

Білки та ціанінові барвники. 1. Несиметричний карбоціаніновий барвник 14К — новий флюоресцентний зонд для гомогенного визначення білків у розчині

С. М. Ярмолюк

Інститут молекулярної біології та генетики НАН України
Вул. Академіка Заболотного, 150, Київ, 03143, Україна

Вивчено взаємодію карбоціаніну 14К (6,8-діетил-7[Е-3-(8-етил-7,8-дигідро-[1,3]-тіазоло-[4',5',3,4], бензо-[d]-[1,2,3]-тіодіазол-7-іліден)-1-пропеніл]-6Н-імідазол-[4',5',5,6]-бензо-[d]-[1,2,3]-тіодіазол-8-ій йодид) з чотирма білками в нативному і денатурованому стані. Встановлено, що барвник 14К має різну величину зростання інтенсивності флюоресценції у присутності цих білків у нативному стані. При взаємодії з денатурованими білками квантовий вихід флюоресценції 14К підвищується на 25–40 % відносно інтенсивності флюоресценції комплексів 14К з нативними білками. Запропоновано можливий механізм для пояснення збільшення інтенсивності флюоресценції 14К при взаємодії з білками та нуклеїновими кислотами. Вивчено вплив присутності різних речовин на інтенсивність флюоресценції 14К.

Вступ. Для детекції водорозчинних білків у лабораторній практиці широко застосовуються два типи спектрально-люмінесцентних методів. Перший полягає у кількісному визначенні білків за їхніми власними спектральними характеристиками — величиною інтенсивності спектрів поглинання [1] або флюоресценції [2] ароматичних амінокислот у їх складі. Ці методи є досить простими і не вимагають складного обладнання, але вони потребують додаткової інформації про процентний вміст ароматичних амінокислот. Крім того, присутність домішок вільних амінокислот у розчині може призвести до похибки при кількісному визначенні білків.

Другий варіант — це гомогенна детекція білків із застосуванням флюоресцентного зонда, який при нековалентній взаємодії з білком підвищує інтенсивність випромінювання у сотні і навіть у тисячу разів порівняно з флюоресценцією у вільному стані [3]. Гомогенна система детекції зручна тим, що не потребує додаткової операції з вилучення надлиш-

ку незв'язаного зонда [4]. Важливою тут є також специфічність взаємодії зонда з білком, внаслідок чого наявність у розчині вільних амінокислот та інших молекул не впливає на результати детекції.

До зондів гомогенного типу належить ряд ультрачутливих флюоресцентних барвників з комерційною назвою Nano Orange, Sypro Orange та Red Protein Cell Stain, ексклюзивно запропонованих фірмою «Molecular Probes» (США) [3]. Використання унікального Nano Orange дозволяє точно детектувати білки в розчині в межах концентрацій від 10 нг/мл до 10 мкг/мл.

Нещодавно було показано можливість використання карбоціанінових барвників як флюоресцентних зондів для гомогенної детекції білків [5]. Зокрема, барвник 14К (рис. 1) при взаємодії з бичачим сироватковим альбуміном (БСА) збільшував інтенсивність флюоресценції в 650 разів порівняно з незв'язаним станом [5].

Запропонована робота присвячена вивченню спектральних властивостей комплексів барвника 14К з різними білками та впливу різноманітних домішок на чутливість визначення.

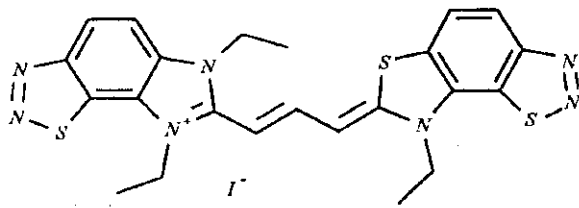


Рис. 1. Хімічна структура барвника 14К

Матеріали і методи. В роботі було використано: ДНК з еритроцитів курчат, сумарну дріжджову РНК, БСА, альбумін жовтка, лізоцим, сечовину, хлористий калій, β -меркаптоетанол, амінокислоти (гліцин, глютамінова кислота, триптофан), трис (оксиметил)-амінометан гідрохлорид та етилендіамінтетраоцтову кислоту (ЕДТА) — «Aldrich» — «Sigma» (США). Лектин з бактеріальної культури *Bacillus subtilis* 668 ІМВ [6] був люб'язно наданий О. Яковлевою (Інститут мікробіології та вірусології НАН України).

