БИООРГАНИЧЕСКАЯ ХИМИЯ
том 5 * № 8 * 1979

УДК 547.962.3:04

ИЗУЧЕНИЕ СВЯЗЫВАНИЯ СЫВОРОТОЧНОГО АЛЬБУМИНА С ЦЕТИЛМЕТАКРИЛАТОМ В РАСТВОРЕ МЕТОДОМ ФЛУОРЕСЦЕНТНОГО ЗОНДА

Ужинова Л. Д., Грачева Н. А., Платэ Н. А.

Химический факультет Московского государственного университета им. М. В. Ломоносова

Методом флуоресцентного зонда проведена количественная оценка констант связывания альбумина с цетилметакрилатом, используемым в качестве специфического лиганда при синтезе адсорбентов сывороточного альбумина. В качестве флуоресцентного зонда выбран 1-анилинонафталин-8-сульфонат *. Сравнение констант связывания в системе сывороточный альбумин – АНС – цетилметакрилат ($K'_{\text{СА–АНС}}$ $3{,}1 \cdot 10^4$ M^{-1}, $K_{\text{СА–ЦМА}}$ $8{,}06 \cdot 10^4$ M^{-1}) показало, что происходит конкуренция за места связывания на молекуле альбумина различных гидрофобных лигандов. Это позволило сделать вывод о характере сорбции белка на синтезированных биоспецифических адсорбентах.

В развитии метода аффинной хроматографии [1], предоставляющей уникальные возможности для проведения очистки и выделения белков, наиболее перспективным направлением является создание адсорбентов на основе синтетических полимерных материалов, содержащих иммобилизованные специфические лиганды. Так, в работе [2] предложен новый способ синтеза таких адсорбентов сывороточного альбумина с использованием радикальной сополимеризации мономеров, образующих матрицу, и мономеров-лигандов. В таких системах достаточно просто регулировать содержание лиганда, размер пор геля, они обладают высокой емкостью и селективностью. Для целенаправленного выбора мономера-лиганда, ответственного за связывание белков, необходима оценка параметров его взаимодействия с выделяемым белком. В частности, для сывороточного альбумина, основного белкового компонента плазмы крови, высокое сродство к неэтерифицированным жирным кислотам, содержащим углеводородные радикалы C_{12-20}, позволяет использовать в качестве специфического лиганда цетилметакрилат, углеводородный радикал которого ($C_{16}H_{33}$), как известно [3], максимально стерически соответствует адсорбционным центрам на молекуле альбумина.

Неспецифичность транспортной функции сывороточного альбумина, отличающая его от других белков плазмы крови и проявляющаяся в конкуренции ряда флуоресцентных красителей, так называемых флуоресцентных зондов типа 1-анилинонафталин-8-сульфоната, с жирными кислотами за одни и те же места связывания на молекуле белка, позволяет привлечь методику флуоресцентного зонда для определения константы связывания

* В работе приняты сокращения: СА – сывороточный альбумин, АНС – 1-анилинонафталин-8-сульфонат, ЦМА – цетилметакрилат.

