DISS. B 1233

József Attila Tudományegyetem Biofizikai Tanszék

AZ ELEKTRON GERJESZTÉSI ENERGIA ÁTADÁSÁNAK HATÉKONYSÁGA FEHÉRJE-DETERGENS RENDSZEREKBEN

Doktori disszertáció

Vozáry Eszter

Szeged

1975

Bevezetés

A fotoszintézis fotokémiai folyamatait gyakran vizsgálják olyan rendszerekben,amelyek fotoszintetizáló szervezetekből kivont kicsiny (500000-20000 molekulasúlyú) részecskéket tartalmaznak. Ezeket a rendszereket a kloroplasztiszok,algák vagy fotoszintetizáló baktériumok szétördelésével lehet létrehozni. Ha ezeket az anyagokat,ill. szervezeteket pl.detergensekkel,ultrahanggal vagy úgynevezett "French press" módszerrel kezelik,akkor részecskékre esnek szét. A részecskék mérete erősen függ pl. az alkalmazott detergens anyagi minőségétől és koncentrációjától,vagy az ultrahang intenzitásától és rezgésszámától.

Triton X-100 detergens kezeléssel állitottak elő pl. Anabena variabilisből P700 klorofill reakciócentrumban dúsitott frakciót [1],amelynek fotokémiai aktivitását,fizikai tulajdonságait és szerkezetét vizsgálták. Szintén triton X-100 segitségével készitettek növényi kloroplasztiszokból fotoszisztéma 1-hez, ill. fotoszisztéma 2-höz tartozó részecskéket [2],amelyek struktúráját fotokémiai aktivitások mérésével,elektronmikroszkópos felvételekkel vizsgálták. Nátrium-dodecilszulfát segitségével olyan preparátumokat készitettek fotoszintetizáló baktériumokból, algákból és magasabb rendü növényekből,amelyek klorofill-fehérje komplexeket,ill. reakciócentrumokat tartalmaztak [3].

Fotoszintetizáló baktériumokból lauril-dimetilamin-oxid (LDAO) detergenssel reakciócentrumot tartalmazó részecskéket vontak ki,és ezek fizikai és kémiai tulajdonságait vizsgálták [4]. A részecskék klorofillt és fehérjét tartalmaztak. A részecskék tisztasági fokát - amely arra jellemző,hogy mennyire sikerült eltávolitani a "felesleges" fehérjéket - az OD(280)/OD(800) hányadossal jellemezték,ahol OD(280) a 280 nm-nél mért optikai denzitás, amely a fehérje koncentrációra jellemző, az OD(800) pedig a 800 nm-nél mért optikai denzitás,amely a reakciócentrum koncentrációjára utal. Ez a hányados a tisztitás során csökkent. A kapott reakciócentrum részecskék csak LDAO-t tartalmazó pufferben oldódtak,tiszta pufferben vagy vizben kicsapódtak.

A [4]-ben leirt tisztasági fok mérés csak akkor alkalmazható,ha 280 nm-nél valóban csak a fehérjék nyelnek el,de az alkalmazott detergens nem. Ez a megállapitás azért lényeges,mert a detergensek általában olyan kromoforokat tartalmaznak,amelyek az ultraibolya tartományban nyelnek el. Például a triton X-100-nak éppen 275 nm-nél és 285,5 nm-nél van egy-egy abszorpciós sávja [5],ezért a közbülső 280 nm-nél is még jelentékeny fényelnyelése van.

Ugyancsak zavaró lehet a detergensek abszorpciója,ha a plasztokinonok redukált vagy oxidált állapotát igyekeznek eldönteni abszorpció méréssel,mert a plasztokinonok szintén az ultraibolya tartományban nyelnek el [6].

Az a [4]-ben közölt tapasztalat,hogy a reakciócentrum-részecskék csak LDAO-t tartalmazó oldószerben " oldódnak ",arra mutat,hogy a detergens molekulák kapcsolatba,kölcsönhatásba lépnek a részecskékkel. Ez a kölcsönhatás megváltoztathatja a részecskék tulajdonságait. Ha a részecskék detergenst tartalmazó oldataiból,pontosabban szuszpenzióiból kapott eredményekből következtetni kívánunk a részecskék tulajdonságaira,ismerni kell a detergens és a részecske fehérjéi közötti,valamint a detergens és a pigmentek közötti kölcsönhatásokat.

A klorofillok és a detergensek kölcsönhatásait már sok modell rendszerben és régóta vizsgálják [7-11].Ezeket a rendszereket egyrészt azért valósitották meg,mert pl. a klorofill nem oldódik vizben,viszont a detergensek hatása révén mégis vizes oldatba vihető be. Másrészt a detergensek bizonyos koncentráció tartományban kb. 100 molekulából álló aggregátumokat,micellákat képeznek,amelyekbe a klorofill fitol lánca révén be tud épülni,és igy a klorofill molekulák olyan rendezett környezetbe kerülnek,amely hasonló a természetes környezetükhöz pl. a kloroplasztisz lamellákhoz.

Ezekben a modell rendszerekben a klorofill optikai tulajdonságai (fényelnyelése és fluoreszcenciája) hasonlóak a szerves oldószerekben tapasztalt tulajdonságaihoz. A fény abszorpciós koefficiens az egész ultraibolya és

látható szinképtartományban valamivel kisebb a kicsiny koncentrációjú ($1 \cdot 10^{-4}$ M-snál higabb) detergens oldatban, mint pl. az acetonos oldatban [7, 11]. A detergens koncentráció növelésével az abszorpciós koefficiens fokozatosan növekszik és az un. kritikus micella koncentráció (c.m.c.) felett,azaz abban a koncentráció tartományban, amelyben a micellák kezdenek kialakulni,telitési értéket ér el [11]. A klorofill fluoreszcencia intenzitása jelentősen megnő a c.m.c. felett [7, 11]. A fotokémiai aktivitás mértékét tekintve a klorofill-detergens rendszerek jobban hasonlitanak a klorofill-szerves oldószer rendszerekhez,mint a kloroplasztisz szuszpenziókhoz [11]. Ha pl. fehérje-klorofill rendszerekhez triton X-100-t adnak,akkor a klorofill fotokémiai aktivitása jelentősen megnövekszik,függetlenül a fehérje minőségétől [10].

Ezek a vizsgálatok mind azt mutatják,hogy olyan molekuláris kapcsolat van a detergensek és a klorofill között,amely a fényelnyelésre,a fluoreszcenciára és a fotokémiai aktivitásra hatással van.

Ennek a dolgozatnak az a célja,hogy megvizsgálja hogyan változnak meg a fehérjék optikai tulajdonságai (fényelnyelése és fluoreszcenciája) detergensek hatására.

1.§. Fehérje-detergens rendszereken végzett vizsgálatok kritikai összefoglalása.

A fehérjék és detergensek között fellépő kölcsönhatások összetettek lehetnek,ezért sokféle módszerrel igyekeznek fényt deriteni rájuk.

A fehérjéket felépitő aminosavak közül sok abszorbeál a 280 nm körüli ultraibolya tartományban. Ha az aminosavak közül néhánynak a környezete megváltozik a detergens hatására,akkor ez abszorpció változást is eredményezhet. Ha ismerjük a fehérje felépitését,akkor az abszorpció változásokból esetleg következtetni lehet arra,hogy milyen csoportokkal van kölcsönhatásban a detergens. Ezért is használják széles körben az abszorpció mérést [12-14] ilyen irányú vizsgálatokban. Ugyancsak gyakran alkalmazzák a differencia spektroszkópiát is ezekben a vizsgálatokban [15,16].

A fehérjékben lévő fluoreszkáló aminosavak,főleg a tirozin,a triptofán és a fenilalanin fluoreszcenciája igen érzékenyen követi a környezet változását,ez kiválóan alkalmassá teszi a fluoreszcencia mérést a detergenssel történő kölcsönhatás vizsgálatára abban az esetben,ha a detergens nem fluoreszkál a fehérje fluoreszcencia hullámhossz tartományában [13,14].

Mig az abszorpció és a fluoreszcencia a molekulák környezetváltozására érzékeny,addig az ORD és CD mérések a fehérje,illetve a fehérje-detergens rendszerek szerkezetére,

illetve a szerkezetben bekövetkező változásokra adnak felvilágositást. Általában detergens hatására a fehérje szerkezete megváltozik,de a változás eredménye nem feltétlenül egy letekeredett hélix,hanem egy jól meghatározott tömör, de a nativ állapottól különböző új szerkezet is lehet [15]. A CD és ORD vizsgálatok nagyon elterjedtek az ilyen irányú szerkezet kutatásban [15,17-21].

Az enzimek aktivitása is nagymértékben függ az alkalmazott detergens koncentrációjától és anyagi minőségétől. Például a nem ionos detergensek egy csoportja a vérkataláz reakcióját gyorsitja a c.m.c. alatti koncentrációban, mig felette lassitja, ill. gátolja [22]. Vannak detergensek, amelyek egyes enzimek aktivitását serkentik,mig másokét gátolják [22].

Lehet még vizsgálni a fehérjék viszkozitását [23-25], vezetőképességét [21],elektroforetikus mozgékonyságát [25], ezek is változhatnak detergens hatására. Ezen jellemzők megváltozása a hidrátburok változásával és fehérje-detergens komplexek képződésével függhet össze.

Az ultracentrifugálást is fel lehet használni a fehérje-detergens rendszerek aggregátumainak molekulasúly meghatározására [26].

A detergensek hatása abban is megnyilvánulhat,hogy a fehérje aktiv csoportjai hozzáférhetőbbekké válnak a detergens jelenlétében a nativ állapothoz képest,azaz az aktiv csoportokra jellemző reakciók a detergens jelenlétében

létrejönnek. Ilyenkor az aktiv csoportok a fehérje felületén vannak,máskülönben pedig a fehérje belsejében [15].

1.1. Az ionos detergensek hatásai.

Az ionos detergensek és fehérjék kölcsönhatását széles körben igen változatos módszerekkel vizsgálták.

A dioktil-szulfoxinát, a nátrium-dihexilszulfoxinát, a nátrium-kaproát anionos detergensek és a γ-globulinok, a szójabab tripszin-inhibitor, a pepszin és a kazein fehérjék kölcsönhatását ORD módszerrel vizsgálták [18]. A detergensek hatására megnőtt a fehérjék diszperziós konstansa,ez a hatás függött a detergensek hidrofob lánchosszától. Ebből arra következtettek,hogy a detergens hidrofob részével részben behatol a fehérje hidrofob belsejébe és azt mintegy "kiteriti".

Nátrium-dodecil,-decil,-aktilszulfát hatását vizsgálták szérum-γ-globulin,pepszin,tripszin,tripszinogén, α-krimotripszin,krimotripszinogén és szójabab tripszin inhibitor fehérjéken szintén ORD módszerrel [19]. Megállapitották,hogy a nem helikális proteinek bizonyos feltételek mellett a nativtól különböző rendezett struktúrát vesznek fel a fenti detergensek hatására.

R.W.COWGILL [13] az inzulin és a ribonukleáz fluoreszcenciáját vizsgálta különböző denaturáló anyagok hozzáadása esetén. Cetildimetil-ammoniumbromidot és nátrium-

-dodecilszulfátot használt kationos és anionos detergensként a c.m.c. alatti koncentrációban. A ribonukleáz fluoreszcencia intenzitása a nátrium-dodecilszulfát hatására jelentősen megnőtt,ami a kvantumhatásfok növekedésének tudható be,ami viszont azt jelenti,hogy a fluoreszkáló aminosavak erősebben hidrofil környezetbe kerültek, azaz a fehérje szerkezete megváltozott,a fehérje denaturálódott. A fluoreszcencia intenzitás változása függött a pH-tól és független volt az ionerősségtől. Ez azt jelzi,hogy a kölcsönhatás nem elektrosztatikus. Az anionos detergens hatástalan volt. Ugyancsak nem változott az inzulin fluoreszcenciája a két detergens hatására pH=3,5--nél, mig pH=8-nál az anionos detergens megnövelte az inzulin fluoreszcenciáját.

A ribonukleáz és dodecilszulfát differencia spektrumát vizsgálva megállapitható [15], hogy a három tirozin közül egy kerül oldószer környezetbe a globuláris tartományból. Ugyancsak megmutatták,hogy a dodecilszulfát nem eredményezi minden esetben a tirozinok oldószerbe kerülését,dodecilszulfát hatására a ribonukleáz négy hisztidin maradékából egynek a szokatlan reaktivitása megszünik és a négy metionin továbbra is hozzáférhetetlen marad a jódacetát számára, épp úgy,mint a nativ fehérjében.

Szérum albumin és anionos detergensek kölcsönhatását is többen vizsgálták [15]. A nativ szérum albumin molekulán kevés olyan hely van,ahová detergens kötődhet. Ha az

albumin denaturálódik,akkor ezek a helyek eltünnek és a megváltozott konformáció olyan,hogy sokkal több detergens iont képes az albumin megkötni [27]. Ha a detergens koncentráció kicsiny,akkor az albumin annyi detergens iont köt meg,ahány kötődésre alkalmas helye van. Ezt a számot [27]-ben 38 detergens molekula/ 1 fehérje molekula-nak találták. [23] eredményei szerint akár 1000 detergens is asszociálódhat egyetlen fehérje molekulával,amikor a detergens nagy koncentrációban van jelen. Természetesen a kötődés mértéke függ a fehérje koncentrációtól is.

Szérum albumin és dodecilszulfát kölcsönhatását differencia spektroszkópiával is tanulmányozták [16]. Az eredmények azt mutatták,hogy a fehérje aromás oldalláncai megváltozott környezetbe kerültek. Ez a reakció két lépésben zajlott le: először a triptofánokra jellemző sáv változott meg kismértékben (ez a változás sokkal kisebb volt,ahhoz a változáshoz képest,amelyet egyetlen triptofán molekula okoz,amikor hidrofil környezetbe kerül), másodszor pedig a tirozinra jellemző sáv változott meg, de olyan mértékben,hogy feltételezni lehetett,több tirozin molekula került az oldószerbe a fehérje globuláris tartományából. Ezt az abszorpció változást csak kismértékü ORD változás követi [23], azaz a nátrium-dodecilszulfát hatására a struktúra jellemzők lényegesen nem változnak meg.

Megmutatták,hogy a lizozim aromás Cotton-effektusa,

amely a triptofánok asszimetrikus környezetét jelenti a nativ fehérjében,dodecilszulfát hatására eltünik [28]. [29] szerint a lizozim a hosszabb szénláncú detergenseket jobban meg tudja kötni,és a lizozimon sok olyan hely van,ahol kötődés jöhet létre.

1.2. Nem ionos detergensek hatásai.

A triton X-100 és más nem ionos detergensek hatását vizsgálták emberi és marha szérum albumin, β-laktoglobulin és ribonukleáz oldatokban papir elektroforézist használva [25]. Megállapitották,hogy nagy detergens koncentrációknál a fehérjék elektroforetikus mozgékonysága csökkent,amit a fehérjék hidratációjának növekedése okozhat.

Triton X-100, tween 20, 40, 60 és 80 és lubrol detergensek hatása sokféle enzimre - lipáz,vérkataláz, β--glikozidák,foszfatázok - sokféle. Detergens és enzim koncentrációtól függően gátolhatja, ill. serkentheti a detergens az enzim aktivitását [22].

