

В. И. СОРОКОВОЙ, Г. Е. ДОБРЕЦОВ, В. А. ПЕТРОВ,
А. Н. НИКИТИНА, Ю. А. ВЛАДИМИРОВ

ДИМЕТИЛАМИНОХАЛКОН КАК ЛЮМИНЕСЦЕНТНЫЙ КРАСИТЕЛЬ, ЧУВСТВИТЕЛЬНЫЙ К КОНФОРМАЦИОННЫМ ИЗМЕНЕНИЯМ В БЕЛКЕ

(Представлено академиком Ю. А. Овчинниковым 3 I 1972)

Среди методов, применяемых для изучения конформационных перестроек в белках, важное место занимает метод «люминесцентного зонда». Преимуществами данной методики является сравнительная простота и доступность, малая чувствительность к эффектам светорассеяния и принципиальная возможность исследования различных зон белковой молекулы. В качестве люминесцентных зондов чаще всего употребляются

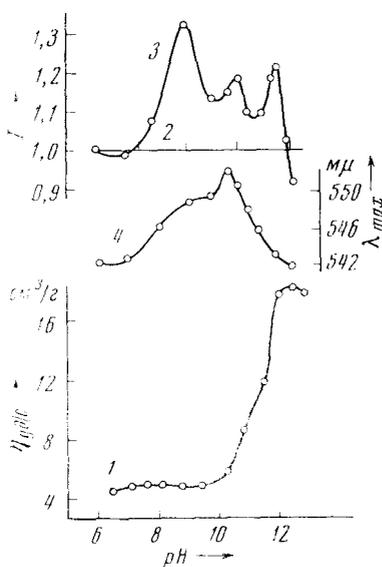


Рис. 1

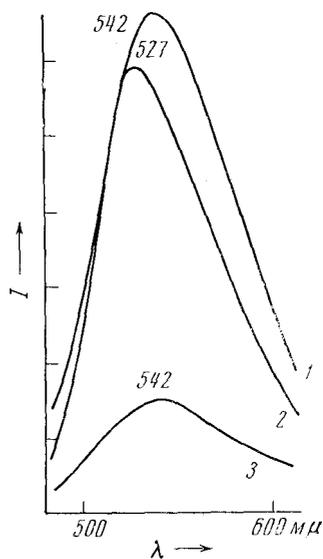


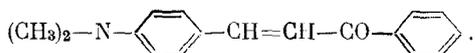
Рис. 2

Рис. 1. Изменения вязкости САЧ и параметров люминесценции комплекса САЧ с ДМХ в зависимости от рН. 1 — приведенная вязкость САЧ, 2 — интенсивность люминесценции взвеси ДМХ в воде, 3 — интенсивность люминесценции ДМХ в комплексе с САЧ, 4 — положение максимума люминесценции ДМХ в комплексе с САЧ. Концентрация САЧ 10 мг/мл в случае изменения вязкости и 1,36 мг/мл в остальных случаях, концентрация ДМХ $2 \cdot 10^{-5}$ М, ДМХ вводился в виде спиртового раствора $2 \cdot 10^{-3}$ М; состав буферного раствора: CH_3COOH 0,01 М, KH_2PO_4 0,01 М, трис 0,01 М

Рис. 2. Спектры люминесценции ДМХ в диметилформамиде (1), в ацетоне (2), в комплексе с САЧ, рН 7 (3)

различные производные нафталинсульфоновой кислоты (1, 2). По величине квантового выхода и положению максимума спектра люминесценции этих красителей можно судить о полярности микроокружения красителя в белке, но наличие заряда у молекулы зонда затрудняет в целом ряде случаев интерпретацию данных (особенно полученных на биологических мембра-

нах (³, ⁴). В связи с этим возникает необходимость употреблять для исследования конформационных изменений в белках гидрофобный люминесцентный зонд, не несущий заряда. Можно было предполагать, что этим требованиям удовлетворяет 4-диметиламинохалкон (ДМХ):



Прежде всего, необходимо было выяснить, пригоден ли этот краситель для определения конформационных переходов в белках. Для этого исследовались изменения параметров его люминесценции в комплексе с сывороточным альбумином человека (САЧ) при изменении pH среды. В работе использовался САЧ фирмы «Реанал» и ДМХ, любезно предоставленный Л. А. Яковской (Институт органической химии Академии наук СССР). Для возбуждения люминесценции применялся свет с длиной волны 436 мμ. Измерения параметров люминесценции производились на спектрофлуориметре с дифракционной решеткой (⁵). Вязкость определяли на капиллярном вискозиметре с диаметром капилляра 0,7 мм и временем истечения растворителя 120 сек. при 20°. Квантовый выход люминесценции определялся по стандартным растворам флуоресценна натрия и розина натрия в 0,1 M растворе NaOH (⁶).

