

меру молекул примеси. Кроме того, в спектрах люминесценции нами обнаружены переходы со второго возбужденного состояния, расположенного примерно на 200 см^{-1} выше первого. Излучение наблюдается как при температуре жидкого азота, так и при $4,2\text{ К}$. Интенсивность линий при понижении температуры образца от 77 до $4,2\text{ К}$ уменьшается примерно в три раза.

Таким образом, «мультиплетная» структура спектра вблизи $0\rightarrow 0$ перехода и его комбинаций с полносимметричным валентным колебанием иона UO_2^{2+} обусловлена присутствием в кристаллах соединений уранила структурных и химических дефектов. Последний вид дефектов обусловлен присутствием в коммерческих препаратах солей уранила различных примесей, а структурные дефекты образуются в процессе роста и хранения кристалла. Суммарный спектр поглощения или люминесценции представляет собой суперпозицию спектров, принадлежащих отдельным центрам свечения.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бурков В. И., Кизель В. А., Красилов Ю. И.— Оптика и спектроскопия, 1976, т. 40, с. 823.
2. Бурков В. И., Красилов Ю. И., Трофимова С. И.— ЖПС, 1978, т. 29, вып. 1, с. 80.
3. Володько Л. В., Комяк А. И., Севченко А. Н., Умрейко Д. С.— Изв. АН СССР. Сер. физ., 1973, т. 37, с. 865.
4. Hall L. A., Dieke J. H.— J. Opt. Soc. Amer., 1957, v. 47, p. 1092.
5. Wong D. P., Wong A. G., Wong E. G.— J. Chem. Phys., 1972, v. 56, p. 2838.
6. Абрамов А. П., Разумова И. К., Толстой Н. А.— В кн.: Спектроскопия кристаллов. М., 1975, с. 330.
7. Мейер К. Физико-химическая кристаллография.— М., 1972.
8. Справочник показателей качества химических реактивов.— М., 1968, т. 2, с. 770.
9. Ахметов Н. С. Неорганическая химия.— М., 1975.
10. Володько Л. В., Зажогин А. П., Комяк А. И.— Докл. АН БССР, 1979, т. 23, № 9, с. 791.
11. Анго А. Математика для электро- и радиоинженеров.— М., 1965, с. 596.
12. Агранович В. И. Теория экситонов.— М., 1968.
13. Лубченко А. Ф. Квантовые переходы в примесных центрах твердых тел.— Киев, 1978, с. 268.
14. Броуде В. Л., Рашба Э. И.— ФТТ, 1961, т. 3, вып. 7, с. 1941.

Кафедра спектроскопии и квантовой электроники

УДК 547.96.535.37

Е. В. БАРКОВСКИЙ, Н. А. ПРОКОШИНА, Н. Н. ХОВРАТОВИЧ, С. Н. ЧЕРЕНКЕВИЧ

СПЕКТРАЛЬНО-ЛЮМИНЕСЦЕНТНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ТРОМБИНА

Тромбин является ведущим ферментом системы свертывания крови. В настоящее время определены аминокислотный состав и последовательность аминокислот в молекуле, изучаются различные формы структурного состояния молекулы, строение активного центра [1—6]. Получены абсорбционные характеристики при двух значениях pH [7].

В настоящей работе приведены данные спектрально-люминесцентных исследований тромбина. Использовали коммерческий препарат тромбина крупного рогатого скота, выпускаемый Каунасским предприятием бакпрепаратов. Очистку производили методом колоночной гель-хроматографии на сефадексах $G-100$ и $G-75$. Была получена димерная фракция тромбина с молекулярным весом 80000 .

Электронные спектры поглощения регистрировались на спектрофотометре Spesord UV VIS (ГДР), дифференциальные спектры флуоресценции — на установке Fica (Франция), возбуждение осуществляли излучением с λ 270, 280 и 296 нм.

