

УДК: 539.23, 621.372.8

PACS: 42.81.-i, 42.81.Pa

DOI: 10.24144/2415-8038.2018.44.75-81

I. I. Трикур, М. Ю. Січка, І. Й. Цьома, В. М. Різак

Ужгородський національний університет, 88000, Ужгород, вул. Волошина, 54

e-mail: ivan.trikur@uzhnu.edu.ua

ДОСЛІДЖЕННЯ ВПЛИВУ ДЕТЕРГЕНТУ ТРИТОН Х100 НА ВЛАСТИВОСТІ ПУРПУРНИХ МЕМБРАН

У роботі наведено аналіз літературних даних що стосуються впливу детергенту Тритон-Х100 на оптичні властивості пурпурних мембран та фотоцикл молекул бактеріородопсину. Запропоновано методику модифікації розмірів фрагментів пурпурних мембран за допомогою обробки детергентом та наступного їх центрифугування. За допомогою контролю спектральних характеристик суспензій пурпурних мембран, отриманих з додаванням різної кількості детергенту, та виготовлених на їх основі плівкових структур визначено оптимальні концентрації Тритону-Х100, які приводять до зменшення фрагментів пурпурних мембран при збереженні оптичних властивостей бактеріородопсину. Зменшення розмірів фрагментів пурпурних мембран підтверджено за допомогою атомно-силової мікроскопії.

Ключові слова: детергент, Тритон-Х100, пурпурні мембрани, бактеріородопсин, оптична мікроскопія, атомно-силова мікроскопія.

Вступ

Оптичні властивості плівок на базі бактеріородопсину (БР) дають можливість вирішення цілого ряду практичних завдань у галузі оптоелектроніки та біосенсорики [1]. Оптичний інтерфейс взаємодії передбачає жорсткі вимоги до оптичної якості таких структур. Один з методів покращення якості плівок - використання пурпурних мембран (ПМ) заданого розміру, отриманих за допомогою солюбілізації. Аналіз літературних даних показав, що для солюбілізації (ПМ) оптимальним варіантом є детергент Тритон-Х100 (ТХ100). Використання даної речовини дозволяє зберегти функціональність БР і в той же час отримати ПМ меншого розміру. Різні автори приводять різні методики проведення солюбілізації за допомогою ТХ100 [2-7]. Змінюватися можуть співвідношення БР/ТХ100, температури та часи проведення процесу, рН використовуваних буферних розчинів.

Переважає більшість характеристик БР суттєво не відрізняється від своїх значень у ПМ [2, 3, 6]. Так світлова адаптація спостерігається як у нативному

так і в мономерному стані [2, 3]. Оцінка проценту α -спіральності на основі спектрів кругового дихроїзму (КД) для БР у мономерному стані дає значення 70 % [3, 6] і 72 % [2]. Для ПМ розрахунки за допомогою спектрів КД з урахування розсіювання дають значення 73 % [8], а розрахунки на основі електронно-дифракційних досліджень дають інтервал 70-80 % [9]. Отже процес солюбілізації суттєво не впливає на вторинну структуру БР. Автори [6] також відмічають відсутність суттєвих структурних змін, а також збереження функціональної активності БР у солюбілізованому стані. Процес солюбілізації не супроводжується появою смуги поглинання на 380 нм, що свідчило б про втрату хромофора [2, 3]. Однак перехід до мономерної форми не може взагалі не вплинути на властивості БР. Для мономерного БР характерно зміщення у синю область максимуму поглинання та зменшення коефіцієнта екстинкції [3]. В різних роботах [2-4] величина зсуву та значення максимумів поглинання трохи відрізняються, однак всі фіксують його наявність. Також цікавим є зменшення активності смуги на 318 нм

спектра КД, яка теж змінюється аналогічно до солюбілізаційної кривої [2]. Оскільки дана смуга виникає в результаті взаємодії ретиналь-білок [10], останній факт свідчить про вплив солюбілізації на дану взаємодію.

