

УДК 577.3

БИОФИЗИКА

В. С. ДАНИЛОВ, С. Н. ОРЛОВ, В. Г. РЕБРОВ, А. С. ШЕВЧЕНКО

**ИССЛЕДОВАНИЕ КИНЕТИЧЕСКИХ ОСОБЕННОСТЕЙ
СВЯЗЫВАНИЯ ПРИРОДНЫХ ЖИРНЫХ КИСЛОТ МОЛЕКУЛАМИ
СЫВОРОТОЧНОГО АЛЬБУМИНА МЕТОДОМ ФЛУОРЕСЦЕНТНЫХ
ЗОНДОВ**

(Представлено академиком А. Л. Курсановым 20 X 1975)

Необычайно высокое сродство молекул сывороточных альбуминов к липидам широко известно (^{1, 2}). Тем не менее, кинетические закономерности процесса сорбции и природа сил, стабилизирующих этот белок-липидный комплекс, изучены недостаточно. В данной работе кинетика взаимодействия бычий сывороточный альбумин — жирная кислота исследовалась методом измерения флуоресценции молекул-зондов, сорбированных на комплексе.

В работе использовали: а) бычий сывороточный альбумин (БСА) — «Pentex Inc.», Illinois, США; б) жирные кислоты (ЖК): лауриновую $C_{12:0}$; линолеовую $C_{18:2}$; арахидоновую $C_{20:4}$ — «Nutritional Biochem. Corp.», США; олеиновую $C_{18:1}$ — «Science Study Lab. Inc.», США; пальмитиновую $C_{16:0}$ — «Союзхимреактив»; в) метиловый эфир стеариновой кислоты, $C_{18:0}$ — C_1 — «Nutritional Biochem. Corp.», США. Флуоресцентные красители — анионный (1-анилинонафталин-8-сульфонат, АНС) и нейтральный (N-фенил-1-нафтиламин, ФНА) использовали в перекристаллизованном виде и растворяли в воде и метаноле, соответственно 10^{-3} М. Метилстеарат растворяли в пропаноле, ЖК омыляли двукратным по молярности раствором КОН. Концентрация БСА в кювете была 10^{-5} М. Среда инкубации 50 мМ трис-HCl-буфер, pH 7,5. Увеличение ионной силы раствора (μ) достигали $MgCl_2$. Подсчет величин константы связывания (K), величины квантового выхода флуоресценции (η) и числа мест связывания (n — относительные единицы) проводили в соответствии с работой (³). Схема флуориметра описана ранее (⁴). Для оценки степени кооперативности кинетики сорбции ЖК использовали построение экспериментальных данных в координатах Аткинсона (⁵)

$$\lg I / (I_{\max} - I) = n' \lg C_{\pi} - \lg K.$$

Здесь $I_{\text{фл. max}}$ соответствует наибольшему изменению интенсивности флуоресценции комплекса БСА-зонд при воздействии ЖК, C_{π} — концентрация ЖК, n' — эффективное число мест связывания, являющееся показателем кооперативности процесса.

Проведенные эксперименты показали, что при pH 7,5 АНС фактически не связывается с водными эмульсиями ЖК, ФНА не связывается с эмульсиями предельных ЖК, а на ненасыщенных ЖК этот краситель обладает в 10–100 раз меньшими значениями K и η , нежели при его сорбции на молекулах БСА.

Флуориметрическое титрование комплексов БСА — АНС (рис. 1) и БСА — ФНА (рис. 2) предельными ЖК и эфиром ЖК выявляет экспоненциальный характер падения интенсивности флуоресценции во всех исследованных случаях. Сравнение этих данных с данными, представленными в табл. 1, указывает, очевидно, на конкурентный характер взаимоотношений зонд — ЖК за места связывания в сорбирующих объемах БСА. В самом деле, в процессе сорбции ЖК не происходит заметного изменения пара-

