

Ю. МЕТС, М. ПООГА, П. КАСК, Э. ЛИППМАА

ИССЛЕДОВАНИЕ ВРАЩАТЕЛЬНОЙ ДИФФУЗИИ КАРБОАНГИДРАЗЫ В И α -ЛАКТАЛЬБУМИНА МЕТОДОМ ДИНАМИЧЕСКОЙ ДЕПОЛЯРИЗАЦИИ ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ

Методом динамической деполаризации флуоресценции оценено время релаксации вращательной диффузии карбоангидразы В крупного рогатого скота и коровьего α -лактальбумина, меченных изотиоцианатом тетраметилпродамина, в зависимости от концентрации, температуры и рН водного раствора.

1. Введение

Метод динамической деполаризации флуоресценции [1,2] вместе с коррелированным во времени счетом фотонов является наиболее чувствительным и прямым методом исследования ориентационной динамики флуоресцирующих молекул в нано- и пикосекундном диапазонах. Метод состоит в оптическом возбуждении исследуемого раствора коротким поляризованным световым импульсом и в последующем измерении анизотропии флуоресценции, которая уменьшается со временем в результате ориентационного движения возбужденных молекул. Временное разрешение метода определяется в основном разбросом времен пролета электронов в фотоэлектронном умножителе; в новейших микроканальных умножителях он доведен до значения 60 пс [3]. Карбоангидраза В крупного рогатого скота и коровий α -лактальбумин представляют интерес, так как имеют частично денатурированные состояния, которые до сих пор исследовались только статическими оптическими методами [4]. Для исследования внутримолекулярной динамики этих белков методом ЯМР-спектроскопии [5] требуется независимая оценка коэффициента вращательной диффузии молекулы как целого при высоких концентрациях белка в растворе.

2. Экспериментальная установка

Источником возбуждения в установке (рис. 1) служит аргоновый лазер с синхронизацией мод («Spectra-Physics 165»), частота следования выходных импульсов которого уменьшается до 800 кГц устройством сброса добротности УСД («Spectra-Physics 344»). Возбуждающий свет направляется через ослабляющие фильтры Ф и объектив микроскопа О в термостатированную кювету ТК, в которой находится примерно 10 мм³ исследуемого раствора. Флуоресценция регистрируется под прямым углом к возбуждающему лучу через объектив микроскопа О и вращаемый поляризатор П фотоэлектронным умножителем ФЭУ (ФЭУ-79) в режиме счета фотонов. Рассеянный свет лазера с длиной волны 514,5 нм поглощается стеклянными фильтрами Ф (ОС-11 и КС-11). Выходные импульсы ФЭУ поступают через предварительный усилитель и дискриминатор ДПД, срабатывающий от постоянной доли амплитуды, на вход

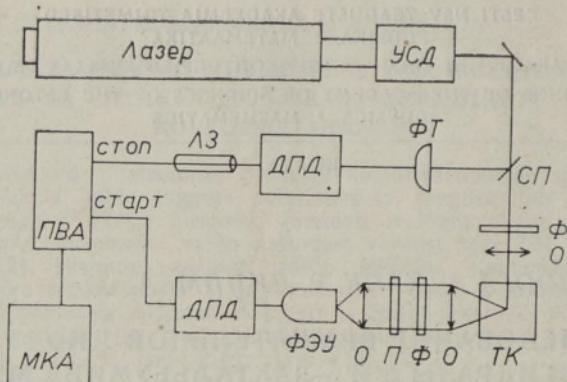


Рис. 1. Схема экспериментальной установки. УСД — устройство сброса добротности лазера, СП — стеклянная пластина, ФТ — фототранзистор, ДПД — дискриминатор, срабатывающий от постоянной доли амплитуды, ЛЗ — линия задержки, ПВА — преобразователь время—амплитуда, Ф — стеклянные фильтры, О — объективы, ТК — термостатированная кювета, П — вращаемый поляризатор, ФЭУ — фотоэлектронный умножитель, МКА — многоканальный амплитудный анализатор.

