

где $x_{3,4}$ и $x_{4,4}$ — вероятность того, что произвольно выбранная молекула ОИГ окажется связанный с тремя и четырьмя «бесконечными» цепями. Наблюдается хорошее соответствие опытных результатов с расчетными данными при найденных значениях конверсии при $r \approx 1$ и всех значениях ρ . При неэквивалентных соотношениях опытные результаты тем сильнее отличаются от расчетных, чем больше отклонение от эквивалентности. Причем, опытные значения плотности узлов химической спивки даже превышают максимальные возможные в данных системах значения (при полностью завершенной реакции).

Такие расхождения невозможно объяснить увеличением плотности узлов спивки за счет зацеплений междуузловых сегментов, вероятность которых увеличивается с увеличением длины сегмента, так как при введении удлинителя больших расхождений не наблюдается. По-видимому, увеличение опытных значений плотности узлов спивки при неэквивалентных соотношениях реагентов обусловлено зацеплением между узлами массивных конечных фрагментов.

Институт химии
высокомолекулярных соединений АН УССР

Поступила в редакцию
17 VII 1979

ЛИТЕРАТУРА

1. Д. П. Кочетов, Высокомолек. соед., A22, № 7, 1980.
2. Д. П. Кочетов, Ф. Р. Гриценко, В. К. Грищенко, Ю. Л. Спирин, Высокомолек. соед., A21, 2171, 1979.
3. E. R. Cluff, E. K. Gladding, J. Polymer Sci., 45, 341, 1960.
4. Н. М. Эмануэль, Д. Г. Кнорре, Курс химической кинетики, «Высшая школа», 1974.
5. P. J. Flory, J. Amer. Chem. Soc., 63, 3083, 1941.
6. Н. С. Ениколов, Препринты, Доклады I Всесоюзной конференции по химии и физикохимии полимеризационноспособных олигомеров, Черноголовка, ИХФ АН СССР, 1977, стр. 87.
7. Д. П. Кочетов, Ф. Р. Гриценко, В. К. Грищенко, Ю. Л. Спирин, Высокомолек. соед., A22, 29, 1980.

УДК 541(64+183.12)

КОНДУКТОМЕТРИЧЕСКОЕ ИЗУЧЕНИЕ КОМПЛЕКСООБРАЗОВАНИЯ ПАНКРЕАТИЧЕСКОЙ РИБОНУКЛЕАЗЫ С НАТРИЕВОЙ СОЛЬЮ ДЕКСТРАНСУЛЬФАТА В ВОДНОМ РАСТВОРЕ

**Фролов В. И., Пономарева Р. Б., Меленевский А. Т.,
Самсонов Г. В.**

Взаимодействие белков с полимерными электролитами имеет главным образом электростатическую природу. Исследование деталей механизма комплексообразования белковая глобула — полион предстает значительный интерес как с точки зрения физической химии биополимеров, так и с точки зрения практических приложений, поскольку в результате такого взаимодействия можно изменять катализитические и биологические свойства ферментов в полимерном комплексе [1, 2].

Кабанов с сотр. [3] методом скоростной седиментации исследовал стехиометрию комплексов бычьего сывороточного альбумина с кватернизованным поли-4-винилпиридином в зависимости от соотношения компонентов. Кондуктометрическое изучение комплексообразования между полианионами и поликатионами выполнено Михаэлисом с сотр. [4].

В данной работе исследовали кондуктометрическим методом взаимодействие основного белка рибонуклеазы (I) с полианионом — натриевой солью дектрансульфата (ДС) в водном растворе. Указанная система по ряду причин представляет удобную модель. I хорошо растворима в воде даже при очень низкой ионной силе и сохраняет в этих условиях конформационную стабильность. К тому же ее первичная и пространственная структуры известны [5].

В работе использованы образцы бычьей панкреатической I производства объединения Ленмясопром, полученные высаливанием сульфатом аммония и дополнительное очищенные гель-хроматографией на колонке с сефадексом G-75 и обессоленные на колонке с сефадексом G-10. Дектрансульфат фирмы «Serva» со степенью полимеризации $z=1700$ и степенью сульфатирования $\gamma=1,3$ использовали без дополнительной очистки.

