



УДК 541.13+535.375.5

Р/С1
**АНОМАЛЬНО ИНТЕНСИВНЫЕ СПЕКТРЫ
КОМБИНАЦИОННОГО РАССЕЯНИЯ НЕКОТОРЫХ БИОЛОГИЧЕСКИХ
МОЛЕКУЛ, АДсорБИРОВАННЫХ НА СЕРЕБРЯНЫХ ЭЛЕКТРОДАХ**

Набиев И. Р.*Московский инженерно-физический институт***Траханов С. Д., Ефремов Е. С.***Институт биоорганической химии Академии наук СССР, Москва***Маринюк В. В., Лазоренко-Маневич Р. М.***Филиал Научно-исследовательского физико-химического
института им. Л. Я. Карпова, Обнинск*

Наблюдавшиеся впервые в работе [1] спектры КР адсорбированного на серебре пиридина имеют, как было установлено рядом исследователей [2–4], аномально высокую интенсивность. При исследовании механизма этого эффекта наиболее убедительные доказательства были получены в пользу резонансного комбинационного рассеяния (РКР), возникающего при адсорбции [5–7]. Кроме того, в работе [8] было показано, что РКР имеет место для молекул, взаимодействующих с адатомами металла (одни из дефектов кристаллической решетки металла). В спектрах поглощения поверхности серебра была обнаружена полоса, относящаяся к электронному переходу адатом – металл, ответственная за РКР адсорбата в красной области. Сечение аномально интенсивного КР сильно зависит от природы адсорбированных молекул. Этот эффект, как правило, наблюдался для ароматических и гетероциклических аминов [2, 9]. В связи с этим следует ожидать возникновения аномально интенсивных спектров КР адсорбированных на электродах белков и полипептидов, содержащих большое количество остатков ароматических аминокислот.

Нами впервые получены аномально интенсивные спектры КР некоторых аминокислот, лейцин-изолейцин-валинсвязывающего и лейцин-специфичного белков, адсорбированных на серебряных электродах. Все спектры КР, приведенные на рис. 1–3, получены при концентрации образцов 0,5–1,0 мг/мл, что на два порядка меньше рабочих концентраций при получении нерезонансных спектров КР белков и пептидов. В условиях, при которых проводилось получение спектров КР ароматических аминокислот, адсорбированных на серебряных электродах, алифатические аминокислоты лейцин и глутамин не дали аномально интенсивных спектров КР. Наблюдаемые спектры КР фенилаланина, триптофана, тирозина и гистидина, адсорбированных на серебряных электродах, содержат наряду с характерными для спектров КР этих аминокислот в объемной фазе

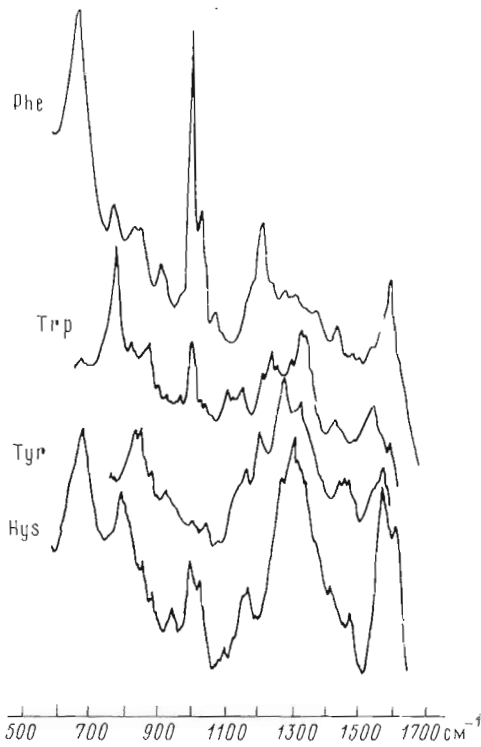


Рис. 1. Спектры КР ароматических аминокислот, адсорбированных на серебряных электродах, из растворов концентрации 0,5—1,0 мг/мл в 0,025 н. КСl при φ -0,6 В и pH 7,0