«старт» преобразователя время—амплитуда ПВА (САМАС 1701, «Polop»). Через другой дискриминатор, также срабатывающий от постоянной доли амплитуды, поступают импульсы на вход «стоп» того же преобразователя с быстрого фототранзистора ФТ (КП 307Д), на который сфокусирована доля лазерного луча, отраженная от стеклянной пластины СП. Выходные импульсы ПВА направляются в многоканальный анализатор (NTA-1024, EMG), работающий в режиме анализа амплитуды. Накопленные данные переводятся из анализатора в персональную ЭВМ «Apple II», где происходит также и их обработка. Дискриминатор, срабатывающий от постоянной доли амплитуды, сконструирован на основе схемы, описанной в [6].

3. Обработка данных

Обозначим через $i_{\parallel}(t)$ и $i_{\perp}(t)$ компоненты флуоресценции, соответствующие бесконечно короткому поляризованному возбуждающему импульсу в момент времени $t=0$; первая из них поляризована параллельно поляризации возбуждения, вторая — перпендикулярно. Затухание флуоресценции выражается суммой этих компонент

$$s(t) = i_{\parallel}(t) + 2i_{\perp}(t). \quad (1)$$

Через разность компонент интенсивности

$$v(t) = i_{\parallel}(t) - i_{\perp}(t) \quad (2)$$

выражается независящая от интенсивности анизотропия флуоресценции

$$r(t) = v(t)/s(t). \quad (3)$$

Аппаратурная функция измерительной системы $E(t)$ образуется длительностью возбуждающих импульсов и разбросом времен отклика фотодетектора. Форма аппаратурной функции слегка зависит от длины волны регистрируемого излучения. Аппаратурную функцию на длинах волн флуоресценции можно с достаточной точностью определить, если вместо флуоресценции регистрировать комбинационное рассеяние от воды. Полуширина аппаратурной функции использованной установки

примерно 550 пс. Полученные из эксперимента сумма $S(t)$ и разность $V(t)$ зарегистрированных интенсивностей представляют собой свёртку аппаратурной функции с истинным ходом интенсивности

$$S(t) = \int_0^{\infty} E(t-t')s(t') dt', \quad (4)$$

$$V(t) = \int_0^{\infty} E(t-t')v(t') dt'. \quad (5)$$

Зная $S(t)$ и $V(t)$ оценим функцию $r(t)$ следующим образом. Сначала предположим, что затухание флуоресценции описывается суммой экспоненциальных функций. Тогда выражение (4) принимает вид:

$$S(t) = \int_0^{\infty} E(t-t') \sum_{i=1}^n b_i \exp(-t'/\Phi_i) dt'. \quad (6)$$

Приближение экспериментальных значений выражением (6) позволяет оценить параметры b_i и Φ_i . Предполагая, что все компоненты в затухании флуоресценции имеют одинаковую функцию анизотропии

$$r(t) = \sum_{j=1}^m a_j \exp(-t/\tau_j), \quad (7)$$

можем переписать выражение для $V(t)$ в виде:

$$V(t) = \int_0^{\infty} E(t-t') \sum_{j=1}^m a_j \exp(-t'/\tau_j) \sum_{i=1}^n b_i \exp(-t'/\Phi_i) dt'. \quad (8)$$

Используя определенные ранее параметры b_i и Φ_i , оценим по выражению (8) параметры a_j и τ_j . Приближение проведено по нелинейному ме-