Вплив концентрації детергенту на степінь та проходження солюбілізації досліджувався авторами [4]. Суттєві зміни відносного поглинання спостерігалися лише в області низьких концентрацій TX100. При досягненні концентрації близько 4 мМ відносне поглинання досягає свого максимального значення близько 0,8. При таких концентраціях не спостерігається осаду при центрифугуванні. Дослідження за допомогою спектрів КД теж підтвердили проходження солюбілізації. При подальшому збільшенні концентрації детергенту, спостерігався незначний спад величини відносного поглинання до 0,75 і потім ця величина залишалася незмінною аж до 200 мМ. Якщо видалити детергент або зменшити його концентрацію спостерігається процес об'єднання молекул з утворенням великих мембранних фрагментів з гексагональною структурою. У процесі самозбірки фрагментів мембрани максимум поглинання знову повертається на 568 нм і інші характеристики набувають своїх вихідних значень [2, 3]. Лише швидкість формування M_{412} залишається більшою за вихідну величину [2].

Солюбілізований БР залишається стабільним на протязі декількох днів, при зберіганні у затемненому приміщенні, і протягом цього часу не спостерігалось ніяких доказів втрати ретиналю [2, 3]. Дослідження температурної стабільності солюбілізованого БР в діапазоні 35-55 °С [4] показало що при концентрації 5 мМ TX100 і температурі до 45 °С у темноті ніяких змін спектру не спостерігається. Однак при вмиканні зовнішнього освітлення реєструється чітке, хоча й повільне, фотовицвітання БР без відновлення спектру навіть при затемненні зразка. Однак вже при 50 °С спостерігалось повільне термовицвітання БР, при чому відновлення спектру не спостерігалось навіть після охолодження зразків. Оскільки у нативному стані БР термостабільний до

70 °С, ми бачимо, що навіть при відсутності освітлення солюбілізація значно дестабілізує БР.

Залежність фотовицвітання від концентрації TX100 досліджували при температурі 35 °С. Константа швидкості фотовицвітання збільшується при зростанні концентрації TX100 до 50 мМ, після чого виходить у насичення при значенні порядку $0,0013 \text{ c}^{-1}$

Зсув максимуму поглинання, який спостерігається при солюбілізації, скоріше за все зумовлений зміною локальної структури навколо Шифової основи, оскільки дослідження не виявили значного впливу солюбілізації на цис-транс ізомеризаційну рівновагу [5]. Хоча у спектрі й присутні зміни, позитивна смуга у спектрі КД, яка відображає локальну хіральну структуру оточення хромофора і висока стабільність БР у темноті дозволяє припустити, що TX100 приводить лише до незначних структурних змін у БР порівняно з іншими детергентами, наприклад октил- β -D-глюкозидом [4]. В той же час температурна межа стабільності мономерного БР на 20 °С нижча ніж у ПМ, що доводить важливість білок-білкової взаємодії молекул БР у ПМ для його структурної стабільності.

Стабільність мономерного БР при наявності освітлення значно менша ніж у темно-адаптованому стані. Значне неререверсивне фотовицвітання фіксується вже при 25 °С [4]. У попередніх роботах [2, 11] не відмічалось даного ефекту при використанні TX100 в якості детергенту. Це зумовлено скоріш за все тим, що частота вицвітання солюбілізованого БР становить $3,94 \times 10^{-3} \%$ за цикл при 35 °С. Тому необхідно опромінювати зразок не менше години щоб можна було зареєструвати зміни у поглинанні при кімнатній температурі.

Дослідження розмірів і агрегаційного числа міцел TX100 в залежності від концентрації показало що обидва ці параметри зростають при збільшенні концентрації, досягають максимальних значень при 50 мМ, після чого виходять на насичення і далі вже не змінюються. Дана залежність дуже нагадує залежність

константи швидкості фотовицвітання від концентрації TX100. Це дозволило зробити припущення, що зростання швидкості фотовицвітання при збільшенні концентрації TX100 нижче 50 мМ спричинене покращенням динаміки флуктуацій БР-TX100 комплексу при збільшенні розміру міцели TX100 [4]. В роботі [7] приведено кількість молекул TX100, що припадає на молекулу БР у солубілізованому стані. Це число коливається від 60 до 68 молекул детергенту на одну молекулу БР.

