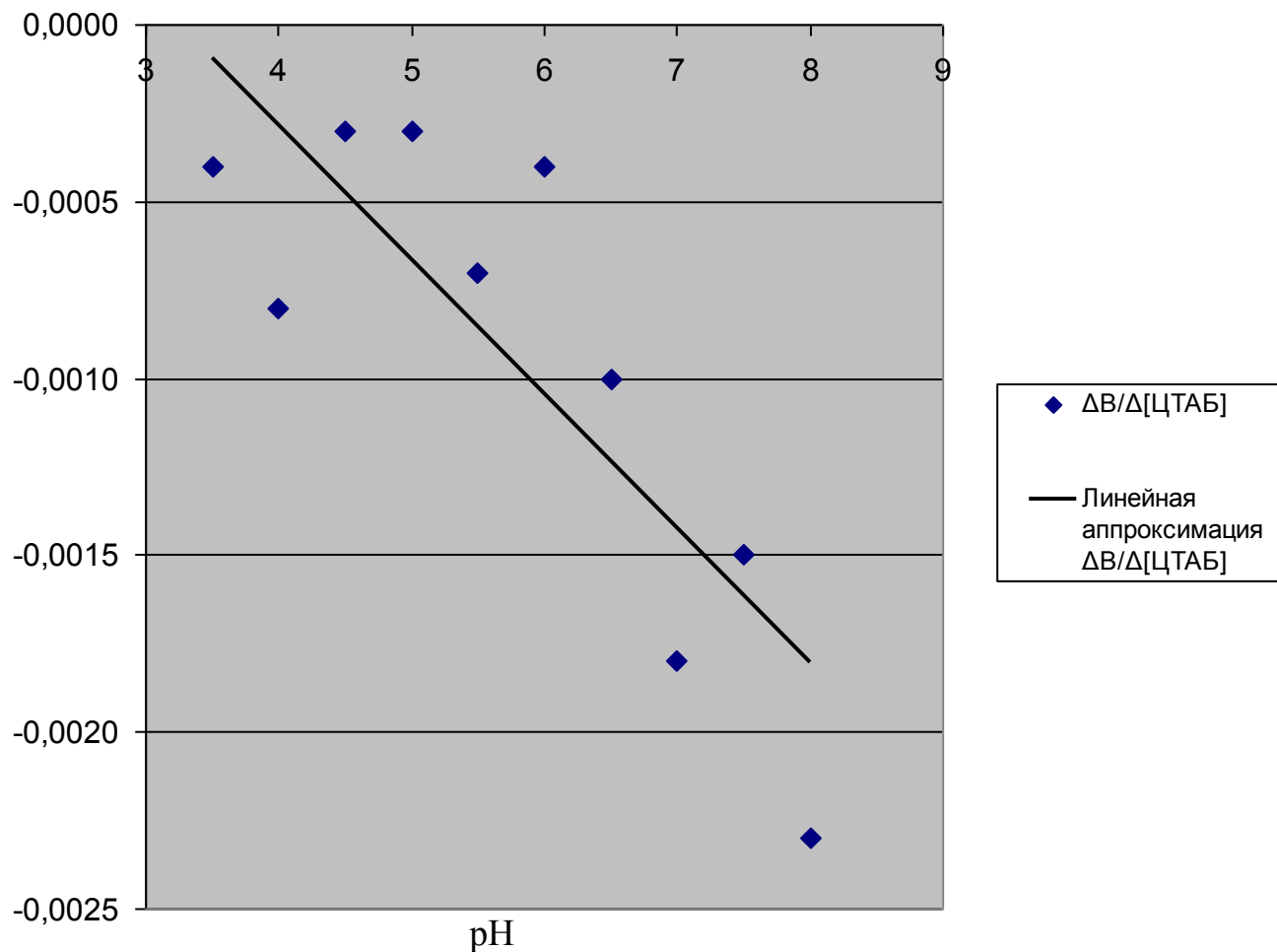


Рис. 3.15. Среднее изменение квантового выхода триптофановой флуоресценции сывороточного альбумина человека к изменению концентрации ЦТАБ при различных значениях pH

