

УДК 541.64:536.7

КОНТРОЛИРУЕМЫЕ ФАЗОВЫЕ РАЗДЕЛЕНИЯ В РАСТВОРАХ КОМПЛЕКСОВ ПОЛИМЕТАКРИЛАТНОГО АНИОНА И ГЛОБУЛЯРНЫХ БЕЛКОВ¹

© 2002 г. В. А. Изумрудов, С. Х. Лим

Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова. Химический факультет
119899 Москва, Ленинские горы

Поступила в редакцию 12.09.2001 г.
Принята в печать 24.10.2001 г.

Методами тушения флуоресценции и турбидиметрического титрования выявлены факторы, влияющие на диссоциацию и фазовые разделения в растворах комплексов, образованных флуоресцентно меченым полиметакрилатным анионом и глобулярными белками – лизоцимом, химотрипсиногеном и рибонуклеазой. Обнаружена глубокая общность в поведении таких комплексов и водорастворимых нестехиометрических полиэлектролитных комплексов, состоящих из разноименно заряженных полионов. Продемонстрирована плодотворность использования подходов, развитых при исследовании нестехиометрических полиэлектролитных комплексов, для получения растворимых белок-полиэлектролитных комплексов, претерпевающих фазовое разделение в заданных диапазонах pH и ионной силы растворов.

В настоящее время имеется обширная информация о способах получения и поведении водорастворимых нестехиометрических полиэлектролитных комплексов (НПЭК), являющихся продуктами завершенных реакций разноименно заряженных полионов. Их описанию посвящен ряд обзоров [1–3]. Уникальные свойства НПЭК, наиболее привлекательным из которых для применения в практических целях является способность претерпевать фазовые разделения в узких, контролируемых и удобных для работы с биологически активными веществами диапазонах pH и ионной силы растворов, позволяют отнести эти новые макромолекулярные соединения к так называемым “умным” полимерам. Перспективы использования НПЭК в медицине и биотехнологии подробно рассмотрены в обзорах [2, 3].

Анализируя результаты исследования комплексов, образованных синтетическим линейным полиэлектролитом с заряженным партнером дру-

гой природы (например, ионогенным дендримером [4], глобулярным белком [5, 6] или нуклеиновой кислотой [2, 7–9]), можно заметить много общего в поведении этих комплексов. По всей вероятности, в основе такого поведения лежат те же принципы и механизмы, которые определяют свойства полиэлектролитных комплексов, в частности НПЭК. Если данное предположение справедливо, то в руки исследователя попадает весь арсенал средств воздействия на фазовое состояние и устойчивость комплексов, накопленный в результате длительных и детальных исследований НПЭК. Кроме того, становится возможным использование уже выработанной стратегии для конструирования систем с контролируемой растворимостью и стабильностью, т.е. для создания новых “умных” полиэлектролитных комплексов, содержащих биополимеры. Важность решения этого вопроса как такового и практическая значимость подобных комплексов очевидны, что делает задачу выявления общих закономерностей поведения полиэлектролитных комплексов, образованных партнерами различной химической природы, особенно актуальной.

Руководствуясь изложенными соображениями, в настоящей работе предпринято изучение

¹ Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (код проекта 99-03-33399) и фонда INTAS (грант 00-113).

E-mail: izumrud@genebee.msu.su (Изумрудов Владимир Алексеевич).

стабильности и фазового состояния растворов комплексов, образованных полиметакрилатным анионом (**ПМА**) с различными глобулярными белками, как модельных систем, удобных для проведения такого рода исследований. Полученные нами данные убедительно свидетельствуют о правомерности рассмотрения таких комплексов и НПЭК с единых позиций и о плодотворности этого подхода для приготовления белок-полиэлектролитных комплексов с контролируемыми свойствами.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали лизоцим, химотрипсинген и рибонуклеазу фирмы "Sigma" (США). Образец флуоресцентно меченного ПМА (**ПМА***) получали взаимодействием фракции ПМА ($M_w = 16 \times 10^4$, $M_w/M_n = 1.3$) с пиренилдиазометаном.

Флуориметрическое титрование проводили на спектрофлуориметре "Jobin Yvon-3CS" (Франция) с интервалом 3 мин между введениями порций титранта при длине волн возбуждения 346 и эмиссии 395 нм. Измеряли интенсивность флуоресценции I смесей компонентов и интенсивность флуоресценции I_0 раствора ПМА* той же концентрации и в тех же условиях (рН, ионная сила).

Турбидиметрическое титрование осуществляли прямым и обратным смешением, добиваясь совпадающих результатов, на спектрофотометре "Hitachi 150-20" (Япония), регистрируя мутность раствора по оптическому поглощению при длине волны 500 нм, где ни один из компонентов смеси не поглощал свет.

