

УДК 541. 64:547.962

ВЗАЙМОДЕЙСТВИЕ ПОЛИ-4-ВИНИЛПИРИДИНА
С СЫВОРОТОЧНЫМ АЛЬБУМИНОМ В КИСЛЫХ СРЕДАХ

М. И. Мустафаев, Е. А. Царева, В. П. Евдаков

Изучение взаимодействия молекул поли-4-винилпиридина с сывороточным альбумином при рН среды ниже изоэлектрической точки белка (рН 2,0–4,5) показало, что при смешении растворов полимера и белка образуется растворимый полиэлектролитный комплекс, находящийся в равновесии с исходными компонентами. Исследовано влияние ионной силы, рН среды, молекулярной массы полимера, а также исходных концентраций компонентов на взаимодействие полимер – белок. Определено массовое соотношение компонентов в комплексе.

В литературе уделено большое внимание межцепным макромолекулярным реакциям между противоположно заряженными полиэлектролитами [1–4]. Взаимодействие биополимеров с положительно заряженными синтетическими полимерами осталось практически не изученным. Данная работа посвящена исследованию реакций поли-4-винилпиридина различной молекулярной массы с бычьим сывороточным альбумином при рН 2,0–4,5.

В работе был использован поли-4-винилпиридин (П4ВП), полученный и фракционированный по методике [5, 6]. Молекулярные массы фракций П4ВП определяли вискозиметрически в 92%-ном этиловом спирте при $25,0 \pm 0,1^\circ$ по уравнению $[\eta] = -1,2 \cdot 10^{-4} \cdot M^{0,73}$ [5]. Бычий сывороточный альбумин (БСА) фирмы «Siech» (Польша) был охарактеризован методами седиментации ($S_0 = 4 \text{ c}_v$) и дисперсии оптического вращения. Наблюдали хорошее совпадение с литературными данными. Белок дополнительной очистке не подвергался. Были использованы растворы $1 \cdot 10^{-2}$ – $3 \cdot 10^{-3} \text{ г/дл}$ П4ВП и альбумина. Смеси готовили в объемном соотношении компонентов 1 : 1 из растворов одинаковой концентрации. Было установлено, что свежеприготовленные смеси и выдержаные в течение 24 час. дают тождественные результаты.

Измерения вязкости проводили в капиллярном вискозиметре Уббелоде при $25,0 \pm 0,1^\circ$. Для гелевой хроматографии использовали колонки длиной 100 см и внутренним диаметром 1,0 см, заполненные сефадексом G-200. Контроль за содержанием полимера в элюенте осуществляли с помощью прибора «Uvecord-1» при длине волны $\lambda = 254 \text{ нм}$. Скорость отбора элюента из колонки составляла 1,5 мл/час.

Седиментационные измерения проводили на аналитической ультрацентрифуге типа «Спинко-Е» при температуре $25,0 \pm 0,1^\circ$. Градиент показателя преломления регистрировали оптической схемой Фильпота – Свенсона с фазовой пластинкой. Скорость ротора составляла 56 000 об/мин. Численный расчет коэффициентов седиментации S_c производили по уравнению

$$S_c = \frac{2,303 \lg(x_n/x_m)}{(t_n - t_m) \omega^2} [7],$$

где x_n и x_m – положения границ седиментации, соответствующие максимуму и миниму седиментограммы соответственно; ω – угловая скорость вращения ротора, рад/сек; t – время, часы.

Изменение угла вращения для растворов белка и его смесей с полимером проводили на спектрополяриметре «Lasco ORD/UV-5». Процент спиральности был рассчитан по уравнениям Моффита и Шехтера [8]. Количество связанного белка и полимера рассчитывали из седиментационных и гель-хроматографических данных. Была построена калибровочная кривая зависимости площади пиков от начальной концентрации белка (c_0 , г/дл), по которой определяли в смеси концентрацию несвязанного в комплексе БСА (c_x , г/дл). Количество БСА, связанного в комплексе, наход-

дили по разности между c_0 и c_x . В тех случаях, когда в смеси свободный белок отсутствует, концентрация связанного белка равна c_0 . Расчет количества П4ВП в комплексе был проведен аналогичным образом.

