

АКУСТИКА И МОЛЕКУЛЯРНАЯ ФИЗИКА

УДК 577.32

ОСОБЕННОСТИ МЕЖМОЛЕКУЛЯРНОГО ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ И ДИНАМИКИ МОЛЕКУЛ КОЛЛАГЕНА В ВОДНЫХ РАСТВОРАХ**Г. П. Петрова, Ю. М. Петрусевиц, А. В. Бойко, Д. И. Тен, Е. В. Гаркуша, И. А. Перфильева, В. И. Щеславский^{*)}, В. В. Яковлев^{*)}***(кафедра молекулярной физики)*

E-mail: petrova@phys.msu.su

Методом статического и динамического рассеяния света исследованы молекулярные параметры водных растворов коллагена. Методом статического светорассеяния определена изоэлектрическая точка, рассчитаны коэффициенты межмолекулярного взаимодействия и молекулярная масса коллагена. С помощью метода фотонно-корреляционной спектроскопии получена зависимость коэффициента трансляционной диффузии от pH в водных растворах коллагена.

Введение

В настоящее время одной из наиболее актуальных проблем медицинской биофизики является изучение белков и их водных растворов, которые играют чрезвычайно важную роль в живых организмах.

Макромолекулы белков и биополимеров и их водные растворы являются уникальными для исследования с помощью методов молекулярной физики, поскольку масса белковой макромолекулы строго определена для каждого типа белка, при этом поверхность белковой молекулы имеет определенную величину заряда, которую можно изменять путем изменения pH раствора. Одним из самых распространенных белков, входящих в состав организма человека, является коллаген [1]. Он входит в состав таких тканей, как кожа, кости, сухожилия (коллаген I типа), в состав хрящевой ткани (коллаген II типа), образует стенки кровеносных сосудов (коллаген III типа), а также соединительные мембраны (коллаген IV типа).

Необычность строения молекулы коллагена приводит к особенностям его оптических свойств и молекулярной подвижности. Эти параметры могут быть исследованы методами статического и динамического рассеяния света, что и является предметом настоящей работы.

Теория метода Рэлея–Дебая

При прохождении плоской линейно поляризованной волны через рассеивающий объем, содержащий раствор макромолекул, при условии, что положения рассеивателей в разбавленном растворе не коррелированы, для интенсивности рассеяния I_s получим

$$I_s = \frac{2\pi^2 n_0^2 \left(\frac{dn}{dc}\right)^2 c M I_0 K v}{\lambda_0^4 N_A r^2} \sin^2 \theta, \quad (1)$$

где n_0 — показатель преломления растворителя, $\frac{dn}{dc}$ — инкремент показателя преломления раствора, c — концентрация растворенного вещества, I_0 — интенсивность падающего света, v — рассеивающий объем, λ_0 — длина волны падающего света в вакууме, N_A — число Авогадро, M — молекулярный вес растворенного вещества, r — расстояние от рассеивающего объема до детектора падающего света, K — коэффициент, определяемый оптической анизотропией рассеивающих частиц (фактор Кабана $K(\Delta_V) = \frac{3+3\Delta_V}{3-4\Delta_V}$) и связанный с коэффициентом деполяризации рассеянного света

$$\Delta_V = \frac{I_h^V}{I_V^V}, \quad (2)$$

где I_h^V — интенсивность компоненты рассеянного света с горизонтальным направлением поляризации по отношению к вертикальной поляризации падающего света и I_V^V — интенсивность вертикально поляризованной компоненты рассеянного излучения.

Вместо величины I_s удобнее рассматривать коэффициент рассеяния R , не зависящий от выбора I_0 , v и r . Для $\theta = 90^\circ$

$$R_{90} = \frac{I_{90} r^2}{I_0 v} = c H M K, \quad (3)$$

где величина $H = \frac{2\pi^2 n_0^2 \left(\frac{dn}{dc}\right)^2}{\lambda^4 N_A}$ называется оптической постоянной раствора.

Коэффициент рассеяния пропорционален концентрации рассеивающих частиц и их массе.

Выражение (4) справедливо, если взаимодействием рассеивающих частиц можно пренебречь. При конечных концентрациях всегда будет существовать межмолекулярное взаимодействие, поэтому, согласно теории Дебая [2], интенсивность рассеянного света можно выразить через флуктуации концентрации,

^{*)} Department of physics, University of Wisconsin–Milwaukee.

которые зависят от химического потенциала. В этом случае для разбавленных растворов макромолекул имеет место соотношение

$$\frac{cHK}{R_{90}} = \frac{1}{M} + 2Bc \dots, \quad (4)$$

которое позволяет измеряемую в эксперименте величину R_{90} — рэлеевский коэффициент — представить в виде вириального разложения по малым концентрациям.

