

УДК 541.64:547.96

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ БЫЧЬЕГО СЫВОРОТОЧНОГО АЛЬБУМИНА С ПОЛИ-N-ВИНИЛАЗОЛАМИ

© 2000 г. В. В. Анненков*, Н. Л. Мазяр*, В. А. Круглова**,
И. А. Ичева**, С. И. Лещук***

*Иркутский институт химии Сибирского отделения Российской академии наук
664033 Иркутск, ул. Фаворского, 1

**Иркутский государственный университет
664003 Иркутск, ул. К. Маркса, 1

***Институт эпидемиологии и микробиологии Научного центра медицинской экологии
Восточно-Сибирского научного центра Сибирского отделения Российской академии медицинских наук
664003 Иркутск, ул. К. Маркса, 3

Поступила в редакцию 22.02.2000 г.

Принята в печать 19.04.2000 г.

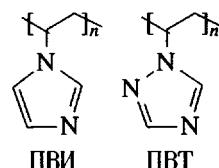
Изучено взаимодействие бычьего сывороточного альбумина с поли-1-венилимидацолом и поли-1-винил-1,2,4-триазолом в водном растворе при различных значениях pH и ионной силы методами потенциометрического титрования, турбидиметрии, вискозиметрии, ИК-спектроскопии и микроскопии. Обнаружено образование интерполимерных комплексов, стабилизованных водородными связями. В системе с поли-1-венилимидацолом при pH 4.5–6 наблюдалось обратимое фазовое разделение системы с выделением комплекса в осадок, что может быть использовано для концентрирования и разделения сложных белковых смесей.

Изучение взаимодействий белков с синтетическими полимерами представляет интерес для иммобилизации ферментов, стабилизации или разрушения их третичной структуры, специфической сорбции белков на поверхностях, выявления механизмов физиологической активности полимеров [1–8]. Ранее [1, 2] были детально исследованы комплексы различных полипептидов с полимерными анионами и катионами, стабилизированные за счет ионных взаимодействий. Кооперативный характер реакций в данных системах открывает новые возможности для разделения сложных белковых смесей, в частности с применением азольсодержащих полимерных систем [9].

Поли-N-венилацолы являются интересными полимерами с точки зрения образования интерполимерных комплексов, так как пиридиновые атомы азота в азольном цикле обладают существенно меньшей основностью по сравнению с обычными органическими основаниями [10]. При их взаимодействии со слабыми поликислотами можно ожидать образования как ионных, так и водородных связей. Кроме того, акцепторная π-система азольных колец способна взаимодействовать с донорами электронов [11–14].

Данная работа посвящена изучению взаимодействия бычьего сывороточного альбумина (БСА) с

линейным и сшитым поли-1-венилимидацолом (ПВИ) и поли-1-винил-1,2,4-триазолом (ПВТ)



ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Линейный ПВИ синтезировали путем радикальной полимеризации N-венилимидацола по методике [15]. ПВТ получали радикальной полимеризацией соответствующего мономера в 10%-ном растворе этанола при 60°C в атмосфере аргона в течение 48 ч, используя ДАК в качестве инициатора (1 мас. %). Очистку проводили переосаждением полимера в диэтиловый эфир и вакуумной сушкой до постоянной массы. Степень полимеризации, определенная вискозиметрически с использованием констант K и α, приведенных в работах [16, 17], составила 750 для ПВИ и 850 для ПВТ. Сшитый ПВИ получали радикальной полимеризацией мономера в 10%-ном бензольном растворе при 60°C в течение 24 ч под действием 1% ДАК. Для сшивания в реакционную смесь добавляли дивинилбензол в количестве 1, 3 и 5% от массы N-венилими-

