

А. Е. ЗАКАРЯН, А. Б. АВАҚЯՆ, Г. А. ПАНОСЯՆ

О ВЗАИМОДЕЙСТВИИ ПРЕПАРАТОВ ПЛАЗМАТИЧЕСКИХ МЕМБРАН С КРАСИТЕЛЯМИ ЭОЗИНОМ БА И РОДАМИНОМ 6Ж

Исследовалось взаимодействие красителей эозина БА и родамина 6Ж с препаратами плазматических мембран. Показано, что эти красители взаимодействуют с мембранами за счет образования слабых связей. Предполагается возможность использования их для исследования биологических мембран.

Одной из наиболее важных проблем современной мембранологии является изучение конформационных переходов при функционировании мембранных структур и особенно плазматических мембран (ПМ) различных клеток. Для этого в настоящее время применяется ряд физических методов, таких, как круговой дихроизм (КД) [1, 2] и ядерно-магнитный резонанс (ЯМР) [3]. Однако метод флуоресцентных зондов, который позволяет обнаружить незначительные изменения в состоянии белковых молекул [1] и белок-липидных комплексов [4], является еще более доступным и перспективным.

Изменение параметров флуоресценции некоторых зондов, обычно нековалентно связанных с белками либо с компонентами мембран или белок-липидных комплексов, может дать конкретные сведения о наличии различных специфических групп [5], охарактеризовать микровязкость окружения зонда [6], выявить влияние растворителей [7, 8] и т. д.

В настоящее время используется большое количество зондов для исследования свойств многих белков и ферментов, а также белок-липидных комплексов и биологических мембран. Флуоресцентным методом получены данные о сродстве к ним разнообразных лигандов и о структурных перестройках, индуцируемых в них действием различных агентов [4, 9]. Наконец, важным достоинством этого метода является возможность регистрировать процессы, происходящие в течение 10^{-10} и более сек при сравнительно низких концентрациях белка (10^{-5} — 10^{-7} М).

В представленной работе приводятся данные, полученные нами при исследовании флуоресценции эозина БА (ЭБА) и родамина 6Ж (Р6Ж) в присутствии фрагментов плазматических мембран печени крысы.

Материал и методика. Объектом исследования служили препараты ПМ, полученные по методу Нигамы и др. [10] на немецкой ультрацентрифуге Vac-60, с некоторой модификацией—последнее осаждение проводилось в 0,5 мМ растворе хлористого кальция. Количество мембранных препаратов в испытуемых образцах составляло 0,1 мг/мл по белку, определенному методом Лоури-Фолина. Рабочие концентрации красителей

равнялись 10^{-2} мг/мл. Все растворы готовились в 0,05 М трис-аминометан-НСl буфере, рН 7,2. Спектры флуоресценции регистрировались на японском спектрофлуориметре Hitachi—MPF-2A. В некоторых случаях производилось измерение спектров возбуждения взятых нами красителей в присутствии ПМ на венгерском приборе Spectromot-204, имеющем специальное устройство для измерения флуоресценции.

Результаты и обсуждение. Учитывая то, что красители обычно взаимодействуют с белковой частью белок-липидных комплексов мембранных структур, нами предварительно исследовалось взаимодействие ЭБА и Р6Ж с сывороточным альбумином человека (САЧ). При этом было установлено, что смещение максимума возбуждения ЭБА в присутствии САЧ (на 16—17 нм в сторону длинных волн) более заметно, чем у Р6Ж (всего на 5—6 нм), что, вероятно, обусловлено относительно большим сродством ЭБА к САЧ.

В последующих опытах исследовалось изменение параметров флуоресценции взятых нами красителей в присутствии ПМ. Из рисунка 1а следует, что в случае с ЭБА отмечается падение интенсивности флуоресценции и небольшое смещение максимума (на 5—6 нм) в длинноволновую область спектра. Опыты с Р6Ж дали аналогичные результаты (рис. 1б).

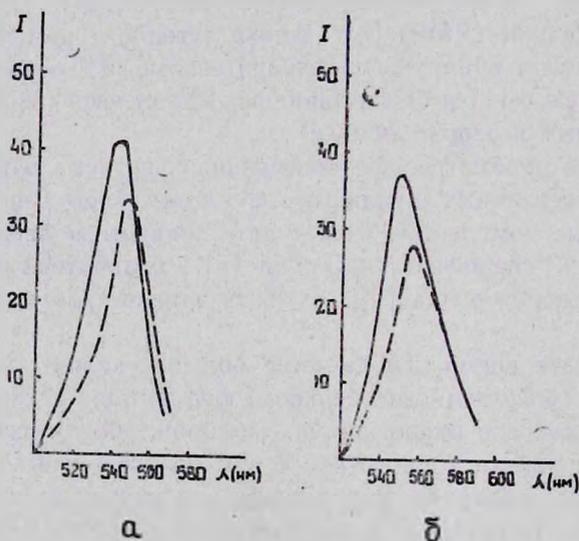


Рис. 1. Действие мембранных препаратов на флуоресценцию эозина БА (а) и родамина 6Ж (б).—свободный краситель, —краситель+ПМ.

