

УДК 541(64+183.12)

О ВЗАИМОДЕЙСТВИИ НЕРАСТВОРИМОГО КОМПЛЕКСА ПРОТАМИН — ПОЛИНУКЛЕОТИД С ПОЛИФОСФАТАМИ

*Гладилин К. Л., Орловский А. Ф., Кирпотин Д. Б.,
Воронцова В. Я.*

Рассмотрено взаимодействие частиц нерастворимого полизелектролитного комплекса протамина с полиадениловой и полицитидиловой кислотой и полифосфатов с различной длиной цепи. Показано, что при длине цепи полифосфата более 6–8 звеньев имеет место реакция замещения полинуклеотида на полифосфат в составе комплекса, сопровождающаяся «дроблением» его частиц (коацерватных капель). Рассмотрено влияние степени полимерности полифосфата, а также порядка смешения реагентов на состав и степень дисперсности результирующего нерастворимого полизелектролитного комплекса. Предложен механизм наблюдаемого явления «дробления» частиц нерастворимого полизелектролитного комплекса.

Разноименно заряженные полизелектролиты в растворе проявляют тенденцию к ассоциации с образованием полизелектролитных комплексов [1]. Образующиеся комплексы могут либо оставаться в растворе, либо выделяться в виде новой фазы — геля или высококонцентрированного вязкого раствора; в последнем случае говорят об образовании нерастворимых полизелектролитных комплексов (НПК). НПК представляют собой практически важный класс соединений [1, 2]. Взаимодействия между биополизелектролитами, приводящие к образованию НПК, играют существенную роль в процессах самосборки ряда субклеточных структур (например, хроматина). Вероятно, что взаимодействия заряженных макромолекул лежали и в основе формирования фазовообособленных микроструктур — эволюционных предшественников живых организмов в ходе добиологической эволюции на Земле [3]. Исследования НПК были начаты еще в 30-х годах на полизелектролитах биологического происхождения [4]. В дальнейших исследованиях рассматривали главным образом реакции, приводящие к образованию НПК в системе, содержащей два полизелектролита [5–7].

В предыдущих работах было показано, что взаимодействие третьего полизелектролита с предварительно полученным двойным НПК приводит к своеобразной структурной перестройке его частиц и увеличению степени дисперсности системы НПК — раствор, причем в ходе этого процесса один из компонентов исходного НПК (имеющий заряд того же знака, что и добавляемый третий полизелектролит) переходит в раствор [8]. Цель данной работы — дальнейшее исследование взаимодействия двойного НПК с третьим полизелектролитом и, в частности, влияние длины цепи третьего полизелектролита на структуру и состав частиц НПК и другие характеристики процесса. В качестве объекта исследования были выбраны комплексы основного белка (протамина) с полирибонуклеотидами (полиадениловой и полицитидиловой кислотой) и полифосфатами.

В работе использовали протаминсульфат (Spofa), переосажденный из 10%-ного водного раствора этанолом при 0–4° (фракция 0–0,25 объем этанола на 1 объем раствора); калиевые соли полирибонуклеотидов (I) и полирибонуклеотидов (II) кислот (Reanal), полифосфаты натрия (III) со средней длиной цепи $\bar{n}=5, 14, 28$ и 47 (Sigma) и 72 и 290^1 ; декагидрат пирофосфата натрия х. ч.; гексагидрат триполифосфата натрия, полученный по методике работы [9]; трист-(оксиметил)аминометан (Sigma), остальные реагенты марки х. ч. и ч. д. а. Эквивалентные веса препаратов полинуклеотидов и полифосфатов определяли по содержанию общего фосфора после минерализации [10], а протамина — методом потенциометрического титрования.

¹ Полифосфаты с $\bar{n}=72, 290$ любезно предоставлены М. С. Крицким.

Длину цепи полипитидовой кислоты определяли по отношению концевого и общего фосфора с использованием щелочной фосфатазы (Calbiochem). Структуру частиц НПК изучали методом интерференционного и фазового контраста с помощью микроскопа «Peraval Interphaco» (K. Zeiss).

