

ОПТИКА И СПЕКТРОСКОПИЯ. ЛАЗЕРНАЯ ФИЗИКА

Исследование молекулярной подвижности фермента пепсина методом фотонной корреляционной спектроскопииСяолэй Чжан^{1,a}, Г. П. Петрова^{1,b}, Ю. М. Петрусевич², И. А. Сергеева¹*Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова, физический факультет,*¹*кафедра молекулярной физики; ²кафедра медицинской физики.**Россия, 119991, Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 2.**E-mail: ^azhangxl@physics.msu.ru, ^bpetrova@phys.msu.ru*

Статья поступила 17.06.2011, подписана в печать 13.10.2011

С помощью метода фотонной корреляционной спектроскопии получена зависимость коэффициента межмолекулярного взаимодействия от рН для фермента пепсина с минимумом вблизи его изоэлектрической точки. Исследованы динамические параметры макромолекул пепсина в растворах, содержащих различные ионы металлов: калия, кобальта, свинца, цинка, цезия и рубидия. Показано, что при добавлении этих ионов коэффициенты трансляционной диффузии уменьшаются. Обнаружено, что в области температур 298–320 К в чистом водном растворе фермента пепсина при нагревании наблюдается увеличение подвижности молекул пепсина с выходом на насыщение. Рассчитана энергия активации этого процесса по закону Аррениуса.

Ключевые слова: ионы металлов, пепсин, метод фотонной корреляционной спектроскопии, изоэлектрическая точка, коэффициент межмолекулярного взаимодействия, коэффициент трансляционной диффузии.

УДК: 532.77.11, 537.635. PACS: 78.35.+c, 87.15.-v, 33.15.-e, 42.62.-b.

Введение

Ферменты играют чрезвычайно важную роль в функционировании различных биосистем, поэтому изучение физических параметров молекул ферментов в водных растворах является весьма интересной задачей биомедицинской физики. Поверхность молекулы фермента содержит многочисленные заряженные группы, причем величину заряда можно изменять в широких пределах путем изменения рН раствора. Кроме того, размер и масса молекулы строго определена для каждого вида фермента. Сильное электростатическое взаимодействие между молекулами фермента оказывает существенное влияние на характер броуновской динамики молекул ферментов. С точки зрения экологии и медицины представляет интерес изучение влияния ионов металлов на растворы ферментов.

В организме человека различные металлы играют весьма важную роль. Основными из них являются натрий, калий, кальций, магний, содержащиеся в человеческом теле в количестве от десятых долей процента до нескольких процентов. Такие металлы, как кобальт, молибден, цинк и др., присутствуют в организме в гораздо меньших концентрациях и существуют в связанном состоянии с ферментами, при этом их совокупное содержание составляет менее процента. В больших количествах многие из этих металлов токсичны.

Известно, что белковые макромолекулы, такие как альбумин, коллаген, гамма-глобулин и т. д. при определенных условиях, например в присутствии ионов металлов, образуют надмолекулярные структуры, при этом кроме молекул белков в растворах появляются их агрегаты — дипольные кластеры [1, 2].

Цель настоящей работы состоит в изучении молекулярной подвижности пепсина в водном растворе

и в растворах, содержащих различные ионы металлов, например калия, кобальта, свинца, цинка, цезия и рубидия.

Объект исследования — пепсин

Пепсин — протеолитический фермент класса гидролаз, присутствующий в желудочном соке млекопитающих, птиц, пресмыкающихся и большинства рыб, расщепляет белки и пептиды. Пепсин представляет собой глобулярный фермент с молекулярной массой около 34500 Да. Изоэлектрическая точка пепсина, по различным литературным данным [3–6], может изменяться от 1.0 до 3.3 рI в зависимости от методов измерений и типа пепсина. Молекула пепсина — полипептидная цепь, которая состоит из 340 аминокислот, содержит три дисульфитные связи (–S–S–) и фосфорную кислоту [7].

Пепсин играет значительную роль в пищеварении у млекопитающих, в том числе у человека, являясь ферментом, выполняющим один из важных этапов в цепочке превращений белков пищи в аминокислоты. Железами желудка пепсин вырабатывается в неактивном виде, переходит в активную форму при воздействии на него соляной кислоты. Пепсин действует только в кислой среде желудка; при попадании в щелочную среду двенадцатиперстной кишки становится неактивным.