Изучение зависимости приведенных вязкостей $\eta_{\text{пп}}/c$ для растворов П4ВП (рис. 1, а, кривая 1) и смеси П4ВП с белком (рис. 1, а, кривая 2) от концентрации П4ВП при pH 3,8 показало, что при смешивании белка с полимером наблюдается уменьшение значения приведенной вязкости почти в 2 раза по сравнению с чистым П4ВП в широком интервале концентраций. Этот факт может свидетельствовать о том, что взаимодействие

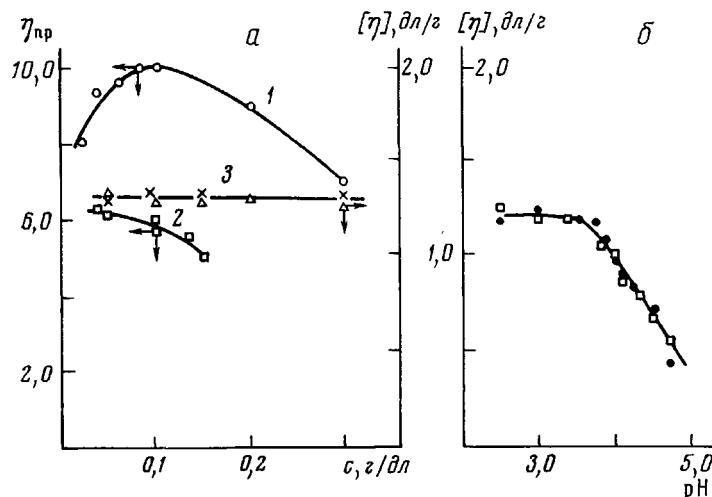


Рис. 1. Зависимости $\eta_{\text{пп}}$ от концентрации (а) и $[\eta]$ от pH среды (б)

а: 1 — П4ВП (0,5% CH_3COOH), 2 — смесь белок — полимер (1 : 1, pH 3,8, 0,5% CH_3COOH), 3 — смесь белок — полимер (\times) (1 : 1, pH 3,8) и раствор П4ВП (Δ) (0,5% $\text{CH}_3\text{COOH} + 0,1$ н. NaCl); б — смесь белок — полимер (\bullet) и раствор П4ВП (\square)

белка с полимером приводит к изменению объемной концентрации кинетических единиц и их формы. Последнее может быть связано с конформационными превращениями.

Данные седиментационного анализа показывают, что смесь характеризуется бимодальным распределением (рис. 2, б). Сравнение расчетных значений S_c белка и смеси показывает, что пик I соответствует сывороточному альбумину ($S_c=4 \text{ с}^2$). В аналогичных условиях макромолекулы П4ВП не осаждаются (рис. 2, а). Таким образом, можно считать, что пик II (рис. 2, б) относится к продукту взаимодействия белка с полимером. Взаимодействие между полимером и белком приводит к изменению конформации молекул белка. На рис. 3 приведены дисперсионные кривые для растворов белка и смеси. Расчет по уравнениям Моффита и Шехтера [8] показал, что спиральность белка в смеси уменьшается на 20%. Таким образом, полученные данные свидетельствуют о наличии полиэлектролитного комплекса, образованного бычьим сывороточным альбумином и П4ВП при pH 3,8.

Изменение pH резко сказывается на взаимодействии полимера с белком. На рис. 4 представлены зависимости $\eta_{\text{пп}}$ и S_c от pH для П4ВП и его смеси с белком. При уменьшении pH среды вязкость растворов П4ВП медленно возрастает. При $\text{pH} > 3,8$ наблюдается падение значений $\eta_{\text{пп}}$ (рис. 4, а, кривая 1) и частичная седиментация молекул П4ВП и комплекса, что затрудняет исследование процесса комплексообразования в этой области. Известно, что ниже изоэлектрической точки (при $\text{pH} < 4,0$) молекулы альбумина разворачиваются [9]. Кроме того, с уменьшением pH увеличивается степень протонизации полимера (рис. 4, б, кривая 2). Это способствует увеличению числа взаимодействующих групп белка и поли-

мера. Анализ седиментограмм растворов смеси и компонентов в отдельности при $\text{pH} < 3,8$ показывает, что с уменьшением до $\text{pH} 2,0$ площадь пика свободного белка уменьшается (рис. 5) и увеличивается количество белка, связанного с полимером. Следовательно, несмотря на одновременное увеличение общего положительного заряда альбумина и П4ВП в области $\text{pH} 2,0-4,0$, количество белка, связанного с полимером, увеличивается. В присутствии низкомолекулярного электролита ($0,1 M \text{ NaCl}$) в области