Седиментационный анализ проводили, готовя смеси компонентов при заданных рН в 0.02 М буферных растворах и отделяя нерастворимые частицы на центрифуге (10 мин, 12000 об/мин). Полноту осаждения контролировали по УФ-спектрам супернатантов по характеристическим полосам поглощения при длине волн 346 нм (ПМА*), 267 нм (полистиролсульфонат натрия – **ПСС**) и 280 нм (белок).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Чтобы комплексы были устойчивыми в достаточно широком интервале рН, использовали белки с высокими изоэлектрическими точками (рI): лизоцим ($M_w = 17.5 \times 10^3$, рI 11.0), рибонуклеазу ($M_w = 13.7 \times 10^3$, рI 9.45) и химотрипсинген ($M_w = 25.4 \times 10^3$, рI 9.50). Основной массив данных был получен при исследовании комплекса ПМА*-лизоцим.

Прежде чем приступить к рассмотрению полученных результатов, необходимо заметить, что использование белка в качестве компонента комплекса создает трудности в представлении экспериментального материала, обусловленные полиамфолитной природой белковой глобулы. В молекуле белка содержатся и кислотные и основные остатки, количество которых задается аминокислотной последовательностью. Их (де)протонирование при изменении рН вызывает изменение заряда глобулы, определяемое балансом этих групп и величинами их рK. Хорошо известно, что некоторые ионогенные группы обладают аномальными значениями рK, обусловленными их специфическим окружением в белковой глобуле, а часть таких групп блокирована для взаимодействия с полианионом, в частности из-за образования более прочных внутримолекулярных ионных пар. Порождаемая этими обстоятельствами неопределенность в количестве ионогенных групп белка, доступных для взаимодействия с полиэлектролитом, затрудняет сравнение свойств и поведения комплексов ПМА* с различными белками.

Для устранения этой неопределенности титровали раствор одного компонента другим, как описано в экспериментальной части, и находили такой состав смеси, при котором и белок и полианион количественно переходили в осадок. Очевидно, что в образующемся нерастворимом комплексе доступные для электростатического взаимодействия группы белка и полианиона нейтрализуют друг друга, находясь в стехиометрическом отношении 1 : 1.

На основании результатов такого анализа смеси ПМА* и лизоцима при рН 9.0 был определен массовый состав R смеси лизоцим–ПМА* = 14 ± 1 , приводящий к образованию стехиометрического комплекса. Зная этот состав и полагая, что при рН 9.0 практически все группы ПМА* ионизованы, было рассчитано число солевых связей Z , приходящихся на одну глобулу; оно составило 12 ± 1 .

Определение числа доступных аминогрупп белка в нейтральных и слабо кислых средах проводили аналогичным образом, но при этом вместо ПМА* использовали ПСС. В отличие от ПМА*, он полностью заряжен в широкой области изменения рН, поскольку значение рK сульфонатных групп не превышает единицу, что существенно упрощает седиментационный анализ, который при использовании ПМА* требует учета степени ионизации этой слабой поликислоты, снижающейся с уменьшением рН. Кроме того, такая замена позволяет избежать осложнений, связанных с образованием в ПМА* в нейтральных средах внутримолекулярных водородных связей, что может оказывать

влияние на состав образующегося нерастворимого комплекса.

Результаты анализа смесей ПСС–лизоцим приведены ниже.

pH	5.8	7.6	9	10
R = [белок] : [ПСС]	5.7	5.9	6.2	6.5
Z	12.6	12.1	11.6	11

Видно, что при pH 9 глобула лизоцима образует с ПСС такое же количество солевых связей, как и с полностью ионизованным ПМА*, что свидетельствует о доминирующем влиянии электростатических взаимодействий на образование комплексов белка с обоими полианионами. Из этих данных следует еще один важный вывод о том, что в изученном широком интервале $5.8 < \text{pH} < 10.0$ количество солевых связей, приходящееся на одну глобулу белка, остается практически постоянным и равным 12 ± 1 . Иными словами, даже в сильно щелочных средах при pH 10 практически все аминогруппы белка, доступные для взаимодействия с полианионом, образуют с ним солевые связи.

Такой вывод хорошо согласуется с данными, полученными при исследовании комплексообразования ПМА* и лизоцима методом поляризованной флуоресценции [10], анализ которых показывает, что в широком интервале степени ионизации полианиона на одну молекулу лизоцима в комплексе в среднем приходится 13 солевых связей.

Очевидно, что причиной столь высокой степени превращения в реакции ПМА* с белком в щелочных средах является зарядение аминогрупп лизоцима на полностью ионизованном полианионе. Мы вернемся к обсуждению этого эффекта ниже, при рассмотрении данных по тушению флуоресценции. Там же будет показано, что увеличение pH выше 10.0 приводит к кооперативному разрушению солевых связей в комплексе, обусловленному депротонированием аминогрупп белка в присутствии заряженной матрицы. Данное обстоятельство ограничивает проведение анализа состава нерастворимых комплексов ПСС с лизоцимом в щелочных средах со значением pH > 10.0 .