F.A.GREEN [12] a triton X-100 detergens és az emberi és marha szérum albumin, a β - laktoglobulin, a ló mioglobin, a tripszin, az emberi immunoglobulin G, a kazein és a neomicin kölcsönhatását vizsgálta. Megállapitotta,hogy ezen fehérjékből az első három jól, az utolsó nem, a többi pedig kismértékben kötődik a triton X-100--hoz. A triton X-100 abszorpcióját mérve 285,5 nm-nél és

ábrázolva a triton koncentráció függvényében, a görbe első szakasza egy egyenes,amely a c.m.c-nél megtörik és egy másik meredekségü egyenessel folytatódik. A c.m.c. alatti szakasz meredeksége jellemző arra,hogy mennyi detergens kötődik a fehérjékhez,feltételezve azt,hogy a fehérjéhez kötött detergens nem képes micellát alkotni. A fehérje koncentráció csökkenésével jelentősen megnőtt a detergens kötődés mértéke egy fehérje molekulára vonatkoztatva.Ezek az adatok arra utalnak,hogy jelentős a hidrofob kölcsönhatás a triton X-100 és a vizsgált fehérjék között. Ezt még nyilvánvalóbbá teszik a [30]-ban kapott eredmények, amelyek még két másik, a triton X-100-hoz hasonló detergensre, a triton X-102-re és a triton N-101-re vonatkoznak. A triton X-102-nek ugyanolyan alkil csoportja van, mint a triton X-100-nak,csak 2-3 etilénoxid egységgel van több rajta. A triton N-101-nek eggyel több alkil csoportja van és ugyanannyi etilénoxid egysége,mint a triton X-100-nak. A triton N-101 majdnem olyan jól kötődött az albuminhoz,mint a másik kettő,a triton X-100 és X-102 között pedig alig volt különbség.

A tween 20 detergens és a tojásfehérje lizozim kölcsönhatását vizsgálták aktivitás méréssel [14]. A lizozim a Micrococcus lysodeikticus falában lévő β -1,4 glikozid kötést hidrolizálja. Ha a detergens is jelen volt,a c.m.c. feletti koncentráció tartományban,az aktivitás jelentős mértékben megnőtt,amit azzal magyaráztak,hogy a li-

zozim molekulák a micellákkal olyan kölcsönhatásban vannak,hogy aktiv oldalukkal kifelé a micellára adszorbeálódnak és igy időegység alatt több szubsztrát molekula érintkezik az aktiv felületükkel. A szubsztrát-enzim reakciót a szubsztrát szempontjából másodrendünek találták. A kinetikai, ultrafiltrációs, UV abszorpciós és fluoreszcenciás vizsgálatok alátámasztják az enzim-micella komplex létezését. 280nm-nél mérték az abszorpciót és megállapitották,hogy kezdetben additiv volt a detergens és a fehérje abszorpciója,de szobahőmérsékleten való állás után 7 nap múlva a lizozim+tween oldat abszorpciója gyorsabban nő,mint a tiszta lizozimé. A tiszta lizozim oldat kezdeti aktivitásának 40 %-át tartja meg,mig a keverék oldat a 60 %-át. A szerzők megjegyzik,hogy a "helyesen" kötött enzim,azaz az olyan enzim,amely természetes környezetéhez hasonló környezetben van,nagyobb aktivitással rendelkezik,mint az oldatban lévő enzim.

2.§ . A detergensek és a fehérjék kölcsönhatásának mechanizmusára irányuló magyarázatok

Bár igen sok kisérletet végeztek különböző fehérje detergens rendszereken,egységes képet ma még nem lehet alkotni a fehérje-detergens kölcsönhatásáról. A detergensek általában denaturálják a fehérjéket. A denaturálódás mértéke erősen függ a fehérjék és a detergensek anyagi minőségétől és koncentrációjától. Például 1 mg/l koncentrációjú albumin oldat un. intrinszik viszkozitása megnő,azaz az albumin denaturálódik,ha dodecilszulfátot tesznek az oldatba [23], de nem változik,vagy csak kissé növekszik,ha töményebb a fehérje koncentráció [24].

Általában a fehérjék nem veszitik el globuláris alakjukat a detergensek hatására,hanem tömör szerkezetet vesznek fel. Ez a struktúra jelentősen különbözhet a nativ fehérje struktúrától [15].

[22] szerint a detergensek a makromolekulákkal,igy a fehérjékkel is másképpen lépnek kölcsönhatásba,mint a kis molekulákkal,amelyek kis detergens koncentrációknál komplexet képeznek,mig a nagy detergens koncentrációknál a kis molekulák beépülnek a micellákba. Kis detergens koncentrációknál szintén komplexet alkothatnak a detergenssel,de a c.m.c. feletti koncentrációknál az egész fehérje molekula, - amely maga is lehet akkora,vagy nagyobb,mint egy micella -, mint egész lép kölcsönhatásba a micellákkal.

Az ionos detergensek esetén számolni kell az elektrosztatikus és a hidrofob erőkkel is,mig a nem ionos detergensek esetében többnyire csak hidrofob kölcsönhatás lép fel.

Az ionos detergensek hatásait [20]-ban a következő módon próbálják magyarázni. A detergens molekulák pl. negativ töltésü ionjai és hidrofob részei is részt vesznek a detergens és a fehérje közötti komplexképződésben. A detergens negativ ionjai a fehérjék "pozitiv" oldalával kapcsolódnak,mig a hidrofob láncok az aminosavak hidrofob R--csoportjaihoz hidrofob kötésekkel kapcsolódnak. A detergens hidrofob láncai egy hidrofob burokkal veszik körül a peptid kötéseket és igy elősegitik a hélix képződést és stabilizálást. A sók elősegitik ezt az átmenetet azáltal, hogy egy olyan teret hoznak létre,amely a pozitiv töltésü fehérje oldalak elektrosztatikus taszitásának tulajdonitható,valamint azáltal,hogy ezek az oldalak nagy affinitással rendelkeznek a negativ töltésü detergens ionok iránt. A komplex képződés és a konformációs átmenet függ a szénhidrogén lánc hosszúságától. Ez alátámasztja azt az elképzelést,hogy a hidrofob kötések döntő szerepet játszanak a protein konformációban,és hogy hidrofob környezet szükséges a hidrogén kötés másodlagos struktúra képzéséhez és stabilizálásához.

3.§. Kisérleti módszerek

3.1. Az abszorpciós spektrum meghatározása

Az abszopciós szinképeket Optica Milano CF4DR tipusú regisztráló spektrofotométerrel vettük fel. A spektrofotométer feloldóképessége $\delta\lambda < 0{,}2$ nm sávszélességnek felel meg, mérési pontossága $\pm$ 0,15 %. A $\lg I_0/I$ dekadikus extinkciós koefficiens olvasható le közvetlenül a különböző hullámhosszaknál. Ebből az abszorpciós együttható az ismert módon számolható ki:

$$k(\lambda) = 2{,}3026 \frac{1}{\ell} \lg \frac{I_0}{I}, \qquad (1)$$

ahol ℓ a vizsgált oldat rétegvastagsága.

3.2. A fluoreszcencia spektrum felvétele

Közvetlen méréssel a külső fluoreszcencia spektrum határozható meg, ebből számitással nyerhető a valódi spektrum. A külső fluoreszcencia spektrumokat a Szegedi Biológiai Központ Perkin-Elmer MPF-3 tipusú spektrofluoriméterén vettük fel. A gerjesztő fényforrás egy XBO 150 W/4 tipusú nagynyomású xenon lámpa, a detektor egy R 106 tipusú fotomultiplier volt. A készülék automatikusan korrigálja a gerjesztő fény intenzitás változását, ezért a különböző időpontokban végzett méréseknél nem kellett ösz-

szehasonlító standardot használni. Lehetőség volt a merőleges és egyéb szög alatti megfigyelésre.

A valódi fluoreszcencia spektrum meghatározásához figyelembe kell venni a reabszorpciót és a szekunder fluoreszcenciát. A spektrofluoriméterrel mért fluoreszcencia intenzitásból, $I_f(\lambda')$-ből, a valódi reabszorpcióra korrigált spektrumot, $f_{q'}(\lambda')$-t, a következő formulával határozhatjuk meg [31]:

$$f_{q'}(\lambda') = C \cdot Q(\lambda') \cdot I_f(\lambda') \cdot \varphi \qquad (2)$$

ahol C konstans, az optikai elrendezéstől és a spektrofluoriméter adataitól függ, a fluoreszcencia λ' hullámhosszától pedig nem. $Q(\lambda')$ a spektrofluoriméter kvantum érzékenysége a hullámhossz függvényében, φ pedig a reabszorpciós korrekció, amelynek értéke merőleges, ill. ϑ_4 szög alatti (lásd.1.ábra) megfigyelés esetén

$$\varphi = \frac{\beta}{1-e^{-\beta}} \quad , \quad \text{ill.} \quad \varphi = \frac{\alpha' + \beta'}{1-e^{-(\alpha'+\beta')}} \quad ,$$

ahol $\beta = k(\lambda) \cdot \ell$, $\alpha' = k(\lambda) \frac{\ell}{\cos \vartheta_2}$ és $\beta' = k(\lambda') \frac{\ell}{\cos \vartheta_3}$,

λ a gerjesztő fény, λ' pedig a fluoreszcencia fény hullámhossza, ℓ az oldat rétegvastagsága. Mivel az $(\alpha'+\beta')$-vel számolt φ értékek eltérése az $(\alpha+\beta)$-val számolt φ értékektől a mérési hibahatáron belül volt, ezért a nem merőleges megfigyelés esetén is $(\alpha+\beta)$-val számoltunk $(\alpha = k(\lambda) \cdot \ell)$.

Ha $k(\lambda)_{max} \cdot \ell < 0,5$ feltétel teljesül,akkor a szekunder fluoreszcencia hatása a mérési hibahatáron belül van,és igy nem kell számitás útján figyelembe venni [32]. A fluoreszcencia spektrumokat két független bemérésből készült oldatok esetén határoztuk meg,és a két mérés középértékét használtuk fel.

3.3. A gerjesztési szinképek meghatározása.

A gerjesztési szinképeket szintén a Szegedi Biológiai Központ Perkin-Elmer MPF-3 tipusú spektrofluoriméterén vettük fel. A kapott fotoáramokat, az $I(\lambda_g)$ értékeket korrigáltuk a xenon lámpa energiaeloszlás görbéjével, $E(\lambda_g)$--vel. Az $E(\lambda_g)$ -t egy Kipp and Zonen termoelemmel határoztuk meg,melyet a küvetta helyére tettük és mértük az egyes gerjesztő hullámhosszaknál a termoelem feszültségét, amely az elnyelt energiával arányos. Figyelembevettük a reabszorpciót is a megfigyelés irányától függően [31, 33]. Ezek alapján a gerjesztési szinképeket az

$$f_{exc}(\lambda_g) = \frac{I(\lambda_g)}{E(\lambda_g)} \cdot \varphi$$

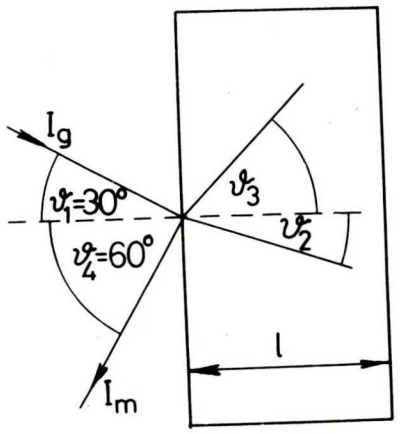
összefüggés alapján határoztuk meg, ahol φ a reabszorpciót figyelembevevő tényező.

3.4. A fluoreszcencia abszolút kvantum hatásfokának meghatározása.

Az abszolút kvantum hatásfokot lényegében a [34]-ben leirt módszer alapján határoztuk meg. A különbség csak annyi volt, hogy a megfigyelés iránya nem volt merőleges a küvettára, ezért a fluoreszcencia fénynek a megfigyelés irányába eső részével kellett számolni. A hatásfokot, η -t, a következő összefüggés alapján számoltuk ki:

$$\eta = \frac{4\tau n^2}{\varrho f_q(\lambda')} \cdot \frac{J_f(\lambda')Q(\lambda')\cos\varphi \dfrac{\cos\vartheta_2}{\cos\vartheta_1}\dfrac{\cos\vartheta_4}{\cos\vartheta_3}}{\ell\left(1-\dfrac{\ell k(\lambda')}{2\cos\vartheta_2}\right)\int_0^\infty J_g(\lambda)Q(\lambda)k(\lambda)d\lambda - \dfrac{\ell^2}{2\cos\vartheta_1}\int_0^\infty J_g(\lambda)Q(\lambda)k^2(\lambda)d\lambda}, \quad (3)$$

ahol $\tau = 0{,}85$, a MgO reflexiós koefficiense a gerjesztő hullámhossznál [35], $n = 1{,}36$ az oldat - azaz a víz törésmutatója a gerjesztő hullámhossznál, $\varrho = 0{,}9$ a reflexiós veszteségeket veszi figyelembe, a Fresnel-féle formulákkal számolható [36], $\varphi = 45^0$, a MgO lapnál a gerjesztő fény beesési és visszaverődési szöge, $f_q(\lambda')$ a vizsgált oldat normált fluoreszcencia spektruma $\left(\int_0^\infty f_q(\lambda')\,d\lambda' = 1\right)$, $I_g(\lambda)$ a gerjesztő fény intenzitása. A $\vartheta_1, \vartheta_2, \vartheta_3$ és ϑ_4 szögek jelentése az 1.ábra alapján nyilvánvaló.



1.ábra

A (3) összefüggés csak akkor érvényes,ha

$$\left(\frac{k(\lambda)}{\cos\vartheta_1}+\frac{k(\lambda')}{\cos\vartheta_2}\right)\cdot l<0{,}1\,,$$

mert csak ekkor alkalmazható az összefüggés levezetése során felhasznált sorfejtés.

3.5. Egyéb fluoreszcencia jellemzők meghatározása.

A fluoreszcencia természetes csillapodási idejét, τ_o -t, a

$$\frac{1}{\tau_o} = 2{,}88\ 10^{-9}\ n^2\ \frac{\int f_q(\bar{\nu})\, d\bar{\nu}}{\int f_q(\bar{\nu})\, \bar{\nu}^{-3} d\bar{\nu}} \cdot \int \frac{\varepsilon(\bar{\nu})}{\bar{\nu}}\, d\bar{\nu} \qquad (4)$$

összefüggés alapján számoltuk ki [37], ahol n az oldat törésmutatója, $f_q(\bar{\nu})$ a normált fluoreszcencia spektrum a hullámszám függvényében és $\varepsilon(\bar{\nu})$ az anyag moláris dekadikus extinkciós koefficiense a $\bar{\nu}$ hullámszámnál.

3.6. Az elektron gerjesztési energia vándorlása.

Ha induktiv rezonancián alapuló energiaátadást feltételezünk a gerjesztett donor és a gerjesztetlen akceptor molekula között, akkor az energiaátadás gyakorisága:

$$n_{D^* \rightarrow A} = \frac{1}{\tau_{OD}} \left(\frac{R_o}{R} \right)^6$$

Förster-féle formulával irható le [31], ahol τ_{OD} a donor molekula fluoreszcenciájának természetes csillapodási ideje az akceptor molekula távollétében, R az akceptor és donor molekula távolsága, R_o pedig az a "kritikus" távolság, amelynél az energiaátadás gyakorisága egyenlő a

primer gerjesztett molekula kisugárzásának gyakoriságával. R_o -t a következő formulával határozhatjuk meg:

$$R_o^6 = \frac{9\kappa^2 \ln 10\, c^4 \eta_D}{128\pi^5 n^4 N'} \cdot \int_0^\infty \varepsilon_A(\bar{\nu}) f_{qD}(\bar{\nu}) \frac{d\bar{\nu}}{\bar{\nu}^4} \cdot \qquad (5)$$

(5)-ben κ^2 orientációs faktor, amelynek értéke $\frac{2}{3}$, c a fénysebesség, η_D a donor molekula fluoreszcenciájának kvantum hatásfoka, n a törésmutató, $N' = 6 \cdot 10^{20}$ az 1 millimólban lévő molekulák száma, $\varepsilon_A(\bar{\nu})$ az akceptor molekula moláris dekadikus extinkciós koefficiense, $f_{qD}(\bar{\nu})$ a donor molekula normált fluoreszcencia spektruma a hullámszám függvényében.

