

ИССЛЕДОВАНИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ БЕЛКОВ С СУСПЕНЗИЯМИ КАРБОКСИЛЬНЫХ СЕТЧАТЫХ ПОЛИЭЛЕКТРОЛИТОВ

*Кузнецова Н.П., Мишаева Р.Н., Гудкин Л.Р.,
Самсонов Г.В.*

Изучение связывания белков с карбоксильными сетчатыми полиэлектролитами имеет большой научный и практический интерес, обусловленный возможностью использования сетчатых полиэлектролитов для очистки белков и ферментов или их иммобилизации. Кроме того, взаимодействие сетчатых полиэлектролитов с белками можно рассматривать в какой-то степени как моделирование биохимических систем, поскольку в ряде случаев полимерный эффект проявляется в стабилизации и активации физиологически активного компонента в полимерном комплексе по сравнению с активностью исходного вещества в растворе [1, 2].

Данная работа посвящена изучению взаимодействия ряда белков с водными суспензиями сетчатых сополимеров метакриловой кислоты и этилендиметакриламида, являющегося спивающим агентом. Исследование взаимодействия белков с суспензиями сетчатых полиэлектролитов (СПЭ) проводили сорбционным методом.

Сополимер метакриловой кислоты и этилендиметакриламида (полиметакриловая кислота сетчатая (ПМАКС)), полученный радикальной сополимеризацией в массе, измельчали в шаровой мельнице, дезагрегировали обработкой ультразвуком, фракционировали, отмывали от низкомолекулярных компонентов методом ультрафильтрации. Использовали фракцию с размерами частиц 5–10 мкм.

В результате суспензионной сополимеризации метакриловой кислоты и этилендиметакриламида (2,5%) в гидрофобной среде образуются микрогранулы сетчатого полимера ПМАКС. Особенности синтеза определяют распределение полиэлектролитных цепей и спивающего агента преимущественно в поверхностном слое капли реакционной смеси, поэтому микрогранульная частица имеет плотный поверхностный слой повышенной жесткости [3]. Это подтверждается ограниченным набуханием микрогранул по сравнению с сополимером, полученным в массе [4], и сильной заторможенностью подвижности фрагментов полимерных цепей при ионизации [5].

Микрогранульные образцы ПМАКС фракционировали по размерам, отмывали ультрафильтрацией. Использовали фракцию с размером частиц ~10 мкм.

Определенную степень ионизации СПЭ достигали добавлением заданного количества щелочи, используя кривую потенциометрического титрования.

В качестве исследуемых белков использовали сывороточный альбумин ($M=69\,000$, рI 4,7), гемоглобин ($M=65\,000$, рI 6,7), лизоцим ($M=14\,000$, рI 10,5). Белки предварительно очищали с помощью ГПХ и подвергали диялизу.

Исследования взаимодействия белков с СПЭ сорбционным методом проводили в статических условиях при перемешивании в течение 1 ч при 20°. Благодаря использованию тонкодисперсных форм СПЭ значительно сокращалось время установления равновесия в системе из-за устранения диффузионных помех, вместе с тем существенно (в 4–5 раз) возросло количество связанного белка. На рис. 1 представлены данные по связыванию белка СПЭ для частиц, различающихся по размерам на порядок (10 и 100 мкм). В токсикологических условиях равновесие достигается в первом случае за 30–40 мин, во втором за ~6 ч. Концентрацию связанного белка определяли спектрофотометрически по разности между исходной и равновесной концентрациями в растворе после отделения твердой фазы.

