

угольных К. А., Островский Л. А. Нелинейные волновые процессы в акустике. М. 1990. [4] Виноградова М. Б., Руденко О. В., Сухоруков А. П. Теория волн. М., 1990. [5] Hopf E.//Comm. Pure and Appl. Math. 1951. 9. P. 201. [6] Cole J. D.//Quart. Appl. Math. 1951. 9. P. 225. [7] Кампе де Ферье Ж., Кемпбелл Р., Петью Г., Фогель Т. Функции математической физики. М., 1963.

Поступила в редакцию  
20.01.94

ВЕСТН. МОСК. УН-ТА. СЕР. 3, ФИЗИКА. АСТРОНОМИЯ. 1994. Т. 35, № 3

УДК 532.782; 532:541.64; 532:577.11

## ЭЛЕКТРОСТАТИЧЕСКИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ В РАСТВОРАХ БИОПОЛИМЕРОВ ПО ДАННЫМ РЭЛЕЕВСКОГО РАССЕЯНИЯ СВЕТА

Г. П. Петрова, Ю. М. Петрусевиц

(кафедра молекулярной физики и физических измерений)

С помощью методов статического и динамического рассеяния света определялись статические (масса, коэффициент деполаризации, второй вириальный коэффициент) и динамические (коэффициенты молекулярной диффузии) параметры белковых макромолекул в разбавленных водных растворах при изменении ионной силы и pH раствора. Обнаружено, что при изменении суммарного заряда белковых макромолекул и при частичной экранировке отдельных заряженных групп на поверхности белковой глобулы указанные параметры изменяются нелинейным образом и имеют экстремум в изоэлектрических точках. Для некоторых белков проведено сравнение зависимости коэффициента трансляционной диффузии от заряда на белке с поведением коэффициента вращательной диффузии, определяемого методом ЯМР.

Поверхность макромолекул белков в растворе всегда является заряженной, что определяет очень сильное электростатическое взаимодействие между молекулами полярного растворителя и заряженными поверхностными группами биополимера и, следовательно, влияет на характер броуновской динамики молекул.

В растворе возможны три типа взаимодействий: белок—белок, белок—противоион, белок—растворитель. Все эти типы взаимодействий могут изменять как статические параметры раствора макромолекул, такие как коэффициент межмолекулярного взаимодействия  $B$ , диэлектрическую проницаемость  $\epsilon$ , вязкость  $\eta$ , так и молекулярно-динамические параметры, например коэффициенты трансляционной  $D_t$  и вращательной  $D_r$  диффузии.

Для определения статических и динамических параметров белковых макромолекул в растворах могут быть использованы различные физические методы, среди которых весьма эффективными являются методы статического и динамического рассеяния света.

Известно [1, 2], что для идеального раствора макромолекул в низкомолекулярном растворителе, каким является вода, коэффициент рассеяния под углом  $\theta$  к падающему лучу, равный

$$R_\theta = I_\theta r^2 / I_0 \Omega, \quad (1)$$

где  $I_0$  — интенсивность падающего света,  $I_\theta$  — интенсивность рассеянного света на расстоянии  $r$  от рассеивающего объема  $\Omega$ , определяется соотношением

$$R_\theta = cHMK \text{ см}^{-1}. \quad (2)$$

Здесь  $c$ ,  $M$  — массовая концентрация и молекулярная масса растворенного вещества,  $H = 2\pi^2 n_0^2 (dn/dc)^2 / (\lambda^4 N_A)$  — постоянная Дебая ( $n_0$  — показатель преломления воды,  $dn/dc$  — инкремент показателя

преломления, связанный с поляризуемостью молекулы  $\alpha$ ,  $dn/dc = 2\pi N_A \alpha / (n_0 M)$ ,  $N_A$  — число Авогадро),  $K$  — фактор Кабанна, учитывающий вклад в рассеяние, обусловленный анизотропией молекул и определяемый коэффициентом деполаризации рассеянного света  $\Delta_\sigma = I_{vh}/I_{vv}$  ( $I_{vh}$  и  $I_{vv}$  — интенсивности рассеянного излучения, измеряемые при двух взаимно перпендикулярных поляризациях). Для линейной поляризации падающего света  $K = (3 + 3\Delta_\sigma) / (3 - 4\Delta_\sigma)$ .

