

Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова
физический факультет
кафедра общей физики

ДИПЛОМНАЯ РАБОТА
студента 605 группы
Панчишина Андрея Ивановича

**ДЕНАТУРАЦИЯ СЫВОРОТОЧНЫХ АЛЬБУМИНОВ ПОД ДЕЙСТВИЕМ
ИОННОГО ДЕТЕРГЕНТА ЦЕТИЛТРИМЕТИЛАММОНИЙБРОМИДА**

Научный руководитель:
кандидат физ.-мат. наук, ст.преп. Власова И.М.

Допущен к защите
«23» «декабря» 2011 года
Зав. каф. общей физики
профессор _____ А.М. Салецкий

Москва-2011

Оглавление

Введение	4
Глава 1. Применение оптических методов исследования для анализа структуры и свойств белков при их взаимодействиях с детергентами (литературный обзор)	6
§1.1. Строение белковых молекул и их свойства.....	6
§1.2. Ионные детергенты.....	8
§1.3. Основы спектроскопии комбинационного рассеяния света.....	9
§1.4. Применение КР – спектроскопии в исследованиях белковых макромолекул.....	13
§1.5. Физические основы спектров флуоресценции.....	17
§1.6. Применение флуоресцентного анализа в исследованиях структуры и свойств молекул белков.....	19
Глава 2. Методическая часть экспериментов	22
§2.1. Приготовление растворов сывороточного альбумина человека и ЦТАБ для изучения денатурации белка методом КР – спектроскопии.....	22
§2.2. Приготовление растворов бычьего сывороточного альбумина и ЦТАБ для изучения денатурации белка методами флуоресцентной спектроскопии.....	22
§2.3. Методика экспериментов на КР – спектрометре для исследования денатурации сывороточного альбумина человека под действием ЦТАБ.....	22
§2.4. Методика экспериментов на спектрофлуориметре для изучения денатурации бычьего сывороточного альбумина под действием ЦТАБ.....	23
Глава 3. Исследование методами КР – спектроскопии вторичной структуры сывороточного альбумина человека при денатурации под действием ЦТАБ при различных значениях рН (собственные результаты и их обсуждение)	24
§3.1. Исследование КР – спектров растворов сывороточного альбумина человека с различными концентрациями ЦТАБ при различных значениях рН.....	24
§3.2. Определение содержания α -спиральных участков во вторичной структуре сывороточного альбумина человека при денатурации под действием ЦТАБ при различных значениях рН.....	29

Глава 4. Исследование методами флуоресцентного анализа денатурации бычьего сывороточного альбумина под действием ЦТАБ при различных значениях pH (собственные результаты и их обсуждение).....	33
§4.1. Исследование триптофановой флуоресценции бычьего сывороточного альбумина при денатурации под действием ЦТАБ при различных значениях pH.....	33
§4.2. Определение методом поляризованной триптофановой флуоресценции параметров вращательной диффузии молекул бычьего сывороточного альбумина при денатурации под действием ЦТАБ при различных значениях pH.....	39
Основные результаты и выводы работы.....	49
Список цитируемой литературы.....	50

Введение

Многие биологические и фармацевтические системы содержат белки и детергенты. Детергенты представляют собой органические амфифильные соединения, молекулы которых имеют гидрофильные и гидрофобные участки.

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

Благодаря высокой поверхностной активности и способности к растворению белков и липидов, а также способности вызывать диссоциацию и денатурацию белков, инактивацию вирусов и токсинов именно ионные детергенты широко применяются для приготовления медицинских фармацевтических препаратов (например, бактерицидных и дезинфицирующих), а также дерматологических и косметических средств.

Одним из широко применяющихся детергентов в медицинских, косметических и фармацевтических исследованиях является катионный детергент цетилтриметиламмонийбромид (ЦТАБ).

ЦТАБ проявляет бактерицидные свойства, при щелочных значениях pH он активен против грамположительных и грамотрицательных бактерий. В биохимических исследованиях ЦТАБ используется для увеличения клеточной проницаемости для субстратов при изучении ферментов. При определенных концентрациях ЦТАБ является денатурирующим белки детергентом.

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

Представляет интерес изучить денатурацию двух типов сывороточных альбуминов (человека и быка) – транспортных белков плазмы крови – под действием ЦТАБ. Данные два типа сывороточных альбуминов имеют похожую структуру в связи с их принадлежностью к одному гомологичному семейству белков.

Сывороточные альбумины представляют собой небольшие глобулярные белки: сывороточный альбумин человека – молекулярная масса 66,4 кДа, изоэлектрическая точка

pI 4,7, бычий сывороточный альбумин – молекулярная масса 64 кДа, изоэлектрическая точка pI 4,9.

Молекулы сывороточных альбуминов состоят из одной аминокислотной цепочки: альбумин человека – из 585 аминокислотных остатков, бычий альбумин – из 582 аминокислотных остатков. Во вторичной структуре оба белка имеют примерно одинаковое содержание регулярных структур при соответствующих значениях pH. Третичная структура обоих типов сывороточных альбуминов определяется тремя доменами.

Сывороточный альбумин человека и альбумины у разных видов животных практически гомологичны и отличаются лишь некоторыми аминокислотными остатками. В частности, сывороточный альбумин человека содержит один остаток триптофана Trp 214, а бычий сывороточный альбумин содержит два остатка триптофана – Trp 135 и Trp 214.

Выбор сывороточных альбуминов человека и быка в данной работе как модельных белков обусловлен важной ролью этих белков в плазме крови, определяемой широким разнообразием функций этих белков: альбумины обеспечивают коллоидно-осмотическое давление крови, альбумины регулируют вместе с другими белками плазмы pH крови, альбумины служат переносчиками различных метаболитов и лекарственных препаратов.

Целью данной работы является исследование с применением спектроскопических методов денатурации двух типов сывороточных альбуминов под действием катионного детергента ЦТАБ в растворах с различными значениями pH. В рамках данной цели поставлены две задачи: первая – методом КР – спектроскопии провести изучение денатурации сывороточного альбумина человека под действием ЦТАБ и вторая – методом флуоресцентного анализа провести исследование денатурации бычьего сывороточного альбумина под действием ЦТАБ, тем самым, показав эффективность использования двух разных спектроскопических методов для достижения поставленной цели.

Глава 1. Применение оптических методов исследования для анализа структуры и свойств белков при их взаимодействиях с детергентами (литературный обзор)

§1.1. Строение белковых молекул и их свойства

Как известно, основными биомолекулами, присутствующими в клетках и тканях высших животных, являются нуклеиновые кислоты (ДНК, РНК), белки, полисахариды и липиды. Эти сложные макромолекулы построены из простых биомолекул. В белках мономерными единицами служат L- α -аминокислоты. Белки являются биополимерами, поскольку они состоят из повторяющихся строительных блоков. Белки помимо аминокислот могут содержать и другие компоненты, однако структура белков, а, следовательно, и их биологические свойства определяются в основном аминокислотным составом, порядком чередования аминокислот в полипептидной цепи и, как следствие, их взаимным пространственным расположением [1].

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.



В природе существует около 300 аминокислот, однако в белках всех форм жизни обнаружены только 20 из них.

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: $\text{R-COOH} \leftrightarrow \text{R-COO}^- + \text{H}^+$ и $\text{R-NH}_3^+ \leftrightarrow \text{R-NH}_2 + \text{H}^+$.

Для белков существует определенное значение pH , соответствующее изоэлектрической точке белка pI . Заряд белка меняется в зависимости от pH . При pH , равном pI , молекулы белка в целом не несут электрического заряда. 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 ковалентных связей (пептидных и дисульфидных) и тремя классами слабых нековалентных связей (водородных, гидрофобных, электростатических) [1].

Различают следующие уровни структурной организации белков [1]:

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 (различают глобулярные или фибриллярные белки);
4. четвертичная структура – возникает в случае, если белок состоит из двух и более полипептидных цепей, связанных между собой нековалентными связями; подобные белки называют олигомерами.

Белки играют центральную роль в процессах жизнедеятельности клеток и в формировании клеточных структур.

В данной работе в качестве объектов исследования выбраны сывороточные альбумины – бычий сывороточный альбумин и сывороточный альбумин человека.

Сывороточный альбумин человека представляет собой глобулярный белок (66,4 кДа, изоэлектрическая точка pI 4,7), выполняющий в плазме крови человека транспортные функции.

Молекула альбумина человека состоит из одной аминокислотной цепочки из 585 остатков. При физиологическом значении pH около 5,0 – 6,7 % аминокислотных остатков альбумина человека уложены в α -спирали, оставшаяся доля вторичной структуры приходится на хаотическую укладку, а доля β -складчатых структур совсем незначительна и менее 1 – 2 %.

Третичная структура сывороточного альбумина человека состоит из 3 практически одинаковых доменов. Центральная область каждого домена образована гидрофобными остатками, а внешняя зона каждого домена – из гидрофильных остатков. Вероятно, домен является «эволюционным предком» альбуминов всех млекопитающих. На сегодняшний день существует модель третичной структуры альбумина человека в виде «сердца», субдомены в этой модели расположены под углом друг к другу, и домены соединены большими спирализованными участками.

Бычий сывороточный альбумин – глобулярный белок семейства альбуминов, выполняющий в плазме крови транспортные функции, его изоэлектрическая точка pI 4,9, молекулярная масса 64 кДа. Первичная структура бычьего альбумина состоит из 582

аминокислотных остатков. Вторичная структура бычьего альбумина в зависимости от рН состоит из 50 – 68 % α -спиралей, 3 % β -складчатых слоев и 29 – 47 % участков хаотической укладки. Третичная структура определяется тремя доменами.

Известно, что сывороточный альбумин человека и альбумины у разных видов животных практически гомологичны и отличаются лишь некоторыми аминокислотными остатками. В частности, сывороточный альбумин человека содержит один остаток триптофана Trp 214, а бычий сывороточный альбумин содержит два остатка триптофана – Trp 135 и Trp 214.

Уникальная способность молекул сывороточных альбуминов связывать обширный круг органических и неорганических лигандов определяет одну из основных функций этих белков – транспорт физиологических метаболитов.

Выбор сывороточных альбуминов человека и быка в данной работе как модельных белков обусловлен важной ролью этих белков в плазме крови, определяемой широким разнообразием функций этих белков: альбумины, во-первых, обеспечивают коллоидно-осмотическое давление крови, от которого в значительной степени зависит обмен воды и растворенных в ней веществ между кровью и тканевой жидкостью, во-вторых, регулируют вместе с другими белками плазмы рН крови благодаря наличию буферных свойств, в-третьих, влияют на вязкость крови, в-четвертых, служат переносчиками гормонов, минеральных веществ и лекарственных препаратов [2].

§1.2. Ионные детергенты

Многие биологические и фармацевтические системы содержат белки и детергенты (или поверхностно-активные вещества ПАВ). Детергенты – это поверхностно-активные вещества, концентрирующиеся на поверхности раздела фаз, вызывающие снижение поверхностного натяжения.

Детергенты представляют собой органические амфифильные соединения, молекулы которых имеют гидрофильные и гидрофобные участки. На границе фаз молекулы детергентов ориентируются энергетически наиболее выгодным образом: гидрофильные (полярные) группы – в сторону полярной (обычно водной) фазы, гидрофобные (длинные углеводородные цепи) – в сторону неполярной фазы.

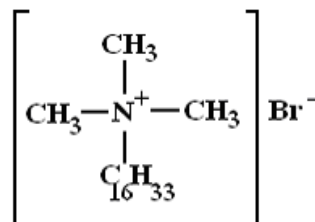
По типу гидрофильных групп различают несколько групп детергентов – ионные и неионные [3]. Ионные детергенты диссоциируют в растворе на ионы, одни из которых поверхностно активны, а другие (противоионы) – нет. В зависимости от знака заряда

поверхностно-активного иона ионные детергенты делят на анионные, катионные и амфотерные.

В водных растворах благодаря межмолекулярным силам происходит ассоциация молекул детергентов с образованием мицелл (при концентрациях, больших критической концентрации мицеллообразования ККМ). В мицеллах в водной среде углеводородные цепи обращены друг к другу и образуют нечто вроде капли неполярного вещества, а ионные группы обращены в воду и экранируют углеводородную каплю. В неполярной среде мицеллы имеют обратное строение (обратные мицеллы). Равновесие между мицеллами и отдельными молекулами зависит от концентрации, температуры, величины рН, наличия электролитов в растворе.

Основную долю в фармацевтических, косметических, медицинских и биохимических исследованиях составляют ионные детергенты. Благодаря высокой поверхностной активности и способности к растворению белков и липидов, а также способности вызывать диссоциацию и денатурацию белков, инактивацию вирусов и токсинов именно ионные детергенты широко применяются для приготовления медицинских фармацевтических препаратов (например, бактерицидных), а также косметических средств.

Одним из широко применяющихся детергентов в медицинских, косметических и фармацевтических исследованиях является катионный детергент цетилтриметиламмонийбромид (ЦТАБ).



Цетилтриметиламмонийбромид
(цетавлон, цетримид, квамоний, ЦТАБ)

ЦТАБ проявляет бактерицидные свойства, при щелочных значениях рН он активен против грамположительных и грамотрицательных бактерий. При определенных концентрациях ЦТАБ является денатурирующим белковые молекулы детергентом.

§1.3. Основы спектроскопии комбинационного рассеяния света

Колебательные спектры молекул экспериментально изучаются методами инфракрасной (ИК) спектроскопии и методами спектроскопии комбинационного рассеяния (КР) света. Эти спектры связаны с переходами между колебательными

энергетическими состояниями или, в классической интерпретации, с колебаниями атомных ядер относительно равновесных положений и определяются строением молекул.

Колебательные спектры являются чрезвычайно специфическими и чувствительными характеристиками молекул, чем и объясняется широкое применение их в биологических исследованиях. Колебательные частоты имеют порядок 10^{12} - 10^{14} Гц и совпадают с ИК диапазоном частот электромагнитного излучения.

Эффект комбинационного рассеяния света веществом был экспериментально открыт Л. И. Мандельштамом и Г. С. Ландсбергом на кристаллическом кварце в СССР и независимо индийскими учеными Ч.В. Раманом и К-С. Кришнаном на жидкости в 1928 г.

Достоинством методов колебательной спектроскопии является то, что они допускают исследование практически любого органического вещества в любом состоянии – жидкости, растворах, кристаллах или аморфной фазе. Для получения спектра требуются миллиграммовые образцы, причем вещество обычно полностью сохраняется в неизменном состоянии.

Колебательный спектр даёт информацию о расположении атомных ядер и химических связей в молекуле, а также о взаимодействии молекулы с её ближайшим окружением [4, 5].

ИК – поглощение происходит тогда, когда частота излучения совпадает с частотой нормального колебания молекулы, при котором дипольный момент молекулы изменяется во времени. Комбинационное рассеяние КР происходит тогда, когда изменяется поляризуемость молекулы. Из-за фундаментальных различий процессов, управляющих ИК – поглощением и комбинационным рассеянием, в спектрах появляются различные полосы или полосы различной интенсивности. Частоты, наблюдаемые в КР – спектрах, не всегда соответствуют частотам в ИК – спектрах. Информация, которую дают два этих метода, зависит от симметрии и полярности молекул. Симметричные колебания и неполярные группы легче изучать методом КР, а антисимметричные колебания и полярные группы – с помощью ИК – спектроскопии.