Оба компонента во взаимодействующей системе белок – СПЭ полифункциональны, и их структурные особенности должны проявляться в характере связывания. При сопоставлении данных, полученных методами поляризованной люминесценции и потенциометрического титрования, было показано, что процесс ионизации сетчатых полиэлектролитов ПМАКС и микрогранульных образцов ПМАКС протекает по-разному [4, 5]. В ходе ионизации ПМАКС фрагменты цепей между химическими узлами претерпевают конформационные изменения, связанные с разрушением вторичной структуры. При низких степенях ионизации до

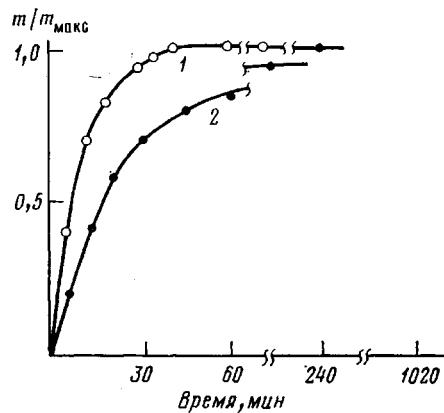


Рис. 1

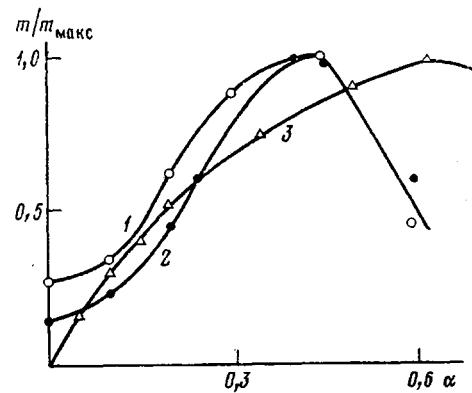


Рис. 2

Рис. 1. Характер изменения относительного количества связанного белка $m/m_{\text{макс}}$ во времени в зависимости от размеров частиц СПЭ: 1 - 10, 2 - 100 мкм

Рис. 2. Зависимость относительного количества связанного белка от степени ионизации СПЭ: 1 - альбумин - ПМАКС, 2 - гемоглобин - ПМАКС, 3 - гемоглобин - микрограммовый образец ПМАКС

Рис. 3. Влияние исходного соотношения компонентов на связывание гемоглобина с неионизованными формами ПМАКС (1) и микрограммового образца ПМАКС (2)

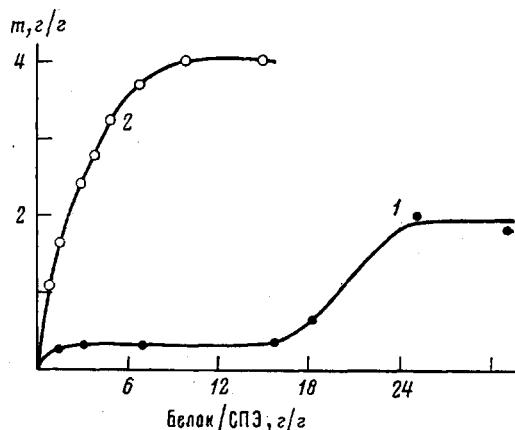


Рис. 3

$\alpha=0,15$ в ПМАКС образуются структурированные участки, стабилизованные гидрофобным взаимодействием метильных групп ПМАК и водородными связями между неионизованными карбоксильными группами. При $\alpha>0,15$, когда энергия электростатического отталкивания ионизированных групп становится соизмеримой с энергией гидрофобного взаимодействия, происходит кооперативное разрушение вторичной структуры, сопровождающееся возрастанием подвижности полимерных цепей сетки. При $\alpha=0,4$ подвижность полимерных цепей достигает максимального значения, при этом происходит максимальное набухание сетки ПМАКС. В силу специфических условий формирования сетчатой структуры в микрограммовых образцах ПМАКС конформационный переход оказывается сдвинутым в область более высоких степеней ионизации $\alpha\sim 0,6-0,7$. Дополнительная стабилизация внутренней структуры линейных фрагментов цепей ПМАКС может возникать за счет повышенной локальной плотности полиэлектролитных цепей и спивок на поверхности микрограммов. Особо следует учесть, что в тонкодисперсных микрограммовых образцах структура поверхности имеет доминирующую значение по сравнению с объемом.