Степень дисперсности и концентрацию дисперсной фазы в системах НПК – раствор изучали с помощью двуволнового варианта спектротурбидиметрического метода [11, 12], принимая относительный коэффициент преломления частиц равным 1,05 [12]; измерения проводили на спектрофотометре СФ-4А в трех- и пяти-миллиметровых кюветах. Состав НПК определяли, проводя анализ надосадочных, полученных после центрифугирования при 17 000 *g* в течение 30 мин; количество полиадениловой и полипитидовой кислоты определяли по поглощению надосадочных при 260 нм и 271 нм соответственно. Количество протамина определяли по модифицированной методике [13], основанной на цветной реакции на аргинин. Для этого к пробе (0,5 мл), содержащей 10–500 мкг протамина, последовательно добавляли 2,2 мл 0,75 н. KOH, 0,1 мл 0,01%-ного α -нафтоля в 50%-ном этаноле, содержащем 5% мочевины, и 0,2 мл раствора гипобромита, полученного растворением 2 г брома в 50 мл 0,5 н. KOH на холода. Через 30 мин интенсивность окраски измеряли при 510 нм против контрольной пробы, не содержащей протамина; концентрацию протамина определяли по калибровочному графику. НПК получали, смешивая растворы компонентов в 0,05 моль/л или 0,1 моль/л *tris*-HCl-буфере, либо в 0,1 моль/л триэтаноламин-HCl-буфере, pH 8,24, при комнатной температуре, причем природа буфера не влияла на получаемые результаты.

В условиях эксперимента протамин (pK 12,7) и полинуклеотид (pK 0,7–1,0), так же как и протамины и полифосфат, несут заряды разного знака и в широком интервале отношений осново-мольных концентраций поликатион – поланион θ образуют нерастворимые комплексы состава, близкого к стехиометрическому. Эти НПК представлены коацерватными каплями – округлыми частицами размером 0,5–5 мкм, обогащенными полимерными компонентами системы. В то время как состав комплексов протамин – полинуклеотид и протамин – III в широком интервале соотношений компонентов остается близким к стехиометрическому, степень дисперсности системы существенно зависит от наличия избыточного компонента в системе, причем максимум среднего диаметра частиц и максимум включения полизелектролитов в НПК отвечают составу системы при $\theta=1$. При взаимодействии полифосфатов с НПК протамин – полинуклеотид количество перешедшего в раствор полинуклеотида тем больше, чем выше концентрация полифосфата. Можно предположить, что в зависимости от длины цепи полифосфат способен действовать как низкомолекулярный электролит, вызывая растворение НПК, либо как связывающий протамин поланион, замещая полинуклеотид в составе НПК. Доля полинуклеотида и протамина, перешедших в раствор, характеризовали величиной

$$\beta = \frac{[A]_2 - [A]_0}{[A] - [A]_0},$$

где $[A]_2$ – осново-мольная концентрация полизелектролита в растворе после добавления полифосфата; $[A]_0$ – концентрация полизелектролита в растворе в отсутствие полифосфата; $[A]$ – общая концентрация полизелектролита в системе раствор – НПК. На рис. 1 приведены зависимости β от концентрации полифосфата для обоих компонентов системы (протамина и полинуклеотида) при взаимодействии НПК протамин – II ($\bar{n}=89$) при $\theta=0,95$ с полифосфатом ($\bar{n}=28$) и пирофосфатом ($n=2$). Совпадающий в пределах ошибки опыта ход кривых для протамина и полинуклеотида при возрастающей концентрации пирофосфата означает, что компоненты исходного НПК переходят в раствор в соотношении, отвечающем его стехиометрии, т. е. наблюдается растворение НПК. Для полифосфата ($\bar{n}=28$) доля полинуклеотида, перешедшего в раствор при данной концентрации полифосфата, значительно превышает долю перешедшего в раствор протамина. Наблюдаемый небольшой переход протамина в раствор в данном случае может быть связан с гетерогенностью препарата протамина; однако малые значения β для протамина позволяют допустить, что стехиометрия НПК при взаимодействии с полифосфатом ($\bar{n}=28$) существенно не изменяется и протекает реакция замещения полинуклеотида на полифосфат в составе НПК.