A donor és akceptor molekula közötti energiaátadás hatékonyságát, f -t, az

$$f = \frac{\left(\frac{R_o}{R}\right)^6}{\left(\frac{R_o}{R}\right)^6 + 1}$$

kifejezés adja meg [31]. Ha az energiaátadás nem induktiv rezonancián alapszik, akkor általánosan igaz, hogy az átadás hatékonysága:

$$f = \frac{\left(\frac{R_o}{R}\right)^j}{\left(\frac{R_o}{R}\right)^j + 1}$$

ahol j a távolság függés kitevője [38]. Tehát,ha f -t valamilyen módszerrel meg tudjuk határozni,akkor a lgR függvényében a $\lg\left(f^{-1} - 1\right)$ értékeket ábrázolva egyenest kapunk,amelynek meredeksége j .

A gerjesztési energia átadásának hatékonyságát kísérletileg meghatározható adatokból a következő összefüggés adja meg [39]:

$$f = \frac{I_{kev}(\lambda) - I_D(\lambda) - I_A(\lambda)}{I_A(\lambda)\frac{k_D(\lambda_g)}{k_A(\lambda_g)} - I_D(\lambda)} \qquad (6)$$

ahol $I_{kev}(\lambda)$ a keverékoldat, $I_D(\lambda)$ a csak donor molekulát tartalmazó oldat, $I_A(\lambda)$ a csak akceptor molekulát tartalmazó oldat reabszorpcióra korrigált fluoreszcencia intenzitása. $k_D(\lambda_g)$, ill. $k_A(\lambda_g)$ pedig a csak donor,ill. a csak akceptor molekulát tartalmazó oldat abszorpciós koefficiense a gerjesztő hullámhossznál.

3.7. Az enzimaktivitás mérése.

A lizozim aktivitását a [40]-ben leirt módszer alapján határoztuk meg. A szubsztrát-enzim kölcsönhatás következtében létrejövő transzmisszióváltozást Optica Milano CF4DR tipusú regisztráló spektrofotométerrel mértük. A szubsztrát Micrococcus lysodeikticus volt,amelyet megfelelő pH-jú és detergens koncentrációjú foszfát pufferben oldottunk fel. Ebből az oldatból meghatározott térfogatot pipettáztunk a küvettába és ehhez szintén meghatározott térfogatú fehérje-detergens keverék oldatot adtunk,amelyben a detergens koncentrációja megegyezett azzal a detergens koncentrációval,amely a szubsztrátot tartalmazó oldatban volt.

Az enzim hozzáadásának pillanatától kezdve növekszik a transzmisszió,ahogy a lizozim elbontja a szubsztrát β -1,4 glikozid kötéseit. A transzmisszió változását 450 nm-nél figyeltük meg. Az aktivitására jellemző mennyiség az

$$[a] = \frac{10^5}{\Delta t \; c} \quad \left[\frac{\text{liter}}{\text{M}\,s}\right]$$

ahol Δt a 40 %-s transzmissziónövekedéshez tartozó idő, c a tényleges enzimkoncentráció,amely a szubsztráthoz való hozzákeverés után alakul ki. Mivel a szubsztrátkoncentráció a különböző térfogatú fehérje-detergens oldatok hoz-

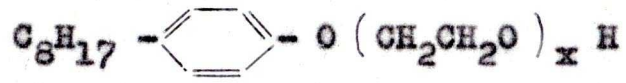
záadása esetén változott,ezért egy korrekcióval ezt is figyelembe vettük.

4.§. A vizsgált anyagok.

Fehérjeként tojásfehérjéből előállitott lizozimot, a Nutritional Biochemical Corporataion (Cleveland) készitményét és liofilizált emberi szérum albumint, a Reanal készitményét használtuk fel. A lizozim viszonylag kisméretü (mólsúlya 15000; mérete 45x30x30 Å) globuláris fehérje. Szerkezetét először D.C.PHILLIPS állapitotta meg 1966-ban [41]. Két tirozin molekulát és hat triptofán molekulát tartalmaz. A fluoreszcencia spektrumában csak a triptofán fluoreszcencia jelenik meg, a gerjesztési energia valószinüleg teljesen átmegy a triptofánokra [29]. A hat triptofán közül is csak a 62, 63 és 108 helyen lévő fluoreszkál,a többi fluoreszcenciája kioltódik [42]. Az albumin egy triptofánt és tizenhét tirozint tartalmaz,és a gerjesztő fénynek a 19,5 %-át az egyetlen triptofán nyeli el [43]. A fluoreszcencia szinképében mind a tirozin,mind a triptofán fluoreszcenciája megjelenik 280nm-s gerjesztő fénynél,csak a triptofán fluoreszcenciája sokkal intenzivebb,mint a tiroziné,mert valószinüleg a gerjesztési energia nagy része átadódik a tirozinekről a triptofánra [44]. Az albumin szintén globuláris fehérje,valamivel nagyobb mint a lizozim: mólsúlya 67000.

Az alkalmazott detergens a triton X-100, a Rhoom and Haas cég gyértmánya volt. Ez nem ionos detergens és

gyakran használják biológiai vizsgálatokban [1,2,45-47]. Szerkezeti képlete:



ahol $x \sim 10$ [48]. Mólsúlya 647, micelláit kb. 100 molekula alkotja [49], kritikus micella koncentrációja: $3 \cdot 10^{-4}$ M [5,50].

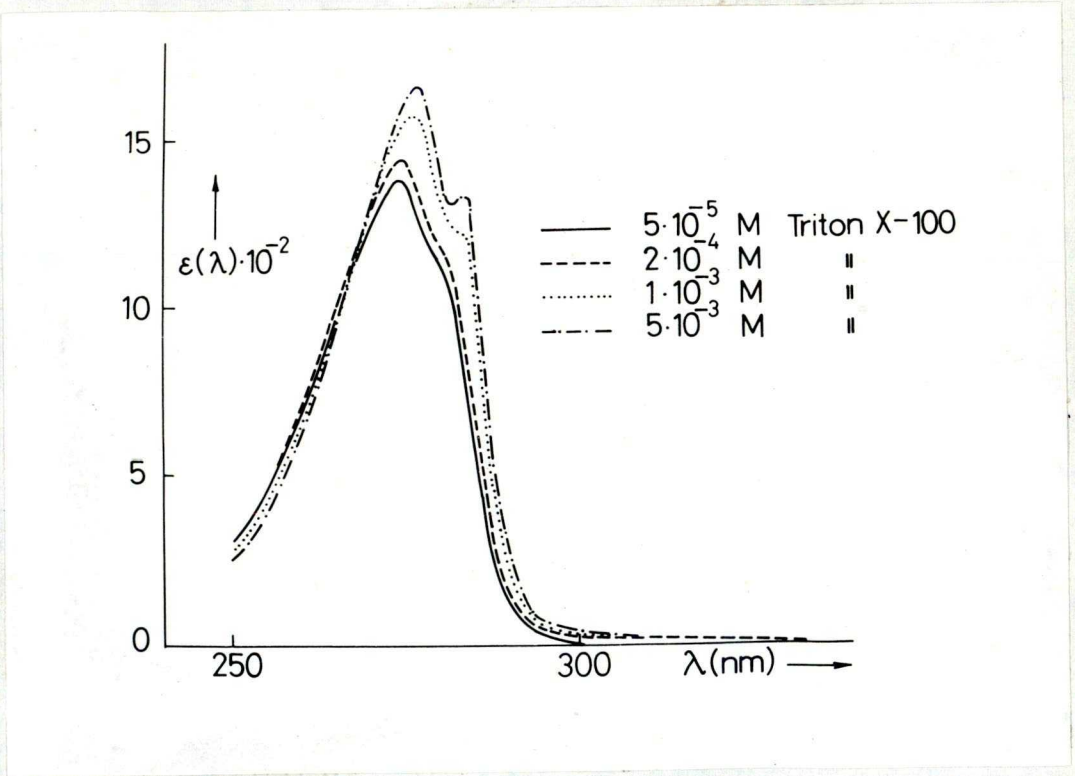
A fehérjékből és a detergensből 0,05 M-s pH = 7 foszfát pufferes törzsoldatot készitettünk és ezekből pipettáztunk ki megfelelő térfogatokat a fehérje,a detergens és a fehérje-detergens keverékoldatokhoz. A lizozim koncentrációja $2 \cdot 10^{-6}$ M-tól $6 \cdot 10^{-4}$ M-ig, az albuminé $2 \cdot 10^{-6}$ M-tól $8 \cdot 10^{-4}$ M-ig és a triton X-100 -é pedig $2 \cdot 10^{-5}$ M-tól $8 \cdot 10^{-3}$ M-ig változott.

A felhasznált Micrococcus lysodeikticust a Worthington Biochemical Corporation (Freehold,New Yersey) készitette.

5.§. A triton X-100 fényelnyelése és fluoreszcenciája.

5.1. A triton X-100 fényelnyelése, kritikus micella koncentráció.

A triton X-100 szerkezeti képletéből látható, hogy fenol kromofort tartalmaz, ez az ultraibolya tartományban nyel el. Az abszorpciós spektrumát már régebben meghatározták [5]. A moláris dekadikus extinkciós koefficiens, $\varepsilon(\lambda)$, bizonyos mértékben függ a koncentrációtól,

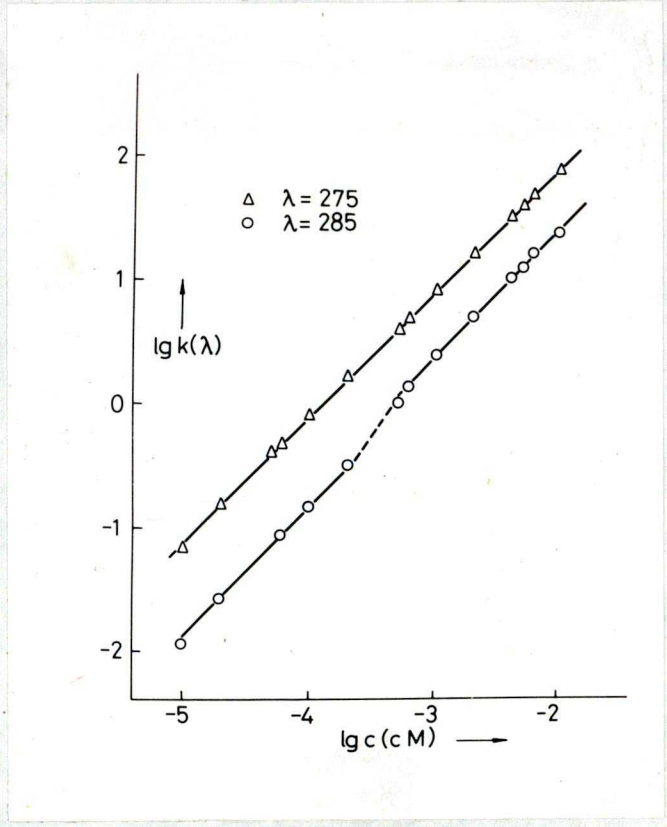


2.ábra

tehát a Beer-törvény nem érvényes (2.ábra). Az $\varepsilon(\lambda)$ csak kissé növekszik a detergens koncentráció növelésével a 275 nm-s sávban, jelentősebben növekszik a 282 nm-s sáv. Ezek az abszorpciós sávok a c.m.c. feletti tartományban a detergens koncentráció növelésével eltolódnak 277 nm-re és 285 nm-re. Ennek a változásnak a magyarázata [5] szerint az,hogy a kromofor erősebben hidrofob környezetbe kerül a micellák kialakulásával.

A 285 nm-nél fellépő abszorpcióváltozást fel lehet használni a c.m.c. meghatározására. [5]-ben ennek alapján határozták meg a c.m.c.-t vizes triton X-100 oldatban és 0,2 mg/ml-t kaptak, ami megegyezett az általunk kapott $3{,}5 \cdot 10^{-4}$ M értékkel. Ezt az értéket egyrészt abszorpciómméréssel nyertük (3.ábra), másrészt korábban végzett felületi feszültség méréssel [50]. Ha a 285 nm-nél mért k (285) abszorpciós együtthatókat a koncentráció függvényében ábrázoljuk,akkor két egymással szöget bezáró egyenes szakaszt kapunk. Ez csak viszonylag kis koncentráció tartományban igaz szigorúan,mert csak ott tekinthető kielégitő közelitéssel érvényesnek a Beer-törvény. Méréseink során elég nagy koncentráció tartományt vizsgáltunk. Itt már a Beer-törvény szigorúan véve ugyan nem érvényes (2.ábra), mivel azonban az eltérés nem nagy, várható,hogy k (285) a koncentráció függvényében nagy koncentráció tartomány esetén is két szöget bezáró egyenest ad. Könnyebb ábrázolhatóság kedvéért a koncentráció logaritmusának függ-

vényében ábrázoltuk a k (285) értékek logaritmusát, és valóban két egymással párhuzamos egyenest kaptunk (3.ábra).

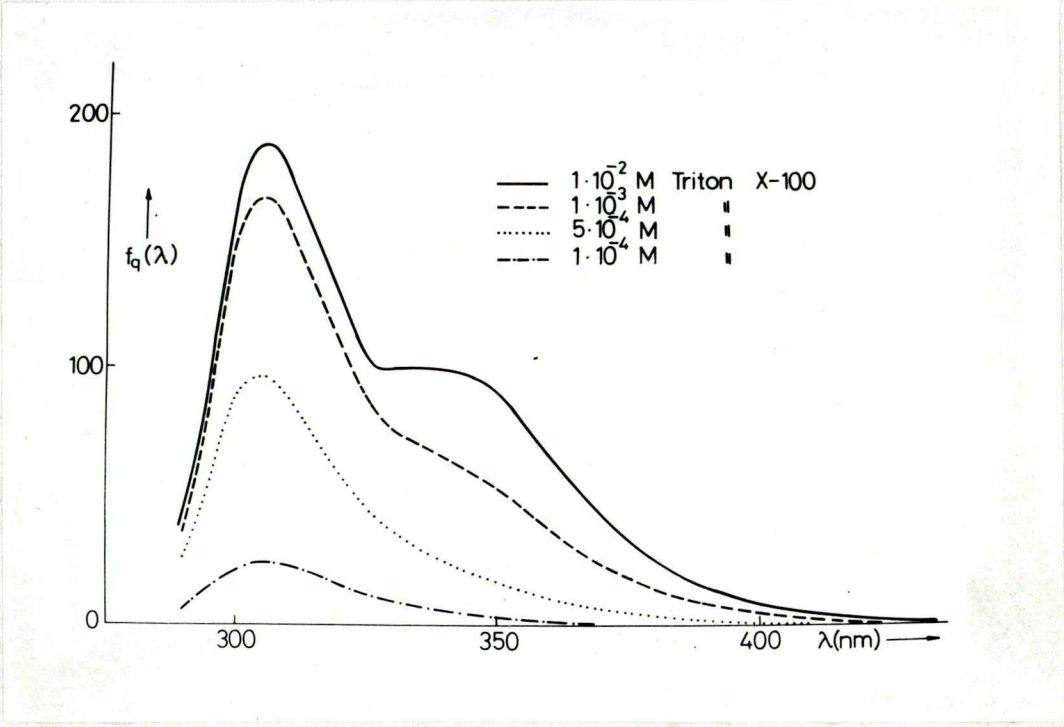


3.ábra

A törési szakaszhoz tartozó koncentráció tartományban kezdenek a micellák kialakulni. Összehasonlitásul közöljük a lg k(275) értékeket is a koncentráció logaritmusának függvényében,ami azt mutatja,hogy a 275 nm-s sáv viszonylag jól követi a Beer-törvényt.

