

УДК 541.64:532.72

ПРОНИЦАЕМОСТЬ РАЗБАВЛЕННЫХ ПОЛИАКРИЛАМИДНЫХ ГИДРОГЕЛЕЙ¹

© 1996 г. Е. Е. Протозанова*, Г. Н. Архипович**, М. А. Лившиц***, К. С. Казанский**

* Университет Торонто,
M5S 1A8 Торонто, Канада

** Институт химической физики им. Н.Н. Семенова Российской академии наук
117977 Москва, ул. Косягина, 4

*** Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук
117984 Москва, ул. Вавилова, 32

Поступила в редакцию 27.12.94 г.

Проницаемость разбавленных (содержащих от 1 до 4 мас. % полимера) гомогенных полиакриламидных гидрогелей по отношению к глобулярным белкам, микросферам поликремневой кислоты и ре-стректам двухцепочечной ДНК исследована соответственно методами диффузии, квазиупругого рассеяния лазерного света и электрофореза. На основании анализа подвижности частиц пенетрантов во всех трех случаях сделаны оценки размеров пор в гидрогелях. Показано, что диффузионная подвижность компактных частиц в гидрогелях указанных концентраций в большей мере определяется характерным размером флуктуационной сетки зацеплений, чем размером ячеек химической сетки, который задан долей разветвителя при синтезе. Обнаружено значительное расхождение в размерах ячеек сетки, оцененных из данных по электрофорезу ДНК (860 - 1120 Å) и диффузии белков (80 - 180 Å), причины которого обсуждаются.

ВВЕДЕНИЕ

Проницаемость растворов полимеров и набухших полимерных сеток давно привлекает к себе интерес как свойство, тесно связанное, с одной стороны, со структурой указанных систем, с другой – с их применением в электрофорезе, хроматографии, мембранным разделении и т.п. В наибольшей степени этот интерес коснулся гидрогелей – набухающих в воде сетчатых полимеров, поскольку они составляют материальную основу упомянутых выше методов разделения.

Подвижность частиц диффундирующего через гидрогель вещества определяется формой и размером этих частиц, а также сопротивлением сетки макромолекул, имеющей характерный размер ξ . Результатом такого сопротивления является торможение частиц, регистрируемое тем или иным экспериментальным методом. Если в качестве меры подвижности частицы радиуса R принят коэффициент диффузии D , то фундаментальное соотношение для торможения имеет вид [1]

$$D/D_0 = \exp[-(R/\xi)^{\delta}], \quad (1)$$

где D_0 относится к растворителю, а параметр δ определяется свойствами системы. Как в работе [1], далее в тексте ξ используется для обозначения диаметра ячейки или поры.

В концентрированных растворах и гелях как правило сопротивление обусловлено физической сеткой зацеплений, характерный размер которой $\xi_c \sim \phi^{-3/4}$ [2], где ϕ – объемная доля полимера в системе. Если, однако, гель достаточно разбавлен, а размеры частиц и сила, вынуждающая их к движению, велики, то лимитирующим фактором в сопротивлении может стать химическая сетка, размер ячеек ξ_c которой связан с длиной цепи между сшивками. Таким образом, изучение движения частиц в геле оказывается весьма удобным и тонким подходом к анализу его реальной структуры, возникающей в процессе синтеза. Именно этот аспект в значительной мере стимулировал данную работу.

Полиакриламидные (ПАА) гидрогели, получаемые радикальной полимеризацией акриламида с N,N'-метиленбисакриламидом (МБАА) в качестве разветвителя, наиболее детально исследованы в этом отношении. В зависимости от полной концентрации мономеров T и доли МБАА C они могут быть гетерогенными (при $C > 5$ мас. %) или гомогенными [3]. В гидрогелях первого типа размер пор, определяемый из электрофоретической подвижности белков, вопреки ожиданиям, растет с увеличением доли МБАА, достигая 600 Å [4, 5], что обусловлено фазовым разделением и образованием макропористой структуры [6]. В гомогенных ПАА-гидрогелях, напротив, наблюдается естественная тенденция к росту экспериментально определяемого размера пор с уменьшением как T ,

¹ Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (код проекта 94-03-09752).

так и С [4]. Можно предположить, что в этой области поры, ответственные за проницаемость, представляют собой ячейки химической сетки, средний размер которых, оцениваемый из объема единичного узла сетки, $\xi_c \sim (CT)^{-1/3} \sim \phi^{-1/3}$ [7, 8]. Разбавленные однородные ПАА-гидрогели в отличие от гетерогенных изучены весьма слабо.

Настоящая работа посвящена исследованию подвижности некоторых типичных тестовых частиц (рестриктов двухцепочечной ДНК, глобулярных белков, микросфер) в разбавленных ПАА-гелях. Основная цель работы – оценка характерных размеров ячеек сетки в гидрогелях и их сопоставление с величинами ξ_c .