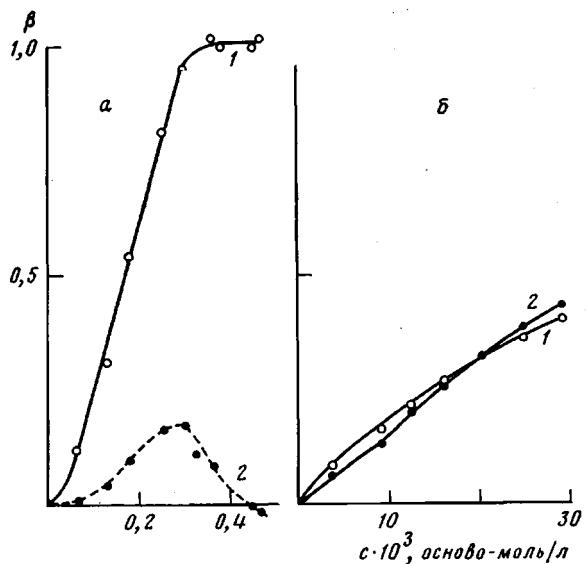


Рис. 1. Зависимость доли β полинуклеотида (1) и протамина (2), перешедших в раствор из нерастворимого комплекса протамин-II, от концентрации полифосфата c ($\bar{n}=28$) (а) и пирофосфата (б) в системе

Способность полифосфата вызывать переход полинуклеотида из НПК в раствор зависит от длины цепи полифосфата. Эту способность характеризовали отношением осново-мольных концентраций полифосфата и полинуклеотида, при котором степень перехода полинуклеотида в раствор составляет 0,5 ($\beta=0,5$). Этот параметр γ , зависимость которого от длины цепи полифосфата \bar{n} представлена на рис. 2, претерпевает сильные изменения при малых \bar{n} ($\bar{n} \leq 5$), а при дальнейшем возрастании \bar{n} достигает постоянного значения (в пределах экспериментальной ошибки), равного 0,80–0,85. Такой характер зависимости может быть связан с переходом от механизма растворения НПК к механизму замещения, а этот переход — с достижением определенного порогового значения длины цепи полифосфата, которое составляет (как можно оценить по точке «излома» кривой на рис. 2) 6–8 звеньев. Полученное значение совпадает с величиной степени полимеризации, при которой олигомер фосфата проявляет способность к кооперативному взаимодействию с заряженной матрицей [14].

Степень дисперсности и концентрация частиц НПК в системе протамин—полинуклеотид с течением времени меняется вследствие коалесценции частиц (рис. 3), поэтому в каждой серии опытов добавление полифосфата и измерение структурных характеристик частиц НПК проводили через определенное время после его образования (60–90 мин). Рис. 3 иллюстрирует также изменение степени дисперсности и числа частиц НПК после добавления полифосфата ($\bar{n}=72$) к системе протамин-II в количестве, отвечающем $\beta=0,5$. Кроме возрастания степени дисперсности системы следует отметить, что скорость коалесценции частиц НПК после прибавления полифосфата заметно уменьшается. Возможно, что такое стабилизирующее действие обусловлено избыточным компонентом, образующим на поверхности частиц НПК заряженный адсорбционный слой, препятствующий коалесценции.

Увеличение степени дисперсности НПК связано с характерной перестройкой структуры частиц — «дроблением». Добавляя раствор полифосфата ($\bar{n}=72$) непосредственно к микропрепаратору НПК протамин-I ($\theta=0,75$), следили за протеканием этого процесса во времени (рис. 4). Как показывают наблюдения, по мере проникновения полифосфата внутрь частиц НПК в их объеме формируются более мелкие частицы новой фазы, видимо, включающей образующийся тройной комплекс с участием полифосфата; эти частицы увеличиваются, абсорбируя новые порции тройного

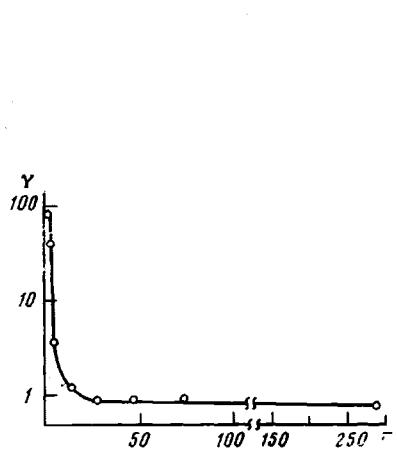


Рис. 2

Рис. 2. Зависимость отношения осново-мольных концентраций γ полифосфата и полинуклеотида, отвечающих $\beta=0,5$, от средней длины цепи полифосфата n