5.2. A triton X-100 fluoreszcenciája.

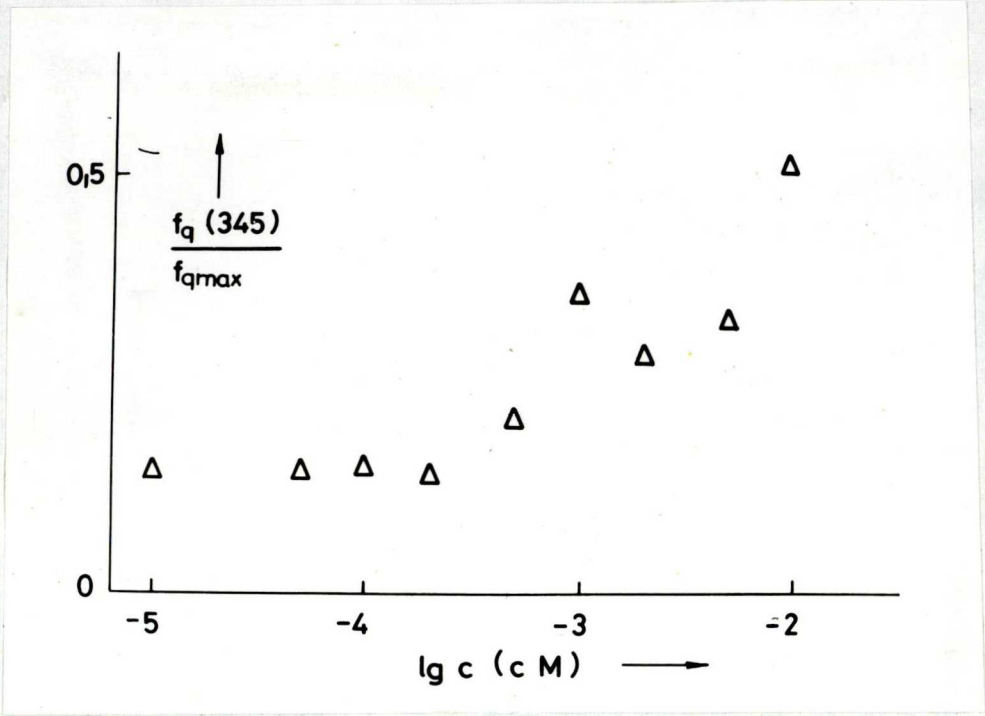
A fluoreszcencia spektrumokat 275, 285 és 290 nm-s gerjesztő fénnyel vettük fel. A spektrumok menete mind három esetben azonos volt,ezért csak a 285 nm-s gerjesztő fény esetén kapott görbéket mutatjuk be (4.ábra).



4.ábra

Mindegyik spektrum 305 nm-nél mutat egy maximumot. A detergens koncentráció növelésével $5 \cdot 10^{-4}$ M koncentrációval kezdődően egy váll jelentkezik 340 nm-nél, amely a koncentráció növelésével tovább növekszik. Ez arra mutat, hogy a koncentráció növelésével valamilyen új, fluoresz-

káló molekula-komplexum (micella, aggregatum) képződik. Az $f_q(340)/f_q(305)$ hányadost a koncentráció logaritmusának függvényében az 5.ábra mutatja.

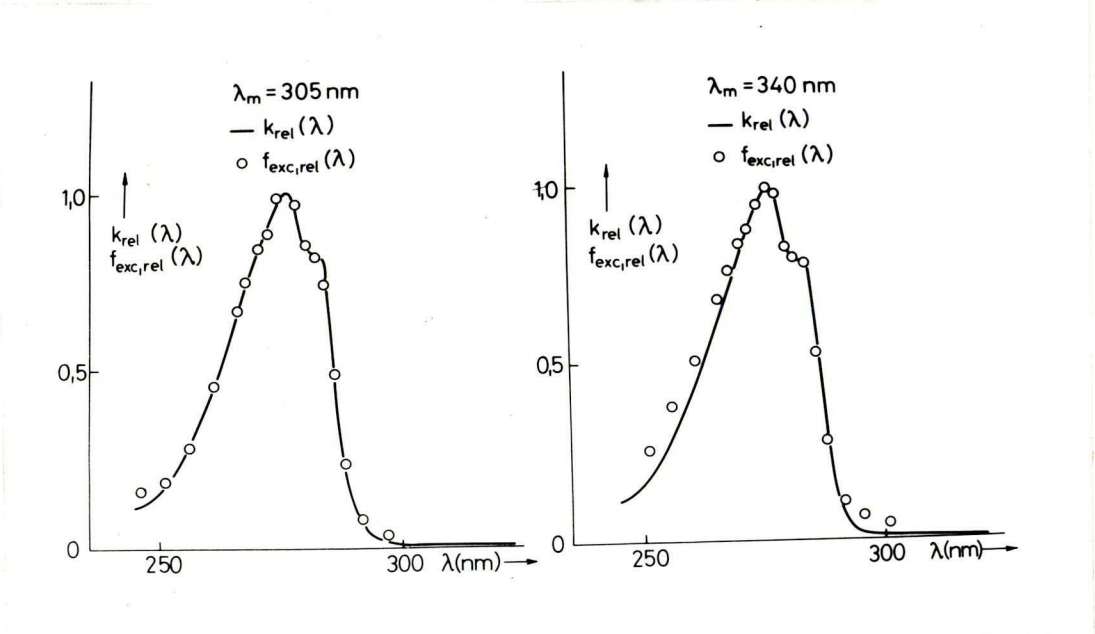


5.ábra

Mivel a görbében a törés éppen a c.m.c.-nél van, ezért ez a módszer is alkalmas lehet a c.m.c. meghatározására.

A gerjesztési szinképet is felvettük 305 nm-s és 340 nm-s megfigyelő hullámhossznál. A relativ gerjesztési szinképek és a relativ abszorpciós szinképek a mérési hibahatáron belül megegyeznek, tehát mind a 305, mind a 340 nm-nél lévő fluoreszcencia sáv az abszorpciós gör-

be mindkét sávjától származik. Ez arra mutat, hogy a kétfajta (305 és 340 nm maximumú) fluoreszkáló komponens között az elektrongerjesztési energia átadása gyakorlatilag teljes. A $2 \cdot 10^{-3}$ M triton X-100 oldat esetén a relativ abszorpciós és gerjesztési szinképeket a két megfigyelési hullámhossznál a 6.ábra mutatja.



6.ábra

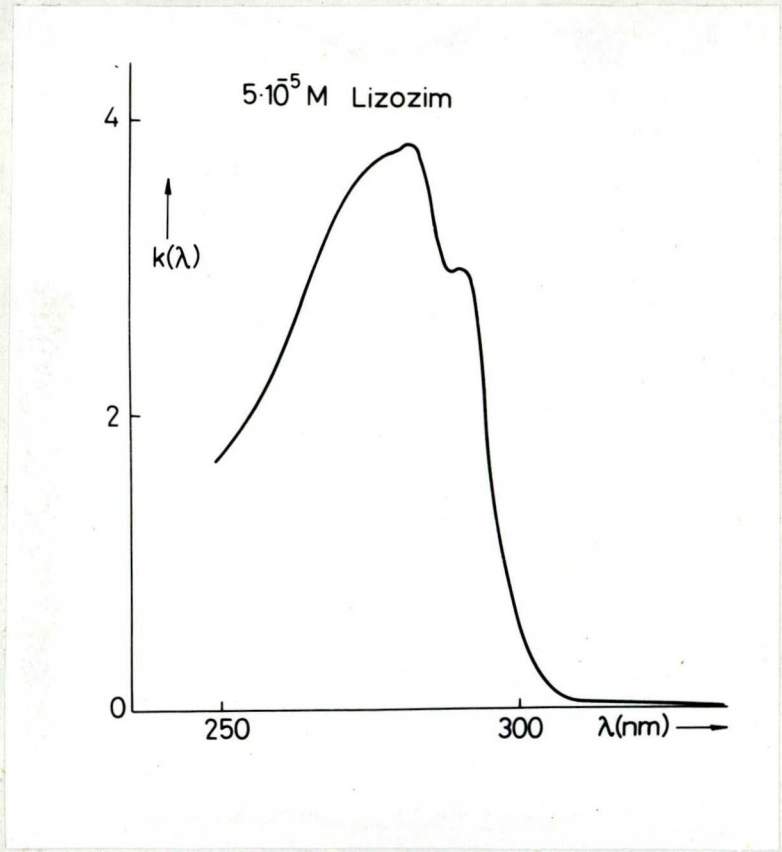
A (4) összefüggés alapján meghatároztuk a fluoreszcencia csillapodás idejét is az $1 \cdot 10^{-3}$ M triton X-100 oldat esetén: $\tau_o = 4{,}6\ 10^{-8}$ s. A (4) alapján kapott τ_o természetesen kismértékben függ a koncentrációtól, mivel

$\varepsilon(\lambda)$ is függ tőle. A (3) összefüggés alapján a triton X-100 abszolút kvantum hatásfoka $\eta = 0{,}3$ 280 nm-s gerjesztő fény esetén.

6. §. A lizozim fényelnyelése és fluoreszcenciája.

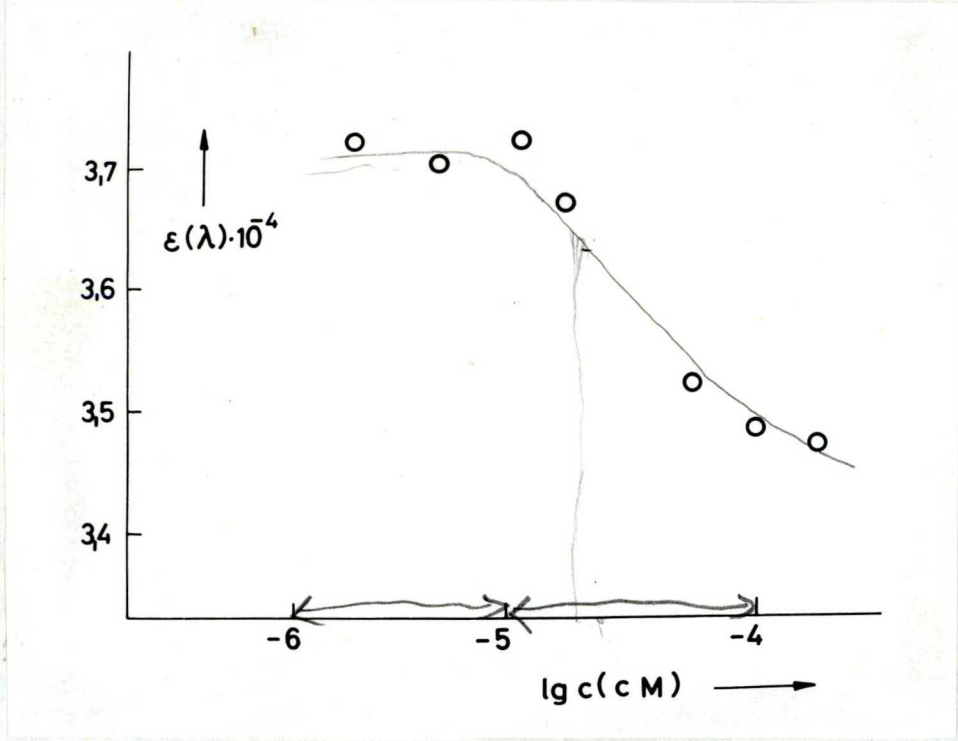
A lizozim fluoreszcencia jellemzőit már sokan vizsgálták [1.pl. 29, 51, 52]. Több közlemény foglalkozik a környezet hatásával is. Igy pl. [29]-ben a pH hatását, [53]-ban a pH és hőmérséklet hatását vizsgálták.

A jelen munkában szükség volt a lizozim abszorpciós és fluoreszcencia spektrumára,abszolút kvantum hatásfokára és csillapodási idejére,ezért a rendelkezésünkre álló lizozim esetén újra meg kellett határoznunk ezeket.



7.ábra

A 7.ábra mutatja az $5 \cdot 10^{-5}$ M koncentrációjú lizozim oldat abszorpciós spektrumát. Az $\varepsilon(280)$ értékeket a koncentráció logaritmusának függvényében a 8.ábrán tüntettük fel. A nagyobb koncentrációknál a csökkenés annak tudható be, hogy az $\varepsilon(\lambda)$ számításánál a felhasznált koncentráció nem valódi monomer koncentráció,hanem annál nagyobb.

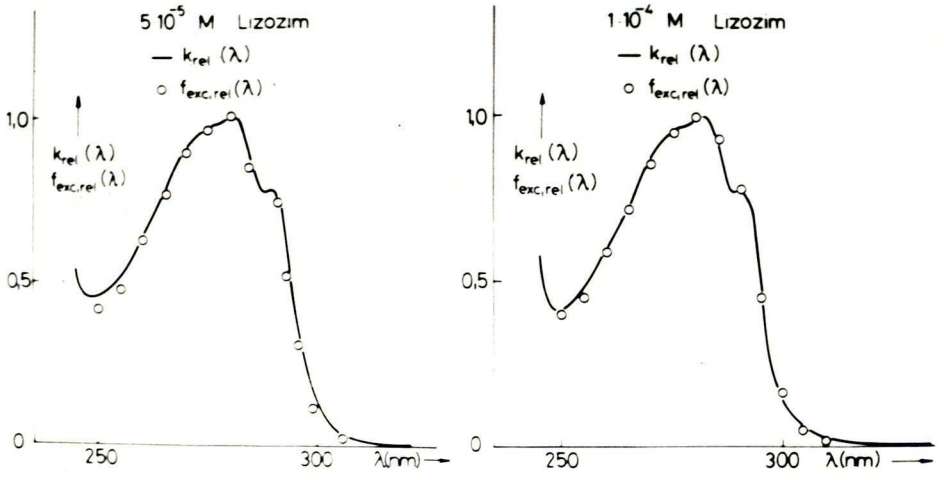


8.ábra

Ugyanis a koncentráció növelésével a lizozim aggregálódásra képes és monomer-dimer egyensúly áll be [54]. Az általunk felhasznált legnagyobb koncentrációnál

($6 \cdot 10^{-4}$ M) a molekuláknak kb. a 20 %-a dimerizálódik. A dimerizáció kb. $2 \cdot 10^{-5}$ M-nál nagyobb koncentrációknál válik számottevővé, mert ekkor a bemért molekuláknak kb. 7 %-a dimerizálódik.

A fluoreszcencia spektrumok eloszlása a koncentráció függvényében lényegesen nem változik [55]. 340 nm-s megfigyelő hullámhossznál felvettük a gerjesztési szinképeket, amelyek az abszorpciós szinképekkel jó egyezést mutattak.



9.ábra

A 9.ábra pl. az $5 \cdot 10^{-5}$ M és $1 \cdot 10^{-4}$ M koncentrációjú lizozim oldatok relativ abszorpciós és gerjesztési színképeit mutatja.

A fluoreszcencia csillapodási idejét és az abszolút kvantum hatásfokát a (4), ill. a (3) összefüggés alapján határoztuk meg. A kapott értékek:

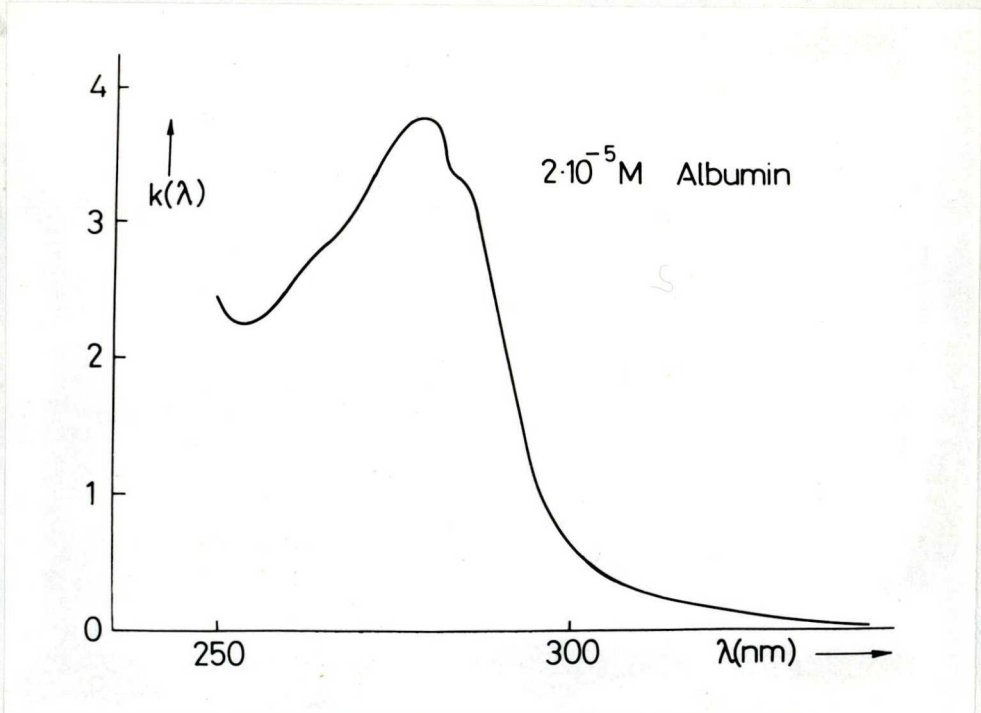
$$\tau = 1{,}96\ 10^{-9}\ \text{s} \qquad \text{és} \qquad \eta = 0{,}074$$

Az irodalomban ezek az értékek: $\tau = 2.10^{-9}$ s [56] és $\eta = 0{,}07$ [57]. Az η meghatározásnál a gerjesztő hullámhossz 280 nm volt.

