

ОПТИКА И СПЕКТРОСКОПИЯ

УДК 532.577.11; 537.635

**ИССЛЕДОВАНИЕ ОСОБЕННОСТЕЙ СОРБЦИИ ИОНОВ КОБАЛЬТА
В ВОДНЫХ РАСТВОРАХ СЫВОРОТОЧНОГО АЛЬБУМИНА****Ю. М. Петрусевиц, Г. П. Петрова, А. М. Макуренков, А. В. Бойко***(кафедра медицинской физики; кафедра молекулярной физики)*

E-mail: petrus@phys.msu.su

Методом ЯМР-релаксации изучены процессы сорбции ионов кобальта на поверхности макромолекул альбумина в его водных растворах. Определено число центров сорбции и произведена оценка энергии адсорбции. Методом динамического рассеяния света измерены диффузионные коэффициенты макромолекулярных кластеров альбумина, образующихся в присутствии ионов кобальта.

Введение

В настоящее время одной из наиболее актуальных проблем медицинской биофизики является изучение белков как основного составного элемента живой природы и, в частности, их водных растворов. Макромолекулы белков и биополимеров являются уникальными для исследования с помощью методов молекулярной оптики. Поверхность белковой молекулы содержит многочисленные заряженные группы, причем величину заряда можно изменять в широких пределах, путем изменения pH раствора. Кроме того, размеры и масса белковой макромолекулы строго определены для каждого вида белка. Сильное электростатическое взаимодействие между молекулами белка оказывает существенное влияние на характер броуновской динамики молекул. Последние играют чрезвычайно важную роль в функционировании различных биосистем. С точки зрения экологии и медицины представляет интерес изучение влияния ионов металлов на растворы белков.

В человеческом организме различные металлы играют весьма важную роль. Основными из них являются натрий, калий, кальций, магний, содержащиеся в человеческом теле в количестве от десятых долей до нескольких процентов. Такие металлы, как кобальт, молибден, цинк и др., присутствуют в организме в гораздо меньших концентрациях и существуют в связанном состоянии с ферментами, их совокупное содержание составляет менее процента. В больших количествах многие из этих металлов токсичны.

Известно, что белковые макромолекулы (протеины) при определенных условиях, например, в присутствии ионов металлов, образуют надмолекулярные структуры, при этом кроме молекул протеина в растворах появляются их агрегаты — дипольные кластеры [1, 2].

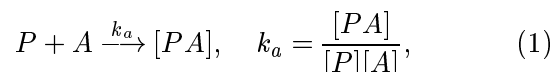
В данной работе была поставлена задача изучить процессы взаимодействия ионов (в частности иона кобальта Co^{2+}) с бычьим сывороточным альбуми-

ном (БСА) в растворе, приводящие к сорбции ионов на поверхности белка, а также к агрегации макромолекул. Для исследования использовались методы ЯМР и динамического светорассеяния.

**1. Уравнение Скэтчарда и теория сорбции
в растворе**

По теории сорбции газов Ленгмюра [3] считается, что молекулы газа адсорбируются на поверхности монослоем. Характеристикой этого процесса является параметр сорбции Ленгмюра $\vartheta = \frac{n_a}{n_f}$, где n_a и n_f — общие количества адсорбированных и свободных молекул соответственно.

Процессы установления равновесия адсорбции в растворе описываются следующим образом:



где P — концентрация протеина, A — концентрация иона металла, k_a — константа адсорбции. Следующие соотношения, написанные Скэтчардом [4], связывают параметр Ленгмюра ϑ и параметр Скэтчарда r :

$$c_m = [PA] + [P], \quad [PA] + k_a n [A][PA] = k_a n [A] c_m, \\ r = n\vartheta = \frac{[PA]}{c_m}. \quad (2)$$

Здесь c_m — исходная концентрация протеина, а n — число центров сорбции. Из уравнения (2) следует линейная зависимость между параметром Скэтчарда и параметром сорбции Ленгмюра. При этом r можно записать в виде

$$r = \frac{k_a [A] n}{1 + k_a [A]}. \quad (3)$$

Видно, что зависимость параметра Скэтчарда r от концентрации иона $[A]$ имеет вид изотермы

Ленгмюра. Окончательно уравнение Скэтчарда записывается следующим образом:

$$\frac{r}{[A]} = nk_a - rk_a. \quad (4)$$

При наличии центров сорбции различной природы уравнение Скэтчарда выражается суммой

$$r = \sum_i \frac{n_i k^i [A]}{1 + k^i [A]}. \quad (5)$$

2. Метод ЯМР-релаксации и молекулярная сорбция

Метод импульсного ЯМР используется в науке уже более тридцати лет и зарекомендовал себя как удобный, быстрый и точный способ обнаружения содержания протонов в растворах и твердых телах. Он позволяет по времени релаксации сигнала определить не только спектр, но и молекулярную подвижность, а также молекулярную сорбцию.