КР – спектроскопия изучает колебательные спектры молекул. Как указывалось выше, эти спектры связаны с переходами между колебательными энергетическими состояниями или, в классической интерпретации, с колебаниями атомных ядер относительно равновесных положений и определяются строением молекулы. Полную энергию молекулы в первом приближении можно разделить на три составляющие, связанные с вращением молекулы как целого, с колебаниями образующих её атомов и с электронным движением в молекуле. В приближении Борна – Оппенгеймера полная энергия молекулы $E = E_e + E_v + E_r$ (где E_e – связана с движением электронов; E_v –

относится к колебательному движению ядер; E_r – учитывает вращательное движение ядерного скелета).

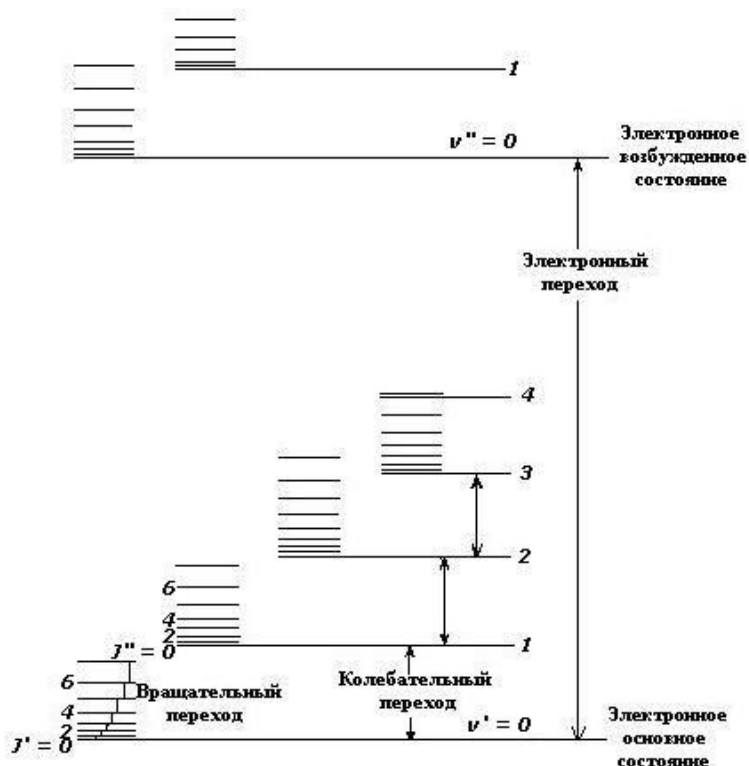


Рис. 1.1. Энергетические уровни двухатомной молекулы.

Вращательные уровни энергии расположены сравнительно близко друг к другу, и переходы между ними наблюдаются в низкочастотной (длинноволновой) области, чисто вращательные спектры лежат между 1 см^{-1} (10^4 мкм) и 10^2 см^{-1} (10^2 мкм). Колебательные уровни энергии отстоят друг от друга дальше, и переходы наблюдаются при более высоких частотах (более коротких длинах волн), чем вращательные переходы. Колебательные спектры лежат в области между 10^2 см^{-1} (10^2 мкм) и 10^4 см^{-1} (1 мкм). Электронные уровни энергии далеки друг от друга, и электронные спектры наблюдаются в области между 10^4 см^{-1} (1 мкм) и 10^6 см^{-1} (10^{-2} мкм). Следовательно, чисто вращательные спектры изучаются в микроволновой и дальней ИК–области, чисто колебательные спектры – в ИК – области, электронные спектры – в видимой и УФ – областях. На рис. 1.1 показаны уровни энергии и возможные переходы для двухатомной молекулы.

Происхождение спектров КР можно объяснить с помощью классической теории. В случае комбинационного рассеяния падающее излучение взаимодействует с молекулами и неупруго рассеивается, т.е. рассеянное излучение имеет частоту, отличную от частоты падающего излучения. Падающая на молекулу световая волна представляет собой электромагнитное поле $E_{пад}$ с частотой колебаний ν , которое можно записать в виде

$$E_{nad} = E_0 \cos 2\pi \nu t,$$

где E_0 – амплитуда, t – время. Взаимодействие этого электромагнитного поля с поляризуемым электронным облаком молекулы индуцирует диполь. Если, например, двухатомная молекула помещается в это световое поле, то индуцируется дипольный момент P :

$$P = \alpha \cdot E_{nad} = \alpha \cdot E_0 \cos 2\pi \nu t,$$

где α – поляризуемость. Эффект комбинационного рассеяния возникает вследствие зависимости поляризуемости от нормальных колебаний молекулы. Если молекула колеблется с частотой ν_l , то смещение ядер q определяется следующим образом:

$$q = q_0 \cdot \cos 2\pi \nu_l t,$$

где q_0 – колебательная амплитуда. При малых колебаниях α линейно зависит от q :

$$\alpha = \alpha_0 + (\partial\alpha/\partial q)_0 \cdot q.$$

В данном выражении α_0 – поляризуемость для равновесной конфигурации, $(\partial\alpha/\partial q)_0$ – производная поляризуемости по смещению в точке равновесия.

Получаем

$$P = \alpha \cdot E_0 \cos 2\pi \nu t = \alpha_0 \cdot E_0 \cos 2\pi \nu t + (\partial\alpha/\partial q)_0 \cdot q_0 \cdot E_0 \cos 2\pi \nu t \cdot \cos 2\pi \nu_l t = \alpha_0 \cdot E_0 \cos 2\pi \nu t + 1/2 (\partial\alpha/\partial q)_0 \cdot q_0 \cdot E_0 \cdot \{ \cos [2\pi(\nu + \nu_l)t] + \cos [2\pi(\nu - \nu_l)t] \}$$

Согласно классической теории, первый член этого выражения описывает осциллирующий диполь, который даёт излучение с частотой ν (рэлеевское рассеяние), а второй член данного выражения объясняет комбинационное рассеяние с частотами $\nu + \nu_l$ (антистоксово) и $\nu - \nu_l$ (стоксово). Следовательно, если поляризуемость при колебании не меняется, т.е. $(\partial\alpha/\partial q)_0$ равна нулю, то второй член этого выражения исчезает, и молекула неактивна в комбинационном рассеянии.

В случае стоксова КР молекула, рассеивая свет с частотой $\nu - \nu_l$, возбуждается из колебательного энергетического состояния $V=0$ в состояние $V=1$. При антистоксовом рассеянии с частотой $\nu + \nu_l$ молекула, находившаяся в исходном состоянии $V=1$, переходит в состояние $V=0$. Поскольку заселенность молекулами состояния $V=0$ больше, чем состояния $V=1$ (закон распределения Максвелла-Больцмана), интенсивность стоксовых линий всегда выше, чем антистоксовых, поэтому спектроскопия КР обычно измеряет стоксовы линии.

В спектрах комбинационного рассеяния волновое число w , соответствующее разности колебательных спектров, представляет собой абсолютную величину разности волновых чисел возбуждающего излучения w_0 и рассеянного излучения w_{pac} :

$$w = (E' - E'')/hc = \nu/c = |w_0 - w_{pac}|,$$

где E' – более высокий энергетический уровень, E'' – более низкий энергетический уровень (рис. 1.2).

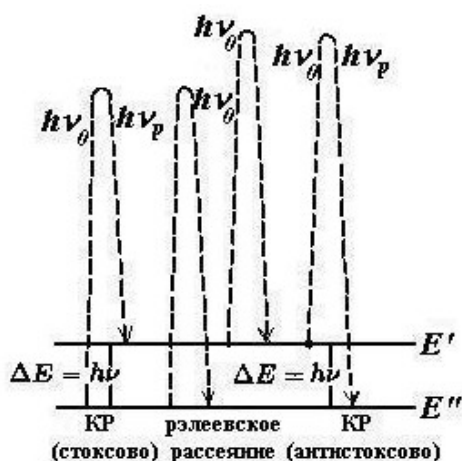


Рис. 1.2. Схема возникновения линий рэлеевского и комбинационного рассеяния.

Квантовомеханическая схема комбинационного рассеяния следующая: молекула, взаимодействуя с фотоном монохроматического излучения $h\nu_0 = hcw_0$, сначала возбуждается до неустойчивого виртуального состояния. Затем молекула может отдать этот фотон, не обмениваясь с ним энергией, и вернуться в исходное энергетическое состояние (рэлеевское рассеяние света). Но, возможно, заимствование молекулой части энергии фотона (отдается фотон меньшей энергии), и молекула переходит на более высокий по сравнению с исходным энергетический уровень E' (стоксово КР). Если же молекула уже находилась в возбужденном состоянии E' , то при взаимодействии с фотоном она может отдать часть своей энергии, рассеивая фотон большей энергии, а сама молекула при этом переходит на более низкий энергетический уровень E'' (антистоксово КР).

§1.4. Применение КР – спектроскопии в исследованиях белковых макромолекул

В биологических исследованиях для идентификации биологических соединений уже давно широко вошел в практику структурно-групповой анализ по колебательным спектрам (как КР – спектрам, так и ИК – спектрам), основанный на концепции групповых или характеристических частот [5-10].

Концепция групповых частот используется не только при изучении простых органических соединений, но и в структурных исследованиях биологических макромолекул, так как для некоторых нормальных колебаний частоты сравнимы с групповыми частотами более простых молекул, например, для групп C=C, C=O, O-H, N-H и т.п. Групповые частоты найдены для большого числа органических соединений.

Концепция групповых (характеристических) частот основывается на предположении, что колебания какой-то конкретной группы атомов не зависят от остальной части молекулы, и эту группу можно рассматривать как «независимый осциллятор».

Существует ряд преимуществ КР – спектроскопии по сравнению с ИК – спектроскопией [4-6]. Например, только с помощью КР – спектроскопии можно определить валентные колебания различного типа групп С=С, которые находятся в области 1640 см^{-1} и часто бывают слабыми в ИК – спектрах. Действительно, когда замещение при этой связи симметрично, то правила отбора запрещают соответствующий переход в ИК – спектре, но именно этот тип симметричного колебания с симметричными распределениями заряда очень сильно проявляется в КР – спектре.

Спектроскопия КР имеет явное преимущество перед ИК – спектроскопией также при изучении природы связей с атомом серы. Валентное колебание SH при приблизительно 2580 см^{-1} слабо проявляется в ИК – спектре, но интенсивно в КР – спектре. Интенсивны также в спектрах КР колебания C-S, находящиеся между 570 и 785 см^{-1} и часто проявляющиеся в виде дублетов или мультиплетов, что объясняется существованием поворотных изомеров. В органических сульфидах проявляются как симметричные, так и антисимметричные валентные колебания C-S-C в области $570 - 800\text{ см}^{-1}$. Органические дисульфиды в большинстве случаев имеют менее сложный спектр в области $700 - 800\text{ см}^{-1}$, чем соответствующие органические сульфиды. Полоса валентного колебания S-S находится между 500 и 550 см^{-1} .

Спектроскопия КР широко применяется также при идентификации ароматических структур. Тип замещения в бензольном кольце характеризуется валентными колебаниями СН в области 3000 см^{-1} , полосами обертонов и составных частот в области $2000 - 1600\text{ см}^{-1}$, полосами деформационных колебаний цикла при 1500 и 1600 см^{-1} и частотами в интервале $900 - 700\text{ см}^{-1}$, соответствующими неплоским деформационным колебаниям СН.

Широкое распространение спектроскопия КР получила в исследованиях биологических систем [10]. Применение КР – спектроскопии в биологии имеет ряд положительных аспектов, таких как возможность использовать водные растворы, возможность получать спектры всех фаз, чувствительность метода к конформационным изменениям, возможность исследовать образцы малого количества.

Для изучения белков и их конформаций колебательная КР – спектроскопия применяется давно. В спектрах КР используются в основном колебания Амид-I и Амид-III, это колебания основной полипептидной цепи. Поскольку частоты этих колебаний зависят от углов, свойственных α -спирали и складчатой β -структуре, а для хаотического

клубка известен интервал их значений, то по указанным колебаниям легко можно определить конформацию белка в растворе. В колебания Амид-I основной вклад дает валентное колебание C=O в пептидной связи, тогда как в Амид-III – плоскостное деформационное колебание N-H в пептидной связи. Полосы КР пептидных групп белков следующие: 1) Амид-I – 1645 – 1655 см⁻¹ (α-спираль), 1665 – 1680 см⁻¹ (β-структура), 1660 – 1670 см⁻¹ (хаотический клубок); 2) Амид-III – 1270 – 1300 см⁻¹ (α-спираль), 1229 – 1240 см⁻¹ (β-структура), 1243 – 1260 см⁻¹ (хаотический клубок). В случае белков в одной системе обычно сосуществуют разные конформеры, это неизбежно приводит к усложнению спектров. Существуют подходы, рассматривающие систему уравнений для количественного определения долей α-спирали, β-структуры и хаотического клубка в белке.

В белке, находящемся в той или иной конформации, обычно образуются характерные для каждой из них дисульфидные (-S-S-) связи, и определение конформации при данной связи часто является важным этапом исследования при расшифровке структуры белка. КР – спектроскопия играет в этих исследованиях важную роль, поскольку атомы серы, обладающие высокой поляризуемостью, дают интенсивное комбинационное рассеяние. Дисульфидные связи дают интенсивную линию в спектре КР при 500 – 550 см⁻¹, обусловленную валентным -S-S- колебанием. Изучение частот этого колебания позволяет исследовать конформационные перестройки белков под воздействием различных реагентов, например, кислотно-индуцированную изомеризацию белка [11]. Изучению вторичной структуры белков в медицинских исследованиях посвящены работы [12, 13].

Метод КР позволяет исследовать изменение конформации белка. С помощью КР – спектроскопии исследованы конформационные изменения протопорфирина гемоглобина при артериальной гипертензии, приводящие к уменьшению парциального давления кислорода в крови и увеличению парциального давления CO₂ [14].

Развитие комбинационной спектроскопии ближней инфракрасной области с Фурье – преобразованием расширило возможности применения данного метода в биомедицинских целях, т.к. работа в этой области спектра позволяет избегать флуоресценции биологических систем. Качественному и количественному исследованию гемоглобина крови методом КР – спектроскопии ближней инфракрасной области с Фурье – преобразованием посвящена работа [15].

С помощью спектроскопии КР можно изучать конформацию белков *in situ*. Уникальные возможности спектроскопии КР демонстрируют результаты исследования белков в хрусталике глаза. Различия в спектре КР в разных частях хрусталика отражают

изменения относительных концентрациях различных белков. Спектральные исследования хрусталиков глаз имеют значение при изучении образования катаракты, при непосредственных экспериментах можно обнаружить предкатарактальные явления [16].

Методом КР – спектроскопии изучается взаимодействие лекарственных препаратов с белковыми молекулами [17, 18]. Например, в [17] выяснены аминокислотные сайты связывания для камптотецина, важного противоопухолевого препарата, на молекулах сывороточного альбумина человека.

При изучении биологических систем [19] часто используется метод резонансного КР (РКР), основанный на попадании возбуждающей линии в интервал частот, соответствующий полосе электронного поглощения. На качественном уровне можно сказать, что эти спектры даёт только та часть молекулы, которая ответственна за электронный переход. Для наблюдения спектров резонансного КР в белках необходимо присутствие хромофорной группы. Увеличение интенсивности вследствие эффекта РКР обеспечивает селективность спектральной регистрации и позволяет получать колебательный спектр хромофора, который является одним из компонентов биологической макромолекулы (поскольку в спектре отсутствуют линии, обусловленные белковой частью или растворителем).

