

СХОДСТВО СПЕКТРАЛЬНЫХ КОМПОНЕНТ С ИНДИВИДУАЛЬНЫМ ВРЕМЕНЕМ ЖИЗНИ ДЛЯ ТРИПТОФАНОВОЙ ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ БЕЛКОВ РАЗНОЙ СЛОЖНОСТИ

© 2016 г. Е.В. Немцева* **, О.О. Лашук*, М.А. Герасимова*

*Сибирский федеральный университет, 660041, Красноярск, пр. Свободный, 79;

**Институт биофизики СО РАН, 660036, Красноярск, Академгородок, 50/50

E-mail: enemtseva@sfu-kras.ru

Поступила в редакцию 02.11.15 г.

Представлены результаты анализа времен жизни триптофановой флуоресценции трех белков: сывороточного альбумина человека, бычьего сывороточного альбумина и бактериальной люциферазы, содержащих один, два и семь триптофанов соответственно. Показано, что флуоресценция всех исследованных белков характеризуется тремя временами жизни: $\tau_1 = 6\text{--}7$ нс, $\tau_2 = 2,0\text{--}2,3$ нс и $\tau_3 \leq 0,1$ нс (нативное состояние) и $\tau_1 = 4,4\text{--}4,6$ нс, $\tau_2 = 1,7\text{--}1,8$ нс и $\tau_3 \leq 0,1$ нс (денатурированное состояние). Установлено, что спектральные контуры компонент с индивидуальным временем жизни флуоресценции белков близки по положению максимума и полуширине спектра как в случае нативной конформации ($\lambda_{\max}^{\tau_1} = 342$ нм, $\lambda_{\max}^{\tau_2} = 328$ нм и $\lambda_{\max}^{\tau_3} = 315$ нм), так и в случае денатурированной конформации ($\lambda_{\max}^{\tau_1} = 350$ нм, $\lambda_{\max}^{\tau_2} = 343$ нм и $\lambda_{\max}^{\tau_3} = 317$ нм). При этом различия в стационарных спектрах белков обусловлены индивидуальным соотношением вкладов временных компонент. Проведено соотнесение спектральных временных компонент с известной классификацией триптофановых остатков в составе исследованных белков в рамках модели дискретных состояний.

Ключевые слова: третичная структура белков, время жизни флуоресценции, триптофан, денатурация, диэлектрическая релаксация.

Метод собственной люминесценции белков является мощным инструментом для изучения их структуры и динамики, позволяющим получать информацию о механизмах сложной и тонкой регуляции различных биохимических процессов [1,2]. Наиболее часто в качестве внутреннего люминесцентного зонда белков используют остатки триптофана, обладающие, по сравнению с другими флуорофорами белка, высокой чувствительностью к изменениям своего микроокружения [1,3]. Однако разнообразие физических механизмов, определяющих изменение спектральных характеристик триптофана, затрудняет однозначную интерпретацию результатов люминесцентного анализа, особенно в случае многотриптофановых белков.

Идентификацию отдельных компонент в стационарных спектрах флуоресценции сложных белков часто проводят используя модель

дискретных состояний остатков триптофана в белках, выдвинутую Э.А. Бурштейном с соавторами [4–7]. Статистический анализ положения и формы спектров триптофановой люминесценции большого числа белков в различных условиях, соотнесение этих данных с такими структурными параметрами, как полярность и подвижность микроокружения, позволили авторам определить пять наиболее вероятных спектральных форм триптофанов в составе белков. Дополнительным инструментом для анализа структурных изменений в разных доменах белковой глобулы могла бы стать время-разрешенная спектроскопия. Однако интерпретация наносекундной кинетики флуоресценции белков оказалась сложной задачей, поскольку обнаружилось, что флуоресценция триптофана не может быть охарактеризована единственным временем жизни даже в простейших случаях – в растворе и в составе одготриптофановых белков [2]. В качестве причины мультимодальности затухания флуоресценции указывают конформационную гетерогенность триптофановых ос-

Сокращения: HSA – сывороточный альбумин человека, BSA – бычий сывороточный альбумин, BL – бактериальная люцифераза.

татков, различия в их взаимодействии с микроокружением, а также реакции в возбужденном состоянии (в том числе дипольная релаксация и образование эксиплексов) и некоторые другие [8–12].

Последнее время, в условиях значительного усовершенствования регистрирующей техники, интерес к проблеме гетерогенности времен жизни триптофанов в составе белков снова возрос. Но большинство авторов анализирует величины времен жизни флуоресценции белков и их вкладов на фиксированной длине волны испускания и, как нам кажется, не уделяет должного внимания спектральному распределению, соответствующему каждой временной компоненте [13–15]. В данной работе проведен анализ изменения времен жизни и спектров флуоресценции, соответствующих временным компонентам, для белков разной сложности при изменении их конформационного состояния.

