

УДК 541.64:532.77:547.96

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ МОЛЕКУЛ БЕЛКА С СЕТЧАТЫМ ПОЛИЭЛЕКТРОЛИТОМ В РАСТВОРЕ

*Паутов В. Д., Кузнецова Н. И., Мишаева Р. Н.,
Ануфриева Е. В.*

Методом поляризованной люминесценции изучено взаимодействие молекул белка с сетчатым полиэлектролитом в воде. Установлены особенности строения комплекса белок — полиэлектролит при низком и высоком (25-кратный избыток по весу) содержании белка в комплексе.

Взаимодействие белков с синтетическими полимерами предоставляет широкие возможности для выделения и очистки белков, для иммобилизации ферментов. Механизм взаимодействия молекул белков с синтетическими полиэлектролитами и строение образующихся комплексов изучены в работе [1].

В качестве объектов исследования в настоящей работе выбраны белок лизоцим и сетчатый полиэлектролит — сополимер метакриловой кислоты и этилендиметакриламида (2,5%) (ПМАК) в тонкодисперсной форме.

Тонкодисперсную форму ПМАК получали механическим измельчением с последующим фракционированием и выделением фракции ПМАК, имеющей размер частиц $\sim 10^{-6}$ м. Степень нейтрализации ПМАК достигали добавлением заданного количества щелочи, определенного с помощью кривой потенциометрического титрования.

При изучении взаимодействия белков с сетчатыми полиэлектролитами сорбционными методами доля белка, связанного сетчатым полиэлектролитом, определяется путем выделения сетчатого полиэлектролита и связанного с ним белка из раствора белка. В этих экспериментах удается выделить лишь такие образования белок — полиэлектролит, которые способствуют осаждению полиэлектролита (рис. 1). Но осаждение, а следовательно, выделение сетчатого полиэлектролита и связанного белка зависят от относительного содержания белка и сетчатого полиэлектролита в растворе, т. е. от весового соотношения белок : полиэлектролит (Б : ПЭЛ). Это следует из экспериментов, в которых используются тонкодисперсная форма сетчатого полиэлектролита и чувствительные люминесцентные методы обнаружения связанного белка. Если отношение белок : полиэлектролит изменяется от 1 до 12, комплекс белок — полиэлектролит выпадает в осадок. Если соотношение Б : ПЭЛ > 12, осадок не образуется, комплекс белок — полиэлектролит остается в растворе белка в тонкодисперсной форме во взвешенном, неосажденном состоянии.

Для изучения межмолекулярных взаимодействий белок — полиэлектролит в условиях, когда осадок не образуется, обычные сорбционные методы непригодны. Наоборот, существенный вклад в решение вопросов, связанных с установлением условий образования таких систем и особенностей их строения, могут дать методы, чувствительные к изменениям межмолекулярных взаимодействий в многокомпонентной системе при низком содержании компонентов в растворе. Таким методом является метод поляризованной люминесценции, позволяющий судить об образовании межмолекулярных контактов между разными компонентами по изменению параметров подвижности каждого из компонентов (подвижности макромолекул белка как целого или внутримолекулярной подвижности полимерных цепей).

Для применения метода поляризованной люминесценции использовали меченные молекулы лизоцима или ПМАК с ковалентно присоединенными люминесцирующими группами ант哩лацилоксиметановой структуры. Меченные лизоцим и ПМАК были

получены по способу, описанному в работе [2]¹. Содержание люминесцирующих групп (ЛГ) в макромолекулах лизоцима варьировали от 1 до 0,1 ЛГ на каждую макромолекулу лизоцима. В первом случае доля меченых молекул лизоцима $\alpha_{\text{ЛГ}}=1$, во втором — $\alpha_{\text{ЛГ}}=0,1$. Содержание ЛГ в ПМАК составляло 1 ЛГ на 500 мономерных звеньев ПМАК. Содержание ПМАК без ЛГ в водном растворе меченого лизоцима варьировали от 1 до 0,0025 кг/м³. Содержание лизоцима в растворе 0,25 кг/м³. Сетчатый полиэлектролит (ПМАК) использовали при степенях ионизации карбоксильных групп ПМАК $\alpha=0,13$ и 0,4.

