

УДК 541.64:547.97:539.199

**ВЛИЯНИЕ РАЗНОЗВЕННОСТИ И СОСТАВА НА УПАКОВКУ
БЕЛКОВЫХ МАКРОМОЛЕКУЛ В СТЕКЛООБРАЗНОМ СОСТОЯНИИ**

*Аскадский А. А., Казанцева В. В., Бикбов Т. М.,
Слонимский Г. Л., Коршак В. В.*

Определены коэффициенты молекулярной упаковки ряда денатурированных белков в стеклообразном состоянии. Найдено, что даже для таких разнозвенных полимеров, как белки, коэффициент молекулярной упаковки составляет ту же величину, что и для всех других аморфных стеклообразных полимеров.

В последнее время большое внимание уделяется разнозвенности полимеров и ее влиянию на их свойства [1]. При этом разнозвенность подразделяется на искусственную и естественную [2]. Искусственная разнозвенность возникает при сополимеризации двух или более мономеров и может регулироваться изменением состава, условий синтеза и т. д. Естественная разнозвенность появляется в ходе полимеризации или поликонденсации гомополимеров в результате образования аномальных звеньев (аномальные звенья могут образоваться и при сополимеризации).

Влияние искусственно созданной разнозвенности на свойства полимеров детально изучено во многих работах; количественная интерпретация такого влияния на термические характеристики полимеров дана в работе [2]. В этом отношении влияние естественной разнозвенности изучено менее детально.

Одним из наиболее разнозвенных полимеров, в которых разнозвенность образуется естественным путем, является белок, содержащий большое количество остатков различных аминокислот.

Подходя к белкам с точки зрения их строения, можно сказать, что макромолекула белка построена из разнородных звеньев, количество типов которых достигает ~20. В связи с этим представляет большой интерес исследовать влияние столь значительной разнозвенности на свойства указанных систем, применяя к ним подходы, хорошо развитые для других полимеров.

В данной работе будет рассмотрен вопрос, связанный с плотностью упаковки белковых макромолекул в монолитных образцах ряда белков, полученных горячим прессованием под давлением. Задача работы — полная денатурация белка при максимальном сохранении химического строения и анализ коэффициента молекулярной упаковки белковых макромолекул в стеклообразном состоянии.

В работе использовали препараты белков: яичный альбумин лиофилизованный, марки А, пятикратной перекристаллизации (Олайнинский завод, хим. реактивов, СССР), а также яичный альбумин кристаллический (РОСН, ПНР), сывороточный альбумин человека (Ренал, Венгрия), лизоцим трехкратной кристаллизации лиофилизованный (Олайнинский завод хим. реактивов, СССР), глицинин, любезно предоставленный проф. Вайнтраубом, выделенный по методике Тханя и Шибасаки [3] с последующей хроматографией на гидроксилиаппатите, и др.

Для удаления солей трижды проводили диализ 5%-ного раствора белка против дистиллированной воды при соотношении раствор белка : вода = 1 : 100 в течение 1 сут. Качество диализа контролировали по содержанию соли методом рентгеноструктурного анализа. Для этого были определены дифрактограммы исходных и прессованных образцов лизоцима (рис. 1). Обращают на себя внимание два факта: во-первых, для неочищенного образца на дифрактограмме отчетливо видны пики,

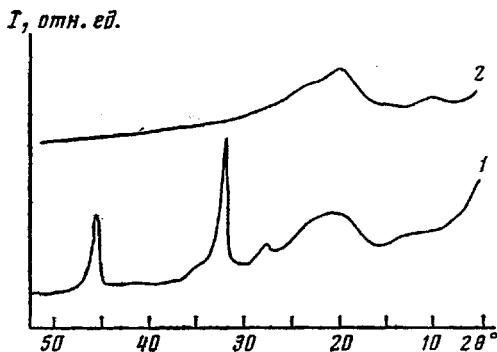


Рис. 1. Кривые интенсивности по данным широкогоуглового рентгеновского рассеяния для образца лизоцима до (1) и после диализа (2)

