

# Молекулярная подвижность частиц в растворах белков, содержащих ионы металлов с различными ионными радиусами

И. А. Сергеева<sup>1a</sup>, Н. В. Сокол<sup>1b</sup>, М. С. Иванова<sup>1</sup>, Г. П. Петрова<sup>1</sup>, Ю. М. Петруевич<sup>2</sup>

*Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова, физический факультет, <sup>1</sup>кафедра молекулярной физики; <sup>2</sup>кафедра медицинской физики. Россия, 119991, Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 2.*

E-mail: <sup>a</sup>sergeeva@physics.msu.ru, <sup>b</sup>Sokol@phys.msu.ru

Статья поступила 25.02.2009, подписана в печать 29.04.2009.

Методами фотонно-корреляционной спектроскопии и поляризации флуоресценции получены pH зависимости коэффициентов трансляционной и вращательной диффузии белков коллагена и бычьего сывороточного альбумина в растворах, содержащих соли NaCl и KCl, при различных ионных силах. Обнаружено, что размер ионного радиуса металла влияет на межмолекулярные взаимодействия и подвижность молекул белков в растворе. Воздействие ионов калия, имеющих больший ионный радиус по сравнению с ионами натрия, аналогично воздействию ионов тяжелых металлов, так как приводит к агрегации молекул белков вблизи изоэлектрической точки.

**Ключевые слова:** коллаген, сывороточный альбумин, динамическое рассеяние света, фотонно-корреляционная спектроскопия, поляризация флуоресценции, коэффициент трансляционной диффузии, время корреляции вращательной подвижности, изоэлектрическая точка.

УДК: 577.32. PACS: 87.15.-v, 87.83.+a.

## Введение

Безусловный интерес представляют собой исследования свойств водных растворов белков, являющихся основными структурными элементами тканей живых организмов.

Коллаген принадлежит к классу фибрillлярных белков и выполняет главную структурную роль в организме человека [1]. Около 40% всего коллагена находится в коже, 10–20% в костях и зубах и 7–8% в кровеносных сосудах. Необычная структура молекулы коллагена (тройная спираль) приводит к особенностям его оптических свойств и молекулярной подвижности.

Альбумин — один из важнейших плазменных белков, поддерживает гомеостаз организма, содержится во всех тканях и жидкостях тела, причем его концентрация достаточно постоянна [2]. Альбумин синтезируется в печени; за 24 ч в организме синтезируется 10–15 г альбумина. Строение аминокислотных остатков, входящих в состав сывороточного альбумина, обуславливает его люминесценцию.

Изменения показателя pH и ионной силы раствора могут привести к изменениям в структуре молекулы белка. В связи с этим очень важными являются исследования как структурных изменений молекул белков в водных растворах, так и процессов, связанных с объединением молекул в наномолекулярные кластеры.

Для всех тканей характерно определенное соотношение между концентрациями калия и натрия. В организме человека около 98% калия находится внутри клеток тканей, а в транспортных системах, где происходит синтез и транспортировка белка, преимущественно содержится натрий. Калий и натрий, играя важную роль в процессе внутриклеточного и межклеточного обмена, являются основными потенциалобразующими ионами. Вместе они участвуют в возникновении нервного импульса, механизме кратковременной памяти, влияют на состояние мышечной и сердечно-сосудистой систем. Поэтому изучение взаимодействия этих металлов с молекулами белков — важная и актуальная проблема современной биофизики и медицины.

Для изучения межмолекулярных взаимодействий и динамики молекул в растворах могут быть успешно использованы оптические методы. В настоящей работе исследования динамики молекул белков проводились с помощью методов фотонно-корреляционной спектроскопии рассеянного света [3] и поляризации флуоресценции [4]. Для экспериментов использовались белки фирмы «Sigma» — бычий сывороточный альбумин и коллаген.

## Метод динамического светорассеяния

Динамическое рассеяние света связано с флуктуациями концентрации рассеивающих частиц, находящихся в броуновском движении. Для растворов макромолекул корреляционная функция  $g(t)$  рассеянного света связана с коэффициентом трансляционной диффузии  $D_t$ :

$$g^{(1)}(t) = a \langle E^*(0)E(t) \rangle = c_0 \exp(-D_t q^2 t), \quad (1)$$

где  $q$  — волновой вектор рассеянного света.