В настоящей работе методом ЯМР-релаксации определялись параметры сорбции парамагнитного иона Co^{2+} на поверхности макромолекулы альбумина. Измеряемая величина скорости спин-решеточной релаксации R_1 может быть представлена в виде следующей суммы:

$$R_1 = (R_1)_0 + p(R_1)_1, \quad (6)$$

где $(R_1)_0$ — скорость спин-решеточной релаксации водного раствора в отсутствие ионов Co , а $(R_1)_1$ характеризует дополнительную релаксацию при наличии ионов кобальта. При этом p характеризует коэффициент сорбции парамагнитного иона на поверхности макромолекулы. Таким образом, из двух измерений можно определить величину $\Delta(R_1)$, по которой рассчитывается коэффициент сорбции:

$$\Delta(R_1) = (R_1)_1 - (R_1)_0 = p(R_1)_1, \quad (7)$$

$$p = c_m \frac{k_a n}{1 + k_a [A]}. \quad (8)$$

Величина параметра Скэтчарда записывается в виде

$$r = \frac{p}{c_m} = \frac{k_a n}{1 + k_a [A]}. \quad (9)$$

Экспериментальная кривая зависимости скорости продольной ЯМР-релаксации представлена на рис. 1 как функция концентрации ионов Co в растворе для двух значений концентрации макромолекул альбумина. На обоих графиках (рис. 1, кривые 2, 3) видна область основной сорбции парамагнитного иона кобальта. Рост скорости релаксации при появлении свободного иона в растворе подтверждается сравнением с графиком для скорости релаксации иона Co в отсутствие белка (рис. 1, кривая 1).

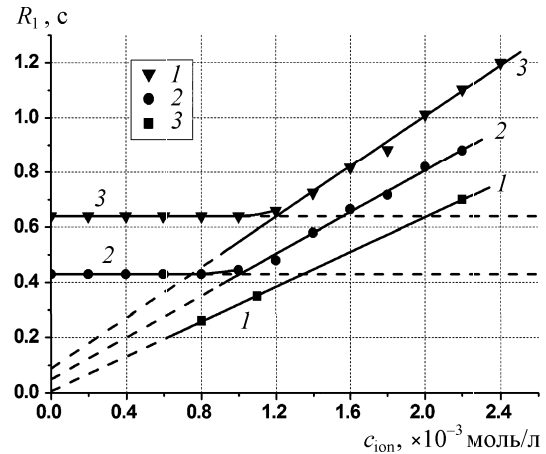


Рис. 1. Зависимости скорости релаксации R_1 парамагнитного иона Co^{2+} от его концентрации $c_{\text{ион}}$ в растворе при pH 7.0 для различных концентраций альбумина $c_m = 0\%$ (1), 5% (2) и 10% (3)

Последовательность графических расчетов по уравнениям (5)–(9) приводит к окончательному результату в координатах Скэтчарда, представленному на рис. 2. Из этого графика следует, что число центров сильной сорбции иона кобальта на поверхности альбумина составляет величину близкую к единице. Кроме того, обнаруживается область слабой сорбции иона Co^{2+} с числом центров сорбции на порядок большей величины. Эти центры имеют различные значения констант связывания и соответственно различную энергию сорбции.

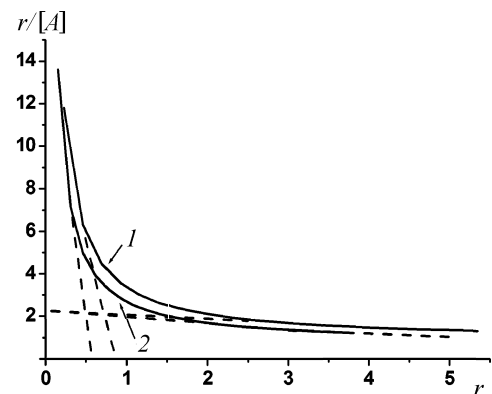


Рис. 2. График сорбции ионов кобальта на альбумине в координатах Скэтчарда. Концентрация макромолекул альбумина $c_m = 5\%$ (1) и 10% (2)

3. Метод динамического рассеяния света

Методом динамического рассеяния света определялись размеры макромолекулярных кластеров, образующихся при сорбции ионов металла и исследовалась зависимость размера кластеров от поверхностного заряда альбумина.