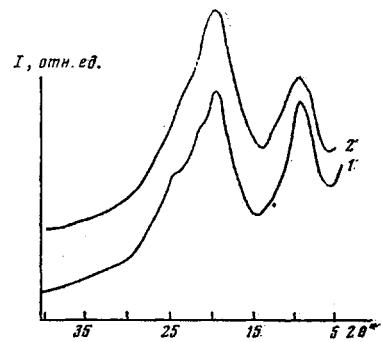


Рис. 2. Кривые интенсивности для кристаллического РОСН (1) и лиофилизированного марки А (2)

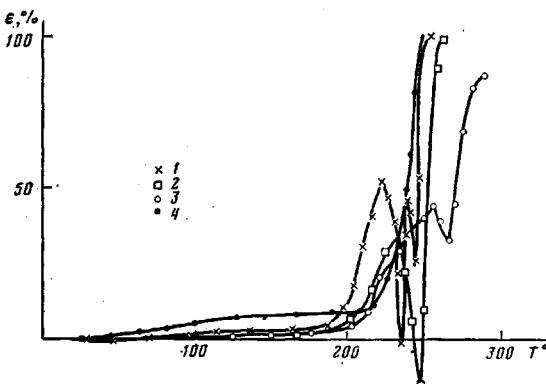


Рис. 3. Термомеханические кривые для лизоцима (1), альбумина кристаллического РОСН (2), лизоцима трехкратной кристаллизации (3) и сывороточного альбумина человека (4)

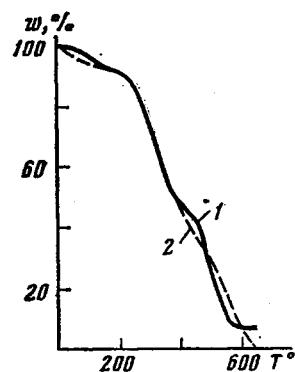


Рис. 4. Термогравиметрические кривые для альбумина кристаллического РОСН (1) и лиофилизированного марки А (2)

связанные с присутствием в образце NaCl ; в диализованном образце такие пики отсутствуют; во-вторых, дифрактограммы прессованных денатурированных образцов свидетельствуют о том, что эти образцы являются полностью аморфными. По внешнему виду они представляют собой прозрачные образцы желто-коричневого цвета, что связано с окислительными процессами, происходящими при прессовании. Вопрос о глубине этих процессов будет обсужден ниже. Аналогичный результат получается при прессовании порошкообразных образцов других препаратов. На рис. 2 показаны кривые интенсивности рассеяния для двух препаратов альбумина (лиофилизированного марки А и альбумина кристаллического РОСН). После прессования оба препарата имеют примерно одинаковые кривые интенсивности, свидетельствующие об аморфной структуре монолитных образцов. На кривых наблюдаются два максимума, свидетельствующие о двух характерных расстояниях между цепями белковых молекул в стеклообразном состоянии.

Для определения температуры размягчения белков, при которой можно осуществлять их прессование, были определены термомеханические кривые (зависимости деформации от температуры при действии постоянной силы) для исходных порошкообразных образцов. Измерения проводили по методу пенетрации пуансона диаметром 4 мм при нагрузке 100 г и скорости подъема температуры 1.5 град/мин. Термомеханические кривые изученных белков представлены на рис. 3. Деформация (текучесть образца) резко увеличивается при температуре выше 200° для всех исследуемых систем; при этом на высокотемпературной ветви термомеханических кривых наблюдаются максимумы и минимумы, связанные с размягчением, деструкцией и вслучиванием образцов. Для доказательства возникновения деструкции нами были определены термогравиметрические кривые тех же образцов. Они представлены на рис. 4. Опыты проводились на установке МОМ (Венгрия) при скорости нагревания 5 град/мин. Интенсивная термодеструкция образцов начинается при температуре выше 200° . Небольшая потеря веса до 200° обусловлена удалением адсорбированной воды. Прессование всех белков осуществляли при $180-200^\circ$, т. е. ниже температуры начала интенсивной деструкции. Следовательно, можно ожидать,

Таблица 1

Ван-дер-ваальсовы объемы ряда атомов

АТОМ	$\Delta V_i, \text{ \AA}^3$	АТОМ	$\Delta V_i, \text{ \AA}^3$
	2,4		10,6
	10,6		4,9
	14,7		

что химическое строение белка в используемых условиях практически сохраняется. Для проверки этого был проведен элементный анализ большинства препаратов, который показал, что элементный состав исходных порошкообразных и прессованных образцов практически совпадает, если учесть, что исходные порошкообразные препараты содержат небольшое количество связанной воды. Поэтому экспериментальные данные необходимо пересчитывать на массу сухого белка. Следовательно, нагревание до 180–200° не приводит к изменению состава белка.