Для анизотропной молекулы поляризуемость является тензором. Средняя поляризуемость  $\alpha = (\alpha_1 + \alpha_2 + \alpha_3)/3$ , а коэффициент поляризации связан с параметрами тензора поляризуемости следующим образом:  $\Delta_\sigma = (3/45) g^2 / [\alpha^2 + (4/45) g^2]$ , где  $g^2 = [(\alpha_1 - \alpha_2)^2 + (\alpha_2 - \alpha_3)^2 + (\alpha_3 - \alpha_1)^2] / 2$  — мера анизотропии поляризуемости.

Согласно теории Дебая, для разбавленных растворов макромолекул при условии, что осмотическое давление  $P$  можно представить в виде вириального разложения по степеням концентрации, справедливо соотношение

$$cHK/R_0 = (RT)^{-1} (dP/dc) = (1/M) (1 + 2VMc + \dots), \quad (3)$$

где  $R$  — газовая постоянная.

Вириальное разложение применимо в случае сильно разбавленных растворов белков, когда дебаевский радиус экранирования много больше среднего расстояния между макроионами. Добавление в раствор небольших количеств соли — сильного электролита — приводит к тому, что вокруг заряженных молекул белка создается облако противоионов, экранирующее кулоновское взаимодействие. Выражение для параметра  $B$ , применимое к разбавленным растворам, при наличии третьей компоненты — сильного электролита — имеет вид [3]

$$B = \frac{1}{2} M_2^2 \left\{ \frac{Z^2}{2m_3} + \frac{d \ln \gamma_2}{dm_2} - \frac{m_3 (d \ln \gamma_3/dm_3)}{2 + m (d \ln \gamma_3/dm_3)} \right\}. \quad (4)$$

Здесь индекс «2» относится к макромолекулам, «3» — к молекулам соли,  $\gamma_i$  — молярный коэффициент активности,  $m_i$  — концентрация (моль/кг),  $Z$  — суммарный заряд макромолекулы белка, который может достигать очень больших величин и приводить к аномально высокому значению ее дипольного момента ( $\sim 10^3 D$ ).

От заряда на поверхности белка зависит не только параметр  $B$ , но и величина  $dn/dc$ , поляризуемость  $\alpha$  и коэффициент деполаризации  $\Delta_\sigma$ .

В нашей работе впервые проведено измерение зависимости всех перечисленных параметров от величины суммарного заряда на поверхности белка.

Для изучения рассеивающих свойств водных растворов белков была использована оптическая установка с фотоэлектрической регистрацией рассеянного излучения и He—Ne-лазером в качестве источника света ( $\lambda = 632$  нм). Поляризационное устройство состояло из двух призм — Волластона и Глана—Томсона. Два рассеянных луча с взаимно перпендикулярной поляризацией модулировались одной частотой (80 Гц) с помощью обтюратора. Сигнал с ФЭУ поступал на резонансный усилитель, настроенный на частоту модуляции и затем на цифровой вольтметр. Контроль за интенсивностью лазерного пучка осуществлялся с помощью фотодиода.

Для определения молекулярного веса и второго вириального коэффициента измерялись относительные интенсивности рассеянного света при  $\theta = 90^\circ$  ( $I_{90}$ ) при двух взаимно перпендикулярных поляризациях и различных значениях pH для нескольких значений концентрации раствора, при этом учитывалось значение  $I_{90}$  для чистой воды.

Калибровка интенсивности  $I_{90^\circ}$  проводилась с помощью эталонной жидкости — бензола ( $R_{90^\circ} = 12,64 \cdot 10^{-6} \text{ см}^{-1}$  для  $\lambda = 632 \text{ нм}$ ) с учетом поправки на разность показателей преломления бензол—вода. Точность определения  $R_{90^\circ}$  составляла 6%.

