

ВЫСОКОМОЛЕКУЛЯРНЫЕ СОЕДИНЕНИЯ

УДК 541.1

КОЛЛАПС ПОЛИАКРИЛАТНОГО ГЕЛЯ ПРИ ВЗАИМОДЕЙСТВИИ С ПРОТИВОПОЛОЖНО ЗАРЯЖЕННЫМИ БЕЛКАМИ

В.Б. Скобелева, Д.И. Ковригин, В.Б. Рогачева, А.Б. Зезян

(кафедра высокомолекулярных соединений)

Изучено влияние простых солей на коллапс сильно набухшей полимерной сетки и макроскопическое фазовое разделение при взаимодействии слабосшитого полиакрилатного геля с противоположно заряженным белком - цитохромом *c*. С помощью микрофотометрического метода исследования показано, что характер транспорта белка и распределение его в противоположно заряженном геле определяется степенью контракции сетки в результате интерполиэлектrolитной реакции сетчатый полиэлектролит – белок.

В последние годы большой интерес исследователей вызывает явление коллапса заряженных полимерных сеток при их взаимодействии с противоположно заряженными линейными полиионами и ионами поверхностно-активных веществ (ПАВ) в водных средах [1 – 4]. Существенно, что в отличие от классического коллапса под влиянием температуры [5], состава растворителя [6] и др. сорбция линейных полиионов и ионов ПАВ противоположно заряженными сетчатыми полиэлектролитами (СПЭ) сопровождается локализованным коллапсом геля. Другими словами, гель претерпевает коллапс в зоне реакции между СПЭ и противоположно заряженным полиионом или ПАВ. Поскольку эти реакции протекают как фронтальные процессы, начинающиеся с периферии образца геля, в результате возникают макроскопически гетерогенные системы типа “ядро – оболочка”, в которых коллапсирует оболочка. Недавно такое же макроскопическое фазовое разделение мы обнаружили при изучении взаимодействия слабосшитого высоконабухшего сетчатого полиакрилата натрия (СПАНа) с противоположно заряженными белками – цитохромом *c*, лизоцимом и протамином в водных бессолевых средах [7]. Очевидно, что исследование механизма переноса белков в химически комплементарных гелях и факторов, управляющих такими процессами, имеет принципиальное значение для понимания физико-химических механизмов активированного транспорта белков в живых системах, а также для дизайна различных функциональных систем на основе иммобилизованных в противоположно заряженных гелях белков, в том числе ферментов.

В данной работе изучено влияние простых солей на характер взаимодействия цитохрома *c* с полиакрилатной сеткой, а также распределение белка в продуктах незавершенных реакций. Цитохром *c* – глобулярный белок неболь-

шой молекулярной массы, окрашенный в водных средах в красный цвет. Окраска белка позволяет визуально наблюдать за движением красного фронта белка в фазе геля.

Гель полиакриловой кислоты (ПАК) синтезировали радикальной сополимеризацией акриловой кислоты (АК) в 10%-м водном растворе с N,N' -метилен-бис-акриламидом (4% от массы мономера) в качестве сшивателя и персульфатом аммония $(NH_4)_2S_2O_8$ (0.2 мас.% от АК) и метабисульфитом натрия $Na_2S_2O_5$ (0.2 мас.% от АК) в качестве инициатора [8]. Полимеризацию вели в течение суток при комнатной температуре. Полученный гель ПАК нейтрализовали раствором NaOH или $N(CH_3)_4OH$ и отмывали водой до установления постоянной величины набухаемости при pH 8 – 9. Набухаемость H определяли как $H = (m_n - m_c)/m_c$, где m_n – масса набухшего образца, m_c – масса сухого образца.

В работе использовали цитохром *c* сердца лошади (фирма “Sigma”, США) молекулярной массы $M = 12384$, изоэлектрическая точка (ИЭТ) = 10.3.

Распределение цитохрома *c* в образцах геля определяли, фотометрируя поперечные срезы образцов поликомплексных гелей толщиной 2 мм при помощи микрофотометра “МФ-4” (Россия). Фотометрирование проводили, как показано на схеме I, лучом света от лампы накаливания без фильтра (размеры щели 0.5 мм x 10 мм) вдоль линии O – A, параллельной грани исходного образца и проходящей через его центр – точку A.

