



УДК 577.112.853.083 + 616-006.66

ВЗАИМОСВЯЗЬ КОНФОРМАЦИОННЫХ ИЗМЕНЕНИЙ КРУСТАЦИНА И ЕГО СПОСОБНОСТИ СПЕЦИФИЧЕСКИ СВЯЗЫВАТЬСЯ С РАКОВО-ЭМБРИОНАЛЬНЫМ АНТИГЕНОМ

Глазунов В. П., Таранкова З. А., Одинокоев С. Е.,
Курика А. В., Павленко А. Ф.Тихоокеанский институт биоорганической химии
Дальневосточного отделения Академии наук СССР, Владивосток

Методами спектроскопии КД и флуоресценции исследовано изменение пространственной структуры крастина в зависимости от температуры, ионной силы, значений рН раствора и концентрации ионов кальция. По спектрам КД оценено содержание элементов вторичной структуры молекулы крастина. Выявлен необратимый конформационный переход в области 45—50° С, приводящий к потере способности крастина связываться с раково-эмбриональным антигеном (РЭА). Показано, что крастин является кальцийсвязывающим белком. В кальцийсвязанной форме повышается на ~10° С температура тепловой денатурации. Связывание кальция и увеличение ионной силы раствора приводят к изменению вторичной и третичной структуры молекулы крастина. В кальцийсвязанной форме крастин обладает максимальной способностью связываться с РЭА. Показано отсутствие специфического взаимодействия крастина с сахарами: фукозой, маннозой, галактозой, N-ацетилглюкозаминном и N-ацетилнейраминной кислотой.

Ранее сообщалось о выделении из рака отшельника *Pagurus prideauxii* белка крастина [1], который обладает уникальной способностью специфически связываться с РЭА по типу антител и поэтому может найти применение для диагностики злокачественных опухолей. Белок крастин, который, по данным SDS-электрофореза, имеет молекулярную массу 34 кДа и молярный коэффициент поглощения $69\,900\text{ M}^{-1}\cdot\text{см}^{-1}$, состоит из двух одинаковых полипептидных цепей, связанных дисульфидными связями [2]. Активность крастина к связыванию с РЭА зависит от внешних условий. Настоящая работа посвящена исследованию влияния температуры, рН, ионной силы раствора и концентрации ионов кальция методами спектроскопии КД, УФ и флуоресценции на конформацию крастина и его способность связываться с РЭА.

Физико-химические свойства крастина. Данные иммуноферментного анализа (см. «Экспериментальную часть») показывают, что в растворе буфера 0,01 М трис-НСl, рН 7,6, содержащем 0,15 М NaCl и 3 мМ CaCl₂, проявляется максимальная способность крастина к связыванию с РЭА, которую принимаем за 100% («нативное» состояние). Измерения по второй производной УФ-спектра дают 11 остатков триптофана, 5 остатков тирозина и 11 остатков фенилаланина.

В спектре собственной флуоресценции остатков триптофана «нативного» крастина наблюдается максимум при 337 нм с квантовым выходом 0,04. Тушение собственной флуоресценции остатков триптофана в молекуле крастина акриламидом характеризуется константой Штерна — Фольмера $K = 2,8\text{ M}^{-1}$.

В ароматической области (240—310 нм) спектра КД «нативного» крастина наблюдаются интенсивные полосы положительного знака, обусловленные остатками ароматических аминокислот триптофана, тирозина и фенилаланина (рис. 1). Высокая молярная эллиптичность этих полос, коротковолновый максимум флуоресценции остатков триптофана, низкое значение квантового выхода и величина константы тушения Штерна — Фольмера указывают на то, что большая часть остатков триптофана погружена во внутреннюю часть молекулы, жестко фиксирована и имеет