Уменьшение стока сдвига флуоресценции ЭБА в присутствии мембранных препаратов по сравнению с опытами с САЧ, возможно, обусловлено изменением микровязкости окружения зонда и последующим нарушением возможности переориентации. Это может быть обосновано данными Левина [11], которые были получены при использовании импульсного возбуждения. Падение интенсивности флуоресценции красителей в наших экспериментах может быть объяснено связыванием свободного красителя с мембранными структурами.

Принимая во внимание тот факт, что мочевины может образовывать сильные водородные связи и тем самым нарушать структуру мембранных фрагментов, мы провели опыты для изучения взаимодействия красителей с ПМ в растворах мочевины различных концентраций. Оказалось, что с повышением концентрации растворов мочевины интенсивность флуоресценции красителей в присутствии мембранных препаратов увеличивается почти до уровня флуоресценции свободного красителя (рис. 2). Вероятно, это обусловлено тем, что мочевины, конкури-

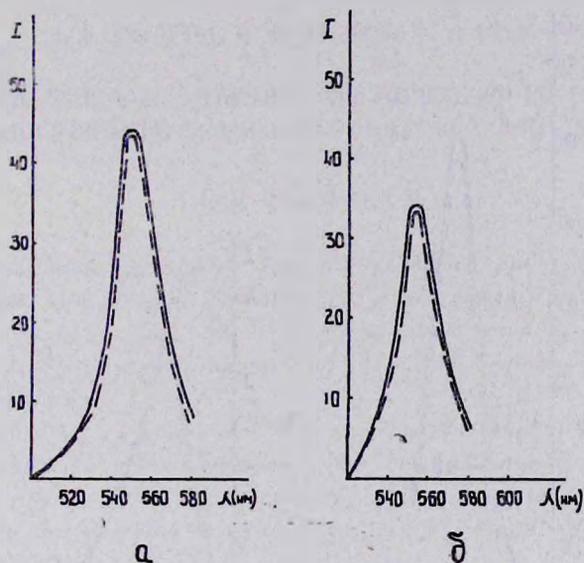


Рис. 2. Действие мембранных препаратов на флуоресценцию эозина БА (а) и родамина БЖ (б) в растворе 7 М мочевины.—свободный краситель, —краситель+ПМ.

руя за образование водородных связей, не дает возможности красителям адсорбироваться на поверхности ПМ. Об этом свидетельствует также отсутствие стока сдвига максимумов флуоресценции красителей в присутствии ПМ в растворах мочевины высоких концентраций. Действительно, имеются данные, согласно которым образование водородных связей различных молекул с красителями (4-диметиламинохолоном) приводит к длинноволновому сдвигу λ_m [12].

В следующей серии опытов спектры флуоресценции систем краситель+ПМ измеряли в растворах (сверхрастворителя) диметилформамида (ДМФА), учитывая то, что ДМФА как детергент ослабляет гидрофобные взаимодействия. Его присоединение к белкам может приводить также к разрушению водородных связей вследствие уже сил внутримолекулярного электростатического отталкивания или нарушения стабильности спиральной структуры неполярными белковыми группами. Из полученных экспериментальных данных видно (рис. 3), что в растворах ДМФА в присутствии ПМ почти не меняется уровень и не наб-

людается смещение максимумов флуоресценции. Возможно, это объясняется тем, что в растворах ДМФА красители не взаимодействуют с мембранными препаратами.

Отметим, что после тепловой обработки в течение 5 мин в интервале от 20 до 50°C с повышением температуры наблюдалось резкое падение интенсивности флуоресценции красителей в присутствии ПМ. Это хорошо согласуется с данными, согласно которым при денатурации белков увеличивается их сродство к красителям [13—15].

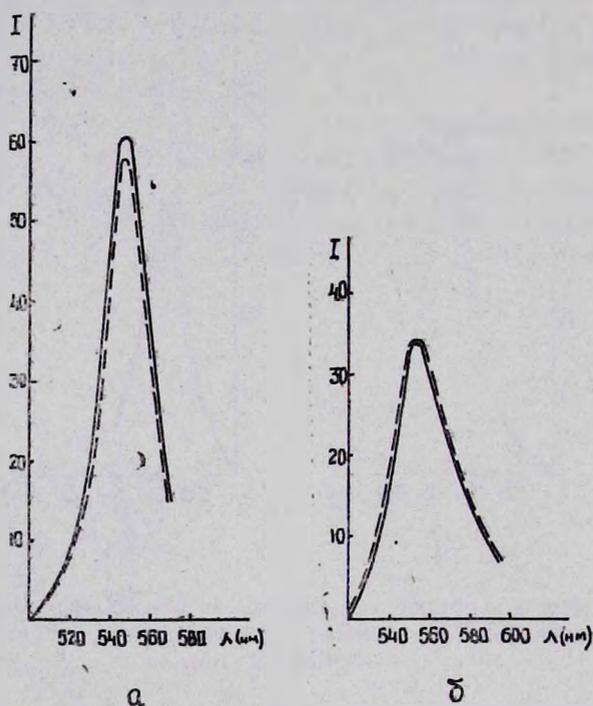


Рис. 3. Действие мембранных препаратов на флуоресценцию эозина БА (а) и родамина 6Ж (б) в 50% растворе диметилформамида.—свободный краситель, — краситель+ПМ.