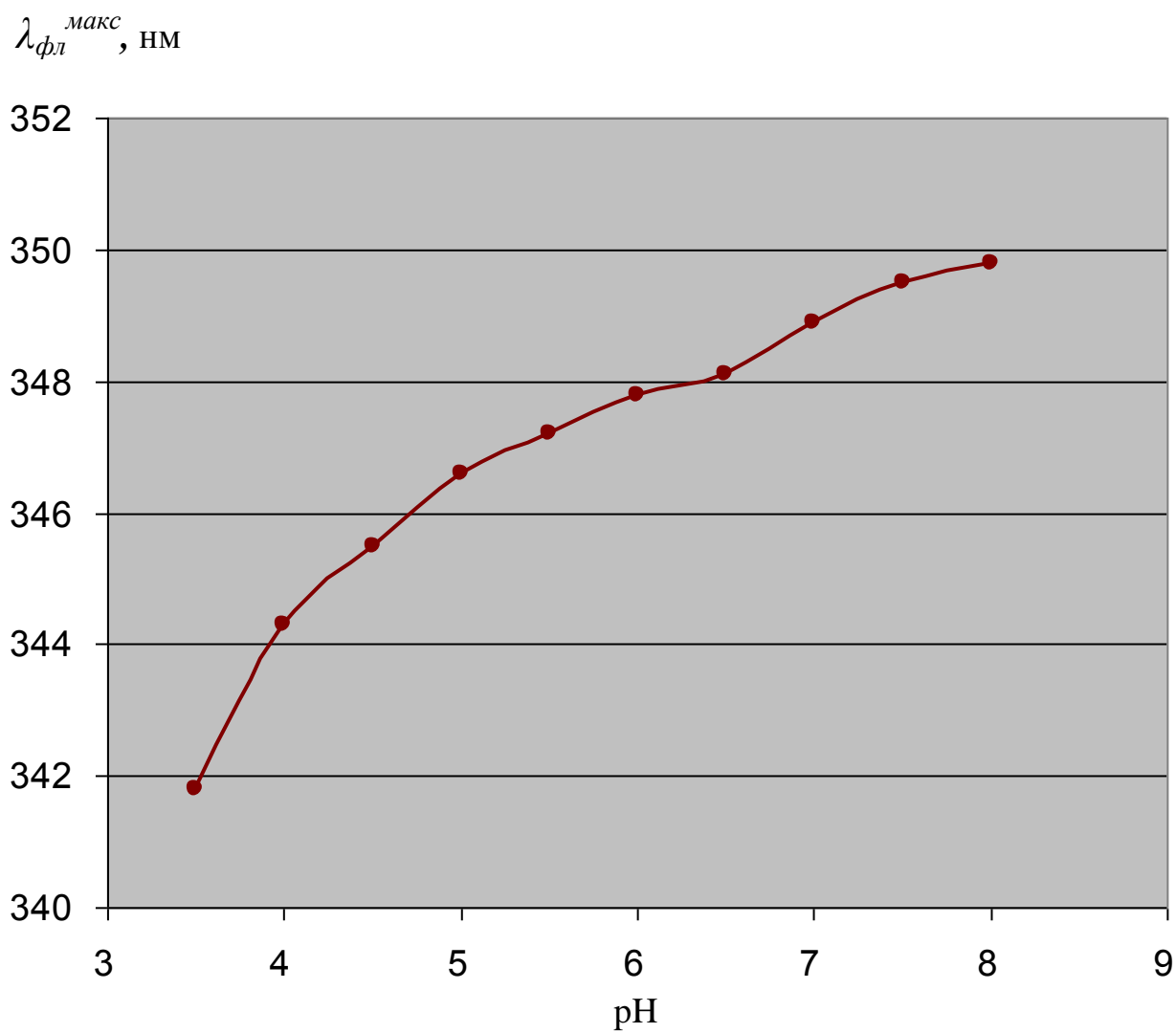


Рис. 3.16. Зависимость длины волны в максимуме спектра триптофановой флуоресценции сывороточного альбумина человека (5 мкМ) от значения pH растворов в отсутствии ЦТАБ.