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Исходные вещества

Для получения гидрогелей использовали акриламид фирмы LKB как правило без дополнительной очистки; содержание акриловой кислоты в нем по данным потенциометрического титрования не превышало 0.8 мол. %. При необходимости акриламид очищали возгонкой в вакууме. Остальные реагенты – МБАА, N,N,N',N'-тетраметилэтилендиамин (оба фирмы "Reanal"), персульфаты аммония и натрия, тиосульфат натрия имели квалификацию х. ч. или были очищены перекристаллизацией.

В качестве тест-объектов использовали стандартные рестрикты двухцепочечной ДНК ($\lambda^{R/H}$ и λ -“лестница”), применяемые для калибровки электрофоретических гелей, глобулярные белки – бычий сывороточный альбумин (БСА) и трипсин (оба фирмы "Sigma"), а также микросфера подиремневой кислоты.

Получение гидрогелей

Гидрогели с $T \geq 2$ мас. % получали радикальной сополимеризацией акриламида и МБАА под действием инициирующей системы персульфат аммония–тетраметилэтилендиамин (2 г/л и 2 мл/л соответственно). Воду, используемую в синтезах, вакуумировали при интенсивном перемешивании и насыщали аргоном. Реакционные системы готовили в атмосфере аргона, полимеризацию проводили при 25 - 30°C в течение 18 - 24 ч. В большинстве экспериментов величины С составляли 1.4 - 2 мас. %, что в соответствии с T -С-диаграммой [3] обеспечивало гомогенность гелей.

Более разбавленные гидрогели приготавливали либо набуханием гелей с $T \geq 2$ мас. % после синтеза, либо путем γ -облучения водных растворов предварительно синтезированного линейного полимера. Облучение проводили на установке ГУРХ-100000 (^{60}Co) при мощности дозы 3.9 - 5.2 рад/с до величины дозы 0.9 - 1.25 Мрад.

что позволяло получать гели с концентрацией 1% и выше.

Электрофорез

Для получения гидрогелей с $T = 2.4 - 4.0$ мас. % и $C = 1.4 - 2.7$ мас. % полимеризацию акриламида проводили прямо в кварцевых трубках для электрофореза (диаметр 7 - 8 мм, длина 100 - 130 мм) в трисборатном буфере (рН 7.4); более разбавленные гели получали γ -облучением в тех же трубках. Перед опытами по электрофорезу трубы с гидрогелями выдерживали в течение нескольких дней в буферном растворе для удаления низкомолекулярных примесей. Во избежание выпадения столбиков геля трубы перед синтезом обрабатывали средством "Bind-Silane" (LKB).

Электрофоретическую подвижность рестриктов ДНК измеряли на установке для вертикального электрофореза в трубках (фирма "Reanal") при напряженности поля 10 В/см и силе тока 2 мА на трубку; верхний и нижний приэлектродные сосуды были заполнены буфером.

После установки трубок и префореза в течение 30 мин в трубы вводили по 5 - 8 мкл пробы в буфере с добавкой глицерина (1 : 1), а также 0.02% бромфенолового синего в качестве маркера фронта. Для визуализации электрофоретической картины использовали бромистый этидий – краситель с флуоресценцией при 590 нм, связывающийся с ДНК; его вводили в количестве 50 мкл/л в нижний сосуд.

Систему полос рестриктов ДНК наблюдали при облучении трубок УФ-светом ртутной лампы ДРК-120 с фильтром УФС-6/3; положение полос регистрировали визуально с помощью компаратора ИЗА-2 с точностью 0.05 мм. Абсолютную электрофоретическую подвижность m рестриктов рассчитывали по формуле

$$m = l/tE, \quad (2)$$

где l – расстояние, проходимое рестриктом от старта за время t при напряженности поля E .

В основном используемом наборе рестриктов ДНК фага λ ($\lambda^{R/H}$) длины цепи лежали в интервале от 590 до 2×10^4 пар оснований, что отвечало ММ от 3.9×10^5 до 1.3×10^8 (около 660 на одну пару оснований). Рестрикты ДНК λ -“лестница” ($M > 5 \times 10^8$) в условиях опытов практически не разделялись. Идентификацию полос производили путем сопоставления с эталонной электрофорограммой образца в калиброванном агарозном геле.

Диффузия

Гидрогели получали полимеризацией в воде при T и $C = 2$ мас. %, а затем выдерживали в течение нескольких дней в 0.1 Н растворе NaCl, содержит-

жащем 0.02% азота натрия как консерванта. При этом образцы набухали в 1.5 - 2.5 раза, и их конечная концентрация, определяемая по весу, составляла 1.5 - 3.7 мас. %.

В качестве тестовых частиц использовали БСА и трипсин с $M = 66 \times 10^3$ и 25×10^3 ; согласно работе [9] их гидродинамические радиусы составляют соответственно 36.5 и 22.6 Å.

Диффузию белков исследовали по снижению их концентрации в растворе, находящемся в контакте с гидрогелем. Прямоугольный образец геля с известным объемом помещали в нижнюю часть стандартной прямоугольной спектрофотометрической кюветы таким образом, что при набухании он плотно прилегал к стенкам кюветы. В пространство над образцом заливали определенный объем раствора белка в 0.1 N NaCl с добавкой азота натрия, кювету закрывали крышкой, обеспечивающей полную герметичность.