В качестве объектов исследования были выбраны многотриптофановый белок бактериальная люцифераза (BL) и два хорошо изученных модельных белка – сывороточный альбумин человека (HSA) и бычий сывороточный альбумин (BSA).

В составе HSA содержится один триптофановый остаток (Trp214), находящийся в гидрофобном окружении [16]. Структура BSA содержит два триптофановых остатка – Trp212 и Trp134. Первый из них находится в условиях, аналогичных триптофану HSA, в то время как Trp134 расположен в гидрофильном окружении вблизи поверхности белка [16]. Люцифераза бактерий *Photobacterium leiognathi* является $\alpha\beta$ -гетеродимером и включает семь триптофановых остатков, два из которых сходны по микроокружению с остатками триптофана в составе BSA [17]. Интерес к структурной динамике бактериальной люциферазы связан как с уникальностью выполняемой ею функции (катализ реакции с испусканием кванта света), так и с развитием многочисленных аналитических методов на основе реакции с участием BL [18]. Таким образом, конечной целью данной работы было получение спектрально-люминесцентных характеристик отдельных групп триптофановых остатков в составе бактериальной люциферазы, опираясь на известные характеристики модельных белков.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Использовали лиофилизированные препараты белков HSA и BSA (Sigma, США) и люциферазы бактерий *Photobacterium leiognathi* (Институт биофизики СО РАН, Россия). Исследовали растворы белков в фосфатном буфере (0,05 М, рН 6,9). Концентрацию белков определяли спектрофотометрически с использованием молярных

коэффициентов экстинкции при длине волны 280 нм 35340 М⁻¹см⁻¹, 43380 М⁻¹см⁻¹, 80000 М⁻¹см⁻¹ для HSA, BSA и BL соответственно. В качестве денатурирующего агента использовали гуанидингидрохлорид (Gerbu, Германия) с конечной концентрацией в кювете 3,0 М.

Спектры поглощения были измерены с помощью двухлучевого спектрофотометра Lambda 35 (Perkin Elmer, США). Для регистрации флуоресценции белков при стационарном и импульсном возбуждении использовали спектрофлуориметр Fluorolog 3–22 (Horiba Jobin Yvon, США), оснащенный приставкой для измерения спада интенсивности флуоресценции методом счета фотонов с временной корреляцией. Стационарные спектры регистрировали при возбуждении ксеноновой лампой (длина волны 295 нм). Разрешенные во времени спады флуоресценции регистрировали при возбуждении импульсным диодом NanoLED с максимумом длины волны излучения 296 нм и длительностью импульса 1,2 нс. Спады интенсивности флуоресценции снимали в диапазоне 305–410 нм с шагом 5 нм, разрешение составляло 7 пс/канал. Времена жизни выделяли с помощью метода деконволюции [19], для восстановления формы возбуждающего сигнала использовали высококоллоидное соединение Ludox.

Все эксперименты проводили при фиксированной температуре 25°C.

Спектры флуоресценции были скорректированы с учетом эффекта внутреннего фильтра и фона растворителя.

Наборы кривых спада флуоресценции каждого образца при регистрации в диапазоне 305–410 нм были проанализированы методами глобального анализа [20]. Качество описания оценивалось по статистическим критериям – взвешенным остаткам и χ^2 .

Спад интенсивности флуоресценции во времени описывали как сумму экспонент:

$$I(t) = \sum_i \alpha_i \exp(-t/\tau_i), \quad (1)$$

где τ_i – время жизни, α_i – амплитудный коэффициент i -й компоненты.

Вклад каждой временной компоненты в общее время жизни определяли с помощью следующего выражения:

$$f_i = \frac{\alpha_i \tau_i}{\sum \alpha_i \tau_i}. \quad (2)$$

Спектры, ассоциированные с временами жизни, $I(\lambda, \tau_i)$, рассчитывали по следующей формуле:

$$I(\lambda, \tau_i) = I_{ss}(\lambda) f_i(\lambda), \quad (3)$$

Таблица 1. Времена жизни флуоресценции белков (τ_i) и их спектральные вклады в суммарный спектр белка (f_i)

Белок	τ_1 , нс	f_1	τ_2 , нс	f_2	τ_3 , нс	f_3	χ^2	Количество триптофанов
Нативное состояние								
HSA	6,99	0,67	2,31	0,30	~ 0,11	0,03	1,12	1
BSA	6,37	0,79	2,30	0,19	~ 0,16	0,02	1,07	2
BL	6,03	0,52	1,99	0,46	~ 0,05	0,05	1,19	7
Денатурированное состояние								
HSA	4,60	0,43	1,77	0,51	~ 0,09	0,07	1,05	1
BSA	4,41	0,41	1,76	0,54	~ 0,12	0,06	1,12	2
BL	4,40	0,36	1,68	0,59	~ 0,09	0,05	1,08	7
Нативное состояние + акриламид (0,6 М)								
HSA	5,65	0,5	1,61	0,38	0,42	0,16	1,07	1
BSA	4,97	0,514	2,01	0,44	0,87	0,05	1,043	2
BL	4,03	0,345	1,47	0,56	0,3	0,1	1,05	7
Денатурированное состояние + акриламид (0,6 М)								
HSA	4,24	0,1	1,11	0,77	~ 0,03	0,13	1,19	1
BSA	4,08	0,07	1,13	0,81	~ 0,02	0,12	1,17	2
BL	5,51	0,02	0,99	0,85	~ 0,02	0,13	1,21	7