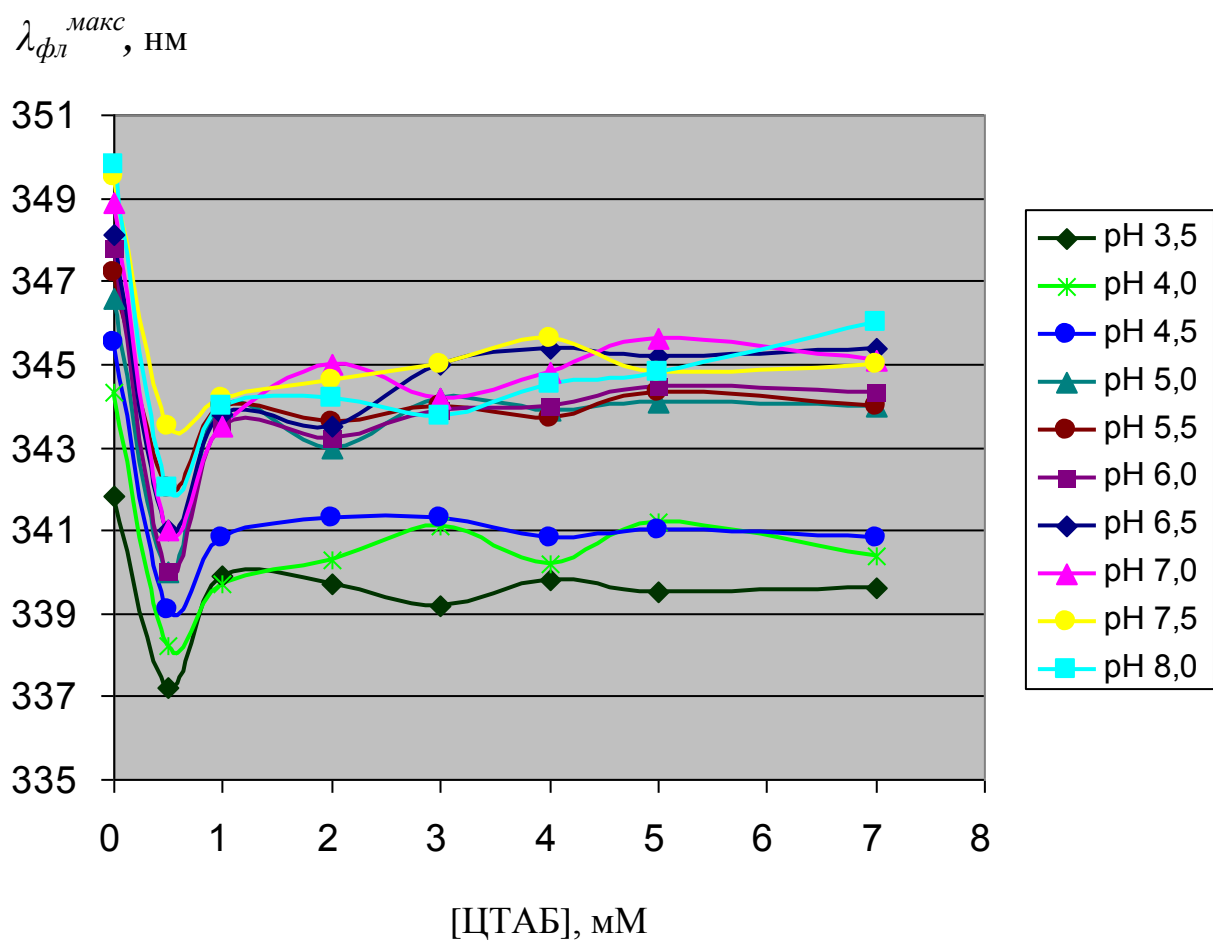


Рис. 3.17. Зависимости длины волны в максимуме спектра триптофановой флуоресценции сывороточного альбумина человека (5 мкМ) от концентрации ЦТАБ при различных значениях pH.