Спектры поглощения. На рис. 1 (кривая 1) изображен спектр поглощения тромбина в трис- HCl буфере при pH 7,5 (без поправки на свето-

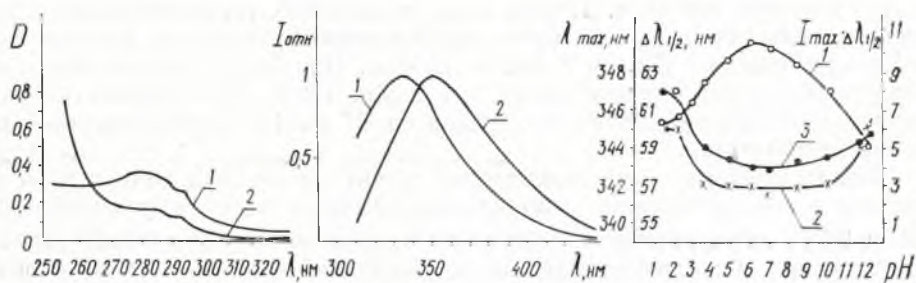


Рис. 1. Спектры поглощения тромбина:

1 — тромбин в трис-НСI буфере (рН 7,5); 2 — тромбин, денатурированный 8 М мочевиной

Рис. 2. Спектры флуоресценции тромбина при $\lambda_{\text{возб}} = 280$ нм:

1 — тромбин в трис-НСI буфере, рН 7,5; 2 — тромбин в трис-НСI буфере (рН 7,5), денатурированный 8 М мочевиной

Рис. 3. Зависимость параметров полосы флуоресценции тромбина в трис-НСI буфере от рН ($\lambda_{\text{возб}} = 280$ нм):

1 — $J_{\text{нас}} \cdot \Delta\lambda_{1/2}$; 2 — λ_{max} ; 3 — $\Delta\lambda_{1/2}$

рассеяние). Наличие максимумов при 280 и 290 нм свидетельствует о преимущественном вкладе в спектр поглощения тромбина триптофановых остатков [8]. Аналогичен характер спектра и для препаратов тромбина, диализованных против воды и уксусно-аммонийного буфера. Незначительное коротковолновое смещение максимумов в их спектрах, вероятно, обусловлено большей доступностью молекул воды к триптофановым остаткам при переходе от трис-НСI буфера к воде как растворителю. В спектре тромбина, денатурированного 8 М мочевиной с добавлением сульфата натрия (кривая 2, рис. 1), наблюдается возрастание оптической плотности в области ниже 270 нм и уменьшение рассеяния света ($D \sim 0$) в области выше 300 нм. Уменьшение рассеяния, по-видимому, можно связать с разрушением ассоциатов молекул тромбина при денатурации.

Изучено влияние рН среды на спектры поглощения (рН варьировали от 1,3 до 12,3). Спектры поглощения тромбина для кислой и щелочной сред заметно отличаются от спектра при рН 7,5. Для спектров кислой среды характерен сдвиг в коротковолновую область, подобный наблюдаемому для протонированного тромбина [9]. Для спектров щелочной среды — длинноволновый сдвиг. Последний, по-видимому, обусловлен значительным вкладом в поглощение в области 290 нм ионизованной формы тирозилов тромбина.

Таким образом, спектр поглощения тромбина в нейтральной и кислой средах в основном определяется триптофанилами белка. В сильнощелочной среде заметный вклад в поглощение вносят тирозилы. Спектр поглощения тромбина отражает чувствительность триптофанилов к изменению среды.

Спектры флуоресценции. Спектр флуоресценции (рис. 2, кривая 1) тромбина в трис-НСI буфере (рН 7,5) имеет обычную для белков форму. Зависимость положения максимума полосы флуоресценции от $\lambda_{\text{возб}}$ незначительна. Она обнаруживается лишь при анализе величины $\beta = I_{320}/I_{370}$ [10] и может быть обусловлена как гетерогенностью триптофанилов в тромбине, так и вкладом люминесценции тирозиновых остатков. Обработка данных по методу [10] показала, что при рН 7,5 люминесценция тромбина обусловлена только триптофанилами, что следует и из спектров поглощения.

