

ВЫСОКОМОЛЕКУЛЯРНЫЕ

Том (A) XXIII

СОЕДИНЕНИЯ

1981

№ 2

УДК 541(64+572)

ВЛИЯНИЕ ИОННОЙ СИЛЫ И РН-СРЕДЫ НА ПОВЕДЕНИЕ КОМПЛЕКСОВ БЫЧЬЕГО СЫВОРОТОЧНОГО АЛЬБУМИНА С ПОЛИ-4-ВИНИЛ-N-ЭТИЛПИРИДИННИЙБРОМИДОМ В ВОДНЫХ РАСТВОРАХ

Кабанов В. А., Мустафаев М. И.

Исследовано влияние ионной силы и pH-среды на поведение комплексов бычего сывороточного альбумина с поли-4-винил-N-этилпиридинийбронидом. В зависимости от ионной силы и pH-среды в системе обнаружено перераспределение молекул белка между поликатионами, в результате чего некоторые поликатионы полностью освобождаются, а другие дополнительно нагружаются глобулами белка. Определены нижние и верхние пределы стабильности комплекса по ионной силе. Чрезмерное обессоливание системы также приводит к электростатической дестабилизации частиц кооперативного поликомплекса: вместо них в системе образуются достаточно рыхлые неупорядоченные агрегаты — продукты случайного взаимодействия белка и полизлектролита. Доказано, что комплексообразование между белком и полизлектролитом носит равновесный характер.

В работах [1, 2] изучены водорастворимые поликомплексы бычего сывороточного альбумина (БСА) с полизлектролитом — поли-4-винил-N-этилпиридинийбронидом (ПВЭПБ). Упомянутые исследования в основном проводились в условиях (pH, ионная сила), соответствовавших оптимуму стабильности продуктов взаимодействия поликатионов с белком. Вместе с тем для доказательства механизма комплексообразования, установления природы связи белок — поликатион, а также для целенаправленного синтеза поликатионов, способных достаточноочно прочно связывать белки в заданных условиях (например, в среде живого организма), существенно исследовать особенности взаимодействия белок — поликатион в достаточно широком интервале pH-среды и ионной силы растворов, что и явилось целью настоящей работы. Роль перечисленных факторов при адсорбции белков полизлектролитами и полизлектролитными гелями отчетливо продемонстрирована в работе [3].

Синтез ПВЭПБ проводили по методам, описанным ранее [1]. Были использованы ПВЭПБ-1 ($\bar{P}_v=1 \cdot 10^3$) и ПВЭПБ-2 ($\bar{P}_v=3,3 \cdot 10^3$). Молекулярную массу БСА (фирма «Sigma», США) во всех расчетах принимали равной 70 000 [4].

Число макромолекул n белка и ПВЭПБ в единице объема раствора рассчитывали по известной формуле [1].

Вязкости растворов определяли в вискозиметре Уббелоде при $25 \pm 0,05^\circ$. Время истечения растворителя $120 \pm 0,1$ с.

Сedimentационные измерения проводили на аналитической ультрацентрифуге «Spinco E» при $25 \pm 0,1^\circ$. Градиент показателя преломления регистрировали с помощью оптической схемы Фильпота — Свенсона с фазовой пластинкой. Скорость вращения ротора $56\,000\text{ об./мин.}$ Численный расчет коэффициентов седиментации S_c и площадей пиков на седиментограммах проводили по методике Шахмана [5].

Диализ растворов БСА — ПВЭПБ проводили против чистой воды, оттитрованной до pH 7, или против раствора NaCl, имеющего концентрацию 0,15, 0,1, 0,05 моль/л в холодной комнате (4°). Пробы отбирали через различные промежутки времени t_d после начала диализа против чистой воды.

