

18. *Laemmli U. K.* Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // *Nature*.—1970.—227.—P. 680—685.
19. *Wang J. C.* Superhelical DNA // *Trends Biochem. Sci.*—1980.—5, N 1.—P. 219—221.
20. *Cook P. R., Brazell I. A.* The superhelical density of nuclear DNA from human cells // *Eur. J. Biochem.*—1977.—74, N 2.—P. 527—531.
21. *Struchkov V. A.* On the subunit organization of DNA in eukaryotic chromatin // *Stud. biophys.*—1982.—87, N 2/3.—P. 153—154.
22. *Стручков В. А., Стражевская Н. Б.* Организация хромомероподобных структур надмолекулярных комплексов ДНК эукариот // *Материалы V Всесоюз. биохим. съезда*.—М.: Наука, 1986.—Т. 2.—С. 369—370.
23. *Welsh R. S., Vyska K.* Organization of highly purified calf thymus DNA // *Biochim. et biophys. acta.*—1981.—655, N 3.—P. 291—306.
24. *Wang J. C.* Variation of the average rotation angle of the DNA helix and the superhelical turns of covalently closed cyclic DNA // *J. Mol. Biol.*—1969.—43, N 1.—P. 25—39.
25. *Isolation of the protein scaffold from mitotic HeLa cells chromosomes* /K. W. Adolph, S. M. Cheng, J. R. Paulson, U. K. Laemmli // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*—1977.—74, N 11.—P. 4937—4941.
26. *Наседкина Т. В., Слезингер С. И.* Изменения в структуре нуклеогистоновых фибрилл хромосомы при удалении бивалентных катионов и гистона H1 // *Цитология*.—1983.—25, № 9.—С. 1054—1058.
27. *Збарский И. Б.* Белковый состав и организация ядерного матрикса // *Биополимеры и клетка*.—1985.—1, № 1.—С. 26—32.
28. *Чернохвостов В. В.* Ядерный матрикс эукариотической клетки: некоторые вопросы выделения, структуры и функционирования // *Успехи соврем. биологии*.—1985.—99, № 3.—С. 371—384.

Всесоюз. онкол. науч. центр АМН СССР, Москва

Получено 25.11.86

УДК 578.08:543.4

ФЛЮОРЕСЦЕНТНАЯ СПЕКТРОСКОПИЯ КРАЕВОГО ВОЗБУЖДЕНИЯ ИНДОЛА И ТРИПТОФАНА

А. П. Демченко, А. С. Ладохин

Введение. В последнее время большое значение приобрели флюоресцентные методы изучения структуры и динамики белков. Поскольку триптофановые остатки вносят основной вклад в собственную флюоресценцию белков, повышенный интерес вызывают флюоресцентные свойства индола и триптофана. Однако связь между свойствами окружения этих хромофоров и их спектрами флюоресценции неоднозначна. Как известно, триптофановая флюоресценция чувствительна к полярности среды, образованию комплексов в возбужденном состоянии (эксиплексов) и к скорости дипольно-ориентационной релаксации молекул растворителя и белковых групп, окружающих хромофор [1—3]. Действие этих факторов приводит к значительным (до 40 нм) вариациям спектров триптофановой флюоресценции. Это определяет высокую чувствительность спектров флюоресценции к структурным изменениям в белках и объясняет большую популярность этого подхода. Но интерпретация результатов может быть очень сложной. Например, только при достижении дипольно-ориентационного равновесия может быть проанализирована полярность окружения хромофора путем сравнения результатов, полученных на белках, с результатами исследований в модельных жидких растворителях. В связи с этим возникает необходимость в методе, который способен выявлять неотрелаксировавшие электронно-возбужденные состояния в белках.

Недавно было предложено проводить анализ дипольно-релаксационной подвижности в белках, применяя флюоресцентную спектроскопию красного краевого возбуждения [4]. Эффекты красного края в спектрах флюоресценции возникают вследствие распределения хромофоров по набору микросостояний, отличающихся по энергии взаимодействия с окружением [5, 6]. Несмотря на широкое изучение этого эффекта

для различных хромофоров, данные по индолу, триптофану и их производным фрагментарны [5, 7].

В данной работе представлены результаты систематических исследований влияния красного краевого возбуждения на спектры флуоресценции индола и триптофана в твердых и вязких средах. Эти исследования могут послужить основой для анализа неравновесных дипольно-ориентационных состояний в белках и непосредственной оценки времен структурной дипольной релаксации.

