



УДК 535.37

УЛЬТРАФИОЛЕТОВАЯ ФЛЮОРЕСЦЕНЦИЯ  
ЦЕРУЛОПЛАЗМИНА ЧЕЛОВЕКА.  
СПЕКТРАЛЬНЫЕ И ПОЛЯРИЗАЦИОННЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

*Туроверов Н. К., Резункова О. П., Кузнецова И. М.*

*Институт цитологии Академии наук СССР, Ленинград*

*Мошков К. А., Борисова О. П., Яковлев А. С.*

*Институт экспериментальной медицины Академии медицинских наук СССР,  
Ленинград*

Проведен сравнительный анализ флуоресцентных свойств препаратов медьсодержащего белка плазмы крови человека — церулоплазмينا, выделенных из различных источников сырья и различающихся по методам выделения и длительности хранения. Исследованные препараты незначительно различаются по квантовому выходу и положению максимумов спектров флуоресценции. По данным измерения степени поляризации флуоресценции, спонтанный ограниченный протеолиз препаратов церулоплазмينا не приводит в процессе их хранения к возникновению подвижности протеолитических фрагментов полипептидной цепи друг относительно друга в составе белковой глобулы. В процессе хранения существенно уменьшается устойчивость церулоплазмينا к различным денатурирующим воздействиям и ослабляется прочность связывания с белковой частью церулоплазмينا по крайней мере одного иона меди, по-видимому, входящего в состав «синего» медного хромофора. Отличительной особенностью спектра поляризации собственной УФ-флуоресценции церулоплазмينا является низкая (по сравнению с другими белками) степень поляризации в коротковолновой части, что обусловлено эффективным переносом энергии между ароматическими остатками в церулоплазмине. Установлено существование подвижности индольных колец в боковых цепях триптофановых остатков церулоплазмينا, которая характеризуется либо временем вращательной релаксации  $\rho \ll \tau_{\text{Фл}}$ , либо  $\rho$ , сопоставимым по величине с  $\tau_{\text{Фл}}$ , но не зависящим от вязкости растворителя.

Около 30 лет, с тех пор как было обнаружено снижение удельной оксидантной активности медьпротеида плазмы крови — церулоплазмينا (КФ 1.16.3.1) при наследственной гепатолентикулярной дегенерации [1], строение его медьсодержащих активных центров и механизмы их функционирования являются предметом интенсивных исследований (см. обзор [2]). Применение метода собственной УФ-флуоресценции позволило нам впервые получить данные о пространственной близости части триптофановых остатков к остаткам гистидина, ответственным за оксидантную активность церулоплазмينا, и к ионам меди [3]. Число триптофановых остатков этой группы достаточно велико. В холоцерулоплазмине флуоресценция этих остатков затухает ионами меди, в то время как в апоцерулоплазмине они флуоресцируют с  $\lambda_{\text{макс}}$  343 нм и высоким квантовым выходом. Другая группа триптофановых остатков не контактирует с ионами меди и определяет флуоресценцию холоцерулоплазмينا.

Задачей настоящей работы было: 1) сопоставление флуоресцентных и других физико-химических свойств ряда препаратов церулоплазмينا с различным содержанием меди с целью анализа особенностей тушащего действия ионов меди; 2) проверка ранее наблюдавшегося нами явления двукратного возрастания квантового выхода триптофановых остатков при полном удалении меди [3] в связи с появлением работы Фримена и Даниеля [4], согласно которой соответствующая величина равна лишь 30%; 3) измерение поляризационных характеристик церулоплазмينا с целью

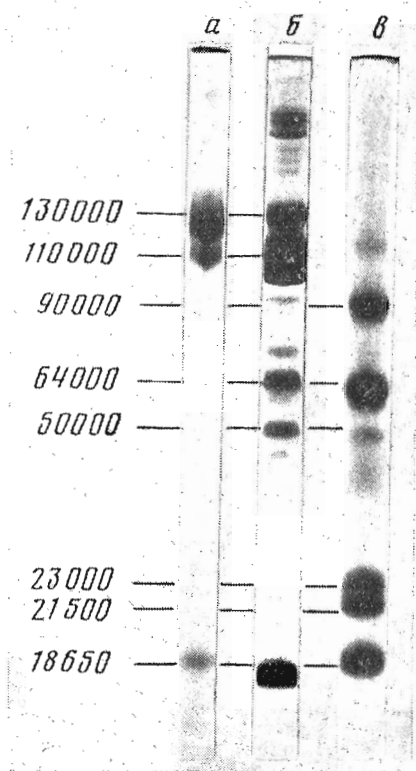


Рис. 1

Рис. 1. Электрофорез препаратов церулоплазмينا в 5,6% полиакриламидном геле, содержащем 1% SDS: а, б — свежeweделенные препараты церулоплазмينا (II) и (I) соответственно; в — церулоплазмин (I) после 3,5 лет хранения в стерильных условиях