Дослідження фотоциклу показало що формування M_{412} у мономерному БР відбувається приблизно в три рази швидше порівняно з БР у пурпурних мембранах [2, 3]. В той же час напівперіод життя інтермедиату M_{412} не змінюється.

Методика підготовки зразків.

Оскільки нас цікавить не повна солубілізація БР, а зменшення розмірів фрагментів ПМ, ми використовували дещо модифіковану методику, описану в [4]. Суспензію ПМ розводили у 5 мМ Tris-HCl буферному розчині (рН = 7.0), до концентрації приблизно 10 μ М. До отриманого розчину в темноті додавали TX100 з концентрацією від 1 до 4 мМ, витримували протягом 2 годин при температурі 35°C і після цього центрифугували при 105000g протягом 60 хвилин при 4°C. Як показали дослідження авторів [4] при даних умовах і концентрації TX100 4 мМ досягається повна солубілізація ПМ і перехід БР у мономерний стан. Ефективність солубілізації контролювали за допомогою визначення співвідношення максимуму пропускання отриманого надосадового розчину та значення максимуму поглинання на 568 нм у нативних ПМ. Солубілізований БР знаходиться у надосадовому розчині. Солубілізація суттєво погіршує стабільність БР та циклічність процесів, які відбуваються під час проходження фотоциклу. Оскільки нас цікавлять матеріали на основі БР з стабільними в часі характеристиками та високою реверсивністю, ми не можемо використовувати БР солубілізований до

мономерного стану. Фрагменти ПМ, які не піддалися повній солубілізації, осаджуються на дно при центрифугуванні. Осаджені фрагменти розводили в 5 мл дистильованої води і використовувалися для всіх подальших досліджень.

Результати досліджень та обговорення.

На рис. 1 наведено спектри надосадової рідини та розведеного у воді осаду, отриманого після центрифугування суспензії ПМ з додаванням різної кількості TX100.

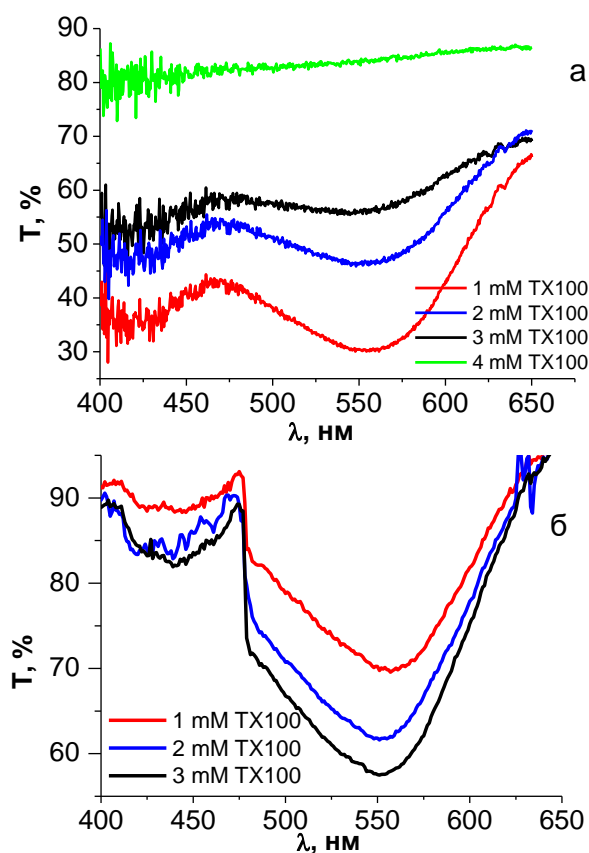


Рис. 1. Спектри пропускання суспензії ПМ з різними концентраціями TX100, отриманої при розведенні осаду (а) та надосадової рідини (б)

Як видно з результатів, збільшення концентрації детергенту приводить до зростання поглинання на 570 нм у надосадовій рідині та збільшення пропускання у суспензії отриманій з осаду. Тобто при зростанні концентрації TX100 зростає кількість молекул БР які відокремлюються від ПМ і переходять у мономерний стан. Про це також свідчить візуально спостережуване зменшення кількості осаджених ПМ при зростанні

концентрації детергенту. При досягненні концентрації 4 мМ, смуга БР у суспензії отриманій з осаду зникає. Це свідчить про проходження повної солюбілізації БР і узгоджується з результатами отриманими у [4].

