

ВЫСОКОМОЛЕКУЛЯРНЫЕ

Том (A) XXIII

СОЕДИНЕНИЯ

№ 2

1981

УДК 541(64+572):546.56

ВОДОРАСТВОРИМЫЙ ТРОЙНОЙ КОМПЛЕКС ПОЛИ-4-ВИНИЛПИРИДИНА, БЫЧЬЕГО СЫВОРОТОЧНОГО АЛЬБУМИНА И МЕДИ

Мустафаев М. И., Кабанов В. А.

Исследовано взаимодействие между поли-4-винилпиридином и бычьим сывороточным альбумином с участием ионов двухвалентной меди в кислой среде. Показано, что в широком интервале соотношений компонентов они образуют растворимый тройной комплекс. Методами светорассеяния, скоростной седиментации и вискозиметрии установлено, что реальная частица тройного поликомплекса представляет собой ассоциат, включающий в качестве субъединиц шесть-семь поликатионов, с которыми белковые глобулы связаны посредством ионов меди. Показано, что частицы растворимого тройного комплекса весьма компактны.

Известно, что ионы переходных металлов непосредственно участвуют в осуществлении таких важных биохимических процессов, как вытеснение гистонов из ДНК, ассоциация рибосомных компонентов друг с другом или с т-RНК и т. д. [1, 2]. Иными словами, ионы переходных металлов играют важную роль при взаимодействии биополимеров.

В свете сказанного определенный интерес может представить изучение роли ионов переходных металлов в модельных реакциях, например, в реакции белка с линейным неприродным полизэлектролитом.

В данной работе изучено взаимодействие между поли-4-винилпиридиным (ПВП) и бычьим сывороточным альбумином (БСА) с участием ионов двухвалентной меди в кислой среде, т. е. в условиях, когда оба полимерных компонента несут избыточные положительные заряды и не способны связываться друг с другом в отсутствие посредника.

Синтез и фракционирование ПВ проводили как описано в работе [3]. Были использованы узкие фракции ПВП с $P_v=0,95 \cdot 10^3$ (ПВП-1); $2,15 \cdot 10^3$ (ПВП-2); $7,4 \cdot 10^3$ (ПВП-3).

Молекулярную массу БСА («Sigma», США) во всех расчетах принимали равной 70 000 [3].

Число макромолекул n белка и ПВП в единице объема раствора рассчитывали по формуле $n=c \cdot 10^{-2} \cdot N_A / M$, где c — концентрация, г/дл , N_A — число Авогадро, M — молекулярная масса БСА и ПВП.

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

Седиментационные измерения проводили на аналитической ультрацентрифуге «Spinco-E» при $25 \pm 0,1^\circ$. Градиент показателя преломления регистрировали при помощи оптической схемы Фильпота — Свенсона с фазовой пластинкой. Численный расчет коэффициентов седиментации S_e и определение площадей пиков на седиментограммах проводили как описано в работе [4].

Нерастворимые продукты взаимодействия отделяли от маточных растворов центрифугированием смесей на препартивной центрифуге.

Измерения интенсивности светорассеяния проводили на автоматическом нефелометре «Fica-50» фирмы «ARL» (Франция) в неполяризованном свете с длиной волны $\lambda_0=436 \text{ нм}$. Прибор калибровали по бензолу при 25° , считая, что $R_{90^\circ}=-48,5 \cdot 10^{-6}$. При исследовании использовали стандартные цилиндрические кюветы. Растворы для исследования светорассеяния обеспыливали методом многократного

фильтрования через стеклянный фильтр РО-5 (средний диаметр пор $\sim 300 \text{ нм}$) под давлением в измерительную колбу. Обесцвечивание растворов контролировали через специальное окошечко, встроенное в прибор, и по асимметрии рассеяния $\Delta = I_{45}/I_{135}$. Инкремент показателя преломления определяли на дифференциальном рефрактометре DR-4B фирмы «Shimadzu» (Япония) в терmostатированных кюветах.

Средневесовую молекулярную массу \bar{M}_w рассчитывали как в работе [5].