Рис. 2. Температурная зависимость интенсивности флуоресценции  $I_{365}$  (а) и параметра  $A$  (б) различных препаратов церулоплазмينا: 1 — свежeweделенные препараты церулоплазмينا (I) и (II); 2 — церулоплазмينا (I) после 3,5 лет хранения

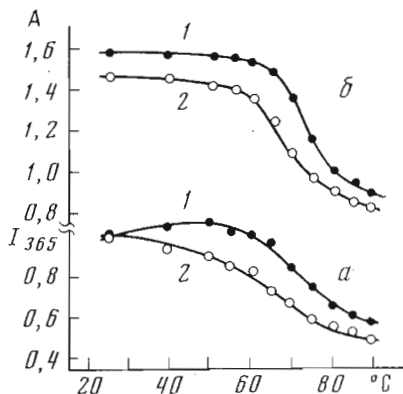


Рис. 2

обнаружения и исследования возможной внутримолекулярной подвижности в белке; 4) изучение процессов переноса энергии возбуждения, эффективность которого можно ожидать очень высокой в связи с необычайно большим содержанием (по сравнению с другими белками) триптофановых, тирозиновых и фенилаланиновых остатков в церулоплазмине [5].

В ходе экспериментальной проверки выводов работы [4] было обнаружено, что различные препараты церулоплазмينا, который, как известно, является весьма лабильным белком [6], могут значительно различаться по оксидазной активности, соотношению  $D_{610}/D_{278}$  и чувствительности к денатурирующим воздействиям. В связи с этим нами был проведен сравнительный анализ флуоресцентных и других физико-химических свойств препаратов церулоплазмينا, различающихся по источнику сырья (свежая донорская кровь или хранившаяся фракция плазмы крови IV-1 по Кону), особенностям метода выделения (применение на конечном этапе очистки гель-фильтрации или кристаллизации) и длительности хранения в стерильных условиях.

Препараты церулоплазминов (I) и (II), выделенные из различных источников различными методами, различаются как по величине оксидазной активности (см. «Экспериментальную часть»), так и по степени спонтанной агрегации молекул и степени протеолитической фрагментации (рис. 1а, б) [7]. Однако ни эти различия, ни длительное (3,5 года) хранение препарата церулоплазмينا (I) в стерильных условиях при 4–5° С, приводящее к значительному уменьшению оксидазной активности (до  $\Delta D_{530} = 19$  ОЕ/мг белка/ч), соотношения  $D_{610}/D_{278}$  (до 0,027) и к усилению протеолитической фрагментации (рис. 1в), не сказываются существенным образом на интенсивности (квантовом выходе) и положении спектра флуоресценции. Так, интенсивность флуоресценции растворов свежeweделенного и длительно хранившегося препарата церулоплазмينا (I) меньше интенсивности флуоресценции раствора свежeweделенного препарата

