

мы направленности нормирована на единицу в максимальном значении. Во всех случаях $k=1$, а уравнение плоскости имеет вид $x=x_0$, плоская волна распространяется параллельно плоскости $y=0$, в случае сферической волны источник расположен в той же плоскости $y=0$. На всех рисунках кривая 1 является сечением диаграммы плоскостью $y=0$, кривая 2 — сечением диаграммы плоскостью $y=x$.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

[1] Кравцов В. В. // Вестн. Моск. ун-та. Сер. 15, Вычислит. матем. и кибернетика. 1977. № 2. С. 78—81.

Поступила в редакцию 25.11.85

ВЕСТН. МОСК. УН-ТА. СЕР. 3, ФИЗИКА. АСТРОНОМИЯ. 1986. Т. 27. № 5

УДК 539.196.3; 547.466; 547.962:538.955

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ВОДЫ С АМИНОКИСЛОТАМИ И БЕЛКАМИ, ИЗУЧЕННОЕ МЕТОДАМИ ЯМР-РЕЛАКСАЦИИ

Н. Г. Вострикова, В. П. Денисов, Ю. М. Петрусевич, О. П. Ревокатов

(кафедра молекулярной физики)

Взаимодействие в системе белок—вода, интенсивно исследуемое многими авторами [1], в последнее время вызывает все больший интерес. Молекулярный механизм этого взаимодействия до сих пор еще недостаточно изучен.

Известно, что в растворе биополимера часть воды связана с его поверхностью, в результате чего ее молекулярное движение заторможено. Различают фракции свободной воды с невозмущенным временем вращательной корреляции молекул τ_1^{BP} и связанной воды, время корреляции которой увеличено из-за взаимодействия с белком. Кроме того, было показано [1, 2], что связанная вода не может рассматриваться как единая фракция, а состоит как минимум из двух компонент, обладающих различными временами корреляции. Эти фракции можно характеризовать как прочно связанную воду (обладающую наибольшим временем корреляции τ_3^{BP}) и слабо связанную воду с τ_2^{BP} .

Скорости спин-решеточной (R_1) и спин-спиновой (R_2) магнитной релаксации протонов i -й фракции даются выражениями [3, 4]

$$R_1^i \equiv \frac{1}{T_1^i} = M \left[\frac{\tau_i}{1 + \omega^2 \tau_i^2} + \frac{4\tau_i}{1 + 4\omega^2 \tau_i^2} \right],$$

$$R_2^i \equiv \frac{1}{T_2^i} = M \left[1,5\tau_i + \frac{2,5\tau_i}{1 + \omega^2 \tau_i^2} + \frac{\tau_i}{1 + 4\omega^2 \tau_i^2} \right],$$

где M — второй момент диполь-дипольного взаимодействия протонов воды, ω — резонансная частота, τ_i — эффективное время корреляции молекулы i -й фракции, равное [5, 6]

$$\tau_i = \tau_i^{BP} \cdot \tau_i^{JK} / (\tau_i^{BP} + \tau_i^{JK}),$$

где τ_i^{JK} — среднее время жизни молекулы в i -й фракции.

В растворе происходит быстрый протонный и молекулярный обмен между всеми фракциями воды, в результате чего в спектре ЯМР наблюдается лишь одна линия воды, скорости релаксации которой [7]

$$R_1 = \sum q_i R_1^i, \quad R_2 = \sum q_i R_2^i,$$

где q_i — относительная заселенность i -й фракции.

В настоящее время нет единого мнения о том, какие взаимодействия воды с белком определяют принадлежность воды к каждой из фракций. Обычно считают, что слабо связанная вода состоит из молекул, взаимодействующих с полярными аминокислотными остатками на поверхности белка. Прочно связанной считают воду, молекулы которой не вращаются относительно белка. Воду, взаимодействующую с заряженными остатками, относят как к одной, так и к другой фракции.

Цель данной работы — исследование зависимости скоростей релаксации растворов белков и аминокислот от величины заряда на их поверхности, которая определяется заданным значением рН раствора.