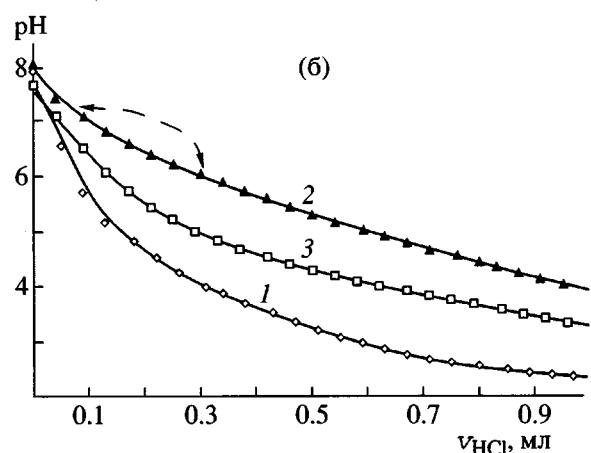
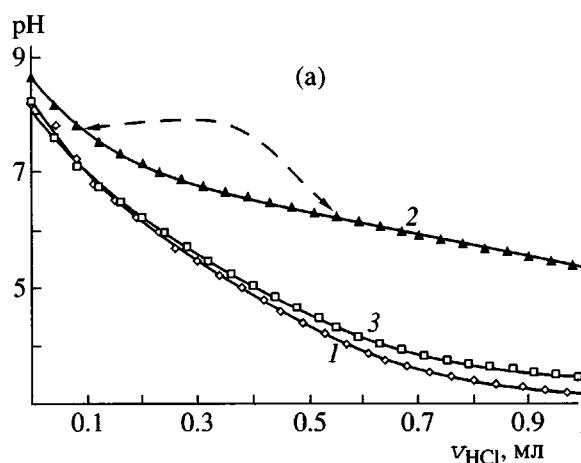


Рис. 1. Потенциометрическое титрование раствора БСА (1) и растворов смесей БСА–ПВИ (2) и БСА–ПВТ (3) раствором 0.1 М HCl. Объем титруемого раствора 10 мл. Концентрация БСА 2.5 г/л, ПВИ и ПВТ – 0.01 осново-моль/л. Концентрация NaCl: 0 (а) и 0.4 моль/л (б). Штриховые линии – фазовое разделение.

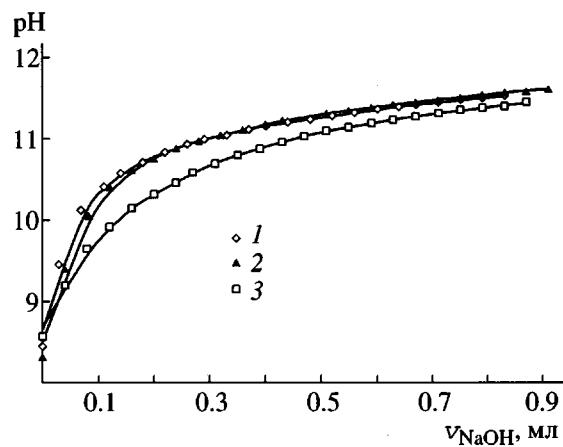


Рис. 2. Потенциометрическое титрование раствора БСА (1) и растворов смесей БСА–ПВИ (2) и БСА–ПВТ (3) раствором 0.1 М NaOH. Объем титруемого раствора 10 мл. Концентрация БСА 2.5 г/л, ПВИ и ПВТ – 0.01 осново-моль/л.

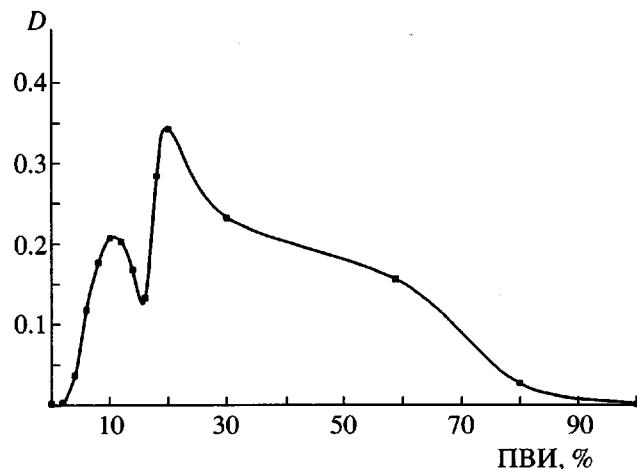


Рис. 3. Зависимость оптической плотности смесей растворов ПВИ и БСА от содержания ПВИ. Суммарная концентрация полимеров 0.5 г/л.