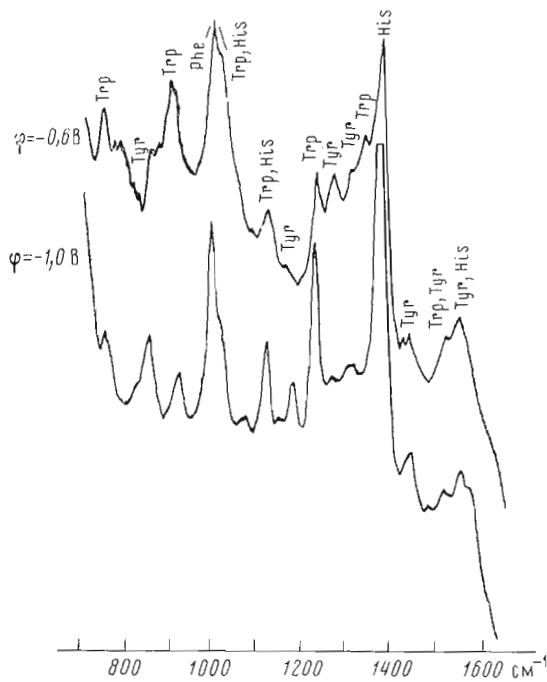


Рис. 2. Спектр КР лейцин-изолейцин-валинсвязывающего белка, адсорбированного на серебряном электроде, из раствора нативного белка концентрации 0,5 мг/мл в 0,025 н. КСl

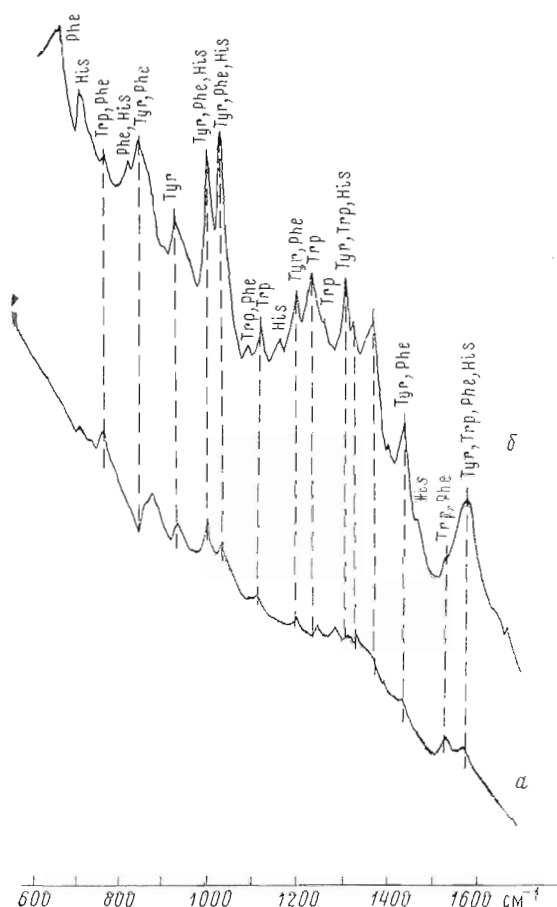


Рис. 3. Спектры КР лейцин-специфичного белка в комплексе с субстратом (а) и освобожденного от субстрата (б). Соотношение белок — субстрат в комплексе 1 : 2. Белок адсорбировался из раствора концентрации 0,5 мг/мл в 0,025 н. КСl при $\varphi = -0,6$ В и рН 7,0

интенсивными полосами (например, 761, 880 см^{-1} и т. д. для триптофана, дублет 830, 850 см^{-1} и т. д. для тирозина, 1004, 1032 см^{-1} и т. д. для фенилаланина [10]) ряд полос (например, полосы в области 1100–1400 см^{-1} для триптофана и тирозина и т. д.), либо появившихся при адсорбции соединений на электроде, либо сильно изменивших свою интенсивность (рис. 1). Точные отнесения частот полос в указанных спектрах КР аминокислот и белков будут приведены в следующей работе, поскольку описанная экспериментальная установка позволяет определить частоты с точностью, не превышающей 5–6 см^{-1} [3]. Появление новых и изменение отношений интенсивностей характеристических полос в спектрах КР аминокислот, адсорбированных на серебре, можно объяснить как влиянием адсорбции на колебания групп атомов ароматических колец, так и тем, что, согласно [8], интенсивность линий спектра КР адсорбированной молекулы в отличие от спектра молекулы в объеме определяется взаимодействием данного колебания с электронным переходом в системе адатом — металл. В связи с этим возможно изменение интенсивности колебаний групп атомов, образующих комплекс с адатомами, а также появление полос колебаний, не наблюдаемых в обычных спектрах КР.