Для определения  $dn/dc$  использовался интерферометр Рэлея. Точность определения инкремента показателя преломления составляла 2%. Для изменения концентрации свободных протонов в растворе (pH), а также ионной силы раствора  $\mu$  в него добавлялось некоторое количество кислоты или основания и соли.

Эксперименты были проведены с белками фирмы «Seriva» — сывороточным альбумином (BSA),  $\gamma$ -глобулином [4, 5], а также с гемоглобином и лизоцимом. Исследовались разбавленные водные растворы с концентрациями белка 0,025; 0,05; 0,1; 0,25; 0,5 и 1%.

Путем экстраполяции  $sHK/R_{90^\circ}$  к  $s=0$  были определены молекулярные массы  $\gamma$ -глобулина ( $M=154000 \pm 23000 \text{ г/моль}$ ), BSA ( $M=72000 \pm 8000 \text{ г/моль}$ ), лизоцима ( $M=16000 \pm 1200 \text{ г/моль}$ ) и гемоглобина ( $M=69000 \pm 8000 \text{ г/моль}$ ).

Эти результаты в пределах ошибки измерений согласуются со значениями  $M$ , полученными другими методами [2]. Следует отметить, что для гемоглобина в области pH 3,5 значение  $M$  оказалось равным 39000 г/моль. Этот результат подтверждает, что в кислой среде при накоплении положительного заряда на поверхности молекулы гемоглобина происходит ее распад на две (а может быть, и четыре) субъединицы [7]. Скорее всего в растворе присутствуют как отдельные  $\alpha$ - и  $\beta$ -цепи, так и димеры и нераспавшиеся частицы. Иными словами, в растворе в данном случае имеются частицы с различными молекулярными массами. Определяемая оптическим методом масса является, следовательно, среднечисловой массой частиц.

На рис. 1 изображены зависимости величин второго вириального

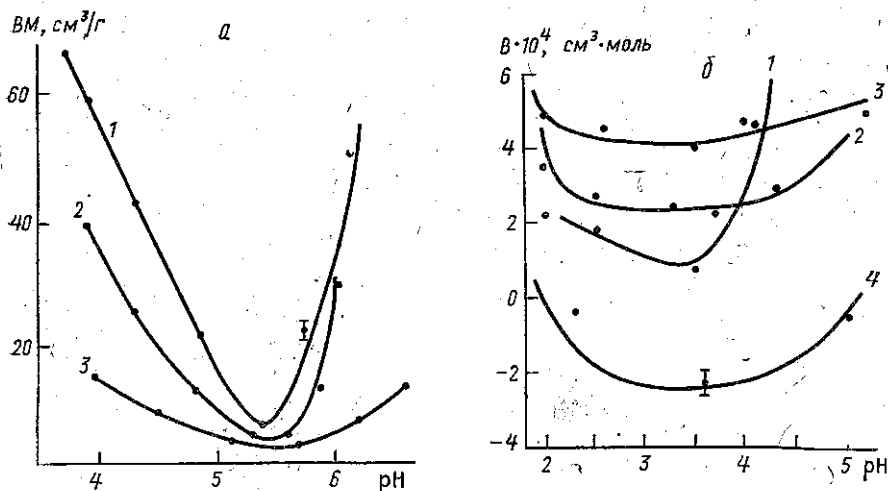


Рис. 1. Зависимость величины произведения коэффициента  $B$  на молекулярную массу  $M_2$  от pH для гемоглобина (а) при различных значениях ионной силы:  $\mu=0,001$  (1); 0,005 (2) и 0,05 (3) и зависимость величины коэффициента  $B$  от pH для лизоцима (б) при  $\mu=0,001$  (1); 0,004 (2); 0,01 (3) и 0,05 (3)

коэффициента от pH для гемоглобина и лизоцима. Как можно видеть, коэффициент  $B$  зависит от pH существенно нелинейным образом ана-

логично тому, что наблюдалось для BSA и  $\gamma$ -глобулина [4—6]. Зависимость  $B$  от  $pH$  для гемоглобина имеет минимум в изоэлектрической точке. В случае лизоцима минимум соответствует  $pH$  3,5 (изоэлектрическая точка лизоцима  $pH$  10 [2]). Провести оптические эксперименты при  $pH$  10 оказалось невозможным из-за деструкции белка. С увеличением ионной силы раствора для всех белков согласно формуле (4) параболический вид зависимости  $B$  от  $pH$  сохраняется, хотя значения производных  $dB/d(pH)$  уменьшаются.