Теория. С помощью флуоресцентной спектроскопии может быть произведено прямое изучение молекулярных движений, происходящих в окружении хромофора. Поглощение кванта света позволяет практически мгновенно нарушить равновесие между возбужденной молекулой и молекулами растворителя и изучать установление нового равновесия (процесс релаксации). При этом происходит зависящее от времени перераспределение в окружении (сольватной оболочке) хромофора, что приводит к установлению равновесия с возбужденным хромофором. Такое состояние может достигаться либо не достигаться в зависимости от соотношения между временем жизни флуоресценции (τ_F) и временем дипольной реориентационной релаксации (τ_R).

Для описания влияния подвижности окружения хромофора на его флуоресценцию используют модель Бахшиева—Мазуренко [8, 9], рассматривающую процесс релаксации сольватной оболочки как процесс установления распределения в ансамбле взаимодействующих частиц. Эта модель предполагает, что процесс релаксации непрерывен, а излучение происходит спонтанно по мере релаксации. Результатом такого рассмотрения является уравнение, связывающее временные и спектральные характеристики системы хромофор—растворитель:

$$\nu - \nu_\infty = (\nu_0 - \nu_\infty) \frac{\tau_R}{\tau_R + \tau_F}, \quad (1)$$

где ν — характеристическая точка спектра излучения (например, максимум или центр тяжести); ν_0 , ν_∞ — эта же величина, но в предельных случаях излучения из неотрелаксированного и полностью отрелаксированного состояний соответственно. Уравнение (1) хорошо описывает спектральный релаксационный сдвиг при изменениях τ_R и τ_F при действии тушителей флуоресценции и вариациях температуры и позволяет оценить τ_R , если τ_F известно. Однако в белковой спектроскопии применение этого уравнения затруднено термолабильностью объекта и невозможностью, зачастую, получить полностью отрелаксированное состояние, не нарушая нативного состояния системы. Для того чтобы исключить из рассмотрения величину ν_∞ , воспользуемся так называемым «краевым возбуждением». Известно, что в системе с замедленной дипольной релаксацией спектры флуоресценции при возбуждении в максимуме полосы поглощения и на длинноволновом краю различны. Это связано с тем, что существует распределение по энергии взаимодействия хромофора со своим окружением и при «краевом возбуждении» возбуждаются состояния, энергия которых сильно отличается от средней.

Запишем уравнение (1) для случая всей системы хромофоров (возбуждению в максимуме полосы поглощения соответствуют величины ν^{mean} , ν_0^{mean}) и для случая подсистемы наиболее сильно взаимодействующих с окружением хромофоров (возбуждение на длинноволновом краю полосы поглощения — соответственно ν^{edge} , ν_0^{edge}). Величины τ_R и τ_F при этом будем считать неизменными. Вычтем одно уравнение из другого и, используя то обстоятельство, что релаксация «перемешивает» электронно-возбужденные состояния (т. е. $\nu_\infty^{\text{mean}} = \nu_\infty^{\text{edge}}$), получим

$$\nu^{\text{mean}} - \nu^{\text{edge}} = (\nu_0^{\text{mean}} - \nu_0^{\text{edge}}) \frac{\tau_R}{\tau_R + \tau_F}. \quad (2)$$

Это уравнение не содержит трудноопределяемых величин и может быть использовано для определения времени релаксационной подвижности τ_R групп в структуре белка. Для этого наряду с определением τ_F

в эксперименте достаточно определить спектральный сдвиг при возбуждении в максимуме и на краю в исследуемых условиях, а также максимальную величину этого сдвига (в случае жесткого раствора $\tau_R \gg \tau_F$).

Следует отметить, что описание реальных процессов релаксации и затухания флюоресценции одноэкспоненциальной функцией является приближением, которое часто используется и дает хорошее описание экспериментальных данных [10].