Концентрации белков регистрировали по оптической плотности при 280 нм на приборе "Specord UV-VIS" ("Carl Zeiss"). Коэффициенты поглощения белков, найденные из калибровки, практически совпадали с имеющимися в литературе. Начальные концентрации белков в опытах не превышали 1.5 и 0.7 мг/мл для БСА и трипсина соответственно. Измерения проводили 1 - 2 раза в сутки.

Для расчетов D использовали уравнение фронтальной диффузии [10], записанное для больших времен диффузии и близких объемов образца и раствора

$$\frac{c}{c_\infty} = 1 - A \exp(-BDt/l^2), \quad (3)$$

где c и c_∞ — текущая и конечная концентрации белка в растворе над гелем, t — время, l — толщина слоя гидрогеля, $A = 0.67$ и $B = 4.12$ — коэффициенты, определяемые по таблицам [10] из условий измерения. Типичные анаморфозы кинетических кривых убыли белков при их диффузии из раствора в гель показаны на рис. 1. Точность расчета величин D в значительной мере определяется погрешностью в определении c_∞ и составляет 10 - 15%.

Квазиупругое рассеяние лазерного света

Гидрогели, содержащие микросферы поликремневой кислоты диаметром около 300 Å, готовили путем полимеризации непосредственно в кюветах для измерений светорассеяния. Для обеспечения стабильности дисперсии микросфер и отсутствия рассеивающих примесей использовали инициирующую систему персульфат калия-тиосульфат натрия (3.9 и 2.5 г/л соответственно) в среде 0.1 N NaCl, раствор нейтрализовали до pH 6.0 - 7.5 и фильтровали через Millipore 0.45 мкм после введения микросфер.

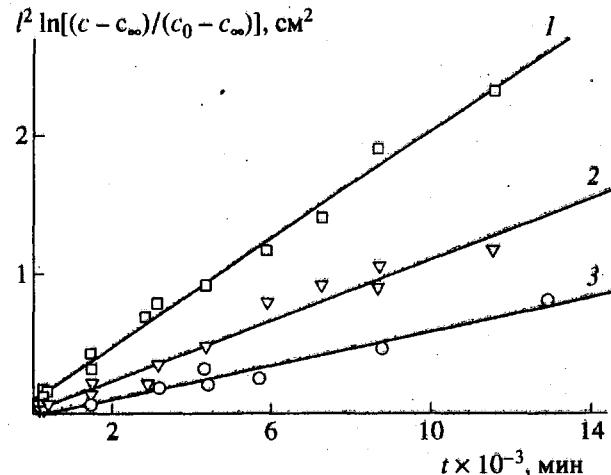


Рис. 1. Анаморфозы кинетических кривых уменьшения концентрации трипсина (1) и БСА (2, 3) в растворе в ходе диффузии белка внутрь геля. $T = 1.5$ (1, 2) и 3.7 мас. % (3); $C = 2$ мас. %.

Измерения рассеяния проводили на гониометре фирмы ALV (Австрия), снабженном Не-Не-лазером с длиной волны 630 нм. Автокорреляционные функции интенсивности света, рассеянного под углом 90°, получали с помощью коррелометра "Model 1096" (США). Эти функции, которые не были строго экспоненциальны, анализировали по методу кумулянтов как суперпозицию экспонента, что дает z -средний коэффициент диффузии и ширину распределения [11]. В расчетах использовали стандартные программы, входящие в математическое обеспечение прибора.

Все рассматриваемые в работе линейные зависимости обрабатывали по методу наименьших квадратов.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Диффузия

Интерпретация экспериментальных данных по убыли белка из раствора в соответствии с уравнением (3) позволяла получать две характеристики проникновения белка в сетку — динамическую D и статическую (коэффициент распределения γ_p); последний рассчитывали из c_∞ и объемов системы как отношение равновесных концентраций белка в геле и в растворе. Результаты опытов по диффузии приведены в табл. 1.

Коэффициент распределения, отражающий доступность порового пространства гидрогеля для частиц данного размера, как видно, закономерно уменьшается с ростом концентрации геля и при переходе к большему по размеру белку. Величины γ_p для БСА удовлетворительно согласуются с имеющимися в литературе данными [12]. Функция $\gamma_p(\phi)$ для БСА (рис. 2) следует скейлин-

Таблица 1. Характеристики гидрогелей, полученные из данных по диффузии белков

Белок	T, мас. %	γ_p	$D \times 10^7$, см ² /с*	$\xi, \text{ \AA}^{**}$
БСА	1.5	0.74	4.14	188
	1.5	0.70	4.37	218
	2.5	0.49	3.09	107
	3.7	0.30	2.49	81
	1.5	0.93	6.19	177
	1.5	0.88	5.76	138
Трипсин	2.5	0.74	5.03	98

* Величины $D_{0,2}$ согласно работе [9] составляют 6.1×10^{-7} и 8.0×10^{-7} см²/с для БСА и трипсина соответственно.

