

УДК 541.6+577.15

ФИЗИЧЕСКАЯ ХИМИЯ

М. В. ГЕНКИН, Р. М. ДАВЫДОВ, Д. Ш. БУРБАЕВ,
Л. А. БЛЮМЕНФЕЛЬД

ИССЛЕДОВАНИЕ ИММОБИЛИЗИРОВАННОГО ЦИТОХРОМА с СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕСКИ И МЕТОДОМ Э.П.Р.

(Представлено академиком В. Н. Кондратьевым 13 VI 1975)

В последнее время все большее внимание исследователей привлекает проблема иммобилизованных ферментов (^{1, 2}). В большинстве случаев иммобилизация белков осуществляется либо адсорбционным или ковалентным связыванием с поверхностью носителя, либо включением в полимерные гели. В работах (³⁻⁶) подробно исследовались адсорбционные и каталитические свойства белков на поверхности аэросила, силикагелей, алюмогелей, сажи, а также на монослоях липидов, предварительно нанесенных на поверхности этих носителей. Полученные результаты позволили авторам сделать определенные выводы о наличии конформационных изменений белков при иммобилизации.

Однако лишь кинетический подход к исследованию свойств иммобилизованных ферментов, который наиболее часто используется при изучении этих систем, является необходимым, но далеко не достаточным для выяснения механизма действия матрицы при иммобилизации. Применение физико-химических (в частности, спектральных) методов позволило бы получить дополнительную информацию о влиянии поверхности на белки.

В настоящей работе исследованы спектральные характеристики цитохрома с, адсорбированного на силихроме и на монослое лецитина, предварительно нанесенного на поверхность силихрома. В качестве адсорбента использовался силихром-120; лецитин получали из куриных яиц по методу (⁷). Липид наносился на поверхность силихрома из раствора хлороформа в количестве, соответствующем монослойному заполнению (⁸). Цитохром с (Краков — Польша), очищали на сефадексе G-50. Для оптических измерений образцы готовились адсорбцией цитохрома с из 0,05 М водных буферных растворов по методу (⁹). Спектры поглощения суспензий, состоящих из 10 мг носителя с адсорбированным цитохромом с и 1 мл буферного раствора, снимались на двухлучевом дифференциальном спектрофотометре ДСД 2. В кювету сравнения помещалась водная суспензия носителя. Спектры э.п.р. регистрировались на радиоспектрометре ЭПР2 ИХФ при температурах 20° К. В э.п.р. измерениях использовались образцы, содержащие 100 мг носителя.

На рис. 1 приведены спектры поглощения окисленного цитохрома с в растворе и адсорбированного на носителе. Спектры 1 и 7 соответствуют растворам цитохрома с в воде при pH 2,0 и 7,0. Изменение спектральных характеристик белка при понижении pH связано с переходом гемового Fe(III) из низкоспинового в высокоспиновое состояние и объясняется отходом 6-го лиганда (мет-80) от железа. Спектр цитохрома с, адсорбированного на силихроме при pH 7,0 (рис. 1, 5) отличается от соответствующего спектра белка в растворе (рис. 1, 1) появлением плеча в области 614 нм, появлением максимума при 495 нм и падением интенсивности полосы при 528 нм. Сопоставление спектров цитохрома с при pH 2,0 в растворе (рис. 1, 1) и адсорбированного на силихроме (рис. 1, 2) указывает на наличие высокоспинового Fe(III) в иммобилизованном белке.

Однако при сорбции белка соотношение между интенсивностями полос спектра изменяется. Это по-видимому, связано с конформационными изменениями белка при иммобилизации. Из зависимости спектральных характеристик адсорбированного цитохрома с от pH среды следует, что уже при pH 5,0 (рис. 1, 3) почти весь белок находится в высокоспиновом состоянии, тогда как в растворе изменение спинового состояния железа наблюдается лишь при pH, меньших 2,5. В интервале pH от 5 до 8 адсорбированный белок существует в двух спиновых состояниях, которые находятся в динамическом равновесии. Аналогичные результаты получа-

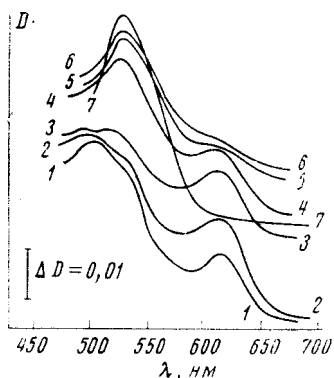


Рис. 1

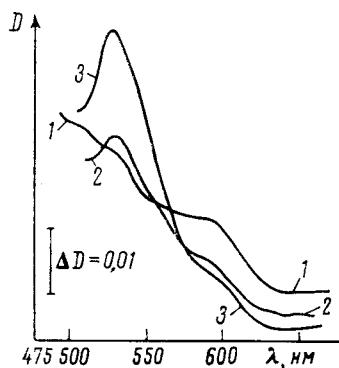


Рис. 2

Рис. 1. Спектры поглощения цитохрома с. 1, 7 — растворы $4 \cdot 10^{-5}$ М белка при pH 2 и 7 соответственно; 2, 3, 4, 5, 6 — спектры поглощения белка, адсорбированного на силихроме при pH 2, 5, 6, 7 и 8 соответственно

Рис. 2. Спектры поглощения цитохрома с, адсорбированного на монослойе лецитина, нанесенного на силихром. 1 — pH 5, 2 — pH 6, 3 — pH 7