В нашей работе использовался препарат пепсин фирмы «Serwa» из слизистой оболочки желудка свиньи.

Методика эксперимента

Метод фотонной корреляционной спектроскопии позволяет определить коэффициент трансляционной диффузии дисперсных частиц в жидкости путем анализа спектра флуктуаций интенсивности рассеянного

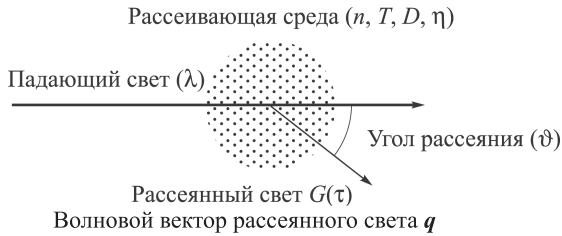


Рис. 1. Рассеяние света

света [8] (рис. 1). Хаотическое броуновское движение дисперсных частиц вызывает микроскопические флуктуации их локальной концентрации. В свою очередь, эти флуктуации приводят к локальным неоднородностям показателя преломления среды. При прохождении лазерного луча через такую среду часть света будет рассеяна на этих неоднородностях. Флуктуации интенсивности рассеянного света будут соответствовать флуктуациям локальной концентрации дисперсных частиц. Временная автокорреляционная функция, согласно определению, имеет следующий вид:

$$G(\tau) = \langle I(0)I(t - \tau) \rangle = \lim_{t_m \rightarrow \infty} \frac{1}{t_m} \int_0^{t_m} I(0)I(t - \tau) dt, \quad (1)$$

где t_m — время интегрирования (время накопления фотоотсчетов).

В соответствии с гипотезой Онзагера, релаксация микроскопических флуктуаций концентрации к равновесному состоянию может быть описана первым законом Фика (уравнение диффузии):

$$\frac{\partial c(r, t)}{\partial t} = -D_t \nabla^2 c(r, t), \quad (2)$$

где $c(r, t)$ — концентрация и D_t — коэффициент трансляционной диффузии частиц. Можно показать, что автокорреляционная функция интенсивности экспоненциально затухает во времени и характерное время релаксации однозначно связано с D_t .

Корреляционная функция интенсивности рассеянного света имеет вид

$$G(\tau) = \alpha \exp\left(-\frac{2\tau}{\tau_c}\right) + b. \quad (3)$$

В соответствии с решением уравнения диффузии обратное время корреляции равно

$$\frac{1}{\tau_c} = D_t q^2. \quad (4)$$

Волновой вектор рассеянного света (рис. 1) описывается выражением

$$q = \left(\frac{4\pi n}{\lambda}\right) \sin \frac{\theta}{2}, \quad (5)$$

где n — показатель преломления жидкости, в которой взвешены дисперсные частицы, λ — длина волны лазерного света, θ — угол рассеяния.

Коэффициент трансляционной диффузии заряженных молекул может отличаться от D нейтральных молекул согласно формуле

$$D_t = D_0 \{1 + (2BM - [\eta])c\}, \quad (6)$$

$$[\eta] = \lim_{c \rightarrow 0} \frac{\eta - \eta_0}{c\eta}$$

где M — масса частиц, B — коэффициент межмолекулярного взаимодействия. В уравнении (6) $[\eta]$ означает так называемую характеристическую вязкость, которая зависит от электростатического взаимодействия молекул.

Для сферических незаряженных частиц, согласно закону Стокса-Эйнштейна:

$$D = \frac{kT}{6\pi\eta R}, \quad (7)$$

где R — радиус частицы, T — температура.

Выражение для коэффициента межмолекулярного взаимодействия B в разложении для свободной энергии, согласно теории Скэтчарда [9], можно записать в виде

$$B = \frac{V_1}{M_2^2} \left(\frac{Z^2}{4m_3} + \frac{\beta_{22}}{2} - \frac{\beta_{23}m_3}{4 + 2\beta_{33}m_3} \right), \quad (8)$$

где V_1 — удельный объем растворителя, Z — заряд макроиона, M_2 — его масса, m_3 — концентрация ионов соли, параметры β_{22} , β_{23} , β_{33} определяются взаимодействием между макроионами, между макроионами и ионами соли и только между ионами соли соответственно.