Результаты наших опытов по исследованию взаимодействия красителей с диализированными препаратами ПМ показывают, что в этом случае увеличивается падение интенсивности флуоресценции ЭБА и Р6Ж, причем у Р6Ж диализированные ПМ почти в два раза сильнее тушат интенсивность флуоресценции красителя, чем недиализированные. Очевидно, это можно объяснить тем, что в результате диализа некоторых ионов (особенно Ca^{++}) с поверхности мембран появляются новые центры сорбции для красителей. Действительно, в работе Тугая и др. [16] было показано, что увеличение концентрации ионов кальция до 1,5 мМ приводит к уменьшению числа мест для связывания красителя нейтрального красного почти в 18 раз, хотя связывание других красителей может меняться противоположным образом [12].

Таким образом, анализируя приведенные данные, можно заключить, что ЭБА и Р6Ж взаимодействуют с препаратами ПМ за счет образования слабых связей, изменение которых хорошо отражается на параметрах флуоресценции красителей; это дает нам право считать возможным их использование в качестве зондов для исследования мембранных структур.

Ереванский государственный университет,
кафедра биофизики

Поступило 13.II 1976 г.

Ա. Ե. ԶԱԲԱՐՅԱՆ, Ա. Բ. ԱՎԱԳՅԱՆ, Գ. Հ. ՓԱՆՈՍՅԱՆ

ՊԼԱԶՄԱՅԻՆ ԹԱՂԱՆԹՆԵՐԻ ՊՐԵՊԱՐԱՏՆԵՐԻ ԵՎ ԷՈԶԻՆ
ԲԱ ՈՒ ՌՈԴԱՄԻՆ ԵԺ ՆԵՐԿԵՐԻ ՓՈԽԱԶԳԵՑՈՒԹՅԱՆ ՄԱՍԻՆ

Ա մ փ ո փ ու մ

Ֆլորիսցենցիայի գրանցման մեթոդով ուսումնասիրվել է առնետի լյարդից ստացված պլազմային թաղանթների փոխազդեցությունը էոզին ԲԱ և ոոդամին ԵԺ ներկերի հետ: Հետազոտությունները տարվել են միզանյութի, դիմեթիլ-ֆորմամիդի լուծույթներում, ինչպես նաև տարբեր շերմաստիճանների պայմաններում:

Ծնթաղվում է, որ էոզին ԲԱ և ոոդամին ԵԺ ներկերի փոխազդեցությունը թաղանթային պրեպարատների հետ իրականացվում է թույլ կապերի առաջացման միջոցով: Դա հնարավորություն է տալիս այդ ներկերը օգտագործել որպես ֆլորիսցենտ գոնդեր պլազմային թաղանթների ուսումնասիրության նպատակով:

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Добрецов Г. Е., Харитоненков И. Г., Мишиев Е. В., Владимиров Ю. А. Биофизика, 20, 4, 581—585, 1975.
2. Daniel E., Jand J. Biochemistry, 12, 3, 508—511, 1973.
3. Chance B. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 67, 2, 560—571, 1970.
4. Добрецов Г. Е. Сб. Молекулярная биология. 6. (Итоги науки и техники. ВИНТИ. АН СССР), М., 34—93, 1975.
5. Parker C., Osterland C. Biochemistry, 9, 5, 1074—1082, 1970.
6. Brand L., Gohlke J. J. Biol. Chem., 246, 7, 2317—2324, 1971.
7. Kosower E. J. Amer. Chem. Soc., 80, 13, 3253—3260, 1958.
8. Turner D., Brand L. Biochemistry, 7, 10, 3381—3390, 1968.
9. Алфимова Е. Я., Кольтовер В. К., Райхман Л. М. Биофизика, 17, 6, 1043—1047, 1972.
10. Nigam V. N., Moralls S. R., Karasaki R. Biochem. Biophys. 249. Acta, 1, 34—40, 1971.
11. Левин С. В. Структурные изменения клеточных мембран. Л., 1976.
12. Сороковой В. И. Канд. дисс. М., 1973.
13. Barel A., Turneer M., Dotmans M. Eur. J. of Biochem., 30, 1, 26—32, 1972.
14. Guttenplan J., Calvin M. Biochem et biophys. acta. 322, 2, 294—297, 1973.
15. Wu Ch., Wu F. Biochemistry, 12, 22, 4349—4355, 1973.
16. Тугай В. А., Левин С. В., Курский М. Д. Цитология, 15, 9, 1103—1109, 1973.