На рис. 1 представлены седиментограммы уксуснокислых растворов смеси ПВП и БСА при различных макромолекулярных соотношениях ПВП и БСА, $n_{\text{БСА}}/n_{\text{ПВП}}$ и pH 4,2. Они характеризуются бимодальным распределением. Коэффициенты седиментации, соответствующие пикам I, близки к независимо измеренным коэффициентам седиментации поли-

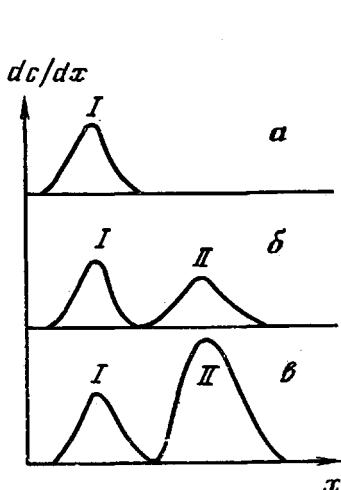


Рис. 1

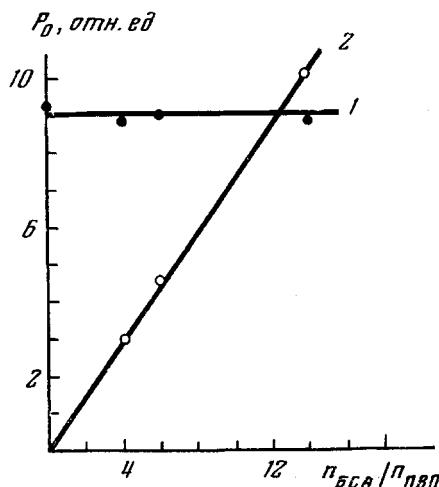


Рис. 2

Рис. 1. Седиментограммы для ПВП-1 (а) и его смесей с БСА при $n_{\text{БСА}}/n_{\text{ПВП}}=4$ (б) и 14 (в). Время центрифугирования 60 мин; $\omega=56\,000$ об/мин; dc/dx — градиент концентрации; x — расстояние от центра вращения ротора в произвольных единицах; pH 4,2; 25°

Рис. 2. Зависимость площадей P_0 пиков I (1) и II (2) на седиментограммах в системе БСА – ПВП-1 от соотношения $n_{\text{БСА}}/n_{\text{ПВП}}$

электролита в отсутствие белка (таблица). Пики II соответствуют свободному БСА. Об этом свидетельствуют данные рис. 2, на котором представлены зависимости площадей пиков I и II от $n_{\text{БСА}}/n_{\text{ПВП}}$ при $n_{\text{ПВП}}=\text{const}$. Как следует из этого рисунка, добавление БСА приводит к линейному возрастанию площадей пиков II, а площади пиков I при этом остаются постоянными. Следовательно, в уксуснокислых водных средах при pH 4,2

Значения коэффициентов седиментации компонентов, соответствующих пикам I (ПВП) и II (БСА), в системе БСА–ПВП

$n_{\text{БСА}}/n_{\text{ПВП}}$	$S_c, \text{с}$		$n_{\text{БСА}}/n_{\text{ПВП}}$	$S_c, \text{с}$	
	пик I	пик II		пик I	пик II
0	0,8	—	10	0,9	4,4
4	0,8	4,5	16	1,0	4,5

отсутствует заметное связывание БСА с ПВП. В этих условиях белок и ПВП заряжены положительно, и электростатическое отталкивание одновременно заряженных глобул и линейных цепей препятствует комплексованию.

Для изучения взаимодействия в тройных системах БСА – ПВП – Cu^{+2} был приготовлен уксусно-кислый раствор ($c_{\text{CH}_3\text{COOH}} = 8,3 \cdot 10^{-2}$ моль/л) ПВП ($c_{\text{ПВП}} = 3/M_{\text{ПВП}}$, моль/л) и водный раствор $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (0,05 моль/л). Далее к 5 мл раствора ПВП (рН 4,4) добавили 5 мл водного раствора БСА (рН 4,4) заданной концентрации. К полученной гомогенной системе прислали раствор Cu^{+2} из расчета один ион Cu^{+2} на четыре звена ПВП, что примерно соответствует максимальной сорбционной емкости ПВП по отношению к ионам меди. При этом значение рН системы несколько уменьшилось (до ~4,0) благодаря замещению протонов ионизированных аминогрупп ионами Cu^{+2} , образующими с ними координационные связи. Затем во избежание возможной кислотной денатурации белка в ходе последующих измерений рН смеси доводили до 4,2 добавлением раствора NaOH.