Ранее [7] мы показали, что цитохром *c*, лизоцим и протамин эффективно сорбируются из водных растворов СПАНа в широком интервале концентрации NaCl с образованием интерполимерного комплекса (ИПК), в котором белок и сетка связаны солевыми связями. При недостатке белка в окружающем геле растворе сорбция протекает практически до полного его исчерпания – равновесные

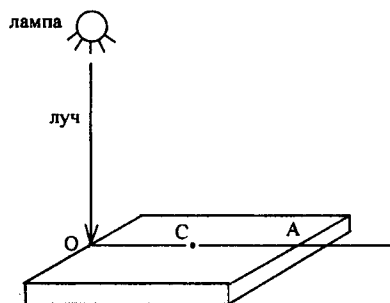


Схема I

концентрации не превышают $10^{-6} - 10^{-7}$ моль/л (концентрацию белка здесь и далее будем выражать в расчете на моль глобул белка.) Состав образующихся ИПК определяется степенью диссоциации белка и полиэлектролитной сетки и не зависит от соотношения компонентов в реакционной смеси.

В данной работе было изучено распределение цитохрома *c* в продуктах незавершенных реакций полиакрилатного геля с белком. Сорбцию цитохрома *c* полиакрилатной сеткой проводили в нейтральных водных средах, содержащих различное количество NaCl или $N(CH_3)_4Cl$ (концентрацию соли варьировали в пределах 0 – 0.08 N). Использовали образцы исходного равновесно набухшего в соответствующих солевых средах полиакрилатного геля в форме параллелепипеда с размером ребра 12 – 18 мм и массой 3.9 г для системы СПАНа – NaCl и с размером ребра 9 – 12 мм и массой 1 г для системы $SPAN(CH_3)_4 - N(CH_3)_4Cl$. Во всех случаях степень превращения (*F*) в интерполимерной реакции (ИПР) составляла 0.2. Здесь *F* – количество белка, поглощенного образцом геля, отнесенное к максимальному количеству белка, которое способен поглотить гель при заданных условиях (рН и концентрация соли). Образцы частично превращенных гелей выдерживали в равновесных растворах в течение определенного времени, затем делали срезы для фотометрирования.

На рис. 1, 2 приведены фотометрические кривые таких срезов в терминах зависимости относительной оптической плотности D/D_{\max}^* от расстояния *r*, которое отсчитывали от края среза исследуемого образца вдоль линии O–C (см. схему I). Исходный равновесно набухший гель полностью прозрачен. Кривые 1 – 6 на рис. 1 отвечают фотометрированию образцов продуктов незавершенных реакций между СПАНа и цитохромом *c* полученных в растворах NaCl различных концентраций (рис. 1). Конеч

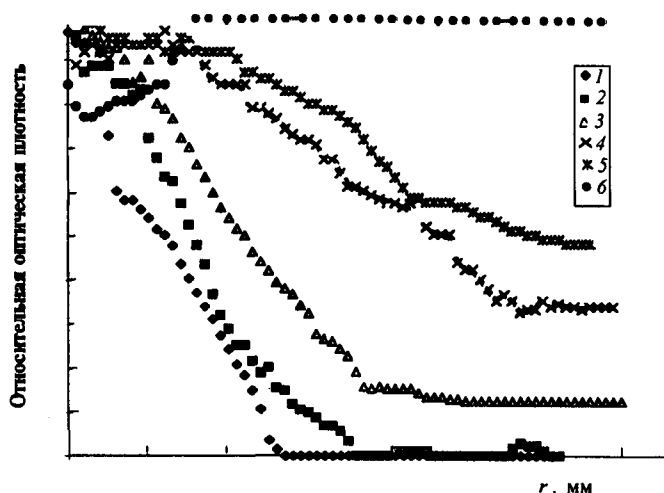


Рис. 1. Кривые фотометрирования срезов гелевых образцов продуктов незавершенных ИПР между СПАНа и цитохромом *c* при различных C_{NaCl} (моль/л): 1 – 0, 2 – 0.01, 3 – 0.02, 4 – 0.04, 5 – 0.06, 6 – 0.08 (рН 7, $T = 20^\circ$)

каждой кривой соответствует центру среза образцов. На оптическую плотность ИПК наряду с характеристическим поглощением цитохрома *c* при длине волны 409 нм влияет также и рассеяние света от слабонабухающего ИПК. Последнее обстоятельство не позволяет преобразовать фотометрические кривые в кривые распределения цитохрома *c* по образцу. Тем не менее кривые 1 – 6 на рис. 1 ясно отражают изменение характера распределения белка в продуктах незавершенных ИПР от ступенчатого (кривые 1 и 2) до равномерного (кривая 6). Ступенчатый характер распределения цитохрома *c* соответствует наличию резкой границы между превращенной в ИПК периферийной частью образца, содержащей весь сорбированный цитохром *c* и внутренней частью образца, не содержащей белка и не отличающейся по оптическим характеристикам от исходного геля.