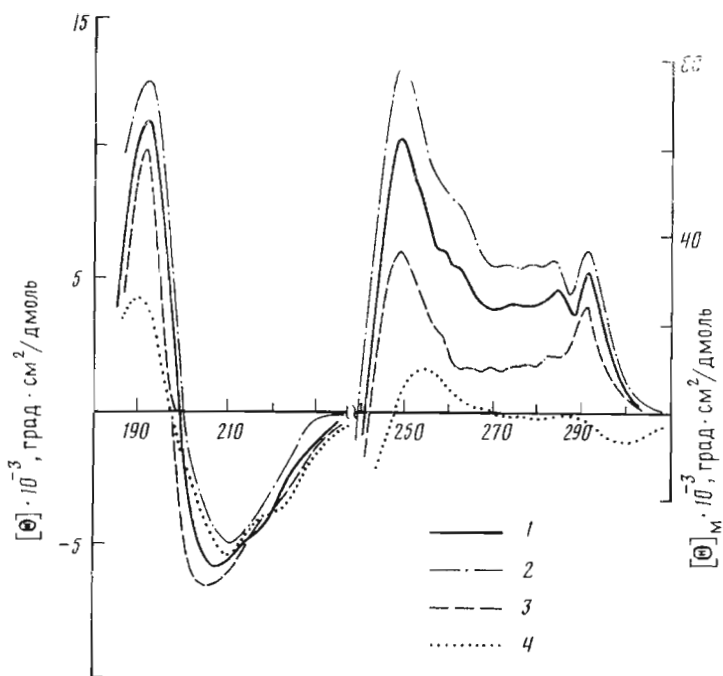


Рис. 1. Спектры КД растворов крастина в 0,01 М трис-НСl, рН 7,6 (1), в этом же буфере с добавками 0,15 М NaCl и 3 мМ CaCl₂ (2), 0,15 М NaCl (3) и в 0,14 М НСООН, рН 2,3 (4)

полярное окружение [3—5]. В пептидной области спектра КД (190—240 нм) наблюдается отрицательный максимум при 208 нм и интенсивный положительный при 192 нм (рис. 1). Расчет процентного содержания элементов вторичной структуры «нативного» крастина из спектра КД методом Провинчера [6] свидетельствует о высоком содержании (84%) β-структуры (см. таблицу).

Поскольку крастин обладает максимальной активностью в «нативном» состоянии (раствор 0,01 М трис-НСl, рН 7,6, содержащий 0,15 М NaCl и 3 мМ CaCl₂, при 37° С), представляет интерес выяснить, в какой мере ионы кальция, ионная сила, значение рН и температура по отдельности влияют на пространственную структуру молекулы. Для этого использовали методы спектроскопии КД и флуоресценции. Спектральные изменения в зависимости от перечисленных выше параметров наблюдали относительно раствора крастина в 0,01 М трис-НСl, рН 7,6, при 20° С.

Содержание разных типов вторичной структуры крастина (%) в зависимости от условий

Условия	α-Спираль	β-Структура	β-Изгиб	Неупорядоченная
0,01 М трис-НСl+0,15 М NaCl, рН 7,6, при 20° С	5	73	22	0
0,01 М трис-НСl+3 мМ CaCl ₂ +0,15 М NaCl, рН 7,6, при 20° С	3	84	14	0
0,01 М трис-НСl+3 мМ CaCl ₂ , рН 7,6, при 20° С	1	90	10	0
55° С	6	79	15	0
20° С (70° С)	8	65	16	11
0,01 М трис-НСl, рН 7,6, при 20° С	8	75	18	0
0,01 М КН ₂ РО ₄ , рН 7,4, при 20° С	8	71	21	0
40° С	12	58	23	8
50° С	12	46	19	22
60° С	9	44	20	27
70° С	9	43	18	29
20° С (70° С)	6	50	29	15
0,14 М НСООН, рН 2,3, при 20° С	12	56	22	10