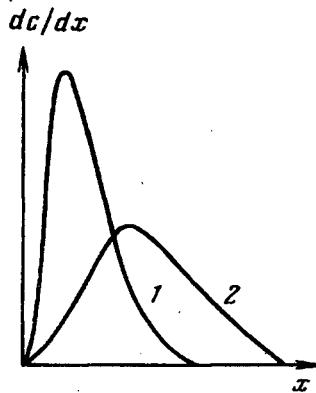


Рис. 3

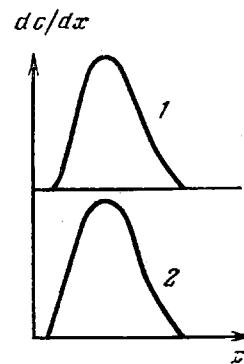


Рис. 4

Рис. 3. Седиментограммы для смесей БСА – Cu^{+2} – ПВП-1 (1) и БСА – Cu^{+2} – ПВП-3 (2) при $n_{\text{БСА}}/n_{\text{ПВП}} = 4$ (1) и 10 (2). Время центрифугирования 12 мин, $\omega = 26\,000$ об/мин

Рис. 4. Седиментограммы для БСА (1) и его смеси с Cu^{+2} (2). Концентрация Cu^{+2} в смеси соответствует концентрации в экспериментах с тройными смесями; время центрифугирования 60 мин, $\omega = 56\,000$ об/мин

В холостых опытах при смешении растворов ПВП и Cu^{+2} в указанных условиях и концентрациях весь ПВП выпадает в осадок в виде медного комплекса, интенсивно окрашенного в синий цвет. Присутствие в системе наряду с ПВП, БСА в зависимости от концентрации последнего частично или полностью предотвращает фазовое разделение.

На седиментограммах маточных растворов систем, подвергшихся частичному фазовому разделению, обнаруживается единственный пик (рис. 3), характеризующийся коэффициентом седиментации 20–30 с в случае ПВП-1 и 50–80 с в случае ПВП-3. Поскольку коэффициент седиментации БСА на порядок ниже, сам белок под влиянием меди в интервале использованных концентраций не агрегирует (рис. 4), а комплекс ПВП – Cu^{+2} в условиях эксперимента нерастворим, можно с уверенностью утверждать, что этот пик принадлежит продукту связывания БСА с поликатионом. Учитывая, что при рН 4,2 в отсутствие меди связывания не происходит, приходим к выводу о том, что ионы Cu^{+2} выполняют в данном случае функцию «скрепок» между одноименно заряженными глобулами белка и цепочками поликатиона. Иными словами, в системе обнаруживается растворимый тройной комплекс БСА – Cu^{+2} – ПВП.

Образование растворимых тройных полимер-металлических комплексов, включающих в себя полиамины (ПВП, полиэтиленимин) и поликарболовую кислоту, в которых ионы Cu^{+2} выполняют такую же функцию, недавно обнаружено и детально изучено в работах [6, 7]. Надо полагать, что мы имеем дело с аналогичным явлением, но в данном случае в ка-

честве одного из макромолекулярных компонентов поликомплекса вместо линейного полииона выступает амфотерная белковая глобула.

Минимальное количество БСА, которое нужно ввести в систему для полного предотвращения фазового разделения при смешении компонентов, составляет $\sim 2,8$ г/г ПВП и примерно одинаково для ПВП-1, ПВП-2 и ПВП-3. На седиментограммах растворов при указанном весовом соотношении наблюдается единственный пик тройного комплекса. Это означает, что по крайней мере в интервале степеней полимеризации поликатиона \bar{P}_n от $1 \cdot 10^3$ до $7,5 \cdot 10^3$ процесс комплексообразования не зависит от \bar{P}_n , т. е. на одну белковую глобуллу, связанную в комплексе, в условиях

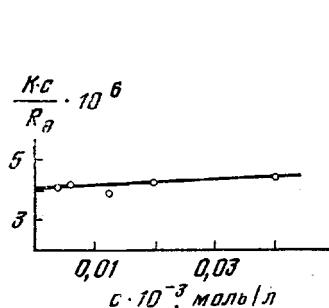


Рис. 5

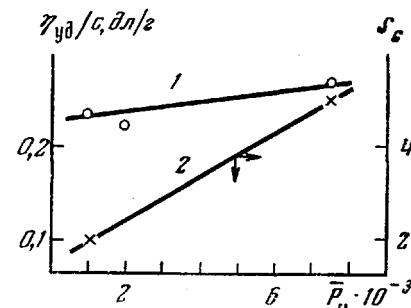


Рис. 6

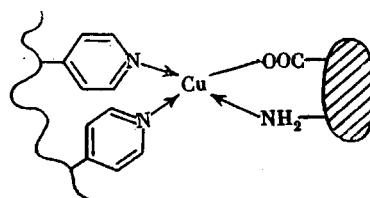
Рис. 5. Зависимость $K \cdot c / R_0$ от c для поликомплекса БСА - Cu^{+2} - ПВП-1; $\text{pH } 4,2, 25^\circ$