Такая картина наблюдается для образцов, полученных при сорбции белка СПАНа в бессолевых средах или растворах с низкой концентрацией NaCl (ниже 0.02 N), как показано на схеме II.

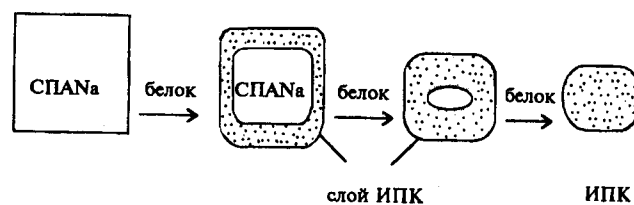


Схема II

* $D = -\lg(I/I_0)$, где *I* – интенсивность света, прошедшего через срез образца, I_0 – интенсивность света, прошедшего через инверсионную среду (водный или водно-солевой раствор), D_{\max} – максимальное значение оптической плотности для каждого образца

При увеличении концентрации соли до 0.02 N NaCl и выше (кривые 3 – 6 на рис.1) наблюдается прокрашивание всего образца геля. При этом в зависимости от концентрации NaCl распределение белка в объеме образца оказывается различным. Так, при концентрации соли 0.02 – 0.06 N наблюдается явно выраженный градиент концентрации белка (кривые 3 – 5), а при концентрации NaCl = 0.08 N образец геля прокрашивается равномерно (кривая 6). Кривые 1 – 6 на рис.1 получены после выдерживания образцов в течение двух недель. При дальнейшем выдерживании образцов в равновесных растворах (в течение 3 – 4 недель), распределение белка в гелевых образцах, полученных при $C_{NaCl} = 0 - 0.01N$, сохраняется (микрофотометрические кривые совпадают с кривыми 1, 2 на рис.1). В образцах, полученных при $C_{NaCl} = 0.02 - 0.06 N$, с течением времени наблюдается все более и более равномерное распределение цитохрома *c* (микрофотометрические кривые приближаются к кривой 6 на рис.1).

Изменение характера распределения белка в сетке (от ступенчатого до равномерного) наблюдается и при выдерживании продуктов незавершенной ИПР между СПАNa и цитохромом *c*, полученных в бессолевой среде, в водных растворах NaCl, $C_{NaCl} > 0.02N$. При этом делая срезы гелевого образца через определенные промежутки времени можно визуальнo или микрофотометрически проследить постепенное размывание границы ИПК – свободный СПАNa. Прокрашивание всего объема геля ($m = 3.9$ г) происходит за 2 – 4 недели, т.е. перераспределение белка по всему объему образца – процесс медленный по сравнению с сорбцией белка гелем. Показано, что общая ско-

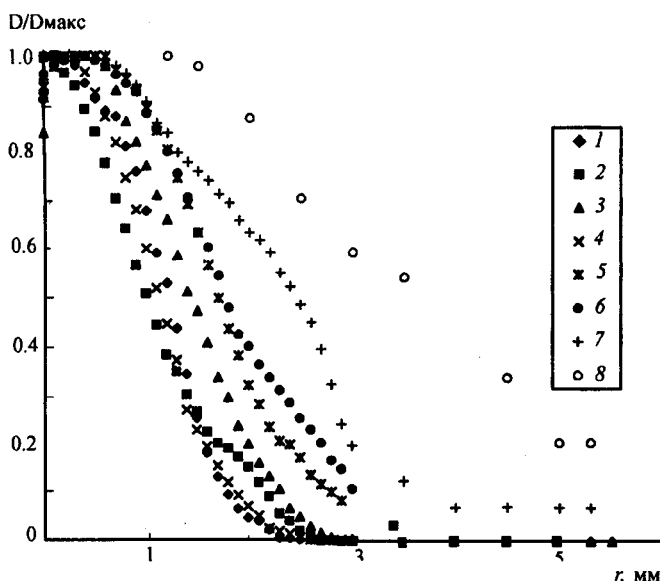


Рис. 2. Кривые фотометрирования срезов гелевых образцов продуктов незавершенных ИПР между СПАН(CH₃)₄ и цитохромом *c* при различных $C_{СПАН(CH_3)_4}$ (моль/л): 1 – 0.01, 2 – 0.02, 3 – 0.03, 4 – 0.05, 5 – 0.06, 6 – 0.07, 7 – 0.08, 8 – 0.08 (рН 7, T = 20°)