дазола. Полимеры отделяли фильтрованием, не прореагировавший мономер и золь-фракцию удаляли промыванием водой. Полученные сшитые полимеры содержали, по данным элементного анализа, 4, 8 и 12 мол. % звеньев сшивавшего мономера. В работе использовали БСА производства НПО "Аллерген", полученный лиофилизацией альбуминовой фракции, выделенной из бычьей плазмы методом спиртового фракционирования.

Потенциометрические измерения проводили на pH-метре Hanna HI8520 в термостатированной ячейке при $20 \pm 0.1^\circ\text{C}$ после установления равновесия. Вискозиметрические измерения проводили на вискозиметре Уббелоде при $20 \pm 0.1^\circ\text{C}$, варьируя соотношение концентраций ПВИ : БСА при по-

стоянной концентрации белка. Турбидиметрическое титрование выполняли с использованием фотометра КФК-3 при длине волны 600 нм.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Образование интерполимерных комплексов сопровождается, как правило, изменением pH раствора, что позволяет использовать потенциометрический метод для исследования подобных реакций. На рис. 1а представлены кривые титрования свободного БСА и его смесей с ПВИ и ПВТ раствором HCl. Потенциометрическая кривая для раствора, содержащего ПВИ, проходит значительно выше, чем в случае чистого раствора БСА, что харак-