Для определения корреляционной функции используется метод фотонно-корреляционной спектроскопии (ФКС). Метод позволяет получать значения коэффициентов трансляционной диффузии частиц и их гидродинамических радиусов.

В работе [5] была рассмотрена связь между статическими и динамическими параметрами рассеяния света в растворах макромолекул. Концентрационная зависимость коэффициента трансляционной диффузии  $D_t$  может быть представлена в виде вириального разложения по малым концентрациям. В соответствии с этим связь между коэффициентом  $D_t$ , массой молекулы  $M$ , коэффициентом межмолекулярного взаимодействия  $B$  и характеристической вязкостью белкового раствора  $[\eta]$  определяется уравнением

$$D_t = D_0 \{1 + (2BM - [n])c\}. \quad (2)$$

Характеристическая вязкость — предельное значение вязкости при  $c \rightarrow 0$

$$[\eta] = \lim_{c \rightarrow 0} \frac{\eta - \eta_0}{c \eta_0}, \quad (3)$$

где  $\eta_0$  — вязкость растворителя, а  $c$  — концентрация раствора. Величина  $[\eta]$  связана с размерами и формой макромолекул в растворе.  $D_0$  — коэффициент трансляционной диффузии, определяемый по формуле Стокса–Эйнштейна для сферической незаряженной частицы

$$D_0 = \frac{kT}{f}. \quad (4)$$

В нашем эксперименте значения коэффициента трансляционной диффузии рассчитывались непосредственно из корреляционной функции.

Согласно формуле (2), в случае заряженных частиц в растворе коэффициент  $D_t$  должен зависеть от концентрации макромолекул, их суммарного поверхностного заряда  $Z$  и ионной силы раствора  $\mu$ , поскольку коэффициент  $B$ , согласно формуле Скетчарда [6], есть функция  $Z^2/\mu$ .

### Метод поляризации флуоресценции

Для экспериментальной реализации метода поляризации флуоресценции последовательно измеряют компоненты интенсивности флуоресценции при параллельном и перпендикулярном направлениях вектора поляризации излучаемого света относительно вектора возбуждающего света (при возбуждении вертикально поляризованным излучением).

Как было показано Вавиловым, флуорофоры преимущественно поглощают те фотоны, у которых направление вектора электрического поля параллельно дипольному моменту поглощения.

Для каждого флуорофора направления дипольных моментов при поглощении и при испускании фиксированы, а угол  $\theta$  между ними определяет анизотропию флуоресценции

$$r = \frac{I_{\parallel} - I_{\perp}}{I_{\parallel} + 2I_{\perp}} = \frac{3\cos^2\theta - 1}{2}. \quad (5)$$

Степень поляризации флуоресценции связана с анизотропией по формуле

$$P = \frac{3r}{2+r}. \quad (6)$$

За время жизни возбужденного состояния флуорофора за счет вращательной диффузии изменяется направление испускающего диполя, что уменьшает измеряемую анизотропию. Угол поворота за время жизни возбужденного состояния молекулы в растворителе определяется температурой и вязкостью растворителя, объемом молекулы и временем жизни возбужденного состояния. Согласно теории вращательной деполяризации люминесценции Левшина–Перрена [1, 7], при поляризованном возбуждении справедливо следующее соотношение:

$$\frac{1}{P} = \frac{1}{P_0} + \left( \frac{1}{P_0} - \frac{1}{3} \right) \frac{kT}{V\eta} \tau_{\parallel}. \quad (7)$$

В формуле (7) учитывается только вращательное движение молекул.

