

Хрусталёв В.В.¹, Стожаров А.Н.¹, Хрусталёва Т.А.², Побойнев В.В.¹

Особенности «тонкого» спектра флюоресценции триптофана

¹УО «Белорусский государственный медицинский университет»,
г. Минск, Беларусь

²ГНУ «Институт физиологии НАН Беларуси», г. Минск, Беларусь

Анализ спектра флюоресценции остатков триптофана в белках традиционно используют в работах, посвящённых изучению структуры этих биополимеров. Известно, что степень полярности растворителя коррелирует с положением максимума длины волны испускания на спектре чистого триптофана. Считается, что положение максимума на спектре флюоресценции как свободного триптофана, так и его остатков в белках варьирует от 308 нм (в абсолютно неполярных растворителях и в белке азурине) до 352 нм (в воде и в глюкагоне). В данной работе нами были получены «тонкие» спектры флюоресценции триптофана с шагом в 1 нм.

Материалом послужили препараты 20 белков и чистого триптофана (Sigma-Aldrich). Спектр флюоресценции триптофана снимали в воде, ацетонитриле, бутаноле, бензоле и гексане. Спектр флюоресценции белков снимали в 0,01М фосфатном буфере при pH=7,4. Все спектры записывали с шагом в 1 нм и в 5 нм на спектрофлюориметре SOLAR CM2203. Длина волны возбуждения флюоресценции – 280 нм.

Положения максимума на спектрах испускания для 20 белков соответствуют таковым из многочисленных источников только при записи с шагом в 5 нм. При записи с шагом в 1 нм на всех спектрах флюоресценции белков заметны два максимума: в районе 330 нм (с колебаниями от 325 до 337 нм) и в районе 360 нм. Для всех использованных белков, кроме пепсина, максимум при 330 нм имеет более высокую интенсивность, чем максимум при 360 нм. Если на спектрах, снятых через 5 нм, варьирует положение единственного максимума флюоресценции (от 327 нм до 350 нм), то на «тонких» спектрах варьирует соотношение интенсивности максимума флюоресценции при 330 нм и при 360 нм. Объяснить такое явление можно тем, что для ароматической системы триптофана наиболее характерны только два перехода из возбуждённого состояния в нормальное: в одном случае энергия теряется в большей степени за счёт испускания фотонов, в другом случае возрастает роль безызлучательного перехода.

В воде чистый триптофан имеет два максимума испускания на «тонком» спектре с преобладанием такового при 360 нм. В бутаноле, ацетонитриле и бензоле триптофан также демонстрирует два максимума испускания, но с преобладанием такового при 330 нм. По мере увеличения содержания воды в её смеси с ацетонитрилом максимум на

спектре испускания триптофана при 330 нм закономерно снижается, а максимум при 360 нм – закономерно возрастает. В гексане «тонкий» спектр триптофана сохраняет пик при 330 нм, полностью теряет таковой при 360 нм, но приобретает наиболее интенсивный максимум при 308 нм. Судя по полученным данным, пик при 360 нм обусловлен взаимодействием постоянного диполя с пи-системой триптофана по типу анион-пи контакта или взаимодействием двух пи-систем «лицом к лицу». Пик при 330 нм обусловлен взаимодействием постоянного или спонтанно возникающего диполя с ароматической системой триптофана по типу катион-пи контакта, или взаимодействием двух пи-систем «край к лицу». Отсутствие полярных взаимодействий приводит к появлению максимума флюоресценции при 308 нм.

Особенности «тонкого» спектра триптофана необходимо учитывать при интерпретации спектральных данных в биофизических и биохимических исследованиях. На спектр флюоресценции остатков триптофана в белках оказывает влияние как близость к ним гидрофобных, полярных и заряженных функциональных групп белка, так и доступность их водному микроокружению.