Экспериментальная часть. В работе использованы хроматографически чистые препараты индола и DL-триптофана фирмы «Serva» (ФРГ), а также индол отечественного производства, который дополнительно подвергали сублимационной очистке. Спектры

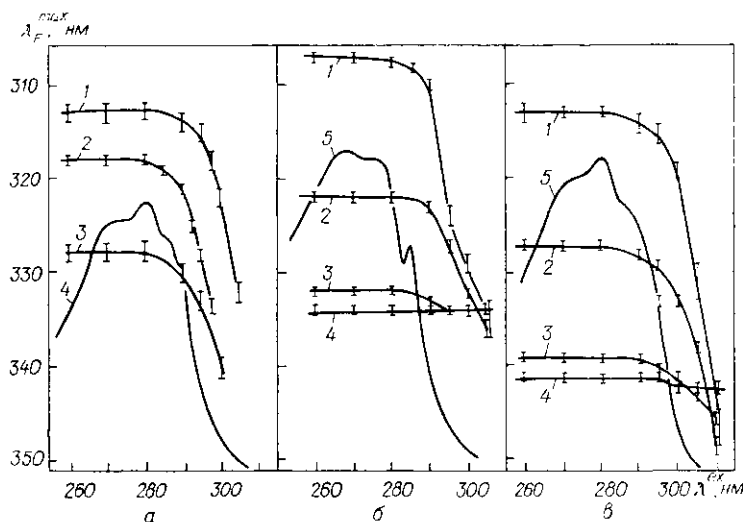


Рис. 1. Зависимость положения максимума спектров флюоресценции от длины волны возбуждения: а — триптофана в этиленгликоле при температуре -196°C (1), в пленке поливинилового спирта при 25°C (2) и в леденце глюкозы при 25°C (3); 4 — спектр поглощения триптофана в этиленгликоле; б — индола в глицерине при температурах -196 (1); -10 (2); 20 (3); 50°C (4); 5 — спектр поглощения индола в глицерине при 20°C ; в — триптофана в глицерине при температурах -196 (1); -14 (2); 20 (3); 50°C (4); 5 — спектр поглощения триптофана в глицерине при 20°C

Fig. 1. Dependence of wavelength of fluorescence maxima on excitation wavelength: а — for tryptophan in ethylene glycol at -196°C (1), in polyvinyl alcohol film at 25°C (2) and in glucose glass at 25°C (3); 4 — the absorption spectrum of tryptophan in ethylene glycol; б — for indole in glycerol at temperatures -196 (1), -10 (2), 20 (3) and 50°C (4); 5 — the absorption spectrum of indole in glycerol at 20°C ; в — tryptophan in glycerol at temperatures -196 (1), -14 (2), 20 (3) and 50°C (4); 5 — the absorption spectrum of tryptophan in glycerol at 20°C

флюоресценции при различных длинах волн возбуждения регистрировали на флюоресцентном спектрофотометре МРФ-4 в режиме регистрации отношения сигналов. Спектральная ширина щели возбуждающего монохроматора составляла 2 нм, а регистрирующего — $2 \div 5$ нм. Коррекции спектров флюоресценции на спектральную чувствительность установки не проводили, поскольку экспериментальные спектры индола и триптофана соответствовали откорректированным спектрам, описанным в литературе, с точностью лучшей, чем 2—3%. Регистрацию спектров поглощения и спектрофотометрическое определение концентрации проводили на спектрофотометре «Beckman», модель 25 (США). Концентрации триптофана и индола выбирали в пределах 10^{-5} — 10^{-3} М, т. е. таким образом, чтобы избежать переноса света образцом. Определение времени жизни возбужденного состояния проводили на импульсном спектрофлуориметре с наносекундным разрешением PRA, система 3000 («Photochemical Research Associates», США), в режиме однофотонного счета. Компьютерная программа обработки предусматривала деконволюцию и учет конечной ширины возбуждающего импульса.

Результаты и обсуждение. На рис. 1 представлены зависимости положения максимума спектра флюоресценции λ_F^{max} от длины волны

возбуждения λ^{ex} для индола и триптофана в различных средах. Из рисунка видно, что, несмотря на значительные различия в положении λ_F^{max} , обнаруживаются общие закономерности. В твердых и вязких средах наблюдается длинноволновый сдвиг излучения при переходе к краевому возбуждению. При повышении подвижности среды, например при увеличении температуры, эффект уменьшается, а затем исчезает.