Седиментационный анализ смесей ПСС с химотрипсиногеном и рибонуклеазой проводили при меньших значениях pH, поскольку щелочные ветви реакции образования полиэлектролитных комплексов с этими белками, имеющими более низкие значения pI, смешены в нейтральные среды. Из данных анализа были рассчитаны массовые отношения компонентов, соответствующие образованию стехиометрических комплексов, а на их основании установлено, что при pH 5.8 полианион

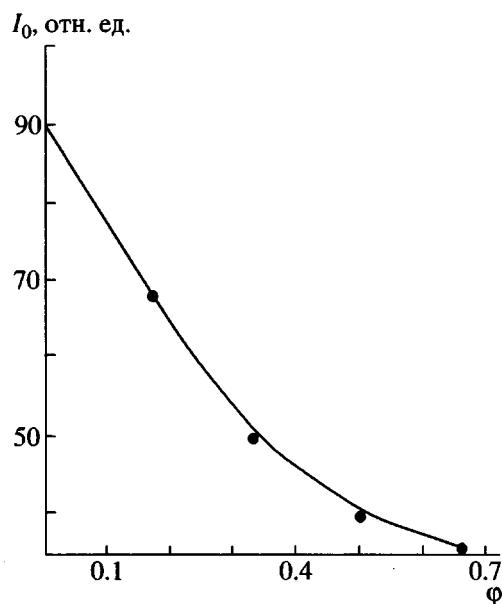


Рис. 1. Кривая флуориметрического титрования раствора ПМА* раствором лизоцима при pH 9.0. Здесь и на рис. 2–8: $[\text{ПМА}^*] = 2 \times 10^{-4}$ основомоль/л, температура 20°C. $\phi = [\text{белок}] : [\text{ПМА}^*]$.

образует 6 ± 1 солевых связей с глобулой химотрипсиногена и 10 ± 1 связей с рибонуклеазой.

Эти результаты позволяют перейти от удобного для приготовления комплексов, но малоинформационного для изучения полиэлектролитных взаимодействий отношения массовых концентраций компонентов в смесях к отношению $\phi = [\text{белок}] : [\text{ПМА}^*]$, где [белок] – мольная концентрация ионогенных групп белка, доступных для взаимодействия с полианионом, а [ПМА*] – мольная концентрация звеньев ПМА*. Выражение составов смесей в этих терминах по смыслу не отличается от используемого при исследовании НПЭК отношения мольных концентраций ионогенных групп полимерных компонентов $\phi = [\text{поликатион}] : [\text{полианион}]$ [1], оно лишь игнорирует наличие в белках аминогрупп, которые заведомо не могут принимать участие в полиэлектролитном взаимодействии с полианионом. Понятно, что при таком представлении данные, полученные при исследовании различных белок-полиэлектролитных комплексов можно сравнивать как между собой, так и с результатами аналогичных опытов с НПЭК, образованными ПМА* и поликатионами.

Протонированные аминогруппы, находящиеся на поверхности глобулярных белков, способны достаточно эффективно тушить флуоресценцию пиреновой метки полианиона. Это следует из представленной на рис. 1 типичной кривой флуориметрического титрования раствора ПМА* рас-

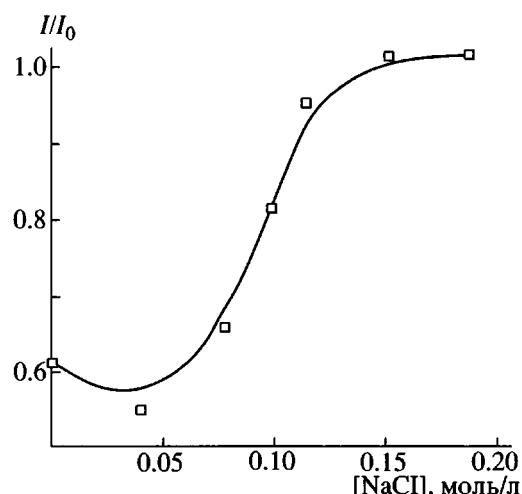


Рис. 2. Зависимость относительной интенсивности флуоресценции I/I_0 смеси растворов ПМА*-лизоцим состава $\phi = 0.2$ при $pH = 9.0$ от концентрации соли.

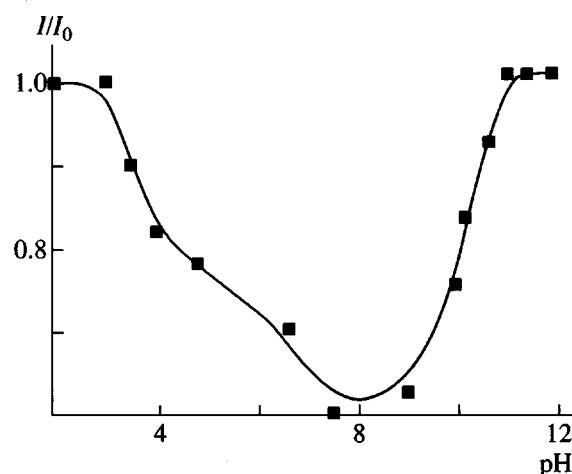


Рис. 3. pH -зависимость относительной интенсивности флуоресценции I/I_0 смеси растворов ПМА*-лизоцим состава $\phi = 0.2$.