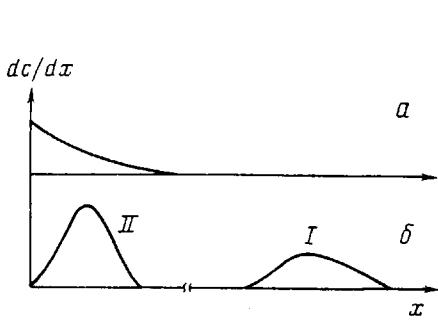


Рис. 2

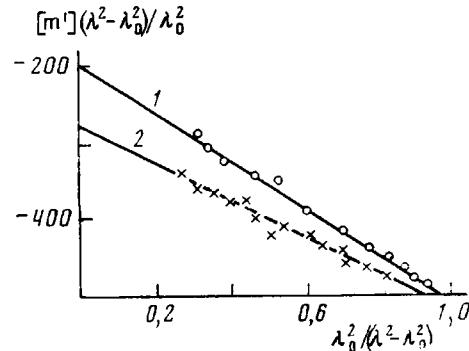


Рис. 3

Рис. 2. Седиментограммы для растворов П4ВП (a) и смеси белок – полимер (b) (растворитель $0,5\% \text{ CH}_3\text{COOH}$, $1:1$, pH 3,8)

Рис. 3. Дисперсия оптического вращения растворов сывороточного альбумина (1) и их смеси с полимером (2) ($1:1$, pH 3,8), обработанные в соответствии с уравнением Мофита [8]

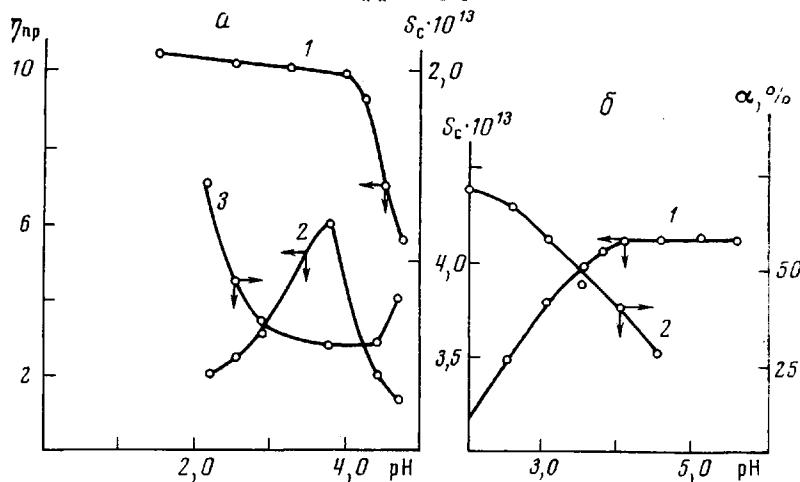


Рис. 4. Зависимости $\eta_{\text{пр}}$ и S_c (a) и степени протонизации α (б) от pH среды

a: 1 — П4ВП, 2, 3 — смесь белок – полимер ($1:1$); б: 1 — раствор белка [9], 2 — П4ВП

pH 2,0–4,5 образования полиэлектролитного комплекса не наблюдается (рис. 1, б, рис. 6). При исследовании зависимости приведенной вязкости от концентрации для смеси белок – полимер обнаружен полиэлектролитный эффект (рис. 1, а, кривая 2). Система белок – полимер представляет собой раствор полиэлектролитного комплекса, образованный макропирами сывороточного альбумина и П4ВП. Устойчивость комплексов в растворе, надо полагать, связана с одноименностью заряда комплекса.

Наличие в системе белок – полимер свободного П4ВП (по данным гельхроматографии на сепадексе G-200 (рис. 7), пик I соответствует комп-

лексу ($v_e = 25 \text{ мл}$), а пик II — свободному П4ВП ($v_e = 31 \text{ мл}$), белок при $\lambda = 254 \text{ нм}$ не определяется) и белка (данные седиментационного анализа, рис. 2) указывает на существование равновесия между комплексом и исходными компонентами. Хроматографический анализ системы белок — полимер при различных молекулярных массах полимера ($\lambda = 254 \text{ нм}$, сефадекс G-200) показывает, что масса полимера, связанная в комплекс с белком, одинаково независима от его молекулярной массы. Этот факт