Спектри поглинання записували за допомогою спектрофотометра Spescord M-40 (Німеччина). Для реєстрації спектрів флюоресценції застосовували спектрофлюориметр «Hitachi» Model 850 (Японія). Флюоресценцію збуджували випромінюванням ксенонової лампи (150 Вт).

Для всіх вимірів використовували Т-буфер (50 мМ трис-НСІ, рН 7,5).

Розчини білків та нуклеїнових кислот концентрації 1 мг/мл отримували, розчиняючи наважку відповідних біополімерів у буфері. Розчини менших концентрацій готували безпосередньо перед вимірами розведенням вищезгаданих розчинів у Т-буфері.

Стоковий розчин барвника з концентрацією 1 мг/мл готували в ДМФА. Концентрація робочих розчинів барвника 14К у кюветі дорівнювала 5 мкг/мл.

Білки денатурували витриманням їхніх розчинів при 90 °С протягом 45 хв, як у роботі [7]. Процес денатурації білків спостерігали спектроскопічно в UV-області згідно з [8].

Результати та обговорення. Як показано в попередній роботі [5], карбоціанін 14К має слабку власну флюоресценцію, але в присутності БСА її квантовий вихід зростає в 650 разів. Спектри поглинання та флюоресценції 14К та його комплексів з БСА представлені на рис. 2.

Для вивчення специфічності зв'язування 14К

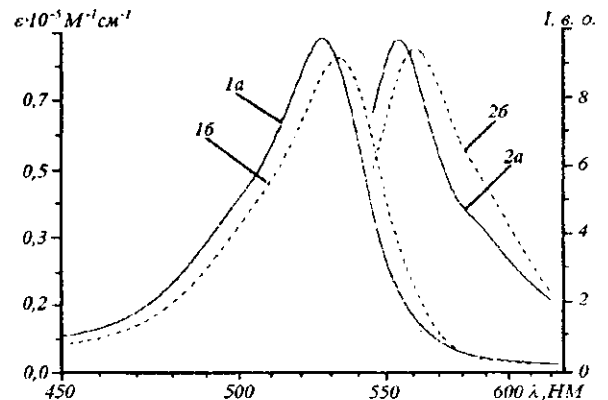


Рис. 2. Спектри поглинання (1) та флюоресценції (2) барвника 14К у вільному стані (а) та в комплексах з БСА (б). Спектр 2а збільшено в 300 разів (λ_{max} поглинання = 528 нм, λ_{max} випромінювання = 555 нм)

було досліджено його спектральні властивості в присутності чотирьох білків: БСА, альбуміну жовтка, лізоциму та лектину. В робочих розчинах концентрація барвника була постійною (5 мкг/мл), у той же час концентрацію білків змінювали від 10 нг/мл до 1 мг/мл. Барвник 14К має різну величину інтенсивності флюоресценції в присутності цих білків (рис. 3). При наявності альбуміну жовтка (1 мг/мл) 14К підвищує інтенсивність флюоресценції в 2 рази. Лізоцим (навіть при концентрації 1 мг/мл) не впливає на спектральні характеристики 14К. У присутності БСА 14К підвищує інтенсивність флюоресценції в 90 разів вже при концентрації білка 1 мкг/мл. З лектином 14К починає підвищувати інтенсивність флюоресценції в 2 рази ще при нижчій концентрації білка — 10 нг/мл.