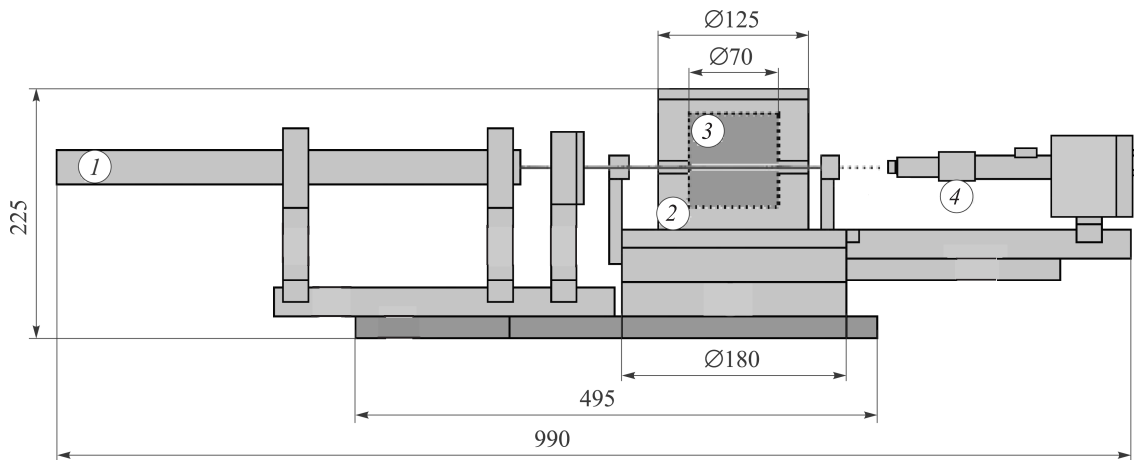


Рис. 2. Схема спектрометра Photocor Complex: 1 — диодный лазер, 2 — термостат, 3 — кювета для образца, 4 — система ФЭУ

Установка «Photocor Complex» [10] представлена на рис. 2. Она собрана по традиционной схеме спектрометра динамического рассеяния света, работающего в гомодинном режиме и предназначенного для измерений динамического и статического рассеяния света и измерения размеров наночастиц. Источником света в установке служит диодный лазер. Рассеянный под углом 90° свет регистрируется ФЭУ. Выходной фототок представляет собой последовательность импульсов, определяемых флуктуациями интенсивности. Из получаемой в результате корреляционной функции интенсивности рассеянного света с помощью программы по технологии программируемой логики (flex-logic) определяется коэффициент трансляционной диффузии частиц.

Результаты и обсуждение

Макромолекулы ферментов в растворе представляют собой частицы, основным видом взаимодействия между которыми является кулоновское отталкивание. Его минимальное значение наблюдается в изоэлектрической точке, когда суммарный заряд на поверхности фермента равен нулю. В качестве примера на рис. 3 показана зависимость коэффициента межмолекулярного взаимодействия B от рН для пепсина, имеющего минимум вблизи рН 1.6. Согласно теории Скэтчарда, коэффициент межмолекулярного взаимодействия B изменяется с ростом суммарного заряда на макромолекуле по параболическому закону $\sim Z^2$ (эффект Доннана) с минимумом в точке $Z = 0$ (изоэлектрическая точка).

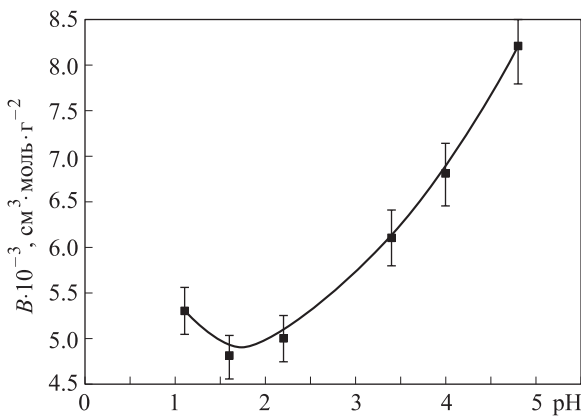


Рис. 3. Зависимость коэффициента межмолекулярного взаимодействия B от рН в чистом водном растворе пепсина при температуре $T = 298 \text{ K}$

Поскольку изоэлектрическая точка пепсина рI 1.6 находится в очень кислой среде (для регулирования рН раствора пепсина используется соляная кислота HCl), левая часть параболической зависимости от рН относительно изоэлектрической точки не была изучена.