Если связать время корреляции вращательной диффузии  $\tau_{\text{rot}}$  с молекулярными параметрами флуоресцирующего объекта

$$\tau_{\text{rot}} = \frac{V\eta}{kT} = \frac{M\eta}{\rho kT}, \quad (8)$$

то можно получить зависимость

$$\frac{1}{P} = \frac{1}{P_0} + \left( \frac{1}{P_0} - \frac{1}{3} \right) \frac{\tau_{\parallel}}{\tau_{\text{rot}}}. \quad (9)$$

Здесь  $P$  — наблюдаемая степень поляризации;  $P_0$  — ее предельное значение в отсутствие деполяризации;  $V, M$  — объем и масса вращающейся молекулы;  $\rho$  — ее плотность;  $\tau_{\parallel}$  — время жизни возбужденного состояния;  $\tau_{\text{rot}}$  — время корреляции вращательной подвижности (переориентации) молекулы;  $k$  — константа Больцмана,  $\eta$  — вязкость раствора,  $T$  — абсолютная температура. Степень поляризации возрастает с увеличением подвижности излучающей молекулы и определяется массой частицы.

### Экспериментальные результаты и обсуждение

**1.** В работе были исследованы растворимый коллаген I типа из кожи теленка и бычий сывороточный альбумин (препараты немецкой фирмы «Sigma-Aldrich»).

При изучении трансляционной диффузии макромолекул в растворах использовались образцы с концентрацией коллагена  $c = 0.055$  мг/мл. Водородный показатель среды (рН) варьировался с помощью добавления малых количеств уксусной кислоты  $\text{CH}_3\text{COOH}$  или щелочи  $\text{KOH}$ .

В экспериментах использовались соли металлов  $\text{NaCl}$  и  $\text{KCl}$ . Значения ионной силы рассчитывались по формуле [6]

$$\mu = \frac{1}{2} \sum (z_i^+ n^c + z_i^- n^a),$$

где  $z_i$  и  $n$  — заряды и парциальные концентрации присутствующих в растворе катионов и анионов.

При исследовании динамических параметров молекул коллагена в чистом водном растворе и в растворах с добавлением соли  $\text{NaCl}$  были получены нелинейные зависимости коэффициента трансляционной диффузии от рН с максимумом вблизи изоэлектрической точки рН 6.0 (минимальное значение поверхностного заряда молекулы белка) (рис. 1). Справа и слева от рН 6 коэффициент трансляционной диффузии уменьшается по сравнению с его значением в изоэлектрической точке.

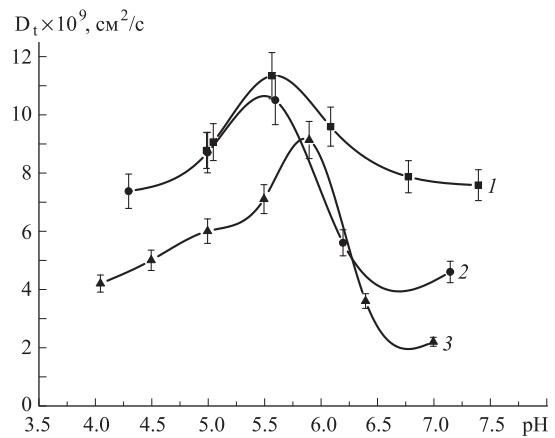


Рис. 1. Зависимость коэффициента трансляционной диффузии  $D_t$  коллагена от показателя рН: в чистом водном растворе (кривая 1), с добавлением соли  $\text{CaSO}_4$  (кривая 2, ионная сила раствора  $\mu = 10^{-3}$  моль/л), с добавлением соли  $\text{NaCl}$  (кривая 3, ионная сила раствора  $\mu = 10^{-3}$  моль/л)

В соответствии с формулой (2) коэффициент трансляционной диффузии белка должен уменьшаться, если его характеристическая вязкость превышает произведение массы молекулы на коэффициент межмолекулярного взаимодействия. Действительно, как следует из [8], характеристическая вязкость коллагена ( $1150 \text{ см}^3/\text{г}$ ) более чем на два порядка выше, чем вязкость таких глобулярных белков, как, например, альбумин ( $3.7 \text{ см}^3/\text{г}$ ). Ранее в работе [9] нами было показано, что в водных растворах альбумина и гамма-глобулина коэффициент трансляционной диффузии  $D_t$  имеет минимум в изоэлектрической точке, а не максимум, как в растворах коллагена. Это определяется тем, что для этих белков произведение  $BM$  в формуле (2) имеет большую величину по сравнению с коэффициентом характеристической вязкости  $[\eta]$ . Величина  $B$  увеличивается с ростом заряда на белке, что и определяет рост коэффициента трансляционной диффузии. Для коллагена модуль разности ( $2BM - [\eta]$ ) уменьшается с ростом заряда, что приводит к уменьшению  $D_t$  по сравнению с его значением в изоэлектрической точке.