Метод дает возможность прямого определения молекулярной массы M , для чего необходимо измерить R_{90} при нескольких концентрациях и экстраполировать полученную зависимость $cHK/R_{90} = f(c)$ к концентрации $c = 0$. Наклон этой прямой, равный $2B$, позволяет вычислить второй вириальный коэффициент B , который характеризует степень отклонения поведения раствора от идеального и служит мерой межмолекулярного взаимодействия в растворе.

Характеристика объекта исследования и порядок проведения эксперимента

Исследуемый в работе коллаген относится к группе фибриллярных белков. Фибриллярные белки образованы полипептидными цепями, которые расположены параллельно друг другу вдоль одной оси и образуют длинные волокна (фибриллы). Волокна фибриллярных белков состоят из кристаллических областей (кристаллитов), перемежающихся с областями меньшей упорядоченности. Эти белки являются основными структурными элементами соединительной ткани.

При нейтральных рН коллаген плохо растворяется в воде, и только добавление кислот заметно увеличивает его растворимость.

В данной работе проведено два вида экспериментов. Определена изоэлектрическая точка коллагена, а также измерены его масса и коэффициент межмолекулярного взаимодействия при изменении рН раствора. Изменение рН среды осуществлялось при помощи добавления в воду кислоты или основания.

Эксперименты проводились на установке, описание которой имеется в работе [3]. В ходе экспериментов снимались зависимости I_h^V и I_V^V от концентрации белка в растворе. Концентрация белка изменялась с шагом 0.055 мг/см^3 путем добавления в приготовленный раствор исходного концентрированного раствора белка. В качестве калибровочных веществ использовались обеспыленные бензол и вода в герметичных запаянных ампулах. Коэффициент рассеяния определялся по следующей формуле:

$$R_{90} = \frac{I - I_w}{I_b - I_0} \cdot 10^{-5} \text{ см}^{-1}, \quad (5)$$

где I — интенсивность рассеянного света в исследуемом растворе, I_w — интенсивность рассеянного света в воде, I_0 — интенсивность фона, I_b — интенсивность рассеяния для бензола.

При экстраполяции зависимости $\frac{cHK}{R_{90}}$ к $c \rightarrow 0$ рассчитывались массы рассеивающих частиц и значения коэффициента взаимодействия. По измеренным вертикальной и горизонтальной компонентам рассеянного света с помощью формулы (4) рассчитывался коэффициент деполаризации.

Данные обрабатывались в автоматическом режиме с помощью компьютера.

Результаты эксперимента по статическому рассеянию света в растворах коллагена

На рис. 1 представлены зависимости параметра рассеяния (4) растворов коллагена от его концентрации c при различных рН. При рН 4 наблюдается наибольший наклон этой зависимости. Минимальный наклон наблюдается при рН 5.9.

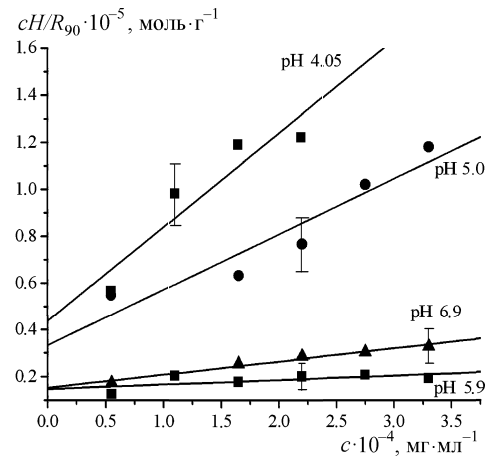


Рис. 1. Концентрационные зависимости параметра рассеяния для коллагена при различных рН

Обработка данных рис. 1 по формуле (4) позволяет рассчитать коэффициент межмолекулярного взаимодействия молекул коллагена при различной величине его поверхностного заряда, определяемого рН раствора. Эти результаты приведены на рис. 2.