Для лизоцима при ионной силе раствора  $\mu=0,05$  величины параметра  $B$  становятся отрицательными в области  $pH$  2÷5, однако положение экстремума сохраняется.

Эти эффекты, вероятно, связаны с экранирующим воздействием облака противоионов, которое создается вокруг поверхности белка, вследствие чего потенциал межмолекулярного взаимодействия уменьшается. Согласно теории Скэтчарда [2, 3], при увеличении потенциала взаимодействия между ионами соли и макроионами растет вклад (по модулю) третьего члена формулы (4), так что он может оказаться больше по величине, чем первые два. В этом случае параметр  $B$  может стать отрицательным.

При перезарядке молекул изменяются и поляризационные характеристики растворов, связанные с флуктуациями ориентации анизотропных молекул. Впервые это было обнаружено в работе [4].

В классической работе Эдсолла и др. [6] предполагалось, что коэффициент  $\Delta_D$ , а следовательно, и фактор Кабанна не изменяются при изменении величины и знака суммарного заряда на поверхности белка (BSA). Как показали наши эксперименты [4, 5], коэффициенты деполаризации, экстраполированные к нулевой концентрации, а также величины средней электронной поляризуемости молекул для всех исследованных нами белков изменяются нелинейным образом при изменении  $pH$  и имеют экстремум в изоэлектрических точках (за исключением лизоцима, для которого минимум наблюдается в точке  $pH$  3,5÷4). Производные этих зависимостей могут различаться по знаку. Это, вероятно, связано с различным перераспределением плотности заряженных групп на поверхности этих макромолекул.

На рис. 2 приведены зависимости  $\Delta_D$  для гемоглобина и лизоцима. Весьма характерным является изменение вида зависимости коэффици-

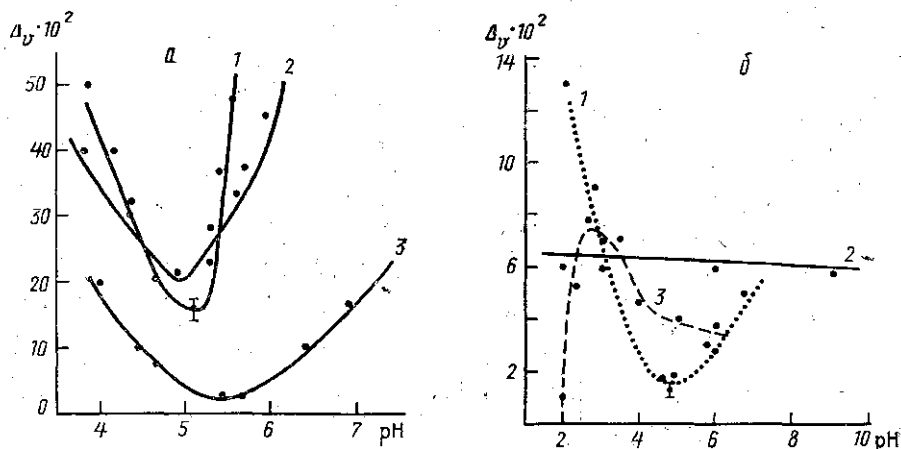


Рис. 2. Зависимость коэффициента деполаризации от  $pH$  при различных значениях ионной силы для гемоглобина (а):  $\mu=0,001$  (1); 0,005 (2) и 0,05 (3); для лизоцима (б):  $\mu=0,001$  (1); 0,004 (2) и 0,05 (3)

ента деполаризации  $\Delta_\nu$  от рН для лизоцима (рис. 2, б). На зависимости  $\Delta_\nu$  от рН при возрастании ионной силы раствора до  $\mu=0,004$  минимум исчезает, а затем при  $\mu=0,05$  возникает максимум, соответствующий рН 3.