Якщо після додавання детергенту не проводити розділення за допомогою центрифугування, солюбілізований БР поступово втрачає свої властивості, що відбивається на спектральних характеристиках суспензії. На рис. 2 наведено зміни спектру оптичної густини суспензії ПМ з додаванням 2 мМ Тритону X100 протягом декількох днів.

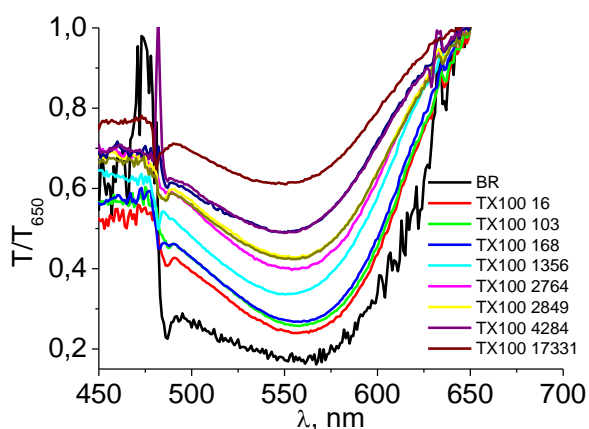


Рис. 2. Спектри пропускання суспензії БР з добавкою TX100, приведені до пропускання на 650 нм.

Як видно з графіків, на початковому етапі спостерігається незначний зсув максимуму поглинання у синю область з 560 нм до 553 нм. Він може бути пояснений впливом детергенту на зв'язок ретиналю з бактеріоопсином. Також спостерігається поступове зменшення поглинання на 570 нм. Воно відбувається через те, що у молекулах БР, які перебувають у мономерному стані, під дією температури та освітлення відбуваються незворотні процеси пов'язані, скоріше за все з втратою ретиналю. Слід відмітити, що зразки зберігалися у затемненому стані, а мінімальне освітлення відбувалося лише у процесі зняття спектрів пропускання.

На основі таких суспензій було виготовлено ряд плівок з різними концентраціями TX100. Результати дослідження спектрів таких плівок приведені на рис. 3.

Плівки з високими концентраціями детергенту повністю прозорі. При низьких концентраціях плівки мають пурпурове забарвлення різної інтенсивності. Як видно з рис. 3, збільшення концентрації детергенту у плівці приводить до зменшення максимуму поглинання на 570 нм, що свідчить про зменшення кількості активних молекул БР, і загальне зростання пропускання на всіх довжинах хвиль, що свідчить про зростання оптичної однорідності та зменшення розсіювання у плівках.