Положение максимума ($\lambda_{\text{max}} = 333$ нм) и большая полуширина ($\Delta\lambda_{1/2} = 62$ нм) полосы флуоресценции не согласуются с моделью трех состояний триптофанилов в белках, предложенной в работе [11]. Вероятно, для тромбина следует допустить существование большего числа состояний триптофанилов в белке, т. е. большей гетерогенности остатков

Действие 8 М мочевины и сульфита натрия на диализованный тромбин

Препарат	λ_{max} нм	$\Delta\lambda_{1/2}$ нм	Условия опыта
1. Тромбин в воде, pH 7,5	337	51	непосредственно после диализа
2. Тромбин + 8 М мочевина	345	60	через 10 мин после добавления мочевины
3. Тромбин + 8 М мочевина	354	79	через неделю хранения в холодильнике ($t = 4^\circ C$)
4. Тромбин + 8 М мочевина + сульфит натрия	359	83	через 0,5 ч после добавления сульфита в препарат 3
5. Тромбин	342	61	препарат 1 хранился неделю в холодильнике ($t = 4^\circ C$)
6. Тромбин + 8 М мочевина	350	67	через 0,5 ч после добавления мочевины в препарат 5
7. Тромбин + 8 М мочевина	350	67	через 1,5 ч после добавления мочевины в препарат 5
8. Тромбин + сульфит натрия	345	63	через 1 ч после добавления сульфита натрия в препарат 5

триптофана. Не исключено, что наблюдаемые особенности спектров флуоресценции могут быть следствием нестабильности молекулы тромбина (наличие в растворе продуктов автолиза).

Изучено действие денатурантов (мочевина, сульфит натрия) на диализованный против воды тромбин (см. таблицу). Установлено, что мочевина вызывает заметное смещение полосы флуоресценции в длинноволновую область и ее уширение. То же наблюдается и при ее воздействии на тромбин в трис-HCl буфере (см. рис. 2, кривая 2). Замечено, что выдерживание тромбина с мочевиной в течение 0,5—1,5 ч дает установившиеся параметры полосы, характерные для спектров денатурированных белков, а время 10 мин является недостаточным.

Полоса флуоресценции растворов тромбина, длительно хранившихся при $4^\circ C$, испытывает дальнейшее смещение и уширение, изменяется ее форма. Дополнительное действие сульфита натрия усиливает отмеченные закономерности.

Изучено влияние pH среды на спектр флуоресценции тромбина в трис-HCl буфере. Зависимость параметров спектра от pH представлена на рис. 3. Получено, что наименьшее значение λ_{max} и $\Delta\lambda_{1/2}$, наибольшее $I_{\text{max}}\Delta\lambda_{1/2}$ характерны для области pH 5—9 (область физиологического значения pH). С переходом как в щелочную, так и в кислую области наблюдается смещение максимума полосы в длинноволновую сторону, ее уширение и уменьшение $I_{\text{max}}\Delta\lambda_{1/2}$. Изменение этих параметров может происходить из-за конформационных перестроек, а также в результате тушения или изменения подвижности воды и поверхностных полярных групп при изменении ионного состояния соседних групп.

Для выяснения причин изменения спектральных параметров проведен анализ разностных спектров при различных pH . Если разностный спектр флуоресценции обусловлен простым тушением или возгоранием, он должен иметь форму, соответствующую спектру остатков, претерпевших изменение выхода. Если же один или более остатков триптофана переходит из одного микроокружения в другое в результате конформационных изменений, разностный спектр должен иметь точку пересечения с осью абсцисс и, соответственно, положительную и отрицательную компоненты [12]. На основании анализа можно констатировать конформационный переход тромбина в областях pH 10—12 и 3,7—2,5. В области остальных pH имеет место тушение. К сожалению, в литературе отсутствуют данные по пространственному расположению аминокислотных остатков в молекуле тромбина, а данные по первичной структуре [1] по-

казывают, что большинство остатков триптофана в молекуле тромбина (пять из девяти) имеют ближайшими соседями катионные остатки аминокислот (лизин, аргинин).