Перейдем теперь к анализу плотности упаковки макромолекул белков в аморфном стеклообразном состоянии. Плотность упаковки определяется коэффициентом молекулярной упаковки (долей занятого объема), который определяется по формуле

$$K = \frac{N_A \sum_i \Delta V_i}{M/d},$$

где d – плотность образца, M – значения ММ, N_A – число Авогадро, $\sum_i \Delta V_i$ – ван-дер-ваальсовый объем цепи, складывающийся из суммы ван-дер-ваальсовых объемов ΔV_i , характерных для каждого атома. Плотность образца определяли в смеси толуола с четыреххлористым углеродом титрованием этой смеси одним из указанных растворителей до тех пор, пока плотность смеси растворителей не станет равной плотности образца. После этого измеряли плотность смеси с помощью денсиметра с точностью $\pm 0,001$ г/см³. ММ рассчитывали по составу белка, а ван-дер-ваальсовый объем – исходя из табличных значений инкрементов ван-дер-ваальсовых объемов, приведенных в работах [4, 5]. Недостающие значения ΔV_i были определены, исходя из ван-дер-ваальсовых радиусов атомов и длин связи между ними, согласно работе [6] (табл. 1).

Исходные данные для расчета коэффициента молекулярной упаковки белков представлены в табл. 2. В этой таблице приведены ван-дер-ваальсовые объемы остатков всех аминокислот, входящих в белки (а не самих аминокислот), а также количество этих остатков в каждом из исследованных белков. На основании указанных данных были рассчитаны суммарные ван-дер-ваальсовые объемы белковых цепей и их ММ. Результаты экспериментов и расчетов представлены в табл. 3, из которой видно, что полученные значения коэффициентов молекулярной упаковки лежат в пределах 0,68–0,69, что соответствует среднему значению коэффициента молекулярной упаковки всех полимерных стекол различного химического строения. Следовательно, появление естественной разнозвенности, как оказалось, не приводит к изменению плотности упаковки макромолекул

Таблица 2

Исходные данные для расчета ван-дер-ваальсовых объемов ряда белков

Аминокислота	Структурная формула	$\sum_i \Delta V_i, \text{ Å}^3$	Количество остатков в белках					
			лизоцим	яичный альбумин	термолизин	рибонуклеаза	альбумин из сыворотки человека	глицинин
Аланин	CH ₃ CH(NH ₂)COOH	64,35	12	34	28	12	—	169
Аргинин	HN=C\NH(CH ₂) ₅ CH-COOH NH ₂ NH ₂	147,35	11	19	10	4	24,3	162
Аспаргин	NH ₂ COCH ₂ CH(NH ₂)COOH	94,8	13	—	18	10	—	381
Аспарагиновая кислота	HOOCCH ₂ CH(NH ₂)COOH	90,4	8	31	26	5	53,9	—
Цистеин	HSCH ₂ CH(NH ₂)COOH	82,25	8	3	—	8	3,99	—
Глутамин	NH ₂ CO(CH ₂) ₂ CH(NH ₂)COOH	111,9	3	—	14	6	—	603
Глутаминовая кислота	HOOC(CH ₂) ₂ CH(NH ₂)COOH	107,5	2	50	7	6	81,6	—
Глицин	NH ₂ CH ₂ COOH	47,35	12	18	36	3	14,7	230
Гистидин	C ₃ H ₃ N ₂ CH ₂ CH(NH ₂)COOH	119,25	1	8	8	4	15,6	60
Изолейцин	C ₂ H ₅ CH(CH ₃)CH(NH ₂)COOH	115,65	6	24	18	3	8,95	161
Лейцин	(CH ₃) ₂ CHCH ₂ CH(NH ₂)COOH	115,65	8	32	16	2	62,66	200
Лизин	NH ₂ CH ₂ (CH ₂) ₅ CH(NH ₂)COOH	127,55	6	20	11	10	58	119
Метионин	CH ₃ S(CH ₂) ₂ CH(NH ₂)COOH	117,55	2	15	2	4	5,93	34
Фенилаланин	C ₆ H ₄ CH ₂ CH(NH ₂)COOH	139,95	3	20	10	3	32,6	121
Пролин	C ₄ H ₈ NCOOH	88,27	2	16	8	4	30,6	181
Серин	CH ₂ OHCH(NH ₂)COOH	71,75	10	36	26	15	24,3	268
Треонин	CH ₃ CHOHCH(NH ₂)COOH	88,85	7	15	25	10	29	160
Триптофан	C ₈ H ₉ NCH ₂ CH(NH ₂)COOH	124,4	6	3	3	—	0,64	26
Тирозин	HOCH ₂ CH ₂ CH(NH ₂)COOH	129,7	3	9	28	6	17,7	85
Валин	(CH ₃) ₂ CHCH(NH ₂)COOH	98,55	6	30	9	22	45,4	156
Цистин/2	-SCH ₂ CH(NH ₂)COOH	77,25	—	—	—	—	32,1	48
Аминогруппа	-NH ₂	16,4	—	—	—	—	43,5	—