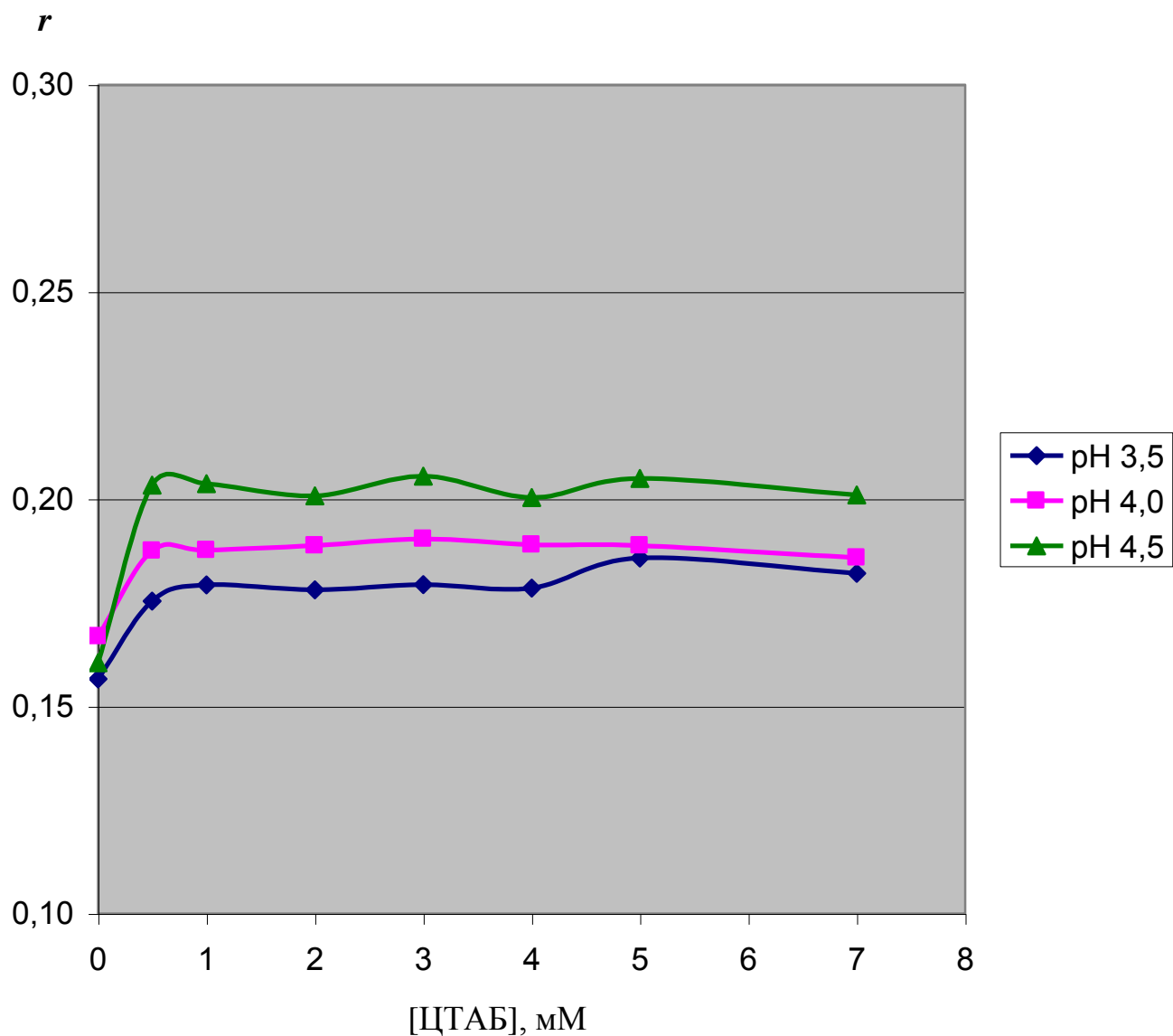


Рис. 3.18. Зависимости степени анизотропии флуоресценции сывороточного альбумина человека от концентрации ЦТАБ при рН, меньших рI белка

