



ООО «НКЦ «ЛАБТЕСТ»
Россия, Москва, 123557,
Большой Тишинский пер.38
Тел: +7 (495) 605 3507, 605 3610
Факс: +7 (495) 518 9452
info@lab-test.ru, www.lab-test.ru



Применение спектрофлуориметра ChronosDFD с цифровой обработкой сигнала в частотной области (ISS, США) в биохимических исследованиях.

Аннотация статьи:

REORIENTATIONAL DYNAMICS OF ENZYMES ADSORBED ON QUARTZ: A TEMPERATURE-DEPENDENT TIME-RESOLVED TIRF ANISOTROPY STUDY.

Czeslik, C., Royer, C., Hazlett, T., Mantulin, W., Biophysical Journal, 2003, 84, 2533–2541.

ДИНАМИКА ПЕРЕОРИЕНТАЦИИ ФЕРМЕНТОВ, АДсорБИРОВАННЫХ НА КВАРЦЕВОМ СТЕКЛЕ: ИССЛЕДОВАНИЕ ТЕМПЕРАТУРНО-ЗАВИСИМОЙ ВРЕМЯ-РАЗРЕШЁННОЙ АНИЗОТРОПИИ ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ МЕТОДОМ ПОЛНОГО ВНУТРЕННЕГО ОТРАЖЕНИЯ

Сохранение ферментативной активности и средства к субстрату белка, адсорбированного на твёрдой поверхности, интересует многих исследователей, поскольку найденные закономерности могут быть использованы в медицине и биотехнологиях. Эти свойства белка во многом зависят от конформационной гибкости и подвижности белковых макромолекул, т.к. от этих характеристик зависит доступность активного центра фермента или шарнирной области белка.

Молекулы белка обладают поверхностной активностью, и при взаимодействии твёрдых поверхностей с раствором белков почти всегда наблюдается спонтанная адсорбция белков на границе твёрдое тело – жидкость. Образование адсорбционного слоя белков на твёрдом материале может иметь неблагоприятные последствия для здоровья человека, такие как поверхностно-индуцированный тромбоз при взаимодействии крови с поверхностью искусственных материалов или глазные болезни, вызванные контактными линзами. С другой стороны, адсорбция белков на твёрдых поверхностях может быть использована для разделения и очистки белков на хроматографических колонках, проведения твёрдофазного иммуноферментного анализа или создания биологических микрочипов, играющих всё большую роль в протеомике и иммунологии. При этом для проведения иммуноанализа или создания биочипа крайне важно сохранение белком его структуры и свойств при адсорбции на твёрдой поверхности.

К настоящему времени накоплен обширный материал об изменениях в структуре и конформации белков, адсорбированных на твёрдой поверхности, но остаётся малоизученным влияние адсорбции на твёрдой поверхности на внутреннюю подвижность белковой макромолекулы и подвижность макромолекулы белка в межфазном адсорбционном слое. Одной из работ в этой области стало исследование, проведённое группой учёных из США, ФРГ и Франции под руководством профессора Клауса Чеслика из Дортмундского университета (ФРГ).

В качестве объектов исследования учёные выбрали два фермента — лизоцим куриного яйца и нуклеазу стафилококка (SNase). Исследователи проводили измерение времени затухания интенсивности и анизотропии флуоресценции методом полного внутреннего отражения. Все измерения проводились на специальном инструменте — **спектрофлуориметре с разрешением в частотной области (ISS, США)**. Отличием данного спектрофлуориметра является технология модуляции возбуждения флуоресценции с использованием различных источников света и детекторов и последующей цифровой обработкой сигнала. Источники работают с установленной пользователем модуляцией частоты сигнала. Сигнал флуоресценции содержит основную частоту, повторяющую скорость работы лазера, и гармонические сигналы, отстающие по фазе. Математическая обработка полученного сигнала позволяет определить амплитуду и отставание по фазе для каждого компонента. По разности фаз между флуоресценцией и возбуждением на заданной частоте и по отношению амплитуд происходит вычисление времени жизни флуоресценции в диапазоне 10^{-12} — 1 с в области длин волн 200 – 1700 нм. Наличие поляризаторов возбуждающего и флуоресцентного излучения позволяет проводить измерения интенсивности флуоресцентного света, поляризованного в параллельной и перпендикулярной плоскостях, и определение анизотропии флуоресценции. На основе анализа кривых затухания анизотропии флуоресценции производится вычисление корреляционного времени вращения

макромолекулы. Кроме того, анализ деполяризации флуоресценции позволяет рассчитать угол реориентации вращающегося сегмента белка (в данном случае — остатка триптофана). Прибор оборудован специальной проточной ячейкой для проведения измерений методом полного внутреннего отражения флуоресценции веществ, адсорбированных на стекле. Все измерения проводились в широком диапазоне температур.

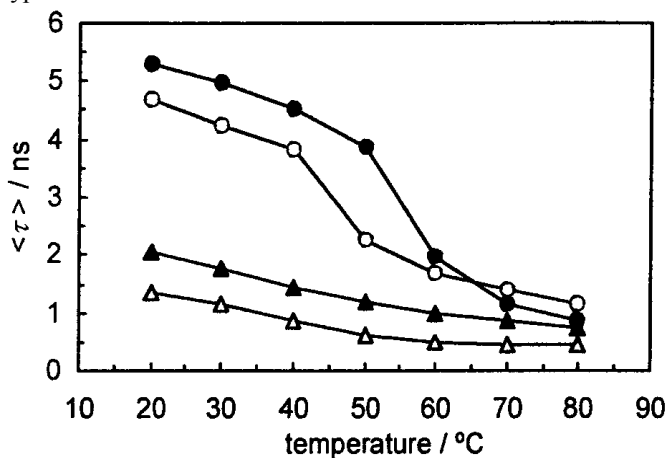


Рис. 1. Среднее время жизни SNase (в растворе (●) и адсорбированного (○) на кварце) и лизоцима куриного яйца (в растворе (▲) и адсорбированного (△) на кварце).

Исследователями были показаны ярко выраженные изменения — в сторону уменьшения — во внутренней динамике белков при их адсорбции из раствора на поверхности стекла. При увеличении температуры выше значений возрастает влияние поверхностных сил, приводящее к уменьшению внутренней динамики белка. Общее вращение белка также значительно уменьшается при адсорбции на твёрдой поверхности. Показано, что уменьшение вращательной диффузии белка обусловлено взаимодействиями белков с твёрдой поверхностью и самоорганизацией белков на твёрдой поверхности. В случае нуклеазы стафилококка, имеющей относительно низкое значение энергии Гиббса разворачивания глобулы, уменьшение вращательной диффузии белка определено взаимодействием белка с поверхностью, в то время как для лизоцима уменьшение общего вращения происходит из-за самоорганизации макромолекул в приповерхностном слое. К удивлению исследователей оказалось, что угол реориентации остатка триптофана при адсорбции белка на твёрдой поверхности меняется незначительно даже при высоких температурах. Получается, что, несмотря на конформационные изменения в структуре белка, подвижность остатков триптофана при адсорбции белка на твёрдой поверхности ограничена.

По мнению учёных полученные ими с помощью измерений деполяризации флуоресценции результаты дают исследователям более глубокое понимание особенностей поведения белков на твёрдой поверхности.

Подготовил Алексей Шнитко
 ООО «НКЦ «ЛАБТЕСТ»
 тел.: +7 495 605 35 07
 факс: +7 495 605 39 44
 a.shnitko@lab-test.ru
 www.lab-test.ru