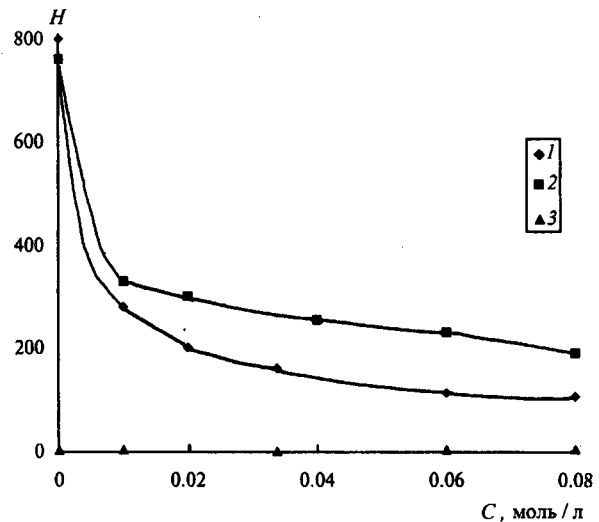


Рис.3. Зависимости набухаемости (*H*) от концентрации низкомолекулярной соли в растворе для: 1 – СПАNa, 2 – СПАН(CH₃)₄, 3 – ИПК СПА – цитохром *c*

рость сорбции белка гелем достаточно высока (образец геля $m = 3.9$ г превращается в ИПК за четверо суток).

Таким образом, при проведении сорбции цитохрома *c* СПАNa и в бессолевых и в водно-солевых средах в продуктах незавершенных реакций имеется более или менее резкая граница между ИПК и СПАNa. Однако, если в бессолевых средах эта граница сохраняется сколь угодно долго при выдерживании образца в воде, то в водно-солевых средах при $C_{NaCl} > 0.02N$ она со временем размывается, и равновесное состояние образца отвечает равномерному распределению белка в объеме геля. Такое перераспределение белка по объему геля в последнем случае не связано с разрушением ИПК СПАNa – цитохром *c* и переходом к пассивной диффузии белка в химически инертной среде. В предыдущей работе [7] нами было показано, что ИПК СПАNa – цитохром *c* стабилен вплоть до $C \approx 0.12 N$. Таким образом, во всем изученном интервале $C_{NaCl} = 0 - 0.08 N$ сорбция белка представляет собой активированный перенос с образованием в фазе геля химического соединения – ИПК. Однако характер сорбции (наличие резкого фронта или постепенное размывание границы) существенно зависит от концентрации соли в растворе.

Можно думать, что тот или иной характер распределения белка в продуктах незавершенных реакций связан с особенностями коллапса полиэлектролитной сетки в результате взаимодействия с белком. Поэтому нами изучено влияние концентрации соли на степень контракции полиакрилатной сетки при взаимодействии с цитохромом *c* в водно-солевых средах.

На рис.3 представлены зависимости набухаемости исходного геля СПАNa (кривая 1) и ИПК СПА – цитохром *c*

(кривая 3) от концентрации NaCl в растворе. Как видно из рис.3, в бессолевых водных растворах значения набухаемости исходных гелей и ИПК различаются более чем на два порядка. В интервале $C_{\text{NaCl}} = 0 - 0.02 \text{ N}$ наблюдается резкое уменьшение $H_{\text{СПАНа}}$, в то же время $H_{\text{ИПК}}$ остается практически неизменной. Таким образом, при $C_{\text{NaCl}} > 0.02 \text{ N}$ значения набухаемости исходного геля и ИПК различаются мало, другими словами, в этих средах степень контракции сетки при взаимодействии с белком невысока. При сопоставлении этих данных с характером распределения цитохрома *c* в продуктах незавершенных ИПР оказывается, что в средах, в которых наблюдается ярко выраженное диспропорционирование в продуктах незавершенных ИПР, взаимодействие СПАНа с цитохромом *c* сопровождается сильной контракцией образца (масса образца уменьшается более чем на порядок). В солевой среде ($C_{\text{NaCl}} > 0.02 \text{ N}$) взаимодействие менее набухшего в этих условиях полиакрилатного геля с белком сопровождается незначительной контракцией образца. И именно в этих условиях наблюдается более или менее равномерное распределение белка в продуктах незавершенных реакций.

Очевидно, набухаемость полиэлектролитной сетки зависит не только от концентрации низкомолекулярной соли в системе, но и химической природы малых ионов. На рис. 3 (кривая 2) приведена зависимость $\text{СПАН}(\text{CH}_3)_4$ от концентрации $\text{N}(\text{CH}_3)_4\text{Br}$ в растворе. Как видно из рис. 3, при замене в системе NaCl на $\text{N}(\text{CH}_3)_4\text{Br}$ удастся увеличить набухаемость исходного полиакрилатного геля при постоянной ионной силе среды. Более высокая набухаемость геля СПАНа объясняется тем, что катион Na^+ значительно сильнее связывается с карбоксилат-анионом чем катион $\text{N}(\text{CH}_3)_4^+$ [9] и оказывает более сильное экранирующее действие.