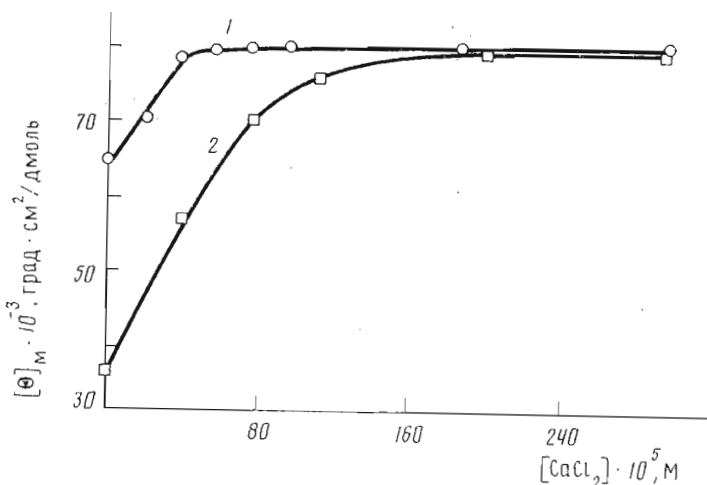


Рис. 2. Зависимость молярной эллиптичности полосы 248 нм от концентрации ионов кальция для растворов крастацина в 0,01 М трис-НСl, рН 7,6 (1), 0,01 М трис-НСl + 0,15 М NaCl, рН 7,6 (2)

Влияние ионов кальция. Добавление CaCl_2 к раствору крастацина в 0,01 М трис-НСl вызывает заметный рост эллиптичности полос в ароматической области спектра КД (рис. 1), что указывает на изменения в третичной структуре крастацина. Зависимость эллиптичности полосы 248 нм от концентрации ионов Ca^{2+} приведена на рис. 2. Наблюдается быстрое (при концентрации $\text{Ca}^{2+} \sim 0,4\text{--}0,5$ мМ) насыщение в эллиптичности полосы 248 нм, свидетельствующее о специфическом характере связывания кальция с крастацином. По-видимому, изменения третичной структуры молекулы при связывании ионов кальция приводят к более жесткой фиксации остатков ароматических аминокислот в результате их погружения во внутренние участки молекулы [3].

В пептидной области спектра КД наблюдается небольшое уменьшение эллиптичности длинноволнового крыла отрицательного максимума 220 нм и увеличение эллиптичности полосы 192 нм (рис. 1). Отсюда следует, что связывание ионов кальция молекулой крастацина приводит к изменению не только ее третичной, но и вторичной структуры (см. таблицу).

Спектр флуоресценции крастацина в 0,01 М трис-НСl имеет максимум 340 нм при квантовом выходе 0,05. Добавление в раствор CaCl_2 до концентрации 3 мМ приводит к сдвигу максимума полосы флуоресценции в коротковолновую область (337 нм) с уменьшением квантового выхода до 0,04. Графики тушения собственной флуоресценции остатков триптофана в координатах Штерна — Фольмера нейтральным тушителем акриламидом линейны (рис. 3). Для раствора крастацина в 0,01 М трис-НСl константа Штерна — Фольмера $K = 3,4 \text{ M}^{-1}$. При добавлении в раствор CaCl_2 до концентрации 3 мМ величина K уменьшается до $2,9 \text{ M}^{-1}$, что свидетельствует об уменьшении доступности остатков триптофана молекулам тушителя. Таким образом, анализ спектров флуоресценции подтверждает данные спектров КД. Связывание ионов кальция крастацином приводит к такому изменению конформации, в результате которого увеличивается доля остатков триптофана, погруженных во внутренние участки молекулы.

Влияние ионной силы раствора. Ионная сила раствора оказывает на конформацию молекулы крастацина воздействие, обратное влиянию ионов кальция. В ароматической области спектра КД эллиптичности всех полос уменьшаются приблизительно на одну треть при добавлении 0,15 М NaCl к раствору крастацина в 0,01 М трис-НСl (рис. 1). Уменьшение эллиптичности с увеличением ионной силы указывает на разрушение пространственной структуры молекулы и увеличение подвижности ароматических хромофоров [3].

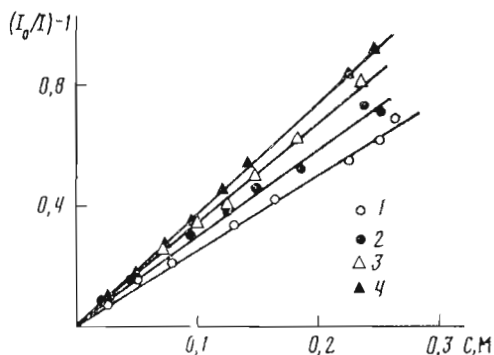


Рис. 3. Тушение триптофановой флуоресценции акриламидом в координатах Штерна — Фольмера растворов крастацина в 0,01 М трис-НСl, рН 7,6 (1), в этом же буфере с добавками 0,15 М NaCl (2), 3 мМ CaCl₂ (3), 0,15 М NaCl и 3 мМ CaCl₂ (4)

В спектрах собственной флуоресценции раствора крастацина в 0,01 М трис-НСl максимум полосы 340 нм сдвигается в присутствии 0,15 М NaCl к 341 нм, квантовый выход увеличивается до 0,10, а константа тушения акриламидом возрастает с 3,4 до 3,7 М⁻¹. По всей видимости, в присутствии 0,15 М NaCl увеличивается доля экспонированных на поверхности молекулы остатков триптофана.