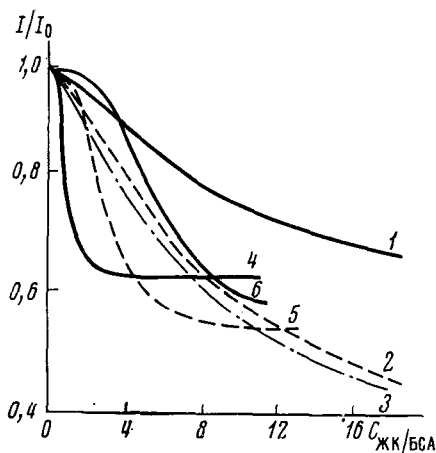


Рис. 1

Рис. 1. Изменение флуоресценции АНС-зонда, сорбированного на БСА, при комплексовании последнего с жирными кислотами. 1 — метилстеарат; 2, 3, 4, 5, 6 — лауриновая, пальмитиновая, олеиновая, линолевая и арахионовая кислоты соответственно

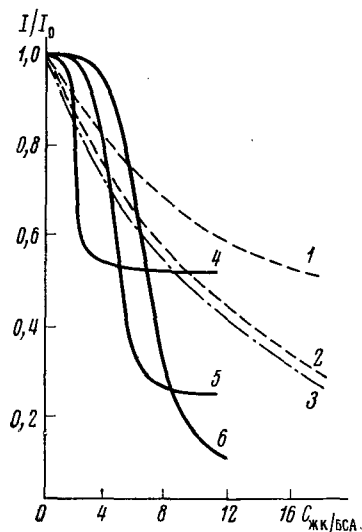


Рис. 2

Рис. 2. Изменение флуоресценции ФНА-зонда, сорбированного на БСА, при комплексовании последнего с жирными кислотами. Обозначения аналогичны рис. 1

Рис. 3. Кривые флуориметрического титрования олеиновой (1), линолевой (2) и арахионовой (3) кислотами комплекса БСА — АНС в координатах Аткинсона

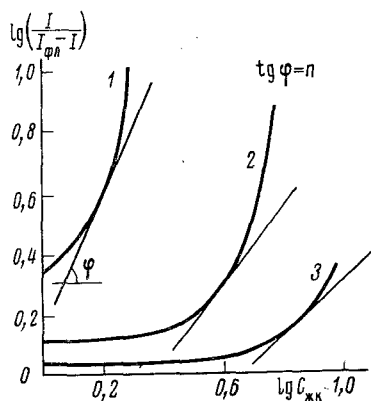


Рис. 3

метра их микроокружения АНС и ФНА — значения квантового выхода флуоресценции, в то время как число мест связывания уменьшается для случая зонда АНС на 25—20%, а для ФНА на 20—15%.

При повышенной ионной силе раствора ($\mu=3$) добавление ЖК фактически не влияет на интенсивность флуоресценции как АНС-, так и ФНА-зондов, сорбированных на БСА. Метилловый эфир стеариновой кислоты в случае ФНА-зонда дает в два раза меньший эффект вытеснения красителя, нежели в экспериментах без $MgCl_2$. Интересно отметить, что вытеснение АНС-зонда метилстеарат проводит в два раза эффективнее при $\mu=3$. Эти эксперименты указывают на существенный вклад электростатических взаимодействий карбоксильных групп ЖК с заряженными группировками белка в процессе сорбции ЖК на БСА.

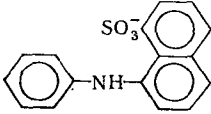
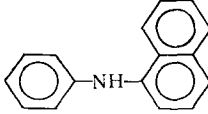
Изменение флуоресценции обоих зондов при сорбции БСА ненасыщенных ЖК имеет, в отличие от их непредельных аналогов, отчетливо выраженный S-образный характер. Естественно предположить, что основной причиной подобного отличия ненасыщенных и насыщенных ЖК является совокупность эффектов стерической конформации и избыточной электронной плотности, вносимых двойными связями гидрокарбоновой цепи. Именно для ненасыщенных ЖК происходит при их сорбции на БСА изменение параметров среды микроокружения зондов (см. табл. 1). Эффект

имеет весьма сложную количественную закономерность. Для его насыщения хватает двух двойных связей олеиновой кислоты, 12–14 двойных связей линолевой кислоты и 40–48 двойных связей арахидоновой кислоты.