** Рассчитано по уравнению (1) при $\delta = 1$ как в работе [1].

Таблица 2. Характеристики диффузионной подвижности микросфер поликремневой кислоты в буферном растворе (БР) и в гидрогелях по данным КРЛС

T, мас. %	$D \times 10^7$, см ² /с	R, Å	$\xi, \text{ \AA}^*$
БР	1.53	140	—
БР	1.59	135	—
2.5	0.177	—	130
3.7	0.047	—	76
3.7	0.041	—	73

* Рассчитано по уравнению (1) при $\delta = 1$ и R, равном среднему значению радиуса микросфер в растворе.

говому соотношению для эффекта исключения белков полимерами в растворе

$$-\ln \gamma_p \sim \phi^m \quad (4)$$

Показатель m , согласно теории [13], равен 1.0 и 2.25 соответственно для $R < \xi$ и $R > \xi$. Данные рис. 2 приводят к $m \approx 1.4$, что отвечает промежуточной ситуации ($R \sim \xi$), весьма правдоподобной в данном случае.

Коэффициенты диффузии белков изменяются также вполне закономерно, уменьшаясь с ростом концентрации геля (рис. 3а) и размера диффунди-

рующих частиц (рис. 3б). Вся совокупность данных по торможению белков в гелях, как показывает рис. 4, удовлетворительно следует корреляции

$$-\ln(D/D_0) \sim R\phi \quad (5)$$

На этом основании, принимая во внимание связь между ϕ и ξ , можно оценить характерный размер сетки (табл. 1); на деталях этих оценок мы остановимся ниже.

Данные по диффузии глобулярных белков естественно дополняются результатами для более крупных частиц — микросфер поликремневой кислоты, включенных в гель на стадии синтеза. Коэффициенты диффузии, полученные методом квазиупругого рассеяния лазерного света (КРЛС), и соответствующие оценки характерного размера сетки приведены в табл. 2. Хотя по физическому смыслу метода [10] эти коэффициенты диффузии в большей мере отражают мелкомасштабную подвижность в порах, данные по всем использованным тестовым частицам, как видно из рис. 4, хорошо следуют единой зависимости (5).

Электрофорез

В данном случае пробная частица — двухнитевая ДНК определенной длины — движется в сетчатой структуре геля под действием силы, определяемой произведением напряженности поля на заряд, который в свою очередь пропорционален длине цепи. Наблюдая картину полос рестриктов ДНК различной длины после электрофореза в геле, можно получить сведения о скорости и характере движения рестриктов, а затем, используя физические модели, — и о структуре сетки.

На рис. 5 показаны в полулогарифмических координатах типичные экспериментальные зависимости подвижности рестриктов от ММ для гидрогелей разных рецептур. Как видно, подвижность естественным образом реагирует на изменение плотности сетки, возрастаая с понижением как T, так и C. В области высоких концентраций (3 - 4 мас. %), исследованной ранее, полученные нами данные совпадают с опубликованными [14].

Эмпирические зависимости $m(\lg M)$ широко используются в аналитическом электрофорезе [15]. У изученных в данной работе разбавленных гидрогелей область линейности таких зависимостей заметно расширяется в сторону высоких ММ, например выше 25×10^6 для 1%-ного геля. В сочетании с современной техникой капиллярного или хроматографического электрофореза, где требования к механическим характеристикам гелей понижены, такие гели могут составить конкуренцию используемому в настоящее время более громоздкому варианту пульс-фореза.

Вернемся к рис. 5. Тенденция к запределянию зависимости $m(M)$ при больших M связана,

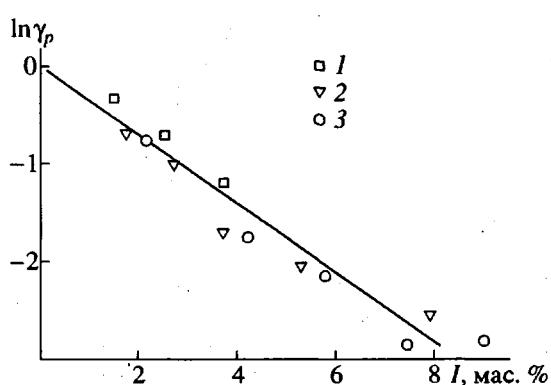


Рис. 2. Зависимость коэффициента распределения БСА от концентрации геля T по данным настоящей работы (1) и работы [12] (2, 3); C = 2.0, (1, 3) и 1.4 мас. % (2).