Описаны в [7] РКР – спектры оксигемоглобина (HbO_2), дезоксигемоглобина (Hb) и карбоксигемоглобина (HbCO), по различию положения рамановских линий и их интенсивностей создана модель, описывающая состояние железа гема при связывании различных лигандов. Создана модель, связывающая каждую линию в спектре РКР гема в диапазоне $1100 - 1700 \text{ см}^{-1}$ со свойствами атома железа, его спиновым состоянием и состоянием окисления.

Широкое распространение КР – спектроскопия получила в медицинских исследованиях. Применение КР в медицине и гистохимической диагностике имеет ряд положительных аспектов, таких как, чувствительность к малейшим структурно-динамическим изменениям клеток, тканей, биологических жидкостей; возможность исследовать образцы малого количества; не возмущающий исследуемую систему способ измерения; возможность диагностики *in vivo* [20, 21].

КР – спектроскопия успешно применяется в медицинских гистохимических исследованиях и открывает в них большие перспективы, т.к. дает возможность диагностики по исследованию образцов малого количества. Например, КР – спектроскопия применяется для гистохимического анализа жировой ткани [21], причем гистохимический анализ *in vivo* возможен не только для поверхностных тканей, КР –

спектроскопия с использованием мощных лазеров (мощность больше 200 мВт) позволяет проникать в более глубокие слои.

КР – спектроскопия в диагностических целях применяется в различных областях онкологии. Например [22], КР – спектроскопия позволяет проводить раннюю диагностику новообразований ткани шейки матки по гистохимическим пробам.

Применению КР – спектроскопии в кардиологии для исследований ишемических и атеросклеротических заболеваний посвящены работы [23, 24], в них проведен биохимический и гистохимический (количественный и качественный) анализ компонентов атеросклеротических бляшек артерий.

§1.5. Физические основы спектров флуоресценции

Электронная спектроскопия связана с изучением энергетических переходов между различными электронными состояниями атомов и молекул. Электронные спектры многоатомных молекул исследуются обычно как спектры поглощения и как спектры люминесценции. Спектры поглощения возникают в результате переходов из основного электронного состояния в возбужденные за счёт поглощения квантов электромагнитного излучения, а спектры люминесценции – в результате перехода молекулы из возбужденного состояния в основное с испусканием электромагнитного излучения. В процессе люминесценции предусматривается предварительный перевод молекул в возбужденное состояние, например, облучением исследуемого вещества, в процессе которого происходит поглощение молекулами квантов излучения.

Свечение вещества, возникающее при переходе молекул из возбужденного состояния в основное, называют люминесценцией [4]. Если возбуждение происходило за счёт поглощения электромагнитного излучения в оптической области, то испускание излучения в процессе релаксации носит название фотолюминесценции.

Люминесценция (рис. 1.3) подразделяется на два вида (флуоресценцию и фосфоресценцию) в зависимости от характера электронного состояния, из которого молекулы переходят в основное состояние с испусканием электромагнитного излучения [4, 5].

При переходе с испусканием излучения между состояниями, имеющими одинаковую мультиплетность, наблюдается флуоресценция: обычно между синглетными первым возбужденным и основным состояниями $S_1 \rightarrow S_0$. Флуоресценция характеризуется отсутствием длительного «послесвечения».

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, характеризующемуся длительным «послесвечением».

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.

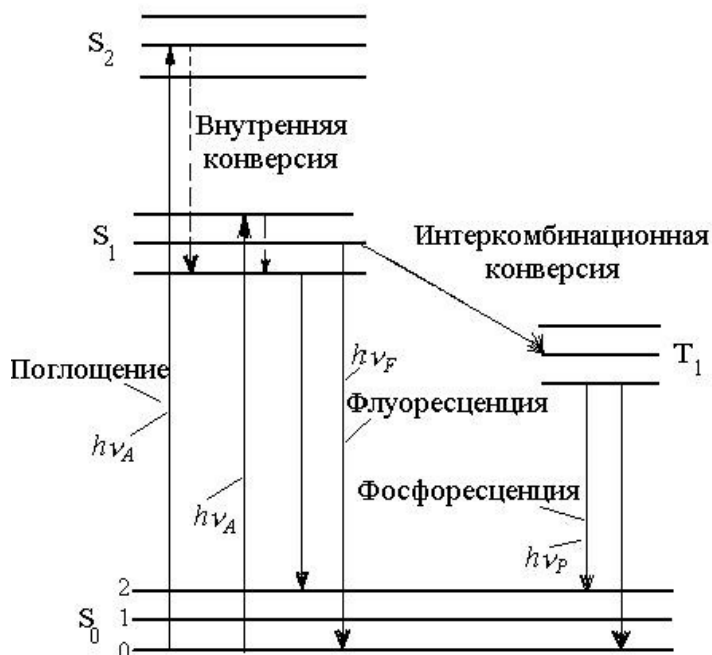


Рис. 1.3. Излучательные и безызлучательные переходы между состояниями одинаковой и различной мультиплетности.

Полоса флуоресценции смещена в область более низких частот по сравнению с полосами поглощения. Данное соотношение $\nu_{\text{погл}} > \nu_{\text{фл}}$ носит название закона Стокса-Ломмеля, а длинноволновое (красное) смещение полосы испускания относительно поглощаемой частоты называется стоксовым.

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

Выход люминесценции отражает эффективность преобразования веществом возбуждающего излучения в свет люминесценции.

Разделяют энергетический ($\Gamma = E_{исп}/E_{погл}$) и квантовый ($\gamma = N_{исп}/N_{погл}$) выходы люминесценции, где Γ - энергетический выход, $E_{исп}$ - испускаемая при люминесценции энергия, $E_{погл}$ - поглощенная энергия, γ - квантовый выход, $N_{исп}$ - число квантов люминесценции, испускаемых единицей объема вещества в единицу времени, $N_{погл}$ - число поглощенных фотонов возбуждающего излучения.

Спектры флуоресценции, как и электронные спектры поглощения, применяются для качественного и количественного анализа, для исследования структур веществ, при изучении физико-химических свойств растворов и т.д. Среди особенностей качественного флуоресцентного анализа, позволяющего по спектрам идентифицировать вещества, следует назвать ограниченность круга поддающихся такому анализу объектов. Чёткими, имеющими характерную структуру спектрами флуоресценции обладают немногие вещества. В большинстве случаев наблюдаются широкие, лишённые структуры спектральные полосы, которые для смеси веществ часто перекрываются и трудно разделяются.

Положение, форма полосы и интенсивность флуоресценции для соединений, способных к диссоциации и ионизации, могут зависеть от pH. Кислотность и основность могут различаться для основного и возбужденного состояний молекул, поэтому не всегда наблюдается соответствие изменений спектров поглощения и флуоресценции в зависимости от pH раствора.

Количественный анализ по спектрам флуоресценции основывается на прямо пропорциональной зависимости интенсивности флуоресценции от концентрации флуоресцирующего вещества в растворе.

§1.6. Применение флуоресцентного анализа в исследованиях структуры и свойств молекул белков

Изучение вида спектров флуоресценции, их интенсивности нашло широкое применение в медицинских и биологических исследованиях. Флуоресценция биологических объектов может быть собственной (первичная флуоресценция) или возникать за счёт добавления в анализируемую систему специальных веществ (меток, зондов, наномаркеров) или при химической модификации уже имеющихся веществ (вторичная флуоресценция).

Собственная флуоресценция простых белков обусловлена наличием ароматических аминокислот – фенилаланина, триптофана и тирозина. Максимумы флуоресценции фенилаланина, тирозина и триптофана имеют место при 282, 303, 348 нм соответственно при возбуждении в максимумах их поглощения (фенилаланин – 258 нм, тирозин – 276 нм, триптофан – 280 нм). Максимум флуоресценции триптофана варьирует от 330 до 350 нм в зависимости от локализации триптофана в белковой молекуле. Положение максимума флуоресценции триптофана может изменяться при варьировании рН среды от 340 до 350 нм.

Длинноволновые полосы поглощения и флуоресценции многих веществ, в том числе белков, нуклеиновых кислот, коферментов, при комнатной температуре представляют собой обычно пологие кривые с одним максимумом, по форме близкие к кривой нормального распределения [25].

Порфирины, хлорофилл, гликоген, пуриновые и пиримидиновые основания и нуклеиновые кислоты, ароматические аминокислоты и белки, а также многие другие биологически важные соединения, содержащие ароматические и гетероциклические кольца с системой сопряжённых двойных связей, обладают флуоресценцией, которая используется для количественного определения этих соединений.

Обнаружено [25], что положение максимума триптофановой флуоресценции различно у разных белков. В качестве примера, можно привести положение максимумов триптофановой флуоресценции (возбуждение 280 нм) ряда белков (в водных растворах): инсулин (304 нм), рибонуклеаза (304 нм), лизоцим (341 нм), трипсин (332 нм), трипсиноген (332 нм), химотрипсиноген (330 нм), сывороточный альбумин человека (339 нм), бычий сывороточный альбумин (330 нм), яичный альбумин (328 нм), пепсин (342 нм), фибриноген (337 нм) [25].

В [25] представлены зависимости положения максимума флуоресценции триптофановых остатков в белках (возбуждение 280 нм) от рН при комнатной температуре для многих белков.

Методы флуоресцентного анализа в исследованиях белков применяются для определения изменения вторичной структуры белков под влиянием внешних факторов [26], под воздействием лекарственных препаратов [27], для оценки окислительных повреждений белков [28], для исследования белковой денатурации [29], при диагностике заболеваний [30], в исследованиях белковых конъюгатов [31]. Динамика конформационных перестроек белковых молекул под действием денатурирующих агентов также изучается методами флуоресцентной спектроскопии как по собственной

триптофановой флуоресценции [32, 33], так и с помощью флуоресцентных зондов и меток (наномаркеров), связывающихся с белками [34, 35].

При изучении структуры и функций макромолекул белков широко используют вторичную флуоресценцию соединений, называемых флуоресцентными зондами и метками (наномаркерами). В качестве таких наномаркеров выбирают вещества, параметры флуоресценции которых резко меняются в зависимости от характеристики окружающей их среды: полярности, вязкости, поверхностного заряда. Зондовые наномаркеры бывают трёх типов: заряженные (1-анилинонафталин-8-сульфонат и др.); незаряженные, но обладающие значительным дипольным моментом (3-метоксибензантрон и др.); не имеющие ни заряда, ни значительного дипольного момента (ретинол, метилантрацен и др.).

Для исследования белков крови применяются флуоресцентные маркеры, анионные при физиологическом значении pH. Использование наномаркеров важно в медицинских диагностических целях: используя наномаркеры, изучались клетки крови – тромбоциты, эритроциты и лейкоциты – и специфические белки клеток крови [36].

Глава 2. Методическая часть экспериментов

§2.1. Приготовление растворов сывороточного альбумина человека и ЦТАБ для изучения денатурации белка методом КР – спектроскопии

Были приготовлены следующие буферные растворы: 0,1 М CH_3COOH – KOH , pH (3,0 – 5,0) и 0,1 М KH_2PO_4 – 0,1 М NaOH , pH (6,0 – 8,0).

В буферные растворы сывороточного альбумина человека (150 мкМ) при различных значениях pH (3,0 – 8,0) добавлялись различные концентрации ЦТАБ (0,5 мМ; 2,0 мМ; 4,0 мМ; 5 мМ; 7 мМ).

§2.2. Приготовление растворов бычьего сывороточного альбумина и ЦТАБ для изучения денатурации белка методами флуоресцентной спектроскопии

В буферные растворы бычьего сывороточного альбумина (5 мкМ) при различных значениях pH (3,5 – 8,0) добавлены различные концентрации ЦТАБ (0,5 – 7,0 мМ).

Для анализа вращательной диффузии молекул бычьего сывороточного альбумина в итоговые растворы добавлены различные концентрации сахарозы (0 – 200 мМ).

§2.3. Методика экспериментов на КР – спектрометре для исследования денатурации сывороточного альбумина человека под действием ЦТАБ

Исследования выполнены на КР – спектрометре с Фурье-преобразованием EQUINOX 55 с приставкой FRA-106 (Bruker), оборудованном InGaAs детектором, длина волны возбуждающего света 1064 нм (Nd-YAG лазер). Мощность возбуждающего лазера 230 мВт, измерения одного образца порядка 100 сканов (примерно 6 мин). Разрешение КР – спектра 2 см^{-1} . Спектры обработаны программой OPUS 4.2 (Bruker).

Проведены измерения КР – спектров следующих растворов:

1. растворов (pH 3,0 – 8,0) без белка и без ЦТАБ;
2. растворов (pH 3,0 – 8,0) с добавлением ЦТАБ (0,5 – 7,0 мМ), но без белка;
3. растворов (pH 3,0 – 8,0) с добавлением альбумина человека (150 мкМ), но без ЦТАБ;
4. растворов (pH 3,0 – 8,0), содержащих как ЦТАБ (0,5 – 7,0 мМ), так и альбумин человека (150 мкМ).

По этим измеренным спектрам растворов составлены две разности:

Δ_1 = спектры (3) - спектры (1) и Δ_2 = спектры (4) - спектры (2).

Δ_1 отражает строение нативных молекул сывороточного альбумина человека. За счёт составления Δ_1 вычтен вклад низкомолекулярных компонентов буферных растворов.

Δ_2 отражает строение денатурированных молекул сывороточного альбумина человека. За счёт составления Δ_2 вычтен вклад низкомолекулярных компонентов буферных растворов, также вычтен вклад не связавшегося с белком ЦТАБ.

Проведен анализ спектральных линий Амид-I ($1645 - 1670 \text{ см}^{-1}$) и Амид-III ($1240 - 1280 \text{ см}^{-1}$) путем сравнения их величины в разностных спектрах Δ_1 нативных молекул альбумина человека с их величиной в разностных спектрах Δ_2 денатурированных молекул альбумина человека после обработки белка различными концентрациями ЦТАБ при различных значениях pH.

§2.4. Методика экспериментов на спектрофлуориметре для изучения денатурации бычьего сывороточного альбумина под действием ЦТАБ

Флуоресцентные исследования проводились на спектрофлуориметре Perkin Elmer LS55. Спектрально-флуоресцентные характеристики приготовленных образцов исследовались при комнатной температуре. Спектры обрабатывались программой Perkin Elmer FL Winlab.

Спектры триптофановой флуоресценции бычьего сывороточного альбумина (БСА) регистрировались в диапазоне $300 - 500 \text{ нм}$ при возбуждении светом с длиной волны $\lambda_{\text{возб}} = 295 \text{ нм}$.

Степень поляризации P и степень анизотропии r триптофановой флуоресценции БСА рассчитывались по значениям I_{\parallel} и I_{\perp} в максимуме спектра испускания флуоресценции белка, где I_{\parallel} и I_{\perp} – интенсивности флуоресценции, измеренные через поляризатор, электрическая ось которого направлена параллельно или перпендикулярно поляризации возбуждающего света.