ются при замене носителя силихром-120 на аэросилы различных марок. На рис. 2, 3 приведен спектр цитохрома с, адсорбированного из буферного раствора при pH 7,0 на монослой лецитина. Этот спектр, как и в случае белка, иммобилизованного на силихроме, отличается от спектра цитохрома с в растворе (рис. 1, 1) появлением дополнительного плеча в области 610 нм и от спектра белка, адсорбированного на силихроме, тем, что плечо выражено несколько слабее. Спектры цитохрома с, адсорбированного на монослойе лецитина при pH 5,0 и 6,0 (рис. 2, 1, 2), отличаются от соответствующих спектров 3 и 4 (рис. 1) тем, что минимум при 585 нм не такой глубокий. Во всех случаях добавление к адсорбированному феррицитохрому с 100-кратного избытка аскорбата натрия приводило лишь к частичному восстановлению белка и не изменяло интенсивности полосы в области 610 нм. Этот факт подтверждает наличие на поверхности, по крайней мере, двух форм иммобилизованного цитохрома с, одна из которых (высокоспиновая) не восстанавливается аскорбатом.

В работе (11) было показано, что пероксидазная удельная активность адсорбированного цитохрома с зависит от степени заполнения поверхности. Поэтому представляло интерес исследовать, влияет ли степень заполнения поверхности носителя на соотношение между высокоспиновым и низкоспиновым состояниями адсорбированного цитохрома с.

На рис. 3 приведены спектры э.п.р. феррицитохрома с при температуре 20°K в растворе и адсорбированного на поверхности лецитина при pH 7,0. Спектр э.п.р. белка состоит из двух сигналов: сигнал э.п.р. с g-факторами 6,0 и 2,0 характерен для высокоспиновых ферригемов (11), сигнал со значениями g-факторов 3,1, 2,2 и 1,2 (компонента с g 1,2 не показана на рис. 3) обусловлен низкоспиновым феррицитохромом (12). Из спектров а, б и в, приведенных на рис. 3, следует, что при

адсорбции на поверхности значительно увеличивается доля высокоспинового цитохрома с. При поверхностной концентрации цитохрома с 10^{-7} мол/м² отношение амплитуд компонент спектра при g -факторе 6,0 и при g -факторе 3,1 в случае адсорбции белка на силихrome и лецитине равны соответственно 1,45 и 1,6. При 5-кратном уменьшении поверхностной концентрации белка это отношение увеличивается для силихрома примерно в 4,5 раза, для лецитина — в 2 раза. В спектре э.п.р. цитохрома с, адсорбированного на поверхности лецитина, наблюдается появление

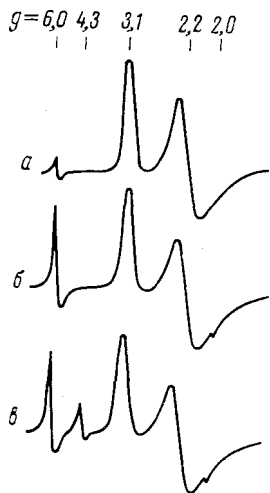


Рис. 3. Спектры э.п.р. цитохрома с при 20° К. Мощность СВч равна 2 мвт/м, амплитуда модуляции 6 гс, $\nu_{\text{СВЧ}}=9440$. а — 10^{-3} М цитохрома с в растворе pH 7; б — цитохром с, адсорбированный на аэросиле (10^{-7} мол/м²) при pH 7; в — цитохром с, адсорбированный на монослое лецитина (10^{-7} мол/м²) при pH 7

нового сигнала при g 4,3. Этот сигнал типичен для соединений, содержащих высокоспиновое железо в ромбическом окружении (¹³). Он часто наблюдается при денатурации железо-серных белков, например нитрогеназы (¹⁴). Однако в данном случае, ввиду прочности связи железа с гемом, причина появления этого сигнала не ясна и требует дополнительного исследования.

Полученные данные свидетельствуют о том, что иммобилизация цитохрома с оказывает значительное воздействие на состояние активного центра белка.

Авторы приносят благодарность О. В. Крылову за обсуждение результатов.

Институт химической физики
Академии наук СССР
Москва

Поступило
9 VI 1975

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ И. В. Березин, Вестн. АН СССР, № 8, 52 (1974). ² А. И. Кёснер, Усп. хим., т. 43, № 8, 1480 (1974). ³ О. М. Полторац, Е. С. Воробьева, Вестн. МГУ, сер. химич., т. 5, 41 (1967). ⁴ О. М. Полторац, Е. С. Воробьева, ЖФХ, т. 40, № 7, 1665 (1966). ⁵ Е. С. Чухрай, О. М. Полторац, Вестн. МГУ, сер. химич., т. 11, № 1, 10 (1970). ⁶ М. Н. Веселова, Е. С. Чухрай, О. М. Полторац, Вестн. МГУ, сер. химич., т. 11, № 1, 14 (1970). ⁷ В. П. Волкова, Канд. дисс., ИХПС, М., 1967. ⁸ Е. А. Тверикова, Н. И. Лобода и др., Вестн. МГУ, сер. химич., № 5, 526 (1971). ⁹ А. Л. Камышный, Е. С. Чухрай, О. М. Полторац, Вестн. МГУ, сер. химич., т. 14, № 2, 142 (1973). ¹⁰ А. Л. Камышный, Е. С. Чухрай, О. М. Полторац, ЖФХ, т. 47, 883 (1973). ¹¹ А. J. Bearden, Biochem. Biophys. Res. Commun., v. 61, 265 (1974). ¹² D. O. Laubeth, K. L. Campbell et al., J. Biol. Chem., v. 248, 8130 (1973). ¹³ R. Aasa, J. Chem. Phys., v. 52, 3919 (1970). ¹⁴ L. C. Davic, V. K. Shah et al., Biochim. et biophys. acta, v. 52, 3919 (1970).