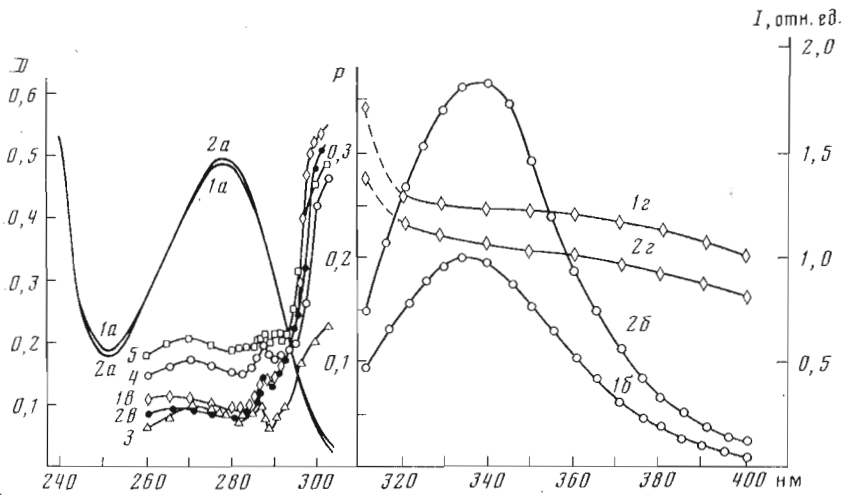


Рис. 3. Спектрально-флуоресцентные и поляризационные характеристики церулоплазмينا: *a* – спектры поглощения (концентрация белка 0,33 мг/мл), *б* – флуоресценции ( $\lambda_{\text{возб}}$  296,8 нм), *в* – поляризации флуоресценции по возбуждению ( $\lambda_{\text{рег}}$  365 нм), *г* – поляризации флуоресценции по излучению ( $\lambda_{\text{возб}}$  296,8 нм). 1 – холо- и 2 – апоцерулоплазмий соответственно, 25° С, рН 7,0, 3 – спектр поляризации флуоресценции церулоплазмينا в 8 М мочевины, 4 – то же в водном растворе при рН 2,85 и 5 – при рН 7,0 после прогревания в течение 2 ч при 90° С

церулоплазмينا (II) приблизительно лишь на 5%. Для характеристики положения и формы спектров флуоресценции в работе использовался параметр  $A = (I_{320}/I_{365})_{296,8}$  [8], где  $I_{320}$  и  $I_{365}$  – интенсивности флуоресценции при длинах волн регистрации 320 и 365 нм и возбуждении излучением с длиной волны 296,8 нм. Для свежевыделенных препаратов церулоплазмينا (I) и (II) и хранившегося препарата церулоплазмينا (I) величина  $A$  оказалась соответственно равной 1,58; 1,66 и 1,46. Все исследованные препараты также мало различаются по степени поляризации флуоресценции ( $P=0,220$ ). Последнее свидетельствует о том, что спонтанный ограниченный протеолиз полипептидной цепи церулоплазмينا [7] не только не сопровождается отделением протеолитических фрагментов от глобулы, но и не приводит к возникновению подвижности этих фрагментов друг относительно друга в составе глобулы.

В значительно большей степени возникновение этих разрывов сказывается на устойчивости церулоплазмينا к различным денатурирующим воздействиям. Наиболее отчетливо это показывает сравнение температурных зависимостей интенсивности флуоресценции и параметра  $A$  различных препаратов церулоплазмينا (рис. 2): тепловая денатурация хранившегося препарата церулоплазмينا (I) происходит при температуре на 8–10° С более низкой, чем свежевыделенных препаратов церулоплазмينا (I) и (II), которые по температуре денатурации близки друг к другу. Об усилении чувствительности церулоплазмينا к различным воздействиям при хранении препарата говорит и следующий факт. Обнаружено, что при работе с препаратом церулоплазмينا (I) недостаточно строгое соблюдение оптимальных условий процедуры удаления меди (величины рН и концентрации NaCN или дитилдитиокарбамата натрия, длительности диализа и др.) приводит к частичной денатурации белка, которая может быть выявлена, например, по уменьшению соотношения  $D_{278}/D_{250}$  в УФ-спектре поглощения.

Таким образом, прирост интенсивности флуоресценции апоцерулоплазмينا по сравнению с холоцерулоплазмином определяется двумя эффектами: возрастанием интенсивности за счет удаления меди и падением интенсивности вследствие денатурации белка. По-видимому, именно этим можно объяснить различие результатов нашей работы [3] и работы Фримена и Даниеля [4]. Такое объяснение весьма вероятно, поскольку дан-

ные Фримепа и Даниеля о том, что при полном удалении меди интенсивность флуоресценции увеличивается лишь на 30%, получены для коммерческого препарата церулоплазмينا, для которого отсутствует детальный предварительный анализ степени протеолитической фрагментации и других свойств. Сопоставление интенсивностей флуоресценции холо- и апоформ свежевыделенных препаратов церулоплазмينا (I) и (II) при тщательном наблюдении условий эксперимента (см. «Экспериментальную часть») подтвердило установленный нами ранее факт двукратного возрастания квантового выхода и длинноволнового сдвига триптофановой флуоресценции на 5 нм при полном удалении меди [3].