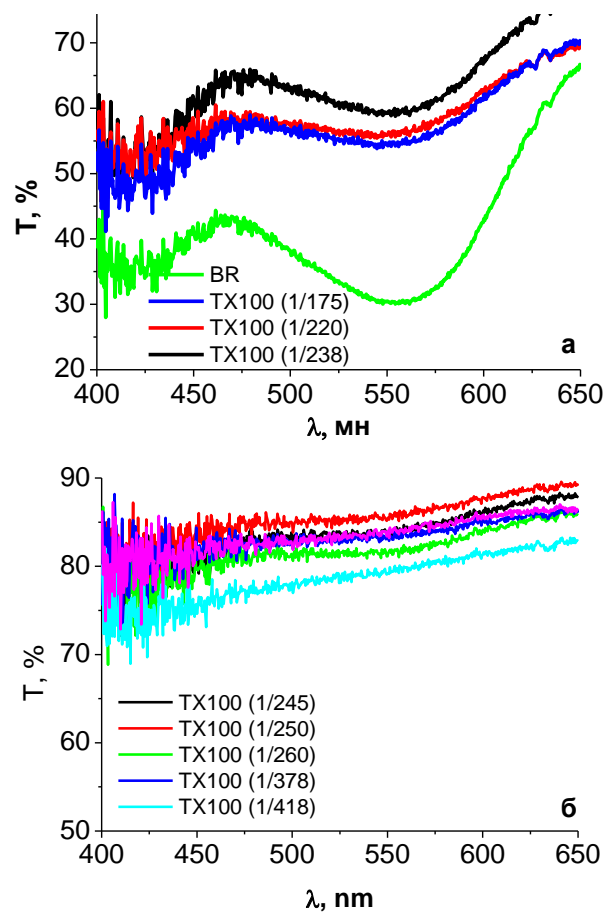


Рис. 3. Спектри пропускання забарвлених (а) та прозорих (б) плівок на основі суспензії БР з різними співвідношенням кількості молекул TX100 на одну молекулу БР.

Дослідження зразків БР, які піддавалися обробці детергентом за допомогою атомно-силової мікроскопії, свідчить про зменшення середнього розміру фрагментів ПМ.

Як видно з рис. 4. у необроблених зразках присутні фрагменти ПМ з розмірами до 5 мікрометрів, в той час як максимальний розмір фрагменту ПМ у

оброблених зразках знаходиться в межах 1 мкм.

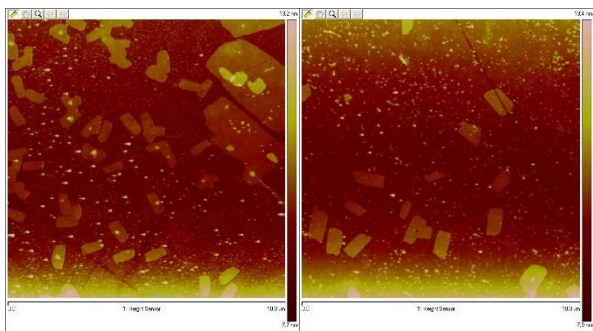


Рис. 4. Зображення фрагменту плівки БР до обробки детергентом (а) та після (б) отримане за допомогою АСМ. Розмір 10×10 мкм.

Дослідження шорсткості плівок отриманих з використанням ПМ оброблених детергентом показало, що при збільшенні концентрації TX100, шорсткість плівки зменшується.

Як видно з отриманих результатів, використання детергентів дозволяє впливати на розмір фрагментів ПМ і таким чином підвищувати оптичну якість плівок на основі БР. Суттєвим недоліком даного методу є досить висока втрата матеріалу у процесі обробки детергентом. Внаслідок повної солюбілізації частка БР в якому

відбуваються незворотні втрати може бути більше 50 %.