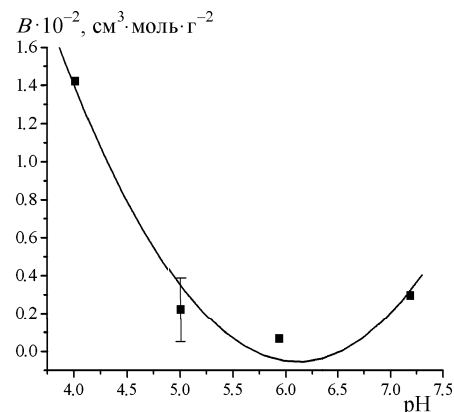


Рис. 2. Зависимость коэффициента межмолекулярного взаимодействия от рН среды

Из рис. 2 видно, что кривая имеет параболическую зависимость с минимумом около рН 6. При этом рН заряд макромолекулы минимален и соответствует изоэлектрической точке белка. В точке

pH 6, где заряд белка минимален, можно определить его массу по формуле Дебая (6). Полученное значение $\sim 300\,000$ г/моль соответствует известным литературным данным [4]. Независимое исследование коэффициента деполаризации рассеянного света при изменении pH раствора (рис. 3) показывает наличие экстремума вблизи pH 6, что также связано с минимизацией суммарного поверхностного заряда на молекуле коллагена.

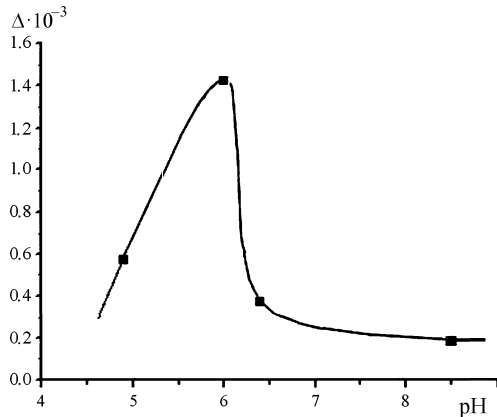


Рис. 3. Зависимость коэффициента деполаризации рассеянного света в растворе коллагена при изменении pH среды

Динамическое рассеяние света в растворах коллагена

Динамические параметры макромолекул могут быть изучены с помощью метода фотонно-корреляционной спектроскопии [5]. В этом методе исследуется корреляционная функция флуктуаций интенсивности рассеянного света, обусловленных броуновским движением частиц раствора. Для растворов макромолекул в этом случае возможно связать корреляционную функцию $c(t)$, описывающую молекулярное движение, с коэффициентом трансляционной диффузии D_t :

$$c(t) = a \langle E^*(0)E(t) \rangle = c_0 \exp(-D_t k^2 t). \quad (6)$$

Соответствующий метод определения $c(t)$ называется методом корреляции фотонов. При этом могут быть определены коэффициенты трансляционной диффузии частиц и их гидродинамические радиусы.

В работе [6] была получена связь между статическими и динамическими параметрами рассеяния света для растворов макромолекул. Как оказалось, концентрационная зависимость коэффициента трансляционной диффузии D_t может быть представлена в виде вириального разложения по концентрации по аналогии с формулой (4). В соответствии с этим связь между коэффициентом D_t , массой молекулы M и характеристической вязкостью белкового раствора $[\eta]$ определяется уравнением

$$D_t = D_0 \{1 + (2BM - [\eta])c\}, \quad D_0 = \frac{kT}{6\pi\eta_0 R}, \quad (7)$$

где R — радиус частицы.

В формулах (3), (4) и (7) зависимость от зарядового состояния белковой молекулы в явном виде отсутствует. Однако можно предположить, что как коэффициент B , так и характеристическая вязкость $[\eta]$ являются функциями электростатических параметров макромолекул. Это было подтверждено экспериментально в работе [7], где было показано, что коэффициент D_t для альбумина и γ -глобулина зависит от заряда на поверхности белка (pH) нелинейным образом с минимумом в изоэлектрической точке подобно параметру B .

По результатам экспериментов, проведенных с помощью фотонно-корреляционного спектрометра для коллагена, было обнаружено, что коэффициент трансляционной диффузии в этом случае имеет максимум вблизи изоэлектрической точки (рис. 4).

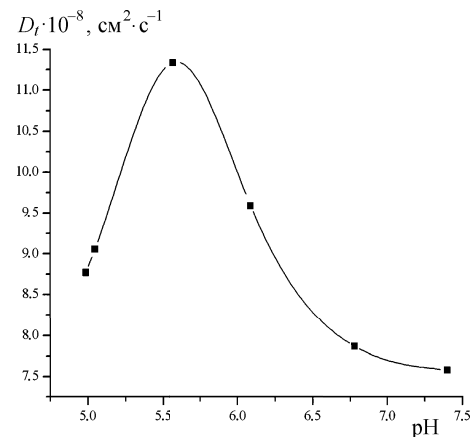


Рис. 4. Зависимость коэффициента трансляционной диффузии от pH для водных растворов коллагена

На рис. 4 максимальный диффузионный коэффициент наблюдается при $\text{pH} > 5.5$, что соответствует минимальному значению поверхностного заряда коллагена. Справа и слева от этого значения диффузионный коэффициент значительно уменьшается, поскольку белок приобретает либо положительное, либо отрицательное значение суммарного поверхностного заряда. Измерения, проведенные при различных концентрациях, показывают, что при увеличении концентрации белка в растворе коэффициент диффузии уменьшается.