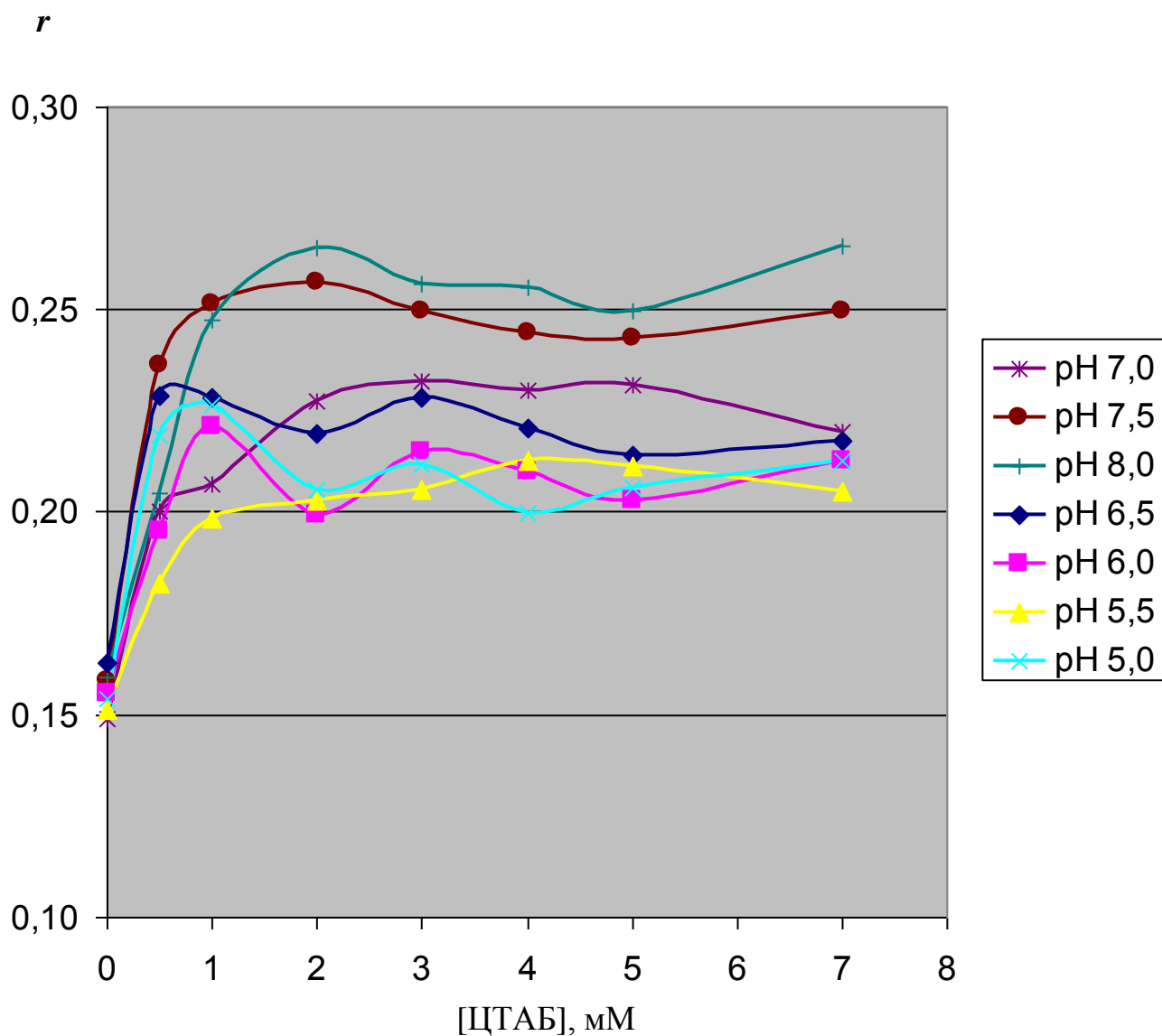


Рис. 3.19. Зависимости степени анизотропии флуоресценции сывороточного альбумина человека от концентрации ЦТАБ при рН, больших рI белка.

На рис. 3.13, 3.14. изображены зависимости квантового выхода триптофановой флуоресценции сывороточного альбумина человека от концентрации ЦТАБ при различных значениях рН растворов. Видно, что в растворах с ЦТАБ триптофановая флуоресценция сывороточного альбумина человека тушится. Тушение триптофановой флуоресценции белка в растворах с ЦТАБ объясняется его денатурацией, вследствие которой при разворачивании белковых глобул хромофорная группа триптофана альбумина становится более доступной для молекул воды, тушащих её свечение.

Из рис. 3.13, 3.14 видно, что более сильное тушение собственной триптофановой флуоресценции сывороточного альбумина, наблюдаемое при одинаковых концентрациях ЦТАБ, имеет место при более высоких значениях рН. Данная закономерность говорит об электростатическом механизме взаимодействия сывороточного альбумина человека с ЦТАБ. ЦТАБ в растворе диссоциирует на отрицательно заряженные анионы брома и цетилтриметиламмоний-катионы, которые и взаимодействуют с белком.

При высоких значениях рН (больших изоэлектрической точки белка) макромолекулы белка в целом заряжены отрицательно, поэтому происходит сильное связывание цетилтриметиламмоний-катионов с молекулами белка, и флуоресценция белка в растворах ЦТАБ тушится сильно. По мере уменьшения рН отрицательный заряд молекулы альбумина уменьшается, связывание альбумина с ЦТАБ происходит более слабо, поэтому и квантовый выход флуоресценции альбумина в растворах ЦТАБ уменьшается слабее (рис. 3.14).