Характер зависимости коэффициента  $D_t$  коллагена резко меняется при добавлении в раствор соли KCl — вместо максимума в зависимости  $D_t$  от pH наблюдается минимум (рис. 2). Кроме того, величины коэффициентов диффузии в чистом водном растворе коллагена и в растворе с ионами натрия почти на два порядка больше, чем в растворах, содержащих ионы калия:  $D_t(\text{H}_2\text{O}) = 10^{-8} \text{ см}^2/\text{с}$ ,  $D_t(\text{Na}^+) = 8.6 \cdot 10^{-9} \text{ см}^2/\text{с}$  ( $\mu = 10^{-3} \text{ моль/л}$ , pH 6.0),  $D_t(\text{K}^+) = 4.7 \cdot 10^{-10} \text{ см}^2/\text{с}$  ( $\mu = 10^{-3} \text{ моль/л}$ , pH 6.0) (см. рис. 1, 2).

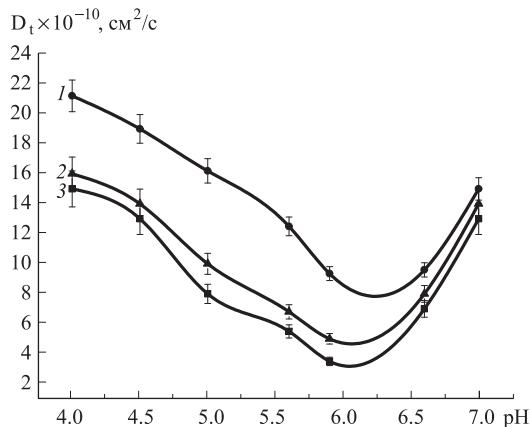


Рис. 2. Зависимость коэффициента трансляционной диффузии  $D_t$  коллагена от показателя pH для водных растворов коллагена с добавлением соли KCl (для ионной силы раствора  $\mu = 10^{-4} \text{ моль/л}$  — кривая 1, для  $\mu = 10^{-3} \text{ моль/л}$  — кривая 2, для  $\mu = 10^{-2} \text{ моль/л}$  — кривая 3)

Как видно из рис. 2, минимум pH зависимости коэффициентов трансляционной диффузии в водных растворах коллагена, содержащих соль KCl, в области изоэлектрической точки становится глубже с ростом ионной силы раствора. Это указывает на то, что с увеличением концентрации ионов  $K^+$  в растворе масса рассеивающих частиц растет, что связано с образованием нанокластеров.

**2.** В работе были исследованы спектры флуоресценции растворов бычьего сывороточного альбумина, содержащих соли NaCl и KCl. Оказалось, что наличие в растворах ионов  $\text{Na}^+$  не приводит к значительным

изменениям интенсивности в спектре флуоресценции альбумина, в то время как наличие ионов  $\text{K}^+$  вызывает уменьшение величины интенсивности флуоресценции. Это, вероятно, связано с тем, что ионы калия прочно связываются с отрицательными группами на поверхности белка; характер взаимодействия макромолекул в растворах изменяется (рис. 3).