При изучении межмолекулярных взаимодействий макромолекул лизоцима с ПМАК в водных растворах лизоцима возникает вопрос, с чем связано отсутствие осадка при отношении Б : ПЭЛ > 12 (при 1 < Б : ПЭЛ < 12 комплекс лизоцима с ПМАК выпадает из раствора). Либо в этих услови-

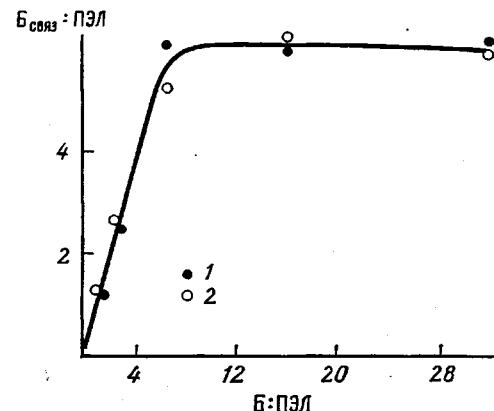


Рис. 1

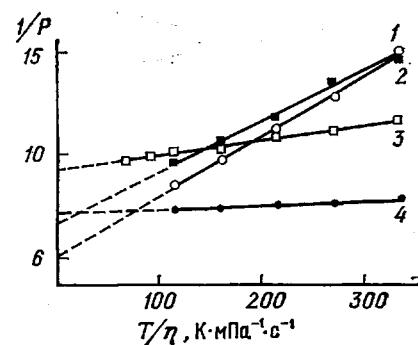


Рис. 2

Рис. 1. Зависимость весового состава (Бсвяз : ПЭЛ) комплекса белок – ПМАК, выделяемого из раствора, от весового соотношения Б : ПЭЛ в растворе при степенях ионизации ПМАК $\alpha=0,14$ (1) и 0,38 (2) ($c_{\text{ПМАК}}=3,0 \text{ кг/м}^3$)

Рис. 2. Зависимости $1/P$ от T/η для свободного меченого лизоцима (1) и меченого лизоцима в комплексе с ПМАК при весовых соотношениях Б : ПЭЛ = 100 (2), 30 (3), 0,5 (4) в растворе в водно-сахарозных смесях (298 К, $\alpha_{\text{ПМАК}}=0,13$, $c_{\text{белка}}=0,25 \text{ кг/м}^3$)

ях белок не взаимодействует с ПМАК, либо это взаимодействие приводит к формированию межмолекулярных образований белок – ПМАК существенно иного строения. Именно для ответа на этот вопрос был использован метод поляризованной люминесценции.

По изменению подвижности меченых макромолекул лизоцима как целого можно судить об образовании межмолекулярных контактов белок – полиэлектролит. Оказывается, что при отношении Б : ПЭЛ < 1 все молекулы лизоцима связаны полиэлектролитом, а межмолекулярные контакты белок – полиэлектролит являются наиболее длительными. В этом случае подвижность молекул лизоцима, взаимодействующих с ПМАК, оказывается сильно заторможенной. Времена релаксации, характеризующие подвижность связанных с ПМАК молекул лизоцима при отношении Б : ПЭЛ < 1, составляют 180 нс, т. е. увеличиваются на порядок по сравнению с временами, характеризующими подвижность свободных молекул лизоцима как целого, $\tau_{\text{ц}}=18$ нс. Это значение определено методом поляризованной люминесценции из зависимости $1/P = T/\eta$ и значения $\tau_{\phi}=7,6$ нс (P – поляризация люминесценции, τ_{ϕ} – длительность свечения, T и η – температура и вязкость растворителя) (рис. 2 кривая 1). Оно хорошо совпадает с теоретическим значением $\tau_{\text{ц}}$, полученным с помощью соотношения

$$\tau_{\text{ц}} = \frac{KM[\eta]\eta}{R_0 T},$$

¹ Авторы глубоко признательны М. Г. Krakovskому и В. Б. Лущик за предоставленный антраценсодержащий реагент и помощь в получении меченых систем.

где K — числовой коэффициент, зависящий от формы молекулы белка; M — молекулярная масса белка; $[\eta]$ — характеристическая вязкость раствора белка; η — вязкость растворителя; R_0 — универсальная газовая постоянная; T — абсолютная температура.