На рис. 1 показаны изменения интенсивности люминесценции (кривая 3), положения максимума спектра люминесценции ДМХ в комплексе с САЧ (кривая 4) и изменения вязкости раствора САЧ (кривая 1) при изменении pH среды. В контрольных опытах параметры люминесценции взвеси ДМХ в воде не изменялись в интервале pH 6,0—13,0 (кривая 2). В области pH 6,8 САЧ представляет собой компактную молекулу, а в более щелочной области pH молекула САЧ вытягивается и набухает (⁷); эти перестройки сопровождаются характерными изменениями вязкости (кривая 1). Кривая зависимости интенсивности люминесценции ДМХ в комплексе с САЧ от pH среды имеет 3 характерных максимума при pH 9,0; 10,5; 12,0; положение максимума спектра люминесценции комплекса ДМХ—САЧ претерпевает обратимый длинноволновый сдвиг, наибольшее значение λ_{max} отмечается при pH 10,5.

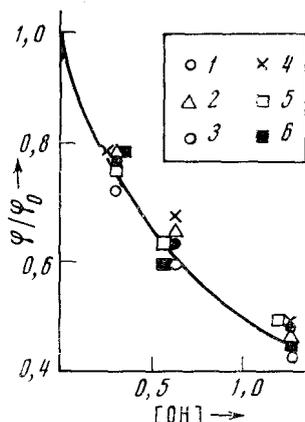


Рис. 3. Тушение люминесценции ДМХ спиртами в диметилформамиде: 1 — метанолом, 2 — этанолом, 3 — изопропанолом, 4 — бутанолом, 5 — изоамиловым спиртом, 6 — водой. Приведенная на рисунке кривая получена из уравнения $\frac{\phi}{\phi_0} = \frac{1}{1 + K \cdot [\text{OH}^-]}$, при $K = 1,0 \text{ M}^{-1}$.

Таблица 1

Параметры люминесценции ДМХ в различных растворителях

Растворитель	Диэлектрическая проницаемость	Максимум люминесценции, мμ	Квантовый выход
Толуол	2,43	470 ± 3	0,027
Ацетон	20,74	527 ± 2	0,17
Диметилформамид	37,6	542 ± 2	0,24
Раствор САЧ с ДМХ в воде, pH 7	—	542 ± 3	0,05
Изоамиловый спирт	14,7	544 ± 3	0,06
Этанол 96%	25,2	556 ± 6	0,01

При сравнении данных по изменениям вязкости САЧ и параметров люминесценции комплекса ДМХ — САЧ видно, что последние более чувствительны к перестройкам молекулы белка.

Необходимо было исследовать влияние среды на интенсивность и положение максимума люминесценции ДМХ, поскольку это представляет интерес с точки зрения интерпретации данных по изменению этих параметров в комплексе ДМХ — белок. Данные представлены в табл. 1. Спектры люминесценции показаны на рис. 2.

Приведенные данные свидетельствуют о том, что при увеличении диэлектрической постоянной среды в ряду толуол — диметилформамид увеличивается квантовый выход и наблюдается длинноволновое смещение максимума люминесценции ДМХ. Вместе с этим ДМХ в спиртах имеет аномально низкий квантовый выход и длинноволновое положение максимума люминесценции. Возможно, это объясняется специфически взаимодействием спиртов с красителем (например, образованием водородной связи между ОН-группами спиртов и молекулой ДМХ). В связи с этим был исследован эффект тушения люминесценции ДМХ в диметилформамиде спиртами и водой. Результаты приведены на рис. 3. Как видно из рисунка, тушение ДМХ малыми концентрациями спиртов и воды (до 1,25 *M*) зависит только от молярной концентрации ОН-групп и хорошо описывается уравнением $\varphi/\varphi_0 = 1/(1 + K[\text{ОН}])$, где φ/φ_0 — отношение квантовых выходов люминесценции ДМХ при разных концентрациях ОН-групп, ОН — молярная концентрация ОН-групп, *K* — константа равновесия нефлуоресцирующего комплекса ДМХ — спирт.

Таким образом, диметиламинохалкон является люминесцирующим соединением, весьма чувствительным к конформационным перестройкам в белке. Гидроксильные группы спиртов и воды вызывают тушение люминесценции диметиламинохалкона.

Второй Московский государственный
медицинский институт им. Н. И. Пирогова

Институт органической химии
Академии наук СССР
Москва

Поступило
28 XII 1971

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ L. Stryer, *Science*, **162**, 526 (1968). ² A. Azzi, B. Chance et al., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **62**, 612 (1969). ³ A. Azzi, *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, **37**, 254 (1969). ⁴ A. A. Jasaitis, V. V. Kulene, V. P. Sculachev, *Biochim. et biophys. acta*, **234**, 177 (1971). ⁵ Г. И. Клебанов, В. И. Сороковой, Ю. А. Владимиров, *Мол. биол.*, (1972). ⁶ C. A. Parker, W. T. Rees, *Analyst*, **85**, 587 (1960). ⁷ М. Жоли, *Физическая химия денатурации белков*, М., 1968, ч. 2, раздел II.