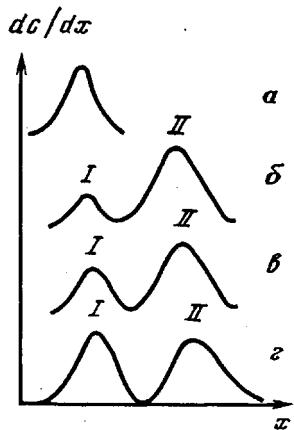


Рис. 1

Рис. 1. Седиментограммы для ПВЭПБ-2 (а) и его смесей БСА (б-е) при рН 7 (б), 5 (с) и 4,2 (д); $n_{\text{БСА}}/n_{\text{ПВЭПБ}}=7$; спвэпб-2=0,45·10⁻⁵ моль/л; время центрифугирования 60 мин; dc/dx – градиент концентрации, x – расстояние от центра вращения ротора в произвольных единицах

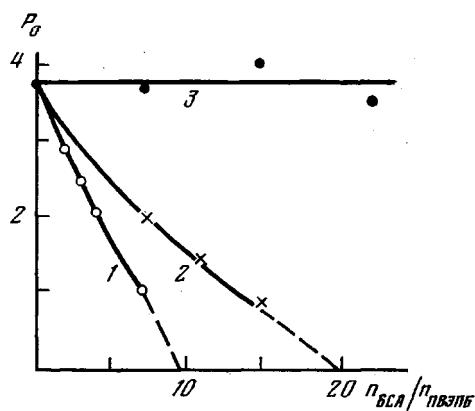


Рис. 2

Рис. 2. Зависимость площадей пиков свободного ПВЭПБ-2 от соотношения $n_{\text{БСА}}/n_{\text{ПВЭПБ}}$ при рН 7 (1), 5 (2) и 4,2 (3); спвэпб-2=0,45·10⁻⁵ моль/л; 25°

Содержание хлористого натрия в системе БСА – ПВЭПБ определяли методом аргентометрического титрования растворов на потенциометре рН – 340, как описано в работе [6]. В качестве индикаторного электрода использовали серебряный электрод, а в качестве электрода сравнения – каломелевый. Точку эквивалентности определяли по точке перегиба зависимости потенциала от количества добавленного раствора AgNO_3 . Данная методика позволяет определить содержание NaCl с точностью ±3%.

Комплексы БСА – ПВЭПБ были обнаружены и исследованы при рН 7 [1]. В этой области рН глобулы БСА (рН 4,9) заряжены отрицательно. Эти условия благоприятствуют образованию солевых связей между положительно заряженными группами на цепи ПВЭПБ и отрицательно заряженными группами белка.

Ситуация меняется при подкислении системы. Из седиментограмм рис. 1, полученных при $n_{\text{БСА}}/n_{\text{ПВЭПБ}} < N_i$, следует, что изменение рН сопровождается изменением соотношения площадей пиков I и II, но во всем исследованном интервале рН распределение частиц по коэффициентам седиментации остается бимодальным. Пик I соответствует свободному ПВЭПБ. На рис. 2 представлены зависимости площади пика P_0 свободного ПВЭПБ от соотношения $n_{\text{БСА}}/n_{\text{ПВЭПБ}}$ при различных рН. Видно, что при рН 7,0 P_0 линейно уменьшается по мере титрования ПВЭПБ белком: свободный ПВЭПБ расходуется на связывание белковых глобул. Экстраполяция на нулевое значение P_0 дает характеристический состав поликомплекса $N_i \approx 10$. При рН 5,0 также наблюдается образование комплекса БСА – ПВЭПБ, однако темп изменения P_0 с ростом $n_{\text{БСА}}/n_{\text{ПВЭПБ}}$ существенно замедляется. Соответственно характеристический состав N_i возрастает приблизительно вдвое. Иными словами, уменьшение рН от 7 до 5 приводит к возрастанию «емкости» поликатиона по молекулам белка при неизменной контурной длине поликатиона. В рамках схематической стержневидной модели строения комплекса, предложенной в работе [1] и подтвержденной в работе [2], это означает уменьшение числа межмакромолекулярных контактов в комплексе в расчете на одну глобулу БСА и, следовательно, укорочение характеристического отрезка ПВЭПБ, на котором связывается одна белковая глобула.