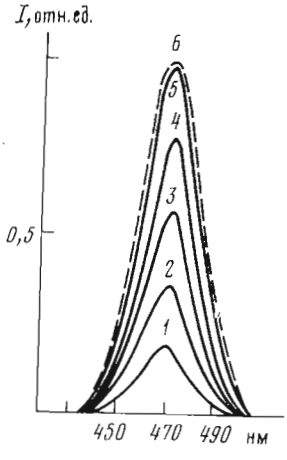

Рис. 1

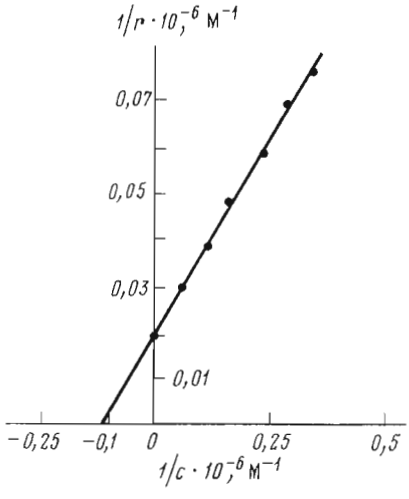

Рис. 2

Рис. 1. Спектры флуоресценции смеси АНС с сывороточным альбумином в фосфатном буфере (pH 7,4) при их соотношении 2,2 (*1*), 2,4 (*2*), 2,6 (*3*), 2,8 (*4*), 3 (*5*) и 4 (*6*)

Рис. 2. Определение константы связывания в системе альбумин – АНС в фосфатном буфере, pH 7,4

сывороточного альбумина с цетилметакрилатом. АНС флуоресцирует в водном растворе только в том случае, если он каким-то образом связан с белком. Само связывание, а также параметры флуоресценции зондов существенно зависят от структурных изменений в белковой молекуле. Поэтому зонд оказывается весьма чувствительным к любым изменениям, происходящим при взаимодействии белка с различными лигандами.

Флуоресцентные спектры системы сывороточного альбумина — АНС в фосфатном буфере приведены на рис. 1. Практически флуоресцируют только молекулы АНС, связанные с белком, и с увеличением числа молей зонда, связанных молем белка, интенсивность флуоресценции увеличивается. Предельное значение интенсивности наступает при мольном отношении АНС — белок, равном 3—4, которое, вероятно, соответствует числу мест на белке, отвечающих за связывание флуоресцентного зонда (или вещества подобного рода) [4]. Для количественной оценки изменений, происходящих при конкуренции лигандов за одно и то же место связывания на молекуле сывороточного альбумина, была рассчитана константа связывания белка с АНС в фосфатном буфере ($K^0_{\text{СА–АНС}}$) по методу Клотца [5], согласно которому уравнение для расчета константы можно записать в виде

$$K\left(\frac{N}{r} - 1\right) = \frac{1}{c},$$

где c и r — концентрации свободного и связанного флуоресцентного зонда в М соответственно; N — концентрация связывающих центров в М. Величины c и r рассчитывали из экспериментальных данных, измеряя интенсивность максимума спектров флуоресценции исследованных систем. В координатах $1/c-1/r$ (рис. 2) зависимость представляется прямой линией, отсекающей на оси абсцисс отрезок, равный $K^0_{\text{СА–АНС}}$ ($1{,}02\cdot10^5$ М^{-1}).

При изучении систем, содержащих цетилметакрилат, был использован смешанный растворитель (вода — пропиловый спирт), так как этот лиганд не растворяется в воде. Вначале были измерены спектры КД растворов белка в фосфатном буфере, содержащем цетилметакрилат и определенное количество пропилового спирта, достаточное для растворимости необходи-