Как уже отмечалось, хранение препарата церулоплазмينا (1) приводит к снижению соотношения  $D_{610}/D_{278}$ , что свидетельствует об уменьшении поглощения так называемых синих медных хромофоров типа 1, обусловленных переходом с переносом заряда  $S \rightarrow Cu$  ( $\lambda_{max} = 510$  нм,  $\epsilon_M = 1 \cdot 10^4$  M<sup>-1</sup> см<sup>-1</sup>) [9]. Этот процесс не сопровождается диссоциацией комплексов ионов меди с церулоплазмином, так как общее содержание меди в процессе хранения остается постоянным — 6 атом/моль белка. Однако прочность этих комплексов ослабевает в такой степени, что один из ионов меди может быть удален пропусканием белкового раствора через ионообменник «Chelex-100». Интенсивность флуоресценции при этом возрастает на 7–8%. Естественно предположить, что при этом удаляется ион меди, который первоначально входил в состав хромофора типа 1.

Если спектры флуоресценции церулоплазмينا были уже предметом изучения [3, 4, 10], то исследование поляризации УФ-флуоресценции церулоплазмينا предпринято в настоящей работе впервые. Спектры поляризации по возбуждению и излучению растворов церулоплазмينا (рис. 3) имеют вид, характерный для других триптофансодержащих белков. Как известно [11–14], такая сложная форма поляризационного спектра по возбуждению объясняется тем, что за длинноволновую полосу поглощения этих соединений ответственны два спектрально перекрывающихся электронных перехода: так называемые переходы  $'L_a \leftarrow A$  и  $'L_b \leftarrow A$ , по терминологии Платта [15]. Абсолютная величина степени поляризации на длинноволновом конце спектра поляризации, где: пренебрежимо мал вклад в поглощение тирозиновых остатков (см., например, [16]); за поглощение ответствен лишь излучающий осциллятор  $'L_a$  [12] и нет гомопереноса энергии между триптофановыми остатками (эффект «красного края» Вебера [11]); достаточно высокая, но все же ниже величины предельной поляризации  $P_0$  для низкомолекулярных модельных соединений, содержащих индольное кольцо. При возбуждении флуоресценции излучением с  $\lambda_{возб}$  296,8 нм и регистрации флуоресценции при длине волны  $\lambda_{рег}$  365 нм для триптофана, глицил-триптофана и N-ацетилтриптофана величина  $P_0$  равна 0,26 [17]; а степень поляризации для холо- и апоформ церулоплазмينا составляет 0,220 и 0,195 соответственно.

Отличительной особенностью спектра поляризации церулоплазмينا является низкая (по сравнению с другими триптофансодержащими белками) степень поляризации в коротковолновой области. Величина отношения  $P_{275}/P_{300}$ , которая может служить характеристикой формы поляризационного спектра, составляет 0,200 и 0,161 для холо- и апоформ соответственно. Значения этой величины, например, для бычьего сывороточного альбумина равны 0,481, для трипсина 0,553 и для триптофана 0,732 [17]. Вебер рассматривает два фактора, влияющих на форму поляризационного спектра: перенос энергии, а точнее, зависимость его эффективности от длины волны возбуждающего света, и зависимость относительного вклада полос поглощения осциллятора  $'L_a$  и  $'L_b$  от свойств микроокружения, в котором находятся триптофановые остатки [11]. Как показано в работах [17, 18], еще одним не рассматривавшимся ранее фактором, влияющим на форму поляризационного спектра, является анизотропия вращательного движения триптофановых остатков, которая определяется ориентацией осцилляторов  $'L_a$  и  $'L_b$  относительно оси внутреннего вращения и анизотропией броуновского вращательного движения макромолекулы белка как целого.

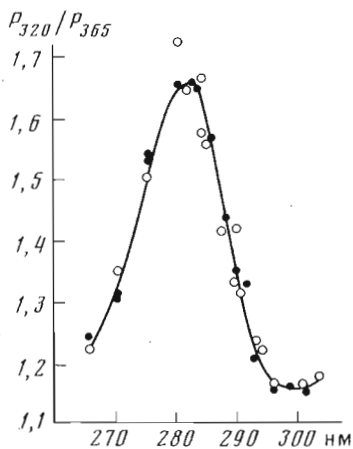


Рис. 4

Рис. 4. Зависимость величины отношения  $P_{320}/P_{365}$  от  $\lambda_{\text{возб}}$  для холо- (черные точки) и апоэритроплазмина (светлые точки)