Рис. 3. Изменения параметров дисперской фазы, представленной НПК в системе протамин – полинуклеотид с течением времени. N – концентрация частиц ($1, 1'$), d – их средний диаметр ($2, 2'$). $1, 2$ – исходная система протамин – II; $1', 2'$ – к части исходной системы добавлен полифосфат (момент добавления отмечен стрелкой)

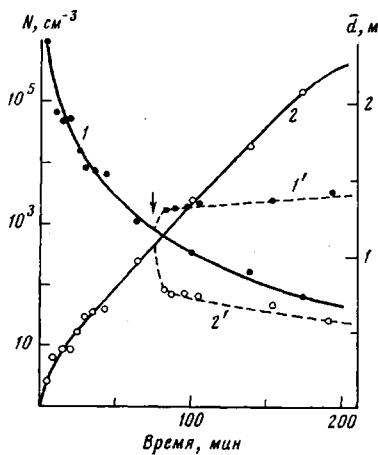


Рис. 3

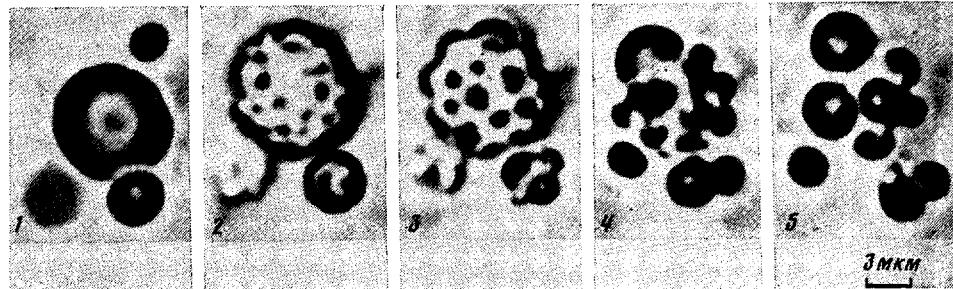


Рис. 4. Изменение структуры частиц НПК протамин – I под действием полифосфата. 1 – частицы до прибавления раствора III; 2–5 – последовательные изменения частиц после прибавления 0,1%-ного раствора III ($n=72$); фотографирование проводили с интервалом 3–5 с

НПК вплоть до завершения процесса – образования двухфазной системы с новым составом фаз и более высокой дисперсностью. Процесс замещения включает промежуточное образование третьей высококонцентрированной фазы в объеме частиц исходного НПК.

Представляло интерес выяснить, влияет ли последовательность добавления поланионов на состав и структуру НПК в системе протамин – полинуклеотид – III. На рис. 5 представлены зависимости среднего объема частиц V , их концентрации N и объемной доли ϕ НПК в системе и значения β для полинуклеотида от концентрации III в системе протамин – I (0,05 моль/л *трис*-HCl-буфер; pH 8,0; $\theta=0,25$; концентрация компонентов $3,6 \cdot 10^{-3}$ осново-моль/л). Эти зависимости отвечают добавлению III к НПК протамин – I (кривая 1), I к НПК протамин – III (кривая 2) и смеси I–III к раствору протамина (кривая 3). Концентрация полифосфата $x_{\text{нф}}$ выражена в осново-мольных долях от суммарного содержания протамина и полифосфата в системе. Как показывает график, степень дисперсности системы существенно зависит от порядка смешения реагентов, тогда как характер изменения объемной доли НПК при переменной концентрации полифосфата во всех трех случаях сходный, а практически совпадающий ход кривых β для полинуклеотида во всех трех случаях свидетельствует о том, что состав тройного комплекса не зависит от