A vizsgált koncentrációtartományban a τ és η csupán kismértékben függ a koncentrációtól, mert $\varepsilon(\lambda)$ és $f_q(\lambda)$ is csak kismértékben változnak. Ezért ezeket a változásokat elhanyagoltuk, mert a mérési hiba nagyságrendjébe esnek.

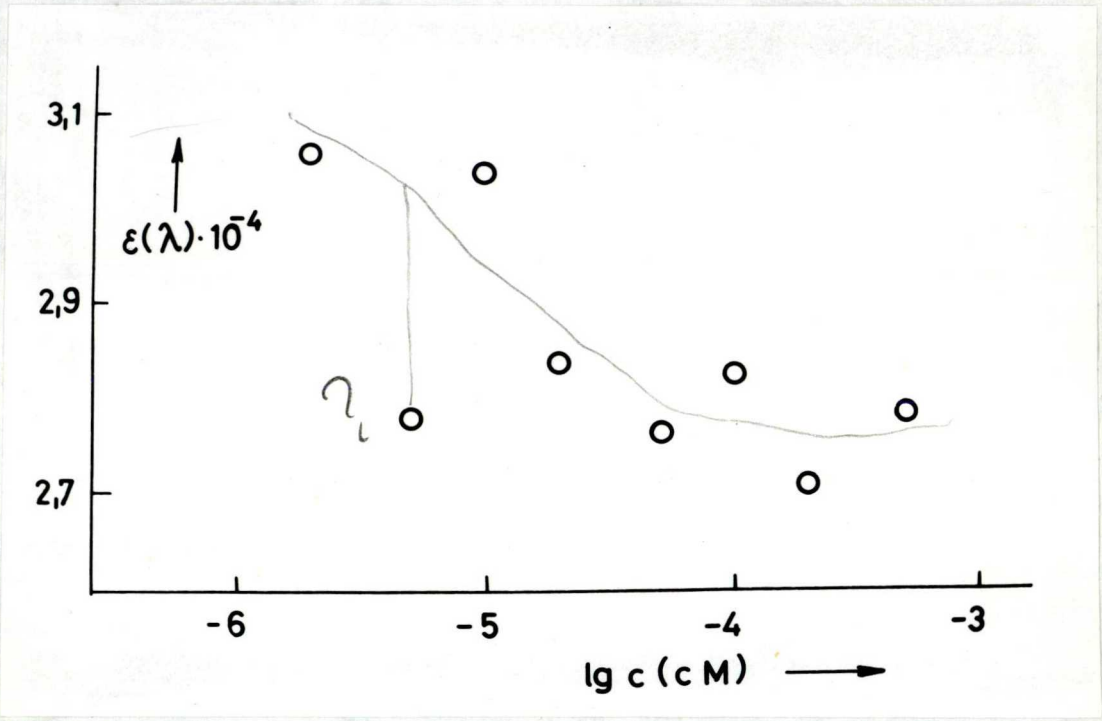
7.§. Az emberi szérum albumin fényelnyelése és fluoreszcenciája.

Az emberi eredetü szérum albumin fluoreszcencia jellemzői jól ismertek az irodalomból [51, 52]. Minthogy vizsgálatainkhoz szükségünk volt az abszorpciós,valamint a fluoreszcencia szinképek számszerü adataira,és a rendelkezésünkre álló albumin minta fluoreszcenciájának abszolút kvantum hatásfokára, ezért ezeket a jellemzőket újból meghatároztuk.



10.ábra

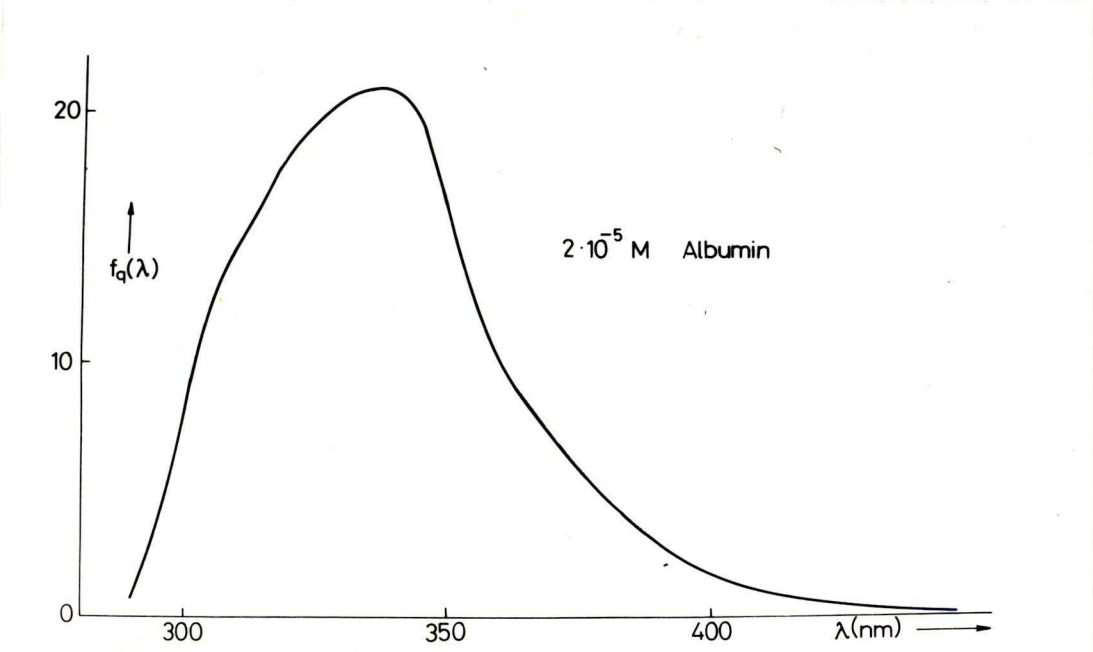
A 10.ábra a $2 \cdot 10^{-5}$ M koncentrációjú albumin oldat szinképét mutatja. A koncentrációtól az abszorpciós szinkép alakja nagyjából függetlennek mutatkozott, de a moláris extinkciós koefficiens kissé függött. A maximumhoz tartozó $\varepsilon(\lambda)$ értékeket a 11.ábrán tüntettük fel.



11.ábra

Habár ezek eléggé szóródnak,de tendencia jellegüen a koncentráció növelésével kis mértékben csökkennek. Ez -hasonlóan a lizozimhoz - azzal magyarázható, hogy a nagy koncentrációknál az albumin aggregálódik és igy az $\varepsilon(\lambda)$ számitásához felhasznált koncentráció (a bemért koncent-

ráció) nem a valódi koncentráció.



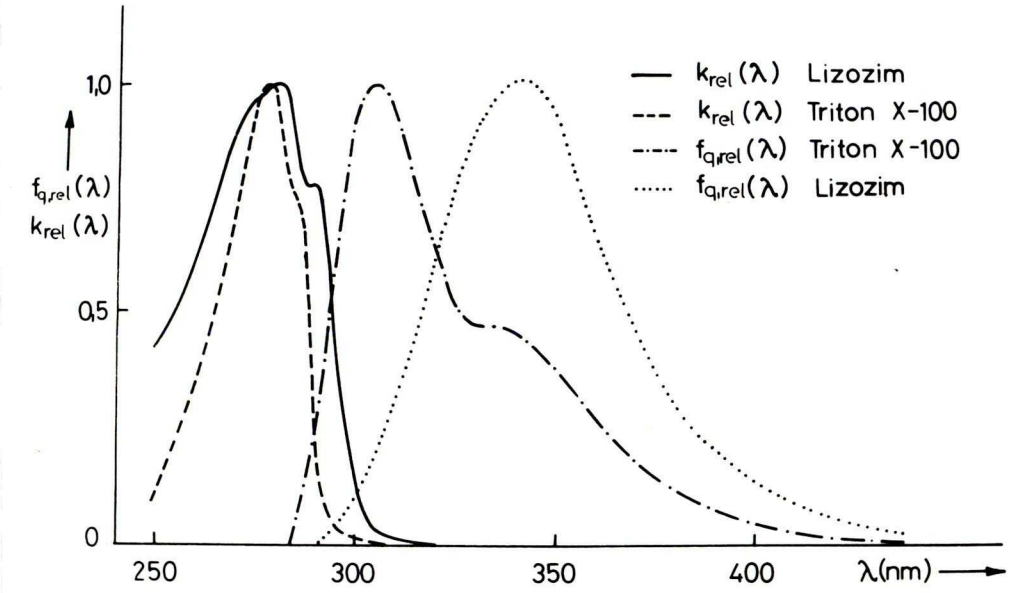
12.ábra

A 12.ábrán a $2 \cdot 10^{-5}$ M koncentrációjú albumin oldat fluoreszcencia spektruma látható.A fluoreszcencia maximum helye 339 nm, ami az irodalmi értékkel jó egyezésben van [52]. 305 nm-nél megjelenik egy váll, ami a tirozin fluoreszcenciára jellemző. A 339 nm-s maximum a triptofán fluoreszcenciának felel meg. A koncentráció növelésével a spektrum alakja és maximum helye nem változik. 280 nm-s gerjesztő fény esetén az abszolút kvantum ha-

tásfokot (3) alapján számoltuk, és értéke: $\eta = 0{,}029$, ami az irodalmi értékkel jól egyezik [52].

8.§. A lizozim és triton X-100 keverék oldatok fényelnyelése és fluoreszcenciája.

Egy adott koncentrációnál a két komponens relativ abszorpciós és fluoreszcencia szinképét a 13.ábra mutatja.



13.ábra

Négy különböző koncentrációjú lizozim és triton X-100 keverék oldatban határoztuk meg az abszorpciós, fluoreszcencia és gerjesztési szinképeket. A vizsgált oldatok összetétele lizozimra és tritonra nézve:

$5 \cdot 10^{-5}$ M lizozim + $5 \cdot 10^{-4}$ M triton X-100,

$5 \cdot 10^{-5}$ M lizozim + $1 \cdot 10^{-3}$ M triton X-100,

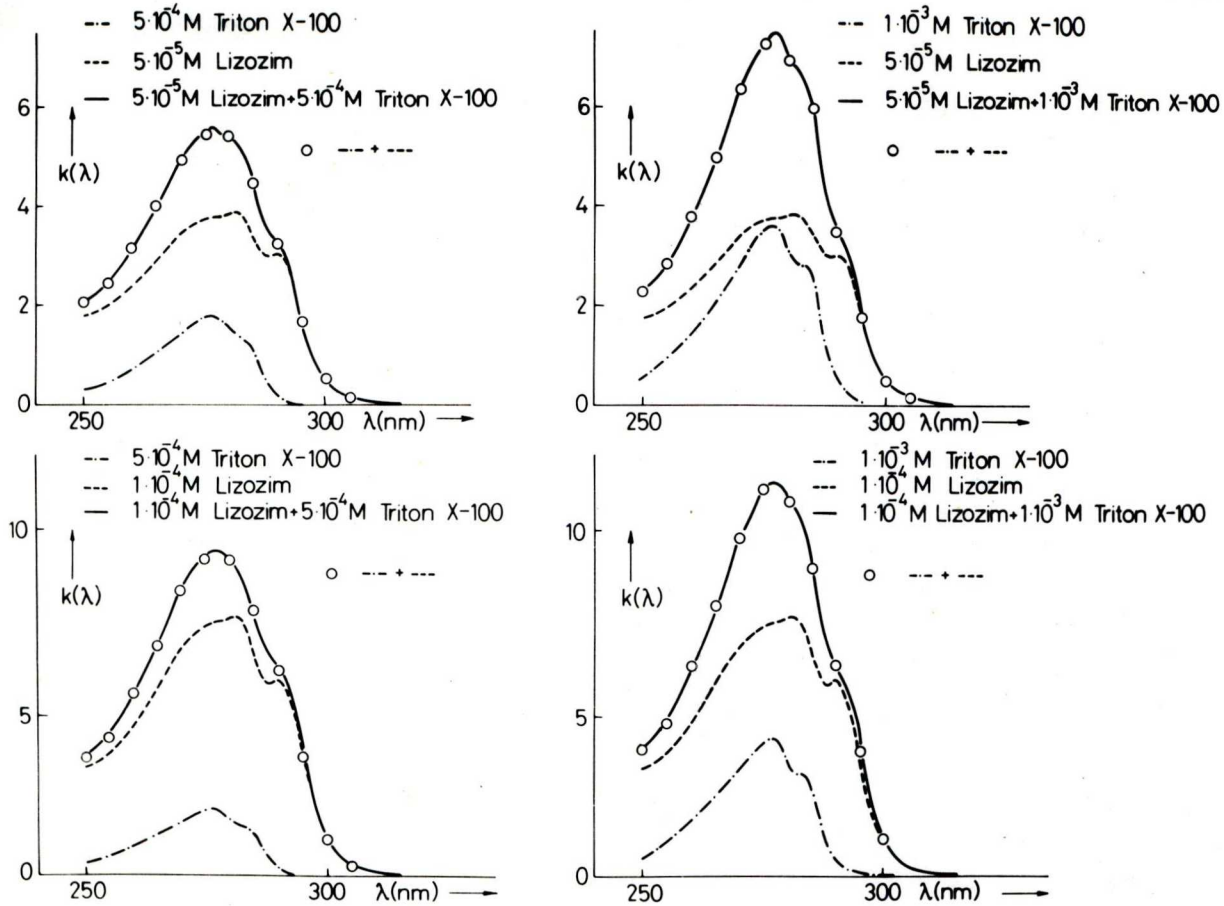
$1 \cdot 10^{-4}$ M lizozim + $5 \cdot 10^{-4}$ M triton X-100,

$1 \cdot 10^{-4}$ M lizozim + $1 \cdot 10^{-3}$ M triton X-100.