Ранее было обнаружено влияние степени ионизации СПЭ на взаимодействие с белками и показано, что связывание белков в зависимости от pH раствора имеет экстремальную зависимость [6]. Интересно проследить за влиянием на взаимодействие белков с СПЭ конформационных изменений в полимерных цепях. На рис. 2 представлены зависимости от-

носительного количества связанных белка (гемоглобина и сывороточного альбумина) от степени ионизации ПМАКС и микрогранулярных образцов ПМАКС.

Связывание белков с ПМАКС носит кооперативный характер в области степеней ионизации СПЭ 0,2–0,4. Это диапазон, в котором разрушается вторичная структура цепей ПМАК, что приводит к увеличению проницаемости сетки и доступности для макромолекул белка новых функционально активных центров СПЭ. В случае микрогранулярных образцов ПМАКС заполнение белком постепенно возрастает, достигая максимального значения при $\alpha \sim 0,6$, когда происходит разрушение внутренней

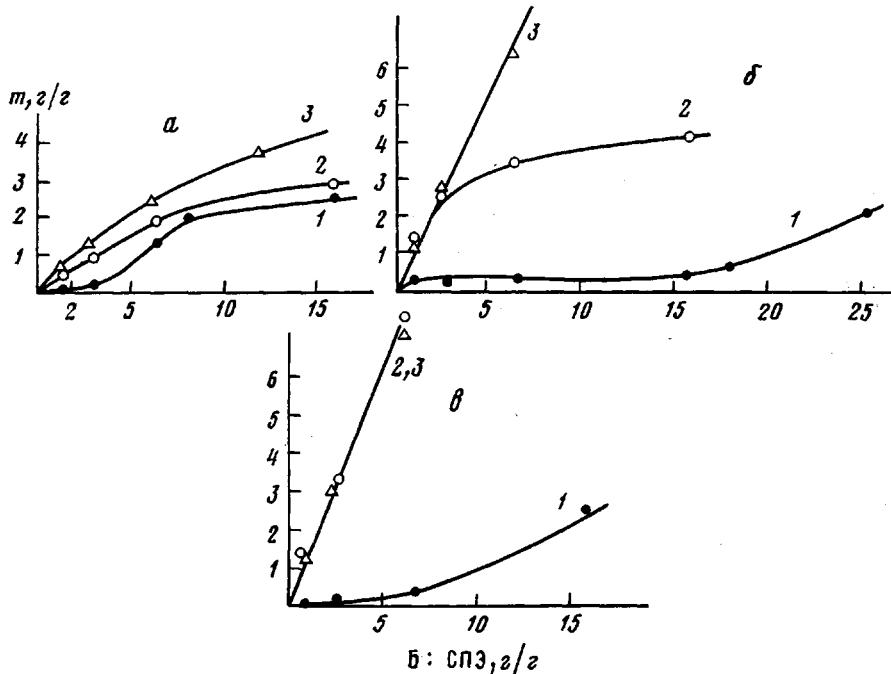


Рис. 4. Влияние исходного соотношения компонентов на связывание альбумина (а), гемоглобина (б) и лизоцима (в) суспензией ПМАКС при степенях ионизации $\alpha=0$ (1), 0,13 (2), 0,4 (3)

структуре локальных плотных областей. В обоих случаях связывание белка меняется симбатно структурным изменениям, происходящим при ионизации СПЭ. Следовательно, конформационное состояние цепей СПЭ определяет сорбционное поведение белков. На рис. 3 представлены данные по связыванию гемоглобина неионизованными формами ПМАКС и микрогранулярного образца ПМАКС.

Взаимодействие гемоглобина с микрогранулярными образцами ПМАКС описывается обычной зависимостью типа изотермы Лэнгмюра; в случае взаимодействия с ПМАКС проявляется кооперативный характер. Особенности связывания белков с неионизованной формой ПМАКС, когда цепи ПМАК образуют вторичную структуру, могут определяться малым количеством центров взаимодействия на поверхности и недоступностью для макромолекул белка внутреннего объема частиц. Кооперативное взаимодействие белковых глобул с ПМАКС обеспечивается, вероятно, электростатическим полем, создаваемым уже первыми сорбированными макромолекулами, связанными с матрицей за счет водородных связей с неионизованными карбоксильными группами или гидрофобного взаимодействия. Увеличение степени ионизации ПМАКС приводит к обычному типу изотермы Лэнгмюра для системы белок – ПМАКС.