творм белка, в качестве которого в данном случае использовали лизоцим. Добавление низкомолекулярного электролита к раствору смеси ПМА* с белком приводит к возгоранию флуоресценции, что свидетельствует о диссоциации комплекса. Полученная кривая флуориметрического титрования, приведенная для той же системы на рис. 2, имеет S-образный вид, указывающий на кооперативный характер разрушения солевых связей. Такое же возгорание наблюдалось при введении в смеси компонентов щелочи или кислоты (рис. 3, правая и левая ветви соответственно). Это позволило использовать метод тушения флуоресценции для выявления границ существования комплексов при изменении pH и ионной силы раствора.

Из кривых флуориметрического титрования смесей бессолевых растворов ПМА* и белков растворами соляной кислоты и гидроксида натрия было установлено, что разрушение контактов между компонентами происходит в кислых и

Значения pH полной диссоциации комплексов, образованных ПМА* с различными белками в кислых и щелочных средах, определенные из кривых флуориметрического титрования

в щелочных средах и заканчивается при достижении pH , приведенных в таблице.

Как и следовало ожидать, комплекс ПМА* с лизоцимом, обладающим наиболее высокой изоэлектрической точкой, полностью диссоциирует на компоненты при более высоком значении pH 11.2 по сравнению с комплексами ПМА* и другими белками, которые разрушаются при $pH = 10.6$.

Из сравнения полученных значений $pH_{щел}$ с величинами pI (таблица) следует, что область существования комплексов заметно сдвинута в щелочные среды по отношению к изоэлектрическим точкам белков. Иными словами, даже если глубокие белки изначально заряжены отрицательно, в присутствии полианиона с высокой плотностью заряда происходит их перезарядка и образование полизеэлектролитного комплекса полианион-белок. В этом отношении аминогруппы белков ведут себя подобно аминогруппам линейных синтетических полiamинов, протонирование которых заметно смещается в щелочные среды при добавлении в их растворы высокозаряженного полианиона [1]. Как уже было отмечено, есть все основания полагать, что тот же эффект ответствен за глубокие степени превращения в реакции между ПМА* и белком, достигаемые в щелочных растворах.

Следует подчеркнуть, что сам факт образования комплексов полианионов с белками при pH , превышающих их изоэлектрическую точку (как, впрочем, и комплексов высокозаряженных поликатионов с белками при pH ниже их pI) был обнаружен сравнительно давно. Однако до сих пор это

Белок	pI	$pH_{кисл}$	$pH_{щел}$
Лизоцим	11.0	3.05	11.2
Химотрипсиноген	9.5	2.65	10.6
Рибонуклеаза	9.45	2.55	10.6

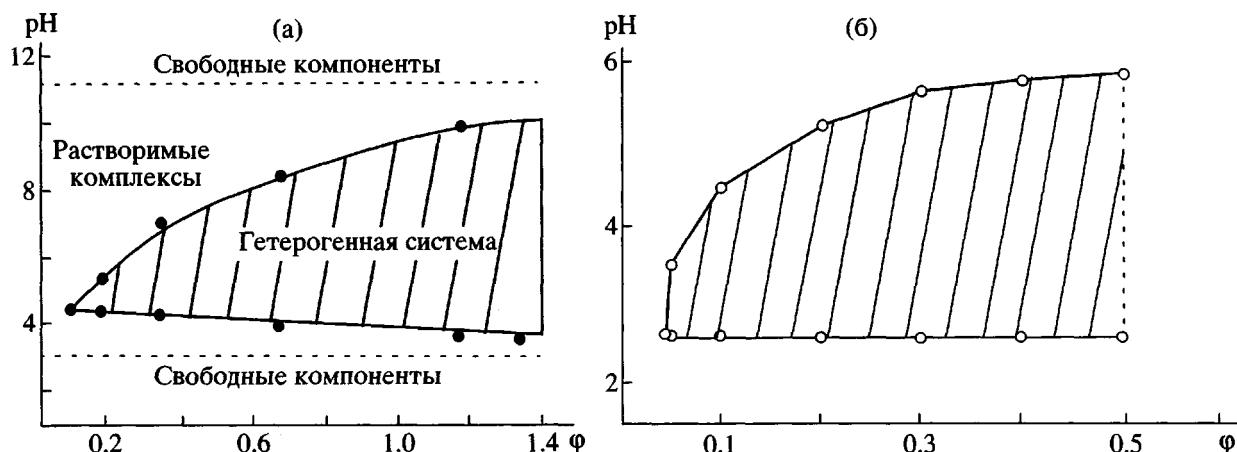


Рис. 4. Фазовые диаграммы смесей растворов ПМА*-лизоцим (а) и ПМА*-ПЭП (б) различного состава ϕ , полученные турбидиметрическим титрованием растворами HCl и NaOH. Рисунок б заимствован из работы [12].