где $I_{ss}(\lambda)$ – стационарный спектр флуоресценции, $f_i(\lambda)$ – вклад i -й компоненты времени жизни на длине волны λ .

Анализ и обработку результатов проводили с применением прикладных программ Microsoft Excel и Microcal Origin Pro 8.1.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Были измерены кривые затухания собственной флуоресценции трех белков: сывороточного альбумина человека, бычьего сывороточного альбумина и бактериальной люциферазы, содержащих в составе один, два и семь триптофановых остатков соответственно. Анализ этих данных показал, что во всех случаях (независимо от длины волны регистрации, конформационного состояния белка, количества триптофановых остатков) затухание носит не моноэкспоненциальный характер и требует описания суммой не менее трех экспонент. Таким образом, для всех образцов были определены три времени жизни флуоресценции. Глобальный анализ кривых затухания при разных длинах волн испускания в диапазоне 305–410 нм позволил не только рассчитать времена жизни флуоресценции (табл. 1), но и получить индивидуальные спектры испускания, характеризующиеся определенным временем жизни (рис. 1).

Из табл. 1 и рис. 1 видны следующие закономерности:

– флуоресценция всех трех белков в нативном состоянии характеризуется сходным набором

времен жизни: длинным τ_1 (6,03–6,99 нс), средним τ_2 (1,99–2,31 нс) и коротким τ_3 ($\leq 0,16$ нс);

– вклад компоненты τ_3 в суммарный спектр мал как для нативных, так и для денатурированных белков ($\leq 9\%$);

– вклад τ_1 в суммарный спектр нативных альбуминов превышает вклад τ_2 более чем в два раза; в спектре бактериальной люциферазы вклад данных компонент приблизительно равный.

Следует отметить, что используемая в данной работе экспериментальная установка не позволяет с достаточной точностью анализировать времена жизни в пикосекундном диапазоне. Мы можем только констатировать факт наличия таких компонент, но не обсуждать обоснованно их изменение под действием различных факторов. Поэтому при дальнейшем изложении материала основное внимание будет уделено компонентам с длинным (τ_1) и средним (τ_2) временем жизни.

Данные, полученные после денатурации белков гуанидингидрохлоридом, приведены на рис. 2. Видно, что денатурация приводит к уменьшению как длинного (до 4,4–4,6 нс), так и среднего (до 1,68–1,77 нс) времен жизни флуоресценции; вклады этих временных компонент в суммарный спектр становятся близкими по значению. Кроме того, в результате денатурации белков происходит батохромный сдвиг спектров флуоресценции, как стационарных, так и время-разрешенных (табл. 1). Если в нативном состоянии белков HSA, BSA и BL их стационарные

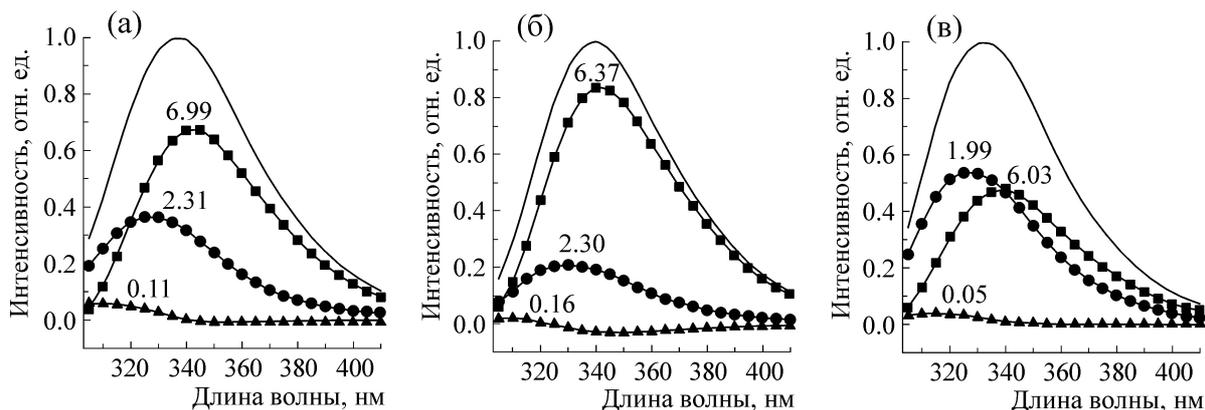


Рис. 1. Спектры, ассоциированные с временами жизни, для нативных белков HSA (а), BSA (б) и BL (в). Сплошная линия – стационарный спектр, маркированные линии – спектры, ассоциированные с определенными (указанными сверху) временами жизни (нс).