Сходное объяснение может быть предложено для интерпретации зависимости отношений интенсивностей полос в спектрах КР от потенциала

на электроде. Изменение потенциала вызывает, вероятно, изменение ориентации ароматических колец относительно поверхности электрода, как это имеет место для пиридина [6]. Вследствие этого интенсивность полос колебаний групп атомов, приближающихся к поверхности электрода и образующих комплекс с адатомами, должна увеличиваться.

На рис. 3 приведены спектры КР лейцин-специфичного белка, свободного от субстрата (*L*-Leu) и в комплексе с субстратом, адсорбированных на серебряном электроде. Связывание с субстратом вызывает существенное изменение интенсивностей и частот полос, относимых нами на основании анализа аномально интенсивных спектров КР ароматических аминокислот, адсорбированных на серебре, к остаткам тирозина, триптофана и фенилаланина. Влияние связывания субстрата на частоты и интенсивности полос, относимых к гистидину, выражено слабее. Данные об участии остатков тирозина, триптофана и фенилаланина в образовании комплекса лейцин-специфичного белка с лейцином были получены ранее [11]; из анализа спектров КР водных его растворов был сделан вывод о том, что при комплексобразовании с лейцином от одного до трех тирозиновых остатков белка стаповаются водородносвязанными, являясь акценторами протонов, и увеличивается гидрофобность окружения остатка (ов) триптофана.

Таким образом, по спектрам КР белков, адсорбированных на электродных поверхностях, можно судить об изменениях состояний ароматических остатков.

Для возбуждения спектров КР использовали линию 632,8 нм He-Ne лазера ЛГ-38 мощностью 30 мВт. Рассеянный свет анализировали с помощью двойного монохроматора ДФС-12 и регистрировали фотоумножителем ФЭУ-79. Сигнал с ФЭУ подавался на усилитель В2-11 и затем на самописец. Схема установки описана в работе [3]. Electrodes механически полировали, обезжиривали кипячением в 2 н. NaOH, поляризовали катодным током и промывали бидистиллятом. Растворы готовили из перекристаллизованных солей и бидистиллята. Потенциалы указаны относительно хлорсеребряного электрода в насыщенном растворе KCl. Для увеличения сигнала КР поверхность электрода разрыхляли однократной анодной поляризацией в 0,1 н. KCl [1] при потенциале +100 мВ в течение 10–30 с. Спектры КР регистрировали до трех раз.

Лейцин-специфичный белок выделяли из *E. coli* К 12 согласно модифицированной методике [12]. Освобождение его от субстрата проводилось гель-фильтрацией в кислой среде (рН 3,0–3,5). Лейцин-изолейцин-валин-связывающий белок выделяли из смеси с лейцин-специфичным белком кристаллизацией при рН 5,0 в присутствии 2-метил-2,4-пентандиола.

ЛИТЕРАТУРА

1. Fleischmann M., Hendra P. J., McQuillan A. J. Raman spectra of pyridine adsorbed at silver electrode.— Chem. Phys. Lett., 1974, v. 26, № 2, p. 163–166.
2. Jeanmaire D. L., Van Duyne R. P. Surface Raman spectroelectrochemistry. Part 1. Heterocyclic, aromatic and aliphatic amines adsorbed on the anodized silver electrode.— J. Electroanalyt. Chem., 1977, v. 84, № 1, p. 1–20.
3. Маринюк В. В., Лазоренко-Маневич Р. М. О сечении КР адсорбированного на серебре пиридина.— Электрохимия, 1978, т. 14, № 3, с. 452–454.
4. Albrecht M. J., Creighton J. A. Anomalous intense Raman spectra of pyridine at a silver electrode.— J. Amer. Chem. Soc., 1977, v. 99, № 12, p. 5215–5217.
5. Pettinger B., Wenning U., Kolb D. M. Raman and reflectance spectroscopy of pyridine adsorbed on single crystalline silver electrodes.— Ber. Bunsenges. phys. Chem., 1978, v. 82, № 12, p. 1326–1331.
6. Маринюк В. В., Лазоренко-Маневич Р. М., Колодыркин Я. М. Резонансное комбинационное рассеяние адсорбированного на серебре пиридина.— Электрохимия, 1978, т. 14, № 7, 1019–1023.
7. Маринюк В. В., Лазоренко-Маневич Р. М. Механизм возникновения аномально интенсивного КР при адсорбции на электродах.— Электрохимия, 1980, т. 16, № 3, с. 332–339.