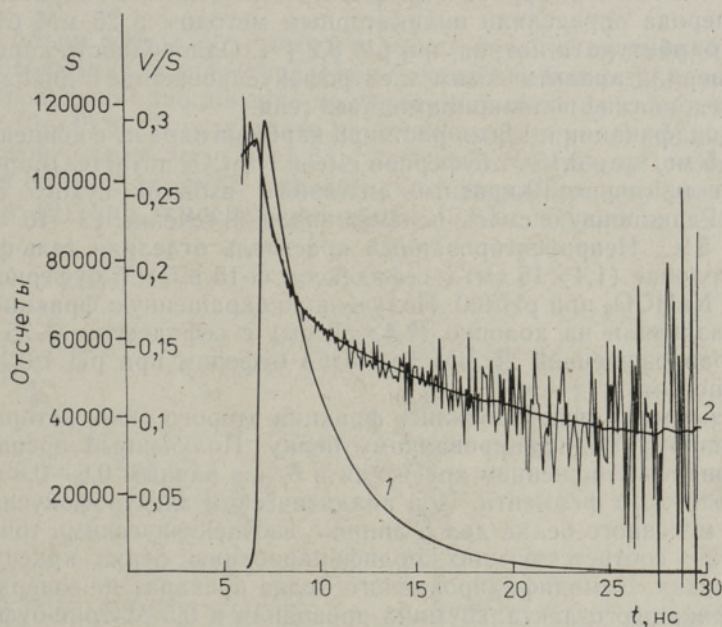


Рис. 2. Результат типичного измерения корреляционного времени вращения. 1 — сумма зарегистрированных компонент флуоресценции $S(t)$, 2 — отношение $V(t)/S(t)$ и кривая приближения для него.

тому наименьших квадратов [7, 8]. В целях увеличения точности приближения учитывается временной сдвиг между зарегистрированными кривыми флуоресценции и используемой при вычислениях аппаратурной функцией ($E(t)$ заменяется на $E(t+a)$ и a варьируется).

Ошибка измерений определена как стандартное отклонение от среднего по результатам нескольких экспериментов. При высоких концентрациях к ошибке измерения (определяемой дрейфом электроники) добавляется еще ошибка, обусловленная плохой воспроизводимостью исследуемых растворов. В качестве примера на рис. 2. приведены результаты измерения карбоангидразы в нейтральном разбавленном (10^{-6} М) растворе при 13°C . В данном случае $m=2$ и $n=3$. Видно увеличение шума на конце кривой анизотропии, что обусловлено уменьшением отношения сигнал—шум для величины $S(t)$, на которую делится $V(t)$. Отсюда видно, что быстрое затухание флуоресценции определяет верхний предел надежно определяемых времен вращения.

4. Образцы

В работе исследовали карбоангидразу В (К.Ф.4.2.1.1) крупного рогатого скота, полученную по методу Линдскога [9], и коровий α -лактальбумин, приготовленный в Институте белка АН СССР [10]. Использовали изотиоцианат тетраметилпродамина — ТРИТЦ фирмы «Fluka» (Швейцария), трис фирмы «Merck» (ФРГ), сефадексы G-15 и G-75 фирмы «Pharmacia Fine Chemicals» (Швеция). Остальные реактивы (о.ч. и х.ч.) отечественного производства; все растворы приготовлены в бидистиллированной воде.

Количество белка и красителя определяли по величине поглощения на длине волны 280 и 554 нм соответственно ($\epsilon_{280}=5,7 \times 10^4$ для карбоангидразы, 3×10^4 для α -лактальбумина и $\epsilon_{554}=4,8 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ см}^{-1}$ для ТРИТЦ). Активность карбоангидразы по отношению к гидратации двуокиси углерода определяли индикаторным методом в 25 мМ буферном растворе барбитурата натрия при рН 8,2 [9]. Однородность карбоангидразы проверяли аналитическим электрофокусированием в диапазоне рН 3,5—10 на пластине полиакриламидного геля.

Для модификации к 1,5 мл раствора карбоангидразы с концентрацией белка 4—5 мг/мл в 0,15 М буферной смеси Na_2CO_3 и NaHCO_3 при рН 9,0 добавляли примерно 10-кратный молярный избыток сухого порошка ТРИТЦ. Реакционную смесь перемешивали в течение 12—16 ч в темноте при 5°C . Непрореагировавший краситель отделяли гель-фильтрацией на колонке ($1,4 \times 15$ см) с сефадексом G-15 в 5 мМ буферной смеси Na_2CO_3 и NaHCO_3 при рН 9,0. Полученную окрашенную фракцию белка (2 мл) разделяли на колонке ($1,4 \times 30$ см) с сефадексом G-75 (суперфайн), уравновешенной 25 мМ трис-НСl буфером при рН 7,0, собирая фракции по 2 мл.