Таким образом, мы имеем дело с «батохромной люминесценцией» [6] или «эффектом сдвига спектров при краевом возбуждении» — явле-

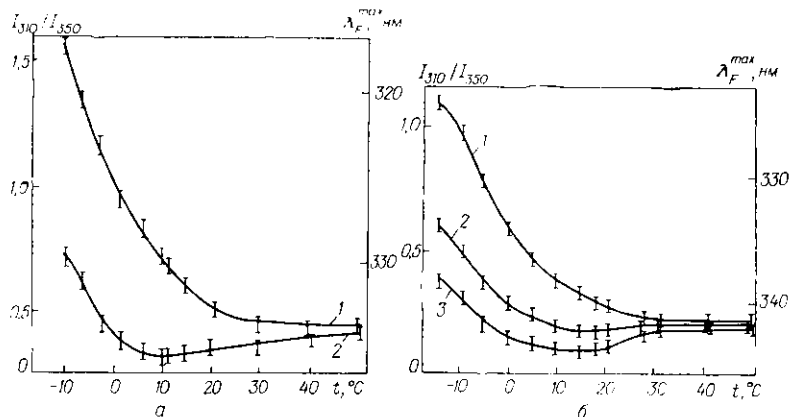


Рис. 2. Температурная зависимость положения максимума спектра флюоресценции и параметра I_{310}/I_{350} индола (а) и триптофана (б) в глицерине для различных длин волны возбуждающего света: 270 (1) и 295 (2) нм для индола и 280 (1), 300 (2) и 305 (3) нм для триптофана

Fig. 2. Dependence of wavelength of fluorescence maxima and parameter I_{310}/I_{350} on temperature for indole (a) and tryptophan (b) in glycerol for different excitation wavelengths: 270 (1) and 295 nm (2) for indole and 280 (1), 300 (2) and 305 nm (3) for tryptophan

нием, к настоящему времени хорошо изученным в спектроскопии вязких и твердых растворов красителей. Для этого явления характерно то, что при достаточно больших длинах волны возбуждения положение максимума флюоресценции в твердых и вязких растворах достигает и даже превышает значения, наблюдаемые в соответствующих жидких растворах. Это область «релаксации вверх» [11]. Для индола в глицерине она наблюдается при $\lambda^{ex} > 303$ —304 нм (рис. 1, б), а триптофана — 307—309 нм (рис. 1, в).

С целью повышения точности результатов температурных исследований излучения индола и триптофана, представленных на рис. 2, определяли параметр I_{310}/I_{350} — отношение интенсивностей на крыльях спектра, который однозначно связан с частотой максимума спектра ν [12], а приведенная шкала λ_F^{max} имеет лишь оценочное значение. Как и следовало ожидать, кривые при обычном и краевом возбуждениях наиболее сильно различаются при низких температурах и сближаются при высоких. Некоторые искажения обычной сигмоидной зависимости релаксационного сдвига связаны с тем, что в глицерине в диапазоне температур 20÷40 °С значительно падает время жизни τ_F (с 4,0 до 3,1 пс для индола и с 5,2 до 3,5 пс для триптофана), в то время как при более низких температурах оно изменяется незначительно. Это наряду с изменениями τ_R приводит к изменениям частоты максимума спектра (уравнение (1)). Применение уравнения (2) для получения информации о дипольной релаксации подразумевает одинаковый характер затухания излучения при обычном и краевом возбуждениях. Это утверждение было проверено экспериментально (рис. 3). Изучался закон затухания — эмиссии триптофана в твердой матрице поливинилового спирта ($\tau_R \gg \tau_F$). Результат свидетельствует о подобии кинетик излучения при возбуждениях в максимуме поглощения на длинновол-

новом краю. На рис. 4 представлены пересчитанные в координатах Аррениуса ($\lg \tau$ от $1/T$) температурные зависимости времен дипольно-ориентационной релаксации, определяемые по уравнению (1) при $\lambda^{\text{ex}}=280$ нм для триптофана и 270 нм для индола, и температурные зависимости τ_R , определяемые по краевому эффекту (уравнение (2)) при $\lambda_{\text{mean}}^{\text{ex}}=270$ и 280 нм и $\lambda_{\text{edge}}^{\text{ex}}=295$ и 305 нм для индола и триптофана соответственно и предельным величинам эффекта, определяемым при -196°C (рис. 1). Результаты сопоставлены с температурной зависимостью времени дипольной релаксации глицерина, определяемого по