При значениях $B : \text{ПЭЛ} > 12$ также все молекулы лизоцима связаны ПМАК вплоть до соотношения $B : \text{ПЭЛ} = 25$. При отношении $B : \text{ПЭЛ} > 25$ появляются свободные молекулы белка и их доля растет при дальнейшем увеличении соотношения $B : \text{ПЭЛ}$ (уменьшается доля б связанных с полиэлектролитом белка) (рис. 3). Эти данные получены при анализе зависимостей $1/P$ от T/η , измеренных при различном относительном содерж-

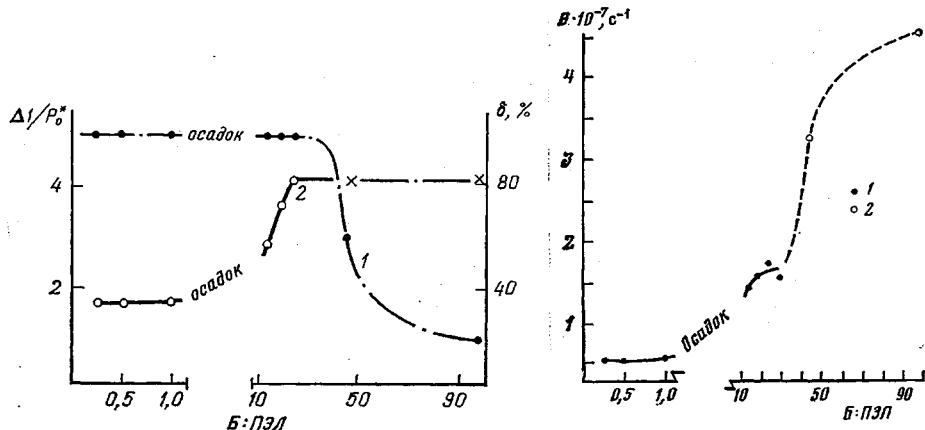


Рис. 3

Рис. 4

Рис. 3. Изменение доли связанных с ПМАК молекул лизоцима (δ) (1) и компактности их упаковки на ПМАК ($\Delta 1/P_0^*$) (2) в зависимости от относительного содержания белка и ПМАК в водном растворе ($B : \text{ПЭЛ}$); кресты — значения $\Delta 1/P_0^*$, вычисленные с учетом доли свободного белка (298 К, $\alpha_{\text{ПМАК}} = 0,13$, $c_{\text{белка}} = 0,25 \text{ кг/м}^3$)

Рис. 4. Изменение подвижности ($\theta_{\text{связ}} = 1/\tau_w$) связанных с ПМАК молекул лизоцима в зависимости от относительного содержания белка и ПМАК ($B : \text{ПЭЛ}$) в водном растворе (1); 2 — изменение наблюдаемого коэффициента подвижности $\theta_{\text{связ+несвяз}}$ при появлении в растворе свободных молекул лизоцима (298 К, $\alpha_{\text{ПМАК}} = 0,13$, $c_{\text{белка}} = 0,25 \text{ кг/м}^3$)

жании белка и ПМАК в растворе, т. е. при различных соотношениях $B : \text{ПЭЛ}$ (рис. 2). Несмотря на то что при $25 > B : \text{ПЭЛ} > 12$, как и при $B : \text{ПЭЛ} < 1$, все молекулы белка связаны ПМАК, имеется и существенное различие между ассоциатами белка на ПМАК, включающими избыточное и недостаточное (по сравнению с ПМАК) количество молекул белка. В комплексе белок — ПМАК с избыточным содержанием белка ($B : \text{ПЭЛ} > 12$) по сравнению с комплексом белок — ПМАК с низким содержанием белка ($B : \text{ПЭЛ} < 1$) реализуется более плотная упаковка молекул белка на полиэлектролитной матрице. Эти данные следуют из анализа зависимости поляризации люминесценции от содержания в растворе меченых, имеющих люминесцирующие группы макромолекул лизоцима, т. е. от доли $\sigma_{\text{ЛГ}}$ меченых макромолекул. Значение $\sigma_{\text{ЛГ}}$ варьировали от 1 до 0,1. При плотной упаковке (расстояние между люминесцирующими группами $r < 5 \text{ нм}$) меченых молекул белка вероятность миграции энергии электронного возбуждения люминесцирующих групп возрастает (поляризация P падает) с увеличением доли $\sigma_{\text{ЛГ}}$ меченых макромолекул.