Исследуемые растворы получали смешиванием растворов ДС и I в деионизованной воде (с удельной электропроводностью $\sigma=10^{-6} \text{ ом}^{-1} \text{ см}^{-1}$), концентрации и объемы которых выбирали с таким расчетом, чтобы получить желаемую величину концентрации белка и полимера после смешения. Электропроводность растворов G ДС и (ДС+I) измеряли при $25\pm0,1^\circ$ в термостатируемой ячейке из платины с изолятором из тefлона с объемом заполнения 2,7 мл [6]. Ее кондуктометрическая постоянная A (коэффициент пропорциональности между σ и G), определенная путем заполнения ячейки стандартным раствором KCl, равна $0,0402 \text{ см}^{-1}$. Специальных мер для устранения CO_2 из растворов не принимали. Измерения проводили на стандартной аппаратуре (мост E10-2) при частоте $f=0,4 \text{ Мгц}$. Чтобы не снижать чувствительность метода, в работе исследованы бессолевые растворы, содержащие менее 10^{-5} моль/л избыточной низкомолекулярной соли.

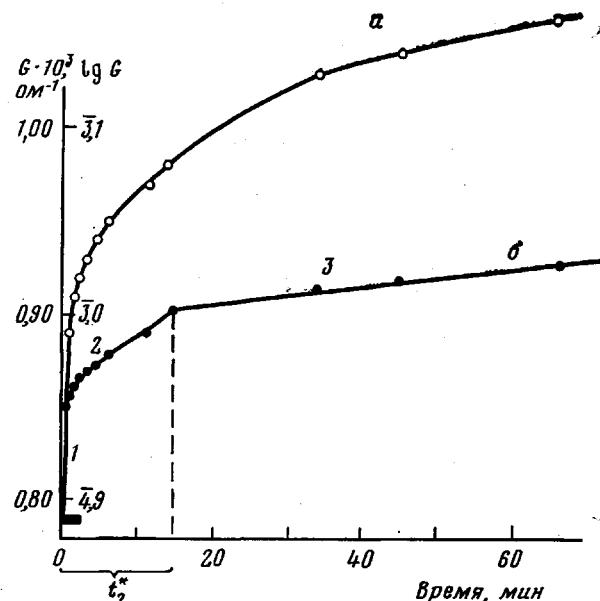
На рисунке приведены зависимости G (кривая *a*) и $\lg G$ (кривая *b*) от времени для раствора, содержащего ДС в концентрации $0,2 \text{ г/л}$ и I в концентрации $0,132 \text{ г/л}$. Указанные концентрации соответствуют $9 \cdot 10^{-4} \text{ г-экв } \text{SO}_4^{2-}/\text{л}$ и $0,96 \cdot 10^{-5} \text{ моль I/л}$. Отсчет времени вели от момента смешения растворов ДС и I ($t=0$). Жирной горизонтальной чертой на оси ординат отмечен уровень электропроводности, которую имел бы раствор, содержащий белок и полианион в указанных концентрациях в отсутствие взаимодействия между ними. Это значение представляет результат аддитивного сложения соответствующих величин G , полученных в отдельных опытах для растворов ДС ($G_{\text{DC}}^{0,22/\text{л}}=0,625 \cdot 10^{-3} \text{ ом}^{-1}$) и раствора I ($G_{0,132/\text{л}}^{\text{I}}=0,174 \cdot 10^{-3} \text{ ом}^{-1}$). Кривая *a* показывает, что в смешанном растворе имеет место быстрое начальное возрастание G во времени, а затем скорость этого возрастания понижается. Построение указанной зависимости в полулогарифмических координатах (кривая *b*) позволяет выявить некоторые характерные особенности исследуемой кинетики, а именно, на этой зависимости четко видны два линейных участка с константами скорости $k_2=0,007 \text{ мин}^{-1}$ при $t < 15 \text{ мин}$, $k_3=0,001 \text{ мин}^{-1}$ при $t > 15 \text{ мин}$, а также начальное чрезвычайно быстрое, практически скачкообразное в масштабе эксперимента, возрастание G . Грубая оценка константы скорости начального участка k_1 (считая этот участок кинетической кривой также линейным) дает нижний предел для величины $k_1=0,2 \text{ мин}^{-1}$. Таким образом, в нашем случае разбавленного раствора при низкой ионной силе окружающего электролита, в условиях, когда отношение мольных концентраций белка и ионогенных групп полианионита много меньше единицы, изменение электропроводности со временем может быть описано выражениями