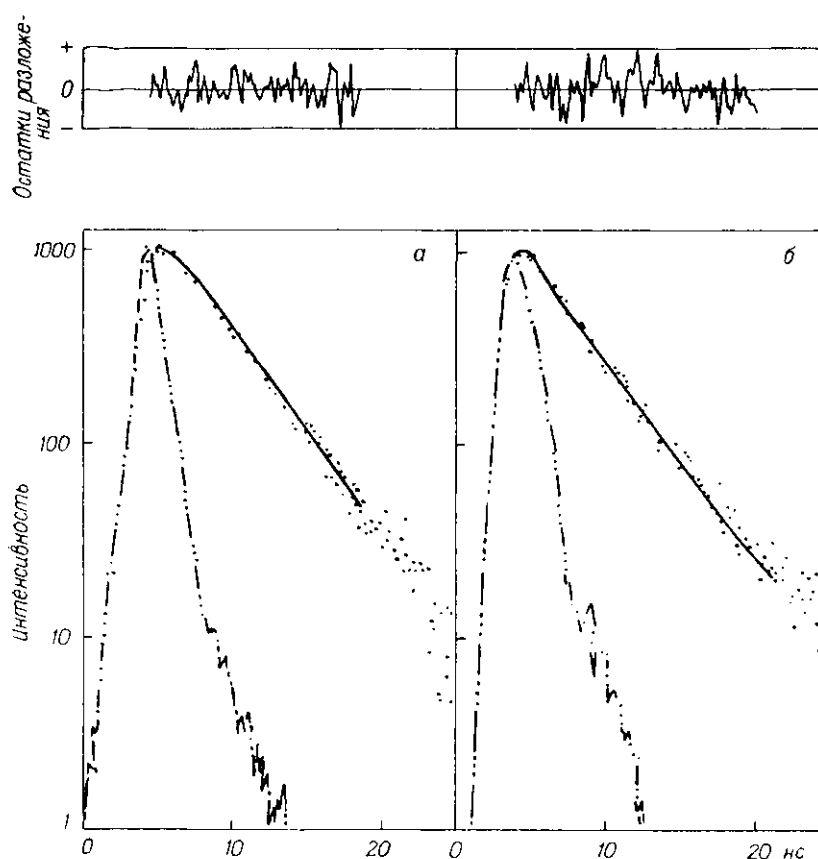


Рис. 3. Кинетика затухания флуоресценции триптофана в пленке поливинилового спирта: *а* — возбуждение 270 нм, регистрация 340 нм, спектральная ширина щели 8 нм (параметры биэкспоненциального разложения, полученного методом наименьших квадратов: $\tau_1=4,30\pm 0,03$; $A_1=0,10\pm 0,01$; $\tau_2=0,09\pm 0,12$; $A_2=0,25\pm 0,34$, вклад короткоживущей компоненты в суммарную интенсивность 5%; $\chi^2=0,60$); *б* — возбуждение 300 нм, регистрация 340 нм, щель 4 нм ($\tau_1=4,53\pm 0,06$; $A_1=0,10\pm 0,02$; $\tau_2=0,06\pm 0,11$; $A_2=0,66\pm 1,23$; вклад короткоживущей компоненты 8%, $\chi^2=1,24$)

Fig 3. Emission decay kinetics for tryptophan in polyvinyl alcohol films: *a* — excitation — 270 nm, emission — 340 nm, bandwidth — 8 nm. The best-fit parameters for biexponential decay are: $\tau_1=4.30\pm 0.03$; $A_1=0.10\pm 0.01$; $\tau_2=0.09\pm 0.12$; $A_2=0.25\pm 0.34$, contribution of the short-living component to integral intensity is 5%; $\chi^2=0.60$; *b* — excitation — 300 nm, emission — 340 nm, bandwidth — 4 nm. The best-fit parameters for biexponential decay are: $\tau_1=4.53\pm 0.06$; $A_1=0.10\pm 0.02$; $\tau_2=0.06\pm 0.11$; $A_2=0.66\pm 1.23$; contribution of the short-living component to integral intensity is 8%, $\chi^2=1.24$

значениям времени диэлектрической релаксации τ_D [13], с учетом поправки, предложенной Мазуренко и Бахшиевым [9]:

$$\tau_R = \tau_D \frac{n^2 + 2}{\epsilon + 2}, \quad (3)$$

где ϵ — статическая диэлектрическая проницаемость; n — показатель преломления. Для глицерина поправочный фактор составляет 0,12.

Величины τ_R , определяемые при помощи уравнения (1) по релаксационному сдвигу спектров флуоресценции индола и триптофана, хорошо согласуются между собой. Более того, они совпадают с величиной τ_R , определяемой из диэлектрических данных (уравнение (3)), не только по порядку, но и по величине в довольно широком температурном интервале. Такое совпадение неожиданно, учитывая ограничения Дебаевской модели в описании диэлектрических свойств глицерина, а также модели Онзагера, используемой при выводе формул (1) и (2).