Висновки

В результаті дослідження спектральних характеристик суспензій та плівок БР з додаванням детергенту TX100 встановлено, що високі концентрації (>4 мМ) останнього приводять до руйнування структури ПМ і незворотних змін у структурі БР під дією оптичного випромінювання. В той же час при менших концентраціях спостерігається часткова солюбілізація при якій відбувається зменшення розмірів ПМ і значна частина молекул БР зберігає свої оптичні властивості. Дослідження за допомогою АСМ фрагментів ПМ оброблених детергентом TX100 з концентрацією 2,5 мМ показало, що великі фрагменти розбиваються до розмірів близько 1 мкм. Використання детергентів дозволяє впливати на розмір фрагментів ПМ і таким чином підвищувати оптичну якість плівок на основі БР. Недоліком даного методу є втрата матеріалу у процесі обробки детергентом внаслідок повної солюбілізації частини ПМ.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Hampp N. Bacteriorhodopsin as a Photochromic Retinal Protein for Optical Memories / N. Hampp // Chem Rev. - 2000. - Vol. 100. - P. 1755-1776.
2. Dencher N. A. Formation and Properties of Bacteriorhodopsin Monomers in the Non-ionic Detergents Octyl- β -D-Glucoside and Triton X-100 / N. A. Dencher, M. P. Heyn // FEBS LETTERS. - 1978. - Vol. 96. - № 2. - P. 322-326.
3. Dencher N. A. Preparation and properties of monomeric bacteriorhodopsin / N. A. Dencher, Heyn M. P. // Methods in Enzymology. - 1982. - Vol. 88. - P. 18-24.
4. Photobleaching of Bacteriorhodopsin Solubilized with Triton X-100 / T. Sasaki, M. Sonoyamat, M. Dernura, S. Mitaku // Photochemistry and Photobiology. - 2005. - Vol. 81. - P. 1131-1137
5. Rehorek M. Binding of all-trans-retinal to the purple membranes. Evidence for cooperativity and determination of the extinction coefficient / M. Rehorek, M. P. Heyn // Biochemistry. - 1979. - Vol. 18. - P. 4977-4983
6. Reynolds J. A. Molecular weight of bacteriorhodopsin solubilized in Triton X-100 / J. A. Reynolds, W. Stoeckenius // Proc. Natl. Acad. Sci. - 1977. - Vol. 74. - №7. - P. 2803-2804.
7. Meyer O. Solubilization steps of dark-adapted purple membrane by Triton X-100 / O. Meyer, M. Ollivon, M. T. Taternostre // Federation of European Biochemical Societies. - 1992. - Vol. 305. - P. 249-253.
8. Long M. M. Circular dichroism of biological membranes: purple membrane of Halobacterium halobium / M. M. Long,

- D. W. Urry, W. Stoeckenius // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* - 1977. - Vol. 75. - P. 725-731.
9. Henderson R. Three-dimensional model of purple membrane obtained by electron microscopy / R. Henderson, P. N. T. Unwin // *Nature.* - 1975. - Vol. 257. - P. 28-32.
10. Becher B. Effects of Light Adaptation on the Purple Membrane Structure of *Halobacterium Halobium* / B. Becher, J. Y. Cassim // *Biophys. J.* - 1976. - Vol. 16. - №10. - P. 1183-1200.
11. Comparison of the dynamics of the primary events of bacteriorhodopsin in its trimeric and monomeric states. / J.-P. Wang, S. Link, C. D. Heyes, M. A. El-Sayed // *Biophys. J.* - 2002. - Vol. 83. - P. 1557-1566.

Стаття надійшла до редакції 17.11.2018.

И. И. Трикур, М. Ю. Сичка, И. И. Цьома, В. М. Ризак
Ужгородский национальный университет, 88000, Ужгород, ул. Волошина, 54

ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ ДЕТЕРГЕНТА ТРИТОН X100 НА СВОЙСТВА ПУРПУРНЫХ МЕМБРАН

В работе приведен анализ известных литературных данных касающихся влияния детергента Тритон-X100 на оптические свойства пурпурных мембран и фотоцикл молекул бактериородопсина. Предложена методика модификации размеров фрагментов пурпурных мембран с помощью обработки детергентом Тритона-X100 и последующего их центрифугирования. С помощью контроля спектральных характеристик суспензий пурпурных мембран, полученных добавлением разного количества детергента, и изготовленных на их основе пленочных структур, определены оптимальные концентрации Тритона-X100, которые приводят к уменьшению фрагментов пурпурных мембран при сохранении оптических свойств бактериородопсином. Уменьшение размеров фрагментов пурпурных мембран подтверждено с помощью атомно-силовой микроскопии.

Ключевые слова: детергент, Тритон-X100, пурпурные мембраны, бактериородопсин, оптическая микроскопия, атомно-силовая микроскопия.