Поскольку при рН 5 в интервале $0 < n_{\text{БСА}}/n_{\text{ПВЭПБ}} < N_i$, как и при рН 7, свободные поликатионы существуют с частицами комплекса, то основываясь на соображениях, высказанных в работе [1], надо полагать, что частицы комплекса сохраняют стержневидную форму. Тогда увеличение N_i

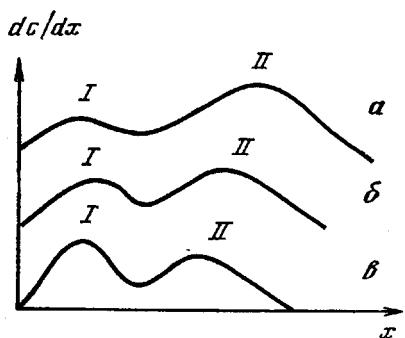


Рис. 3

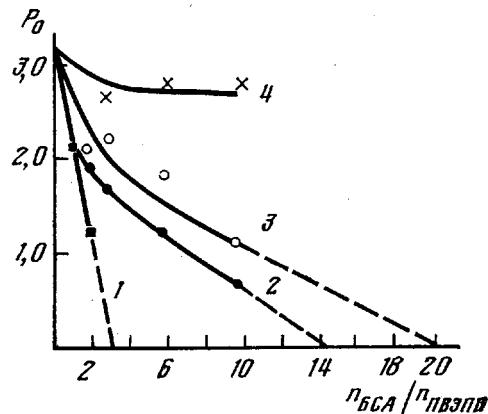


Рис. 4

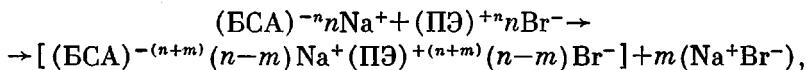
Рис. 3. Седиментограммы для систем БСА – ПВЭПБ-1, содержащих различные количества добавленной NaCl: а – 0; б – 0,1; в – 0,2 моль/л; $n_{\text{БСА}}/n_{\text{ПВЭПБ-1}} = 2,5$; время центрифугирования 55 мин; спвэпб-1 = $1,5 \cdot 10^{-5}$ моль/л; 25°; pH 7

Рис. 4. Зависимость площадей пиков свободного ПВЭПБ-1 от соотношения $n_{\text{БСА}}/n_{\text{ПВЭПБ}}$ при $\text{NaCl}=0$ (1); 0,1 (2); 0,15 (3); 0,2 моль/л (4); спвэпб-1 = $1,5 \cdot 10^{-5}$ моль/л; 25°; pH 7

должно соответствовать увеличению длины стержня. Данные вискозиметрических измерений согласуются с этим предположением: приведенные вязкости комплексов БСА – ПВЭПБ-2 в точках N_i равны 1,58 дл/г (рН 7) и 2,0 дл/г (рН 5).

Титрование ПВЭПБ-2 раствором БСА при рН 4,2 вообще не приводит к уменьшению пика свободного ПВЭПБ на седиментограммах (рис. 1, диаграмма g и рис. 2, кривая 3). В этих условиях комплекс не образуется. Число солевых связей, которые могут быть завязаны между поликатионом и положительно зарядившейся белковой глобулой, видимо, недостаточно для кооперативной самосборки частиц комплекса. Надо полагать, что область диссоциации поликомплекса на исходные компоненты лежит где-то в интервале рН между 5 и 4,2.

Несколько сложнее обстоит дело с количественным изучением влияния ионной силы. При смешении растворов БСА и ПВЭПБ, даже не содержащих специально добавленных низкомолекулярных электролитов, образование солевых связей между макромолекулами сопровождается освобождением эквивалентных количеств противоположно заряженных ионов по схеме



т. е. увеличением ионной силы раствора. Этот процесс был, в частности,

Данные аргентометрического анализа NaCl, оставшегося в системе БСА – ПВЭПБ-1 в зависимости от времени диализа

t_d , час	[NaCl] *, моль/л	t_d , час	[NaCl] *, моль/л
0	0,22	4,0	0,048
0,5	0,11	6,0	0,010
1,0	0,074	8,0	0,008
1,5	0,059	12,0	0,0075
2,0	0,041	36,0	0,0058
3,0	0,027		

* Точность измерения $\pm 3\%$.