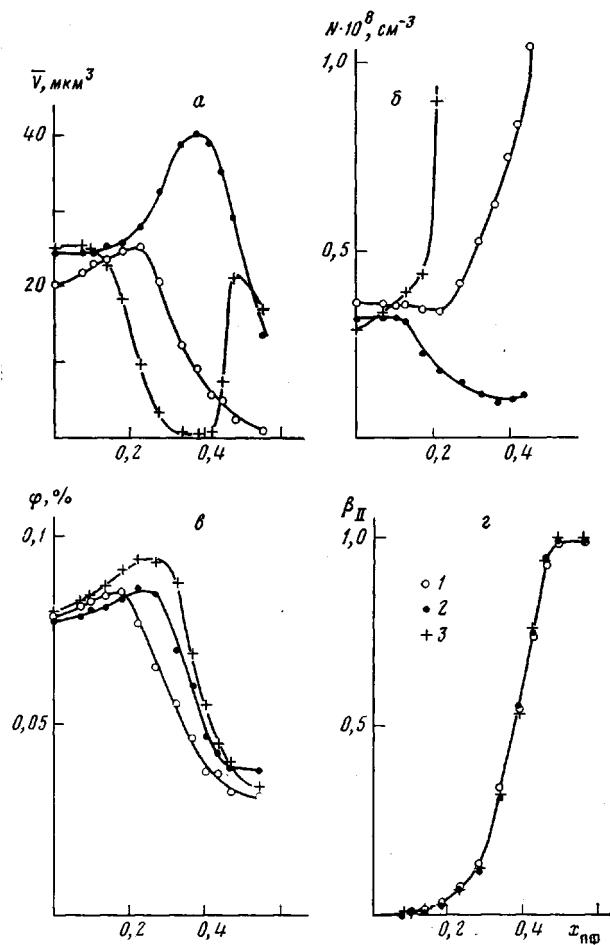


Рис. 5. Зависимость среднего объема \bar{V} частиц НПК (а), их концентрации N (б), объемной доли дисперсной фазы φ (в) и доли β полинуклеотида, находящегося в растворе (г), от концентрации полифосфата в системе протамин – I – полифосфат ($n=40$). Порядок смешения реагентов: 1 – протамин – I – полифосфат; 2 – протамин – полифосфат – I; 3 – протамин – смесь I и полифосфата. Концентрация полифосфата выражена в осново-мольных долях от суммарного содержания полианионов в системе

порядка смешения. Зависимость степени дисперсности системы от порядка смешения реагентов указывает на неравновесный характер этих параметров и возможное влияние распределения компонентов НПК внутри частиц на степень дисперсности системы.

Пороговый характер зависимости концентрации звеньев полифосфата, отвечающей $\beta=0.5$, от длины цепи полифосфата и хорошо совпадающий (начиная с некоторого \bar{n}) ход зависимостей β от концентрации полифосфата (рис. 6) может свидетельствовать о том, что размер наименьшего вступающего в реакцию участка макромолекулы полифосфата превышает размеры одного звена, так же как и для реакций между линейными макромолекулами в растворе [15].

При \bar{n} , обусловливающих реакцию замещения, зависимости для полинуклеотида от осново-мольной концентрации полифосфата в системе приобретают S-образный характер (рис. 6), который можно объяснить на основе представлений о механизме комплексообразования полиаминов с полианионными матрицами, развитых Кабановым с сотр. [16]. Образование НПК связано с достижением в системе определенного соотношения поликатион – полианион N_i , которое отвечает полному заселению молекул одного компонента (матрицы) молекулами второго компонента (олигомера) и определяется природой и соотношением степеней полимериза-

ции компонентов. Рассматриваемая здесь реакция замещения протекает, как показывают наблюдения, по существу в фазе НПК. Начало реакции замещения и сопутствующего ей образования новой (третьей) фазы также может быть связано с достижением некоторого критического соотношения добавленного и первоначально содержавшегося компонента в фазе НПК. Однако в этом случае большую роль могут играть недостаточно изученные

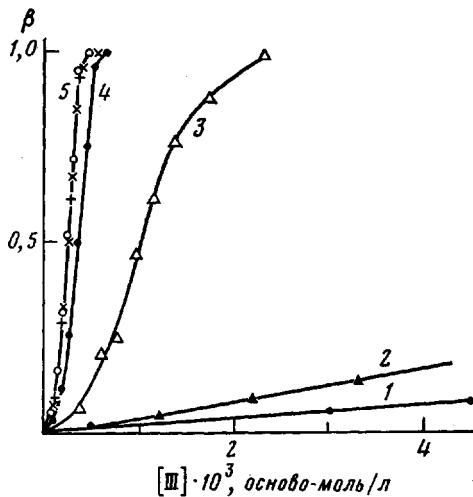


Рис. 6. Зависимость доли полинуклеотида β , перешедшего в раствор из НПК протамина - II, от концентрации добавленных полифосфатов с длиной цепи $n=2$ (1), 3 (2), 5 (3), 14 (4), $n \geq 28$ (5)

механизмы переноса макромолекул из раствора в частицы НПК, насчитывающие $\sim 10^9$ – 10^{10} звеньев каждая.