В пептидной области спектра КД при добавлении 0,15 М NaCl к раствору крастацина в 0,01 М трис-НСl наблюдается уменьшение эллиптичности положительной полосы при 192 нм (рис. 1) и, как показывает расчет (таблица), вторичная структура молекулы изменяется незначительно.

По данным иммуноферментного анализа (см. «Экспериментальную часть»), связывание крастацина с РЭА в 0,01 М трис-НСl в присутствии 0,15 М NaCl по сравнению с «нативным» состоянием уменьшается до 40%. Как показывают результаты расчета вторичной структуры (таблица), потеря связывающей активности сопровождается уменьшением содержания β-структуры и увеличением α-спирали и нерегулярной структуры.

Титрование крастацина в присутствии 0,15 М NaCl раствором CaCl₂ приводит к быстрому увеличению эллиптичности полос в ароматической области спектра КД. Эллиптичность достигает тех же значений, что и в отсутствие NaCl, но при бóльших концентрациях CaCl₂ (1,5—2 мМ) (рис. 2). Максимум полосы флуоресценции при этом смещается в коротковолновую область (с 341 на 337 нм); константа Штерна — Фольмера (K) уменьшается от 3,7 до 2,8 М⁻¹ и практически совпадает с ее значением (2,9 М⁻¹) для раствора крастацина в 0,01 М трис-НСl в присутствии 3 мМ CaCl₂ без NaCl. Таким образом, по данным спектров КД в ароматической области и флуоресценции, конформация кальцийсвязанной формы крастацина не зависит от ионной силы.

Влияние температуры раствора. В ароматической области спектра КД при повышении температуры раствора наблюдается уменьшение эллиптичности всех полос (рис. 4), что указывает на нарушение исходной третичной структуры молекулы. В пептидной области спектра КД также наблюдается уменьшение эллиптичности положительной полосы 192 нм при повышении температуры раствора, а также смещение отрицательного максимума от 208 до 202 нм при увеличении его эллиптичности. Как следует из рис. 5 и 6, при 45—50° С в третичной и вторичной структурах наблюдается необратимый конформационный переход*. Расчеты вторичной структуры при различных температурах растворов были проведены для крастацина в 0,01 М трис-НСl и 0,01 М КН₂РО₄. Буфер 0,01 М трис-НСl из-за сильного поглощения ниже 200 нм вносит в этой области большие искажения при температурах выше 50° С. Расчет показывает (таблица), что повышение температуры раствора крастацина вызывает уменьшение содержания β-структуры и увеличение неупорядоченной структуры. Необратимая тепловая денатурация крастацина приводит к сохранению высокого содержания β-структуры (см. 20° С после 70° С, таблица) и к полной потере активности связывания с РЭА.

* Эллиптичности полос не восстанавливаются при охлаждении раствора.