Зростання інтенсивності флюоресценції барвника в присутності білка може бути обумовлене двома причинами: по-перше, жорсткою фіксацією молекули барвника на молекулі білка і, по-друге, підвищенням в'язкості водного середовища при розчиненні в ньому білка [9]. Щоб оцінити можливий внесок останнього фактора в загальне підвищення інтенсивності флюоресценції 14К, було досліджено інтенсивність флюоресценції барвника в суміші буфер : гліцерин (1 : 1): У присутності 50 % гліцерину квантовий вихід флюоресценції 14К зростає лише в 5 разів. Отже, підвищення флюоресценції барвника в присутності БСА більше ніж на

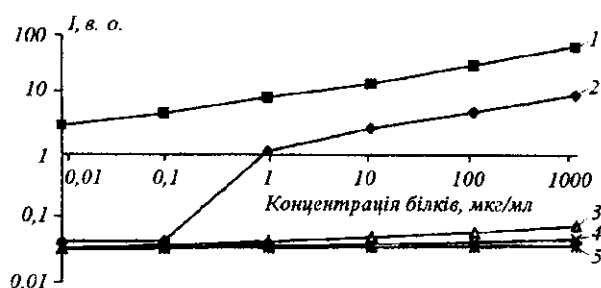


Рис. 3. Залежність інтенсивності флюоресценції (I) барвника 14К від концентрації білків (в. о. — відносні одиниці). Осі координат наведено в логарифмічній залежності

два порядки не можна пояснити просто підвищенням в'язкості розчину. Для вивчення впливу можливої домішки нуклеїнових кислот на результати детекції було також досліджено інтенсивність флюоресценції барвника в присутності нуклеїнових кислот. Присутність РНК підвищує квантовий вихід флюоресценції 14К у 100 разів, тоді як присутність ДНК — у 8 разів.

Відомо, що відсутність інтенсивної флюоресценції вільних цjanінів у розчині пояснюється тим, що для незв'язаних молекул карбоціаніну за рахунок конформаційних переходів та крутильних коливань відбувається безвипромінювальне розсіювання значної частини поглинутої енергії [9]. При взаємодії молекули барвника з білком або нуклеїновою кислотою фіксується планарна конформація і ймовірність випромінювальної дезактивації поглинутої енергії зростає.

Щодо взаємодії барвника з нуклеїновими кислотами, слід зауважити, що розміри та конформація барвника не дозволяють йому інтеркалювати

між парами основ дволанцюгової ДНК та жорстко зафіксувати планарну конформацію. Тому невелике (у 8 разів) підвищення інтенсивності флюоресценції барвника в присутності ДНК, напевне, обумовлене зростанням в'язкості розчину. В той же час нуклеотидні основи односпірального ділянок РНК відкриті для взаємодії з барвником. Отже, барвник буде мати більше можливості для взаємодії з односпіральною РНК, ніж з двоспіральною ДНК. Цим, на погляд автора, і пояснюється 100-разове збільшення інтенсивності флюоресценції барвника в присутності РНК на противагу лише 8-разовому — з ДНК.

При детекції білків у розчинах за допомогою флюоресцентних зондів для підвищення чутливості використовують денатурацію білків [3]. Дійсно, після денатурації білків було зафіксоване 25—40 %-ве підвищення квантового виходу флюоресценції 14К відносно інтенсивності флюоресценції 14К у присутності нативних білків (таблиця).

Було вивчено також вплив речовин, які можуть бути домішками при визначенні білків і потенційно впливати на чутливість детекції та інтенсивність флюоресценції 14К. Як видно з наведених нижче даних, величини зростання флюоресценції барвника в присутності таких речовин не перевищують 13 разів:

1 М сечовина	в 5,5 разу
5 мМ ЕДТА	в 2 рази
20 мМ КСІ	у 13 разів
50 мМ β -меркаптоетанол	у 1,5 разу
1 М Gly, Glu, Tgr	Не впливають

Таким чином, наявність цих сполук суттєво не впливає на зростання інтенсивності флюоресценції 14К порівняно з вільним його станом. Величини зростання флюоресценції складають 2—13 разів.

Отже, барвник 14К може бути використаний для синтезу на його основі флюоресцентних зондів високої чутливості для детекції білків у розчині.

Інтенсивність випромінювання комплексів 14К з різними білками

I , в. о.	Лектин	Лизоцим	Альбумін жовтка	БСА
Нативний стан	60	0,064	0,039	9,46
Денатурований стан	78	0,1	0,053	15

Автор висловлює щирю подяку Олександрові Гоменюку за допомогу в проведенні експерименту.