При исследовании динамических параметров пепсина в чистом водном растворе и в растворе с добавлением соли KCl были получены нелинейные зависимости коэффициента трансляционной диффузии от показателя рН с минимумом вблизи изоэлектрической точки рI 1.6 (рис. 4). Как видно из рис. 5, справа и слева от изоэлектрической точки коэффициент трансляционной диффузии увеличивается. Согласно формуле (6), коэф-

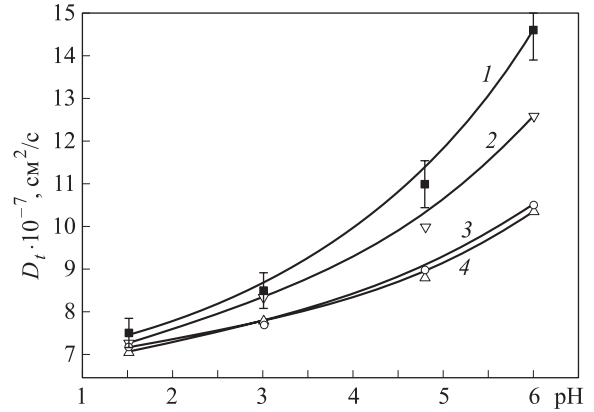


Рис. 4. Зависимость коэффициента трансляционной диффузии D_t от рН при температуре $T = 298 \text{ K}$ для чистого водного раствора пепсина (кривая 1) и с добавлением соли KCl: ионная сила раствора $I = 0.0003 \text{ моль/л}$ (кривая 2), 0.001 моль/л (3), 0.01 моль/л (4)

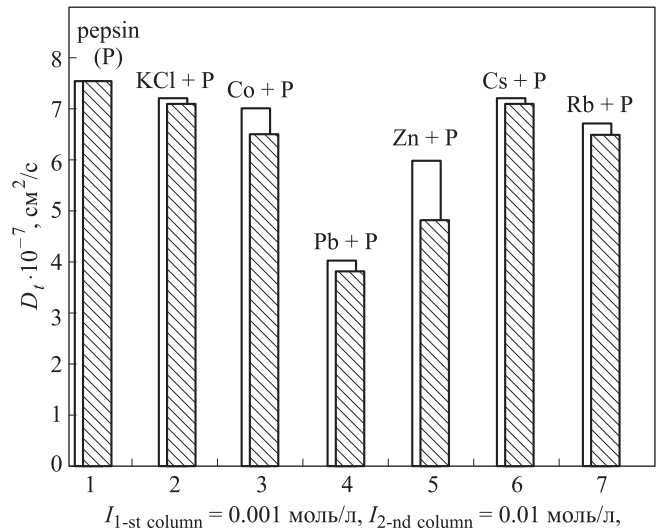


Рис. 5. Сравнительные величины коэффициентов трансляционной диффузии при температуре $T = 298 \text{ K}$ для чистого водного раствора пепсина (1) и при добавлении различных солей — калия (2), кобальта (3), свинца (4), цинка (5), цезия (6) и рубидия (7) (рН 1.6, $I_{\text{column 1}} = 0.001 \text{ моль/л}$, $I_{\text{column 2}} = 0.01 \text{ моль/л}$)

фициент межмолекулярного взаимодействия и коэффициент трансляционной диффузии связаны линейной зависимостью.

Коэффициент трансляционной диффузии в чистом водном растворе пепсина при фиксированном рН имеет большую величину по сравнению с D_t пепсина в растворе, содержащем ионы калия. Кроме того, с увеличением ионной силы KCl коэффициент трансляционной диффузии уменьшается, а затем при больших ионных силах (выше $I = 0.001 \text{ моль/л}$) коэффициент трансляционной диффузии не изменяется.