Глава 3. Исследование методами КР – спектроскопии вторичной структуры сывороточного альбумина человека при денатурации под действием ЦТАБ при различных значениях рН (собственные результаты и их обсуждение)

§3.1. Исследование КР – спектров растворов сывороточного альбумина человека с различными концентрациями ЦТАБ при различных значениях рН

В данной работе методом КР – спектроскопии выполнено исследование вторичной структуры транспортного белка плазмы крови – сывороточного альбумина человека – при денатурации под действием различных концентраций катионного детергента ЦТАБ при различных значениях рН.

Для оценки состояния вторичной структуры белка исследуются в основном колебания Амид-I и Амид-III. В колебания Амид-I основной вклад дает валентное колебание С=О в пептидной связи, тогда как в Амид-III – плоскостное деформационное колебание N-H в пептидной связи.

Полосы КР пептидных остовов белков следующие:

- 1) Амид-I – 1645-1655 см^{-1} (α -спираль), 1670-1680 см^{-1} (β -структура), 1660-1670 см^{-1} (хаотический клубок);
- 2) Амид-III – 1270-1280 см^{-1} (α -спираль), 1230-1240 см^{-1} (β -структура), 1240-1260 см^{-1} (хаотический клубок).

В сывороточном альбумине человека присутствуют, в основном, два типа вторичных структур – регулярные α -спирали и участки хаотической укладки, а доля β -складчатых структур совсем незначительна и в зависимости от рН составляет менее 1 %, что позволяет ею пренебречь.

Анализ КР – спектров сывороточного альбумина человека в растворах с ЦТАБ в области линий Амид-I и Амид-III позволяет судить об изменении вторичной структуры белка при денатурации, вызванной действием ЦТАБ.

Как описано в методической главе, получены четыре типа спектров при каждом значении рН: 1) спектры буферного раствора без белка и без ЦТАБ, 2) спектры буферного раствора без белка, но с ЦТАБ, 3) спектры буферного раствора с белком, но без ЦТАБ, 4) спектры буферного раствора с белком и с ЦТАБ.

Составлены разностные КР – спектры в области полос Амид-I (1645 – 1670 см^{-1}) и Амид-III (1240 – 1280 см^{-1}) растворов сывороточного альбумина человека с различными концентрациями ЦТАБ (0,5 – 7,0 мМ) при различных значениях рН (3,0 – 8,0).

При анализе разностных спектров обнаружено, что при значениях рН, больших рI белка, при увеличении концентрации ЦТАБ в растворах происходит более сильное уменьшение интенсивности спектральных линий в областях 1645 – 1655 см⁻¹ и 1270 – 1280 см⁻¹, соответствующих α-спиральным участкам альбумина, по сравнению со значениями рН, меньшими рI белка. А также при рН, больших рI альбумина человека (4,7), при увеличении концентрации ЦТАБ в растворах происходит более сильный рост интенсивности спектральных линий в областях 1660 – 1670 и 1240 – 1260 см⁻¹, соответствующих хаотическим участкам альбумина, по сравнению со значениями рН, меньшими рI белка.

Таким образом, при рН, больших рI сывороточного альбумина человека (4,7), происходят сильные изменения вторичной структуры белка (уменьшение содержания α-спиральных участков и увеличение содержания участков хаотической укладки) при увеличении концентрации ЦТАБ в растворах в отличие от значений рН, меньших рI альбумина человека, при которых эти изменения незначительны.

Данный факт объясняется электростатическими причинами:

1) При значениях рН, больших рI белка, молекулы альбумина человека в целом отрицательно заряжены, и или цетилтриметиламмоний-катионы (при концентрациях, меньших ККМ 0,9 мМ) или положительно заряженные мицеллы ЦТАБ (при концентрациях, больших ККМ 0,9 мМ) интенсивно связываются с белком, что и приводит к существенной денатурации белка под действием ЦТАБ, выражающейся в уменьшении содержания α-спиральных участков и в увеличении содержания участков хаотической укладки альбумина человека.

2) При значениях рН, меньших рI белка, или цетилтриметиламмоний-катионы (при концентрациях, меньших ККМ 0,9 мМ) или положительно заряженные мицеллы ЦТАБ (при концентрациях, больших ККМ 0,9 мМ) слабо взаимодействуют с положительно заряженными молекулами альбумина человека, что и приводит к слабой денатурации белка под действием ЦТАБ.

§3.2. Определение содержания α-спиральных участков во вторичной структуре сывороточного альбумина человека при денатурации под действием ЦТАБ при различных значениях рН

В ходе анализа спектральных полос Амид-I и Амид-III в разностных КР-спектрах определено процентное содержание α-спиральных участков во вторичной структуре

сывороточного альбумина человека при различных концентрациях ЦТАБ в растворах с различными рН (табл. 3.1, рис. 3.1).

Таблица 3.1. Процентное содержание α -спиральных участков во вторичной структуре сывороточного альбумина человека (150 мкМ) при различных концентрациях ЦТАБ при различных значениях рН.

рН	ЦТАБ, мМ					
	0	0,5	2,0	4,0	5,0	7,0
3	66,1	65,4	63,6	62,5	62,3	62,2
4	66,3	64,8	62,9	60,4	60,1	60,1
5	66,8	63,5	60,8	56,6	56,2	56,1
6	66,7	62,3	57,8	51,7	51,4	51,3
7	66,4	59,4	52,3	48,3	48,1	48,0
8	66,2	57,6	51,8	44,6	44,5	44,5

Видно, что в отсутствие ЦТАБ процентное содержание α -спиральных участков во вторичной структуре альбумина человека не зависит от рН и имеет практически постоянное значение (примерно 66 %) в исследованном диапазоне рН, где отсутствует кислотнo-индуцированная денатурация белка.

При добавлении ЦТАБ до его концентрации 4 мМ в растворы наблюдается уменьшение процентного содержания α -спиральных участков во вторичной структуре альбумина человека: более сильное уменьшение α -спиральных участков наблюдается при более высоких значениях рН.

Например, при рН 8,0 при 4мМ ЦТАБ содержание α -спиральных участков во вторичной структуре альбумина человека достигает примерно 44 %, тогда как, при рН 3,0 при 4 мМ ЦТАБ содержание α -спиральных участков во вторичной структуре альбумина человека составляет примерно 62 %.

Дальнейшее увеличение концентрации ЦТАБ (больше, чем 4 мМ) практически не меняет процентного содержания α -спиральных участков во вторичной структуре сывороточного альбумина человека при всех значениях рН. Следовательно, максимально возможная денатурация сывороточного альбумина человека под действием ЦТАБ достигается при концентрации детергента, равной 4 мМ.

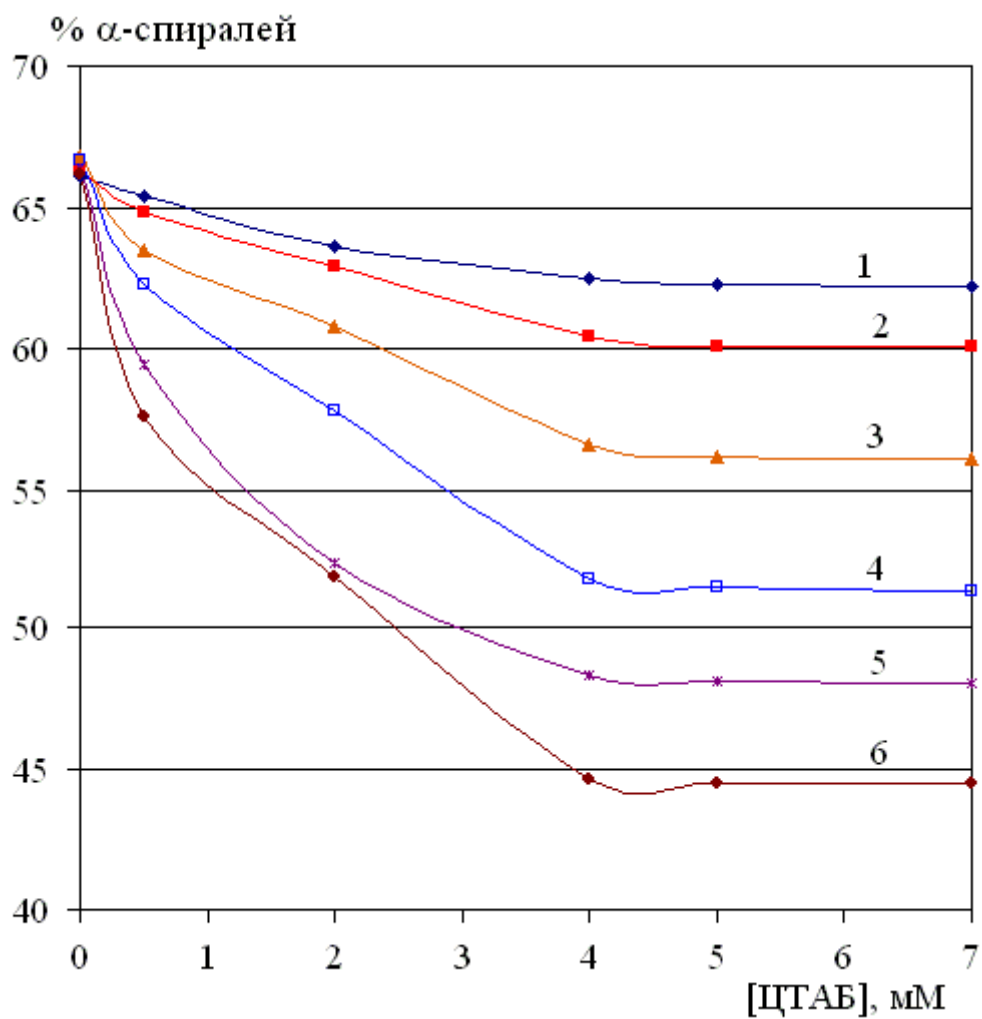


Рис. 3.1. Процентное содержание α -спиральных участков во вторичной структуре сывороточного альбумина человека (150 мкМ) при денатурации под действием ЦТАБ при различных значениях рН: 3,0 (1), 4,0 (2), 5,0 (3), 6,0 (4), 7,0 (5), 8,0 (6).

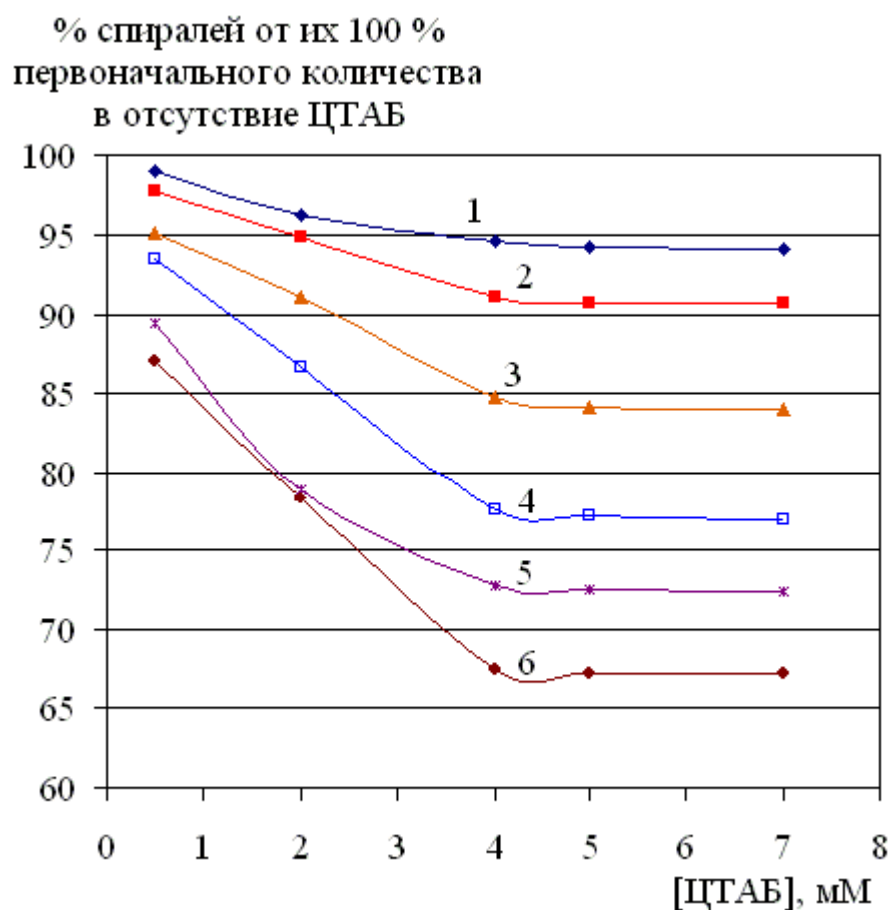


Рис. 3.2. Относительное изменение (по сравнению с нативным белком в отсутствие ЦТАБ, где содержание α -спиральных участков принято за 100 % при каждом соответствующем значении рН) содержания α -спиральных участков во вторичной структуре сывороточного альбумина человека (150 мкМ) при денатурации под действием ЦТАБ при различных значениях рН: 3,0 (1), 4,0 (2), 5,0 (3), 6,0 (4), 7,0 (5), 8,0 (6).

Также в работе посчитано относительное изменение (по сравнению с нативным белком в отсутствие ЦТАБ, где содержание α -спиральных участков во вторичной структуре белка принято за 100 % при каждом соответствующем значении pH) содержания α -спиральных участков во вторичной структуре альбумина человека при денатурации под действием различных концентраций ЦТАБ при различных значениях pH (рис. 3.2). Видно, что, чем больше значение pH, тем сильнее уменьшение процентного содержания α -спиральных участков во вторичной структуре альбумина человека с ростом концентрации ЦТАБ (до 4 мМ) в растворах.

Таким образом, по исследованию КР спектров продемонстрирована денатурация сывороточного альбумина человека под действием ЦТАБ и определены ее количественные характеристики – определено процентное содержание регулярных α -спиральных участков во вторичной структуре этого белка в растворах с различными концентрациями детергента ЦТАБ и при различных значениях pH. Показано, что более глубокая денатурация альбумина человека под действием ЦТАБ имеет место при значениях pH, больших pI белка, что указывает на электростатический характер взаимодействия альбумина человека и катионного детергента ЦТАБ.

Глава 4. Исследование методами флуоресцентного анализа денатурации бычьего сывороточного альбумина под действием ЦТАБ при различных значениях рН (собственные результаты и их обсуждение)

§4.1. Исследование триптофановой флуоресценции бычьего сывороточного альбумина при денатурации под действием ЦТАБ при различных значениях рН

В данном параграфе представлены результаты исследований механизма денатурации молекул бычьего сывороточного альбумина под действием различных концентраций ЦТАБ при различных значениях рН методами флуоресцентного анализа по изучению собственной триптофановой флуоресценции бычьего сывороточного альбумина. Бычий сывороточный альбумин имеет в своей аминокислотной цепи два остатка триптофана – Трп 135 и Трп 214.

Получены спектры триптофановой флуоресценции (возбуждение 295 нм) бычьего сывороточного альбумина в растворах с различными концентрациями ЦТАБ при различных значениях рН. На рис. 4.1, как пример, представлены спектры триптофановой флуоресценции бычьего сывороточного альбумина в растворах с различными концентрациями ЦТАБ при рН 8,0. В растворах с ЦТАБ происходит тушение триптофановой флуоресценции бычьего альбумина, происходящее при всех значениях рН.