$$G(t) = \begin{cases} 0,79 \cdot 10^{-3} \exp 0,2t & 0 < t \leq 1 \text{ мин} \\ 0,91 \cdot 10^{-3} \exp 0,007t & 1 \text{ мин} < t < 15 \text{ мин} \\ 1,01 \cdot 10^{-3} \exp 0,001t & t > 15 \text{ мин} \end{cases}$$

Из рисунка видно, что переход от участка 1 к участку 2 и от участка 2 к участку 3 происходит весьма резко. Характерные времена t_1^* и t_2^* в приложенном случае составляют, соответственно, < 1 и $\sim 15 \text{ мин}$. Абсолютные значения изменений электропроводности в интервале времени $0 < t < 1 \text{ мин}$

(ΔG_{01}) и $1 \text{ мин} < t < 15 \text{ мин}$ (ΔG_{02}) сравнимы по величине и равны $\Delta G_{01} = -0,12 \cdot 10^{-3} \text{ ом}^{-1}$, $\Delta G_{02} = 0,10 \cdot 10^{-3} \text{ ом}^{-1}$. Изменение электропроводности на участке 3 за 50 мин $\Delta G_{03} = 0,05 \cdot 10^{-3} \text{ ом}^{-1}$. Заметим, что при повышении общей концентрации и увеличении соотношения I:ДС зависимость $\lg G(t)$ становится более плавной, т. е. резкие переходы между участками 1 и 2, а также 2 и 3 исчезают, а сами участки перестают быть линейными.

В условиях эксперимента pH 6,2 молекула I имеет суммарный положительный заряд (+6), обусловленный, с одной стороны, ионизацией аминной группы лизинов, гуанидиновой группы аргининов, имидазольной



Зависимость электропроводности G (а) и $\lg G$ (б) от времени для водного раствора I+ДС

Концентрация I — 0,132, ДС — 0,2 г/л. Жирной горизонтальной чертой отмечено значение суммы электропроводностей растворов I и ДС при указанных концентрациях

группы гистидина и N-концевой аминной группы, а с другой стороны, ионизацией карбоксильной группы остатков глутаминовой и аспарагиновой кислот [5, 7]. Полионы ДС несут большой отрицательный заряд. Поскольку опыты проводили без добавления низкомолекулярной соли в условиях низкой ионной силы окружающего электролита, макроионы в значительной степени развернуты, так что их конформация на участках, сравнимых с радиусом экранирования Дебая — Хюккеля, не сильно отличается от палочкообразной вследствие электростатического отталкивания фиксированных на остове групп $-\text{SO}_3^-$.

Кинетика комплексообразования. Наблюдаемая кинетика возрастания G растворов ДС после добавления к ним I отражает кинетику образования комплекса между белком и полианионом, а также сопровождающее этот процесс изменение конформации макроиона и изменение структуры его ионной атмосферы. Она может быть интерпретирована следующим образом. Участок 1 кинетической кривой отражает быстро протекающее ($k_1 > 0,2 \text{ мин}^{-1}$) и быстро заканчивающееся взаимодействие ($t_1^* < 1 \text{ мин}$) компактных белковых глобул с вытянутым палочкообразным макроионом ДС с образованием солевых связей типа $-\text{NH}_3^+ \dots -\text{SO}_3^-$, в результате чего в окружающий раствор вытесняются противоионы указанных ионогенных групп. Последнее и обуславливает быстрое начальное возрастание $\lg G$ раствора.

