

УДК 577.151

Ф.Б.Байрамов (5 курс, каф. ЭФ), М.Г.Петухов, к.ф.-м.н., с.н.с. НОЦ “Биофизика”,
Е.А.Глазунов, к.б.н., н.с. НОЦ “Биофизика”, Б.Х.Байрамов, д.ф.-м.н., в.н.с. ФТИ РАН

ИССЛЕДОВАНИЕ ГИДРАТАЦИИ ЛИЗОЦИМА С ПОМОЩЬЮ ЛАЗЕРНОЙ СПЕКТРОСКОПИИ НЕУПРУГОГО РАССЕЯНИЯ СВЕТА

Поскольку многие белки принимают нативную (т.е. природную и биологически активную) конформацию только при физиологических условиях в водной среде, выяснение природы взаимодействия белков с водой является одной из актуальных проблем физики белка. Определение вклада гидратации в свободную энергию белка остается трудной задачей из-за большого количества различных физических взаимодействий между белком и водой, включая такие как Ван-дер-ваальсовы силы, водородные связи, электростатическая поляризация диполей воды, гидрофобные взаимодействия и различные энтропийные эффекты. Кроме того, как было показано экспериментально, возможно также образование стабильных водных структур, таких как, например, клатраты, образующиеся около гидрофобных участков поверхности белка. Одним из важных факторов гидратации белков, который вносит значительный вклад в свободную энергию, является также то, что молекулы воды способны образовывать мостики водородных связей с двумя атомами белка [1]. В этой работе мы попытались разработать новый метод, способный детектировать образование водных мостиков в белках с помощью Рамановской спектроскопии рассеяния света в видимой области спектра.

Изучалось рассеяние света в образцах лизоцима из белка куриных яиц, растворенного в TRIS буфере (рН 5.5). Для регистрации слабых световых потоков рассеянного света использовалась экспериментальная установка, разработанная в лаборатории “Оптики полупроводников” ФТИ им. А.Ф.Иоффе. В качестве источника возбуждения спектра использовался аргоновый (Ar⁺) лазер непрерывного действия с длинами волн 487.980 и 514.532 нм и мощностью ~ 50-150 МВт на отдельных линиях. Лазерный луч, прошедший через фильтр из двух спектральных призм и поляризатор, фокусировался на образец с помощью короткофокусной линзы. Исследуемый раствор находился в оптической кювете из плавленого кварца размером (1×1×1) см³. Дно кюветы было специально отполировано для вывода лазерного излучения. Спектральный состав рассеянного света анализировался с помощью двойного дифракционного монохроматора. Эксперименты показали, что разработанная методика регистрации спектров неупругого рассеяния света, возбуждаемых в видимой области спектра, в водных растворах белков позволяет детектировать спектры как квазиупругого рассеяния света в области низких частот, близких к возбуждающей линии лазера, так и неупругого рассеяния света в области высоких частот до 5000 см⁻¹.

Теоретические расчеты [1], выполненные для известной пространственной структуры лизоцима, показали, что на поверхности этого белка возможно образование 37 водных мостиков. Часть мостиков (примерно 1/3) обладает чрезвычайно низкой свободной энергией. Интересно, что водные мостики на поверхности белка формировались почти исключительно С=О группами основной цепи белка.

Спектры неупругого рассеяния света, полученные для особо чистой воды, в целом, хорошо совпадают с литературными данными. В спектрах для буфера TRIS обнаружены, незначительные отличия от спектров воды. В спектрах лизоцима в буфере TRIS обнаружено появление дополнительной структуры линий в области частот 3000 см⁻¹, характерной, как

было нами показано, для водных мостиков на поверхности белка. В области $1500 - 1700 \text{ см}^{-1}$ обнаружена богатая структура с максимумами, соответствующими различным группам в аминокислотной цепи белка, которые взаимодействуют с окружающей белок водой. Это указывает на возможность непосредственного детектирования формирования водных мостиков на поверхности белка.

ЛИТЕРАТУРА:

1. M. Petukhov, D. Cregut, C.M. Soares, L. Serrano. Local water bridges and protein conformational stability. *Protein Sci.* 8, 1999, 1982-1989.