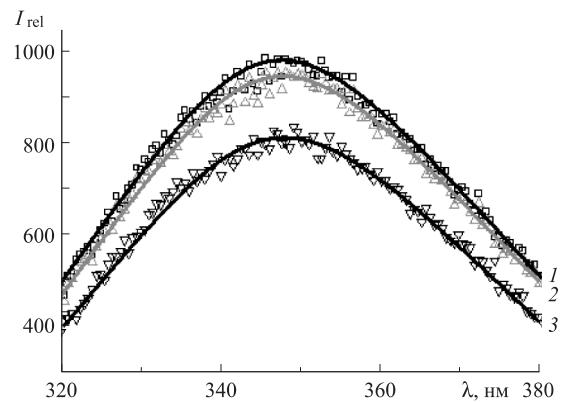


Рис. 3. Спектры флуоресценции растворов бычьего сывороточного альбумина: 1 — без добавления солей ( $c_{\text{BSA}} = 4 \cdot 10^{-6} \text{ г/см}^3$ , pH 4.9), 2 — при добавлении хлорида натрия ( $c_{\text{NaCl}} = 3 \cdot 10^{-3} \text{ г/см}^3$ ), 3 — при добавлении хлорида калия ( $c_{\text{KCl}} = 10^{-5} \text{ г/см}^3$ )

Методом поляризации флуоресценции была исследована вращательная подвижность молекул в растворах альбумина, содержащих ионы  $\text{K}^+$  и  $\text{Na}^+$ . Поляризация частиц в растворах, в которые добавлялся хлорид калия, возрастила при увеличении концентрации соли (рис. 4). Все исследования проводились в области изоэлектрической точки сывороточного альбумина (pH 4.9 [2]). В соответствии с теорией Левшина-Перрена (7), (9) рост поляризации флуоресценции свидетельствует о росте времени корреляции вращательной подвижности частиц (рис. 4), а следовательно, и о росте их массы (формула (8)).

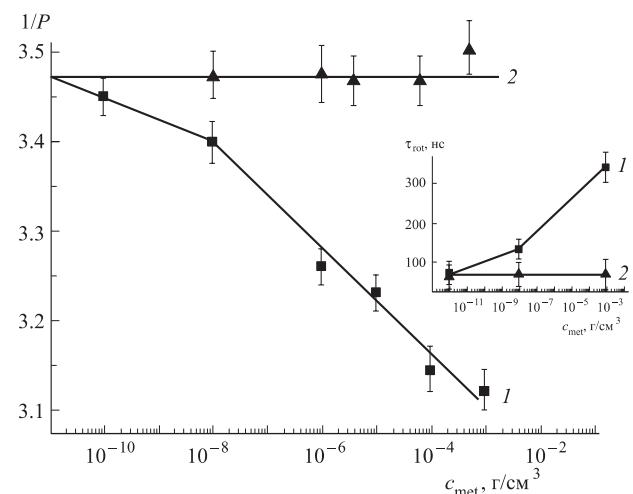


Рис. 4. Концентрационные зависимости обратного значения степени поляризации флуоресценции и времен корреляции вращательной подвижности частиц в растворах бычьего сывороточного альбумина ( $c_{\text{BSA}} = 4 \cdot 10^{-6} \text{ г/см}^3$ , pH 4.9), содержащих хлорид калия (кривая 1) и натрия (кривая 2)

При добавлении в растворы альбумина хлорида натрия поляризация флуоресценции не изменяется; значения  $\tau_{\text{rot}}$  частиц остаются постоянными (рис. 4, кривая 2).

Как было показано ранее [9, 10], наличие в растворах белков ионов с большим ионным радиусом приводит к преобладанию сил диполь–дипольного взаимодействия между молекулами белка по сравнению с силами кулоновского отталкивания и образованию макромолекулярных комплексов вблизи изоэлектрической точки. Ионный радиус  $K^+$  гораздо больше, чем у  $Na^+$  (для сравнения:  $R_{K^+} = 1.33 \text{ \AA}$ ,  $R_{Na^+} = 0.8 \text{ \AA}$ ). Крупные частицы обладают меньшей подвижностью и большей массой. Трансляционная и вращательная подвижности частиц в растворах коллагена и бычьего сывороточного альбумина, содержащих соль  $KCl$ , меньше, чем в аналогичных растворах, содержащих  $NaCl$ . Это свидетельствует о том, что механизм взаимодействия между молекулами белков в растворах, содержащих ионы большего радиуса, изменяется. Это приводит к объединению белков в макромолекулярные комплексы — нанокластеры.