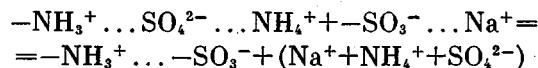
На участке 2, характеризуемом константой скорости $k_2=0,007 \text{ мин}^{-1}$, происходит дальнейшее более медленное возрастание $\lg G$ раствора. Эффективная экранировка групп $-\text{SO}_3^-$ декстрансульфата в результате взаимодействия с катионными группами I на начальном этапе уменьшает их взаимное электростатическое отталкивание, что приводит к сворачиванию полиамиона и делает возможным образование новых солевых связей между белком и полиамионом. Этот процесс в условиях опыта заканчивается приблизительно через $t_2^*=15 \text{ мин}$, после чего дальнейшее образование новых связей существенно замедляется. Последующий более медленный рост $\lg G$ (участок 3, характеризующийся константой $k_3=0,001 \text{ мин}^{-1}$) связан, по-видимому, с выходом в окружающий электролит противоионов в результате дальнейшего изменения структуры комплекса и его ионной атмосферы в соответствии со стремлением свободной энергии системы к минимуму, обеспечиваемому максимальным насыщением солевых связей $-\text{SO}_3^- \dots -\text{NH}_3^+$ и наиболее равномерным распределением белковых молекул вдоль цепи полиамиона. На этом участке изменения $\lg G$ не исключено и влияние других факторов.

Стехиометрия комплексообразования. Измеренная при $j=0,4 \text{ M}_{24}$ электропроводность G исследованного раствора содержит вклады от следующих процессов ионного транспорта в системе: 1) движение во внешнем электрическом поле макроионов, подвижность которых не очень мала, а остаточный заряд велик; 2) движение свободных, неассоциированных противоионов, т. е. находящихся в периферической части ионной атмосферы макроиона; 3) вклад, связанный с присутствием некоторого незначительного количества ионов избыточной низкомолекулярной соли; 4) релаксационный вклад, обусловленный, главным образом, коллективной тепловой подвижностью ассоциированных с полиионом противоионов. Заметим, что суммарный вклад в G от эффектов 3 и 4 в нашем случае не превышает 5–10%, а вклады 1 и 2 в общем случае могут быть сравнимы по величине. Из рисунка видно, что на каждой из трех стадий наблюдаемой кинетики имеет место вытеснение в раствор сравнимого полного числа противоионов.

Исходя из полученных величин измеренной электропроводности на различных стадиях кинетики комплексообразования I – ДС ($\Delta G_{01}=0,12 \cdot 10^{-3} \text{ ом}^{-1}$, $\Delta G_{02}=0,10 \cdot 10^{-3} \text{ ом}^{-1}$, $\Delta G_{03}=0,05 \cdot 10^{-3} \text{ ом}^{-1}$), можно оценить число солевых связей в расчете на одну молекулу белка, образующихся на каждой стадии. Эту оценку мы выполнили при следующих предположениях.

1. На всех стадиях G раствора возрастает исключительно в результате вытеснения в окружающий электролит противоионов белка и полиамиона при взаимодействии катионных групп I и $-\text{SO}_3^-$ групп ДС.

2. Образование солевых связей между ДС и белком, полученным осаждением сульфатом аммония и имеющим противоионы SO_4^{2-} и кationы NH_4^+ , описывается следующей реакцией:



Иными словами предполагается, что в результате элементарного акта в окружающий раствор вытесняются три иона: Na^+ , NH_4^+ и SO_4^{2-} . Природа выходящих в раствор ионов была установлена качественными реакциями с использованием BaCl_2 и реагента Несслера. Заметим, что перевод I при помощи ионообменной колонки в Cl-форму приводит к существенному снижению эффекта возрастания электропроводности со временем. Это является следствием того, что замена противоионов уменьшает полное число выходящих в раствор ионов, кроме того эквивалентная проводимость Cl^- существенно ниже, чем SO_4^{2-} .

3. Подвижность вытесненных ионов в растворе, содержащем белок и полиамион, мало отличается от подвижности при бесконечном разбавлении в растворе соответствующего низкомолекулярного электролита. Таким

образом, мы пренебрегаем взаимодействием вышедших ионов друг с другом и с макроионами, изменением вклада макроиона в полную электропроводность при комплексообразовании, а также изменением релаксационного вклада при частоте измерений $f=0,4$ Мгц, связанного с поляризацией атмосферы ассоциированных противоионов ДС.