явление не получало внятного объяснения. Единственная попытка, сделанная в работе [11], не представляется удачной. Авторы отмечают, что для интерпретации наблюдаемого эффекта они вынуждены предполагать наличие существенно неравномерного распределения зарядов разного знака по поверхности белковых глобул. При таком условии полианион будет взаимодействовать с “пятном” из положительных зарядов на поверхности глобулы даже в случае общего отрицательного заряда белка. Нетрудно видеть, что этот подход ставит в прямую зависимость величину сдвига pH от степени неоднородности распределения заряда по глобуле белка, а поскольку длина кооперативного участка связывания составляет четыре-шесть заряженных звеньев [1], для проявления эффекта “пятно” должно состоять из по меньшей мере такого же количества аминогрупп. Однако из данных, полученных нами, и опубликованных в работе [11], следует, что сдвиг pH образования комплекса за изоэлектрическую точку белка присущ широкому кругу систем, причем этот эффект выражен достаточно ярко. Более того, для комплексов с белками, обладающими близкими значениями рI, в частности комплексов ПМА* с химотрипсиногеном и рибонуклеазой, он практически одинаков, $\Delta\text{pH} \approx 1.1$ (таблица). Следуя логике авторов гипотезы, приходится заключить, что у всех белков, использованных в экспериментах, хорошо развитая “пятнистая” структура с практически одинаковой и достаточно высокой степенью гетерогенности распределения зарядов по поверхности глобул, что маловероятно. Предлагаемое нами объяснение обсуждаемого эффекта, основанное на хорошо известных принципах протекания интерполиэлектролитных реакций [1], но-

сит универсальный характер и потому лишено этого недостатка.

На рис. 4 представлена фазовая диаграмма растворов комплексов ПМА*-лизоцим, которую находили по точкам помутнения смесей бессолевых растворов компонентов, как описано в экспериментальной части.

По данным тушения флуоресценции, ПМА* и лизоцим начинают взаимодействовать друг с другом уже при pH 3.05 (таблица), что заметно меньше pH 4.3, при котором наступает фазовое разделение (нижняя ветвь диаграммы). Иными словами, в кислых средах фазовому переходу предшествует образование растворимого комплекса. Очевидно, что растворимость такого комплекса определяется балансом между положительно заряженными протонированными аминогруппами белка, выполняющего функции лиофилизирующего компонента (т.е. поддерживающего частицу комплекса в растворе) и образовавшимися солевыми связями. При увеличении pH положительный заряд комплекса уменьшается из-за нейтрализации его возрастающим количеством депротонированных (карбоксилатных) групп полианиона, а число солевых связей соответственно растет. Совместное действие обоих факторов приводит к ухудшению растворимости, что находит свое отражение в фазовом разделении, наступающем при pH 4.3 (точка помутнения).

Полноту перехода полианиона в осадок оценивали по концентрации ПМА* в супернатанте после отделения в ультракентрифуге нерастворимых комплексных частиц, как описано в экспериментальной части. Результаты, полученные для смеси ПМА* и лизоцима состава $\phi = 0.6$ представ-

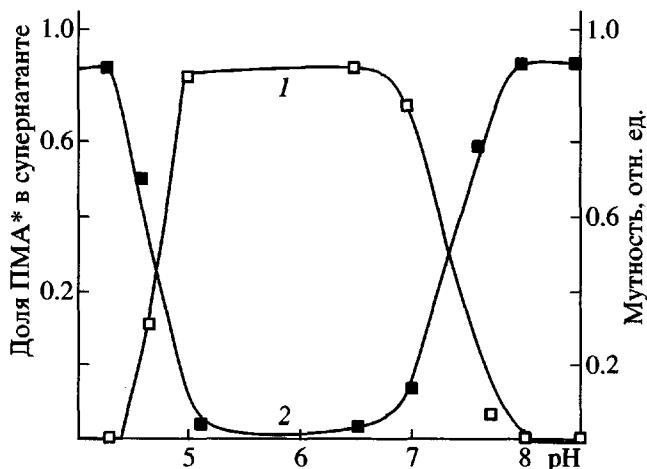


Рис. 5. pH-зависимости мутности (1) и доли оставшегося в супернатанте ПМА* (2) в смеси растворов ПМА* и лизоцима состава $\phi = 0.6$.

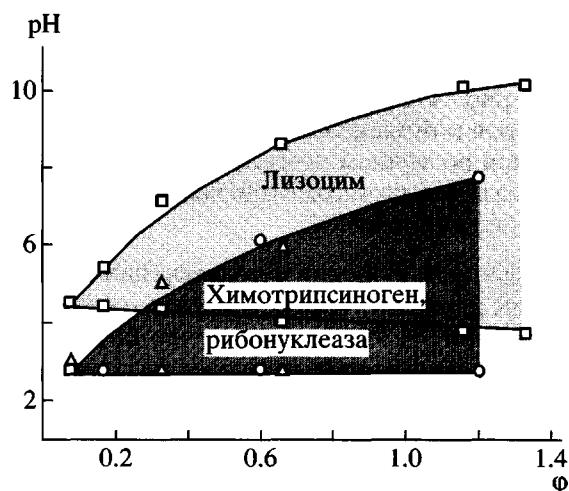


Рис. 6. Фазовые диаграммы смесей растворов ПМА* с химотрипсиногеном, рибонуклеазой и лизоцимом, полученные турбидиметрическим титрованием растворами HCl или NaOH.