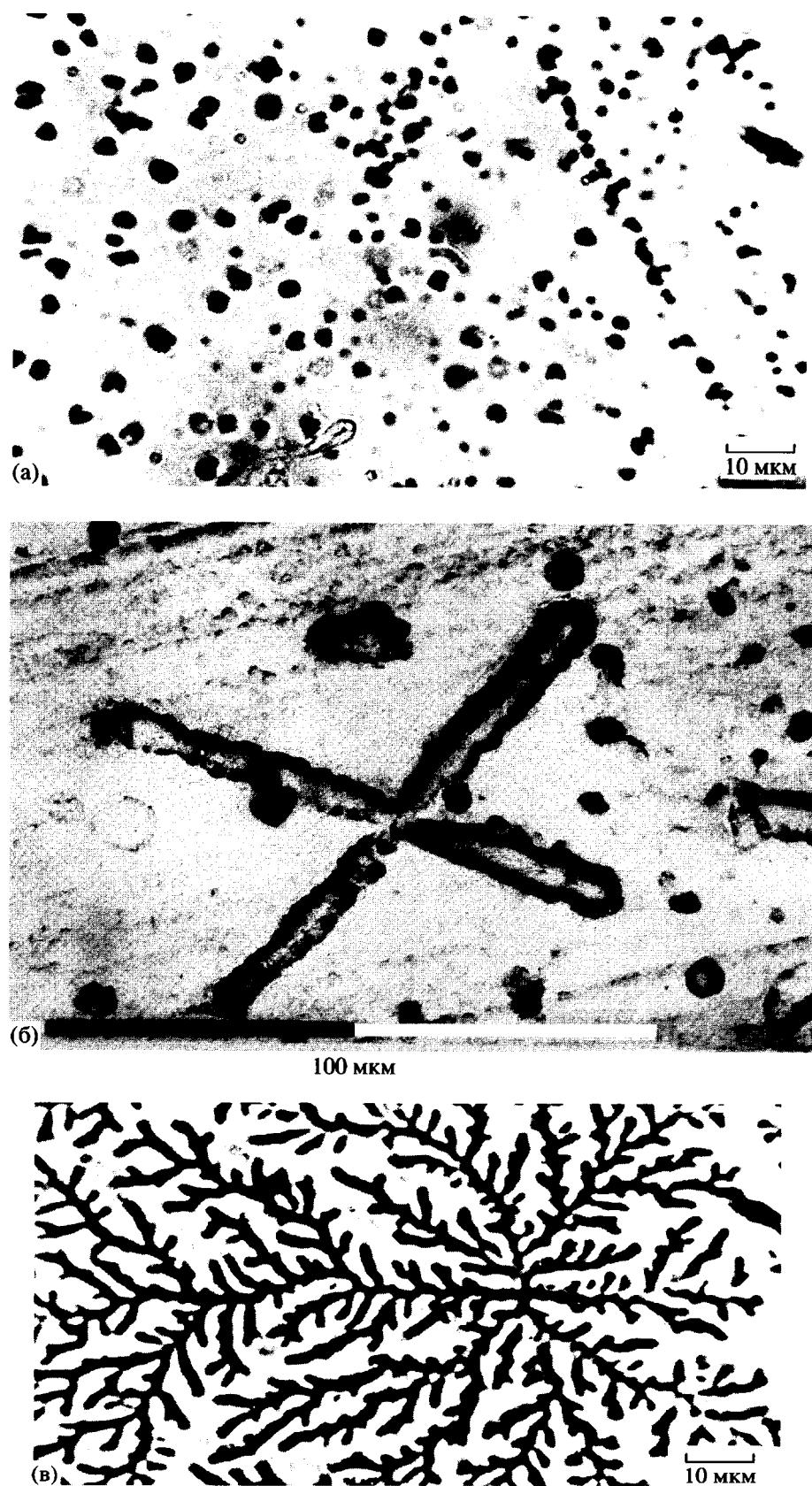


Рис. 4. Микрофотографии комплекса БСА-ПВИ, полученного при pH 6.5, концентрация БСА 0.5 (а) и 2.5 г/л (б, в).

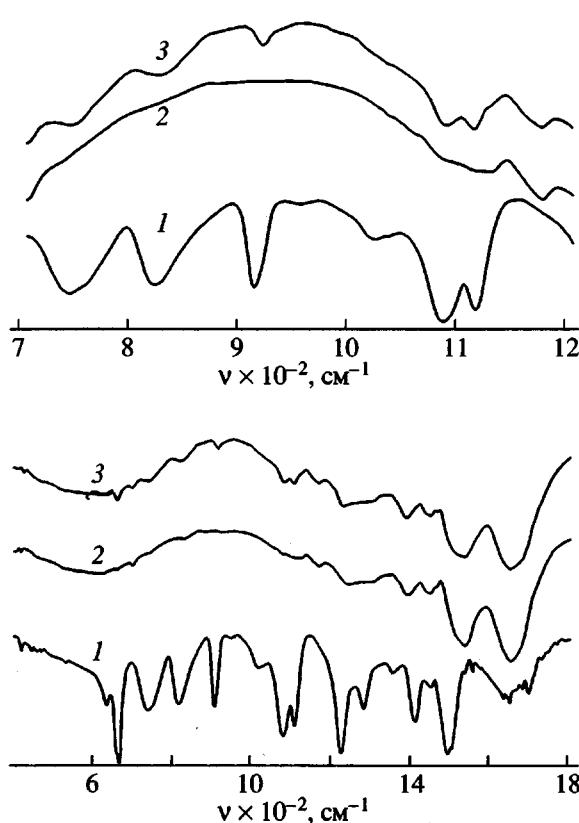
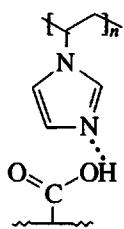


Рис. 5. ИК-спектры ПВИ (1), БСА (2) и их нерастворимого комплекса (3), полученного при pH 6.5.

терно для образования интерполимерного комплекса, стабилизированного водородными связями [12]. Наиболее вероятным представляется формирование водородных связей между карбоксильными группами, которые имеются в молекуле БСА, и атомом азота в гетероцикле ПВИ



С повышением кислотности среды возрастает число недиссоциированных карбоксильных групп, что приводит к усилению комплексообразования и соответственно увеличению разности pH растворов. Кривая для ПВТ располагается значительно ближе к кривой свободного белка, что связано с меньшей устойчивостью комплекса ПВТ–БСА из-за снижения основности азольного цикла при введении третьего атома азота.