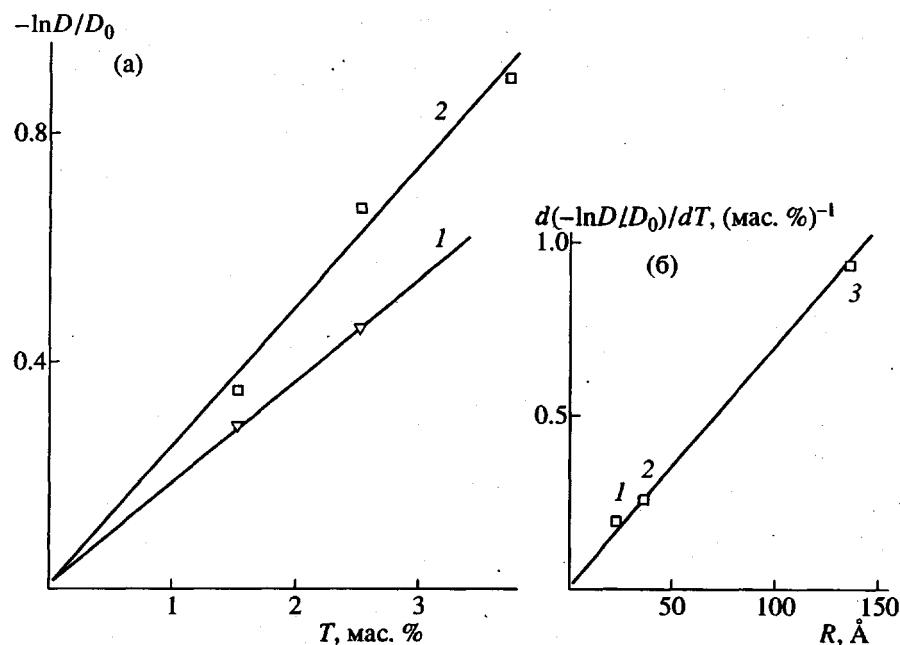


Рис. 3. Зависимость торможения молекул трипсина (1) и БСА (2), а также микросфер (3) от концентрации геля T (а) и размера частиц R (б).

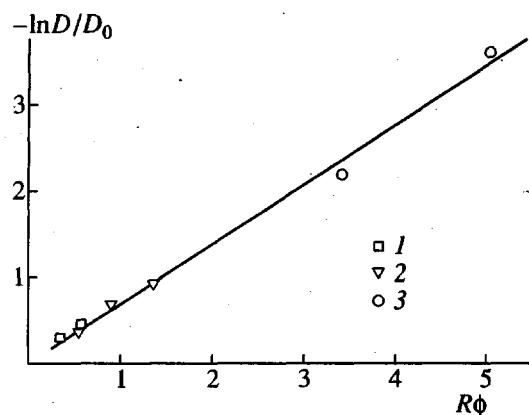


Рис. 4. Корреляция торможения тестовых частиц с их размером и концентрацией геля: 1 – трипсин, 2 – БСА, 3 – микросфера.

как известно [16, 17], с нелинейным по полю эффектом распрямления макромолекул ДНК при рептационном движении в геле. Теоретическое описание рептации ДНК при гель-электрофорезе дано в работе [16]; после некоторых преобразований основное выражение для подвижности принимает вид

$$m = (Q/3\eta)(2p/L + \varepsilon^2/3), \quad (6)$$

где Q , L и p – соответственно полный заряд, длина и персистентная длина цепи ДНК, η – коэффициент, отражающий трение ДНК о субцепи сетки; $\varepsilon = (Q/L)\xi^2/2k_B T$, причем комбинация $(Q/L)\xi$ в этом выражении представляет собой заряд сегмента ДНК, находящегося в пределах одной поры размера ξ .

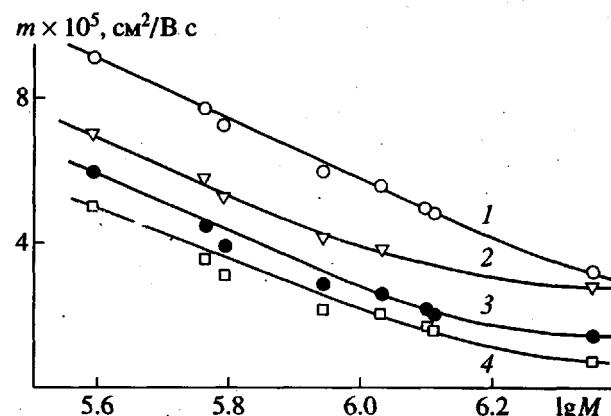


Рис. 5. Электрофоретическая подвижность рестриктов ДНК как функция ММ в гелях с $T = 1.0$ (1), 3.0 (2, 3) и 4.0 мас. % (4); $C = 1.8$ (2) и 2.5 мас. % (3, 4).

В слабых полях или при низких L подвижность молекулы ДНК, не зависящая от напряженности поля и обратно пропорциональная ее длине L , описывается первым слагаемым. Второе слагаемое – поправка, связанная с частичным распрямлением молекулы ДНК в направлении поля, которая квадратична по полю и не зависит от длины, поскольку $Q \sim L$. Преобразование выражения (6) приводит к формуле, удобной для анализа экспериментальных данных

$$m = \alpha(1/L + 1/L^*) \quad (7)$$

Здесь α – комбинация констант, $L^* = 6p/\varepsilon^2$ – критическая длина цепи ДНК, характеризующая насыщение функции $m(L)$. На рис. 6 некоторые из