Рис. 6. Зависимость приведенной вязкости (1) и коэффициента седиментации (2) поликомплексов БСА - Cu^{+2} - ПВП при соотношении $n_{\text{БСА}}/n_{\text{ПВП}}$, соответствующем полной гомогенизации системы от степени полимеризации

экспериментов приходится в среднем участок цепи ПВП постоянной длины (около 250 звеньев).

Для оценки молекулярной массы частиц растворимого тройного комплекса, образованного с участием ПВП-1 ($M_n = 1 \cdot 10^4$) при минимальном содержании ПВП, достаточном для сохранения гомогенности системы (2,8 г БСА/г ПВП), был использован метод светорассеяния. На рис. 5 представлена зависимость $K \cdot c / R_0$ от c для поликомплекса БСА - Cu^{+2} - ПВП-1. Как видно, она линейна, что указывает на отсутствие диссоциации поликомплекса на исходные компоненты при разбавлении. Значение M_n , определенное из этой зависимости составляет $2,5 \cdot 10^6$. В то же время расчет показывает, что при указанном соотношении на один поликатион ПВП в комплексе приходится четыре молекулы белка. С учетом атомной массы меди, содержащейся в составе комплекса, молекулярная масса такой частицы должна быть $3,8 \cdot 10^6$. Следовательно, реальная частица поликомплекса БСА - Cu^{+2} - ПВП-1 представляет собой ассоциат, включающий в себя в качестве субъединиц шесть-семь поликатионов, с которыми белковые глобулы связаны через посредство ионов меди.

Можно предположить, что контакты белка и поликатиона осуществляются посредством образования хелатных узлов типа



в которых ион меди играет роль центрального атома.

Коэффициент седиментации растворимых комплексов БСА – Cu⁺⁺ – ПВП сильно растет при увеличении длины цепи ПВП. В том же интервале степеней полимеризации поликатиона приведенная вязкость изменяется весьма незначительно (рис. 6). Учитывая, что при молекулярных массах поликомплекса $\sim 10^6$ $\eta_{sp}/c \sim 0,25$, приходим к выводу о весьма высокой компактности этих частиц и отсутствии у них существенной асимметрии.

Московский государственный
университет им. М. В. Ломоносова

Поступила в редакцию
13 VII 1979

ЛИТЕРАТУРА

1. Дж. Хаггис, Д. Михи, А. Миур, К. Робертс, П. Уокер, Введение в молекулярную биологию, «Мир», 1967, стр. 273.
2. А. С. Спирин, Л. П. Гаврилова, Рибосома, «Наука», 1971, стр. 164.
3. В. А. Кабанов, В. П. Евдаков, М. И. Мустафаев, А. Д. Антипина, Молек. биол., 11, 582, 1977.
4. В. Н. Цветков, В. Е. Эскин, С. Я. Френкель, Структура макромолекул в растворе, «Наука», 1964, стр. 421.
5. V. A. Kabanov, 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.
6. А. Б. Зезин, Н. М. Кабанов, А. И. Кокорин, В. Б. Рогачева, Высокомолек. соед., А19, 118, 1977.
7. Н. М. Кабанов, А. И. Кокорин, В. Б. Рогачева, А. Б. Зезин, Высокомолек. соед., А21, 209, 1979.

WATER-SOLUBLE TRIPLE COMPLEX OF POLY-4-VINYLPYRIDINE, BOVINE SERUM ALBUMINE AND COPPER

Mustafayev M. I., Kabanov V. A.

Summary

The interaction between poly-4-vinylpyridine and bovine serum albumine with the participation of bivalent copper ions in acidic medium has been studied. The formation of soluble triple complex is shown for the wide range of components ratios. It is established by light scattering, sedimentation and viscosimetry methods that the real particle of the triple polycomplex is an associate which includes 6-7 polycations binded with protein globules via copper ions. The high compactness of particles of soluble triple complex is shown.