При pH от 6 до 7.8 в системе ПВИ–БСА происходит фазовое разделение. Образуется белый мел-

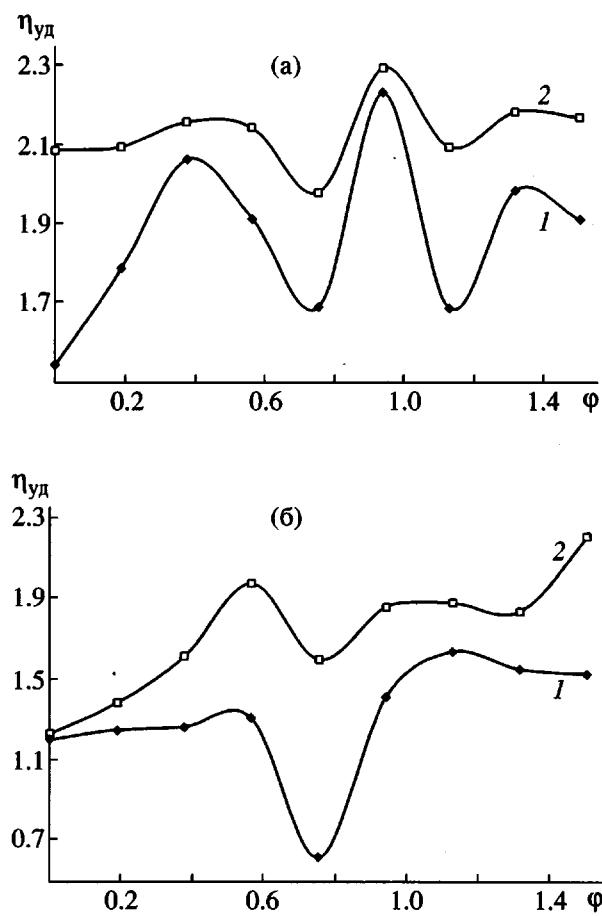


Рис. 6. Зависимость удельной вязкости $\eta_{уд}$ растворов комплексов БСА (а) и ПВТ (б) от массового соотношения компонентов ϕ при постоянной концентрации БСА (2.5 г/л). pH 8.6 (1) и 3.6 (2).

кодисперсный осадок, способный конгломерироваться в более крупные частицы по истечении некоторого времени. Осадок растворяется после добавления HCl в количестве, соответствующем достижению изоэлектрической точки (pH 4.5) при титровании свободного БСА. При этом кривая титрования комплекса сохраняет монотонный вид и по-прежнему лежит выше кривой БСА. Очевидно, понижение pH приводит к увеличению положительного заряда на частицах комплекса и их растворению, а водородные связи между звеньями ПВИ и БСА сохраняются.

Повышение ионной силы раствора (рис. 1б) практически не сказывается на взаимодействии БСА с ПВИ, а комплексообразование с ПВТ усиливается. Данный факт подтверждает стабилизацию комплекса за счет водородных, а не ионных связей, так как последние разрушаются при добавлении низкомолекулярных электролитов [18].

Потенциометрическое титрование изучаемых систем раствором NaOH (рис. 2) позволяет обна-