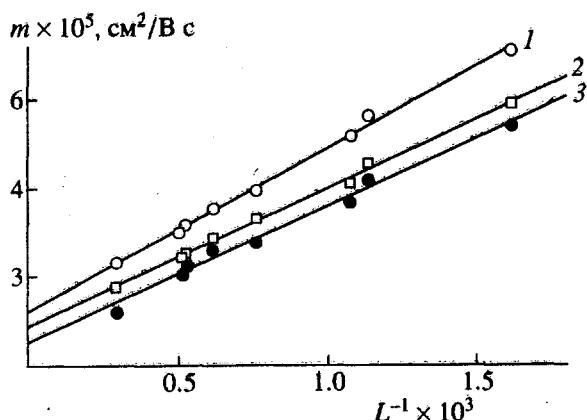


Рис. 6. Зависимость электрофоретической подвижности от длины цепи рестрикта ДНК (в парах оснований) в координатах уравнения (7) для гелей с $T = 2.5$ (1), 3.0 (2) и 4 мас. % (3); $C = 2.5$ мас. %.

полученных серий экспериментальных данных представлены в соответствии с уравнением (7).

Как видно, рептационный механизм удовлетворительно описывает зависимость подвижности от длины цепи ДНК; табл. 3 содержит параметры этих зависимостей для исследованных гидрогелей. Критическая длина молекул ДНК закономерно уменьшается с разбавлением геля, иначе говоря, с ростом характерного размера сетки, который в модели рептации отвечает диаметру трубки. На основании этого получены оценки характерного размера сетки, которые также даны в табл. 3.

Экспериментальные данные по зависимости подвижности рестрикта ДНК определенной длины от концентрации геля T хорошо описываются известным уравнением Фергюсона

$$\lg m = \lg m_0 - K_T, \quad (8)$$

где K_T – так называемый коэффициент задержки. Уравнение (8) обычно используют для оценки

Таблица 3. Характеристики движения ДНК в гидрогелях в рамках рептационной модели

T^* , мас. %	$\alpha/L \times 10^6$, $\text{см}^2/\text{В с}$	$L \times 10^{-3}$, пары оснований	ξ_c , Å***
1.0**	24.50	1.72	1120
2.5	13.17	2.67	1004
2.5	14.01	2.55	1018
3.0	9.67	3.07	973
3.0	7.17	4.28	890
3.0	9.17	3.63	932
4.0	5.83	5.01	860

* $C = 2.4 - 2.5$ мас. %.

** Образец получен радиационным сшиванием.

*** В расчетах по соотношениям для ξ и L^* , приведенным в тексте, использованы величины $p \approx 160$ пар оснований, $Q/L = 1$ заряд электрона на пару оснований (3.4 Å).

размеров компактных частиц. ПАА-гели достаточно детально “откалиброваны” в рамках этого подхода, и имеющиеся корреляции $K_T(R)$ для белков [18] позволяют оценить “эффективные” размеры рестриктов ДНК как сфер. Так, например, для рестрикта с $M = 1.3 \times 10^6$ (около 2000 пар оснований), $K_T = 0.41$ (мас. %)⁻¹) радиус составляет около 55 Å. Очевидно, это не отвечает действительности и лишь дополнительно свидетельствует о “вытягивании” макромолекул при движении через гель. Для сравнения: невозмущенный размер клубка такого рестрикта ~3000 Å.

Характерные размеры пор в гидрогелях

В табл. 4 сопоставлены оценки размеров пор для исследованных в работе гидрогелей, полученные, с одной стороны, на основе представлений о структуре сетки, с другой, – из данных по подвижности. Остановимся на наиболее важных аспектах этого сопоставления.

Плотность сетки в гидрогелях определяется суперпозицией физических зацеплений и ковалентных сшивок макромолекул. Частота зацеплений ξ_c достаточно надежно оценивается по теории скейлинга [2], однако в данном случае разумно воспользоваться результатами экспериментальных работ по КРЛС в ПАА-гидрогелях [7, 12]; полученное из них усредненное уравнение $\xi_c = 9.85\phi^{-0.635}$ дает величины, приведенные в табл. 4. Для перехода от T к ϕ мы использовали значение парциального удельного объема ПАА, равное 0.70 см³/г ([19], с. 386).

Размеры ячеек химической сетки, как отмечено выше, могут быть оценены из концентраций реагентов при синтезе. При полной конверсии групп мономера и разветвителя и при условии, что объем системы при гелеобразовании не изменяется, средний размер ячеек при их гексагональной упаковке в геле

$$\xi_c \equiv (2 \times 10^4 M_{\text{МВАА}} / CTN_A)^{0.33} \quad (9)$$

Здесь N_A – число Авогадро, $M_{\text{МВАА}} = 154$. Этот размер, также приведенный в табл. 4, отвечает среднему расстоянию между узлами при равномерном распределении разветвителя в объеме геля. При изотропном набухании геля размер ячейки, очевидно, возрастет как $\phi^{1/3}$.

Такой подход должен быть в принципе эквивалентен расчёту через длину субцепи сетки при условии, что среднеквадратичный размер этой цепи не меньше ξ_c , рассчитанного по уравнению (9). Длина цепи в идеальном приближении определяется только мольной долей разветвителя $N_{\text{МВАА}}$ и, например, для гелей с $C = 2.5$ мас. % число звеньев цепи $\bar{x}_c = (2N_{\text{МВАА}})^{-1}$ составит около 45, а ее средний размер в хорошем растворителе – 90–95 Å.