Рис. 5. Перреновская зависимость для церулоплазмينا: а — холо-, б — апоэритроплазмин;  $\lambda_{\text{рег}}$  365 нм; 1 —  $\lambda_{\text{возб}}$  296,8 нм, 2 —  $\lambda_{\text{возб}}$  300,0 нм

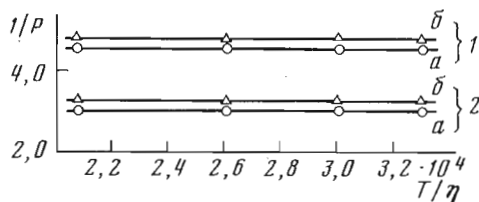


Рис. 5

Из ряда факторов, которые могут оказывать влияние на форму поляризационного спектра триптофансодержащих белков, определяющим в случае церулоплазмина, по-видимому, является перенос энергии между триптофановыми остатками и от тирозиновых и фенилаланиновых остатков к триптофановым. Справедливость этого предположения представляется весьма вероятной ввиду того, что в макромолекуле церулоплазмина очень велико относительное содержание ароматических аминокислот (49 фенилаланиновых, 64 тирозиновых и 22 триптофановых остатка на макромолекулу с молекулярным весом 130 000 [5]).

Подтверждение существенной роли переноса энергии возбуждения в деполаризации флуоресценции церулоплазмина может дать сопоставление степени поляризации в коротковолновой и длинноволновой частях спектра при денатурации церулоплазмина, вызванной 8 М мочевиной, нагреванием и при переходе в область кислых значений pH (рис. 3). Свидетельством денатурации является существенное уменьшение параметра  $A$ . При этом степень поляризации на длинноволновом крае спектра, как и следовало ожидать, уменьшается за счет увеличения подвижности триптофановых остатков. В коротковолновой области имеет место наложение двух эффектов: уменьшение степени поляризации за счет увеличения подвижности триптофановых остатков и возрастание степени поляризации вследствие нарушения условий, благоприятствующих эффективному переносу энергии в нативной макромолекуле церулоплазмина.

Зависимости  $P=P(\lambda_{\text{рег}})$  для церулоплазмина (см. рис. 3, 1з и 2з) также имеют вид, характерный для других триптофансодержащих белков: степень поляризации монотонно убывает по спектру излучения с увеличением длины волны [18, 19]. Основной причиной изменения степени поляризации по спектру излучения является изменение для различных  $\lambda_{\text{рег}}$  комбинирующих колебательных подуровней возбужденного и основного электронных состояний, между которыми осуществляется переход с излучением и за счет этого изменение угла между дипольными моментами переходов в поглощении и излучении [19].

Характер зависимости  $P=P(\lambda_{\text{рег}})$  не дает никаких оснований для предположения об участии осциллятора  $L_c$  в излучении. Резкий подъем степени поляризации при переходе от 320 к 310 нм обусловлен вкладом рассеянного света при приближении к длине волны возбуждения. Удобной характеристикой крутизны зависимости  $P=P(\lambda_{\text{рег}})$  является величина отношения  $P_{320}/P_{365}$ . Зависимость этого отношения от  $\lambda_{\text{возб}}$  (рис. 4) аналогична зависимости, полученной для водно-глицеринового раствора, содержащего смесь триптофана и тирозина. Величина отношения  $P_{320}/P_{365}$  практически не зависит от  $\lambda_{\text{возб}}$  для триптофана и других производных индола [18]. Таким образом, при регистрации флуоресценции церулоплазмина в коротковолновой части спектра существенным фактором, влияю-



щим на форму поляризационного спектра и наклон зависимости  $P = P(\lambda_{\text{рег}})$ , является вклад тирозиновых остатков в суммарное излучение. Возрастание величины  $P_{320}/P_{365}$  при  $\lambda_{\text{возб}} > 300$  нм обусловлено вкладом рассеянного возбуждающего света при  $\lambda_{\text{рег}} 320$  нм.