Для измерений использовались фракции второго пика, который отвечает активному модифицированному белку. Полученный препарат характеризовался отношением красителя и белка равным 0,6—0,8 и активностью нативного фермента. При аналитическом электрофокусировании препарат меченного белка дал 5 линий с изоэлектрическими точками от 6,1 до 6,25, соответствующих модифицированию белка красителем в разных точках. Немодифицированного белка препарат не содержал.

Модификацию α -лактальбумина проводили в 0,5 М трис-буфере при рН 7,5 таким же образом; отношение метка/белок для полученного препарата равнялось 0,44.

Концентрация меченного белка во всех растворах при измерении вращательной диффузии была 5×10^{-7} М.

5. Результаты и обсуждение

Для описания затухания флуоресценции как свободного, так и связанного с белком ТРИТЦ при достигаемой в эксперименте точности нужны три компоненты ($n=3$). Затухание анизотропии флуоресценции свободного красителя в водном растворе 10^{-6} М при 13°C описывается одной компонентой с $\tau=0,25\pm 0,02$ нс (в эксперименте по динамической деполяризации флуоресценции постоянная времени τ и коэффициент вращательной диффузии D_r связаны соотношением $\tau=1/6D_r$).

Релаксация анизотропии флуоресценции ТРИТЦ, связанного с карбоангидразой или с лактальбумином, описывается двумя компонентами ($m=2$), что является обычным для красителей, связанных с белком. При этом наиболее медленную компоненту относят к вращательному движению молекулы как целого, а более быстрая компонента, вероятно, связана с внутримолекулярной динамикой. В соответствии с упрощенной моделью для внутримолекулярной динамики, по которой ориентация метки может свободно изменяться в пределах конуса с углом раствора 2Θ [11], величина угла Θ оценена в $27^\circ\pm 2$ и слабо зависит от условий эксперимента. Соответствующее этому движению время релаксации (как для карбоангидразы, так и для лактальбумина в 5×10^{-7} М растворе при 13°C) равно $0,8\pm 0,05$ нс. О внутримолекулярной динамике белка это движение дает лишь косвенную информацию, так как метка может связываться с белком нежестко и, кроме того, возмущать собственные внутримолекулярные движения белка. Учитывая, что метка намного меньше молекулы белка, медленную компоненту можно с достаточной точностью отнести к вращению молекулы белка как целого.

Температурная зависимость медленной компоненты релаксации для нейтрального разбавленного раствора карбоангидразы ($3,4\times 10^{-6}$ М) (рис. 3) показывает медленный дрейф в установке. Кривая соответствует формуле Эйнштейна

$$\tau = V\eta/kT, \quad (9)$$

где V — объем сферы, η — вязкость среды, k — постоянная Больцмана и T — абсолютная температура. Использована табулированная вязкость воды и проведено приближение по методу наименьших квадратов в промежутке $10-45^\circ\text{C}$. В результате приближения получена оценка объема сферической молекулы ($V=5,53\times 10^{-20}$ см³), которому соответствует удельный объем $1,13$ см³/г. Отклонения от поведения, описываемого выражением (9) при температурах выше 45°C , связаны с изменением

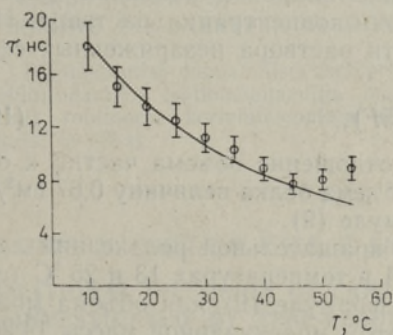


Рис. 3. Температурная зависимость корреляционного времени вращения карбоангидразы V при концентрации $3,4\times 10^{-6}$ М.

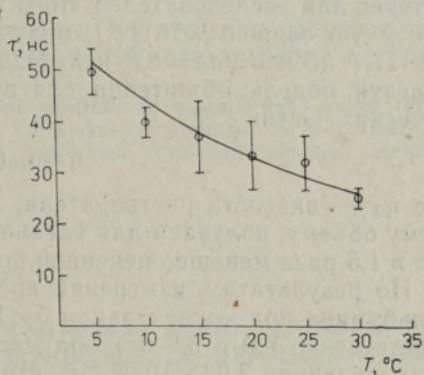


Рис. 4. Температурная зависимость корреляционного времени вращения карбоангидразы V при концентрации $2,9$ мМ.