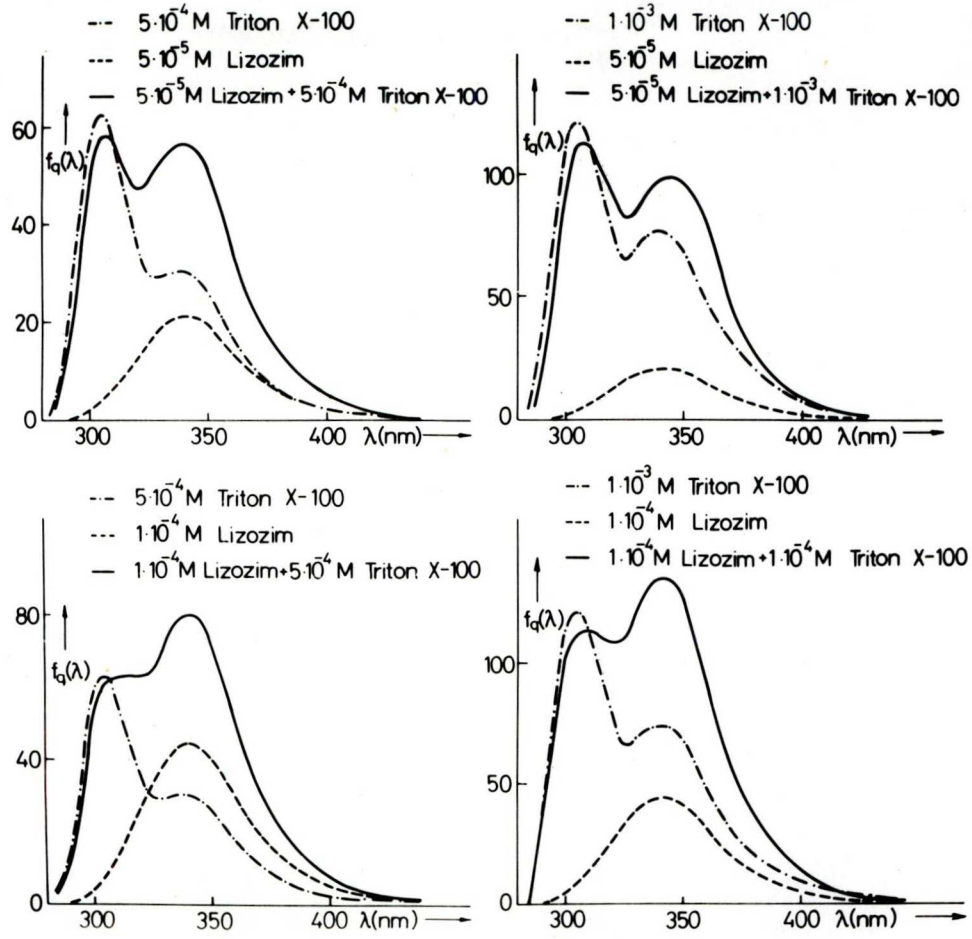
Az abszorpciós szinképek jó közelitéssel additivak voltak. A 14. ábra mutatja a négy keverék oldat és a komponens oldatok abszorpciós szinképeit a komponensekből számitott összeg-szinképekkel együtt.

A fluoreszcencia szinképeket 275 nm-es és 290 nm-es gerjesztő fény esetén határoztuk meg. A 275 nm-es gerjesztés esetén kapott fluoreszcencia spektrumok a 15. ábrán láthatók.

Megállapitható, hogy a triton X-100 305 nm-nél lévő csucsa a keverék oldatokban mindig lecsökken. Ezért feltételezhető, hogy a gerjesztési energia egy része a triton X-100-ról a lizozimnak adódik át. Ezt a lizozim abszorpciós és a triton X-100 fluoreszcencia szinképének viszonylag nagyobb átfedése (13. ábra) is érthetővé teszi. Ezenkivül a triton X-100 fluoreszcencia csillapodási ideje egy nagyságrenddel nagyobb mint a lizozimé, ami szintén az energiaátadás meglétét támasztja alá.


5·10⁻⁴M Triton X-100
5·10⁻⁵M Lizozim
5·10⁻⁵M Lizozim+5·10⁻⁴M Triton X-100
k(λ)
λ(nm)
1·10⁻³M Triton X-100
5·10⁻⁵M Lizozim
5·10⁻⁵M Lizozim+1·10⁻³M Triton X-100
1·10⁻⁴M Lizozim
1·10⁻⁴M Lizozim+5·10⁻⁴M Triton X-100
1·10⁻⁴M Lizozim+1·10⁻³M Triton X-100

14. ábra


-·- 5·10⁻⁴ M Triton X-100
--- 5·10⁻⁵ M Lizozim
— 5·10⁻⁵M Lizozim + 5·10⁻⁴M Triton X-100
fQ(λ)
λ(nm)
-·- 1·10⁻³ M Triton X-100
--- 5·10⁻⁵ M Lizozim
— 5·10⁻⁵M Lizozim+1·10⁻³M Triton X-100
-·- 5·10⁻⁴M Triton X-100
--- 1·10⁻⁴ M Lizozim
— 1·10⁻⁴M Lizozim+5·10⁻⁴ M Triton X-100
-·- 1·10⁻³ M Triton X-100
--- 1·10⁻⁴M Lizozim
— 1·10⁻⁴M Lizozim+1·10⁻⁴M Triton X-100

15.ábra

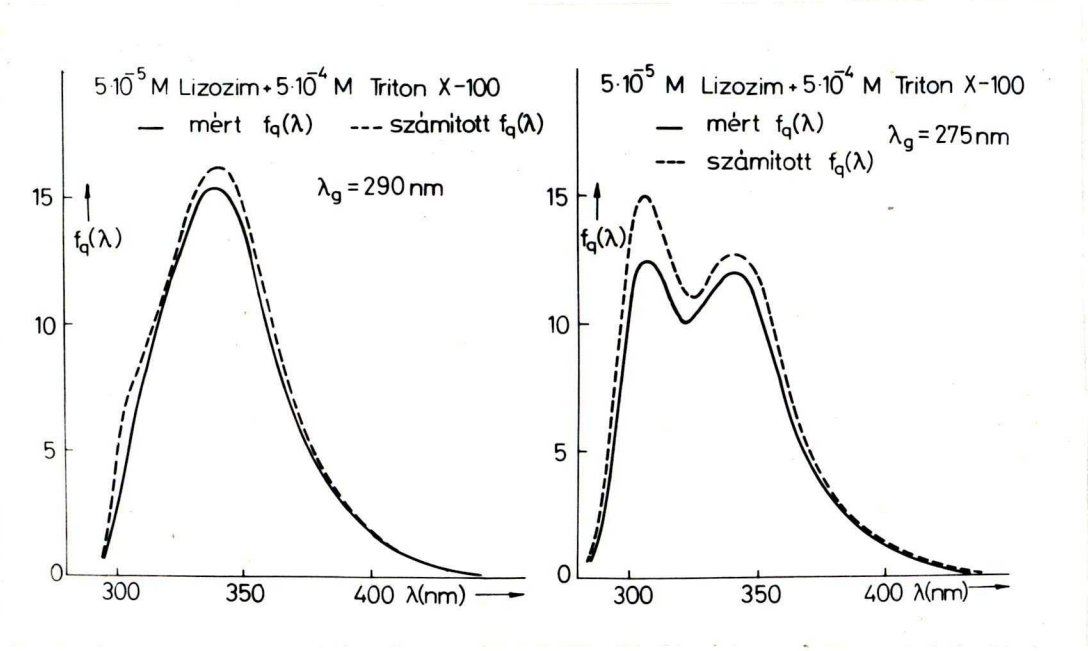
[34]-ben megadtak egy összefüggést a két komponensü keverék oldat fluoreszcencia kvantum eloszlás spektruma ($f(\lambda')$) és a két komponens fluoreszcencia kvantum eloszlás spektrumai ($f_1(\lambda')$, $f_2(\lambda')$) között arra az esetre, amikor nincs gerjesztési energia átadás a komponensek között:

$$f(\lambda') = \frac{k_1(\lambda)\,\eta_1(\lambda)\,f_1(\lambda') + k_2(\lambda)\,\eta_2(\lambda)\,f_2(\lambda')}{k_1(\lambda)\,\eta_1(\lambda) + k_2(\lambda)\,\eta_2(\lambda)} \qquad (7)$$

ahol $k_1(\lambda)$ és $\eta_1(\lambda)$, ill. $k_2(\lambda)$ és $\eta_2(\lambda)$ az első ill. a második komponens abszorpciós együtthatója és fluoreszcenciájának abszolút kvantumhatásfoka a gerjesztő hullámhossznál. Ha a mért és a számitott $f(\lambda')$ értékek eltérnek egymástól, akkor ebből az energiaátadás meglétére következtethetünk.

A (7) összefüggés alapján kiszámitottuk a négy keverék oldat esetén az $f(\lambda')$ értékeket a λ_g = 275 nm és λ_g = 290 nm gerjesztő hullámhosszaknál.

A 16.ábrán az $5\cdot10^{-5}$ M lizozim + $5\cdot10^{-4}$ M triton X-100 keverék oldat számitott és mért $f_q(\lambda)$ értékeit tüntettük fel. A másik három keverék oldat esetén a mért és számitott spektrumok közötti különbség hasonló volt, ezeket a spektrumokat nem mutatjuk be.



16.ábra

Megállapithatjuk, hogy a 290 nm-s gerjesztő hullámhossz esetén a mért és számitott spektrumok eltérése kicsiny, ezért a tritonról lizozimra történő gerjesztési energia átadás jelentéktelen, viszont a 275 nm-s gerjesztés esetén számottevő a különbség a mért és a számitott spektrumok között, tehát van energiaátadás.

Ennek az energiaátadásnak a hatékonyságát a (6) összefüggés alapján számoltuk ki, és az egyes oldatok esetén az I.táblázatban tüntettük fel az értékeket.

I.táblázat

oldat	$5\cdot10^{-5}$ M lizozim + $5\cdot10^{-4}$ M triton	$5\cdot10^{-5}$ M lizozim + $1\cdot10^{-3}$ M triton	$1\cdot10^{-4}$ M lizozim + $5\cdot10^{-4}$ M triton	$1\cdot10^{-4}$ M lizozim + $1\cdot10^{-3}$ M triton
f	0,138	0,111	0,167	0,155

A táblázat adataiból látható,hogy az energiaátadás hatékonysága a legnagyobb abban az esetben, amikor a [triton]/[lizozim] koncentráció arány a legkisebb, és amikor ez az arány nagy, akkor a hatékonyság csökken.

Ennek oka egyrészt az lehet,hogy az $1\cdot10^{-3}$ M koncentrációjú triton X-100 oldatban már jelentős mennyiségü micella is jelen van. A detergens kromoforja viszonylag a micella belsejében helyezkedik el és nem a felületén,igy nyilván nehezebben képes az energiát átadni az oldatba, ill. a micella felületén lévő fehérjének [14]. Másrészt viszont, ha a lizozim molekulák száma megnő,akkor az átvevő centrumok többen lesznek, és igy nagyobb a valószinüsége annak,hogy egy triton molekula a gerjesztett állapot élettartama alatt találkozik egy gerjesztetlen lizozim molekulával, amely képes az energiát átvenni.

A továbbiakban azt kivántuk felderiteni, hogy a gerjesztési energia átadás hatékonysága hogyan függ a molekulák között lévő távolságtól. Ezért egy széles koncent-

ráció tartományban (a triton X-100 koncentrációja : $2 \cdot 10^{-5}$ M-tól $6 \cdot 10^{-3}$ M-ig, a lizozimé pedig $2 \cdot 10^{-6}$ M--tól $6 \cdot 10^{-4}$ M-ig változott; a triton/lizozim mólarány minden esetben 10/1 volt) meghatároztuk az $\underline{f}$ -t 275 nm-s gerjesztő fény esetén. Az abszorpciós együtthatókat 275 és 305 nm-nél és a reabszorpcióra korrigált fluoreszcencia intenzitásokat 305 nm-nél a II.táblázat tartalmazza.

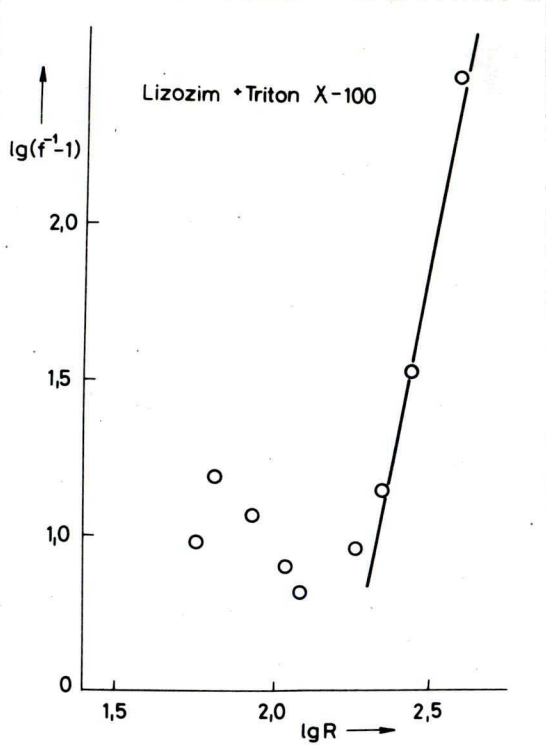
Az abszorpciós együtthatók 275 nm-nél additivak az egész vizsgált koncentráció tartományban. 305 nm-nél ez már nincs igy, de itt a spektrumok lábainál a kis $k(\lambda)$ értékek miatt a mérési hiba rendkivül nagy, ezért az eltérések valószinüleg a mérési pontatlanságból erednek.

A megfelelő adatok segitségével a (6) összefüggésből meghatároztuk az $\underline{f}$ értékeket az egyes keverék oldatoknál. A $\lg\left(f^{-1} - 1\right)$ értékeket a donor és az akceptor molekulák közötti $\underline{R}$ távolság logaritmusának függvényében ábrázoltuk (17.ábra). Jelen esetben az $\underline{R}$ pontos meghatározása nehéz lenne, mert az oldatok nem ekvimoláris keverékeket tartalmaznak. Viszont az egymás után következő oldatok esetén az $\underline{R}$ távolságok aránya megegyezik pl. a csak donor molekulák távolságának arányával, egyenletes eloszlást feltételezve. Ezért,ha a $\lg\left(f^{-1} - 1\right)$ értékeket a donor molekulák közötti $\underline{R}$ távolság logaritmusának függvényében ábrázoljuk,akkor ez azt jelenti,hogy a $\lg\left(f^{-1} - 1\right)$ értékeket valamilyen

II. táblázat

Oldat	k(275)	k(305)	I(305)	f
$2 \cdot 10^{-6}$ M lizozim	0,183	0,038	0,53	
$2 \cdot 10^{-5}$ M triton	0,060	0,000	6,09	0,0031
$2 \cdot 10^{-6}$ M lizozim + $+2 \cdot 10^{-5}$ M triton	0,240	0,040	6,60	
$6 \cdot 10^{-6}$ M lizozim	0,486	0,076	0,95	
$6 \cdot 10^{-5}$ M triton	0,198	0,006	17,54	0,0287
$6 \cdot 10^{-6}$ M lizozim + $+6 \cdot 10^{-5}$ M triton	0,712	0,088	18,00	
$1 \cdot 10^{-5}$ M lizozin	0,825	0,112	1,78	
$1 \cdot 10^{-4}$ M triton	0,324	0,010	25,32	0,0661
$1 \cdot 10^{-5}$ M lizozim + $+1 \cdot 10^{-4}$ M triton	1,175	0,150	25,48	
$2 \cdot 10^{-5}$ M lizozim	1,700	0,224	2,62	
$2 \cdot 10^{-4}$ M triton	0,661	0,018	32,75	0,1003
$2 \cdot 10^{-5}$ M lizozim + $+2 \cdot 10^{-4}$ M triton	2,290	0,260	32,19	
$6 \cdot 10^{-5}$ M lizozim	4,690	0,650	1,95	
$6 \cdot 10^{-4}$ M triton	2,060	0,025	22,54	0,1317
$6 \cdot 10^{-5}$ M lizozim + $+6 \cdot 10^{-4}$ M triton	6,510	0,639	21,63	
$1 \cdot 10^{-4}$ M lizozim	7,870	1,085	2,93	
$1 \cdot 10^{-3}$ M triton	3,400	0,036	40,48	0,1122
$1 \cdot 10^{-4}$ M lizozim + $+1 \cdot 10^{-3}$ M triton	11,870	1,145	39,01	
$2 \cdot 10^{-4}$ M lizozim	15,800	2,210	2,51	
$2 \cdot 10^{-3}$ M triton	6,790	0,073	45,05	0,0786
$2 \cdot 10^{-4}$ M lizozim + $+2 \cdot 10^{-3}$ M triton	22,400	2,303	44,10	
$4 \cdot 10^{-4}$ M lizozim	32,200	4,720	0,92	
$4 \cdot 10^{-3}$ M triton	13,930	0,150	18,63	0,0616
$4 \cdot 10^{-4}$ M lizozim + $+4 \cdot 10^{-3}$ M triton	47,800	6,260	18,43	
$6 \cdot 10^{-4}$ M lizozim	55,400	8,790	1,34	
$6 \cdot 10^{-3}$ M triton	21,700	0,245	31,74	0,0948
$6 \cdot 10^{-4}$ M lizozim + $+6 \cdot 10^{-3}$ M triton	80,700	8,090	30,12	

módon eltoljuk a lgR tengely mentén,de a görbe meredeksége nem változik meg. Ezért a kapott ábráról csak a j értéket tudjuk meghatározni, az R_0 értékét már nem.