При дальнейшем уменьшении рН, при значениях рН, меньших изоэлектрической точки, макромолекулы белка становятся заряжены в целом положительно, но при этом сохраняются и отрицательно заряженные участки. В связи с этим происходит слабое связывание САЧ с катионами ЦТАБ и триптофановая флуоресценция альбумина тушится слабо в

растворах с ЦТАБ по сравнению с растворами, не содержащими ЦТАБ (рис. 3.13.).

На рис. 3.15. представлена зависимость среднего изменения квантового выхода триптофановой флуоресценции сывороточного альбумина человека к изменению концентрации ЦТАБ при различных значениях рН. Более сильная денатурация белка под действием ЦТАБ имеет место при рН, больших рI белка. Видно, что с увеличением рН происходит более сильное тушение квантового выхода триптофановой флуоресценции с ростом концентрации ЦТАБ.

Из рис. 3. 13. – 3.14. видно, что денатурация альбумина под действием ЦТАБ носит одностадийный характер при всех значениях рН.

На рис. 3.16. представлена зависимость длины волны в максимуме спектра триптофановой флуоресценции САЧ от значения рН раствора в отсутствие ЦТАБ. Видно, что при увеличении рН наблюдается увеличение длины волны, т.е. происходит красный сдвиг максимума спектра.

На рис. 3.17. представлены зависимости длины волны в максимуме спектра триптофановой флуоресценции от концентрации ЦТАБ при различных значениях рН. При добавлении в раствор первой концентрации ЦТАБ (0,5 мМ) происходит резкий синий сдвиг максимума спектра триптофановой флуоресценции альбумина (примерно на 5 – 7 нм в зависимости от рН), что объясняется изменением окружения хромофорной группы триптофана альбумина вследствие денатурационной конформационной перестройки глобулы белка под действием ЦТАБ.

Также были проведены исследования поляризованной флуоресценции альбумина в растворах ЦТАБ. Экспериментальные условия были подобраны так, что на поляризацию флуоресценции триптофана сывороточного альбумина человека оказывала влияние только вращательная диффузия флуорофора – триптофанового остатка молекулы белка, а не безызлучательный перенос энергии между флуорофорами. Вклад вращения домена, содержащего триптофан, и вращения триптофанового остатка

относительно ближайшего окружения считается пренебрежимо малым, поэтому полученные результаты позволяют анализировать вращение целой молекулы белка.

Как видно из рис. 3.18. – 3.19., значения степени анизотропии флуоресценции сывороточного альбумина человека r возрастают в области до 1мМ ЦТАБ для всех значений рН, что указывает на первую стадию денатурации белка – разрыхление белковых глобул: происходит увеличение размеров молекулы белка (увеличение гидратированных молекул белка), что уменьшает вращательную диффузию молекул сывороточного альбумина человека и приводит к увеличению r .

Дальнейшее увеличение (больше 1 мМ) концентрации ЦТАБ при всех рН не меняет значений r , что указывает на прекращение изменения размеров молекул альбумина и остановку денатурации на первой стадии.

§3.3. Сравнительный анализ денатурирующего действия ионных детергентов на сывороточный альбумин человека

В данной работе исследовалось взаимодействие сывороточного альбумина человека с анионным детергентом додецилсульфатом натрия и катионным детергентом цетилтриметиламмонийбромидом. В растворе ДСН диссоциирует на катионы натрия и додецилсульфат-анионы, а ЦТАБ диссоциирует на анионы брома и цетилтриметиламмоний-катионы. Процесс связывания обоих детергентов с белком носит электростатический характер, поэтому, характер процессов денатурации белка под действием этих детергентов отличался в зависимости от значений рН.

Было получено, что денатурация альбумина под действием ДСН носит двустадийный характер (первая стадия – разрыхление глобул, вторая – полное разворачивание аминокислотной цепи белка), а под действием ЦТАБ – одностадийный.

При значениях pH , меньших изоэлектрической точки сывороточного альбумина, белок в целом заряжен положительно, но при этом имеет участки, заряженные отрицательно. Поэтому, при взаимодействии с додецилсульфат-анионами происходит полная денатурация белка, состоящая в разворачивании глобул, приводящая к двухступенчатому уменьшению квантового выхода флуоресценции белка, вращательной диффузии молекул альбумина, а значит, к двухступенчатому увеличению r . При взаимодействии белка с ЦТАБ цетилтриметиламмоний-катионы взаимодействуют с отрицательно заряженными участками альбумина, но белок в целом положительно заряжен, поэтому наблюдается слабая его денатурация (разрыхление глобул), что ведет к слабому уменьшению квантового выхода флуоресценции альбумина, вращательной диффузии молекул альбумина и, следовательно, к слабому увеличению r .