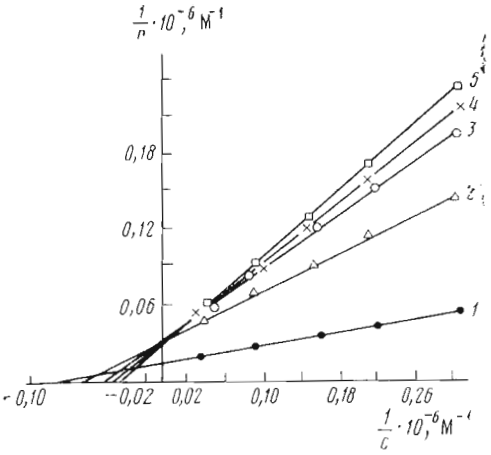

Рис. 3

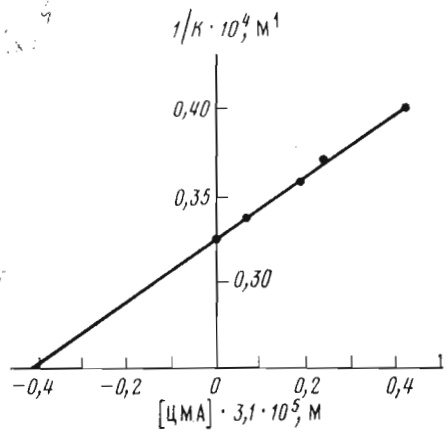

Рис. 4

Рис. 3. Влияние пропилового спирта на константу связывания сывороточного альбумина с АНС в фосфатном буфере, pH 7,4. Концентрация пропилового спирта соответственно: *1* – 0 (1,02·10^5), *2* – 0,1 (8,0·10^4), *3* – 0,19 (6,0·10^4), *4* – 0,28 (5,0·10^4), *5* – 0,37 М (4,3·10^4). В скобках приведены соответствующие значения $K_{\text{СА–АНС}}$, М$^{-1}$

Рис. 4. Определение константы связывания в системе альбумин – цетилметакрилат ($K_{\text{СА–ЦМА}}$): водно-спиртовая среда, концентрация пропилового спирта 1,9 М

мой навески цетилметакрилата и не вызывающее помутнения водного раствора альбумина в результате возможного высаживания белка. Каких-либо изменений в спектрах КД изучаемых систем в сравнении с контрольными не наблюдалось. Это свидетельствует о том, что смешанные растворители в данном случае, по-видимому, не нарушают конформации альбумина. Однако в системе белок – АНС – пропиловый спирт с увеличением содержания спирта отмечается падение значений константы связывания белка с АНС (рис. 3). Пользуясь набором измеренных вышеописанным способом констант $K_{\text{СА–АНС}}$, получаемых при различных концентрациях пропилового спирта, рассчитали, что константа связывания АНС с альбумином при концентрации пропилового спирта, использованной для приготовления растворов, содержащих цетилметакрилат, равна соответственно $K'_{\text{СА–АНС}}$ 3,1·10^4 М$^{-1}$. Такое уменьшение $K'_{\text{СА–АНС}}$ по сравнению с $K^0_{\text{СА–АНС}}$ при добавлении в изучаемую систему пропилового спирта может быть связано с незначительной модификацией связывающих центров белка, которую не чувствует метод КД, но которая отражается на изменении флуоресценции АНС в смешанном растворителе по сравнению с водным раствором при тех же концентрациях зонда и белка. Поэтому при оценке конкурентоспособности цетилметакрилата за занятие мест связывания АНС на молекуле белка использовали $K'_{\text{СА–АНС}}$. $K_{\text{СА–ЦМА}}$ рассчитывали тем же методом, что и $K'_{\text{СА–АНС}}$, из данных пяти серий экспериментов, содержащих различные количества цетилметакрилата. Определенная графически $K_{\text{СА–ЦМА}}$ равна 8,06·10^4 М$^{-1}$ (рис. 4). Таким образом, уменьшение $K_{\text{СА–АНС}}$ в этой системе (по сравнению с $K'_{\text{СА–АНС}}$) при увеличении содержания цетилметакрилата свидетельствует о конкуренции мономера-лиганда с флуоресцентным зондом за одни и те же места связывания на молекуле альбумина, а сопоставление величин $K'_{\text{СА–АНС}}$ и $K_{\text{СА–ЦМА}}$ приводит к заключению о большем сродстве цетилметакрилата к этим центрам по сравнению с АНС.