17.ábra

Kis koncentrációk esetén a $\lg\left(f^{-1}-1\right)$ görbe pontjai egyenest határoznak meg, amelynek a meredeksége : j = 5,8. A mérési pontatlanságokat figyelembe véve, ezt a j értéket tekinthetjük 6-nak, ami arra utal, hogy amig az oldatban nincsenek micellák, addig érvényes az energiaátadás hatékonyságára az

$$f = \frac{\left(\frac{R_0}{R}\right)^6}{\left(\frac{R_0}{R}\right)^6 + 1}$$

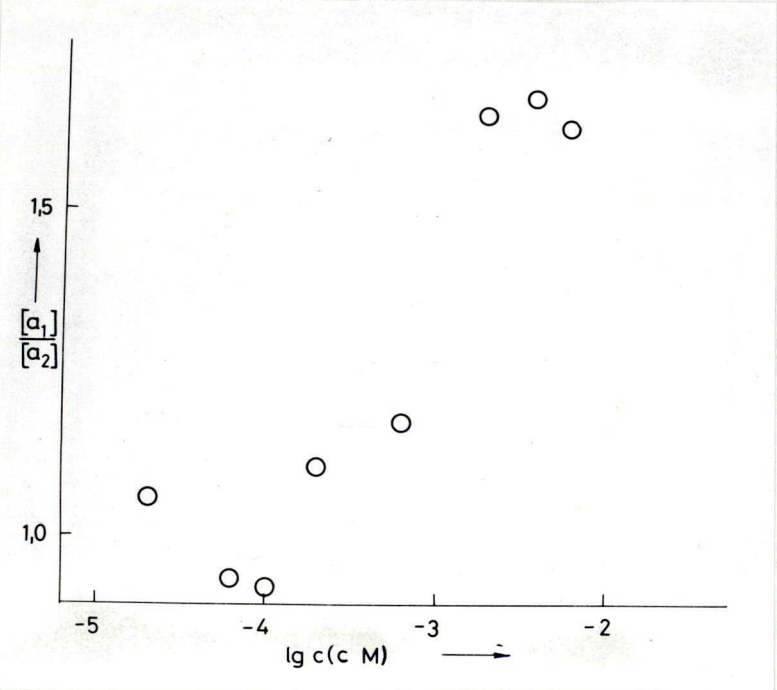
összefüggés. A micellák megjelenésével az f egy közel állandó érték körül szóródik.

A c.m.c. feletti detergens koncentráció tartományban a szabad detergens molekulák száma állandó [58], tehát a lizozim koncentráció növelésével az energiaátadás hatékonyságának növekednie kellene, feltételezve, hogy csak szabad detergens molekuláról megy át az energia a fehérje molekulára.

Az f növekedését nem tapasztaljuk. Ezt értelmezhetjük azzal, hogy a lizozim molekulák a micellákkal lépnek kölcsönhatásba, a micellák felületére adszorbeálódnak, és igy a szabad detergens molekuláktól való távolságuk nem változik, hasonlóan a tween 20 és lizozim rendszerhez [14].

Az aktivitás mérések is a lizozim-micella kölcsönhatás meglétét támasztják alá. A II.táblázatban szereplő lizozim és lizozim-triton keverék oldatok aktivitását meghatároztuk. Az $[a_2] / [a_1]$ hányadost, ahol $[a_2]$ a lizozim-triton keverék oldatban a lizozim aktivitása és $[a_1]$ a csak lizozimot tartalmazó oldat aktivitása, a detergens koncentráció logaritmusának függvényében ábrá-

zoltuk.



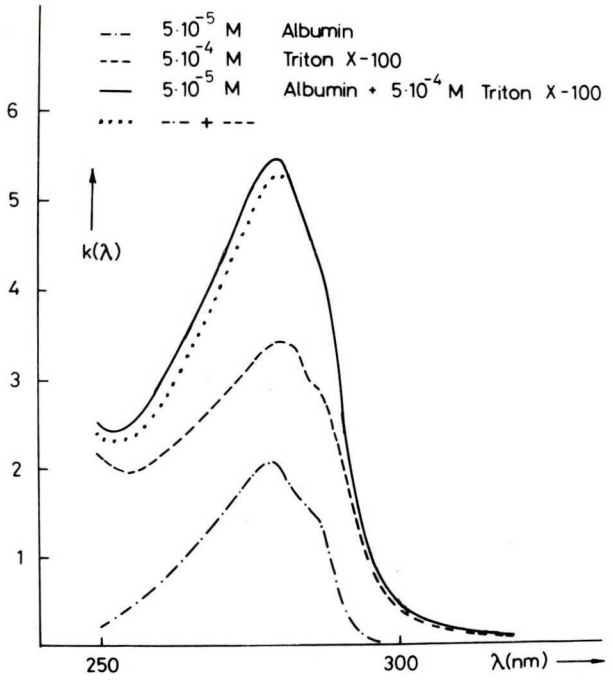
18.ábra

A két oldatban a lizozim és a szubsztrát koncentrációja azonos volt.

Látható,hogy a triton X-100,amikor jelentős mennyiségben van jelen micella, a lizozim aktivitását mintegy 60 %-kal megnöveli. Ez egyrészt bekövetkezhet azért,mert a triton X-100 fellazithatja a szubsztrát sejtfalában lévő kötéseket,másrészt viszont feltételezhető,hogy a lizozim a micellával olyan orientációjú kölcsönhatásban van, amelynél az enzim aktiv oldala jobban hozzáférhető a szubsztrát számára.

9. §. Az albumin és triton X-100 keverék oldatok fényelnyelése és fluoreszcenciája.

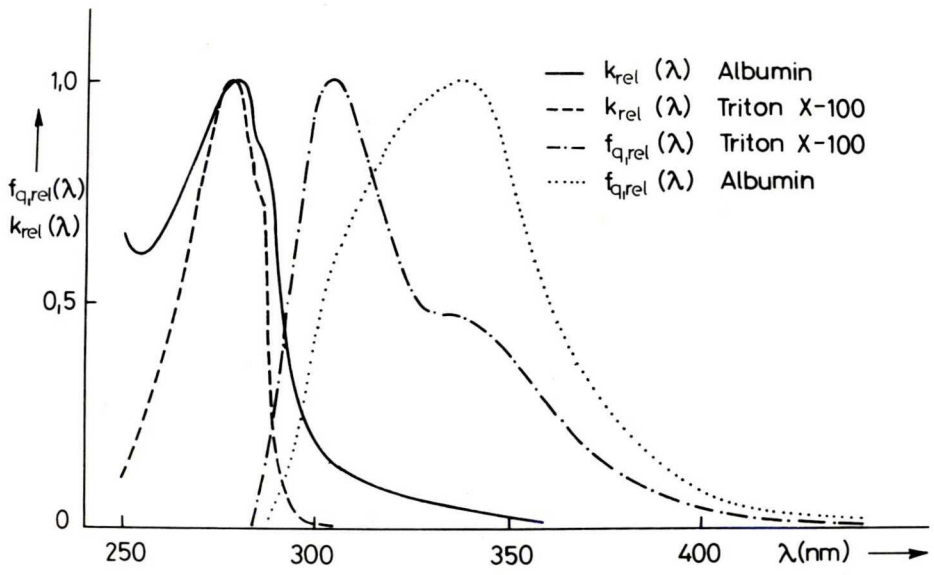
Az $5 \cdot 10^{-4}$ M koncentrációjú triton X-100 és az $5 \cdot 10^{-5}$ M koncentrációjú albumin oldatok, ill. keverékük abszorpciós spektrumait a 19.ábrán tüntettük fel.



19.ábra

A pontozott vonal a két komponens abszorpciójának összege. Látható, hogy a két komponens abszorpciója nem szigorúan additiv. Ez arra utal, hogy a komponensek között, legalábbis kis mértékben kölcsönhatás van.

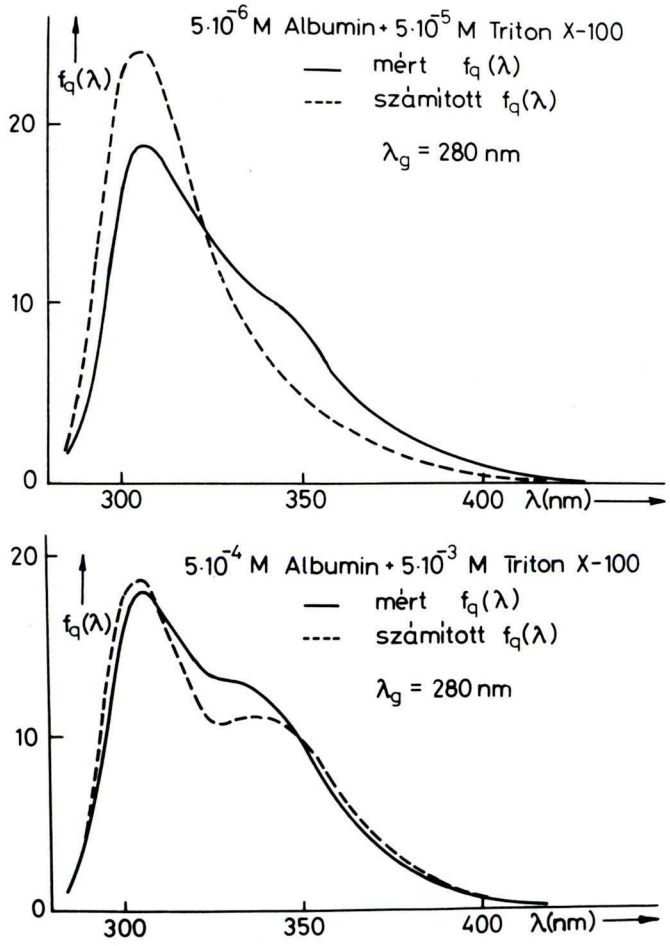
A 20.ábra mutatja az albumin és a triton X-100 relativ abszorpciós és fluoreszcencia spektrumait.



20.ábra

Az albumin abszorpciós szinképe eléggé átfedi a triton X-100 fluoreszcencia szinképét. Ezért várható,hogy keverék oldatban létrejön a gerjesztési elektron energia átadása a tritonról az albuminra. Ezt a keverék oldatok fluoreszcencia spektrumai is mutatják. A 21.ábrán az $5 \cdot 10^{-6}$ M albumin + $5 \cdot 10^{-5}$ M triton X-100, valamint az $5 \cdot 10^{-4}$ M albumin + $5 \cdot 10^{-3}$ M triton X-100 keverék oldatok

mért és (7) alapján számított fluoreszcencia spektrumai láthatók. A gerjesztő hullámhossz 280 nm volt.



21.ábra

Ezen két anyag esetén is igyekeztük meghatározni, hogy a gerjesztési energia átadásának hatékonysága hogyan függ

a molekulák közötti távolságtól. Ezért egy széles koncentráció tartományban meghatároztuk az $\underline{f}$ -t a (6) összefüggés segitségével. Az albumin koncentrációja $2 \cdot 10^{-6}$ M-tól $8 \cdot 10^{-4}$ M-ig változott. A triton X-100-é pedig $2 \cdot 10^{-5}$ M-tól $8 \cdot 10^{-3}$ M-ig. Az albumin-triton X-100 mólaránya 1/10 volt minden esetben. Azért választottuk ezt az arányt, mert a triton X-100 $\varepsilon(\lambda)$ értékei kb. egy nagyságrenddel kisebbek, mint az albumin $\varepsilon(\lambda)$ értékei. Ezért a fenti arány esetén a komponensek abszorpció, ill. várhatólag a fluoreszcencia intenzitás értékei is jól összemérhetőek. A gerjesztő fény kb. 6 nm félérték szélességü 281 nm-s maximumú sáv volt. Ily módon jól mérhető fluoreszcencia intenzitásokat kaptunk. Mivel a gerjesztő fény meglehetősen széles sávval rendelkezett, ezért a (6) összefüggésben szereplő abszorpciós együtthatók helyett a gerjesztő fényre vonatkozó átlagos abszorpciós együtthatókkal számoltunk.

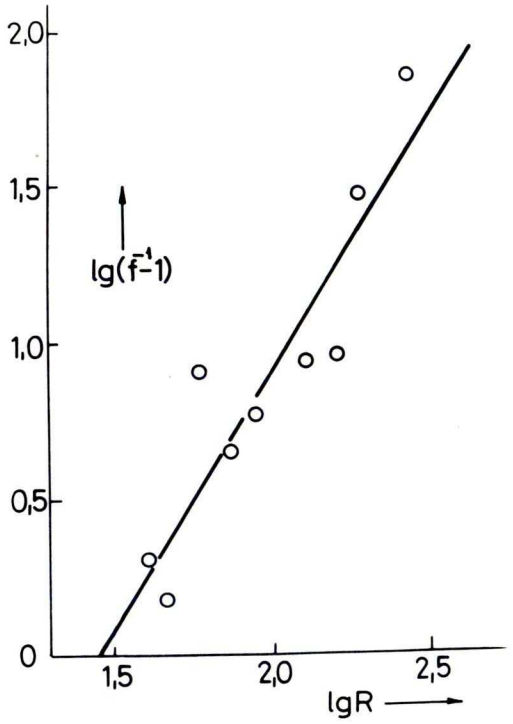
A III.táblázat tartalmazza az egyes komponens oldatok, ill. keverék oldatok abszorpciós együtthatóit 280 nm-nél és 305 nm-nél, valamint 305 nm-nél a reabszorpcióra korrigált fluoreszcencia intenzitásokat, és az egyes keverékeknél a (6) összefüggés alapján számitott $\underline{f}$ értékeket.

Az egyes keverék oldatok esetén kiszámolt $\lg(f^{-1} - 1)$ értékeket a lgR függvényében ábrázoltuk (22.ábra).

III. táblázat

Oldat	k(280)	k(305)	I(305)	f
$2 \cdot 10^{-6}$ M albumin	0,163	0,031	0,841	
$2 \cdot 10^{-5}$ M triton	0,059	0,006	2,578	0,0131
$2 \cdot 10^{-6}$ M albumin + $+2 \cdot 10^{-5}$ M triton	0,200	0,025	3,389	
$5 \cdot 10^{-6}$ M albumin	0,361	0,033	1,758	
$5 \cdot 10^{-5}$ M triton	0,135	0,010	6,256	0,0326
$5 \cdot 10^{-6}$ M albumin + $+5 \cdot 10^{-5}$ M triton	0,497	0,045	7,828	
$1 \cdot 10^{-5}$ M albumin	0,784	0,093	1,524	
$1 \cdot 10^{-4}$ M triton	0,267	0,006	4,416	0,1000
$1 \cdot 10^{-5}$ M albumin + $+1 \cdot 10^{-4}$ M triton	0,996	0,107	5,546	
$2 \cdot 10^{-5}$ M albumin	1,467	0,178	2,281	
$2 \cdot 10^{-4}$ M triton	0,554	0,011	6,903	0,1010
$2 \cdot 10^{-5}$ M albumin + $+2 \cdot 10^{-4}$ M triton	1,925	0,188	8,564	
$5 \cdot 10^{-5}$ M albumin	3,592	0,396	3,590	
$5 \cdot 10^{-4}$ M triton	1,545	0,024	8,629	0,1460
$5 \cdot 10^{-5}$ M albumin + $+5 \cdot 10^{-4}$ M triton	5,043	0,432	13,156	
$1 \cdot 10^{-4}$ M albumin	7,725	0,922	1,714	
$1 \cdot 10^{-3}$ M triton	3,214	0,035	5,095	0,1828
$1 \cdot 10^{-4}$ M albumin + $+1 \cdot 10^{-3}$ M triton	10,373	0,968	6,019	
$2 \cdot 10^{-4}$ M albumin	14,386	1,441	3,072	
$2 \cdot 10^{-3}$ M triton	6,654	0,064	11,169	0,1101
$2 \cdot 10^{-4}$ M albumin + $+2 \cdot 10^{-3}$ M triton	20,585	1,579	13,169	
$5 \cdot 10^{-4}$ M albumin	34,585	3,620	4,193	
$5 \cdot 10^{-3}$ M triton	17,121	0,291	16,641	0,4000
$5 \cdot 10^{-4}$ M albumin + $+5 \cdot 10^{-3}$ M triton	49,868	4,025	15,080	
$8 \cdot 10^{-4}$ M albumin	61,019	5,883	1,301	
$8 \cdot 10^{-3}$ M triton	27,401	0,271	6,114	0,3322
$8 \cdot 10^{-4}$ M albumin + $+8 \cdot 10^{-3}$ M triton	86,939	6,044	5,565	

Az R-t hasonló módon számoltuk ki,mint a lizozim+triton X-100 keverék oldatoknál.