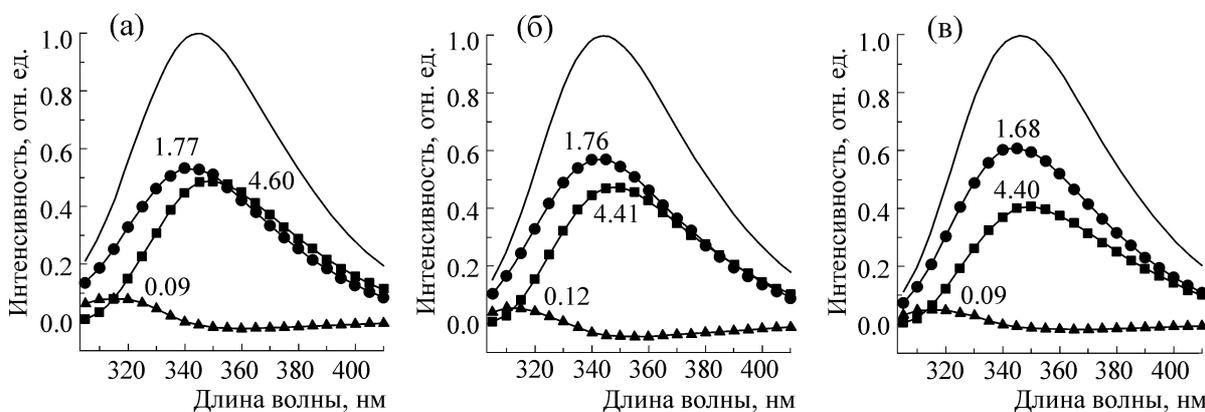


Рис. 2. Спектры, ассоциированные с временами жизни, для денатурированных белков: HSA (а), BSA (б) и BL (в). Сплошная линия – стационарный спектр, маркированные линии – спектры, ассоциированные с определенными (указанными сверху) временами жизни (нс).

спектры различимы (максимумы при 337, 340 и 333 нм соответственно), то после денатурации становятся сходными по положению максимума (344 нм – для альбуминов и 346 нм – для люциферазы) и полуширине спектра.

При этом индивидуальные спектры испускания, характеризующиеся определенным временем жизни, имеют близкие положения максимумов для всех белков как в нативном состоянии (342 нм, 328 нм и 315 нм для τ_1 , τ_2 , и τ_3 соответственно), так и в денатурированном (350 нм, 343 нм и 317–320 нм для τ_1 , τ_2 , и τ_3 соответственно). Это хорошо видно по нормированным спектрам компонент разных белков, сгруппированным по временам жизни на рис. 3.

Для моделирования зависимости спектральных компонент триптофановой флуоресценции от диэлектрической проницаемости микроокружения было получено разложение спектров триптофана в воде и водно-этанольных смесях (рис.

4, табл. 2). Это позволило сравнить характеристики стационарных спектров денатурированных альбуминов со спектрами триптофана в водно-этанольных смесях (табл. 1 и 2). Видно близкое сходство формы спектра денатурированных альбуминов со спектром триптофана в 50%-м этаноле. Но сопоставление временных компонент, из которых состоят стационарные спектры, указывает на существенные различия между составом этих спектров (рис. 2а,б и рис. 4б).

Чтобы оценить доступность триптофановых остатков растворителю, были проанализированы спектральные характеристики белков в присутствии полярного нейтрального тушителя акриламида.

Анализ полученных данных показывает, что добавление акриламида к белку с измененной конформацией снижает времена жизни флуоресценции для HSA и BSA (рис. 5). Изменение вкладов для всех трех исследуемых белков имеет