Таблица 3.

**Исходные данные и коэффициенты молекулярной упаковки ряда белков
в стеклообразном состоянии**

Белок	d , г/см ³	$\sum_i \Delta V_i$, Å ³	M	K
Альбумин яичный марки А	1,26	38632,72	42794	0,685
Альбумин марки РОСН	1,27	38632,72	42794	0,690
Лизоцим	1,31	12523,74	14277	0,692
Альбумин из сыворотки человека	1,27	58105,65	64427,6	0,690
Глицинин	1,314	317007,17	353428	0,710

в аморфном стеклообразном состоянии. Это соответствует принципу наибольшей упаковки молекулы, развитому в работе [6].

Таким образом, белки при их денатурации и переводе в стеклообразное состояние ведут себя аналогично обычным синтетическим полимерам в том смысле, что при формировании из них твердого тела плотность упаковки макромолекул такая же, как у всех других аморфных полимеров, и практически не зависит от химического строения белка. Это позволяет рассчитывать плотность сухого аморфного белка по формуле

$$d = \frac{K_{cp} M}{N_A \sum_i \Delta N_i},$$

где $K_{cp}=0,685$.

Полученные результаты позволяют также проводить структурный анализ белков в кристаллическом состоянии при наличии связанной воды.

ЛИТЕРАТУРА

1. Коршак В. В. Разновидность полимеров. М.: Наука, 1977. 301 с.
2. Коршак В. В., Аскадский А. А., Слонимский Г. Л., Сосин С. Л., Захаркин Л. И., Ковредов А. И., Бычко К. А., Антилова Б. А., Шаугумбекова Ж. С. Высокомолек. соед. А., 1981, т. 23, № 9, с. 2051.
3. Hin. Thanh V., Shilasaki K. J. Agr. Food. Chem., 1976, v. 24, № 6, p. 1117.
4. Слонимский Г. Л., Аскадский А. А., Китайгородский А. И. Высокомолек. соед. А., 1970, т. 11, № 3, с. 494.
5. Аскадский А. А. Структура и свойства теплостойких полимеров. М.: Химия, 1981. 320 с.
6. Китайгородский А. И. Органическая кристаллохимия. М.: Изд-во АН СССР, 1955. 558 с.

Институт элементоорганических соединений
им. А. Н. Несмеянова АН СССР

Поступила в редакцию
29.XII.1982

INFLUENCE OF REPEAT-UNIT HETEROGENEITY AND COMPOSITION ON PACKING OF PROTEIN MACROMOLECULES IN GLASSY STATE

*Askadskii A. A., Kazantseva V. V., Bikbov T. M.,
Slonimskii G. L., Korshak V. V.*

Summary

The coefficients of molecular packing of some denatured proteins in glassy state have been determined. Even for such repeat-unit heterogeneous polymers the coefficient of molecular packing was found to have the same value as for all other amorphous glassy polymers.