исследован в работе [2], где показано, что при рН 7 на каждую глобулу БСА, входящую в комплекс с ПВЭПБ, образуется ~ 50 солевых связей. В пересчете на используемые нами концентрации макромолекулярных компонентов последнее соответствует повышению концентрации низкомолекулярного электролита на величину 10^{-3} моль/л. Поэтому, начиная изучение влияния ионной силы на поведение комплексов БСА – ПВЭПБ, мы должны были учитывать, что в исходной системе уже содержится некоторое количество низкомолекулярных солей, и, следовательно, для получения полной информации необходимо двигаться в сторону как повышения, так и понижения. Увеличение ионной силы выше исходной конт-

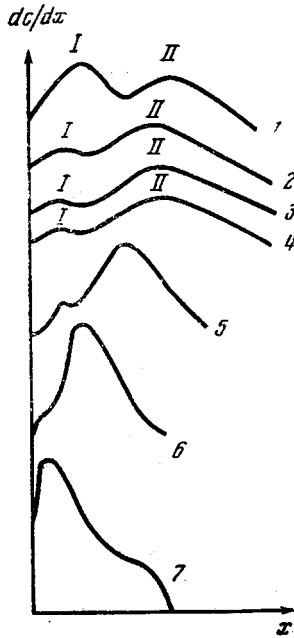


Рис. 5

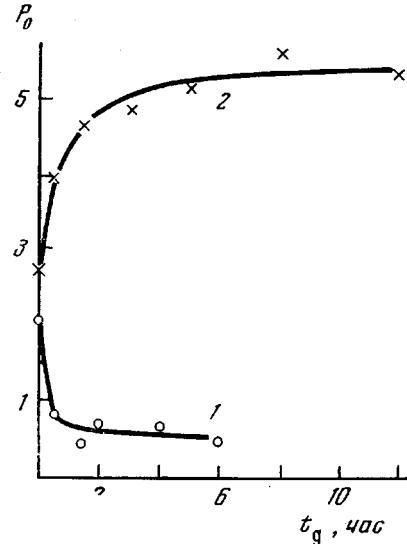


Рис. 6

Рис. 5. Седиментограммы растворов БСА – ПВЭПБ-1, полученные до диализа (1) и через различные промежутки времени после начала диализа против чистой воды: $t_d=30$ (2), 120 (3), 180 (4), 480 (5), 720 (6) и 2160 мин (7); рН 7; $n_{\text{БСА}}/n_{\text{ПВЭПБ-1}}=3$; 25°

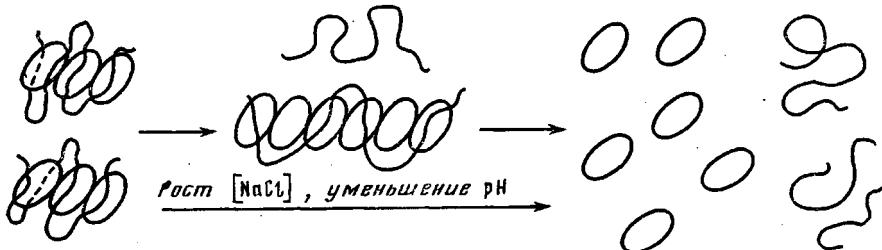
Рис. 6. Зависимость площадей пиков I (1) и II (2) системы БСА – ПВЭПБ-1 на седиментограммах рис. 5 от времени диализа

ролировали добавлением в раствор смеси БСА и ПВЭПБ определенных количеств NaCl.