С. Н. Ярмолюк

Белки и цианиновые красители. 1. Несимметричный карбоцианиновый краситель 14К — новый флюоресцентный зонд для гомогенного определения белков в растворе

Резюме

Исследовано взаємодія карбоцианина 14К (6,8-диетил-7-[Е-3-(8-етил-7,8-дигидро-[1,3]-тиазоло-[4',5',3,4], бензо-[d]-[1,2,3]-тиодиазол-7-илден)-1-пропеніл]-6Н-имідазол-4',5',5,6]-бензо-[d]-[1,2,3]-тиодиазол-8-ий йодид) з чотирьма белками в нативному і денатурированому стані. Показано, що краситель 14К в різній ступені збільшує інтенсивність флюоресценції в присутстві цих белків в нативному стані. При взаємодії з денатурированными белками квантовий вихід флюоресценції 14К збільшується на 25—40 % відносно інтенсивності флюоресценції комплексів 14К з нативними белками. Предложено можливий механізм, пояснює збільшення інтенсивності флюоресценції 14К при взаємодії з белками і нуклеиновими кислотами. Изучено влияние присутствия различных реагентов на интенсивность флюоресценции 14К.

S. M. Yarmoluk

Proteins and cyanine dyes. 1. Asymmetrical carbocyanine dye 14K — a new fluorescent probe for homogeneous detection of proteins in solution

Summary

An interaction of carbocyanine 14K (6,8-diethyl-7-[E-3-(8-ethyl-7,8-dihydro-[1,3]-thiazolo-[4',5',3,4], benzo-[d]-[1,2,3]-thiadiazolo-7-ylidene)-1-propenyl]-6H-imidazo-4',5',5,6]thiadiazolo-8-ium iodide) with four proteins in both native and denatured states has been studied. The difference in fluorescent enhancement of this dye in the presence of various proteins has been shown. The fluorescence intensity of 14K in the presence of denatured proteins

increased by 25—40 % in comparison with the fluorescence intensity of this dye in the complexes with corresponding native proteins. A possible mechanism of increasing the dye fluorescence under the interaction with proteins and nucleic acids has been proposed. The influence of different substances on fluorescent properties of 14K has been studied.

ПЕРЕЛІК ЛІТЕРАТУРИ

1. Scopes R. K. Protein purification: principles and practice / 2nd ed.—Amsterdam: Springer, 1987.—P. 280—283.
2. Корнелюк А. И., Курочкин И. В., Мацука Г. Х. Тирозин-тРНК-синтетаза из печени быка. Выделение и физико-химические свойства // Молекуляр. биология.—1988.—22, № 1.—С. 176—186.
3. Haughland R. P. Detection and quantitation of protein in solution // Handbook of fluorescent probes and research chemicals / 6th ed.—1996.—P. 180—182.
4. Mayer A., Neuenhofer S. Luminescent labels — more than just alternative to radioisotopes // Angew. Chem. Int. Ed. Engl.—1994.—33.—P. 1044—1072.
5. Ярмолюк С. М. Взаємодія ціанінових барвників з нуклеїновими кислотами. 8. Вивчення ціанінових барвників як можливих флюоресцентних зондів для детекції нуклеїнових кислот // Біополімери і клітина.—1999.—15, № 4.—С. 328—336.
6. Коваленко Э. А. Аминокислотный и моносахаридный состав внеклеточных сиалоспецифичных лектинов бактерий рода *Bacillus* // Микробиол. журн.—1997.—59, № 5.—С. 3—6.
7. Привалов П. Л. Исследование белков в денатурированом состоянии: Тез. Всесоюз. симпозиума химии белков.—Тбилиси, 1990.
8. Демченко А. Д. Ультрафиолетовая спекрофотометрия и структура белков.—Киев: Наук. думка, 1981.
9. Ищенко А. А. Строение и спектрально-люминесцентные свойства полиметиновых красителей.—Киев: Наук. думка, 1994.

УДК 542.95

Надійшла до редакції 09.02.99