Аналогичные эксперименты были проведены для раствора пепсина в присутствии кобальта, свинца, цинка, цезия и рубидия в изоэлектрической точке при концентрации пепсина $c = 2.5 \text{ мг/мл}$ (рис. 5). Коэффициент трансляционной диффузии уменьшается

при добавлении этих солей. Максимальное падение D_t (почти в два раза) наблюдается при добавлении ионов свинца.

Как было показано в [11], присутствие в растворе ионов с большим ионным радиусом приводит к преобладанию сил диполь-дипольного взаимодействия между молекулами белка по сравнению с силами кулоновского отталкивания и к образованию макромолекулярных кластеров вблизи изоэлектрической точки. Коэффициент трансляционной диффузии в этом случае уменьшается, что означает рост массы рассеивающих частиц.

Ранее в работе [12] нами было показано, что в растворе коллагена с ионами свинца ($I = 0.001$ моль/л) вблизи изоэлектрической точки (рI 5.8) коэффициент трансляционной диффузии по сравнению с чистым водным раствором коллагена уменьшается примерно в 60 раз. В данной работе коэффициент трансляционной диффузии при добавлении свинца падает только в два раза. Этот эффект, по-видимому, может быть связан с тем, что молекула пепсина сильно протонирована, поскольку изоэлектрическая точка пепсина (рI 1.6) находится в очень кислой среде. В результате положительно заряженные ионы водорода препятствуют прочному связыванию тяжелых ионов калия, свинца и др. с отрицательно заряженными группами на поверхности макромолекулы пепсина.

На рис. 6 показаны зависимости коэффициента трансляционной диффузии от концентрации в чистом водном растворе пепсина при двух различных температурах. Видно, что за счет теплового движения при увеличении температуры коэффициент трансляционной диффузии растет. Кроме того, при двух температурах коэффициент трансляционной диффузии вблизи изоэлектрической точки не изменяется в диапазоне концентрации 2–15 мг/мл, а при рН 4.5 коэффициент трансляционной диффузии падает.

При рН 4.5, $T = 310$ К минимальный коэффициент трансляционной диффузии ($D_t = 1.4 \cdot 10^{-6}$ см²/с) наблюдается при концентрации $c > 11$ мг/мл. При рН 4.5, $T = 293$ К минимальный коэффициент трансляционной диффузии ($D_t = 0.9 \cdot 10^{-6}$ см²/с) наблюдается при концентрации $c > 7.5$ мг/мл.

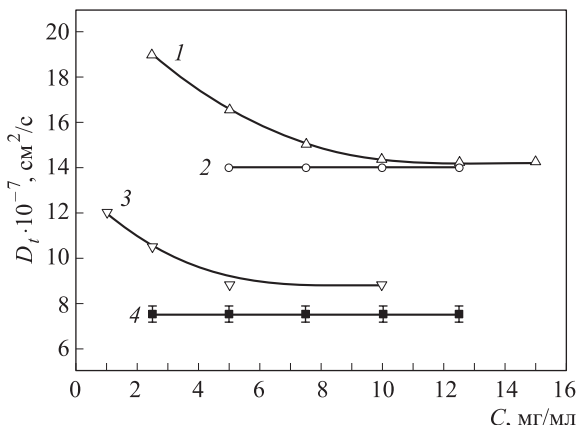


Рис. 6. Зависимость коэффициента трансляционной диффузии D_t от концентрации для чистого водного раствора пепсина при различных температурах и рН: кривая 1 — $T = 310$ К, рН 4.5; кривая 2 — $T = 310$ К, рН 1.6; кривая 3 — $T = 293$ К, рН 4.5; кривая 4 — $T = 293$ К, рН 1.6

На рис. 7 представлены зависимости коэффициента трансляционной диффузии пепсина от температуры в диапазоне $T = 298-320$ К в чистом водном растворе при различных концентрациях $c = 2.8-15$ мг/мл (рН 4.6).

Коэффициент трансляционной диффузии с ростом температуры в диапазоне $T = 298-320$ К достигает максимума (насыщения), причем чем меньше концентрация пепсина, тем быстрее достигается максимум коэффициента трансляционной диффузии при увеличении температуры. Максимум коэффициента трансляционной диффузии при различных концентрациях пепсина имеет одно и то же значение ($D_t = 1.9 \cdot 10^{-6}$ см²/с). Кроме того, такие кривые зависимости не изменяются при концентрации пепсина выше 10 мг/мл.