На рис. 4.2 представлены зависимости интенсивности в максимуме спектра ($I_{фл}^{макс}$) триптофановой флуоресценции бычьего сывороточного альбумина от концентрации ЦТАБ при различных значениях рН. Видно, что, как в отсутствие ЦТАБ, так и при наличии этого детергента, при увеличении значения рН происходит увеличение интенсивности в максимуме спектра $I_{фл}^{макс}$ триптофановой флуоресценции бычьего альбумина.

При всех значениях рН в растворах с ЦТАБ наблюдается тушение триптофановой флуоресценции бычьего сывороточного альбумина (рис. 4.2), величина тушения зависит от значения рН: при значениях рН, меньших рI бычьего сывороточного альбумина (4,9), тушение флуоресценции незначительное, при значениях рН, больших рI бычьего альбумина, тушение флуоресценции значительное.

Тушение флуоресценции бычьего сывороточного альбумина в присутствии ЦТАБ в растворах объясняется денатурацией белка под действием ЦТАБ – разрыхлением глобул бычьего сывороточного альбумина, открытием гидрофобных карманов с триптофанами и увеличением доступности триптофанов (Трп 135 и Трп 214) для тушащих их молекул воды.

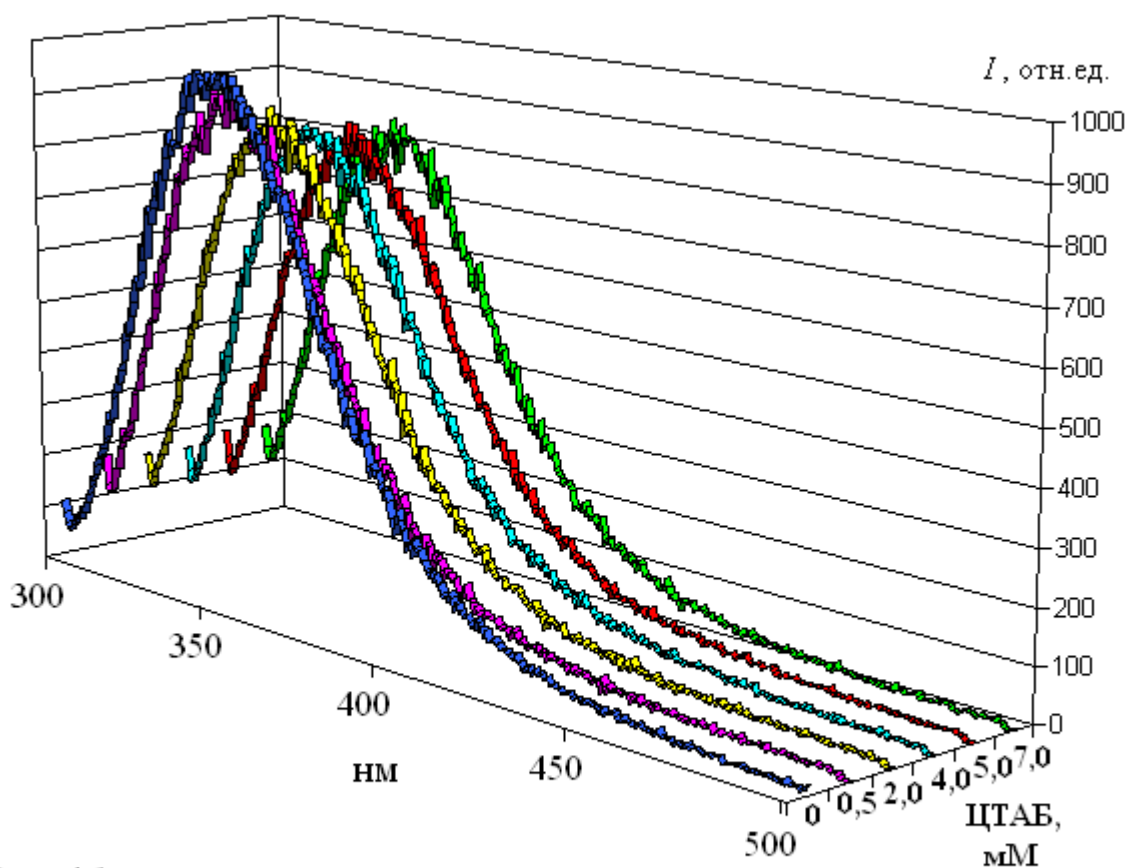


Рис. 4.1

Спектры триптофановой флуоресценции (возбуждение 295 нм) бычьего сывороточного альбумина (5 мкМ) в растворах с различными концентрациями ЦТАБ при рН 8,0

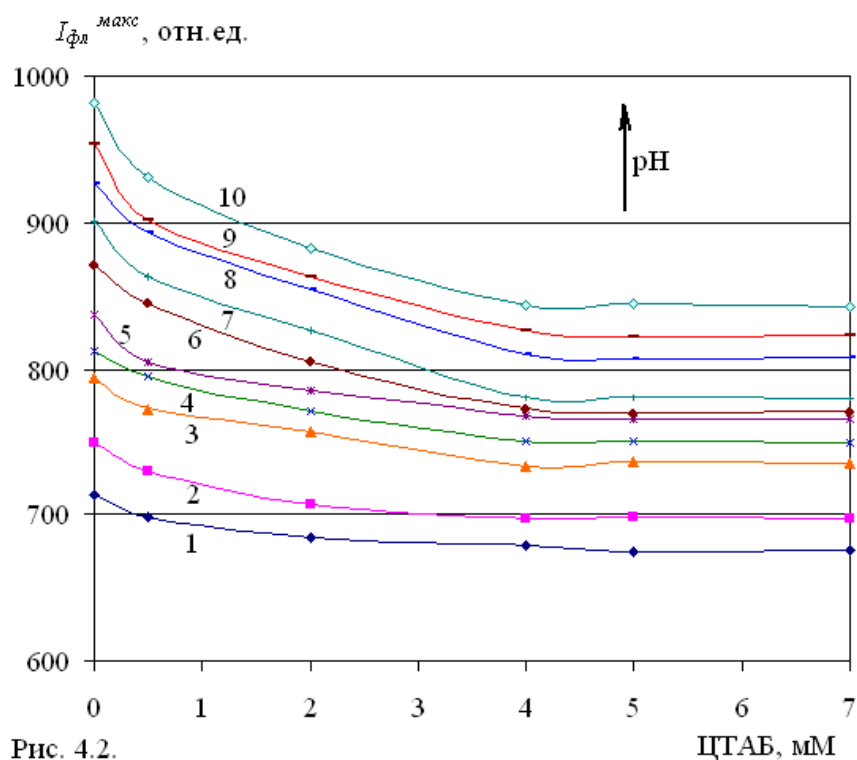


Рис. 4.2. Зависимость интенсивности в максимуме спектра триптофановой флуоресценции (возбуждение 295 нм) бычьего сывороточного альбумина (5 μM) от концентрации ЦТАБ при различных значениях pH: 3,5 (1), 4,0 (2), 4,5 (3), 5,0 (4), 5,5 (5), 6,0 (6), 6,5 (7), 7,0 (8), 7,5 (9), 8,0 (10).

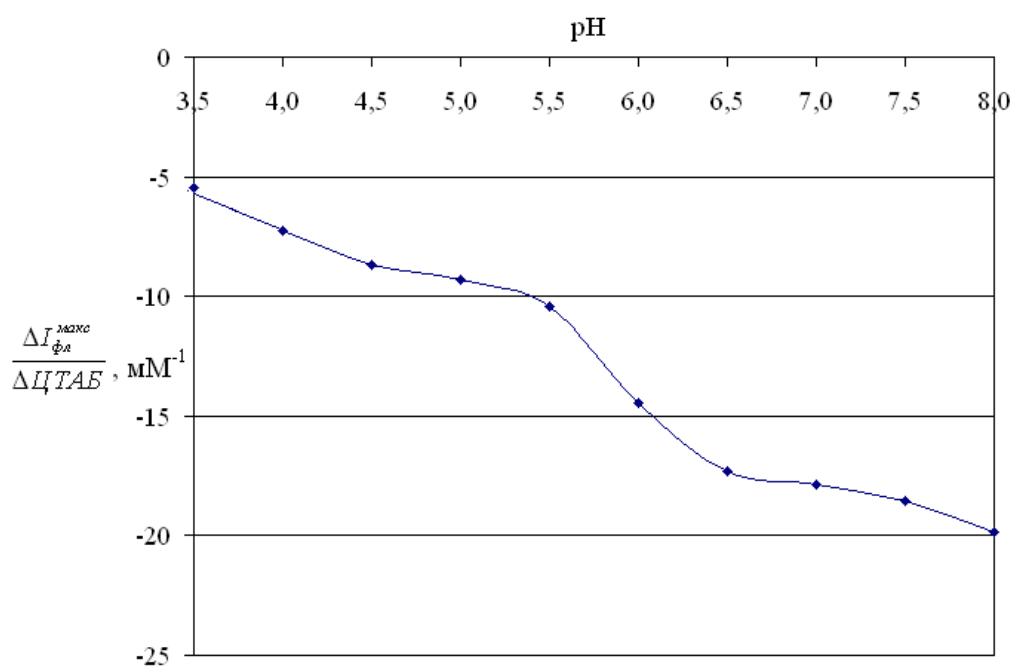


Рис. 4.3. Среднее изменение интенсивности триптофановой флуоресценции (возбуждение 295 нм) бычьего сывороточного альбумина (5 мкМ) к изменению концентрации ЦТАБ в растворах с различными значениями рН.

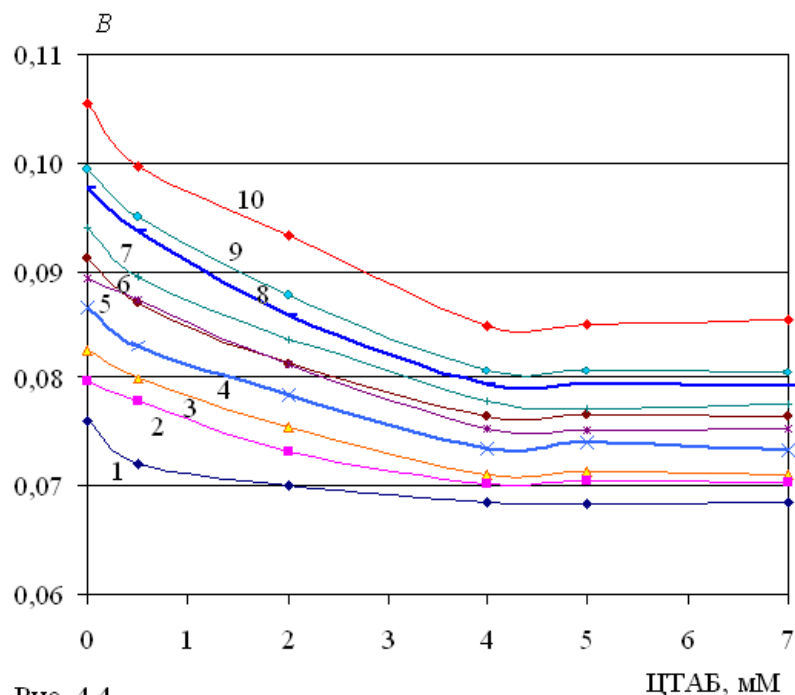


Рис. 4.4. Зависимость квантового выхода триптофановой флуоресценции (возбуждение 295 нм) бычьего сывороточного альбумина (5 мкМ) от концентрации ЦТАБ в растворах с различными значениями рН: 3,5 (1), 4,0 (2), 4,5 (3), 5,0 (4), 5,5 (5), 6,0 (6), 6,5 (7), 7,0 (8), 7,5 (9), 8,0 (10).

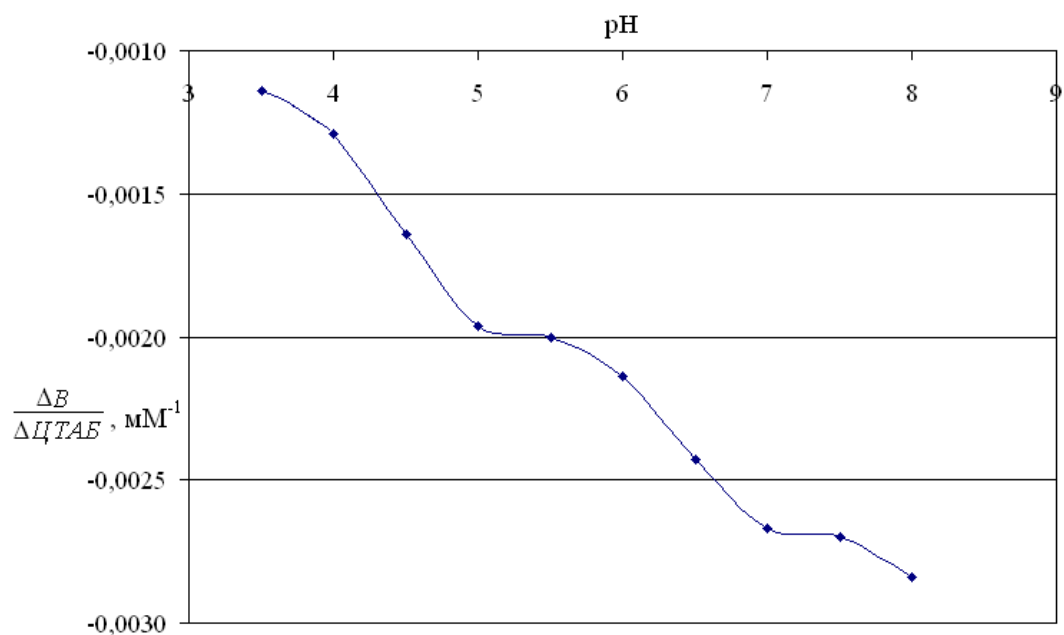


Рис. 4.5.

Среднее изменение квантового выхода триптофановой флуоресценции (возбуждение 295 нм) бычьего сывороточного альбумина (5 мкМ) к изменению концентрации ЦТАБ в растворах с различными значениями рН.