Из седиментограмм рис. 3, полученных при $n_{\text{БСА}}/n_{\text{ПВЭПБ}} < N_c$ следует, что увеличение ионной силы, как и уменьшение рН, сопровождается ростом пика I свободного ПВЭПБ и уменьшением пика II. Распределение по коэффициентам седиментации в этом интервале концентраций низкомолекулярного электролита остается бимодальным.

На рис. 4 приведены зависимости площади пика свободного ПВЭПБ от соотношения $n_{\text{БСА}}/n_{\text{ПВЭПБ}}$ при различных концентрациях NaCl. Видно, что добавление NaCl, как и уменьшение рН, вначале ведет к увеличению «емкости» ПВЭПБ по белку ($roast N_c$). Затем при $[NaCl] \geq 0,2$ моль/л комплексообразования между БСА и ПВЭПБ уже не происходит. Из полученных данных следует, что превращения, происходящие в системе при увеличении ионной силы и при уменьшении рН, аналогичны. Вначале происходит перераспределение молекул белка между поликатионами, в результате чего некоторые поликатионы полностью освобождаются, а другие дополнительно нагружаются глобулами БСА (увеличение характеристического

состава N_i), а затем при некоторых значениях рН или ионной силы кооперативная стабилизация комплекса оказывается уже невозможна, и он диссоциирует на исходные компоненты



Постепенного уменьшения ионной силы по сравнению с исходной, заданной добавлением определенного количества NaCl к раствору БСА и ПВЭПБ, добивались путем его последующего диализа против чистой воды или раствора NaCl меньшей концентрации. На рис. 5 представлены седиментограммы растворов, полученные через различные промежутки времени

после начала диализа против чистой воды. Седиментограмма 1 получена при концентрации NaCl 0,2 моль/л, т. е. в условиях, когда поликомплекс не существует. Пик I соответствует свободно-

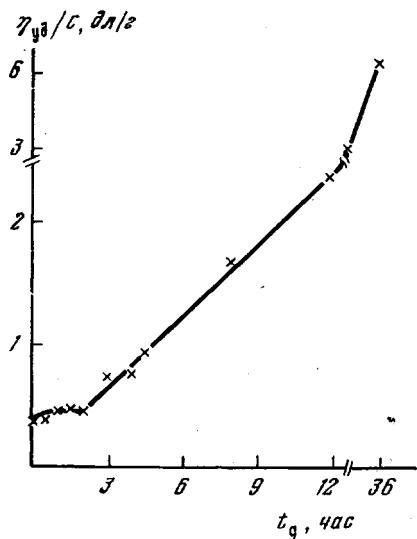


Рис. 7

Рис. 7. Зависимость приведенной вязкости раствора системы БСА – ПВЭПБ-1 от времени диализа; рН 7; 25°

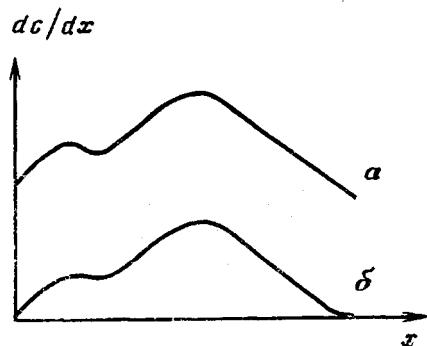


Рис. 8

Рис. 8. Седиментограммы для систем БСА – ПВЭПБ-1:

а — диализ проведен против 0,1 моль/л раствора NaCl; время диализа 24 час; б — в обессоленную систему ($t_d=36$ час) добавлен 0,1 моль/л раствора NaCl; $c_{\text{ПВЭПБ-1}}=1,5 \cdot 10^{-5}$ моль/л; $n_{\text{БСА}}/n_{\text{ПВЭПБ-1}}=3$; рН 7; 25°