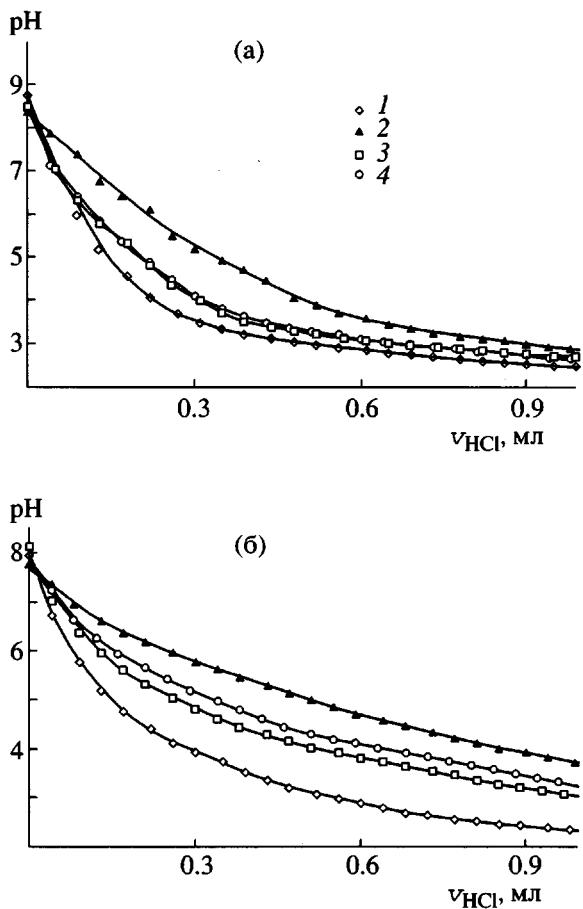


Рис. 7. Потенциометрическое титрование раствора БСА (1) и растворов смеси БСА—сшитый ПВИ раствором 0.1 М HCl (2—4). Объем титруемого раствора 10 мл. Концентрация БСА 2.5 г/л, соотношение весовых концентраций ПВИ : БСА = 0.38. [NaCl] = 0 (а) и 0.15 моль/л (б). Количество сшивающего агента в ПВИ 4 (2), 8 (3) и 12% (4).

ружить существование комплекса в области высоких значений pH, причем взаимодействие более выражено в системе БСА—ПВТ. Понижение pH при комплексообразовании свидетельствует о протекании реакции с карбоксилатными анионами БСА, стабилизация которых увеличивает степень диссоциации карбоксильных групп и препятствует реакции гидролиза анионов. Подобные взаимодействия отмечались ранее для комплексов ПВИ и ПВТ с полимерными кислотами [11—14] и связывались с акцепторными свойствами азольных π-систем. С этой точки зрения вполне объясняма большая активность ПВТ, содержащего больше электроотрицательных атомов азота в цикле.

Образование нерастворимого комплекса БСА—ПВИ при pH 6.5 было изучено методом турбидиметрии (рис. 3). На кривой зависимости оптической плотности от состава смеси видны два максимума, соответствующие 11 и 20% ПВИ. С учетом

того, что основная доля макромолекул БСА имеет $M = 7 \times 10^4$ и содержат 143 карбоксильных группы [2], можно сделать вывод, что второй максимум соответствует полному связыванию карбоксильных групп БСА. Наличие дополнительного максимума в области избытка белка может быть связано с известной способностью БСА участвовать в комплексообразовании в глобулярной форме [1], при этом с ПВИ взаимодействуют только карбоксильные группы, находящиеся на поверхности глобулы. При увеличении содержания ПВИ более выгодным оказывается участие в комплексообразовании с ним БСА в линейной форме, что обеспечивает значительный выигрыш в энталпии за счет большего числа образующихся водородных связей.

Частицы комплекса БСА—ПВИ, выпадающие в осадок, образуют упорядоченные структуры (рис. 4), характерные для систем, способных к самосборке [1].

Твердый продукт взаимодействия БСА—ПВИ был изучен методом ИК-спектроскопии (рис. 5). В спектре наблюдаются интенсивные полосы поглощения функциональных групп БСА: карбонильных, карбониламидных, карбоксилатных (1550 и 1670 cm^{-1}) и характерные полосы имидазольного кольца (740 , 817 , 918 , 1085 и 1110 cm^{-1}). Как известно, при протонировании звеньев ПВИ происходят существенные изменения в ИК-спектрах, отсутствие которых в комплексах с БСА подтверждает образование именно водородных, а не ионных связей.

Существование растворимого комплекса БСА—ПВИ при высоких и низких значениях pH позволило провести вискозиметрические измерения (рис. 6). Полученные кривые зависимости вязкости от соотношения компонентов имеют сложный вид, указывающий на протекание процессов перестройки структуры комплекса при изменении его состава.

Полимеризация 1-винилимидазола в присутствии сшивающего агента позволяет получить образцы, ограниченно набухающие в воде. По данным потенциометрического титрования (рис. 7), они также способны взаимодействовать с БСА. При этом комплексообразование ослабевает с ростом степени сшивки из-за стерических затруднений при проникновении макромолекул БСА в сетку ПВИ. Увеличение ионной силы раствора повышает устойчивость комплекса, как и в случае линейного полимера.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Кабанов В.А., Евдаков В.П., Мустафаев М.И., Антипина А.Д. // Молек. биология. 1977. Т. 11. С. 582.
2. Скобелева В.Б., Зинченко А.В., Рогачева В.Б., Зезин А.Б. // Вестн. МГУ. Сер. 2, Химия. 1998. Т. 39. С. 268.