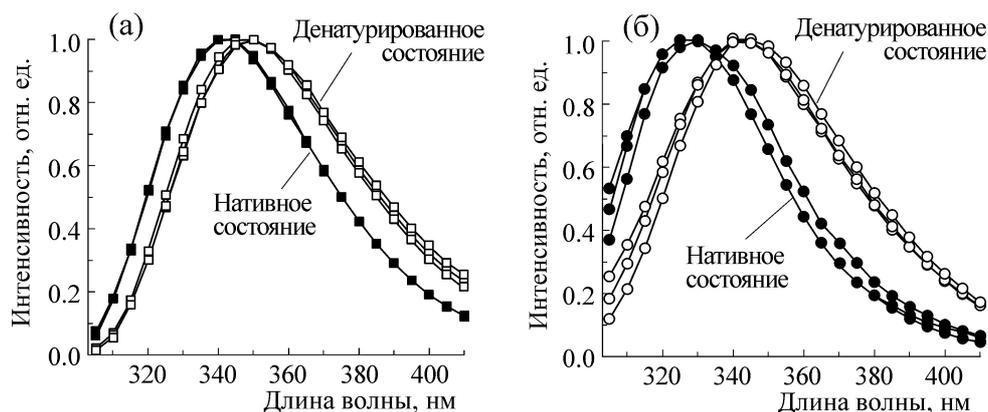


Рис. 3. Спектры трех исследованных белков, ассоциированные с длинным τ_1 (а) и средним τ_2 (б) временем жизни. Черные маркеры – нативные белки, светлые маркеры – денатурированные белки.

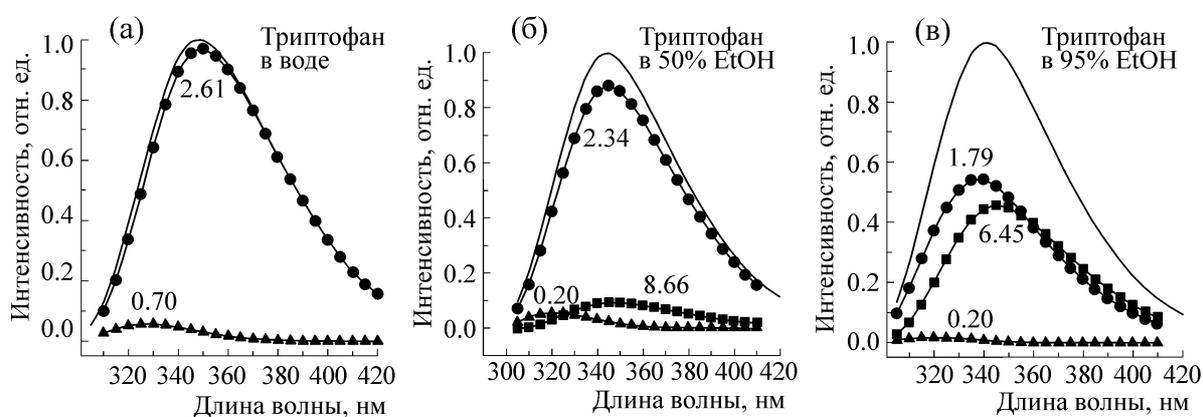


Рис. 4. Спектры, ассоциированные с временами жизни, для триптофана в воде (а) и водно-этанольных растворах (б, в). Сплошная линия – стационарный спектр, маркированные линии – спектры, ассоциированные с определенными (указанными сверху) временами жизни (нс).

один и тот же характер: наибольшему тушению подвергается спектральная компонента с длинным временем жизни (τ_1). Поскольку спектр этой компоненты сдвинут батохромно относительно остальных компонент, его тушение приводит к хорошо известному эффекту – сдвигу стационарного спектра испускания белков в коротковолновую область в присутствии тушителя (табл. 1).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

По полученным разложениям спектров видно, что различия в стационарных спектрах исследованных белков объясняются индивидуальным соотношением одних и тех же спектрально-временных компонент (рис. 3), несмотря на существенно различающуюся трехмерную структуру люциферазы и альбуминов. Оказалось, что наличие трех времен жизни флуорес-

Таблица 2. Времена жизни и их вклады в суммарный спектр для триптофана в водно-этанольных растворах

Этанол, %	ϵ	τ_1 , нс	f_1	τ_2 , нс	f_2	τ_3 , нс	f_3	χ^2
0	78,6	–	–	$2,61 \pm 0,03$	0,96	$0,7 \pm 0,2$	0,04	1,07
50	52,6	$8,66 \pm 0,13$	0,09	$2,34 \pm 0,03$	0,88	$0,2 \pm 0,1$	0,03	1,18
70	40,7	$7,31 \pm 0,07$	0,18	$2,08 \pm 0,02$	0,80	$0,5 \pm 0,2$	0,02	1,10
95	26,4	$6,45 \pm 0,09$	0,46	$1,79 \pm 0,02$	0,53	$0,2 \pm 0,1$	0,01	1,13

Примечание: ϵ – диэлектрическая постоянная [22].