Для определения промежуточных состояний с небольшими изменениями спектральных параметров использованы зависимости интенсивностей флуоресценции при различных длинах волн для разных pH [13]. Это позволило в области pH 5—9 определить значение pH 6,1, соответствующее состоянию тромбина, с которого начинаются плавные изменения состояния молекул при изменении pH как в щелочную, так и в кислую область (возможно, это самое устойчивое состояние тромбина).

Таким образом, спектры флуоресценции тромбина являются весьма чувствительными к изменениям конформации молекул.

ЛИТЕРАТУРА

1. Magnusson S.—*Folia haematol* (DDR), 1972, B. 98, N 4. S. 285.
2. Seegers W. H., Beuterby J., Murano G., Meloy H., Agrawal B.—*Trambos Daihes haemrrn*, 1971, Suppl 47, p. 325.
3. Lunblad R. L., Uhlig L. C., Vogel C. W., Kindon H. S., Mann K. G.—*Biochem and Biophys. Res Commun*, 1975, v. 66, N 2, p. 482.
4. Федоряк Д. М., Кибирев В. К., Серейская А. А., Серебряный С. Б.—В сб.: Молекулярная биология. Киев, 1977, вып. 17, с. 64.
5. Струкова С. М.—Вестн. МГУ. Сер. биол. и почвоведение, 1976, № 1, с. 17.
6. Струкова С. М., Умарова Б. А., Киреева Е. Г., Кудряшов Б. А.—*Биохимия*, 1978, т. 43, вып. 4, с. 708.
7. Kotoku J., Matsushima A., Bando J., Inada J.—*Biochim, Biophys Acta*, 1970, v. 214, N 3, p. 490.
8. Черницкий Е. А. Люминесценция и структурная лабильность белков в растворе и клетке.—Минск, 1972, с. 111.
9. Черницкий Е. А., там же, с. 75.
10. Туроверов К. К., Щелчков Б. В.—*Биофизика*, 1970, т. 15, вып. 6, с. 965.
11. Веденкина Н. С., Бурштейн Э. А.—*Молекулярная биология*, 1970, т. 4, вып. 5, с. 743.
12. Веденкина Н. А., Буколова Т. Г., Ивкова М. Н., Бурштейн Э. А.—*Молекулярная биология*, 1971, т. 5, вып. 6, с. 809.
13. Бурштейн Э. А.—В сб.: Биофизика. Итоги науки и техники, ВИНТИ АН СССР. М., 1977, т. 7, с. 132.

Кафедра биофизики

УДК 532.783 : 535.33

И. П. ЗЯТКОВ, Г. А. ПИЦЕВИЧ, Д. И. САГАЙДАК

О КОРРЕЛЯЦИИ СПЕКТРАЛЬНЫХ И ТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ ХАРАКТЕРИСТИК ПЕРОКСИДОВ АЦИЛОВ

Для ряда пероксидов ацилов наблюдалась связь между константами скорости термораспада k_d , а также константами скорости инициирования реакции полимеризации $k_{ин}$, с одной стороны, и константами Гаммета и Тафта — с другой [1, 2]. Поиск и установление корреляций между спектральными и химико-технологическими характеристиками пероксидов позволили бы разработать экспрессные методы определения их технологически важных параметров в реакциях инициирования полимеризации и прогнозировать последние для новых представителей гомологических рядов.

Нами исследованы колебательные спектры (КР и ИК) ряда симметричных и несимметричных ароматических и алифатических пероксидов, отдельные представители которых являются как широко известными, так и специфическими инициаторами полимеризации [3].

Для пероксидов рядов I—IV $RC_6H_4C(O)OOC(O)C_6H_4R$ (I), $RC_6H_4C(O)OOC(O)C_6H_5$ (II), $RC_6H_4C(O)OOC(O)CH_3$ (III), $[CH_3(CH_2)_nC(O)O]_2$ (IV) термоустойчивость $k_d = A \exp(-E_{дис}/k \cdot T)$, а следова-