Эффекты электростатического взаимодействия заряженных белков в растворах проявляются также и в динамике молекул.

Как показали наши исследования, динамические параметры, такие как коэффициент трансляционной диффузии  $D_t$  для белковых макромолекул в растворах, также зависят нелинейным образом от концентрации белка и величины его поверхностного заряда. Коэффициент трансляционной диффузии макромолекул в растворе может быть представлен в виде разложения по концентрациям аналогично формуле Дебая (3):

$$D_t = (dP/dc) M / (N_A f) = D_0 (1 + K_d c). \quad (5)$$

Здесь  $D_0 = kT/f_0$ ,  $f = f_0(1 + Ac)$  — коэффициент трения,  $A$  — постоянная, определяемая свойствами данного растворителя.

Таким образом, динамический коэффициент  $K_d$  зависит как от межмолекулярного взаимодействия, характеристикой которого является коэффициент  $B$  в формуле (3), так и от коэффициента трения  $f$ . В случае заряженных макромолекул этот коэффициент трения определяется так называемой электровязкостью макромолекул, расчет которой приведен в работе [8].

Для исследования трансляционного движения макромолекул в растворе был использован метод корреляции фотонов. С помощью коррелометра фирмы «Malvern» изучались растворы альбумина и  $\gamma$ -глобулина при изменении рН и концентрации белка [5]. Результаты приведены на рис. 3. Как можно видеть, коэффициент трансляционной диффузии зависит нелинейным образом от поверхностного заряда макромолекулы и имеет минимум в изоэлектрической точке белка.

Согласно теории Джеймса—Эванса, зависимость коэффициента трансляционной диффузии от концентрации макромолекул в растворе и результирующего поверхностного заряда  $Z$  может быть представлена в виде

$$D_t = D_0 [1 - \lambda_h c + \lambda_s (Z, \mu) c]. \quad (6)$$

В уравнении (6)  $\lambda_h$  — постоянная, а  $\lambda_s \propto Z^2 \mu^{-1/2}$ .

Для белков  $\lambda_s > \lambda_h$ , что подтверждается наблюдаемой в эксперименте близкой к параболической зависимостью  $D_t$  от рН (см. рис. 3).

Влияние поверхностного заряда на характер вращательных движений макромолекул может быть представлено в виде [8]

$$D_r = D_r^0 [1 + \{p^2 / (\epsilon^2 (kT)^2 a^6) + p^2 Z^2 / (\epsilon^2 (kT)^2 a^4)\} c], \quad (7)$$

где  $a$  — радиус макромолекулы,  $p$  — ее дипольный момент. Коэффициент вращательной диффузии белка  $D_r^0$  определяется соотношением Стокса—Эйнштейна—Дебая:  $D_r^0 = kT / (8\pi a^3 \eta_0)$ ,  $\eta_0$  — вязкость чистого растворителя. В работе [9] методом ЯМР было показано, что  $D_r$  для некоторых белков зависит от рН нелинейным образом. На рис. 4 приво-

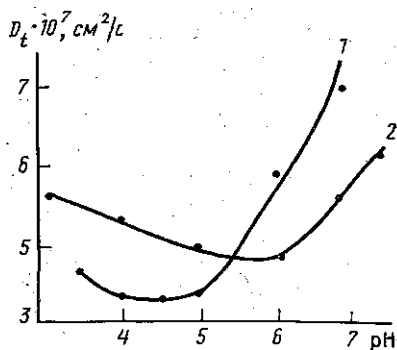


Рис. 3. Зависимость коэффициента трансляционной диффузии от рН при  $c=1\%$  и  $\mu=0,001$  для BSA (1) и  $\gamma$ -глобулина (2)