При значениях pH , больших изоэлектрической точки белка, альбумин в целом заряжен отрицательно, хотя и имеет участки, заряженные положительно. В связи с этим, при взаимодействии белка с додецилсульфат-анионами, денатурация проходит только через первую стадию и ведет к разрыхлению глобул, поэтому уменьшается одностадийно квантовый выход флуоресценции белка, вращательная диффузия молекул альбумина, а значит, одностадийно увеличивается r . При взаимодействии белка с катионами ЦТАБ, происходит сильная денатурация, поэтому квантовый выход флуоресценции альбумина сильно уменьшается (по сравнению с $pH < pI$), как и вращательная диффузия молекул альбумина, а значит сильно увеличивается r .

Таким образом, денатурация альбумина под действием ДСН проходит более глубоко при pH , меньших pI белка, а денатурация альбумина под действием ЦТАБ проходит более глубоко при pH , больших pI белка.

Основные результаты и выводы работы

1. Методами флуоресцентного анализа по оценке собственной белковой триптофановой флуоресценции сывороточного альбумина человека исследован механизм денатурации этого белка под действием ионных детергентов: анионного - додецилсульфата натрия (ДСН) и катионного - цетилтриметиламмонийбромида (ЦТАБ) при различных значениях рН.

2. Зарегистрировано, что интенсивность в максимуме спектра триптофановой флуоресценции альбумина, гидродинамический радиус Эйнштейна молекул САЧ, степень анизотропии триптофановой флуоресценции сывороточного альбумина чувствительны как к перестройкам ближайшего окружения триптофана белка, так и к более отдаленным периферийным перестройкам глобулы белка. В то время как значения длины волны в максимуме спектра триптофановой флуоресценции альбумина отражают только перестройки ближайшего окружения триптофана белка.

3. По анализу триптофановой флуоресценции сывороточного альбумина человека показано, что денатурация белка под действием ДСН имеет 2-стадийный характер: первая стадия – разрыхление глобул, вторая – полное разворачивание аминокислотной цепи белка, в то время как денатурация под действием ЦТАБ отличается 1-стадийным характером (только разрыхление глобул).

- Для анионного детергента (ДСН) при рН, меньших изоэлектрической точки белка (рI 4,7), денатурация альбумина проходит через обе стадии, а при рН, больших изоэлектрической точки белка, денатурация альбумина проходит слабо и останавливается на первой стадии.
- Для катионного детергента ЦТАБ более глубокая денатурация альбумина происходит при рН, больших рI белка, тогда как менее глубокая денатурация альбумина происходит при рН, меньших рI белка.

Список цитируемой литературы

1. Степанов В.М. Молекулярная биология. Структура и функции белков. Москва: Издательство Московского университета, 2005.
2. Остерман Л.А. Методы исследования белков и нуклеиновых кислот: электрофорез и ультрацентрифугирование (практическое пособие). М.: Наука, 1981
3. Левшин Л.В., Салецкий А.М. Оптические методы исследования молекулярных систем. Ч.1. Молекулярная спектроскопия. Москва: Издательство Московского университета, 1994.
4. Поверхностные явления и поверхностно-активные вещества. Справочник под ред. А.А. Абрамзона, Е.Д. Щукина. Л., 1994
5. Partha Hazra, Debdeep Chakrabarty, Anjan Charaborty, and Nilmoni Sarkar. Probing protein-surfactant interaction by steady state and time-resolved fluorescence spectroscopy. *Biochemical research communications* 314 (2004) 543-549.
6. Досон Р.И. и др. Справочник биохимика. М.: Мир, 1991.
7. Финкельштейн А.В., Птицын О.Б., Физика белка. Курс лекций. М.: Книжный Дом Университет, 2002.
8. А. Н. Баранов, И. М. Власова, В. Е. Микрин, А. М. Салецкий. Лазерная корреляционная спектроскопия процессов денатурации сывороточного альбумина. *Журнал прикладной спектроскопии*, V. 71 (2000), № 6, с. 831-835.
9. E.L. Gelamo, M. Tabak 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. X. Diaz, E. Abuin, E. Llssi 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.