22.ábra

A $\lg\left(f^{-1}-1\right)$ értékek által meghatározott egyenes meredeksége 1,7. Ez azt mutatja, hogy a két komponens nem egyszerüen keverék oldatot alkot, hanem bizonyos mértékü kötődés jön létre közöttük. Más irányú vizsgálatok szerint [59] az albumin molekulán 10 olyan hely van,ahol képes megkötni az albumin a triton X-100-t, abban az esetben, ha a triton koncentráció kisebb mint a c.m.c.

kétszerese és a triton/albumin mólaránya nagyobb mint kettő. F.A.GREEN [12] megállapitotta, hogy a triton/albumin mólarány 10, akkor egy albumin molekula kb. 5 triton X-100 molekulát képes megkötni. A különböző kötődési vizsgálatok szerint [12, 48, 59] a kötődés mértékét nem csak a két komponens mólaránya határozza meg, hanem a komponensek koncentrációi is. A 22.ábra szerint a koncentráció növelésével nő az $\underline{f}$ értéke, tehát feltételezhetjük, hogy egyre növekvő koncentráció esetén az albumin molekulák egyre több triton X-100 molekulát képesek megkötni és igy megnő az energiaátadás hatékonysága. Ily módon a szabad triton X-100 molekulák száma csökken és igy a c.m.c. nagyobb koncentrációk felé tolódik el, ugyanis a micellák csak akkor kezdenek kialakulni, amikor a szabad molekulák koncentrációja eléri a c.m.c -nek megfelelő értékeket.

Az albumin molekula (ha feltételezzük,hogy gömb alakú) sugara (kb. 34 Å) összemérhető a micellák sugarával (kb. 48 Å [48]) (ha feltételezzük, hogy a micella szintén gömb alakú). Igy nem valószinü, hogy ebben a rendszerben micella-albumin kölcsönhatás létre jön. Annak eldöntésére, hogy a c.m.c. feletti detergens koncentráció tartományban milyen a rendszer, még további vizsgálatok szükségesek.

Összefoglalás.

A fotoszintetizáló szervezetek tanulmányozása során gyakran kezelik a kloroplasztisz szuszpenziókat detergensekkel, hogy különböző pigment-fehérje komplexeketbtartalmazó frakciókat állitsanak elő. Ezideig keveset tudunk arról, hogy a detergensek hogyan befolyásolják az igy kapott komplexek tulajdonságait. E disszertációban a detergens--fehérje kölcsönhatás szisztematikus vizsgálatát tüztük ki.

A lizozim és triton X-100, valamint az albumin és triton X-100 keverék oldatokban megvizsgáltuk a triton X-100-ról történő elektron gerjesztési energia átadásának hatékonyságát az oldatok koncentrációjának függvényében.

Ehhez meg kellett határoznunk a triton X-100 fluoreszcencia spektrumát és abszolút kvantum hatásfokát,amelynek értéke 0,3 280 nm-s gerjesztő fény esetén. A koncentráció függvényében a triton X-100 fluoreszcencia spektrumának eloszlás görbéje változik: a kritikus micella koncentráció feletti koncentráció tartományban megjelenik egy új fluoreszkáló komponens 340 nm-nél,amelynek fluoreszcencia intenzitása növekszik a koncentráció növelésével.

Megállapitottuk,hogy a lizozim + triton X-100 rendszerben az energiaátadás hatékonysága a kritikus micella koncentráció alatti detergens koncentrációk esetén a

molekulák közötti távolság reciprokának hatodik hatványával arányos, mig a micellák megjelenése után gyakorlatilag állandó. Ez azt jelenti, hogy kis detergens koncentrációk esetén nincs kémiai kölcsönhatás a lizozim és a triton X-100 molekulák között, és a lizozim molekulák csak a micellákkal vannak kölcsönhatásban. Ezeket a megállapitásokat az enzimaktivitás méréseink is alátámasztják, amelyek szerint a kritikus micella koncentráció alatt a lizozim aktivitása nem változik a keverék oldatokban, de ha a micellák jelen vannak, akkor kb. 60 %-s emelkedést lehet tapasztalni. Ezt a növekedést még elősegithetí az is, hogy a micellák "fellazitják" a szubsztrát falában lévő kötéseket.

Az albumin + triton X-100 rendszerekben az energiaátadás hatékonysága az egész vizsgált koncentráció tartományban a molekulák közötti távolság reciprokának második hatványával arányos. Ez azt jelenti,hogy az albumin és a triton X-100 molekulák között kémiai kölcsönhatás lép fel.

Korábbi vizsgálatok szerint [12, 58, 59] ennek a kötődésnek a mértéke függ a két komponens mólarányától és koncentrációjától. Ezért rendszerünkben feltételezhetjük, hogy egyre növekvő koncentráció esetén az albumin molekulák egyre több triton X-100 molekulát kötnek meg. Igy a szabad triton X-100 molekulák száma csökken, ami

azt eredményezi, hogy a micellák száma is kevesebb lesz, és igy a kritikus micella koncentráció a nagyobb koncentrációk felé tolódik el. Az albumin molekula nagy méretét tekintve valószinü, hogy nincs micella-fehérje kölcsönhatás.

A két rendszerben kapott eredmények azt mutatják, hogy van kölcsönhatás a detergens és fehérje molekulák között. Ez a kölcsönhatás nyilván befolyásolhatja a kloroplasztisz frakciók egyes részecskéinek fluoreszcenciás és fotoszintetikus tulajdonságait.

Irodalom Jegyzék

1./ Ogawa,T., L.P.Vernon: BBA 180, 334 (1969)

2./ Vernon,L.P., E.R.Shaw, Ogawa,T., Raveed,D.: Photochem. Photobiol. 14, 343 (1971)

3./ Thomber,J.P., J.M.Olson: Photochem.Photobiol. 14, 329 (1971)

4./ Feher,G.: Photochem.Photobiol. 14, 373 (1971)

5./ Gratzer,W.B., Beaven,G.H.: J.Phys.Chem. 73, 2270 (1969)

6./ Farkas,G.: Növényi anyagcsereélettan; Akadémiai Kiadó Budapest (1968)

7./ Csatorday,K.: Az elektrongerjesztési energia vándorlása klorofill-a tartalmú setergens micellákban; Egyetemi doktori értekezés, Szeged (1974)

8./ Krasnovsky,A.A.: Biophys. J. 12, 749 (1972)

9./ Brashikov,B.J., Chibisov,A.K.: Biofizika 18, 747 (1973)

10./ Semichaevsky,V.D., Los,S.I., Lozovaya,G.I.: Biofizika 16, 1117 (1971)

11./ Massini,P., Voorn,G.: BBA 153, 589 (1968)

12./ Green,F.A.: J.Coll.Interf.Sci. 35, 481 (1971)

13./ Cowgill,R.W.: Arch.Biochem.Biophys. 104, 84 (1964)

14./ Bernath,F.R., Vieth,W.R.: Biotechnol.Bioeng. 14, 737 (1972)

15./ Tanford,C.: Adv.Prot.Chem. 23, 211 (1968)

16./ Bigelow,C.C., Sonenberg,M.: Biochemistry 1, 197 (1962)

17./ Jirgensons,B.: Arch.Biochem.Biophys. 94, 59 (1961)

18./ Jirgensons,B.: Arch.Biochem.Biophys. 96, 314 (1962)

19./ Jirgensons,B.: J.Biol.Chem. 242, 912 (1967)

20./ Jirgensons,B.: Optical Rotatory Dispersion of Proteins and Other Macromolecules; Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York (1969)

21./ Norio Murai, Shio Makino, Shintaro Sugai: J.Coll. Interf.Sci.: 41, 399 (1972)

22./ Non Ionic Surfactants,edited by Schick,J.M., Marcel Dekker, Inc., New York

23./ Reynolds,J.A., Herbert,S., Polet,H., Steinhardt,J.: Biochemistry 6, 937 (1967)

24./ Markus,G., Love,R.L., Wissler,F.C.: J.Biol.Chem. 234, 3687 (1964)

25./ Dowben,R.M., Koehler,W.R.: Arch.Biochem.Biophys. 93, 446 (1961)

26./ Tanford,C., Yasuhiko Nozaki, Reynolds,J.A., Shio Makino: Biochemistry 13, 2369 (1974)

27./ Decker,R.V., Foster,J.F.: Biochemistry 5, 1242 (1966)

28./ Glazer,A.N., Simmons,N.S.: J.Am.Chem.Soc. 87, 2287 (1965)

29./ The Enzymes,edited by Paul Boyer Vol. VII. Academic Press New York-London (1970)

30./ Green,F.A.: J.Coll.Interf.Sci. 41, 124 (1972)

31./ Förster,Th.: Fluoreszenz Organischer Verbindungen; Vandenhoeck und Ruprecht, Göttingen (1951)

32./ Budó,Á., Ketskeméty,I.: J.Chem.Phys. 25, 595 (1956)

33./ Várkonyi,Z., Szalay,L.: Acta.Phys.et Chem. Szeged 2o, 199 (1974)

34./ Dombi,J.: Lumineszkáló keverék oldatokban lejátszódó energia átadási folyamatokról; Kandidátusi értekezés, Szeged (1967)

35./ Kortüm,G.: Reflexionsspektroskopie; Springer-Verlag Berlin, Heidelberg New York (1969)

36./ Mátrai,T.: Gyakorlati Spektroszkópia; Müszaki Könyvkiadó, Budapest (1963)

37./ Strickler,S.J., Berg,R.A.: J.Chem.Phys. 37, 814 (1962)

38./ Steyer,L., Haugland,R.P.: Proc.Nat.Acad.Sci. US 58, 719 (1967)

39./ Bauer,R.K., Szalay,L., Tombácz,E.: Biophys.J. 12, 731 (1972)

4o./ Schugar,D.: BBA 8, 3o2 (1952)

41./ Phillips,D.C.: Proc.Roy.Soc. B. 167, 348 (1966)

42./ Imoto,T., Johnson,L.N., North,A.C.T., Phillips,D.C., Rupley,J.A.: The Enzymes, Vol. VII. 21. 665.

43./ Teale,F.W.J.: Biochem.J. 76, 381 (196o)

44./ Weber,G.: Nature 19o, 27 (1961)

45./ Lapetina,E.G., DeRobertis,E.: Life Science 7, 2o3 (1968)

46./ Sottysiak,D., Kanigua,Z.: Eur.J.Biochem. 14, 7o (197o)

47./ Haa pala,E.: Physol.Plant. 23, 187 (197o)

48./ Helenius,A., Simons,K.: BBA 415, 29 /1975)

49./ Dwiggins,C.W., Ir R.J.Bolen, Dunning,H.N.: J.Phys. Chem. 64, 1175 (196o)

5o./ Vozáry,E.: Különböző festék-detergens rendszerek optikai tulajdonságairól; Diplomamunka, Szeged (1973)

51./ Csernickij,E.A.: "Lumineszcencija i sztrukturnaja labilnoszty belkov v rasztvore i kletke" Nauka i technika, Minksz (1972)

52./ Konev,S.V.: Fluorescence and Phosphorescence of Proteins and Nucleic Acids; Plenum Press, New York (1967)

53./ Kabók,K.: Hőmérséklet hatása a fehérjék fluoreszcenciájára; Egyetemi doktori értekezés, Szeged (1974)

54./ Williams,J.W.: Ultracentrifugation of Macromolecules; Academic Press, New York and London (1972)

55./ Várkonyi,Z.: szóbeli közlés

56./ Chen,R.F., Vurek,G.G., Alexander,N.: Science 156, 949 (1967)

57./ Kronman,M.J., Holmes,L.G.: Photochem.Photobiol. 14, 113 (1971)

58./ Wolfram,E.: Kolloidika II/2; egyetemi jegyzet (197o)

59./ Sukov,W.W., Sondberg,H.E.: FEBS Letters 42, 36 (1974)

Tartalom

oldal

Bevezetés ..... 1.

1.§. Fehérje-detergens rendszereken végzett vizsgálatok kritikai összefoglalása..... 5.

2.§. A detergensek és a fehérjék kölcsönhatásának mechanizmusára irányuló magyarázatok ..... 13.

3.§. Kísérleti módszerek ..... 15.

3.1. Az abszorpciós spektrum meghatározása ..... 15.

3.2. A fluoreszcencia spektrum felvétele ..... 15.

3.3. A gerjesztési szinképek meghatározása ..... 17.

3.4. A fluoreszcencia abszolút kvantum hatásfokának meghatározása ..... 18.

3.5. Egyéb fluoreszcencia jellemzők meghatározása ..... 2o.

3.6. Az elektron gerjesztési energia vándorlása. 2o.

3.7. Az enzimaktivitás mérése ..... 23.

4.§. A vizsgált anyagok ..... 25.

5.§. A triton X-100 fényelnyelése és fluoreszcenciája ..... 27.

5.1. A triton X-100 fényelnyelése,kritikus micella koncentráció ..... 27.

5.2. A triton X-100 fluoreszcenciája ..... 3o.

6.§. A lizozim fényelnyelése és fluoreszcenciája... 34.

7.§. Az emberi szérum albumin fényelnyelése és fluoreszcenciája ..... 38.

oldal

8.§. A lizozim és triton X-100 keverék oldatok fényelnyelése és fluoreszcenciája ..... 42.

9.§. Az albumin és triton X-100 keverék oldatok fényelnyelése és fluoreszcenciája ..... 54.

Összefoglalás ..... 61.

Irodalom jegyzék ..... 64.

Ez a disszertáció a József Attila Tudományegyetem Biofizikai Tanszékén készült. Köszönetemet fejezem ki dr.Szalay László tanszékvezető egyetemi tanárnak, hogy lehetővé tette ehhez a munkához szükséges kisérletek elvégzését, valamint a munkám során felmerült problémák megoldását értékes tanácsokkal segitette.

Köszönettel tartozom dr.Várkonyi Zoltán adjunktusnak azért a sokoldalú és hasznos közvetlen segitségért,amelyet a vizsgálatok során felmerült problémák megoldásához nyújtott.

Köszönetemet fejezem ki dr.Ketskeméty István tanszékvezető egyetemi tanárnak, aki lehetővé tette a mérések egy részének elvégzését a Kisérleti Fizikai Tanszéken.

Köszönet illeti dr.Garay Andrást, az SzBK Biofizikai Intézetének igazgatóját, aki a mérések egy részének elvégzését lehetővé tette az SzBK-ban.

Köszönettel tartozom a technikai, illetve adminisztrációs munkatársaknak az értekezés formai kivitelezése alkalmával végzett gondos és lelkiismeretes munkájukért.