Кроме временных характеристик, анализировали функцию неоднородного уширения электронных спектров,

которая, согласно Рубинову и Томину [14], является гауссовским распределением. Расчет дисперсии этого распределения $\Delta\nu$ для индола в глицерине для комнатных температур дает значение порядка 1040 см^{-1} ($12,5 \text{ кДж/моль}$).

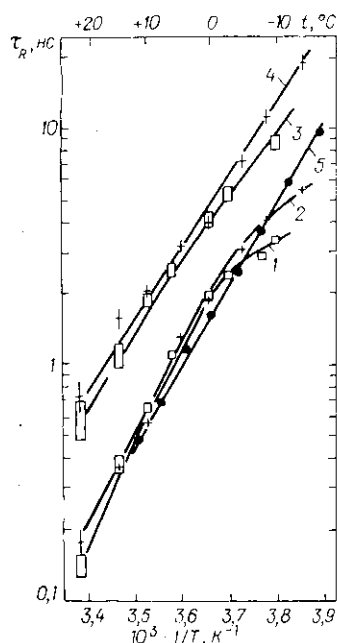


Рис. 4. Зависимость логарифма времени дипольной релаксации от обратной температуры для индола и триптофана в глицерине: 1 — данные при $\lambda^{ex} = 270 \text{ нм}$ для индола; 2 — 280 нм для триптофана (расчет по уравнению (1)); 3 — для индола при 270 и 295 нм ; 4 — триптофана при 280 и 305 нм (расчет по уравнению (2)); 5 — температурная зависимость τ_R , рассчитанная по уравнению (3) из данных по диэлектрической релаксации глицерина

Fig. 4. Calculated dependence of dipole-reorientational relaxation time on temperature for indole and tryptophan in glycerol: 1 — data at $\lambda^{ex} = 270 \text{ nm}$ for indole; 2 — 280 nm for tryptophan calculated by Eq. (1); 3 — for indole at 270 and 295 nm ; 4 — tryptophan at 280 and 305 nm (calculated by Eq. (2)); 5 — temperature dependence, τ_R , of dipole relaxation time in glycerol was obtained from the data of dielectric studies and recalculated by Eq. (3)

Для эффекта краевого сдвига спектров линейность и ход температурной зависимости в координатах $\lg \tau_R$ от $1/T$, в основном, сохраняется, но абсолютные значения τ_R выше для триптофана в 3, а для индола в 2,5 раза. Вероятное объяснение этому может быть следующим: в сольватах с повышенной энергией взаимодействия в возбужденном состоянии, фотоотбор которых происходит при краевом возбуждении, более затруднены и процессы релаксации. Вероятность такого фотоотбора состояний с более высоким τ_R интересна и требует проверки на других системах.

Таким образом, полученные результаты показывают правильность определений с помощью эффекта краевого сдвига порядка величины τ_R и характера ее температурной зависимости. Это позволяет решить задачу определения величины τ_R , если дипольная ориентационная подвижность неизвестна, в частности, для окружения триптофанила в белках.

Важное достоинство методов краевого возбуждения заключается в том, что отпадает необходимость получения спектров в полностью отрелаксированном состоянии. Это обстоятельство может оказаться решающим при исследовании таких термолабильных объектов, как белки. Следует отметить, что метод спектроскопии краевого возбуждения не замедляет, а дополняет другие методы спектроскопии молекулярных релаксаций и может быть использован в сочетании с ними. Краевое возбуждение можно применять при получении спектров с разрешением по времени жизни при использовании эффективных тушителей флуоресценции [15], а также в спектроскопии с временным разрешением [10]. Такие подходы уже используются для анализа молекулярной динамики в белках и мембранах [16—18].