На рис. 5 представлена зависимость относительного коэффициента трансляционной диффузии коллагена от его концентрации в растворе. Из рисунка видно, что с ростом концентрации диффузионный коэффициент уменьшается и достигает минимального значения при концентрации около 1% ($1.1 \cdot 10^{16}$ частиц в cm^3).

В соответствии с формулой (6) должен уменьшаться коэффициент трансляционной диффузии с ростом концентрации коллагена в случае, если его характеристическая вязкость превышает произведение массы молекулы на коэффициент межмолекулярного взаимодействия. Как следует из литературных данных [8], действительно характеристическая вязкость коллагена ($1150 \text{ cm}^3/\text{g}$) более чем на два

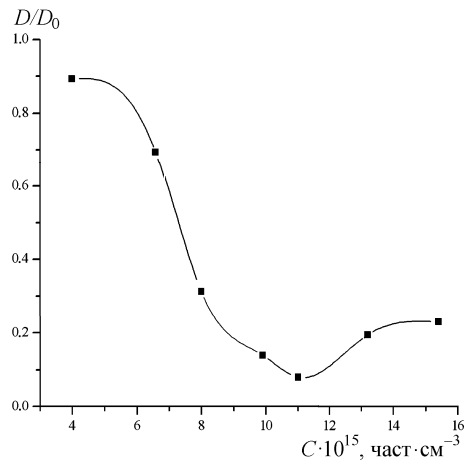


Рис. 5. Зависимость относительной величины D_t/D_0 (D_0 — значение коэффициента трансляционной диффузии при экстраполяции $c \rightarrow 0$)

порядка выше, чем вязкость таких глобулярных белков, как альбумин ($3.7 \text{ см}^3/\text{г}$). Для последних наблюдается не уменьшение, а рост коэффициента трансляционной диффузии с концентрацией [9].

Дальнейшее увеличение коэффициента трансляционной диффузии, показанное на рис. 5, является «кажущимся», поскольку расчеты по методу светорассеяния возможны только для определенных концентраций рассеивающих частиц, когда отсутствуют процессы вторичного рассеяния или поглощения квантов.

Заключение

В настоящей работе с помощью методов статического и динамического светорассеяния были исследованы растворы коллагена при различных рН и различных его концентрациях. Из концентрационной зависимости параметра рассеяния при рН в изоэлектрической точке рассчитана масса коллагена, которая близка к значению $300\,000 \text{ г/моль}$.

Для определения изоэлектрической точки коллагена получена зависимость коэффициента деполари-

зации от рН раствора. Экстремум этой зависимости наблюдается при значении рН ~ 6 .

Коэффициент межмолекулярного взаимодействия от рН имеет нелинейную зависимость, близкую к параболической, с минимумом в изоэлектрической точке рН 6.

Коэффициент трансляционной диффузии для молекул коллагена, определенный методом динамического рассеяния света, имеет максимальное значение при рН 5.6.

Также получено уменьшение диффузионного коэффициента коллагена в области его малых концентраций, что связано с преобладанием величины характеристической вязкости молекул коллагена над величиной произведения массы на коэффициент взаимодействия макромолекул этого белка.

Литература

1. Ленинджер А.Л. Основы биохимии. М., 1985.
2. Дебай П. Определение молекулярного веса методом рассеяния света. Л., 1987.
3. Петрова Г.П., Петрусевиц Ю.М., Тен Д.И. // Квантовая электроника. 2002. **32**. С. 897.
4. Мартин Р. Введение в биофизическую химию. М., 1966.
5. Камминс Г.Э., Пайк Е.Р. Спектроскопия оптического смешения и корреляция фотонов. М., 1978.
6. Петрова Г.П., Петрусевиц Ю.М. // Биомед. радиоэлектроника. 2000. № 3. С. 41.
7. Петрова Г.П., Петрусевиц Ю.М. // Вестн. Моск. ун-та. Физ. Астрон. 1994. **35**, № 3. С. 45 (Moscow University Phys. Bull. 1994. **49**, N 3. P. 41).
8. Маршелл Э. Биофизическая химия. Т. 1. М., 1981.
9. Бойко А.В., Гаркуша Е.В., Петрова Г.П. и др. Препринт № 2/2005. МГУ, физический ф-т.

Поступила в редакцию
04.03.05