лены на рис. 5 в виде зависимости доли оставшегося в растворе ПМА* от pH (кривая 2). Видно, что введение щелочи при pH > 4.3 вызывает увеличение содержания ПМА* в нерастворимом комплексе (левая ветвь кривой 2) и рост массы нерастворимых частиц, отображаемый левой ветвью кривой турбидиметрического титрования (кривая 1). При достижении pH 5.1 весь полианион обнаруживался в осадке. Более того, при этом pH весь белок также переходил в осадок, поскольку супернатант не поглощал свет с характерной для белков длиной волны 280 нм.

Для использования на практике, например, в биотехнологии для разделения биологических

смесей обнаруженная нами способность комплексов растворяться при низких значениях pH вряд ли может представлять интерес. Аналогичные опыты с другими белками показали, что области существования растворимых комплексов ПМА* с химотрипсиногеном или рибонуклеазой еще более сужены и ограничены фазовым разделением, наступающим уже при pH 2.80 (нижние ветви диаграмм рис. 6). Во многих случаях целевые белки (ферменты, антитела) денатурируют в столь кислых средах. Гораздо более привлекательны белок-полиэлектролитные комплексы, способные растворяться в щелочных, или, что особенно важно при работе с биологически активными веществами, в нейтральных средах. Области существования таких комплексов отвечает верхняя ветвь фазовой диаграммы, приведенной на рис. 4.

Как следует из ее рассмотрения, фазовое состояние системы эффективно контролируется изменением параметра ϕ . Это означает, что при необходимости осуществить фазовое разделение в нейтральных средах при заданном значении pH достаточно подобрать нужный состав смеси.

Полученная ветвь диаграммы (рис. 4а) очень напоминает верхнюю ветвь фазовой диаграммы смесей слабых полимерных кислот и сильных полионов, в частности, ПМА и поли-N-этил-4-винилпиридиний бромида (ПЭП), взятых в неэквимольных соотношениях, $\phi < 1$ (рис. 4б). По аналогии с этой системой, растворимость смесей ПМА* и лизоцима в нейтральных и слабо щелочных средах можно объяснить образованием растворимых нестехиометрических белок-полиэлектролитных комплексов, состав которых совпадает с составом смесей. Растворимость комплексов обеспечивается карбоксилатными группами полиамиона, входящими в комплекс в избытке и потому не участвующими в образовании солевых связей с белком. Уменьшение pH приводит к протонированию карбоксилатных групп, понижению отрицательного заряда комплексных частиц и, как следствие, к потере ими растворимости при достижении pH, соответствующего точке помутнения. При таком рассмотрении становится понятным, почему при увеличении ϕ , т.е. при уменьшении числа не скомпенсированных отрицательно заряженных карбоксилатных групп, комплекс перестает быть растворимым при более высоких значениях pH.

Из данных турбидиметрического титрования и результатов седиментационного анализа, приведенных на рис. 5 (правые ветви кривых 1 и 2 соответственно) видно, что введение соляной кислоты в смесь растворов ПМА* и лизоцима состава $\phi = 0.6$ при pH < 8 сопровождается накоплением нера-

творимых частиц, которое осуществляется в узком диапазоне pH и заканчивается количественным переходом ПМА* в осадок. При pH 6.7 белка в супернатанте также не обнаруживается. Добавление щелочи к осадку вызывало его растворение. Результаты седиментационного анализа, представленные правой ветвью кривой 2, практически не менялись от того, введением какого титранта достигалось изменение pH, что свидетельствует об обратимости фазовых переходов. Те же закономерности, а именно обратимость и количественное осаждение компонентов, наблюдались при pH-зависимых фазовых переходах в смесях ПМА с ПЭП [12]. Это подтверждает общность поведения обоих типов систем и правомерность рассмотрения pH-индуцируемого фазового разделения в смесях бессолевых растворов ПМА* и лизоцима, как обратимого осаждения-растворения нестехиометричного комплекса, образованного лиофилизирующим полианионом и блокирующими белком. Наблюдаемый полный перевод обоих компонентов комплекса в осадок наряду с продемонстрированной возможностью эффективного контроля pH фазового разделения делают подобные системы особенно привлекательными для практического применения.

Так же вели себя смеси бессолевых растворов ПМА* с химотрипсиногеном и рибонуклеазой. Как следует из сравнения представленных на рис. 6 фазовых диаграмм таких смесей с приведенной на том же рисунке фазовой диаграммой смеси растворов ПМА* и лизоцима, вид всех диаграмм одинаков, а что касается различий, то они невелики и носят количественный характер. Так, верхние ветви фазовых диаграмм смесей ПМА* с упомянутыми двумя белками смешены в нейтральные среды, что согласуется с понижением устойчивости комплексов при переходе от лизоцима к химотрипсиногену и рибонуклеазе, которые существуют только при pH < 10.6.