3. Morawetz H., Hughes W.L. // J. Phys. Chem. 1952. V. 56. P. 64.
4. Chargaff E., Ziff M., Moore D.H. // J. Biol. Chem. 1941. V. 139. P. 385.
5. Rice R.V., Stahmann M.A., Alberty R.A. // J. Biol. Chem. 1954. V. 209. P. 105.
6. Noguchi H. // J. Phys. Chem. 1960. V. 64. P. 185.
7. Zhao J., Ford C.F., Glatz C.E., Rougvie M.A., Gendel S.M. // J. Biotechnol. 1990. V. 14. P. 273.
8. Wen Y.-P., Dubin P.L. // Macromolecules. 1997. V. 30. P. 7856.
9. Лещук С.И., Анненков В.В., Круглова В.А., Скопинцева И.А. // Вопросы вирусологии. 1996. Т. 41. С. 135.
10. Чипанина Н.Н., Фролов Ю.Л., Казакова Н.А., Домнинна Е.С., Скворцова Г.Г. // Докл. АН СССР. 1974. Т. 216. С. 371.
11. Annenkov V.V., Kruglova V.A. Polymer Materials Encyclopedia / Ed. Salamone J.P. Boca Raton: CRC Press, 1996. P. 7163.
12. Annenkov V.V., Kruglova V.A., Mazyar N.L. // J. Polym. Sci., Polym. Chem. 1996. V. 34. № 2. P. 597.
13. Мазяр Н.Л., Анненков В.В., Круглова В.А., Торшинова Д.-С.Д., Даниловцева Е.Н. // Высокомолек. соед. А. 1999. Т. 41. № 2. С. 357.
14. Тагер А.А., Сафронов А.П., Лопырев В.А., Ермакова Т.Г., Татарова Л.А., Кашик Т.Н. // Высокомолек. соед. А. 1987. Т. 19. № 7. С. 2421.
15. Скушникова А.И., Домнинна Е.С., Скворцова Г.Г. // Высокомолек. соед. Б. 1977. Т. 19. № 5. С. 372.
16. Эскин В.Е., Магарик С.Я., Жураев У.Б., Рудковская Г.Д. // Высокомолек. соед. А. 1978. Т. 20. № 10. С. 2219.
17. Татарова Л.А., Ермакова Т.Г., Берлин Ал.Ал., Разводовский Е.Ф., Лопырев В.А., Кедрина Н.Ф., Епиколопян Н.С. // Высокомолек. соед. А. 1982. Т. 24. № 2. С. 2205.
18. Зезин А.Б., Рогачева В.Б. // Успехи химии и физики полимеров. М.: Химия, 1973. С. 3.

Interaction of Ox Serum Albumin with Poly(N-vinylazoles)

V. V. Annenkov*, N. L. Mazyar*, V. A. Kruglova**, I. A. Icheva**, and S. I. Leshchuk***

*Irkutsk Institute of Chemistry, Siberian Division, Russian Academy of Sciences,
ul. Favorskogo 1, Irkutsk, 664033 Russia

**Irkutsk State University,
ul. K. Markska 1, Irkutsk, 664003 Russia

***Institute of Epidemiology and Microbiology, Scientific Center of Medical Ecology,
East-Siberian Scientific Center, Siberian Division, Russian Academy of Medical Sciences,
ul. K. Markska 3, Irkutsk, 664003 Russia

Abstract—The interaction of ox serum albumin with poly(1-vinylimidazole) and poly(1-vinyl-1,2,4-triazole) in an aqueous solution at the varying pH values and ionic strengths was studied by potentiometric titration, turbidimetry, viscometry, IR spectroscopy, and microscopy. It was discovered that the interpolymer complexes stabilized by hydrogen bonds are formed in the systems under examination. In the system involving poly(1-vinylimidazole), a reversible phase separation, accompanied by precipitation of the complex, was shown to take place at pH 4.5–6. This effect may be used in the concentration and separation of complex albumin mixtures.