Обработка данных (рис. 8) по закону Аррениуса ($D_t = D_0 \exp(-E_a/kT)$) позволяет рассчитать энергию активации при различной концентрации пепсина в водном растворе. Энергия активации достигает минимума при концентрации 10 мг/мл. При дальнейшем увеличении концентрации энергия активации не уменьшается.

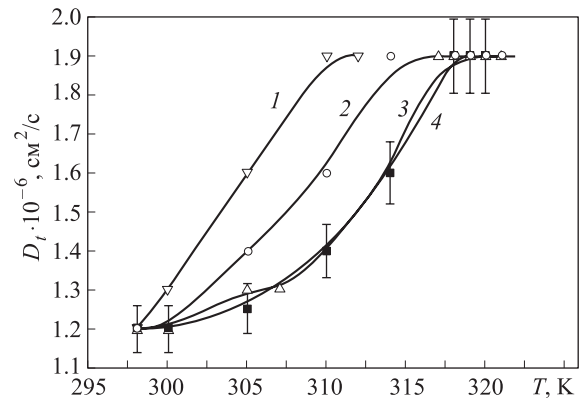


Рис. 7. Зависимость коэффициента трансляционной диффузии D_t от температуры для чистого водного раствора при различных концентрациях пепсина (рН 4.6): кривая 1 — $c = 2.8$ мг/мл; 2 — 5 мг/мл; 3 — 10 мг/мл; 4 — $c = 15$ мг/мл

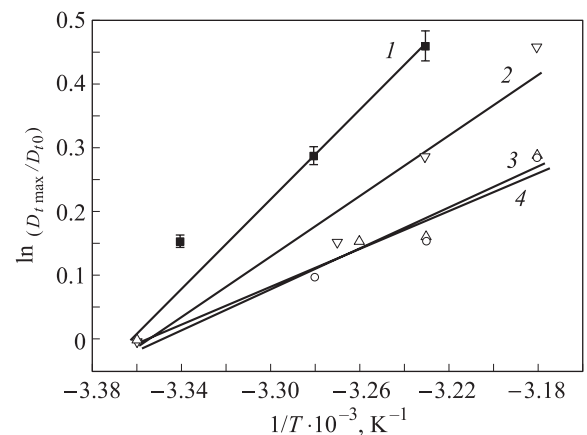


Рис. 8. Расчет энергии активации диффузионного процесса для чистого водного раствора пепсина при различных концентрациях (рН 4.6): кривая 1 — $c = 2.8$ мг/мл, $E_a = 7.03$ ккал/моль; 2 — $c = 5$ мг/мл, $E_a = 5.17$ ккал/моль; 3 — $c = 10$ мг/мл, $E_a = 4.99$ ккал/моль; 4 — $c = 15$ мг/мл, $E_a = 4.95$ ккал/моль

Заключение

С помощью метода фотонной корреляционной спектроскопии были исследованы молекулярные параметры пепсина в чистом водном растворе и в водных растворах с добавлением солей калия, кобальта, свинца, цинка, цезия и рубидия.

1. Коэффициенты диффузии и межмолекулярного взаимодействия для чисто водного раствора пепсина имеют нелинейную зависимость от pH, близкую к параболической, с минимумом вблизи изоэлектрической точки (pI 1.6).

2. Выявлено уменьшение коэффициента трансляционной диффузии вблизи изоэлектрической точки с ростом ионной силы в растворах пепсина, содержащих ионы калия, кобальта, свинца, цинка, цезия и рубидия. Наиболее заметное падение коэффициента трансляционной диффузии пепсина наблюдается вблизи изоэлектрической точки при добавлении свинца. Этот эффект связан с образованием дипольных кластеров пепсина при диполь-дипольном взаимодействии между молекулами. По сравнению с размером дипольных кластеров других макромолекул, таких как альбумин, гамма-глобулин, дипольный кластер пепсина обладает относительно небольшим размером, так как в очень кислой среде положительно заряженные ионы водорода препятствуют прочному связыванию ионов металлов с отрицательно заряженными группами на поверхности пепсина.