му ПВЭПБ, пик II — свободному БСА. По мере диализа вначале наблюдается очень быстрое уменьшение площади пика поликатиона и возрастание пика II (рис. 6). Последнее обусловлено накоплением в системе комплекса БСА – ПВЭПБ, которое становится возможным благодаря выносу избытка соли через диализную мембрану (коэффициенты седиментации БСА и поликомплекса весьма близки). Затем в течение определенного времени t_d площади пиков I и II сохраняются примерно постоянными. Однако при дальнейшем диализе через 3 час и более распределение частиц по коэффициентам седиментации начинает катастрофическим образом меняться (диаграммы 5–7). Уже через 8 час бимодальное распределение вырождается в унимодальное. Одновременно происходит значительное нарастание приведенной вязкости раствора (рис. 7). Следует

полагать, что чрезмерное обессоливание системы также приводит к электростатической дестабилизации частиц кооперативного поликомплекса: вместо них в системе образуются достаточно рыхлые неупорядоченные агрегаты — продукты случайного взаимодействия БСА и ПВЭПБ. Замечательно, что добавление в обессоленную систему NaCl в зависимости от концентрации полностью восстанавливает все промежуточные и исходное состояния (рис. 8). Последнее обстоятельство очень важно, так как оно служит независимым доказательством обратимости, а следовательно, равновесного характера изучаемых нами систем.

Таким образом, равновесные водорастворимые стержнеобразные кооперативные комплексы БСА — ПВЭПБ, описанные в работах [1, 2], имеют нижний и верхний пределы стабильности по ионной силе. При увеличении ионной силы в этих пределах и приближении к верхнему пределу устойчивости может меняться их характеристический состав. При ионных силах выше критической поликомплексы диссоциируют на исходные компоненты. Интервал ионных сил $1,1 \cdot 10^{-1} - 8 \cdot 10^{-3}$ соответствует оптимуму стабильности (таблица). При очень малых ионных силах ($c_{\text{NaCl}} < 8 \cdot 10^{-3}$ моль/л) наступает электростатическая дестабилизация упорядоченной стержнеобразной структуры, и частицы комплекса перестрояются в рыхлые неупорядоченные агрегаты, в которых поликатионы и глобулы белка, по всей вероятности, связаны между собой случайным образом.

Московский государственный
университет им. М. В. Ломоносова

Поступила в редакцию
13 VII 1979

ЛИТЕРАТУРА

1. В. А. Кабанов, В. П. Евдаков, М. И. Мустафаев, А. Д. Антипина, Молек. биол., 11, 582, 1977.
2. V. A. Kadanov, A. B. Zezin, M. I. Mustafaev, V. A. Kasaikin, In: Polymeric amines and ammonium salts, ed. by E. J. Coethals, N. Y., 1980, p. 173.
3. Г. В. Самсонов, Высокомолек. соед., A21, 723, 1979.
4. W. F. Harrington, P. Johnson, R. H. Ottewill, Biochem. J., 62, 569, 1956.
5. В. Н. Цветков, В. Е. Эскин, С. Я. Френкель, Структура макромолекул в растворе, «Наука», 1964.
6. В. А. Климова, Основные микрометоды анализа органических соединений, «Химия», 1975, стр. 111.

INFLUENCE OF THE IONIC STRENGTH AND pH OF THE MEDIUM ON THE BEHAVIOUR OF THE COMPLEXES OF BOVINE SERUM ALBUMINE WITH POLY-4-VINYL-N-ETHYL PYRIDINIUM BROMIDE IN AQUEOUS SOLUTIONS

Kabanov V. A., Mustafayev M. I.

Summary

The influence of ionic strength and pH of the medium on the behaviour of the complexes of bovine serum albumine with poly-4-vinyl-N-ethylpyridinium bromide has been studied. The redistribution of the albumine molecules between polycations depending on the ionic strength and pH of the medium was found. As a result of this process some polycations became free, while other were overloaded by albumine globules. The lower and upper limits of the complex stability regard to the ionic strength were determined. The excessive desalination of the system results in the electrostatic destabilization of particles of cooperative polycomplex with the formation of rather bulky non-ordered aggregates being the products of the statistical interaction of albumine with polyelectrolyte. It was shown that the formation of a complex between albumine and polyelectrolyte is an equilibrium process.