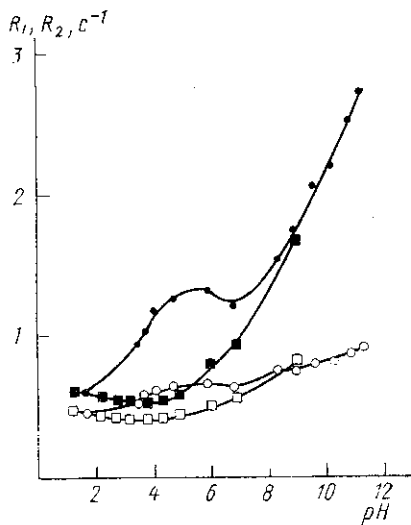
В работе использовались белки лизоцим и бычий сывороточный альбумин, а также аминокислоты аланин, аргинин и глутаминовая кислота, которые разводились в растворах HCl или NaOH различной концентрации. Времена релаксации T_1 и T_2 измерялись на приборе «Miniresc РС-20» на частоте 20 МГц при $T=40^\circ\text{C}$ по стандартным программам. Применялось 25-кратное накопление для улучшения воспроизводимости результатов, при этом ошибка не превышала 1—2%.

Проведенные измерения показывают, что скорости спин-спиновой и спин-решеточной релаксации воды в растворах белков лизоцима и альбумина имеют явно выраженную зависимость от значения pH в области нативности растворенных белков (рис. 1). Спад кривой для раствора альбумина при $\text{pH} < 4$ связан с его денатурацией в кислой среде при $T=40^\circ\text{C}$ [8].

Полученные результаты позволяют предположить, что изменение числа заряженных центров на поверхности белка влияет на количество связанной воды или на ее время корреляции (или на оба этих параметра).

Число заряженных центров на молекуле белка определяется степенью ионизации отдельных аминокислотных остатков, выходящих на поверхность молекулы (в основном лизина, аргинина, глутаминовой и аспарагиновой кислот). По-видимому, именно заряженные центры, входящие в состав указанных остатков, определяют параметры релаксации растворов белков на частоте 20 МГц. Легко видеть, что в области, где скорость релаксации раствора минимальна, абсолютное количество зарядов (положительных и отри-

Рис. 1. Зависимость скоростей релаксации от pH для 10%-ных растворов альбумина (● — R_2 ; ○ — R_1) и лизоцима (■ — R_2 ; □ — R_1)



цательных) на белке достигает наибольшего значения, хотя его суммарный заряд и невелик. Такой факт приводит к выводу о компенсации действия противоположных зарядов на воду. Вместе с тем следует отметить, что минимум на рис. 1 для лизоцима находится далеко от его изоэлектрической точки ($\text{pI}=11$), что затрудняет интерпретацию результатов только на основе изменения суммарного заряда белка. Очевидно, следует принимать во внимание не только общее количество заряженных центров на молекуле белка (с учетом их компенсации), но и другие факторы (например, степень взаимодействия разных заряженных групп с растворителем).

Чтобы лучше разобраться, в том, как заряженные аминокислотные остатки взаимодействуют с молекулами воды, удобно взять в качестве модели растворы отдельных аминокислот. На рис. 2, 3 показана зависимость величин $R_{1,2}$ от pH для раст-

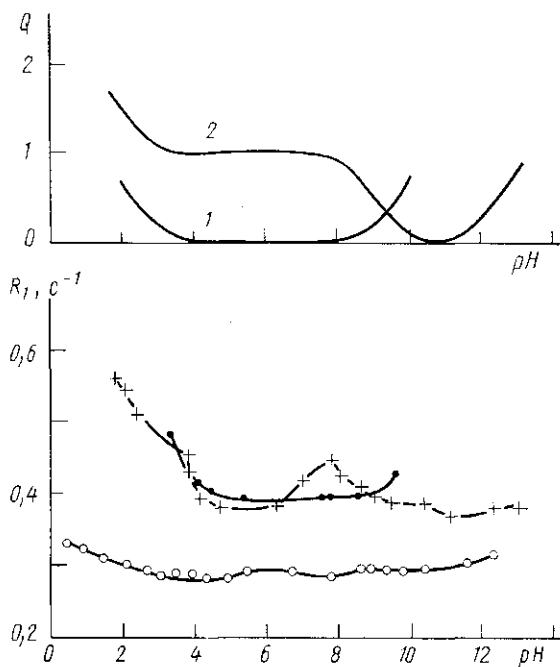


Рис. 2. Зависимость R_1 от pH для растворов аминокислот: ● — 10%-ный раствор аланина, + — 10%-ный раствор аргинина, ○ — 4%-ный раствор глутаминовой кислоты. Сверху — зависимость от pH среднего молекулярного заряда (1 — аланин, 2 — аргинин)

вора аланина, молекула которого имеет один положительный и один отрицательный заряды при нейтральном pH. При этом концентрации молекул, содержащих заряженные центры (C_+ и C_-), могут быть определены из следующих соотношений:

$$C_+ = C_0 / (1 + 10^{pH - pK_1}); C_- = C_0 / (1 + 10^{pK_2 - pH}),$$

где C_0 — концентрация аминокислоты, $pK_{1,2}$ — соответствующие константы диссоциации групп (для аланина $pK_1 = 2,34$; $pK_2 = 9,69$). На рис. 2 для сравнения представлен модуль среднего молекулярного заряда, т. е. величина $Q = |C_+ - C_-| / C_0$.