3. Обнаружено, что в области температур 298–320 К в чистом водном растворе фермента пепсина при нагре-

вании наблюдается увеличение подвижности молекул пепсина с выходом на насыщение.

4. Энергия активации диффузионного процесса достигает минимума при концентрации пепсина 10 мг/мл. При дальнейшем увеличении концентрации энергия активации сохраняется постоянной.

Список литературы

1. Petrova G.P., Petrusevich Yu.M., Evseevicheva A.N. // Gen. Physiol. Biophys. 1998. **17**, N 2. P. 97.
2. Петрова Г.П., Петрусевич Ю.М., Евсеевичева А.Н. // Вестн. Моск. ун-та. Физ. Астрон. 1998. № 4. С. 71 (Moscow University Phys. Bull. 1998. N 4. P. 91).
3. Patrickios C.S., Yamasaki E.N. // Analytical Biochem. 1995. **231**. P. 82.
4. Chaiyavat Chaiyasut, TaKao Tsuda. // Chromatography. 2001. **22**. N 2.
5. Neurath H., Bailey K. // Proteins. 1954. **2**. Part. A.
6. <http://www.sigmaldrich.com/life-science/metabolomics/enzyme-explorer/analytical-enzymes/pepsin.html>
7. Коротько Г.Ф. // Кубанский науч. мед. вестн. 2006. № 7–8 (88–89). С. 17.
8. Камминс Г., Пайк Э.Р. Спектроскопия оптического смешения и корреляция фотонов. М., 1978.
9. Scatchard G.J. // Ann. N.Y. Acad. Sci. 1949. **51**. P. 2315.
10. <http://www.photocor.ru/>
11. Петрова Г.П., Петрусевич Ю.М., Тен Д.И. // Квант. электродин. 2002. **32**, № 10. С. 897.
12. Петрова Г.П., Петрусевич Ю.М., Перфильева И.А. и др. // Вестн. Моск. ун-та. Физ. Астрон. 2008. № 4. С. 68 (Moscow University Phys. Bull. 2008. N 4. P. 296).

Investigation of molecular mobility of enzyme pepsin by photon-correlation spectroscopy method

Xiaolei Zhang^{1,a}, G. P. Petrova^{1,b}, Yu. M. Petrusevich², I. A. Sergeeva¹

¹Department of Molecular Physics; ²Department of Medical Physics, Faculty of Physics, M. V. Lomonosov Moscow State University, Moscow 119991, Russia.
E-mail: ^a zhangxl@physics.msu.ru, ^b petrova@phys.msu.ru.

Photon-correlation spectroscopy method was used for obtaining pH-dependence of intermolecular interaction coefficient for enzyme pepsin in water solution, which has a minimum near its isoelectric point. Dynamic parameters of pepsin macromolecules in solutions containing various metal ions: potassium, cobalt, lead, zinc, cesium and rubidium were studied. It was shown that presence of these ions in pepsin solution leads to decrease translational diffusion coefficients. We found that in the temperature range 298–320 K in pure water solution of pepsin, when heated, molecular mobility of pepsin increases, and finally becomes saturated. The energy activation for this process was calculated by the Arrhenius equation.

Keywords: metal ions, pepsin, photon-correlation spectroscopy method, isoelectric point, intermolecular interaction coefficient, translational diffusion coefficient.

PACS: 78.35.+c, 87.15.-v, 33.15.-e, 42.62.-b.

Received 17 June 2011.

English version: *Moscow University Physics Bulletin* 1(2012).

Сведения об авторах

1. Чжан Сяолэй — аспирант; тел.: (495) 939-10-88, e-mail: zhangxl@physics.msu.ru.
2. Петрова Галина Петровна — докт. физ.-мат. наук, профессор; тел.: (495) 939-10-88, e-mail: petrova@phys.msu.ru.
3. Петрусевич Юрий Михайлович — докт. физ.-мат. наук, профессор.
4. Сергеева Ирина Александровна — канд. физ.-мат. наук, ст. преподаватель; тел.: (495) 939-10-88, e-mail: sergeeva@physics.msu.ru.