8. Маринюк В. В., Лазоренко-Маневич Р. М., Колодыркин Я. М. О роли адатомов металла в возникновении резонансного комбинационного рассеяния.— Докл. АН СССР, 1980, т. 253, № 1, с. 155–159.
9. Marinyuk V. V., Lazorenko-Manevich R. M., Kolotyркиn Ya. M. Nature of the interaction of adsorbate molecules with metal ad-atoms.— J. Electroanalyt. Chem., 1980, v. 110, № 1, p. 111–118.
10. Simons L., Bergström G., Blomfelt G., Forss S., Stenbäck H., Wansen G. Laser Raman spectroscopy of amino acids, oligopeptides, polypeptides and enzymes.— Comment. Phys.-Math., 1972, v. 42, № 3, p. 125–207.
11. Набиев И. Р., Траханов С. Д., Сурин А. М., Воробынцева Т. Н., Ефремов Е. С., Плагнев В. З. Исследование связывания субстратов лейцин-изолейцин-валинсвязывающим и лейцин-специфичным белками из *E. coli* методами оптической спектроскопии.— Матер. III СССР – ФРГ симпозиума по химии пептидов и белков, Махачкала, 2–6 октября 1980 г., с. 35.
12. Антонов В. К., Арсеньева Е. Л., Гаврилова Н. А., Гимодман Л. М., Крылова Ю. И. Новый способ выделения и некоторые свойства лейцинсвязывающего белка из кишечной палочки.— Биохимия, 1973, т. 38, № 8, с. 1294–1297.

Поступила в редакцию
16.XII.1980

SURFACE ENHANCED RAMAN SPECTRA OF SOME BIOLOGICAL MOLECULES ADSORBED AT SILVER ELECTRODES

NABIEV I. R., TRAKHANOV S. D., EFREMOV E. S.,
MARINYUK V. V., LASORENKO-MANEVICH R. M.

*Moscow Physical-Engineering Institute; M. M. Shemyakin Institute
of Bioorganic Chemistry, Academy of Sciences of the USSR, Moscow;
Branch of L. Ya. Karpov Institute of Physical Chemistry, Obninsk*

Surface enhanced Raman spectra of aqueous solutions of aromatic amino acids (phenylalanine, tryptophan, tyrosine and histidine), as well as of leucine-isoleucine-valine (LIV) binding and leucine-specific (LS) proteins adsorbed at silver electrodes were obtained. The concentrations of aqueous solutions of these compounds were 0,5-1,0 mg/ml, that is two orders of magnitude less than those required for obtaining the non-resonance Raman spectra of proteins and peptides. Surface enhanced Raman spectra were not observed for glutamine and leucine adsorbed at silver electrodes. The ratio of band intensities in Raman spectra was shown to change at various potentials. Tentative band assignments in the surface enhanced Raman spectra of LIV and LS proteins were proposed. The influence of substrate (*L*-Leu) binding by adsorbed LS protein on the state of its tryptophan, tyrosine and phenylalanine residues was observed.

Технический редактор Е. С. Кузьмишкина

Сдано в набор 20.03.81	Подписано к печати 27.04.81	Т-08444	Формат бумаги 70×108 ^{1/16}
Высокая печать	Усл.-печ. л. 14,0	Усл. кр.-отт. 12,5 тыс.	Уч.-изд. л. 14,8
	Тираж 880 экз.	Зак. 263	Бум. л. 5,0

Издательство «Наука», 103062, Москва, К-62, Подсосенский пер., 21
2-я типография издательства «Наука», 121099, Москва, Г-99, Шубинский пер., 10