Наклон зависимостей  $1/P = f(T/\eta)$ , где  $T$  и  $\eta$  — температура и вязкость растворителя, оказался практически равным нулю (рис. 5). Это свидетельствует о том, что время вращательной релаксации макромолекулы церулоплазмينا как целого много больше времени жизни возбужденного состояния триптофановых остатков  $\tau_{\text{фл}}$ ; в церулоплазмине отсутствуют внутримолекулярные движения с временами вращательной релаксации  $\rho$ , зависящими от вязкости растворителя и сопоставимыми по величине с  $\tau_{\text{фл}}$ . Расчетные значения времени вращательной релаксации церулоплазмينا, определенные на основании данных о размере гидратированной макромолекулы церулоплазмينا ( $V = 270$  нм<sup>3</sup> [20]), равны при 25°С 175 и 303 нс в воде и в 20% глицерине соответственно. Данные о величине  $\tau_{\text{фл}}$  для церулоплазмينا отсутствуют. Если принять, что  $\tau_{\text{фл}}$  составляет, как и для большинства других триптофаносодержащих белков, 2—5 нс [16], то в интервале изменения  $T/\eta$   $3,34 \cdot 10^4$ — $1,94 \cdot 10^4$  К·пз<sup>-1</sup> (водно-глицериновые растворы с содержанием глицерина 0—20%) расчетное изменение величины  $P$  за счет броуновского вращательного движения макромолекулы церулоплазмينا как целого будет составлять около 2%, т. е. ожидаемый наклон зависимости  $1/P = f(T/\eta)$  весьма мал.

Величина отрезка  $1/P'_0$ , отсекаемого на оси ординат при экстраполяции зависимости  $1/P = f(T/\eta)$  к нулевым значениям  $T/\eta$ , для церулоплазмينا оказалась больше соответствующего значения для низкомолекулярных модельных соединений — триптофана, N-ацетилтриптофана и глицилтриптофана. Это свидетельствует о существовании внутримолекулярной подвижности триптофановых остатков с временем вращательной релаксации  $\rho$ , много меньшим времени жизни возбужденного состояния ( $\rho \ll \tau_{\text{фл}}$ ) [21], или подвижности триптофановых остатков, недоступных растворителю, с временем релаксации  $\rho$ , сопоставимым по величине с  $\tau_{\text{фл}}$  и не зависящим от вязкости растворителя.

### Экспериментальная часть

Было произведено сравнение двух препаратов церулоплазмينا.

Препарат церулоплазмينا (I) был выделен с помощью метода [22] из фракции плазмы крови IV-1 по Кону, которая хранилась 1—1,5 мес при -20°С. Конечным этапом очистки служила кристаллизация церулоплазмينا. Кристаллически чистый церулоплазмин (I) характеризовался соотношением  $D_{610}/D_{278}$ , равным 0,047, удельной оксидазной активностью  $\Delta D_{530} = 24$  ОЕ/мг белка/ч и наличием на электрофореграмме трех оксидазоположительных белковых зон, главная из которых соответствовала мономерам церулоплазмينا с молекулярным весом 130 000, а минорная — димерам и тримерам белка [23]. Картина электрофоретического разделения церулоплазмينا (I) в полиакриламидном геле в присутствии 1% SDS представлена на рис. 16. Препарат церулоплазмينا (I) в 0,05 М Na-ацетатном буфере, pH 7,0, хранили в стерильно запаянных ампулах при 4—5°С, которые вскрывали непосредственно перед проведением опытов.

Препарат церулоплазмينا (II) был выделен с помощью метода [24] из свежей донорской крови. Конечным этапом очистки служила гель-фильтрация на сефадексе G-200, что позволило получить монодисперсный препарат, который, по данным электрофореза, содержал одну оксидазоположительную зону, соответствующую мономерам церулоплазмينا. Препарат церулоплазмينا (II) характеризовался соотношением  $D_{610}/D_{278}$ , равным 0,047, и удельной оксидазной активностью  $\Delta D_{530} = 30$  ОЕ/мг белка/ч. Картина электрофоретического разделения церулоплазмينا (II) в полиакриламидном геле в присутствии 1% SDS представлена на рис. 1а.

Анализ свежих препаратов церулоплазмينا (I) и (II) был проведен в течение 1 недели после их получения.

Оксидазную активность церулоплазмينا определяли по методу Рейвина [25] с применением в качестве субстрата *n*-фенилендиамина и выражали в единицах прироста оптической плотности инкубационной смеси  $\Delta D_{530}$  в расчете на 1 мг белка за 1 ч.

Концентрацию церулоплазмينا определяли микробиуретовым методом [26].

Содержание меди в церулоплазмине определяли с помощью атомно-абсорбционного спектрофотометра «Perkin-Elmer», модель 503 (Англия).