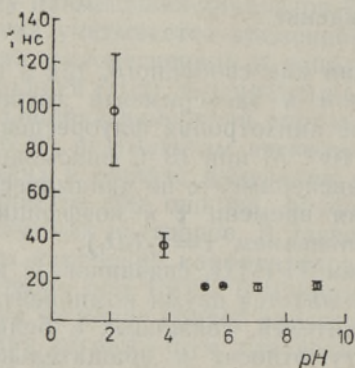


Рис. 5. Зависимость корреляционного времени вращения карбоангидразы В от рН при концентрации 10^{-6} М и температуре 13°C .

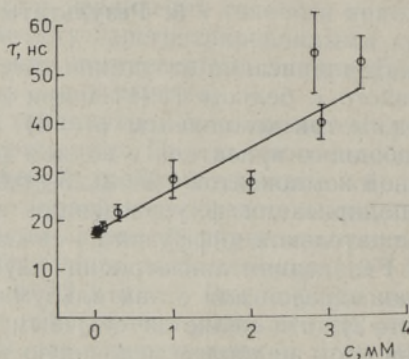


Рис. 6. Зависимость корреляционного времени вращения карбоангидразы В от концентрации при температуре 13°C .

формы или удельного объема молекулы. Понижение температуры до 13°C восстанавливает прежнее время релаксации.

По зависимости времени вращательной релаксации карбоангидразы от температуры при концентрации 2,9 мМ (рис. 4) видно снижение точности измерений, которое при увеличении концентрации обусловлено большим отношением времени вращения к времени затухания флуоресценции. При температурах выше 35°C обнаружилось медленное необратимое денатурирование белка, что привело к плохой воспроизводимости результатов. Кривая отвечает времени вращательной релаксации сферы с объемом, найденным в предыдущем эксперименте, при вязкости среды, в 2,4 раза превышающей вязкость воды.

По зависимости времени вращательной релаксации карбоангидразы от рН раствора при концентрации 10^{-6} М и температуре 13°C (рис. 5) обнаруживается заметное замедление вращения при низких рН. Это свидетельствует о частичной денатурации в широком интервале рН. Большое время релаксации указывает на сохранение глобулярности при рН 3,8 и 2,1, так как наиболее длинная компонента релаксации карбоангидразы, полностью денатурированной гидрохлоридом гуанидиния, равна 4,8 нс, что свидетельствует о большой величине амплитуды взаимных колебаний частей молекулы.

Зависимость времени вращательной релаксации карбоангидразы от концентрации в нейтральном растворе при 13°C (рис. 6) представляет интерес для исследователей этого же белка методом ЯМР. Предполагая линейную зависимость [12], получаем для аппроксимационной прямой $\tau_0 = 17,7$ нс и $d\tau/dc = 8,8$ нс/мМ, где c — концентрация раствора. Используя модель Эйнштейна для вязкости раствора незаряженных сферических частиц [12],

$$\eta = \eta_0(1 + 2,5F), \quad (10)$$

где η_0 — вязкость растворителя, F — отношение объема частиц к общему объему, получаем для удельного объема белка величину $0,67 \text{ см}^3/\text{г}$, что в 1,5 раза меньше оцененной по формуле (9).

По результатам измерений времени вращательной релаксации лактальбумина при концентрации 5×10^{-7} М и температурах 13 и 25°C (соответственно 9,0 и 6,9 нс) получаем по формуле (9) для объема молекулы величину $3,03 \times 10^{-20} \text{ см}^3$, что с учетом молекулярной массы 14 200 приводит к удельному объему $1,29 \text{ см}^3/\text{г}$. При концентрации 4,7 мМ и температуре 13°C время вращательной релаксации лактальбумина $\tau = 35,8$ нс. По формуле (10) получаем отсюда относительный объем

белка больше единицы. Следовательно, при таких концентрациях выбранная простая модель неприменима. По объему, оцененному по формуле (9), и измерению в разбавленном растворе получаем для концентрации 4,7 мМ относительный объем 0,86.