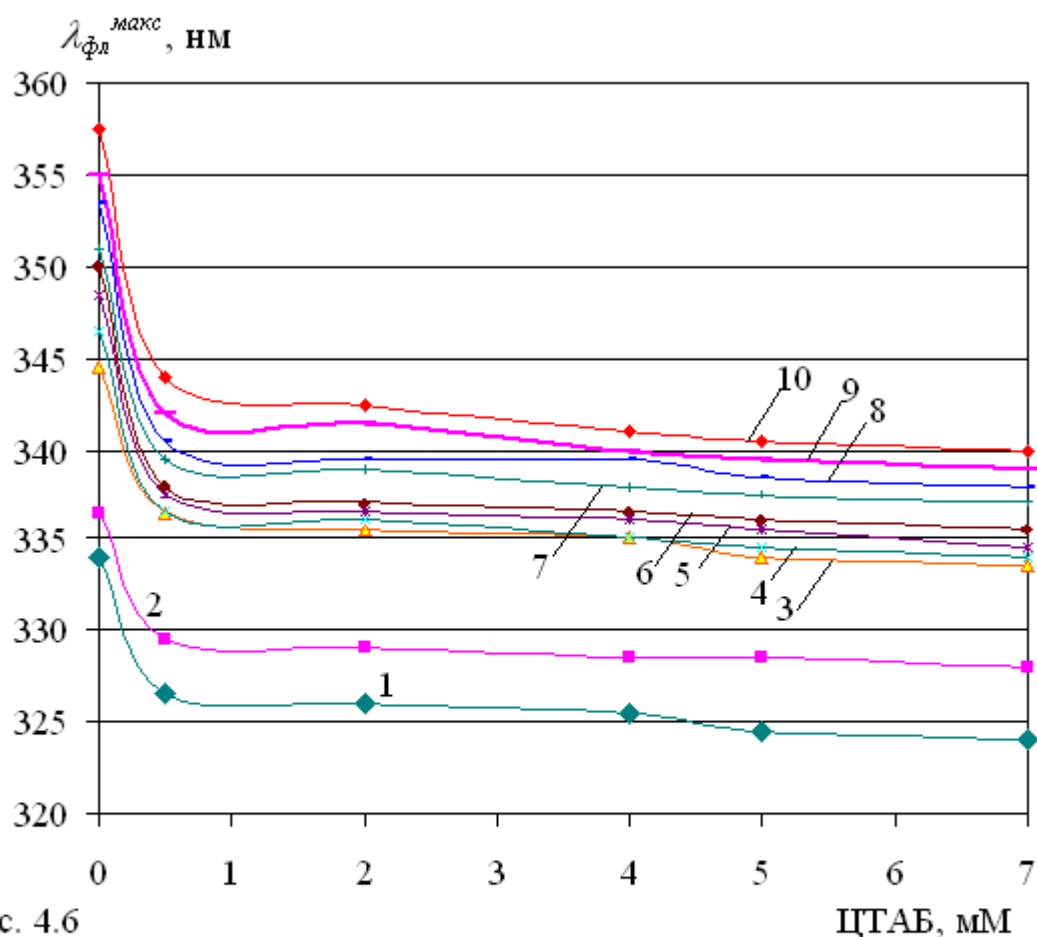


Рис. 4.6
 Зависимость положения максимума спектра триптофановой флуоресценции (возбуждение 295 нм) бычьего сывороточного альбумина (5 мкМ) от концентрации ЦТАБ в растворах с различными значениями рН: 3,5 (1), 4,0 (2), 4,5 (3), 5,0 (4), 5,5 (5), 6,0 (6), 6,5 (7), 7,0 (8), 7,5 (9), 8,0 (10).

Видно (рис. 4.2), что денатурация бычьего сывороточного альбумина под действием ЦТАБ при всех исследованных значениях рН (3,5 – 8,0) носит одностадийный характер – белковые глобулы постепенно разрыхляются под действием ЦТАБ примерно до концентрации 4 мМ ЦТАБ, дальнейшее увеличение концентрации ЦТАБ практически ничего не меняет в системе.

На рис. 4.3 изображено среднее изменение интенсивности в максимуме спектра триптофановой флуоресценции бычьего сывороточного альбумина к изменению концентрации ЦТАБ в растворах ($\Delta I_{\text{фл}}^{\text{макс}} / \Delta[\text{ЦТАБ}]$) при различных значениях рН.

Из рис. 4.3 следует, что более сильное тушение флуоресценции бычьего сывороточного альбумина под действием ЦТАБ происходит при высоких значениях рН, больших рI этого белка (4,9), что указывает на электростатический механизм взаимодействия альбумина и ЦТАБ.

В растворе молекулы ионного детергента ЦТАБ диссоциируют на цетилтриметиламмоний-катионы и анионы брома.

При значениях рН, больших рI бычьего альбумина (4,9), молекулы бычьего альбумина человека в целом отрицательно заряжены, и или цетилтриметиламмоний-катионы (при концентрациях, меньших ККМ 0,9 мМ) или положительно заряженные мицеллы ЦТАБ (при концентрациях, больших ККМ 0,9 мМ) интенсивно связываются с белком, что и приводит к существенной денатурации белка под действием ЦТАБ.

При значениях рН, меньших рI бычьего альбумина (4,9), или цетилтриметиламмоний-катионы (при концентрациях, меньших ККМ 0,9 мМ) или положительно заряженные мицеллы ЦТАБ (при концентрациях, больших ККМ 0,9 мМ) слабо взаимодействуют с положительно заряженными молекулами бычьего сывороточного альбумина, что и приводит к слабой денатурации этого белка под действием ЦТАБ.

На рис. 4.4 представлены зависимости квантового выхода ($I_{\text{фл}}^{\text{макс}}$) триптофановой флуоресценции бычьего сывороточного альбумина от концентрации ЦТАБ при различных значениях рН. Видно, что зависимость квантового выхода флуоресценции бычьего альбумина от концентрации детергента имеет схожий характер с зависимостью интенсивности в максимуме спектра флуоресценции этого белка от концентрации детергента.

При всех значениях рН в растворах с ЦТАБ наблюдается тушение триптофановой флуоресценции бычьего сывороточного альбумина (рис. 4.4).

Видно (рис. 4.4), что денатурация бычьего сывороточного альбумина под действием ЦТАБ при всех исследованных значениях рН носит одностадийный характер –

белковые глобулы постепенно разрыхляются под действием ЦТАБ примерно до концентрации 4 мМ ЦТАБ.

На рис. 4.5 изображено среднее изменение квантового выхода триптофановой флуоресценции бычьего сывороточного альбумина к изменению концентрации ЦТАБ ($\Delta B / \Delta[\text{ЦТАБ}]$) в растворах при различных значениях рН. Более сильное тушение флуоресценции бычьего сывороточного альбумина под действием ЦТАБ происходит при высоких значениях рН, больших рI этого белка (4,9), что указывает на электростатический механизм взаимодействия альбумина и ЦТАБ.

Механизм денатурации бычьего сывороточного альбумина под действием ЦТАБ исследован также по анализу положения длины волны в максимуме спектра триптофановой флуоресценции белка $\lambda_{\text{фл}}^{\text{макс}}$. На рис. 4.6 представлены зависимости положения максимума триптофановой флуоресценции бычьего сывороточного альбумина $\lambda_{\text{фл}}^{\text{макс}}$ от концентрации ЦТАБ при различных значениях рН.

Следует отметить, что при увеличении рН максимум спектра триптофановой флуоресценции бычьего сывороточного альбумина смещается в сторону больших длин волн как для растворов, содержащих ЦТАБ, так и для растворов, не содержащих его.

При добавлении в раствор начальной концентрации ЦТАБ (0,5 мМ) происходит резкий синий сдвиг максимума спектра триптофановой флуоресценции бычьего альбумина примерно на 8–12 нм в зависимости от рН. Дальнейшее повышение концентрации ЦТАБ от 0,5 до 7,0 мМ приводит лишь к незначительному синему сдвигу спектров триптофановой флуоресценции бычьего альбумина. Явление синего сдвига $\lambda_{\text{фл}}^{\text{макс}}$ в присутствии ЦТАБ объясняется изменением ближайшего окружения хромофорных групп триптофанов бычьего альбумина вследствие денатурационной конформационной перестройки глобулы белка и влиянием связавшихся с белком цетилтриметиламмоний-катионов или мицелл ЦТАБ.

§4.2. Определение методом поляризованной триптофановой флуоресценции параметров вращательной диффузии молекул бычьего сывороточного альбумина при денатурации под действием ЦТАБ при различных значениях рН

В работе проведены исследования поляризованной триптофановой флуоресценции бычьего сывороточного альбумина в растворах с ЦТАБ при различных значениях рН.

Как известно, изменения поляризации флуоресценции обуславливаются двумя причинами – во-первых, вращательной диффузией флуорофоров и, во-вторых, безызлучательным переносом энергии между флуорофорами.

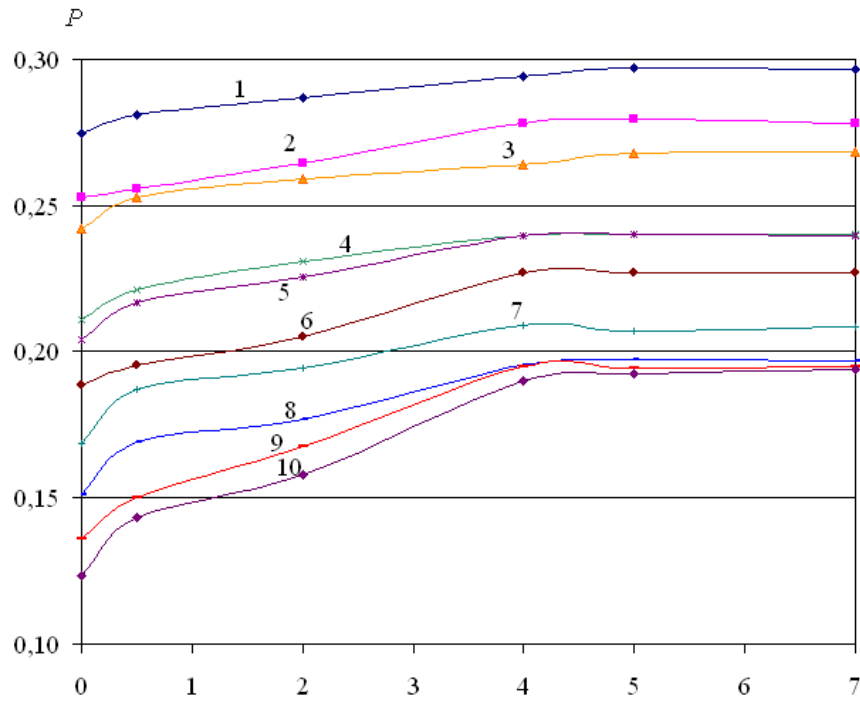


Рис. 4.7. Зависимость степени поляризации триптофановой флуоресценции (возбуждение 295 нм) бычьего сывороточного альбумина (5 мкМ) от концентрации ЦТАБ в растворах с различными значениями pH: 3,5 (1), 4,0 (2), 4,5 (3), 5,0 (4), 5,5 (5), 6,0 (6), 6,5 (7), 7,0 (8), 7,5 (9), 8,0 (10).

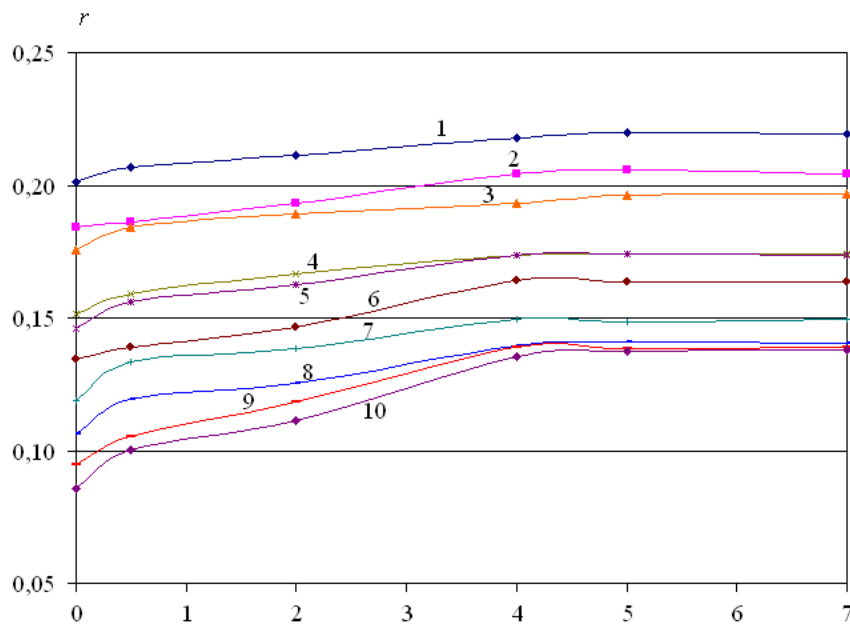


Рис. 4.8. Зависимость степени анизотропии триптофановой флуоресценции (возбуждение 295 нм) бычьего сывороточного альбумина (5 мкМ) от концентрации ЦТАБ при различных значениях pH: 3,5 (1), 4,0 (2), 4,5 (3), 5,0 (4), 5,5 (5), 6,0 (6), 6,5 (7), 7,0 (8), 7,5 (9), 8,0 (10).

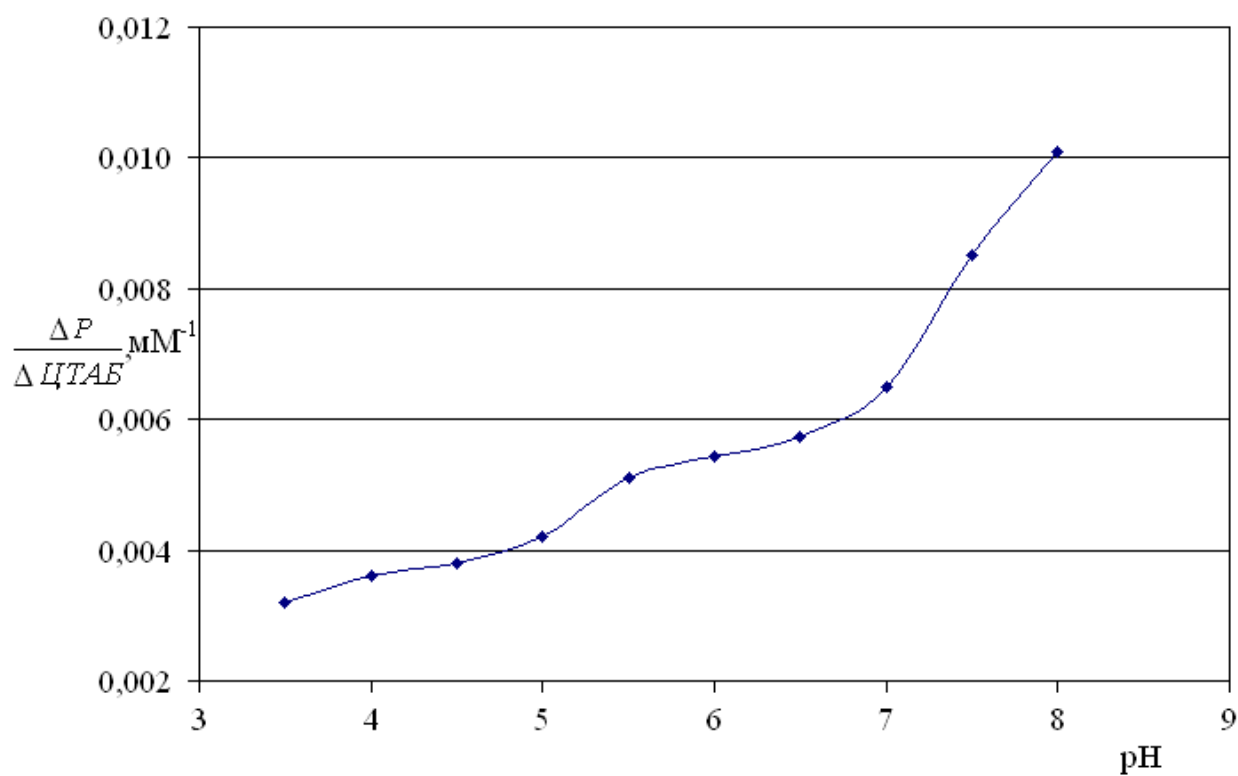


Рис. 4.9. Среднее изменение степени поляризации триптофановой флуоресценции (возбуждение 295 нм) бычьего сывороточного альбумина (5 мкМ) к изменению концентрации ЦТАБ в растворах с различными значениями рН.