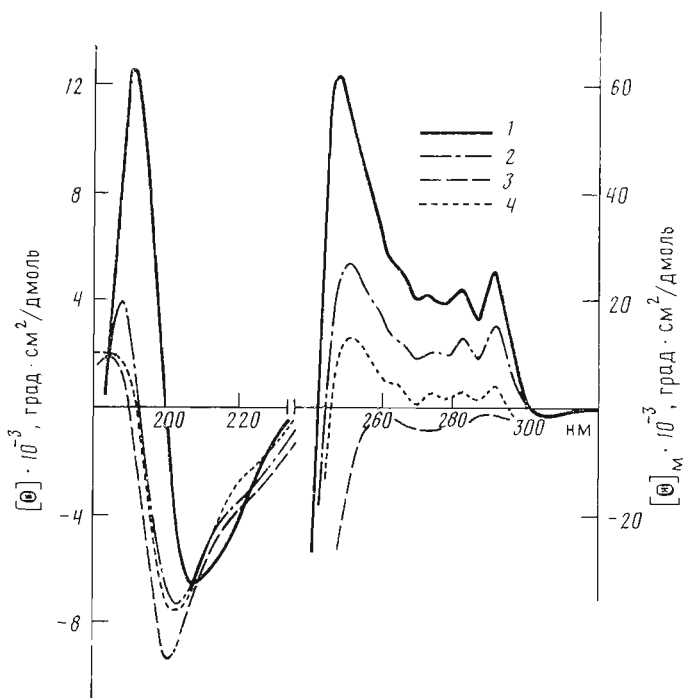


Рис. 4. Спектры КД раствора краустина в 0,01 М KH_2PO_4 , рН 7,4, при 20 (1), 50 (2), 70 (3) и при 20° С после нагрева до 70° С (4)

Связывание краустином ионов кальция повышает температурную стабильность молекулы. Точка конформационного перехода для кальций-связанной формы краустина повышается на 10° С (рис. 5 и 6). Необратимая тепловая денатурация кальцийсвязанной формы (20° С после 70° С) приводит к состоянию, близкому для тепловой денатурации краустина без кальция. Температурное поведение конформации краустина в кальцийсвязанной форме не изменяется при добавлении 0,15 М NaCl («нативное» состояние).

рН-Зависимость. Конформация краустина чувствительна к значениям рН раствора. В области значений рН от 6 до 3 краустин в 0,01 М трис-НСl выпадает в осадок. Поэтому мы сопоставили изменения в структуре краустина при более низком значении рН 2,3 в 0,14 М НСOON с исходным рН 7,6. В ароматической области спектра КД сохраняется слабая полоса при 248 нм и появляется новый отрицательный максимум малой эллиптичности при 300 нм (рис. 1). В пептидной области спектра КД отрицательная полоса 208 нм незначительно уменьшается. Эллиптичность же положительной полосы 192 нм уменьшается почти в 3 раза (рис. 1). Расчет вторичной структуры краустина при рН 2,3 показывает, что процентное содержание α -спирали увеличивается, а также появляется неупорядоченная структура при уменьшении содержания β -структуры (см. таблица). Эти изменения структуры краустина полностью обратимы при титровании раствора от рН 2,3 до исходного значения рН 7,6.

Взаимодействие с сахарами. Проведенная оценка константы связывания для комплекса краустин — РЭА дает значение $\sim 10^8 \text{ M}^{-1}$ [2], которое близко к значениям констант, характерным для высокоаффинных антител, и много выше, чем для лектинов. Методом конкурентного иммуноферментного анализа было показано [2], что реакцию связывания краустина с РЭА ингибируют многие моносахариды, даже отсутствующие в РЭА. Однако 50% ингибирование достигалось только при относительно высоких концентрациях сахаров, что не характерно для лектинов.

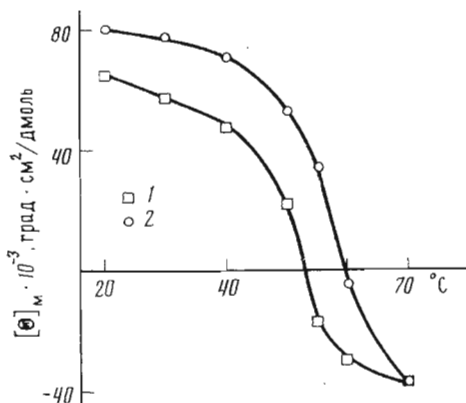


Рис. 5

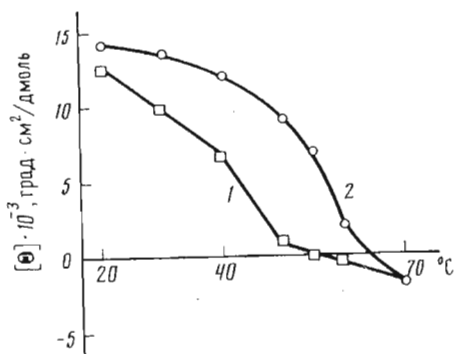


Рис. 6

Рис. 5. Зависимость молярной эллиптичности полосы 248 нм от температуры раствора крахмалана в 0,01 М трис-НСI, рН 7,6 (1), и в том же растворе в присутствии 3 мМ CaCl_2 (2)