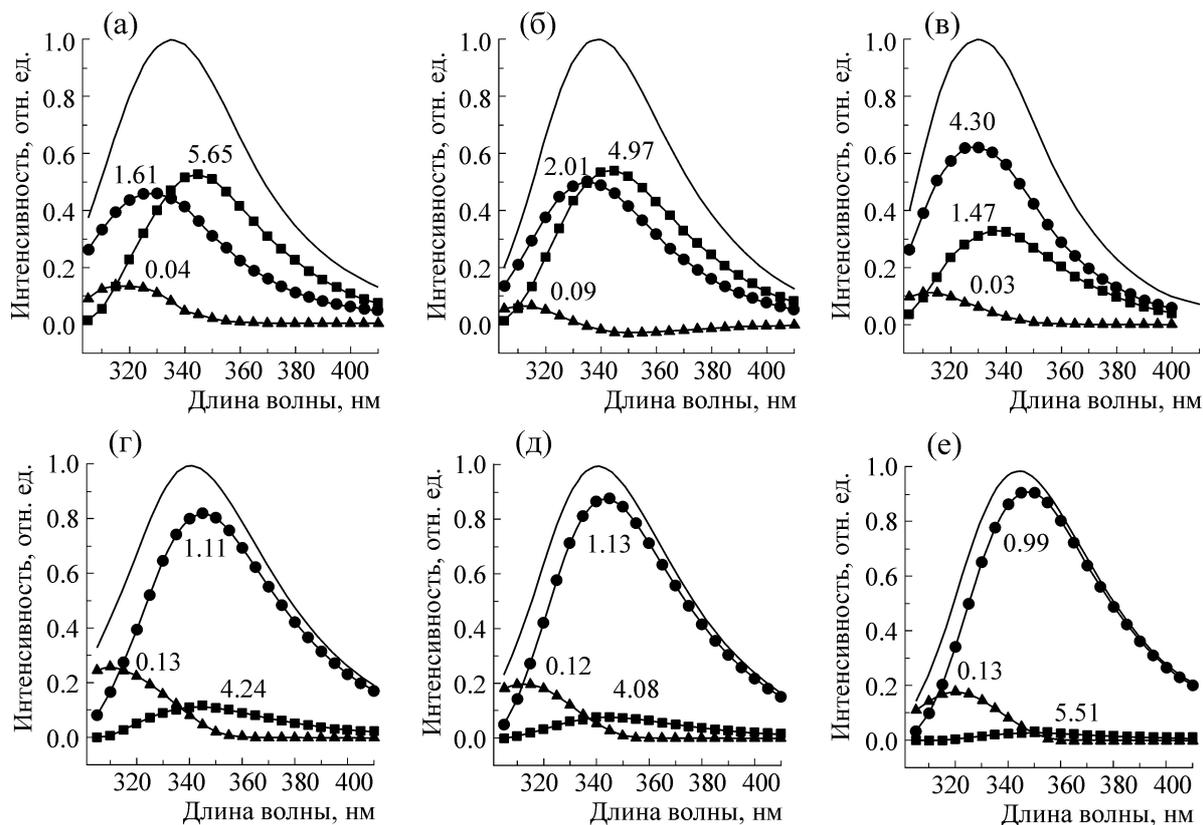


Рис. 5. Спектры, ассоциированные с временами жизни (нс), для HSA (а, г), BSA (б, д) и BL (в, е) в нативном (а–в) и денатурированном (г–е) состояниях в присутствии нейтрального тушителя акриламида (0,6 М).

ценции не зависит от количества триптофановых остатков и их локализации в белках. Еще более интересным результатом можно назвать тот факт, что экспериментально найденные три времени жизни имеют близкие значения для всех белков. Аналогичные результаты, хотя и с гораздо бóльшим разбросом значений τ_1 , τ_2 , τ_3 и без соответствующих спектральных контуров, были получены не так давно для целого ряда белков, содержащих от одного до восьми остатков триптофана [21]. Это позволяет приписать полученные спектрально-временные компоненты к определенным, одним и тем же, конформационным состояниям триптофановых остатков (например, к хорошо известным ротамерам) в составе исследованных белков. В таких состояниях фотофизика триптофана определяется не только положением индольного кольца как таковым, но и характером взаимодействия флуорофора с белковым окружением, которое может также влиять на вероятность образования того или иного ротамера и степень завершенности релаксационных процессов за время жизни возбужденного состояния.

Таким образом, показано, что специфика строения исследованных белков определяет не абсолютные значения времен жизни триптофа-

новой флуоресценции, а соотношение вкладов временных компонент.

Денатурация гуанидингидрохлоридом переводит триптофановые остатки всех белков в приблизительно равные условия, что отражается на спектральных компонентах: разброс значений времен жизни между белками становится еще меньше, вклады двух основных компонент (τ_1 , τ_2) в суммарный спектр испускания примерно выравниваются (рис. 2). Наблюдаемое уменьшение значений τ_1 , τ_2 и батохромные сдвиги соответствующих спектров связаны, вероятно, с увеличением подвижности микроокружения триптофанов и усилением процессов тушения вследствие разрушения третичной структуры белка.