Благодаря подбору экспериментальных условий (исследованы сильно разбавленные растворы белка (5 мкМ) и использовано возбуждение флуоресценции триптофана на дальнем длинноволновом крае (295 нм)) вклад от второй причины – безызлучательного переноса энергии между флуорофорами – отсутствует.

Таким образом, на поляризацию триптофановой флуоресценции бычьего сывороточного альбумина оказывает влияние только вращательная диффузия флуорофоров – триптофановых остатков (Trp 135 и Trp 214) молекулы белка.

Эта поляризация флуоресценции триптофановых остатков молекулы бычьего сывороточного альбумина в общем случае обусловлена как вращением целой молекулы белка, так и вращением доменов белка, содержащих триптофановые остатки, так и вращением самих триптофанов относительно своих ближайших окружений. Проведенные в данной работе стационарные измерения поляризованной флуоресценции бычьего сывороточного альбумина позволяют анализировать вращение целой молекулы белка, а вклад вращения доменов, содержащих триптофановые остатки, и вращения триптофановых остатков относительно ближайшего окружения считается пренебрежимо малым.

Получены зависимости степени поляризации (рис. 4.7) и степени анизотропии (рис. 4.8) триптофановой флуоресценции бычьего сывороточного альбумина от концентрации ЦТАБ при различных значениях рН. Значения степени поляризации P и степени анизотропии r флуоресценции рассчитывались по значениям $I_{||}$ и I_{\perp} в максимуме спектров испускания флуоресценции бычьего сывороточного альбумина.

Из рис. 4.7 и рис. 4.8 видно, что денатурация бычьего сывороточного альбумина под действием ЦТАБ имеет моностадийный (одностадийный) характер при всех исследованных значениях рН (максимальное разрушение глобул белка достигается при концентрации ЦТАБ 4 мМ).

На рис. 4.9 представлено среднее изменение степени поляризации триптофановой флуоресценции бычьего сывороточного альбумина к изменению концентрации ЦТАБ в растворах с различными значениями рН. Видно, что большее увеличение степени поляризации P (большее увеличение линейно-продольных размеров молекул бычьего альбумина, т.е. более глубокая денатурация) с ростом концентрации ЦТАБ в растворах наблюдается при высоких значениях рН, больших rI бычьего сывороточного альбумина (4,9). Причем, чем больше значение рН, тем большее наблюдается увеличение степени поляризации триптофановой флуоресценции бычьего альбумина с ростом концентрации ЦТАБ в растворах.

Крупным биохимическим применением метода поляризационной флуоресценции является оценка времен вращательной релаксации белков $\xi = \frac{V\eta}{Tk}$ и оценка

коэффициентов вращательной диффузии $D_{\text{вращ}}$ по формуле $\frac{r_0}{r} = 1 + 6D_{\text{вращ}} \cdot \tau$.

Например, в биологии часто таким способом оценивают эффективные коэффициенты вращательной диффузии молекул белков.

Количественная теория вращательной деполяризации была предложена В.Л. Левшиным и Ф. Перреном с использованием модели вращательной диффузии, на основе этой теории была получена следующая формула:

$\frac{1}{P} = \frac{1}{P_0} + \left(\frac{1}{P_0} - \frac{1}{3} \right) \cdot \frac{kT\tau_0}{V\eta}$, где T – абсолютная температура, η – вязкость раствора, V – объем раствора, k – постоянная Больцмана, τ_0 – среднее время жизни возбужденных молекул, P_0 – предельная степень поляризации люминесценции. Данная зависимость получила название формулы Левшина – Перрена. 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:

$\text{tg}\varphi = \left(\frac{1}{P_0} - \frac{1}{3} \right) \cdot \frac{k\tau_0}{V}$, этот тангенс при известном значении τ_0 позволяет определить величину молекулярного объема, и, наоборот, по известному молекулярному объему можно определить значение среднего времени жизни возбужденного состояния исследуемых молекул.

Используя эти данные, можно определить время вращательной релаксации (или разупорядочивания вследствие теплового движения) ξ флуорофора по формуле:

$\xi = \frac{4a^3\pi\eta}{3Tk} = \frac{V\eta}{Tk}$, где a – средний гидродинамический радиус Эйнштейна ($V = \frac{4\pi a^3}{3}$).

Согласно Левшину, Перрену и Яблонскому, для флуорофоров можно определить коэффициент вращательной диффузии:

$\frac{r_0}{r} = 1 + 6D_{\text{вращ}} \cdot \tau$, где r_0 – анизотропия для неподвижного флуорофора, $D_{\text{вращ}}$ –

коэффициент вращательной диффузии ($D_{\text{вращ}} = \frac{kT}{6\eta V}$), τ – время жизни возбужденного состояния флуорофора.

Бычий сывороточный альбумин содержит два триптофана, каждый из которых имеет свое время затухания флуоресценции ($T_{gr} 214 - 4,4$ нсек, $T_{gr} 135 - 6,7$ нсек), тогда как время затухания флуоресценции в целом бычьего сывороточного альбумина – это 3,9 нсек. Данное время (3,9 нсек) учитывалось в расчетах в этой работе.

Путем варьирования вязкости растворов добавлением различных концентраций сахарозы определены время вращательной релаксации, коэффициент вращательной диффузии и эффективный радиус Эйнштейна молекул бычьего сывороточного альбумина в растворах с различными концентрациями ЦТАБ при различных значениях рН.

На рис. 4.10 представлены зависимости коэффициента вращательной диффузии $D_{вращ}$ молекул бычьего сывороточного альбумина от концентрации ЦТАБ при различных значениях рН. В растворах с ЦТАБ происходит уменьшение значений $D_{вращ}$ молекул бычьего альбумина, что объясняется денатурацией белка под действием ЦТАБ и соответствующими денатурационными разрыхлениями белковых глобул (увеличением линейно-продольных размеров) молекул бычьего альбумина.

Видно, что более сильное уменьшение $D_{вращ}$ молекул бычьего сывороточного альбумина в растворах с ЦТАБ (до концентрации 4 мМ ЦТАБ) происходит при значениях рН, больших рI этого белка, что указывает на глубокую и сильную денатурацию белка в этих случаях.

На рис. 4.11 представлены зависимости времени вращательной релаксации ξ , отражающей время разупорядочивания вследствие тепловой диффузии, молекул бычьего сывороточного альбумина от концентрации ЦТАБ при различных значениях рН.

Видно (рис. 4.11), что с увеличением концентрации ЦТАБ в растворах (до 4 мМ) происходит увеличение времени вращательной релаксации ξ молекул бычьего альбумина, причем величина этого увеличения ξ молекул альбумина определяется значением рН: при значениях рН, больших рI этого белка (4,9), происходит более существенное увеличение ξ (например, при рН 8,0 значение ξ молекул бычьего альбумина в растворах с 4 мМ ЦТАБ достигает примерно 354 нсек, тогда как при рН 3,5 значение ξ молекул бычьего альбумина в растворах 4 мМ ЦТАБ всего 95 нсек).

На рис. 4.12 представлены зависимости эффективного радиуса Эйнштейна $R_{эфф}$ молекул бычьего сывороточного альбумина от концентрации ЦТАБ при различных значениях рН.

Известно, что в основе вывода формулы вращательной деполяризации Левшина – Перрена лежат условия изотропного распределения молекул, дипольного характера их излучения, экспоненциальности затухания флуоресценции отдельных флуорофоров, гидродинамического описания броуновского вращения молекул.

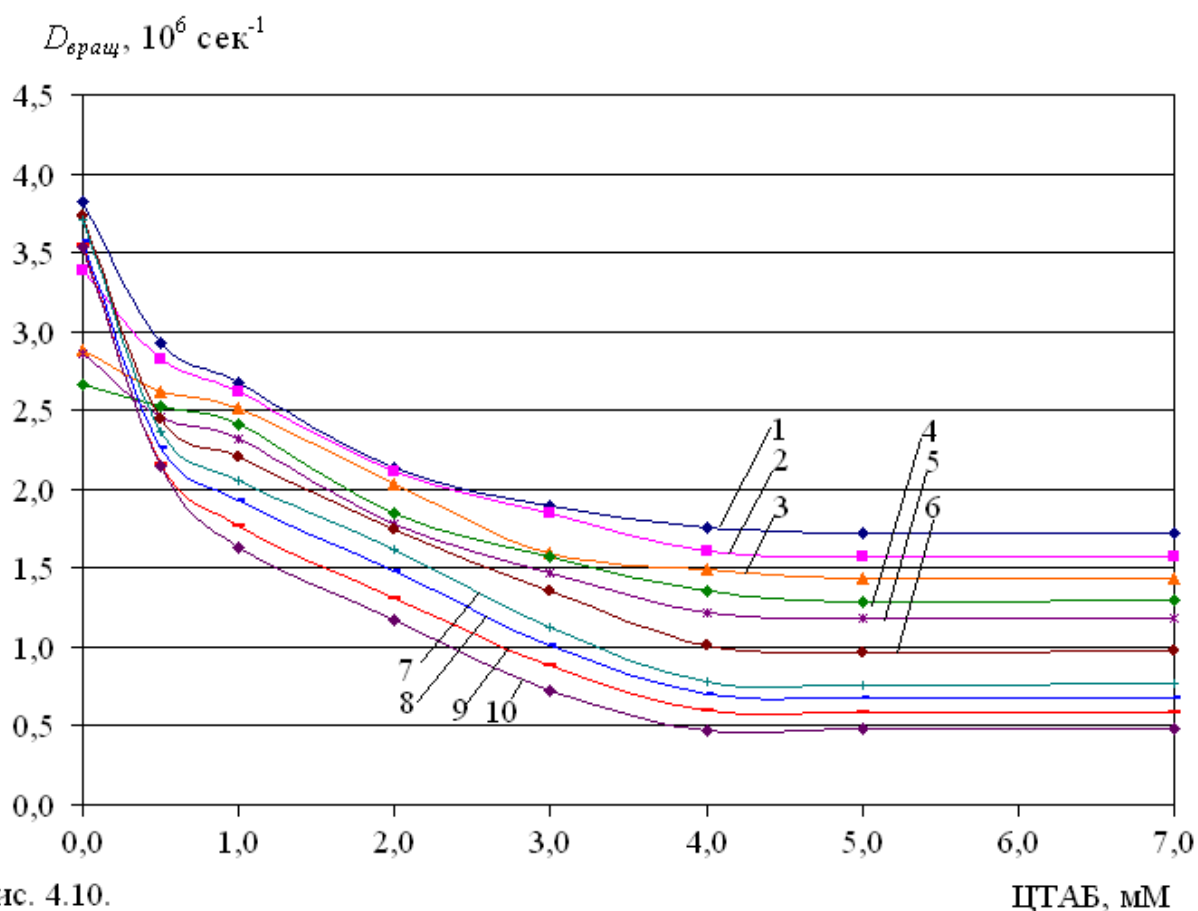


Рис. 4.10. Зависимость коэффициента вращательной диффузии молекул бычьего сывороточного альбумина от концентрации ЦТАБ в растворах с различными значениями pH: 3,5 (1), 4,0 (2), 4,5 (3), 5,0 (4), 5,5 (5), 6,0 (6), 6,5 (7), 7,0 (8), 7,5 (9), 8,0 (10).

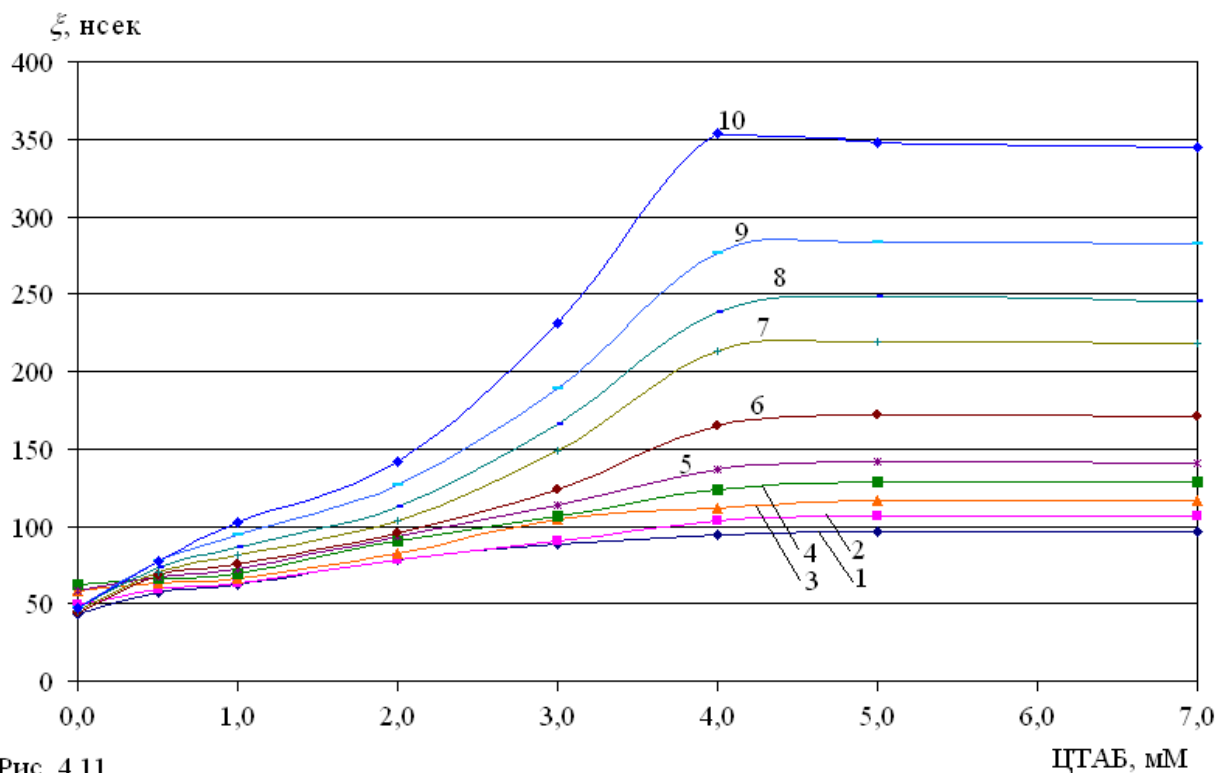


Рис. 4.11. Зависимость времени вращательной релаксации молекул бычьего сывороточного альбумина от концентрации ЦТАБ в растворах с различными значениями рН: 3,5 (1), 4,0 (2), 4,5 (3), 5,0 (4), 5,5 (5), 6,0 (6), 6,5 (7), 7,0 (8), 7,5 (9), 8,0 (10).