Рассмотренный в работе тип реакций между НПК и внешним полизелектролитом может играть роль в процессах сборки и эволюции предбиологических структур и при сборке и функционировании ряда биологических систем.

В заключение авторы считают приятным долгом выразить искреннюю благодарность Т. Е. Павловской, В. А. Кабанову, А. Б. Зезину и их сотрудникам за плодотворное обсуждение данной работы.

ЛИТЕРАТУРА

1. Зезин А. Б., Рогачева В. Б. В кн.: Успехи химии и физики полимеров. М.: Химия, 1973, с. 3.
2. Соловьев В. Д. Микрокапсулирование. М.: Химия, 1980, с. 22.
3. Опарин А. И., Гладилин К. Л. В кн.: Успехи биологической химии. М.: Наука, 1980, т. 21, с. 3.
4. Bungenberg de Jong H. G. La coacervation, les coacervates et leur importance en biologie. Paris: Hermann et Cie, 1936. 54 p.
5. Voorn M. J. Recueil trav. chim., 1956, v. 75, № 1, p. 805.
6. Veis A. In: Biological macromolecules, Biological polyelectrolytes. N. Y.: Marcell Dekker, 1970, v. 3, p. 211.
7. Платэ Н. А., Литманович А. Д., Ноа О. В. Макромолекулярные реакции. М.: Химия, 1977. 255 с.
8. Опарин А. И., Гладилин К. Л., Кирпотин Д. Б., Чертигин Г. В., Орловский А. Ф. Докл. АН СССР, 1977, т. 232, № 2, с. 485.
9. Неорганические синтезы/Под ред. Воробьева О. И. М.: Изд-во иностр. лит., 1952, вып. 3, с. 7.
10. Практикум по биохимии/Под ред. Мешковой Н. П., Северина С. Е. М.: Изд-во МГУ, 1979, с. 76.
11. Sedláček B. Collect. Czechosl. Chem. Commun., 1967, v. 32, № 4, p. 1374.
12. Орловский А. Ф. Дис. на соискание уч. ст. канд. биол. наук. М.: Ин-т биохимии им. А. Н. Баха АН СССР, 1978. 126 с.
13. Birt L. M., Hird F. S. R. Biochem. J., 1956, v. 64, № 5, p. 805.
14. Харенко А. В., Старикова Е. А., Луценко В. В., Зезин А. Б. Высокомолек. соед. А, 1976, т. 18, № 7, с. 1604.
15. Кабанов В. А., Паписов И. М. Высокомолек. соед. А, 1979, т. 21, № 2, с. 243.
16. Kabanov V. A., Zezin A. B., Mustafaev M. I., Kasaikin V. A. In: Polymeric amines and polyammonium salts. Oxford — N. Y.: Pergamon Press, 1980, p. 173.

ON INTERACTION OF THE INSOLUBLE PROTAMINE — POLYNUCLEOTIDE
COMPLEX WITH POLYPHOSPHATES

*Gladilin K. L., Orlovskii A. F., Kirpotin D. B.,
Vorontsova V. Ya.*

S u m m a r y

The interaction of particles of the insoluble polyelectrolyte complex of protamine with polyadenylic and polycytidylic acids and polyphosphates with various chain-length has been studied. At the chain length being more than 6-8 units the reaction of substitution of polynucleotide by polyphosphate in the complex was shown to proceed being accompanied by «breacking» of its particles (coacervate drops). The influence of the length of polyphosphate chain and of the order of reagents mixing on the composition and on the dispersity of formed insoluble polyelectrolyte complex is discussed. The mechanism of «breacking» of complex particles is proposed.