Известно, однако, что такая идеальная сетка не реализуется, и средние длины цепи, получае-

Таблица 4. Размеры пор в гидрогелях, полученные из экспериментов (ξ) и расчетов (ξ_e , ξ_c)*

T mas. %	C	$\xi, \text{ \AA}$						
		$\xi_e, \text{ \AA}$	$\xi_c, \text{ \AA}$	$L_c^{***}, \text{ \AA}$	набухание***	диффузия		электрофорез ДНК
						белки	микросферы	
1.0	-**	230	-	-	-	-	-	1120
1.5	2.0	180	120	-	-	180	-	-
2.5	2.0	130	101	-	-	100	126	-
2.5	2.4	130	93	-	-	-	-	1010
3.0	2.4	115	88	2200	210	-	-	930
3.7	2.0	100	89	-	-	80	74	-
4.0	2.5	95	80	1000	145	-	-	860

* Для экспериментальных данных приведены средние величины.

** Радиационно-сшитый полиакриламид.

*** Пояснения в тексте.

мые из модуля упругости, значительно (в 7 - 40 раз) выше рассчитанных из $N_{\text{МБА}}$, причем степень этого расхождения растет при разбавлении системы и увеличении доли разветвителя [8]. Если воспользоваться данными работы [8], относящимися к гомогенным гелям, то \bar{x}_c следует увеличить в 7 раз, а расчетная величина ξ_c достигнет в этом случае $\sim 300 \text{ \AA}$, что существенно превышает элементарные "геометрические" оценки в табл. 4.

В качестве дополнительного источника информации о размере ячеек сетки может быть использовано равновесное набухание, и соответствующие оценки размера ξ (\bar{x}_c определено как в работе [20]) даны в табл. 4. Здесь же приведена длина цепи между узлами L_c в качестве меры предельного размера ячейки. Набухание гелей определяли, измеряя диаметры образцов в форме дисков [21].

Резюмируя все эти оценки, можно отметить, что в изученных гелях физическая и химическая сетки соизмеримы по плотности, однако в случае второй из них имеется весьма большой простор для не вполне строгих допущений.

Что же дают экспериментальные методы?

Диффузия компактных частиц отражает в большей степени плотность физической сетки. Это следует из совпадения соответствующих размеров в табл. 4, а также из анализа корреляции, приведенной на рис. 4, в которой показатель степени при Φ (около 1.05) близок к 0.75 в скейлинговом соотношении для ξ_e . Сходная зависимость диффузионного торможения от $R\Phi$ получена в работе [7], где этот показатель в случае БСА составляет 0.92.

Необходимо отметить, что отсутствие строгих решений для коэффициентов в уравнениях, связывающих торможение больших сфер в геле с параметрами $R\Phi$ и R/ξ [1, 2, 7, 12], допускает лишь оценку размеров, но вряд ли дает основание для

более детального анализа ситуации. Предложенное в работе [1] и использованное нами приближение, в частности, игнорирует все возможные численные коэффициенты в уравнении (1) или его аналогах.

Значительно сложнее обстоит дело с данными, полученными из электрофореза. Как видно, величины ξ в этом случае более чем на порядок превышают размеры, получаемые из диффузии, и значительно, хотя и в меньшей степени, расходятся с оцениваемыми из набухания или величин T и C .

Ограниченнность возможностей количественной трактовки данных эксперимента с помощью уравнения (6) была отмечена уже авторами теории [16]. Они получили, в частности, существенно завышенную плотность заряда на ДНК - 5.7 заряда электрона на пару оснований против формального заряда $2e$ или эффективного $1e$ на пару в условиях электрофореза; степень этого несоответствия удалось несколько уменьшить, только приняв во внимание большой разброс пор по размерам. Таким образом, формула (6), которая учитывает распрямляющее действие поля на ДНК в условиях сильного "структурного" сопротивления среды геля и вполне удовлетворительна в качественном смысле, не может претендовать на количественное описание эффекта.

Как отмечено выше, невозмущенный размер молекул ДНК исследованного диапазона ММ существенно больше размеров пор при любых оценках. Теория рептации [16, 17] создана применительно к агарозным гелям, имеющим неизменную жесткую структуру. Можно думать, что в условиях электрофореза в разбавленном ПАА-геле жесткие молекулы ДНК, движущиеся под действием значительной силы сквозь эластичную сетку, ощущают сетку как слабое, податливое препятствие. В табл. 4 в качестве меры предела эластичности субцепей сетки приведены их контурные длины L_c , которые сопоставимы с равно-

весным размером ДНК. Не исключено, что в такой ситуации понятие поры или другие ключевые параметры модели рептации должны быть уточнены.