Можно видеть, что для связанной с аминокислотой воды $R_{1,2}$ (или q_i , так как $\sigma_i \ll 1$) возрастает в областях, где молекула в целом несет заряд, и минимально, где молекула в целом нейтральна (pH = 5–8), причем в данном случае обнаруживается хорошее соответствие между

ходом кривых $R_{1,2}$ и средним зарядом на молекуле. Такой результат может объясняться компенсацией противоположных зарядов (например, при связывании их друг с другом внутри одной молекулы или с соседней молекулой), сопровождающейся переходом от ион-дипольного к диполь-дипольному механизму взаимодействия воды с заряженными группами. На поверхности белка такое связывание приводит к образованию солевых мостиков [9] между относительно свободными боковыми остатками.

На рис. 2, 3 представлены также зависимости $R_{1,2}$ (pH) для растворов аргинина и глутаминовой кислоты, молекулы которых содержат один дополнительный заряд при нейтральном pH. Отличие кривых R_1 и Q говорит о том, что заряды различных групп оказывают неодинаковое действие на воду. Следует отметить, что наличие подобного эффекта на

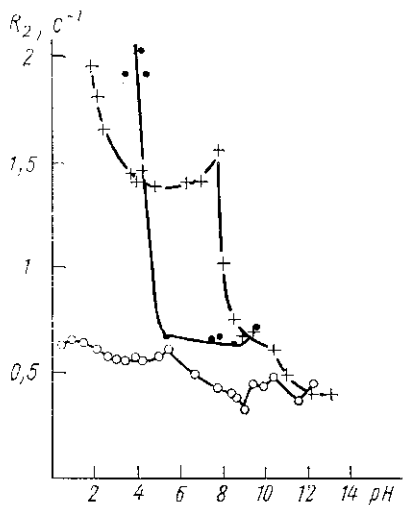


Рис. 3. Зависимость R_2 от pH для растворов аминокислот: ● — 10%-ный раствор аланина, + — 10%-ный раствор аргинина, ○ — 4%-ный раствор глутаминовой кислоты

поверхности белка приведет не только к уменьшению скоростей релаксации, но и к сдвигу их минимума относительно изоэлектрической точки. Качественный ход кривых R_2 на рис. 3 может быть связан с обменными процессами в растворе.

Из полученных результатов следует, что наличие зарядов у аминокислот и белков существенно влияет на параметры ЯМР-релаксации. Таким образом, релаксационные измерения позволяют исследовать взаимодействие воды с заряженными молекулярными группами. Из анализа приведенных результатов вытекает также существование механизма компенсации зарядов, определяющего характер связывания воды в исследованных растворах.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- [1] Вода в полимерах / Ред. Р. Роулэнд. М., 1984. [2] Аксенов С. И. // Связанная вода в дисперсных системах. М., 1980. Вып. 5. С. 46–75. [3] Bloembergen N., Purcell E. M., Pound R. V. // Phys. Rev. 1948. 73, N 7. P. 679–712. [4] Solomon I. // Phys. Rev. 1955. 99, N 2. P. 559–565. [5] Wennerström H. // Mol. Phys. 1972. 24. P. 69. [6] Бриллиантов Н. В., Ревокатов О. П. // Тез. докл. Всесоюз. конф. по магн. рез. в конденсированных средах. Казань. 1984. Ч. 1. С. 108. [7] Zimmerman J. R., Brittin W. E. // J. Phys. Chem. 1957. 61, N 10. P. 1328–1333. [8] Абецедарская Л. А., Мифтахутдинова Ф. Г., Федотов В. Д., Мальцев Н. А. // Молек. биол. 1967. Т. 1. С. 451–462. [9] Rashin A. A., Honig B. // J. Mol. Biol. 1984. 173. P. 515–521.

Поступила в редакцию
31.01.86