Из формулы для эквивалентной электропроводности $\Lambda=10^3 \text{ с}^{-1}$, в которой удельная электропроводность σ связана с измеряемой проводимостью раствора G соотношением $\sigma=AG$, а концентрация c электролита выражена в моль/л, получаем $c=10^3 AG/\Lambda$. Для концентрации образовавшихся солевых связей между I и ДС на каждой стадии комплексообразования имеем

$$\Delta c_i = 10^3 A \Delta G_i / \Lambda, \quad \text{где } i=1, 2, 3.$$

После подстановки в указанные выражения значения постоянной ячейки $A=0,0402 \text{ см}^{-1}$, величины $\Lambda = \lambda_{\text{Na}^+}^0 + \lambda_{\text{NH}_3^+}^0 + \lambda_{\text{SO}_4^{2-}}^0 = (50,1 + 73,5 + 80,0) \text{ ом}^{-1} \text{ см}^2 \text{ экв}^{-1} = 203,6 \text{ см}^2 \text{ ом}^{-1} \text{ экв}^{-1}$ [8] и экспериментальных величин ΔG_i получаем

$$\Delta c_1 = 2,4 \cdot 10^{-5} M, \quad \Delta c_2 = 2,0 \cdot 10^{-5} M, \quad \Delta c_3 = 1,0 \cdot 10^{-5} M.$$

Число солевых связей, которые образует с ДС каждая молекула I на стадиях 1, 2 и 3, получается делением Δc_i на мольную концентрацию I ($c_1=0,963 \cdot 10^{-5}$ моль/л) в растворе ($n_i=\Delta c_i/c_1$) и соответственно равно 2,5; 2,1 и 1,0.

Таким образом, в условиях эксперимента (pН 6,2, низкая ионная сила раствора и малая концентрация белка и полиэлектролита при соотношении I ($-\text{SO}_3^-$ группы): ДС $\ll 1$) к моменту завершения быстрых стадий реакции комплексообразования ($t_2^* \approx 15$ мин) приблизительно пять катионных групп молекулы I из общего количества 16 провзаимодействовали с группами $-\text{SO}_3^-$ декстрансульфата.

Заметим, что выполненная на основании кондуктометрических данных оценка числа межмолекулярных солевых связей может дать заниженные значения при наличии на поверхности глобулы I солевых связей типа $-\text{COO}^- \dots -\text{NH}_3^+$ (в этом случае стехиометрия реакции будет отличаться от предполагаемой). Число таких связей, однако, не должно быть велико, в частности, ввиду особенностей метода выделения белка.

Институт высокомолекулярных
соединений АН СССР

Поступила в редакцию
17 VII 1979

ЛИТЕРАТУРА

1. Р. Б. Пономарева, А. П. Кавуненко, Т. П. Калачева, Н. С. Сидорова, Г. В. Самсонов, *Биохимия*, 40, 469, 1975.
2. Г. В. Самсонов, Н. В. Глазова, О. А. Писарев, В. И. Гомолицкий, Р. Б. Пономарева, *Докл. АН СССР*, 228, 985, 1976.
3. В. А. Кабанов, В. П. Евдаков, М. И. Мустафаев, А. Д. Антипина, *Молек. биол.*, 11, 582, 1977.
4. A. Michaels, L. Mir, N. Schneider, *J. Phys. Chem.*, 69, 1447, 1965.
5. T. M. Richards, H. W. Wyckoff, In *The Enzymes*, ed by P. D. Boyer, H. Jardy, K. Myrbäck, v. IV, 3-rd ed, New York — London, 1971, p. 746.
6. В. И. Фролов, А. Д. Морозова, *Высокомолек. соед.*, B19, 425, 1977.
7. C. Tanford, J. D. Hauenstein, D. G. Rands, *J. Amer. Chem. Soc.*, 77, 6409, 1955.
8. Р. А. Робинсон, Р. Г. Стокс, *Растворы электролитов*, Изд-во иностр. лит., 1963.