Основное отличие сывороточного альбумина от других белков плазмы состоит в значительной неспецифичности транспортной функции, которая проявляется в конкуренции различных переносимых им лигандов за одни и те же места связывания на молекуле белка. Особенно высокое сродство альбумин проявляет к неэтерифицированным жирным кислотам. Однако вытесняющее действие жирных кислот становится заметным только после

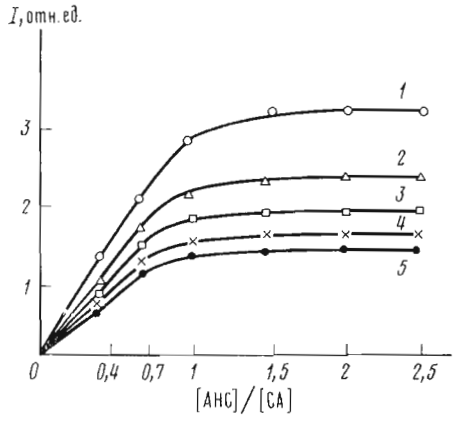

Рис. 5. Влияние цетилметакрилата на интенсивность флуоресценции системы альбумин — АНС в водно-спиртовой среде при концентрации пропилового спирта 1,9 М. Мольные соотношения цетилметакрилат — белок составляют 0 (*1*), 0,1 (*2*), 0,3 (*3*), 0,4 (*4*) и 0,8 (*5*)

заполнения 3—4 наиболее специфических мест связывания на молекуле белка. Этот факт указывает на то, что первые центры связывания жирных кислот на молекуле альбумина стерически недоступны для большинства объемных лигандов (красителей, билирубина, стероидов). Согласно данным Гудмена [3], молекула сывороточного альбумина человека имеет 7 центров с высокой энергией связывания физиологических жирных кислот, которые можно подразделить на два класса с соответствующими константами связывания: $K_1 \sim 10^6 - 10^8$ M^{-1} (2 центра) и $K_2 \sim 10^5 - 10^6$ M^{-1} (5 центров). Было показано [4], что тушение флуоресценции в комплексе бычьего сывороточного альбумина с АНС наступает лишь при молярном соотношении жирная кислота — белок, равном 3, т. е. при заполнении первых центров связывания кислот на молекуле альбумина. При соотношении жирная кислота — белок, равном 1—2, жирные кислоты не оказывают вытесняющего действия на молекулы АНС, а при большем соотношении конкурируют с АНС за места связывания в молекуле альбумина (K_1 $3{,}5 \cdot 10^5$, K_2 $1{,}2 \cdot 10^4$ M^{-1}), относящиеся ко второму классу и являющиеся общими для жирных кислот и других гидрофобных лигандов, транспортируемых альбумином.

Таким образом, в данной работе показано, что введение цетилметакрилата снижает интенсивность флуоресценции в системе альбумин — АНС уже при молярном соотношении цетилметакрилат — альбумин 0,1—0,2 (рис. 5). Это свидетельствует о превосходстве цетилметакрилата в процессе взаимодействия со вторым классом мест связывания на молекуле альбумина по сравнению с другими гидрофобными лигандами, например АНС, и об отсутствии его взаимодействия с первым классом мест связывания. Известно, что концентрация свободной жирной кислоты у человека в нормальных условиях составляет 10^{-3} моль/л плазмы, т. е. если в физиологических условиях на молекуле альбумина остаются незанятыми активные центры связывания, доступные для жирных кислот, билирубина и др., то мономер-лиганд цетилметакрилат, иммобилизованный в матрицу полимерного адсорбента, должен сорбировать на себя молекулу альбумина. Центры связывания этого лиганда на молекуле белка не перекрываются с центрами связывания других лигандов, к которым альбумин тоже проявляет большое сродство.

Экспериментальная часть

Растворы АНС (ФРГ) и сывороточного альбумина человека (Reanal, Венгрия) готовили в фосфатном буфере, pH 7,4. Концентрацию растворов белка определяли по поглощению в УФ-области ($E^{1\%}_{278}$ 5,3 [6]), используя спектрофотометр Pye Unicam SP8-100 (Англия). Флуоресцентные измерения проводили на флуориметре MPF-2A Hitachi при длине волны возбуждающего света 365 нм; флуоресцентное излучение наблюдали в ин-

тервале 400–600 нм (длина волны в максимуме интенсивности спектра флуоресценции 470 нм). Измерения проводили сразу после смешения компонентов изучаемых систем. Предварительно было показано, что характер спектра не зависит от промежутка времени между смешением компонентов и измерением. Величина ε_{350} $6{,}5 \cdot 10^3$ M^{-1} $см^{-1}$ для АНС, полученная в работе, совпадает с литературными данными [7]. Изучение связывания АНС на молекуле альбумина в различных системах проводили на основании оценки интенсивности в максимуме спектра флуоресценции соответствующих комплексов [5].