В миллимолярных растворах вращательная диффузия молекул белка значительно замедлена. Так, время вращательной релаксации карбоангидразы *B* при концентрации 2,9 мМ и температуре 13 °С $\tau=40,4$ нс, а α -лактальбумина при концентрации 4,7 мМ и той же температуре $\tau=35,8$ нс. Простые модели не могут описать эту зависимость вращательной диффузии от концентрации. Для интерпретации результатов измерений ЯМР желательно проводить отдельный оптический эксперимент с конкретным объектом при конкретной концентрации.

ЛИТЕРАТУРА

1. Chigginio, K. P., Roberts, A. J., Phillips, D. Adv. Polym. Sci., **40**, 69—167 (1981).
2. Tao, T. Biopolymers, **8**, № 5, 609—632 (1969).
3. Yamazaki, I., Tamai, N., Kume, H., Tsuchiya, H., Oba, K. Rev. Sci. Instrum., **56**, № 6, 1187—1194 (1985).
4. Brazhnikov, E. V., Chirgadze, Yu. N., Dolgikh, D. A., Ptitsyn, O. B. Biopolymers, **24**, № 10, 1899—1907 (1985).
5. Ярвет Ю. И.-Х., Оливсон А. И., Агурайуя Р. К., Липпмаа Э. Т. Молекулярная биология, **19**, № 5, 1358—1366 (1985).
6. Leskovaar, B., Lo, C. C., Hartig, P. R., Sauer, K. Rev. Sci. Instrum., **47**, № 9, 1113—1121 (1976).
7. Grinvald, A., Steinberg, I. Z. Anal. Biochem., **59**, № 2, 583—598 (1974).
8. Magar, M. E. Data Analysis in Biochemistry and Biophysics. New York, Academic Press, 1972.
9. Липпмаа Э. Т., Оливсон А. И., Ярвет Ю. И.-Х., Агурайуя Р. К. Молекулярная биология, **17**, № 3, 484—491 (1983).
10. Dolgikh, D. A., Gilmanishin, R. I., Brazhnikov, E. V., Bychkova, V. E., Semisotnov, G. V., Venyaminov, S. Yu., Ptitsyn, O. B. FEBS Lett., **136**, № 2, 311—315 (1981).
11. Lipari, G., Szabo, A. Biophys. J., **30**, № 3, 489—505 (1980).
12. McKie, J. E., Brandts, J. F. In: Methods in Enzymology (Eds Hirs, C. H. W., Timasheff, S. N.), **26**. New York, Academic Press, 1972, 257—288.

Институт химической и биологической физики
Академии наук Эстонской ССР

Поступила в редакцию
13/X 1986

Ü. METS, M. POOGA, P. KASK, E. LIPPMAA

KARBOANHÜDRAASI *B* JA α -LAKTALBUMIINI ROTATOORSE DIFUSIOONI UURIMINE FLUORESTSENTSI DÜNAAMILISE DEPOLARISATSIOONI MEETODIL

Fluorestsentsi dünaamilise depolarisatsiooni meetodil on uuritud kahe valgu (tetrametüülrodamiini isotiotsüanaadiga märgitud härja karboanhüdraasi *B* ja α -laktalbuumiini) rotatoorse korrelatsiooniaja sõltuvust vesilahuse kontsentratsioonist, temperatuurist ja pH-st.

Ü. METS, M. POOGA, P. KASK, E. LIPPMAA

ROTATIONAL DIFFUSION OF CARBONIC ANHYDRASE *B* AND α -LACTALBUMINE INVESTIGATED BY TIME-RESOLVED FLUORESCENCE DEPOLARIZATION

Rotational correlation times of two proteins (bovine carbonic anhydrase *B* and α -lactalbumine, labelled with tetramethylrhodamine isothiocyanate) were investigated by time-resolved fluorescence depolarization at various temperatures, concentrations and pH of the aqueous solution.