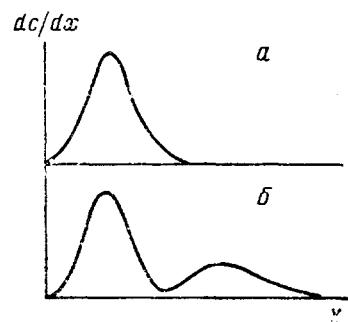
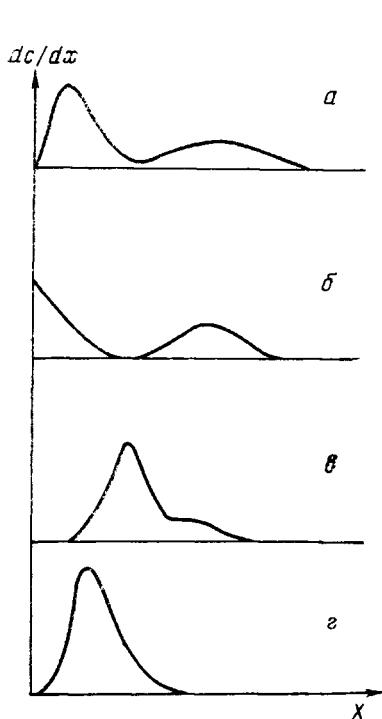


Рис. 6

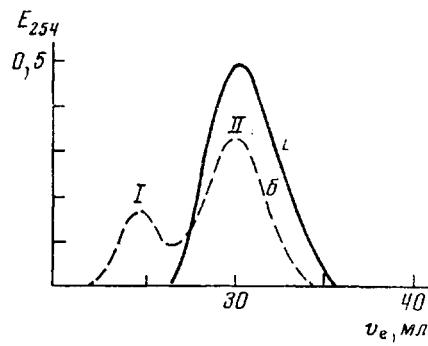


Рис. 5

Рис. 7

Рис. 5. Седиментограммы для смеси белок – полимер (1 : 1) при pH 4,4 (a), 3,8 (б), 2,9 (в), 2,2 (г); время центрифугирования 50 (a – в) и 40 мин. (г).

Рис. 6. Седиментограммы для растворов П4ВП (a) и смеси белок – полимер (1 : 1) (б) (0,5% $\text{CH}_3\text{COOH} + 0,1 \text{ н. NaCl}$, pH 3,8)

Рис. 7. Выходные кривые исходного П4ВП (a) и в смеси с белком (б) в уксусно-кислых средах (pH 3,8, 1 : 3; 1,57 мл/час; П4ВП $M = 14 \cdot 10^4$, G-200, колонка 1×100 см). По оси абсцисс — объем элюции v_e .

подтверждается результатами изучения взаимодействия белка со смесью двух узких фракций П4ВП $M = 14 \cdot 10^4$ и $4 \cdot 10^4$, взятых в весовом отношении 1 : 1.

Как показывают седиментационные данные, при увеличении исходных концентраций компонентов (весовое соотношение 1 : 1) время выхода пика, соответствующего комплексу, увеличивается, и пик становится более асимметричным и широким. Увеличение времени выхода пика на 60 мин., а также изменение его формы при незначительном изменении концентрации (в 1,5 раза) показывают, что указанные изменения связаны как с концентрационной зависимостью коэффициента седиментации, так и обусловлены, по-видимому, композиционной неоднородностью комплекса.

Из данных по седиментации и гель-хроматографии видно, что на 15–20% полимера (от исходной массы) приходится 35–40% белка. Поскольку комплекс является композиционно неоднородным, то определенное таким образом соотношение белок – полимер соответствует, собственно,

не стехиометрическому коэффициенту, а указывает только на весовое соотношение компонентов в комплексе.

Авторы выражают глубокую благодарность В. А. Кабанову и А. Б. Зезину за интерес к работе и ценные замечания.

Институт биофизики
МЗ СССР

Поступила в редакцию
22 VII 1974

ЛИТЕРАТУРА

1. R. Porter, M. C. Porter, I. N. Shnberge, *Biochemistry*, 6, 1854, 1967.
2. S. Huguchi, M. Tsuboi, *Biopolymers*, 4, 837, 1966.
3. S. A. Latt, H. A. Sober, *Biochemistry*, 6, 3293, 1967.
4. А. Б. Зезин, В. Б. Рогачева, Сб. Успехи химии и физики полимеров, «Химия», 1973, стр. 3.
5. A. G. Boyes, U. P. Strauss, *J. Polymer Sci.*, 22, 463, 1950.
6. E. B. Fitzgerald, R. M. Fuoss, *Industr. and Engng Chem.*, 42, 1603, 1950.
7. H. K. Schachman, *Ultracentrifugation, Diffusion and Viscosimetry in Methode of Enzymology*, v. 4, Acad. Press, New York, 1957.
8. А. Б. Зезин, Новое в методах исследования полимеров, «Мир», 1968.
9. W. F. Harrington, P. Johnson, R. H. Ottewill, *J. Biochem.* 62, 569, 1956.