Если вернуться к вопросу о роли физической и химической сеток в свойствах гидрогелей, то ответ на него может быть получен только при переходе к существенно более разбавленным состояниям гелей. Оценки показывают, что "распутывание" зацеплений, исключая топологические, произойдет при степенях набухания около 3000, что, во-первых, трудно достижимо в случае нейтральных сеток ПАА, а во-вторых, сильно ограничит выбор методов исследования и тестовых частиц. Тем не менее более детальное изучение электрофореза, диффузии или седиментации крупных глобуллярных белков, например β -липопротеина ($R = 73 \text{ \AA}$), вирусов или микросфер позволило бы существенно продвинуться вперед в анализе разбавленных гелей.

Выполненные эксперименты и оценки показывают, по нашему мнению, что подход к анализу структуры полимерных сеток по их проницаемости для крупных частиц не является тривиальной задачей и требует как уточнения ряда аспектов теории движения, так и усовершенствования методов исследования.

Авторы выражают благодарность В.А. Касакину за предоставление образцов микросфер и возможности измерений светорассеяния, Д.Р. Бериташвили – за охарактеризованные наборы рес- триктов ДНК, С.А. Дубровскому – за помощь в интерпретации результатов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Langevin D., Rondelez F. // Polymer. 1978. V. 19. № 8. P. 875.
2. De Gennes P.-G. Scaling Concept in Polymer Physics. Ithaca, London: Cornell Univ. Press, 1979. Ch. 3.
3. Bansil R., Gupta K. // Ferroelectrics. 1980. V. 30. № 1/4. P. 63.
4. Fawcett J.S., Morris C.J.O.R. // Sep. Sci. 1966. V. 1. № 1. P. 9.
5. Righetti P.G., Brost B.C.W., Snyder R.S. // J. Biochem. Biophys. Methods. 1981. V. 4. № 5/6. P. 347.
6. Hsu T.-P., Ma D.S., Cohen C. // Polymer. 1983. V. 24. № 10. P. 1273.
7. Parks I.H., Johnson Ch.S., Gabriel D.A. // Macromolecules. 1990. V. 23. № 5. P. 1548.
8. Baselga G., Hernández-Fuentes I., Piérola I.F., Llorente M.A. // Macromolecules. 1987. V. 20. № 12. P. 3060.
9. Morris C.J.O.R., Morris P. // Biochem. J. 1971. V. 124. № 3. P. 517.
10. Crank J.M. The Mathematics of Diffusion. Oxford: Clarendon Press, 1957. Ch. IV.
11. Jamieson A.M., McDonnell M.E. // Probing Polymer Structures / Ed. by Koenig J.L., Washington, D.C.: Am. Chem. Soc., 1979. Ch. 10.
12. Sellen D.B. // J. Polym. Sci., Polym. Phys. Ed. 1987. V. 25. № 4. P. 699.
13. Abbott N.L., Blankenscheit D., Hatton T.A. // Macromolecules. 1992. V. 25. № 20. P. 5192.
14. Stellwagen N. // Biochemistry. 1983. V. 22. № 26. P. 6186.
15. Gel Electrophoresis of Nucleic Acids / Ed. by Rickwood D., James B.D. Oxford, Washington: IRL Press, 1983.
16. Lumpkin O.J., Déjardin P., Zimm B.H. // Biopolymers. 1985. V. 24. № 8. P. 1573.
17. Slater G.W., Noolandy J. // Biopolymers. 1986. V. 25. № 3. P. 431.
18. Chrambach A., Rodbard D. // Science. 1971. V. 172. № 3982. P. 440.
19. Kulicke W.-M., Kniewske R., Klein J. // Progr. Polym. Sci. 1982. V. 8. № 3. P. 373.
20. Dubrovskii S.A., Afanas'eva M.V., Lagutina M.A., Kazanskii K.S. // Polym. Bull. 1990. V. 24. № 1. P. 587.
21. Дубровский С.А., Афанасьева М.В., Лагутина М.А., Казанский К.С. // Высокомолек. соед. А. 1990. Т. 32. № 1. С. 165.

Permeability of Dilute Polyacrylamide Hydrogels

E. E. Protozanova*, G. N. Arkhipovich**, M. A. Livshits***, and K. S. Kazanskii**

* Toronto University
M5S 1A8 Toronto, Canada

** Semenov Institute of Chemical Physics, Russian Academy of Sciences
ul. Kosygina 4, Moscow, 117977 Russia

*** Engel'gardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences
ul Vavilova 32, Moscow, 117984 Russia

Abstract—Permeability of dilute (containing 1 to 4 wt % of polymer) homogeneous polyacrylamide hydrogels to globular proteins, microspheres of polysilicic acid, and restricted fragments of double-strand DNA were studied by diffusion, quasielastic laser light scattering, and electrophoresis. By analyzing the mobility of penetrating particles for all three penetrating species, pore dimensions of the hydrogels were evaluated. It was found that diffusion mobility of compact particles in the examined hydrogels is controlled mostly by the characteristic size of the fluctuation network of entanglements rather than by the size of the cell of chemical network, which is specified during the synthesis by the amount of cross-linking agent. The sizes of the cell evaluated from DNA electrophoresis (860 - 1120 Å) and protein diffusion (80 - 180 Å) were found to be significantly different. The causes of this discrepancy are discussed.