Удаление меди из церулоплазмينا осуществляли тремя методами.

1. Растворы церулоплазмينا с концентрацией 1—3 мг/мл при 40° С диализовали против 0,04 М Na-ацетатного буфера, рН 5,5, или 0,2 М Na-ацетатного буфера, рН 7,0, содержащего 0,1 М NaCl. Оба буфера содержали 0,05 М NaCN. После добавления в буферные растворы навески NaCN указанные значения рН устанавливали путем добавления нужного количества ледяной уксусной кислоты. После удаления меди белковые растворы диализовали против 0,2 М Na-ацетатного буфера, рН 7,0, содержащего 0,1 М NaCl.

2. Раствор церулоплазмينا с концентрацией 1—3 мг/мл обесцвечивали кристалликом аскорбиновой кислоты и при 4° С диализовали против 0,2 М Na-ацетатного буфера, рН 7,0, содержащего 0,1 М NaCl и 2—3 мг/мл диэтилдитиокарбамата натрия. Затем взвесы комплексов диэтилдитиокарбамата натрия с медью осаждали центрифугированием (центрифуга «Spinco», модель L2-65B, ротор Тi-50) при 40 000 об/мин в течение 1 ч и супернатант пропускали через колонку (1×5 см) с ионообменником IRA-400 в ацетатной форме.

3. Для удаления слабо связанных с церулоплазмином ионов меди белковые растворы пропускали через колонку (1×3 см) с ионообменником «Chelex-100».

Электрофорез в градиентном (3—30%) полиакриламидном геле и в 5,6% геле, содержащем 1% SDS, проводили согласно работам [7, 23].

Люминесцентные измерения выполнены на спектрофлуориметрической установке, описанной в работе [27]. В качестве источника возбуждающего света использовали ртутную лампу типа ДРШ-250-2М. Спектры флуоресценции и значения параметра *A* исправлены на спектральную чувствительность установки.

Степень поляризации флуоресценции измеряли при возбуждении линейно поляризованным светом в направлении, перпендикулярном направлению распространения возбуждающего света, и определяли из соотношения

$$P = (I_V^V - kI_H^V)/(I_V^V + kI_H^V)$$

где  $k = I_V^H/I_H^H$  — поправочный коэффициент, учитывающий различие чувствительности регистрирующей системы установки к вертикальной (V) и горизонтальной (H) составляющей флуоресценции. Индексы указывают направление колебаний электрического вектора составляющей излучения, проходящей через поляризатор (верхний индекс) и анализатор (нижний индекс). В качестве поляризатора и анализатора были использованы интерференционные поляризационные призмы для УФ-области спектра [28].

В качестве вязкого компонента использовали глицерин (ч.д.а.), очищенный активированным углем и пропущенный через миллипоровый фильтр. Очистка позволила получить глицерин с достаточно низким уровнем поглощения и свечения в рабочих областях спектра. Содержание глицерина в растворах (их вязкость) контролировали по показателю преломления с помощью рефрактометра типа Аббе (Carl Zeiss, ГДР). Все измерения выполнены при 25,0±0,1° С.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Markowitz H., Gubler D. J., Mahoney J. P., Cartwright G. E., Witrobe M. M. J. Clin. Invest., 1955, v. 34, № 7, p. 1498—1504.
2. Нейфак С. А., Шавловский М. М. В кн.: Прогресс в медицинской гелетике. М.: Медицина, 1978, с. 106—150.