I. I. Trykur, M. Y. Sichka, I. Y. Tsoma, V. M. Rizak
Uzhhorod National University, 88000, Uzhhorod, Voloshin Str., 54

STUDY OF THE DETERGENT TRITON X100 EFFECT ON THE PROPERTIES OF PURPLE MEMBRANES

The paper analyzes the literature data concerning the influence of the Triton-X100 detergent on the optical properties of purple membranes and the photocycle of bacteriorhodopsin molecules. The method of changing the sizes of purple membranes fragments by means of treating them with a detergent and subsequent centrifugation is proposed. The control of the detergent effect on the properties of purple membranes was carried out using spectral analysis and AFM microscopy.

As a result of the spectral characteristics investigation of bacteriorhodopsin suspensions and films with the addition of Triton-X100, it was found that high concentrations (>4 mM) of detergent cause the destruction of purple membranes and

irreversible changes in the structure of bacteriorhodopsin under the influence of temperature and optical radiation. At the same time, at lower concentrations partial solubilisation is observed in which there is a decrease in the size of purple membranes and a significant part of the bacteriorhodopsin molecules retains its unique optical properties. The atomic force microscopy study of fragments of purple membranes treated with detergent Triton-X100 with a concentration of 2.5 mM showed that large fragments are divided into smaller ones, the dimensions of which make up about 1 μm . The use of detergents can influence the size of fragments of purple membranes and thus increase the optical quality of film structures based on bacteriorhodopsin. The disadvantage of this method is the loss of material in the process of detergent treatment due to the complete solubilization of a large part of the purple membranes.

Keywords: detergent, Triton-X100, purple membranes, bacteriorhodopsin, optical microscopy, atomic force microscopy.

PACS NUMBER: 42.81.-i, 42.81.Pa

REFERENCES

1. Hampp, N. (2000) "Bacteriorhodopsin as a Photochromic Retinal Protein for Optical Memories" *Chem Rev.*, Vol. 100, pp. 1755-1776.
2. Dencher, N. A., Heyn, M. P. (1978) "Formation and Properties of Bacteriorhodopsin Monomers in the Non-ionic Detergents Octyl- β -D-Glucoside and Triton X-100", *FEBS LETTERS*, Vol. 96, № 2, pp. 322-326.
3. Dencher, N. A., Heyn, M. P. (1982) "Preparation and properties of monomeric bacteriorhodopsin", *Methods in Enzymology*, Vol. 88, pp. 18-24.
4. Sasaki, T., Sonoyamat, M., Dernura, M., Mitaku, S. (2005) "Photobleaching of Bacteriorhodopsin Solubilized with Triton X-100", *Photochemistry and Photobiology*, Vol. 81, pp. 1131-1137
5. Rehorek, M., Heyn, M. P. (1979) "Binding of all-trans-retinal to the purple membranes. Evidence for cooperativity and determination of the extinction coefficient" *Biochemistry*, Vol. 18, pp. 4977-4983
6. Reynolds, J. A., Stoeckenius, W. (1977) "Molecular weight of bacteriorhodopsin solubilized in Triton X-100", *Proc. Natl. Acad. Sci.*, Vol. 74, №7, pp. 2803-2804.
7. Meyer, O., Ollivon, M., Taternostre, M. T. (1992) "Solubilization steps of dark-adapted purple membrane by Triton X-100", *Federation of European Biochemical Societies*, Vol. 305, pp. 249-253.
8. Long, M. M., Urry, D. W., Stoeckenius, W. (1977) "Circular dichroism of biological membranes: purple membrane of *Halobacterium halobium*", *Biochem. Biophys. Res. Commun*, Vol. 75, pp. 725-731.
9. Henderson, R., Unwin, P. N. T. (1975) "Three-dimensional model of purple membrane obtained by electron microscopy", *Nature*, Vol. 257, pp. 28-32.
10. Becher, B., Cassim, J. Y. (1976) "Effects of Light Adaptation on the Purple Membrane Structure of *Halobacterium Halobium*", *Biophys. J.*, Vol. 16, №10, pp. 1183-1200.
11. Wang, J.-P., Link, S., Heyes, C. D., El-Sayed, M. A. (2002) "Comparison of the dynamics of the primary events of bacteriorhodopsin in its trimeric and monomeric states", *Biophys. J.*, Vol. 83, pp. 1557-1566.