Параметр $\Delta 1/P_0^* = (1/P)_{\sigma_{\text{ЛГ}}=1} - (1/P)_{\sigma_{\text{ЛГ}}=0,1} = 0,1$ выбран нами в качестве характеристики компактности расположения молекул белка на ПМАК. Для свободных молекул лизоцима в воде $(1/P)_{\sigma_{\text{ЛГ}}=1} = (1/P)_{\sigma_{\text{ЛГ}}=0,1}$ и $\Delta 1/P_0^* = 0$. Напротив, для связанных с ПМАК молекул лизоцима при избыточном содержании белка на ПМАК, например при соотношении $B : \text{ПЭЛ} = 25$, $\Delta 1/P_0^* = 4$. Параметр $\Delta 1/P_0^*$ существенно уменьшается для

комплекса белок – ПМАК с низким относительным содержанием белка (рис. 3), хотя и не падает до нуля, как для свободных молекул лизоцима. Это значит, что молекулы лизоцима, связанные с ПМАК, даже при низком содержании белка в комплексе ($B : PЭЛ = 0,25$) сближены друг относительно друга, хотя плотность упаковки ниже ($\Delta 1/P_0^*$ меньше), чем в комплексе с высоким содержанием белка.

Таким образом, при высоком и низком относительном содержании белка в растворе ($c=0,25 \text{ кг}/\text{м}^3$) на матрице ПМАК формируются ассоциаты, в которых молекулы белка расположены компактно друг относительно друга, а степень компактности возрастает при 12–25-кратном увеличении относительного содержания белка в растворе. Даже при столь значительном избытке белка по сравнению с ПМАК все молекулы белка связаны с ПМАК, свободные молекулы белка в растворе не обнаруживаются. Это значит, что комплекс ПМАК – белок при увеличении отношения $B : PЭЛ$ не осаждается из-за формирования компактных ассоциатов белка на матрице ПМАК с избыточным (12–25-кратным) содержанием белка в комплексе. Если содержание белка в растворе оказывается недостаточным для образования таких комплексов, как это имеет место при отношении $1 < B : PЭЛ < 12$, комплекс белок – ПМАК выпадает из раствора. Сорбционным методом показано, что состав осадка определяется отношением $B : PЭЛ = 6$. При отношении $B : PЭЛ \leq 1$ осадок не образуется, но молекулы белка (лизоцима) связаны с ПМАК. В этих условиях формируется комплекс иного строения, чем комплекс с избыточным содержанием белка. В комплексе при соотношении $B : PЭЛ \leq 1$ не только уменьшается компактность расположения молекул белка на матрице ПМАК (параметр компактности $\Delta 1/P_0^*$ уменьшается от 4 до 1,6), но и существенно изменяется (возрастает) длительность контакта белок – ПМАК ($\tau_w = 1/\theta$ увеличивается от 60 до 180 нс). Ассоциаты белка на матрице ПМАК становятся менее компактными, а сам комплекс белок – ПМАК более стабильным.

При $\alpha=0,13$ и $0,4$ все зависимости рис. 1–4 совпадают. Это удивительно, так как при $\alpha=0,13$ линейные фрагменты ПМАК в отсутствие молекул белка состоят из локальных структурированных участков, которые разрушаются при $\alpha=0,4$ [3]. Эти локальные структурированные участки ПМАК имеют существенно иную (большую) способность связывать молекулы, по крайней мере низкомолекулярных соединений, если существенную роль в связывании играют гидрофобные взаимодействия [3, 4]. Однаковая доля связанного с ПМАК белка, одинаковая компактность расположения молекул белка на матрице ПМАК, одинаковая длительность контакта белок – матрица (времена, характеризующие подвижность молекул белка, связанных с матрицей) для всех комплексов белок – ПМАК при разных α ($0,13$ и $0,4$) указывают на то, что факторы, стабилизирующие ассоциаты белок – ПМАК, не зависят от изменений, происходящих в ПМАК при изменении α от $0,13$ до $0,4$ [3]. Это значит, что определяющим фактором в образовании ассоциатов белок – ПМАК являются электростатические взаимодействия молекул лизоцима с ионизованными группами линейных фрагментов ПМАК, а не гидрофобные взаимодействия неполярных групп. Так как при увеличении α доля связанного белка не увеличивается, можно думать, что электростатическое взаимодействие белок – ПМАК существенно лишь для образования зародышей будущих ассоциатов.