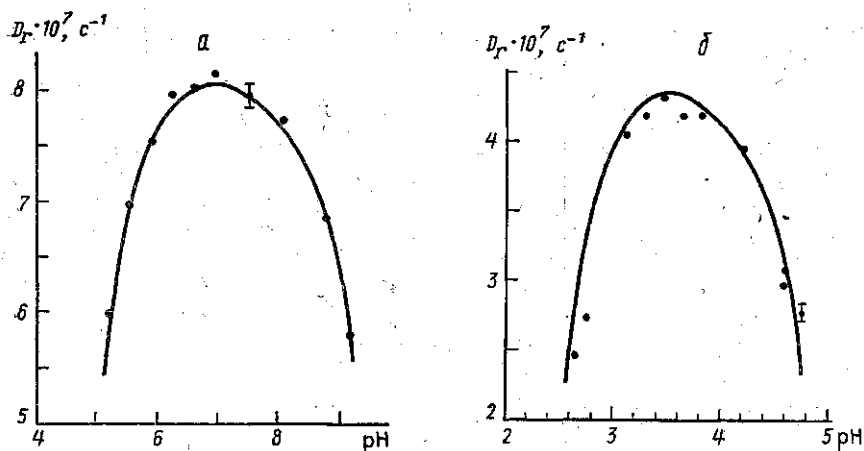


Рис. 4. Зависимость коэффициента вращательной диффузии  $D_r$  от рН при  $c=3\%$  и  $\mu=0,01$  для BSA (а) и лизоцима (б)

дятся данные по вращательной диффузии, полученные методом ЯМР, в BSA и лизоциме. Интересно отметить, что для лизоцима экстремум этой зависимости также соответствует рН 3,5.

Поведение динамических параметров белков в растворе показывает, что при изменении поверхностного заряда на молекуле величина ее энергии взаимодействия с раствором проходит через минимум, чему должно соответствовать минимальное значение коэффициента трения. Для всех исследованных белков этот минимум соответствует изoeлектрической точке. Исключение представляет собой лизоцим, имеющий особенность при рН 3,5.

Измерения диэлектрической проницаемости, времени вращательной корреляции  $\tau_r$  и вязкости лизоцима [10, 11] показали, что и в этих случаях экстремумы  $\epsilon$ ,  $\eta$  и  $\tau_r$  соответствуют рН 3,5. По всей вероятности, в случае лизоцима поверхностное распределение заряженных групп таково, что основную роль играет дипольный момент молекулы (рН 3,5 соответствует, очевидно, минимуму дипольного момента  $p$ ). Поскольку дипольный момент образуется системой зарядов, то можно предположить, что и электронная компонента поляризуемости, определяющая  $\Delta\sigma$  и  $\alpha$ , также будет иметь особенность при рН 3,5, что и подтверждается нашими оптическими экспериментами.

#### ЛИТЕРАТУРА

- [1] Цветков В. Н., Эскин В. Е., Френкель С. Я. Структура макромолекул в растворах. М., 1964. [2] Генфорд Ч. Физическая химия полимеров. М., 1965. [3] Scathard G. // J. Am. Chem. Soc. 1946. 68. P. 2315. [4] Петрова Г. П., Петрусевич Ю. М., Ширкова И. И., Ревокатов О. П. // Вестн. Моск. ун-та. Физ. Астрон. 1987. 28, № 2. С. 59. [5] Petrova G. P., Petrusевич Yu. M., Borisov B. A. // SPIE. V. 1403: Laser Application Life Sciences. USA, 1990. P. 387. [6] Edsall J. T., Edelhoch H., Lontie R., Morrison P. R. // J. Am. Chem. Soc. 1950. 72. P. 4641. [7] Белки/Ред. Г. Нейрат, К. Бейли. М., 1956. [8] Brilliantov N. V., Vostrikova N. G., Denisov V. P. et al. // Biophys. Chem. 1993. 46. P. 227. [9] Бриллиантов Н. В., Квяткевич А. И., Петрусевич Ю. М., Ревокатов О. П. // ДАН СССР. 1989. 304, № 2. С. 340. [10] Денисов В. П., Мигулин В. В., Петрусевич Ю. М., Ревокатов О. П. // Вестн. Моск. ун-та. Физ. Астрон. 1989. 30, № 1. С. 88. [11] Петрусевич Ю. М. Взаимодействие биополимеров в растворе и их молекулярная подвижность: Автореф. дис. ... д-ра физ.-мат. наук. М. (МГУ). 1992.

Поступила в редакцию  
20.10.93