Исследованы следующие системы:

1. Альбумин — АНС в фосфатном буфере. Приготовлено 15 растворов с постоянной концентрацией альбумина ($2{,}2 \cdot 10^{-5}$ М), концентрацию АНС меняли от $2{,}2 \cdot 10^{-6}$ до $8{,}8 \cdot 10^{-5}$ М.

2. Альбумин — АНС — C_3H_7OH в фосфатном буфере. Приготовлено 5 серий растворов, концентрацию пропилового спирта в каждой из них сохраняли постоянной и равной соответственно 0,1; 0,19; 0,29; 0,4; 1,9 М, а концентрацию АНС в каждой серии варьировали от $0{,}64 \cdot 10^{-5}$ до $3{,}2 \cdot 10^{-5}$ М. Концентрация белка была постоянна во всех сериях и составляла $1{,}6 \cdot 10^{-5}$ М.

3. Альбумин — АНС — цетилметакрилат в водно-спиртовом растворителе. Приготовлено 5 серий растворов. Концентрацию цетилметакрилата в каждом из них сохраняли постоянной и равной соответственно 0; $0{,}16 \cdot 10^{-5}$; $0{,}48 \cdot 10^{-5}$; $0{,}64 \cdot 10^{-5}$ и $1{,}28 \cdot 10^{-5}$ М, а концентрацию АНС в каждой серии варьировали в тех же пределах, что и в серии 2. Концентрация белка была постоянна во всех сериях и составляла $1{,}6 \cdot 10^{-5}$ М. Цетилметакрилат предварительно растворяли в пропиловом спирте, а затем смешивали с раствором альбумина в фосфатном буфере. Все полученные системы были оптически прозрачны.

ЛИТЕРАТУРА

1. Cuatrecasas P., Anfinsen C. B. (1971) Methods Enzymol., **22**, 345–351.
2. Платэ Н. А., Матросович М. Н. (1976) Докл. АН СССР, **229**, 496—499.
3. Goodman D. S. (1958) J. Amer. Chem. Soc., **80**, 3892–3895.
4. Santos E., Spector A. (1972) Biochemistry, **11**, 2299–2305.
5. Добрецов Г. Е. (1975) в сб.: Молекуляр. биология, т. 6, с. 34–47. Итоги науки и техники, ВИНИТИ АН СССР.
6. Peters T., Jr. (1970) Advance Clin. Chem., **13**, 37–40.
7. Добрецов Г. Е. (1975) в сб.: Биофизика, т. 4, с. 86—97. Итоги науки и техники, ВИНИТИ АН СССР.

Поступила в редакцию
19.I.1979

CETYLMETHACRYLATE BINDING BY SERUM ALBUMIN IN SOLUTION AS STUDIED BY THE FLUORESCENT PROBE METHOD

UZHINOVA L. D., GRACHEVA N. A., PLATE N. A.

Chemistry Department, M. V. Lomonosov State University, Moscow

By the fluorescent probe method, the binding constants were determined for albumin association with cetylmethacrylate, the latter being commonly used as an affinity ligand in the synthesis of absorbents for serum albumin. 1-Anilinonaphthalene-8-sulfonate (ANS) was chosen as a fluorescent probe. A comparison of the binding constants in the ternary system serum albumin-ANS-cetylmethacrylate revealed a competition of various hydrophobic ligands for the binding sites on the albumin molecule. This permitted to make some conclusions about the character of protein adsorbtion onto studied biospesific adsorbents.