Рис. 6. Зависимость эллиптичности полосы 192 нм от температуры раствора крахмалана в 0,01 М трис-НСI, рН 7,6 (1), и в том же растворе в присутствии 3 мМ CaCl_2 (2)

В связи с этим представляет интерес выяснить характер взаимодействия крахмалана с рядом сахаров, которые входят в состав углеводной части РЭА: маннозой, фукозой, галактозой, N-ацетилглюкозамин и N-ацетилнейраминовой кислотой. При исследовании специфических взаимодействий лектинов с сахарами широкое применение нашли разностная УФ- и КД-спектроскопия. В разностных УФ-спектрах лектинов при их специфическом взаимодействии с сахарами появляются характерные полосы при 291—293, 284—285, 288 и 280 нм [7, 8]. Первые две полосы обусловлены изменением окружения остатков триптофана, а две другие — изменением окружения остатков тирозина. Величины молярного поглощения этих полос растут с увеличением концентрации сахара и быстро достигают насыщения [7, 8]. Разностные КД-спектры лектинов при специфическом связывании сахаров в ароматической области имеют ряд полос, обусловленных остатками тирозина и триптофана [9]. Так как крахмалан содержит достаточно много остатков триптофана и тирозина (11 и 5 соответственно), в случае специфического связывания с ним сахаров следует ожидать появления разностных УФ- и КД-спектров. Чтобы убедиться в этом, регистрировали разностные УФ-спектры крахмалана в «нативном» состоянии против того же раствора с добавлением сахаров (см. «Экспериментальную часть»). Титрование водными растворами сахаров проводили так, что молярное отношение крахмалана к сахарам изменялось от 1 : 10 до 1 : 1000. Однако даже при таких высоких избытках сахаров не наблюдалось появления разностных УФ-спектров (не приводятся).

Аналогичные эксперименты были проведены для получения разностных КД-спектров. В ароматической области они не наблюдались, а спектры КД крахмалана с добавками сахаров были идентичны спектру КД крахмалана в «нативном» состоянии (рис. 1). Не получив подтверждения наличия специфического взаимодействия в разностной УФ- и КД-спектроскопии, мы попытались применить метод флуоресценции. Однако разностные спектры флуоресценции при титровании раствора крахмалана водными растворами сахаров также отсутствовали как при возбуждении только остатков триптофана ($\lambda_{\text{возб}} = 296$ нм), так и при суммарном возбуждении остатков тирозина и триптофана ($\lambda_{\text{возб}} = 280$ нм).

Полученный отрицательный результат по разностным спектрам КД, УФ и флуоресценции свидетельствует об отсутствии специфического связывания указанных выше сахаров с крахмаланом.

Полученные результаты показывают, что крахмалан является кальцийсвязывающим белком с лабильной пространственной структурой,

зависящей от температуры, рН среды и ионной силы раствора. Кальций-связанная форма краустина обладает наиболее стабильной конформацией, в которой проявляется наибольшая РЭА-связывающая активность.

Экспериментальная часть

УФ-спектры регистрировали в кварцевых кюветках на спектрофотометрах Spexord M 40 (Carl Zeiss, ГДР) и Cary 219 (Varian, США). Спектры КД регистрировали на спектрополяриметре J-500A с процессором DP-501N (Jasco, Япония) в кварцевых кюветках с толщиной слоя 1 см для ароматической области, 1 и 0,1 мм для пептидной; концентрация раствора краустина составляла: $2 \cdot 10^{-5}$ М, 0,2 и 2 мг/мл соответственно. Кюветы термостатировали с точностью $\pm 0,5^\circ$ С. Температурное изменение объема раствора белка в кювете учитывали при расчетах эллиптичности. В пептидной области эллиптичность полос (в град·см²/дмоль) считали на средний аминокислотный остаток с молекулярной массой 110 Да

$$[\theta] = \theta S_{110}/cl \cdot 10,$$

где S — чувствительность прибора, c — весовая концентрация краустина в мг/мл. В ароматической области эллиптичность полос считали как молярную на молекулярную массу молекулы 34 кДа:

$$[\theta]_M = \theta S/c_M \cdot 110,$$

где c_M — молярная концентрация краустина.