Для исследования изменений в линейных фрагментах ПМАК, происходящих при взаимодействии ПМАК с молекулами лизоцима при соотношении $B : PЭЛ < 1$, мы изучали внутримолекулярную подвижность линейных фрагментов ПМАК при разных α в воде и в водных растворах лизоцима при отношении $B : PЭЛ \leq 1$. Установлено, что при взаимодействии ПМАК с молекулами белка внутримолекулярная подвижность линейных фрагментов ПМАК изменяется даже при низком относительном содержании белка в растворе ($B : PЭЛ \leq 1$). Значительная заторможенность подвижности линейных фрагментов ПМАК при $\alpha=0,13$ по сравнению с подвижностью при $\alpha=0,4$ связана с тем, что полимерные цепи ПМАК в этих условиях содержат структурированные участки [3], которые не разрушаются под действием отдельных молекул белка. Увеличение содер-

Изменение времен релаксации τ_{ω} , характеризующих внутримолекулярную подвижность линейных участков ПМАК в воде, при изменении содержания белка (лизоцима) ($c_{\text{ПМАК}} = 0,2 \text{ кг/м}^3$, 298 К)

Соотношение Б : ПЭЛ	$\tau_{\omega}, \text{ нс}$		Соотношение Б : ПЭЛ	$\tau_{\omega}, \text{ нс}$	
	$\alpha=0,13$	$\alpha=0,4$		$\alpha=0,13$	$\alpha=0,4$
0	170±20	59±6	0,3	190±20	67±7
0,1	190±20	62±6	1,0	270±30	82±8
0,2	190±20	66±7			

жания белка от Б : ПЭЛ=0 до Б : ПЭЛ=1 приводит к постепенному росту внутримолекулярной заторможенности полимерных цепей ПМАК (таблица).

Выяснить, что происходит с внутримолекулярной подвижностью ПМАК при дальнейшем увеличении относительного содержания белка до Б : ПЭЛ>12 в условиях, когда образуется неосажддающийся комплекс белок – полиэлектролит с плотной упаковкой белковых глобул на полиэлектролитной матрице, не удалось, так как поляризация люминесценции такого раствора не может быть измерена. В экспериментах с меченой ПМАК концентрация ПМАК не должна быть ниже 0,2 кг/м³, поэтому при отношении Б : ПЭЛ>12 концентрация белка в растворе достигает столь высоких значений, при которых взвесь ПМАК – белок становится слишком мутной для измерения параметров люминесценции (из-за контактов между различными частицами ПМАК и молекулами белка).

Существенные изменения внутримолекулярной подвижности линейных фрагментов ПМАК при взаимодействии с белком при различных α , сохранение при $\alpha=0,13$ вторичной структуры линейных цепей ПМАК при взаимодействии с белком указывают на электростатическое взаимодействие белковой глобулы с различными участками линейных фрагментов ПМАК или с различными линейными фрагментами ПМАК. Таким образом, использование меченых компонентов – меченого белка или меченого полиэлектролита – позволяет выявить различные особенности строения комплексов белок – полиэлектролит и их зависимость от относительного содержания белка и ПМАК в растворе.

ЛИТЕРАТУРА

1. Кабанов В. А., Евдакимов В. П., Мустафаев М. И., Антипина А. Д. Молек. биол., 1977, т. 11, вып. 3, с. 582.
2. Krakovyak M. G., Anufrieva E. V., Lysik V. B., Shelekhov N. S., Skorokhodov S. S. J. Macromolec. Sci. A, 1978, v. 12, № 6, p. 789.
3. Ануфриева Е. В., Кузнецова Н. П., Краковяк М. Г., Мишаева Р. Н., Паутов В. Д., Семисотнов Г. В., Шевелева Т. В. Высокомолек. соед. А, 1977, т. 19, № 1, с. 102.
4. Anufrieva E. V., Birshtein T. M., Nekrasova T. N., Ptitsyn O. B., Sheveleva T. V. J. Polymer Sci. C, 1968, v. 16, p. 3519.

Институт высокомолекулярных
соединений АН СССР

Поступила в редакцию
7.XII.1981

INTERACTION OF PROTEIN MOLECULES WITH NETWORK POLYELECTROLYTE IN SOLUTION

Pautov V. D., Kuznetsova N. P., Mishaeva R. N., Anufrieva Ye. V.

Summary

The interaction of protein molecules with network polyelectrolyte in water has been studied by polarized luminescence method. The features of the protein – polyelectrolyte complex structure at low and high (25-fold weight excess) content of protein in the complex are discussed.