3. Семисотнов Г. В., Мошков К. А., Туроверов К. К., Шавловский М. М. Биоорганическая химия, 1976, т. 2, № 3, с. 413-421.
4. Fresten S., Daniel E. Biochim. et biophys. acta, 1978, v. 534, № 1, p. 132-140.
5. Rydén L., Björk I. Biochemistry, 1976, v. 15, № 16, p. 3411-3417.
6. Laurie S. H., Mohammed E. S. Coord. Chem. Rev., 1980, v. 33, № 3, p. 279-312.
7. Мошков К. А., Каримова Х. М., Нейфах С. А., Лакагош С., Хайду Я., Заводски П., Самсоидзе Т. Г., Киселев Н. А. Биоорганическая химия, 1979, т. 5, № 3, с. 395-407.
8. Туроверов К. К., Щелчков Б. В. Биофизика, 1970, т. 15, № 6, с. 965-972.
9. Peisach J. In: Mechanisms Oxid. Enzymes / Eds Singer T. P., Ondarza R. N. N. Y.: Elsevier / North Holland, 1978, p. 285-306.
10. Salvato B., Jori G. Bull. Mol. Biol. Med., 1976, v. 1, p. 97-106.
11. Weber G. Biochem. J., 1960, v. 75, № 2, p. 345-352.
12. Valeur B., Weber G. Photochem. Photobiol., 1977, v. 25, № 5, p. 441-444.
13. Конев С. В. Электронно-возбужденные состояния биополимеров. Минск: Наука и техника, 1965.
14. Черницкий Е. А. Люминесценция и структурная лабильность белков в растворе и клетке. Минск: Наука и техника, 1972.
15. Platt J. R. J. Chem. Phys., 1949, v. 17, № 2, p. 484-492.
16. Бурштейн Э. А. Собственная люминесценция белка (Природа и применение). Итоги науки и техники. Сер. биофиз., т. 7. М.: ВИНТИ, 1977.
17. Кузнецова И. М., Кирик И. И., Туроверов К. К. Молекулярная биология, 1981, т. 15, № 5, с. 989-999.
18. Кузнецова И. М. Исследование собственной УФ-флуоресценции для изучения внутримолекулярной подвижности в белках методом вращательной поляризации. Автореф. канд. дис. / Институт фотобиологии АН БССР. Минск: 1982. 17 с.
19. Саржевский А. М., Севченко А. Н. Анизотропия поглощения и испускания света молекулами. Минск: Изд-во БГУ, 1971.
20. Зайцев В. Н., Наумов А. П., Мошков К. А. Кристаллография, 1980, т. 25, № 1, с. 174-177.
21. Ануфриева Е. В., Готлиб Ю. Я., Краковяк М. Г., Скороходов С. С. Высокомолек. соед., 1972, т. 14А, № 6, с. 1430-1450.
22. Morrell A. G., Van Den Hamer C. J. A., Scheinberg I. H. J. Biol. Chem., 1969, v. 244, № 13, p. 3494-3496.
23. Мошков К. А., Яковлев А. С., Маслов В. Г. Биоорганическая химия, 1980, т. 6, № 3, с. 413-425.
24. Rydén L. FEBS Lett., 1971, v. 18, № 2, p. 321-325.
25. Ravin H. A. J. Lab. Clin. Med., 1961, v. 58, № 1, p. 161-168.
26. Кочетов Г. А. Практическое руководство по энзимологии. М.: Высшая школа, 1971, с. 310-311.
27. Гусев Е. В., Туроверов К. К., Розанов Ю. М., Волосов П. С. В сб.: Функциональная морфология, генетика и биохимия клетки. Л.: Наука, 1974, с. 364-366.
28. Соколова Р. С., Крылова Т. Н. Оптика и спектроскопия, 1963, т. 14, № 2, с. 401-408.

Поступила в редакцию

20.I.1982

После доработки

15.III.1982

## ULTRAVIOLET FLUORESCENCE OF THE HUMAN CERULOPLASMIN. SPECTRAL AND POLARIZATION CHARACTERISTICS

TUROVEROV K. K., REZUNKOVA O. P., KUZNETZOVA I. M.,  
MOSHKOV K. A., BORISOVA O. P., YAKOVLEV A. S.

*Institute of Cytology Academy of Sciences of the USSR and Institute  
of Experimental Medicine, Academy of Medical Sciences  
of the USSR, Leningrad*

A comparative analysis was carried out of the fluorescence properties of various preparations of human copper-protein — ceruloplasmin (CP), differing in sources, isolation procedures, or in duration of storage. According to the fluorescence polarization data, spontaneous limited proteolysis of the CP-samples during their isolation and storage do not lead to the mobility of the proteolytic fragments of the polypeptide chain. However, the susceptibility towards various denaturants is considerably increased, whereas the stability of binding of at least one copper ion to the protein moiety of CP is noticeably weakened on storage. A characteristic feature of the polarization spectrum is low polarization in the shortwave-length region of the spectrum due to energy migration between the aromatic residues in CP. The mobility of the CP tryptophan side chains was disclosed, which may be described either by the rotational relaxation time  $\rho \ll \tau_n$ , or by  $\rho$  value comparable to  $\tau_n$  and independent of the solvent viscosity.