Интересным вопросом является, насколько соответствуют полученные временные спектральные компоненты контурам, установленным для разных классов триптофанов в рамках модели дискретных состояний, построенной на основе стационарных спектров собственной флуоресценции [4–7]. Ранее, используя кристаллическую структуру бактериальной люциферазы, мы рассчитали характеристики микроокружения семи триптофановых остатков этого белка и провели их классификацию [17]. Было предсказано, что один триптофан BL относится к классу III, один –

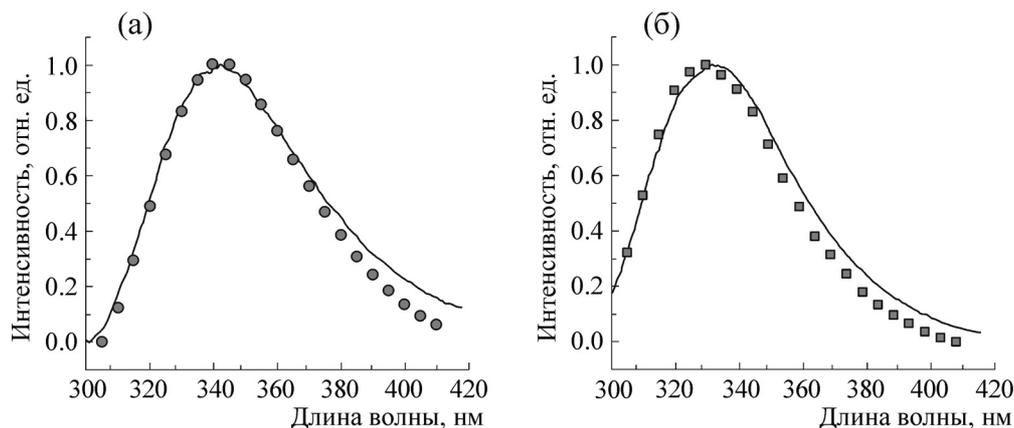


Рис. 6. Сопоставление разностных стационарных спектров с временными компонентами. (а): сплошная линия – {BSA–HSA}, маркеры – компонента τ_1 ; (б): сплошная линия – {BL–BSA}, маркеры – компонента τ_2 .

к классу II, четыре – к классу I и один – к классу S. С учетом имеющихся в литературе данных о том, что единственный триптофан в составе HSA принадлежит к классу II, а два триптофана BSA – к классам II и III, теоретически с помощью разностных спектров можно получить характеристики триптофанов всех трех классов. Спектральные свойства HSA являются характеристикой триптофанов класса II, разность спектров BSA и HSA должна отражать свойства триптофанов класса III, а разность спектров BL и BSA – свойства триптофанов класса I. Сопоставление таких разностных спектров с полученными контурами индивидуальных временных компонент представлено на рис. 6. Видно, что действительно наблюдается хорошее соответствие предполагаемого спектра класса III с контуром испускания, характеризующимся в нативных белках самым длинным временем жизни (τ_1). Аналогично, контур, опираясь на структуру BL, можно приписать триптофанам класса I, по форме близок спектру со средним временем жизни (τ_2). Кроме того, этот контур соответствует формальному описанию спектрального класса I: положение максимума при $331,0 \pm 4,8$ нм и полуширина спектра 48–50 нм.

Таким образом, сравнение стационарных спектров с временными компонентами позволяет предположить, что для триптофанов класса I наиболее вероятным конформационным состоянием является то, которое характеризуется спектральной компонентой со средним временем жизни (рис. 3б), для триптофанов класса II высока вероятность образования обеих конформаций (как с τ_1 , так и с τ_2 , рис. 3а,б), а класс III формируют триптофаны в конформации, характеризующейся длинным временем жизни и батохромно сдвинутым спектром (рис. 3а).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Описанные выше закономерности указывают на то, что специфика строения белковых макромолекул сказывается не на абсолютных значениях времен жизни триптофановой флуоресценции, а на соотношении вкладов как минимум двух временных компонент: с длинным временем жизни (6–7 нс) и средним (около 2 нс). Первая компонента имеет батохромно сдвинутый спектр, что может свидетельствовать о высокой полярности и подвижности микроокружения триптофанов этой группы. Это согласуется с результатами, полученными в присутствии акриламида: в большей степени тушению подвергается именно компонента с длинным временем жизни. Денатурированные белки, вне зависимости от исходной структуры, имеют спектральные компоненты с близкими временами жизни, энергетическими характеристиками и соотношением вкладов.

На основании результатов, полученных методом флуоресцентной спектроскопии с временным разрешением для модельных белков альбуминов, стало возможным разложить спектр собственной флуоресценции многотриптофанового белка бактериальной люциферазы на компоненты, соответствующие разным группам триптофанов в ее составе. Данный результат в дальнейшем может стать основой исследования стадий денатурации бактериальной люциферазы и вовлечения разных доменов этого белка в конформационную динамику, связанную с катализом.

Данная статья подготовлена по материалам V Съезда биофизиков России (Ростов-на-Дону, 2015).