Причина разной устойчивости комплексов в щелочных средах очевидна. Поскольку их диссоциация в этой области pH вызывается депротонированием аминогрупп положительно заряженных партнеров, находящихся вблизи ионизированного ПМА*, для различных белков она определяется величиной их рI. Что касается диссоциации комплексов в сильнокислых средах, то она обусловлена протонированием карбоксилатных групп полианиона ПМА*, входящего в состав комплекса. При этом вплоть до полного разделения компонентов полианион находится поблизости от своего партнера, испытывая влияние электростатического поля, создаваемого его протонированными аминогруппами. Такое влияние сводится к зарядению полиани-

она на положительно заряженной макромолекуле, т.е. является фактором, стабилизирующим полиэлектролитный комплекс и смещающим его диссоциацию в более кислые среды [1].

Очевидно, что эффективность такого воздействия определяется количеством протонированных аминогрупп на партнере, их распределением по цепи и конформацией цепи. При замене ПЭП на лизоцим область полного разрушения комплекса с ПМА* сдвигается из сильнокислых (pH 2.1) в слабокислые среды почти на единицу pH (pH 3.05, таблица), свидетельствуя о гораздо более слабом влиянии протонированных аминогрупп белка на полианион и, как следствие, на образование менее упорядоченной системы солевых связей в комплексе. По всей вероятности, жесткая фиксация относительно немногочисленных положительных зарядов на поверхности белковых глобул не способствует формированию достаточно протяженных последовательностей ионных пар, как это имеет место при образовании комплекса с гибким поликатионом ПЭП.

Результаты аналогичных опытов, проделанных с другими белками, подтверждают данное предположение, хотя в зависимости от индивидуального сродства белка к полианиону положение критических областей может меняться. Так, замена лизоцима на химотрипсиноген и рибонуклеазу вызывала понижение pH разрушения комплексов в кислых средах от 3.05 до 2.65 и 2.55 соответственно (таблица); это сопровождалось ожидаемым понижением pH-границы фазового разделения, которое уменьшалось от 4.0 для лизоцима до 2.80 для двух других белков (рис. 6). Тем не менее, даже наиболее стабильный комплекс с рибонуклеазой заметно (на половину единицы pH) уступал в устойчивости комплексу ПМА* с ПЭП, что согласуется с приведенными выше соображениями об относительном ограничении полиэлектролитного взаимодействия белка с полианионом, обусловленном глобулярной конформацией белка.

Рассмотрим теперь полученную при pH 9.0 фазовую диаграмму водно-солевых растворов смеси ПМА* и лизоцима, которая приведена на рис. 7 в виде зависимостей концентраций хлористого натрия, соответствующих точкам помутнения, от состава смеси ф. Верхняя и нижняя ветви диаграммы ограничивают гетерогенную область. По виду она напоминает фазовую диаграмму смесей водно-солевых растворов ПМА* и ПЭП [12], будучи замкнута слева и расширяясь по мере продвижения вправо по оси абсцисс. Нисходящая нижняя ветвь свидетельствует о том, что фазовое разделение в этой области, соответствующей относительно невысоким ионным сила姆 раствора,

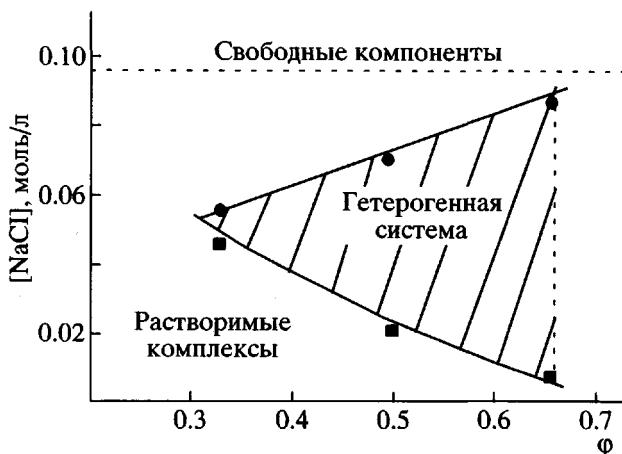


Рис. 7. Фазовая диаграмма водно-солевых растворов ПМА* и лизоцима, полученная турбидиметрическим титрованием смесей различного состава ϕ раствором NaCl при pH 9.0.