### Заключение

С помощью методов динамического светорассеяния и поляризации флуоресценции были исследованы параметры трансляционной и вращательной подвижности молекул коллагена и бычьего сывороточного альбумина в водных растворах с добавлением  $NaCl$  и  $KCl$ . Было обнаружено, что величины ионных радиусов металлов влияют на электростатическое взаимодействие между макромолекулами белка. Наличие в растворах коллагена

и сывороточного альбумина ионов калия, обладающих большим ионным радиусом, приводят к образованию макромолекулярных комплексов — дипольных белковыхnanoструктур. При наличии в растворах ионов натрия nanoструктуры не образуются.

Как было отмечено ранее, калий в основном находится внутри клеток. При лизисе, когда разрушается оболочка клетки, калий попадает во внеклеточную среду. При этом может произойти отравление организма избытком калия и нарушение нормального функционирования белков. Таким образом, полученные результаты очень важны для современной медицины.

### Список литературы

1. Ленинджер А.Л. Основы биохимии. М., 1985.
2. Характеристики продуктов: альбумин // <http://www.lifefactor.ru>.
3. Камминс Г.З., Пайк Е.Р. Спектроскопия оптического смешения и корреляция фотонов. М., 1978.
4. Лакович Д. Основы флуоресцентной спектроскопии. М., 1986.
5. Петрова Г.П., Петрусеевич Ю.М. // Биомед. радиоэлектрон. 2000. № 3. С. 41.
6. Мартин Р. Введение в биофизическую химию. М., 1966.
7. Perrin F. // J. Physique. 1926. N 7. P. 390.
8. Маршалл Э. Биофизическая химия. Т. 1. М., 1981.
9. Бойко А.В., Гаркуша Е.В., Петрова Г.П. и др. Структурные фазовые переходы в растворах белков, содержащих ионы легких и тяжелых металлов. Препринт МГУ. М., 2005.
10. Петрова Г.П., Петрусеевич Ю.М., Тен Д.И. // Квант. электрон. 2002. № 10. С. 897.

### Molecular mobility in the protein solutions containing metal ions with various ionic radii

I. A. Sergeeva<sup>1a</sup>, N. V. Sokol<sup>1b</sup>, M. S. Ivanova<sup>1</sup>, G. P. Petrova<sup>1</sup>, Yu. M. Petrusevich<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Department of Molecular Physics; <sup>2</sup>Department of Medical Physics, Faculty of Physics, M. V. Lomonosov Moscow State University, Moscow 119991, Russia.

E-mail: <sup>a</sup>sergeeva@physics.msu.ru, <sup>b</sup>Sokol@phys.msu.ru.

In the solutions of collagen and bovine serum albumen the translation and rotary diffusion coefficients dependences on pH and concentration of  $Na^+$  and  $K^+$  ions have been received by methods of photon-correlation spectroscopy and polarized fluorescence. It is revealed that the size of ionic radius of metal influences on intermolecular interactions and mobility of protein molecules in solutions. Potassium ions have the big ionic radius and behave similarly heavy metals. They could lead to aggregation of protein molecules near isoelectric point.

**Keywords:** collagen, serum albumen, dynamic light scattering (DLS), photon-correlation spectroscopy, polarized fluorescence, translation diffusion coefficient, correlation time of rotational diffusion, isoelectric point, potassium, sodium.

PACS: 87.15.-v, 87.83.+a.

Received 25 February 2008.

English version: *Moscow University Physics Bulletin* 4(2009).

### Сведения об авторах

1. Сергеева Ирина Александровна — ассистент; тел.: 939-10-88, e-mail: sergeeva@physics.msu.ru.
2. Сокол Наталья Васильевна — канд. физ.-мат. наук, мл. науч. сотр.; тел.: 939-43-88, e-mail: sokol@phys.msu.ru.
3. Иванова Мария Сергеевна — студентка; тел.: 939-10-88, e-mail: ivanova@mail.ru.
4. Петрова Галина Петровна — докт. физ.-мат. наук, профессор; тел.: 939-10-88, e-mail: petrova@phys.msu.ru.
5. Петрусеевич Юрий Михайлович — докт. физ.-мат. наук, профессор; тел.: 939-10-88.