Следовательно, катион тетраметиламмония является слабым конкурентом в ИПР по сравнению с катионом натрия. Исследования стабильности ИПК $\text{СПАН}(\text{CH}_3)_4$ -цитохром *c* в водных растворах $\text{N}(\text{CH}_3)_4\text{Br}$ показали, что ИПК устойчив в водных растворах вплоть до $C_{\text{N}(\text{CH}_3)_4\text{Br}} \approx 0.25 \text{ N}$.

Увеличение набухаемости исходного геля приводит к существенному расширению интервала концентрации соли, в котором ИПР СПА – цитохром *c* имеет фронтальный характер. Из рис.2 видно, что распределение белка в продуктах незавершенных ИПР с $\text{СПАН}(\text{CH}_3)_4$ соответствует ступенчатому в интервале $C_{\text{N}(\text{CH}_3)_4\text{Br}} = 0 - 0.07 \text{ N}$ (кривые 1–6). При $C_{\text{N}(\text{CH}_3)_4\text{Br}} = 0.08 \text{ N}$ начинается размывание границы между превращенной в ИПК внешней частью образца и внутренней областью (кривая 7). Кривые 1–7 получены микрофотометрированием срезов гелевых образцов, предварительно выдержанных в равновесных растворах в

течение 15 сут. При дальнейшем выдерживании образцов в равновесных растворах в течение 1–2 недель перераспределения цитохрома *c* в образцах, полученных в средах с $C_{\text{N}(\text{CH}_3)_4\text{Br}} = 0 - 0.07 \text{ N}$, не происходит (микрофотометрические кривые таких образцов совпадают с кривыми 01–6). Однако в гелевом образце продукта незавершенной ИПР $\text{СПАН}(\text{CH}_3)_4$ с цитохромом *c*, полученном при $C_{\text{N}(\text{CH}_3)_4\text{Br}} = 0.08 \text{ N}$, граница между слоем ИПК $\text{СПАН}(\text{CH}_3)_4$ – цитохром *c* и внутренней частью непрореагировавшего $\text{СПАН}(\text{CH}_3)_4$ еще больше размывается. Микрофотометрические данные, полученные для такого образца через 4 недели, представлены на рис.3, кривая 8 и соответствуют более или менее равномерному прокрашиванию белком всего образца геля.

Таким образом, характер переноса полиионов в противоположно заряженных сетках определяется величиной контракции сетки в результате ИПР. Чем выше контракция, тем ярче выражен фронтальный характер интерполиэлектrolитной реакции и в продуктах незавершенной ИПР наблюдается локализованный коллапс. Фронтальный характер ИПР непосредственно связан с энтропийной упругостью набухшей полимерной сетки. Ситуация, при которой в продукте незавершенной реакции контракции подвергается только часть геля, оказывается термодинамически предпочтительной. Действительно, проигрыш конформационной энтропии системы при диспропорционировании должен быть существенно меньше, чем в случае равномерного распределения пенетранта в сетке, поскольку в последнем случае контракции должен подвергнуться весь объем образца.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Рогачева В.Б., Превыш В.А., Зезин А.Б., Кабанов В.А. // Высокомолек.соед. 1988. 30. С. 2120.
2. Рябина В.Р., Стародубцев С.Г., Хохлов А.Р. // Высокомолек.соед. 1990. 32. С. 969.
3. Хохлов А.Р., Стародубцев С.Г., Василевская В.В. Conformational Transitions in Polymer Gels: Theory and Experiment. Adv.Polym.Sci., 1993, 109-123.
4. Хандурина Ю.В., Рогачева В.Б., Зезин А.Б., Кабанов В.А. // Высокомолек.соед.1994. 36. С. 229.
5. Akiya T., Tanaka T.// Macromolecules. 1987. 20. P.1162.
6. Tanaka T.// Phys. Rev. Lett. 1978. 40. P. 820.
7. Карабанова В.Б., Рогачева В.Б., Зезин А.Б., Кабанов В.А. // Высокомолек.соед. 1995. 37. С.1861.
8. Чупатов А.М., Рогачева В.Б., Зезин А.Б., Кабанов В.А. // Высокомолек.соед. 1994. 36. С. 212.
9. Пергушов Д.В., Изумрудов В.А., Зезин А.Б., Кабанов В.А. // Высокомолек.соед. 1993, 35. С. 844.