Корректированные спектры флуоресценции регистрировали на флуориметре Hitachi-850 (Япония) в стандартных кварцевых кюветках, ширина щелей возбуждения и эмиссии 6 нм, линия возбуждения 296 нм. Квантовый выход флуоресценции остатков триптофана (q) определяли относительным методом [10]:

$$q = q_{\text{Трп}} \cdot S \cdot D_{\text{Трп}} / S_{\text{Трп}} \cdot D,$$

де $q_{\text{Трп}} = 0,2$; S , $S_{\text{Трп}}$ — площади под корректированными спектрами эмиссии растворов краустина и триптофана; D и $D_{\text{Трп}}$ — УФ-поглощение в оптических единицах растворов краустина и триптофана на длине волны возбуждения 296 нм. При измерении квантового выхода для исключения эффекта внутреннего фильтра работали с растворами, для которых величины D и $D_{\text{Трп}}$ не превышали 0,003 и 0,002 соответственно. Для тушения флуоресценции остатков триптофана использовали водный раствор 2 М акриламида (Reanal, Венгрия), дважды перекристаллизованный. Константу тушения флуоресценции (K) считали по формуле Штерна — Фольмера:

$$K = (I_0/I - 1)/c_M [5],$$

где I_0 и I — интенсивность флуоресценции без тушителя и в присутствии тушителя; c_M — молярная концентрация тушителя.

При регистрации разностных УФ-спектров записывали базовую линию в икале поглощения 0,02. Для этого в кюветы измерения и сравнения толщиной слоя 1 см заливали равные объемы по 3 мл (по весу) одного и того же раствора краустина в «нативном» состоянии с концентрацией $1,4 \cdot 10^{-5}$ М. После этого в кювету измерения добавляли 20 мкл раствора сахара, а в кювету — 20 мкл буфера и записывали разностный спектр. Концентрацию водного раствора сахара подбирали так, чтобы каждая его добавка к раствору краустина соответствовала 10-кратному молярному избытку сахара по отношению к краустину. Для избежания значительного разбавления краустина при титровании раствором сахара после достижения молярного соотношения краустин:сахар, равного 1:100, использовали в 20 раз более концентрированные растворы сахаров для получения соотношения краустин:сахар 1:1000.

Аналогичным образом регистрировали разностные спектры КД с помощью процессора DP-501N, используя раствор краустина с концентрацией $2 \cdot 10^{-5}$ М. Разностные спектры флуоресценции записывали с использованием стандартной программы вычитания спектров на флуориметре Hitachi-850 ($c_{\text{крауст}} = 2$ мкМ).

При титровании краустина использовали перекристаллизованные сахара: маннозу, фукозу, галактозу, N-ацетилглюкозамин (Chemapol, ЧССР) и N-ацетилглюкозамин-6-фосфат (Serva, ФРГ).

Антигенную активность краустина определяли с помощью модифицированного иммуноферментного метода [11].

Буферный раствор 1 для нанесения на планшет IgG против РЭА (основной раствор): 0,1 М NaHCO₃ с 0,15 М NaCl, рН 9,6; буферный раствор 2: 0,01 М фосфатный буфер с 0,15 М NaCl, рН 7,5; буферный раствор 3 для нанесения антигена (РЭА): буферный раствор 2 + 0,1% раствор бычьего сывороточного альбумина; буферный раствор 4 для нанесения конъюгата и отмывки: буферный раствор 2 + 0,05% твин 20; буферный раствор 5 для разведения и нанесения на планшет краустина: 0,01 М трис-HCl + 0,1% раствор бычьего сывороточного альбумина, рН 7,4, в этот раствор дополнительно вместе и в отдельности вводились NaCl и CaCl₂ (концентрации NaCl и CaCl₂ см. в обсуждении).