Методом солюбилизации с углеводородами в молекулах БСА обнаружено 4 типа зон, причем зона, представленная в единственном числе, имеет объем 3000 Å³, в то время как остальные 12–15 щелей занимают в 10 раз меньший объем⁽⁹⁾. Совпадение мольных соотношений связывания БСА с различными ЖК, полученных методом измерения флуоресценции

Таблица 1

Параметры флуоресценции АНС- и ФНА-зондов в системах БСА и БСА – ЖК*
при $\mu=0$ и $\mu=3$

ЖК	АНС 						ФНА 					
	K, 10 ⁴ M ⁻¹		η		n		K, 10 ⁴ M ⁻¹		η		n	
	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3
	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3
БСА	2,3	3,0	0,56	0,63	750	800	1,2	1,7	0,73	0,80	264	262
БСА+C _{12:0}	2,1	2,9	0,55	0,63	600	790	1,2	1,7	0,70	0,80	210	260
БСА+C _{16:0}	2,1	3,0	0,54	0,63	620	790	1,2	1,7	0,72	0,80	210	260
БСА+C _{18:0} C ₁	2,3	2,9	0,55	0,63	640	770	1,2	1,7	0,70	0,80	220	230
БСА+C _{18:1}	2,1	2,7	0,44	0,60	750	790	0,9	1,7	0,53	0,80	260	260
БСА+C _{18:2}	2,1	2,6	0,43	0,59	730	780	0,8	1,7	0,45	0,85	240	240
БСА+C _{20:4}	2,2	2,6	0,41	0,59	720	780	0,8	1,2	0,40	0,85	230	260

* Измерения проводили при мольном отношении предельные ЖК: БСА=20, C₁₈:1:БСА=6, C₂₀:4:БСА=12.

АНС- и ФНА-зондов, а также уменьшение интенсивности флуоресценции ФНА при введении $12 \cdot 10^{-5}$ M арахидоновой кислоты более чем на 85% указывает на то, что скорее всего для самой большой зоны БСА промерены истинные величины связывания. На это указывают также построения кривых флуорометрического титрования в координатах Аткинсона. Наиболее кооперативным эффектом обладает олеиновая кислота, причем $n=2, 3$ (рис. 3) хорошо коррелирует с числом мест связывания по данным рис. 1 и 2. Большая эффективность олеиновой кислоты по отношению к изменению гидрофобности зон сорбции красителя определяется высокой реакционной способностью π -электронов двойной связи, вынесенной под углом 150° из гидрофобной части гидрокарбонового остова. Более замаскированными оказываются π -электроны линолевой и арахидоновой кислот⁽⁷⁾.

Ненасыщенные ЖК выявляют резкие отличия в температурной зависимости флуоресценции АНС и ФНА (перегиб в аррениусовых координатах при $t=30-39^\circ$), в то время как на комплексах белка с предельными ЖК температурная зависимость выражается на участке $20-60^\circ$ в виде прямой. Как и следовало ожидать, добавление 1 M MgCl₂, блокирующего взаимодействие БСА – ЖК, приводит к сглаживанию подобных переходных процессов.

Московский государственный университет
им. М. В. Ломоносова

Поступило
28 VIII 1975

ЛИТЕРАТУРА

- ¹ R. F. Chen, J. Biol. Chem., v. 242, 173 (1967).
- ² B. L. Fletcher, A. L. Tappel, Lipids, v. 6, 172 (1971).
- ³ H. Träuble, P. Overath, Biochim. et biophys. acta, v. 307, 491 (1973).
- ⁴ С. Н. Орлов, В. С. Данилов, В сб.: Физико-химические основы функционирования надмолекулярных структур клетки, ч. II, М., 1974, стр. 49.
- ⁵ С. В. Конев, С. Л. Аксенцев, Е. А. Черныцкий, Кооперативные переходы белков в клетке, Минск, 1970.
- ⁶ А. В. Волюнская, В. Н. Измайлова, В. А. Пчелин, Биофизика, т. 18, № 2, 210 (1973).
- ⁷ L. Saunders, Biochim. et biophys. acta, v. 195, 70 (1966).