RED-EDGE FLUORESCENCE SPECTROSCOPY OF INDOLE AND TRYPTOPHAN

A. P. Demchenko, A. S. Ladokhin

A. V. Palladin Institute of Biochemistry,
Academy of Sciences of the Ukrainian SSR, Kiev

Summary

Studies on the dependence of indole and tryptophan fluorescence spectra on excitation wavelength λ^{ex} demonstrate the existence of the effect of the longwave fluorescence shift at the red edge-excitation in different solid and viscous solvents. In solid systems spectral shifts in the excitation range 290-310 nm reach tens of nm, and they are more significant than changes of λ^{ex} . In the viscous medium the magnitude of this effect is directly related to the dipole-reorientational relaxation of solvent molecules in the chromophore environment, which allows the relaxation times to be estimated. The method involves simple steady-state experiments of fluorescence spectra at the maximum and at the red edge of absorption band. It may be advantageous when studying proteins, since there is no necessity to obtain information on the fluorescence spectra of completely relaxed states.

1. Бурштейн Э. А. Люминесценция белковых хромофоров (модельные исследования).— М.: ВИНТИ, 1976.—214 с.
2. Пикудик Л. Г., Гладченко Л. Ф., Костко М. Я. Влияние температуры на флуоресценцию растворов ароматических аминокислот // Журн. прикл. спектроскопии.— 1967.— № 6.— С. 210—215.
3. Lakowicz J. R., Baller A. Direct recording of the initially excited and the solvent relaxed fluorescence emission spectra of tryptophan by phase sensitive detection of fluorescence // Photochem. and Photobiol.— 1982.—36, N 1.— P. 125—132.
4. Demchenko A. P. Structural relaxation in protein molecules studied by fluorescence spectroscopy // J. Mol. Struct.— 1984.—114, N 1.— P. 45—48.
5. Galley W. G., Purkey R. M. Role of heterogeneity of the solvation site in electronic spectra in solution // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.— 1970.—67, N 3.— P. 1116—1121.
6. Рубинов А. Н., Томин В. И. Батохромная люминесценция в низкотемпературных растворах красителей // Оптика и спектроскопия.— 1970.—29, № 6.— С. 1082—1086.
7. Lami H. Dynamic evidence for a short-lived CTTS state of indoles in glycerol // Nuovo sim.— 1981.—63, N 1.— P. 241—253.
8. Бахшиев Н. Г., Мазуренко Ю. Т., Питерская И. В. О затухании свечения в разных участках спектра люминесценции молекул в вязких растворах // Оптика и спектроскопия.— 1966.—21, № 5.— С. 550—554.
9. Мазуренко Ю. Т., Бахшиев Н. Г. Влияние ориентационной дипольной релаксации на спектральные, временные и поляризационные параметры люминесценции растворов // Там же.— 1970.—28, № 5.— С. 905—913.
10. Lakowicz J. R. Principles of fluorescence spectroscopy.— New York; London: Plenum press, 1983.—496 p.
11. Немкович Н. А., Мацейко В. И., Томин В. И. Межмолекулярная ориентационная релаксация «вверх» в растворах фталимида при возбуждении перестраиваемым по частоте лазером на красителе // Оптика и спектроскопия.— 1980.—49, № 2.— С. 274—282.
12. Зима В. Л., Драган А. І., Богач П. Г. Флуоресценція і температурнопертурбаційні диференціальні спектри триптофану в гідрофобному оточенні // Доп. АН УРСР.— 1978.—11, Сер. Б.— С. 1016—1019.
13. McDuffie G. E., Litovitz T. A. Dielectric relaxation in associated liquids // J. Chem. Phys.— 1962.—37, N 8.— P. 1699—1705.
14. Рубинов А. Н., Томин В. И. Неоднородное уширение электронных спектров органических молекул в твердых и жидких растворах.— Минск, 1984.—40 с.— (Препринт / АН БССР. Ин-т физики; № 348).
15. Demchenko A. P. Ultraviolet spectroscopy of proteins.— Berlin etc.: Springer, 1986.—340 p.
16. Demchenko A. P. Fluorescence molecular relaxation studies of protein dynamics. The probe binding site of melittin is rigid on the nanosecond time scale // FEBS Lett.— 1985.—182, N 1.— P. 99—102.
17. Demchenko A. P., Shcherbatska N. V. Nanosecond dynamics of the charged fluorescent probes at the polar interface of membrane phospholipid bilayers // Biophys. Chem.— 1985.—22, N 2.— P. 131—143.
18. Структурно-динамические свойства окружения триптофанового остатка в мелиттине / А. П. Демченко, А. С. Ладокhin, Е. Г. Коstrжевская и др. // Молекуляр. биология.— 1987.—21, № 3.— С. 663—671.

Ин-т биохимии им. А. В. Палладина АН УССР, Киев

Получено 11.12.86