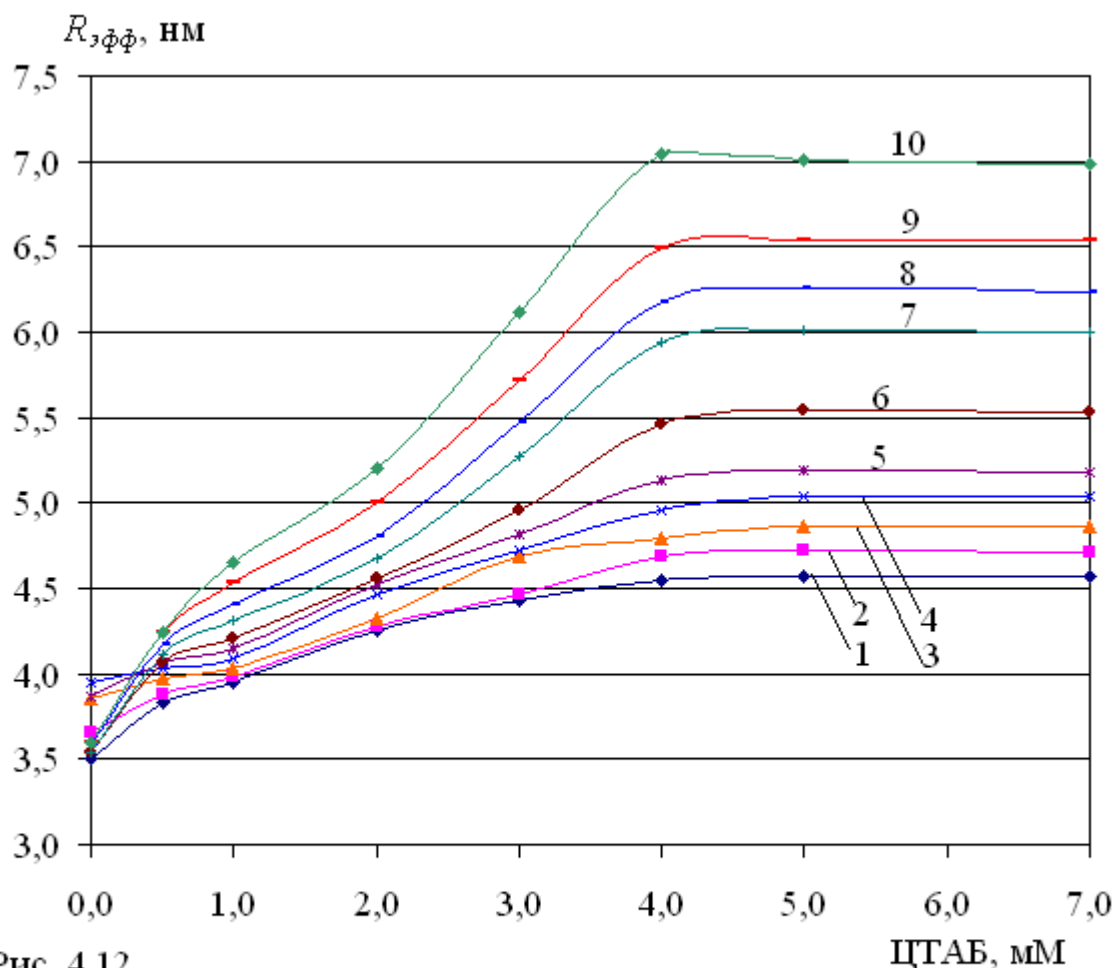


Рис. 4.12. Зависимость эффективного радиуса молекул бычьего сывороточного альбумина от концентрации ЦТАБ в растворах с различными значениями pH: 3,5 (1), 4,0 (2), 4,5 (3), 5,0 (4), 5,5 (5), 6,0 (6), 6,5 (7), 7,0 (8), 7,5 (9), 8,0 (10).

Радиус $R_{эфф}$ молекул бычьего альбумина, определенный таким образом в сферическом гидродинамическом приближении (по уравнению Стокса – Эйнштейна), отражает не реальный геометрический размер молекул бычьего альбумина, которые при прохождении денатурации под действием ЦТАБ приобретают все более вытянутую, не сферическую геометрическую форму, а показывает эффективный размер молекул бычьего альбумина, меняющийся под действием ЦТАБ и удобный для оценки степени глубины денатурации белка под действием ЦТАБ.

Видно (рис. 4.12), что более сильное увеличение размеров молекул бычьего сывороточного альбумина имеет место при значениях рН, больших рI этого белка (4,9), что говорит о глубокой денатурации белка под действием ЦТАБ при этих значениях рН.

Обнаруженное увеличение P триптофановой флуоресценции бычьего сывороточного альбумина, уменьшение $D_{вращ}$ молекул бычьего альбумина, увеличение ξ молекул бычьего альбумина и увеличение $R_{эфф}$ молекул бычьего альбумина в растворах с ЦТАБ объясняется денатурацией белка под действием детергента.

В растворах происходит диссоциация молекул ЦТАБ на цетилтриметиламмоний-катионы и анионы брома. При значениях рН, больших рI бычьего альбумина (4,9), молекулы альбумина в целом отрицательно заряжены, и или цетилтриметиламмоний-катионы (при концентрациях, меньших ККМ 0,9 мМ) или положительно заряженные мицеллы ЦТАБ (при концентрациях, больших ККМ 0,9 мМ) интенсивно связываются с белком, что приводит к существенной денатурации бычьего альбумина и к сильному изменению параметров его вращательной диффузии. При значениях рН, меньших рI бычьего альбумина (4,9), или цетилтриметиламмоний-катионы (при концентрациях, меньших ККМ 0,9 мМ) или положительно заряженные мицеллы ЦТАБ (при концентрациях, больших ККМ 0,9 мМ) слабо взаимодействуют с положительно заряженными молекулами альбумина, что приводит к слабой денатурации белка при этих рН и к слабому изменению параметров его вращательной диффузии.

Таким образом, проведенный в данной работе анализ поляризованной триптофановой флуоресценции бычьего альбумина в растворах ЦТАБ дал новую информацию о денатурации бычьего альбумина под действием ЦТАБ по оценке вращательной диффузии молекул белка в растворах ЦТАБ. По зависимостям параметров вращательной диффузии (ξ , $D_{вращ}$, $R_{эфф}$) молекул бычьего альбумина от концентрации ЦТАБ видно, что денатурация бычьего альбумина под действием ЦТАБ при всех исследованных значениях рН носит одностадийный характер – глобулы белка разрыхляются под действием ЦТАБ до концентрации 4 мМ ЦТАБ, дальнейшее увеличение концентрации ЦТАБ ничего не меняет в системе.

Основные результаты и выводы работы

- 1.** Получена новая информация о денатурации транспортных белков плазмы крови – сывороточных альбуминов – под действием катионного детергента цетилтриметиламмонийбромида (ЦТАБ) с помощью применения спектроскопических методов: КР – спектроскопии для анализа денатурации сывороточного альбумина человека и флуоресцентного анализа для анализа денатурации бычьего сывороточного альбумина.
- 2.** По исследованию КР – спектров установлены количественные характеристики денатурации сывороточного альбумина человека под действием ЦТАБ – определено процентное содержание α -спиральных участков во вторичной структуре этого белка в растворах с различными концентрациями ЦТАБ и при различных значениях рН.
- 3.** По анализу триптофановой флуоресценции бычьего сывороточного альбумина в растворах с ЦТАБ с различными значениями рН обнаружено, что в растворах с ЦТАБ происходит тушение триптофановой флуоресценции и увеличение степени поляризации триптофановой флуоресценции бычьего сывороточного альбумина, а также уменьшение коэффициента вращательной диффузии, увеличение времени вращательной релаксации и увеличение эффективного радиуса молекул бычьего альбумина.
- 4.** Для обоих типов сывороточных альбуминов (человека и быка) обнаружены следующие общие закономерности в их денатурации под действием ЦТАБ: во-первых, более глубокая денатурация альбуминов под действием ЦТАБ имеет место при значениях рН, больших рI белков, во-вторых, денатурация альбуминов под действием ЦТАБ носит моностадийный (одностадийный) характер, и в-третьих, максимально глубокая денатурация альбуминов под действием ЦТАБ при всех исследованных значениях рН достигается при концентрации 4 мМ ЦТАБ.

Список цитируемой литературы

1. Ленинджер А. Биохимия. М., Мир, 1974.
2. Марри Р., Греннер Д., Мейес П., Родуэлл В. Биохимия человека в 2-х томах. М., Мир, 1993.
3. Остерман Л.А. Методы исследования белков и нуклеиновых кислот. М.: МЦМНО, 2002.
4. Левшин Л.В., Салецкий А.М. Оптические методы исследования молекулярных систем. Ч.1. Молекулярная спектроскопия. Москва: Издательство Московского университета, 1994.
5. Пентин Ю.А., Вилков Л.В. Физические методы исследования в химии. Москва: Мир, 2003.
6. Граселли Дж., Снейвили М., Балкин Б. Применение спектроскопии КР в химии. Москва: Мир, 1984.
7. Накамото К. ИК спектры и спектры КР неорганических и координационных соединений. Москва: Мир, 1991.
8. Волькенштейн М.В., Грибов Л.А., Ельяшевич М.А., Степанов Б.И. Колебания молекул. Москва: Наука, 1972.
9. Грибов Л.А. Введение в молекулярную спектроскопию. Москва: Наука, 1976.
10. Кэри П. Применения спектроскопии КР и РКР в биохимии. Москва, Мир, 1985.
11. Nakamura K., Era S., Ozaki Y., Sogami M., Hayashi T., Murakami M. Conformational changes in seventeen cystine disulfide bridges of bovine serum albumin proved by Raman spectroscopy. FEBS Letters, 1997, v. 417, p. 375-378.
12. Iconomidou V.A., Chryssikos G.D., Gionis V., Willis J.H., Hamodrakas S.J. "Soft"-cuticle protein secondary structure as revealed by FT-Raman, ATR FT-IR and CD spectroscopy. Insect Biochemistry Molecular Biology, 2001, v. 31, № 9, p. 877-885.
13. Osada M., Gniadecka M., Brandrup F., Kjaergard Hansen L., Wulf H.C. Raman spectroscopy analysis of protein structure of hair in patients with trichothiodystrophy. British Journ. Dermatology, 2003, v. 148, № 3, p. 600-601.
14. Maksimov G.V., Maksimova N.V., Churin A.A., Orlov S.N., Rubin A.B. Study on conformational changes in hemoglobin protoporphyrin in essential hypertension. Biochemistry, 2001, v. 66, № 3, p. 295-299. (translated from Biokhimiya, v. 66, № 3, p. 365-370).

15. Ozaki Y., Mizuno A., Sato H., Kawauchi K., Muraishi S. Biomedical application of near-infrared Fourier Transform Raman spectroscopy. Part I: the 1064-nm excited Raman spectra of blood and met hemoglobin. *Applied Spectroscopy*, 1992, v. 46, № 3, p. 533-536.
16. Siebenga I., Vrensen G.F., Otto K., Puppels G.J., De Mul F.F., Greve G. Aging and changes in protein conformation in the human lens: a Raman microspectroscopy study. *Exp. Eye Res.*, 1992, v. 54, p. 759-767.
17. Fleury F., Ianoul A., Berjot M., Feofanov A., Alix A.J.P., Nabiev I. Camptothecin-binding site in human serum albumin and protein transformations induced by drug binding. *FEBS Letters*, 1997, v. 411, p. 215-220.
18. Jenkins A.L., Larsen R.A., Williams T.B. Characterization of amino acids using Raman spectroscopy. *Spectrochimica Acta Part A*, 2005, v. 61, p. 1585-1594.
19. Asher S.A. UV resonance Raman studies of molecular-structure and dynamics-application in physical and biophysical chemistry. *Ann. Rev. Phys. Chem.*, 1988, v. 39, p. 537-558.
20. Hirschfeld T., Chase B. FT-Raman spectroscopy: development and justification. *Applied Spectroscopy*, 1986, V. 40, № 2, P. 133-137.
21. Pappas D., Smith B.W., Winefordner J.D. Raman spectroscopy in bioanalysis. *Talanta*, 2000, v. 51, p. 131-144.
22. Manoharan R., Wang Y., Feld M.S. Review: histochemical analysis of biological tissues using Raman spectroscopy. *Spectrochim. Acta A*, 1996, v. 52, p. 215-249.
23. Van der Poll S.W., Kastelijn K., Bakker Schut T.C., Strijder C., Pasterkamp G., Puppels G.J., Van der Laarse A. On-line detection of cholesterol and calcification by catheter based Raman spectroscopy in human atherosclerotic plaque ex vivo. *Heart*, 2003, v. 89, № 9, p. 1078-1082.
24. Deinum G., Rodriguez D., Romer T.J., Fitzmaurice M., Kramer J.R., Feld M.S. Histological classification of Raman spectra of human coronary artery atherosclerosis using principal component analysis. *Applied Spectroscopy*, 1999, v. 53, p. 938-942.
25. Владимиров Ю.А. Фотохимия и люминесценция белков. М.: Наука, 1965, 232 с.
26. Dobretsov G.E., Kurek N.K., Syrejschikova T.I., Yakimenko M.N., Clarke D.T., Jones G.R., Munro I.H. Time-resolved spectroscopy of the probe fluorescence in the study of human blood protein dynamic structure on SR beam. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research A*, 2000, v. 448, p. 471-477.

27. Trynda-Lemiesz L., Luczkowski M. Human serum albumin: spectroscopic studies of the paclitaxel binding and proximity relationships with cisplatin and adriamycin. *Journ. Inorg. Biochem.*, 2004, v. 98, № 11, p. 1851-1856.
28. Zamora R., Hidalgo F.J. Comparative methyl linoleate and methyl linoleate oxidation in the presence of bovine serum albumin at several lipid/protein ratios. *Journ. Agric. Food Chem.*, 2003, v. 51, № 16, p. 4661-4667.
29. Bito R., Shikano T., Kawabata H. Isolation and characterization of denatured serum albumin from rats with endotoxiosis. *BBA*, 2003, v. 1646, p. 100-111.
30. Kashiwakuma T., Hasegava A., Kajita T., Takata A., Mori H., Ohta Y., Tanaka E., Kiyosawa K., Tanaka T., Tanaka S., Hattiri N., Kohara M. Detection of hepatitis C virus specific core protein in serum of patients by a sensitive fluorescence enzyme immunoassay (FEIA). *Journal Immunological Methods*, 1996, v. 190, № 1, p. 79-89.
31. Singh A.K., Darshi M. A fluorescence study of (4-((1E,3E)-4-(4-(dimethylamino)phenyl)buta-1,3-dienyl)phenyl)methanol and its bioconjugates with bovine and human serum albumins. *New Journal Chemistry*, 2004, v. 28, № 1, p. 120-126.
32. Gelamo E.L., Silva C.H.T.P., Imasato H., Tabak M. Intraction of bovine (BSA) and human (HSA) serum albumins with ionic surfactants: spectroscopy and modelling. *BBA*, 2002, v. 1594, p. 84-99.
33. Ahmad B., Ahmed M.Z., Haq S.K., Khan R.H. Guanidine hydrochloride denaturation of human serum albumin originates by local unfolding of some stable loops in domain III. *BBA*, 2005, v. 1750, p. 93-102.
34. Салецкий А.М., Мельников А.Г., Правдин А.Б., Кочубей В.И., Мельников Г.В. Структурные изменения в сывороточном альбумине человека по данным кинетики фосфоресценции люминесцентного зонда – эозина. *Журнал Прикладной Спектроскопии*, 2005, т. 72, № 5, с. 660-663.
35. Santra M.K., Banerjee A., Krishnakumar S.S., Rahaman O., Panda D. Multiple-probe analysis of folding and unfolding pathways of human serum albumin. Evidence for a framework mechanism of folding. *Eur. Journ. Biochem.*, 2004, v. 271, p. 1789-1797.
36. Владимиров Ю.А., Добрецов Г.Е. Флуоресцентные зонды в исследовании биологических мембран. М.: Наука, 1980, 320с.