Порядок проведения иммуноферментного анализа. В лунки планшета (Dynatech, Швейцария) вносили по 200 мкл IgG против РЭА в буфере 1 в концентрации 50 мкг/мл

и инкубировали в течение ночи при 4° С. Избыток иммуноглобулинов отмывали буфером 2 три раза по 3 мин. Добавляли во все лунки по 200 мкл раствора РЭА в концентрации 100 мкг/мл. Инкубировали 1 ч при 37° С, избыток антигена отмывали как описано выше. После этого сразу добавляли по 200 мкл раствора крастацина в буфере 5 в концентрации 200 нг/мл. Инкубировали 1 ч при 37° С и избыток реагентов отмывали. Затем вносили во все лунки планшета конъюгат IgG против крастацина с пероксидазой (Биолар, Олайн, RZ 3,0) в разведении 1 : 300, инкубировали 1,5 ч при 37° С и планшет промывали. Вносили во все лунки по 200 мкл субстрата (0,08% 5-амипосалициловой кислоты (Merck, ФРГ) + 0,03% H₂O₂, рН 6,0) и инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре. Оптическое поглощение измеряли при 449 нм на спектрофотометре (Multiskan Lab Systems, Финляндия).

Активность определяли как $A/A_0 \cdot 100\%$, где A_0 и A — поглощение при 449 нм «нативного» крастацина и исследуемого образца.

ЛИТЕРАТУРА

1. Оводов Ю. С., Павленко А. Ф., Чикаловец И. В., Коржиков И. А. // Докл. АН СССР. 1987. Т. 293. С. 1009—1010.
2. Павленко А. Ф., Курика А. В., Чикаловец И. В., Белогорцева И. И., Оводов Ю. С. // Биоорган. химия. 1988. Т. 14. № 1. С. 58—64.
3. Horvitz J., Strickland E. H., Billups C. // J. Amer. Chem. Soc. 1970. V. 92. № 7. P. 2119—2124.
4. Лакович Дж. Основы флуоресцентной спектроскопии: Пер. с англ. М.: Мир, 1986.
5. Ejtink M. R., Ghiron C. A. // Analyt. Biochem. 1981. V. 114. P. 199—227.
6. Provencher C. W., Glöcker J. // Biochemistry. 1981. V. 20. № 1. P. 33—37.
7. Yamasaki N., Hatakeyama T., Funatsu G. // J. Biochem. 1985. V. 98. № 6. P. 1555—1560.
8. Yamasaki N., Absar N., Funatsu G. // Biochim. et biophys. acta. 1985. V. 828. P. 155—161.
9. Young N. M., Williams R. E. // Can. J. Biochem. and Cell Biol. 1985. V. 63. P. 266—274.
10. Паркер С. А. Фотолюминесценция растворов: Пер. с англ. М.: Мир, 1972.
11. Engvall E. // Meth. Enzymol. Immunochem. Techn. 1980. V. 70. Pt. A. P. 419—439.

Поступила в редакцию
4.II.1988
После доработки
19.VII.1988

RELATIONSHIP BETWEEN CONFORMATIONAL CHANGES OF CRUSTACIN MOLECULE AND ITS SPECIFIC BINDING WITH CARCINO-EMBRIONIC ANTIGEN (CEA)

GLAZUNOV V. P., TARANKOVA Z. A., ODINOKOV S. E., KURIKA A. V.,
PAVLENKO A. F.

*Pacific Institute of Bioorganic Chemistry, Far East Branch of the Academy
of Sciences of the USSR, Vladivostok*

Temperature-, ionic strength-, calcium ion- and pH-dependence of spatial structure of crustacin have been studied using CD and fluorescent spectroscopy. Secondary structure of crustacin was estimated by CD spectra. An irreversible conformational transition of crustacin's protein moiety connected with the loss of CEA-binding activity has been found at *ca.* 50° C. Crustacin is shown to be calcium-binding protein, stability of the native crustacin conformation being markedly enhanced by calcium ions (1 mM Ca²⁺ shifted up the transition temperature by ~10° C). Calcium binding and ionic strength increase led to alteration of both secondary and tertiary structures of crustacin. The highest CEA-binding activity was observed for the calcium-bound form of crustacin. A lack of specific interaction of crustacin with some saccharides was shown. Interrelation between conformation and immunochemical activity of crustacin is discussed.