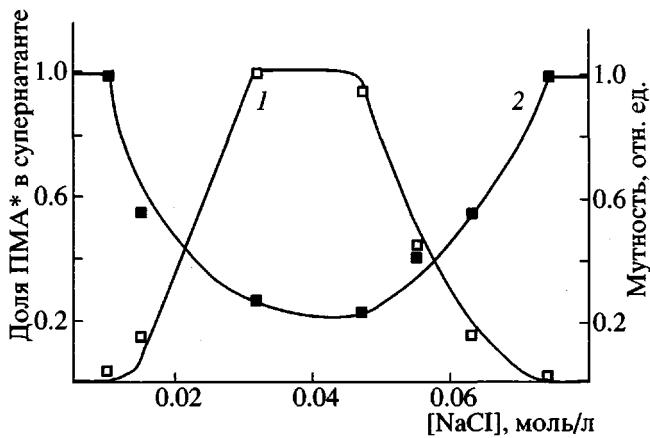


Рис. 8. Зависимости мутности (1) и доли оставшегося в супернатанте ПМА* (2) в смеси растворов ПМА* и лизоцима состава $\phi = 0.6$ при pH 9.0 от концентрации хлористого натрия.

контролируется изменением состава ϕ . Контроль сводится к хорошо известному для НПЭК [1] сужению области существования растворимых комплексов с ростом ϕ , т.е. по мере увеличения в них относительного содержания блокирующего компонента.

Седиментационные исследования гетерогенных смесей ПМА* и лизоцима подтвердили общность механизмов фазового разделения в водно-солевых растворах обоих типов комплексов. Результаты седиментационного анализа смеси компонентов состава $\phi = 0.6$, проведенного при pH 9.0 и различной концентрации соли представлены на рис. 8 (кривая 2). Видно, что даже при максимальной глубине осаждения, фиксируемой кривой турбидиметрического титрования (кри-

вая 1), не удается добиться полного перевода полииона в осадок, как при pH-индукционном фазовом разделении в этой же смеси в отсутствие соли (рис. 5). Так же осуществляется фазовое разделение при введении соли в растворы НПЭК [1]. Это сходство является еще одним весомым аргументом в пользу правомерности рассмотрения белок-полиэлектролитных комплексов как аналогов НПЭК и позволяет использовать изученные механизмы фазового разделения в растворах НПЭК [13] для объяснения фазового поведения смесей растворов белков и полионов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Кабанов В.А. // Высокомолек. соед. А. 1994. Т. 36. № 2. С. 183.
2. Кабанов А.В., Кабанов В.А. // Высокомолек. соед. А. 1994. Т. 36. № 2. С. 198.
3. Izumrudov V.A., Galaev I.Yu, Mattiasson B. // Bioseparation. 1999. V. 7. P. 207.
4. Kabanov V.A., Zezin A.B., Rogacheva V.B., Gulyaeva Zh.G., Zansochova M.F., Joosten J.G.H., Brackman J. // Macromolecules. 1999. V. 32. № 6. P. 1904.
5. Izumrudov V.A. // Ber. der Deutsc. Buns., Phys. Chem. 1996. B. 100. S. 1017.
6. Xia J., Dubin P.L. // Macromolecular Complexes in Chemistry and Biology / Ed. by Dubin P.L. Berlin; Heidelberg: Springer-Verlag, 1994. Ch. 15. P. 247.
7. Izumrudov V.A., Kargov S.I., Zhiryakova M.V., Zezin A.B., Kabanov V.A. // Biopolymers. 1995. V. 35. P. 523.
8. Izumrudov V.A., Zhiryakova M.V. // Macromol. Chem. Phys. 1999. V. 200. P. 2533.
9. Izumrudov V.A., Zhiryakova M.V., Kudaibergenov S. // Biopolymers (Nucleic Acid Sciences). 2000. V. 52. № 2. P. 94.
10. Ануфриева Е.В., Паутов В.Д., Кузнецова Н.П., Луцк В.Б., Краковяк М.Г. // Высокомолек. соед. А. 1987. Т. 29. № 3. С. 593.
11. Park J.M., Muhoberac B.B., Dubin P.L., Xia J. // Macromolecules. 1992. V. 25. № 1. P. 290.
12. Margolin A.L., Sherstyuk S.F., Izumrudov V.A., Zezin A.B., Kabanov V.A. // Eur.J.Biochem. 1985. V. 146. P. 625.
13. Изумрудов В.А., Лим С.Х. // Высокомолек. соед. А. 1998. Т. 40. № 3. С. 459.

Controlled Phase Separations in Solutions of Poly(methacrylate) Anion Complexes with Globular Proteins

V. A. Izumrudov and San Khuyn Lim

*Faculty of Chemistry, Moscow State University,
Leninskie gory, Moscow, 119899 Russia*

Abstract—Factors influencing dissociation and phase separation in solutions of complexes formed between a fluorescently labeled poly(methacrylate) anion and globular proteins: lysozyme, chymotrypsinogene, and ribonuclease were studied by the methods of fluorescence quenching and turbidimetric titration. It was shown that the behavior of these complexes and water-soluble nonstoichiometric polyelectrolyte complexes of oppositely charge polyions follows a general trend. It was demonstrated that approaches evolved in the study of nonstoichiometric polyelectrolyte complexes are beneficial for obtaining soluble protein–polyelectrolyte complexes undergoing phase separation in the desired ranges of pH and ionic strength of solutions.