Влияние соотношения компонентов белок : СПЭ на количество связанного с ПМАКС белка при вариации степени ионизации СПЭ показано на рис. 4 на примере связывания трех белков. Независимо от величины изоэлектрической точки белка во всех случаях при $\alpha=0$ связывание молекул белка имеет кооперативный характер. Увеличение степени ионизации СПЭ приводит к возрастанию количества связанного белка, причем на характере изменений сказывается электрохимическое состояние белка (pI). Различия во взаимодействии белков с неионизированной и ионизованными формами ПМАКС проявляются также в изменении термодинамических функций [7].

Таким образом, исследование взаимодействия сетчатых полиэлектролитов ПМАКС и микрогранульных образцов ПМАКС, полученных в условиях различного формирования сетчатых структур, с белками (альбумином, гемоглобином, лизоцимом) показало, что характер связывания белков с СПЭ при различных степенях ионизации повторяет особенности поведения при ионизации полимерных цепей в сетчатой структуре.

Выражаем искреннюю признательность К. П. Папуковой, К. М. Рожецкой и Т. Д. Муравьевой за предоставление образцов сетчатых полиэлектролитов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Самсонов Г. В. Высокомолек. соед. А, 1979, т. 21, № 4, с. 723.
2. Камышный А. Л. Ж. физ. химии, 1981, т. 55, № 3, с. 562.
3. Чернова И. А., Погодина Т. Е., Шатаева Л. К., Самсонов Г. В. Высокомолек. соед. А, 1980, т. 22, № 11, с. 2403.
4. Кузнецова Н. П., Мишаева Р. Н., Гудкин Л. Р., Кузнецова Н. Н., Муравьева Т. Д., Папукова К. П., Рожецкая К. М., Самсонов Г. В. Высокомолек. соед. А, 1978, т. 20, № 3, с. 629.
5. Ануфриева Е. В., Паутов В. Д., Кузнецова Н. П., Мишаева Р. Н. Высокомолек. соед. Б, 1981, т. 23, № 7, с. 557.
6. Шатаева Л. К., Кузнецова Н. Н., Елькин Г. Э. Карбоксильные катиониты в биологии / Под ред. Самсонова Г. В. Л.: Наука, 1979, с. 93, 213.
7. Samsonov G. V., Ponomareva R. B., Melenevsky A. T. Pure Appl. Chem., 1979, v. 51, № 7, p. 1409.

Институт высокомолекулярных
соединений АН СССР

Поступила в редакцию
24.VIII.1982

УДК 541.64 : 536.6

О ХАРАКТЕРЕ ТЕПЛОВЫХ ДЕФЕКТОВ В ПОЛИТЕТРАФТОРЭТИЛЕНЕ

Тараканов Б. М.

Молекулярная и кристаллическая структура ПТФЭ достаточно подробно изучена [1-4], при этом обнаружены переходы при 292 и 303 К, сопровождающиеся возникновением динамического беспорядка или «ротационно-кристаллического» состояния [5]. Вопрос же о структурных преобразованиях, связанных с повышенной подвижностью макромолекул, изучен недостаточно [6]. Это объясняется, по-видимому, тем, что в ПТФЭ не удается обнаружить большепериодную структуру [7] и, следовательно, получить дополнительную информацию о строении полимера. Вместе с тем изучение влияния температуры на изменение структуры имеет важное значение, поскольку ПТФЭ является термостойким полимером и используется при повышенных температурах.

Цель настоящей работы — исследование характера динамического беспорядка и выявление закономерностей перестройки надмолекулярной структуры ПТФЭ выше температуры перехода.