11. Sunil Jain, C. Vijaya Kumar, Devendra S. Kalonia Protein-Peptide Interactions as Probed by Tryptophan Fluorescence: Serum Albumins and Enkephalin Metabolites. *Pharmaceutical Research*, Vol. 9, № 8, 1992, 990-992.
12. Sebnem Ercelen, Andrey S. Klymchenko, Alexander P. Demchenko Novel two-color fluorescence probe with extreme specificity to bovine serum albumine. *FEBS Letters* 538 (2003), 25-28.
13. Shashank Deep, Jagdish C. Ahluwalia Interaction Of Bovine Serum Albumin With Anionic Surfactants. *Physical Chemistry Chemical Physics*, V. 3, № 20 (2001), 4583-4591.
14. Dong-Hui Li, Quing-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.
15. David Li Zeng Investigation of protein surfactant interactions in aqueous solutions. A Dissertation submitted in Partial Fulfilment of the Requirements for the Degree of Doctor of Philosophy at University of Connecticut, 1997.
16. J.K. Amisha Kamal, Digambar V. Behere Spectroscopic studies on human serum albumin and methemalbumin: optical, steady-state, and pico-second time-resolved fluorescence studies, and kinetic of substrate oxidation by methemalbumin. *J Biol Inorg Chem* 7 (2002), 273-283.
17. Michelle L. Gee, Levie Lensen, Trevor A. Smith, Colin A. Sholes Time-resolved evanescent wave-induced fluorescence anisotropy for the determination for molecular conformational changes of proteins at an interface. *Eur Biophys J* 33 (2004), 130-139.
18. Bidisa Sengupta and Pradeep K. Sengupta The interaction of quersitin with human serum albumin: fluorescence spectroscopic studies. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 299(2002) 400-403.
19. C.E. Bigelow Biological Applications Of Confocal Fluorescence Polarization Microscopy. *Disertation Abstracts International* (2005), V 66, № 3, 1530

20. H. Yamini Shrivastava, Balachandran Unni Nair. A fluorescence-based assay for nanogram quantification of proteins using a protein binding ligant. *Anal bioanal Chem* (2003) 375: 169-174.
21. 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.
22. Michael Dockal, Daniel C. Carter, and Florian Rüker. Conformational transitions of the three recombinant domains of human serum albumin depending on pH. *The Journal of Biological Chemistry* (2000), vol. 275, № 5, 3042-3050
23. 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* 2003, vol. 24, No 1.
24. S.M.T. Shaikh, J. Seetharamappa, P.B. Kandagal, D.H. Manjunatha,, S.Ashoka. Spectroscopic investigations on the mechanism of interactions of bioactive dye with bovine serum albumin. *Dyes and pigments* (2006) 1- 7.
25. Liliana Birla, Ana-Maria Cristian, Michaela Hillebrand. Absorption and steady state fluorescence study of interaction between eosin and bovine serum albumin. *Spectrochimica Acta Part A* 60 (2004) 551-556.
26. Helen Lottin, Claude Motta, Gilles Simard. Differential effect of glycerol and sphingolipolysis on human high-density lipoprotein fluidity. *Biochimica et biophysica Acta* 1301 (1996) 127-132.
27. Tricia A Cregger. Adsorption of biopolymers human serum albumin and human gamma globulin to well-defined surfaces of self-assembled monolayers. A Dissertation presented to The Graduate Faculty of the University of Akron in Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree of Doctor of Philosophy 2002.
28. David L. Andrews, Philip Allcock. Polarisation analysis of biomolecular excitations mediated by energy transfer: A common theoretical framework for fluorescence migration and sequential Raman scattering. *Chemical Physics* 198 (1995) 35-51.

29. Iren Bardos-Nagy , Rita Galantai, Judit Fidy. Effect of trehalose in low concentration on the binding and transport of porphyrins in liposome-human serum albumin system. *Biochimica et Biophysica Acta* 1512 (2001) 125-134
30. А.Н. Кукушкина, С.Р. Деркач, Б.М. Ужинов, С.М. Левачев, М.А. Сакварелидзе. Взаимодействие бычьего сывороточного альбумина с катионными поверхностно-активными веществами по данным флуоресценции. *Известия КГТУ № 13 (2008 год)*
31. Zhang W., Liu H., Chen J. Forward and backward extraction of BSA using mixed reverse micellar system of CTAB and alkyl halides / W. Zhang, H. Liu, J. Chen // *Biochemical Engineering J.* - 2002. - V. 2. - № 1. - P. 1-5.

*