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке Министерства образования и науки РФ (проект № 1762), Федерального агентства научных организаций РФ (проект № VI 57.1.1) и Краевого государственного ав-

тономного учреждения «Красноярский краевой фонд поддержки научной и научно-технической деятельности» (доп. соглашение № 46/15 от 19.06.2015).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. J. R. Lakowicz, *Principles of Fluorescence Spectroscopy* (Springer Science, 2006).
2. А. П. Демченко, *Люминесценция и динамика структуры белков* (Наук. думка, Киев, 1988).
3. F. W. Teale, *Biochem. J.* **76**, 381 (1960).
4. E. A. Burstein, N. S. Vedenkina, and M. N. Ivkova, *Photochem. Photobiol.* **18** (4), 263 (1973).
5. Э. А. Бурштейн, *Люминесценция белковых хромофоров: Модельные исследования* (ВИНИТИ, Москва, 1976).
6. Я. К. Решетняк и Э. А. Бурштейн, *Биофизика* **42** (4), 785 (1997).
7. J. Nixon and Y. K. Reshetnyak, *Algorithms* **2** (3), 1155 (2009).
8. A. G. Szabo and D. M. Rayner, *J. Am. Chem. Soc.* **102** (2), 554 (1980).
9. S. L. C. Moors, M. Hellings, M. De Maeyer, et al., *Biophys. J.* **91** (3), 816 (2006).
10. J. R. Lakowicz, *Photochem. Photobiol.* **72** (4), 421 (2000).
11. Y. Engelborghs, *Spectrochim. Acta, Part A* **57** (11), 2255 (2001).
12. Y. Chen and M. D. Barkley, *Biochemistry* **37** (28), 9976(1998).
13. J. R. Albani, *J. Fluoresc.* **24** (1), 93–104 (2014).
14. M. Amiri, K. Jankeje, and J. R. Albani, *J. Fluoresc.* **20** (3), 651 (2010).
15. R. Swaminathan, G. Krishnamoorthy, N. Periasamy, *Biophys. J.* **67** (5), 2013 (1994).
16. T. Peters, *Adv. Clin. Chem.* **13**, 37 (1970).
17. A. A. Deeva, E. V. Nemtseva, and V. A. Kratasyuk, *Luminescence* **29**, 72 (2014).
18. E. Esimbekova, V. Kratasyuk, and O. Shimomura, *Bioluminescence: Fundamentals and Applications in Biotechnology* (Springer Berlin Heidelberg, 2014).
19. M. Ameloot and H. Hendrickx, *Biophys. J.* **44** (1), 27 (1983).
20. J. R. Knutson, J. M. Beechem, and L. Brand, *Chem. Phys. Lett.* **102** (6), 501 (1983).
21. J. R. Albani, *J. Fluoresc.* **24** (1), 105 (2014).
22. M. Faraji, A. Farajtabar, and F. Gharib, *J. Appl. Chem. Res.* **9**, 7 (2009).

Similarity of Spectral Profiles with Individual Fluorescence Lifetime of Tryptophan in Proteins of Different Structure

E.V. Nemtseva* **, O.O. Lashchuk*, and M.A. Gerasimova*

*Siberian Federal University, Svobodny prosp. 79, Krasnoyarsk, 660041 Russia

**Institute of Biophysics, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Akademgorodok 50/50, Krasnoyarsk, 660036 Russia

This work presents the results of the analysis of the fluorescence lifetime of tryptophan in three proteins: human serum albumin, bovine serum albumin and bacterial luciferase, containing 1, 2 and 7 tryptophan residues, respectively. It was shown that for all proteins fluorescence decay can be fitted by three lifetimes: $\tau_1 = 6\text{--}7$ ns, $\tau_2 = 2,0\text{--}2,3$ ns and $\tau_3 \leq 0,1$ ns (the native state) and $\tau_1 = 4,4\text{--}4,6$ ns, $\tau_2 = 1,7\text{--}1,8$ ns and $\tau_3 \leq 0,1$ ns (the denaturated state). It was found that spectral profiles with individual protein fluorescence lifetime have similar peak wavelength and identical half-width of the spectrum as in the native state ($\lambda_{\max}^{\tau_1} = 342$ nm, $\lambda_{\max}^{\tau_2} = 328$ nm and $\lambda_{\max}^{\tau_3} = 315$ nm), and in the denaturated state ($\lambda_{\max}^{\tau_1} = 350$ nm, $\lambda_{\max}^{\tau_2} = 343$ nm and $\lambda_{\max}^{\tau_3} = 317$ nm). In addition, the differences in the steady-state spectra of the studied proteins are caused by the individual ratio of lifetime contributions. The correlation between lifetime components and a known classification of the tryptophan residues in the structure of proteins under study was performed within the discrete states model.

Key words: tertiary protein structure, fluorescence lifetime, tryptophan, denaturation, dielectric relaxation