Динамическое рассеяние света, также как и статическое рассеяние, связано с флуктуациями концентрации рассеивающих частиц [5]. Для растворов макромолекул в этом случае возможно написать корреляционную функцию $c(t)$, описывающую мо-

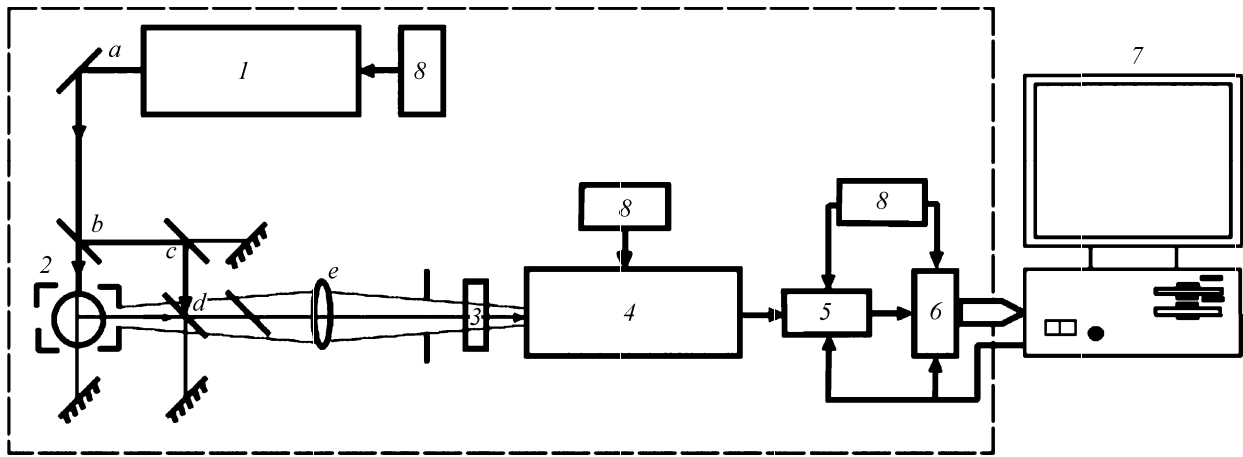


Рис. 3. Схема установки для исследования динамического светорассеяния: 1 — лазер; 2 — кювета с раствором; 3 — фильтр; 4 — фотоумножитель; 5 — усилитель; 6 — коррелятор с PCI-интерфейсом; 7 — IBM PC; 8 — блоки питания

лекулярное броуновское движение:

$$c(t) = a \langle E^*(0)E(t) \rangle. \quad (10)$$

Соответствующий метод определения $c(t)$ называется методом корреляции фотонов. Схема установки для исследования динамического рассеяния света приведена на рис. 3. Луч лазера (1) попадает через зеркало (a) на зеркало (b) с малым коэффициентом отражения, за счет чего образуются два луча. Часть прошедшего сквозь зеркало излучения рассеивается в кювете с раствором (2) под углом 90° и линзой (e) фокусируется на катоде ФЭУ (4). Отраженный опорный луч через зеркала (c) и (d) также попадает на катод ФЭУ, где смешивается с рассеянным лучом и регистрируется гетеродинным методом. Автокорреляционная функция интенсивности, получаемая с помощью коррелятора, затем обрабатывается компьютером (7).

Корреляционная функция в случае раствора макромолекул, совершающих трансляционное броуновское движение с диффузионным коэффициентом D и волновым вектором $q = 2\pi/\lambda$ выглядит следующим образом:

$$c(t) = c_0 \exp[-t/\tau]. \quad (11)$$

В случае частиц различных по массе имеем сумму таких экспонент:

$$c(t) = \sum c_{0i} \exp[-t/\tau_i], \quad (12)$$

где $\tau_i = 1/D_i q^2$. При этом

$$D = kT/6\pi\eta R_i, \quad \tau_i = \frac{6\pi\eta R_i}{kTq^2}, \quad (13)$$

где R_i — радиус i -й частицы, а η — вязкость раствора. Программа обработки данных позволяет рассчитать величины гидродинамических радиусов рассеивающих частиц. Из последней формулы (13) следует линейная связь между измеренным временем релаксации τ_i и радиусом частицы R_i . Из рис. 4 видно, что логарифм корреляционной функции можно аппроксимировать двумя прямыми, что свидетельствует о наличии двух типов частиц с различны-

ми радиусами. Вероятнее всего это макромолекулы альбумина и образованные из них кластеры.

Результаты эксперимента, полученные методом динамического светорассеяния в растворе альбумин + $\text{CoCl}_2 + \text{H}_2\text{O} + \text{HCl}$ ($M = 0.015$), проведенного при различных pH, представлены на рис. 5, a, где показано изменение величины относительного размера дипольных кластеров R_c/R_m ,

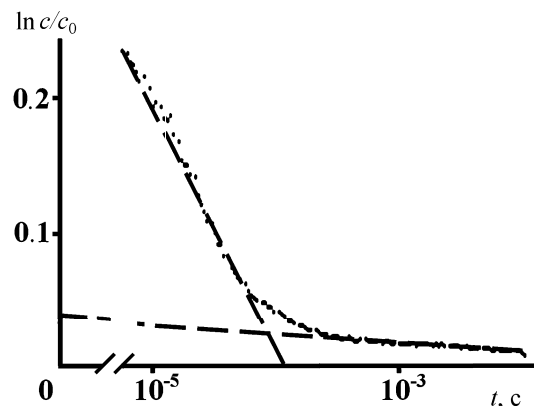


Рис. 4. Зависимость логарифма отношения конечной c и начальной c_0 корреляционной функции от времени t

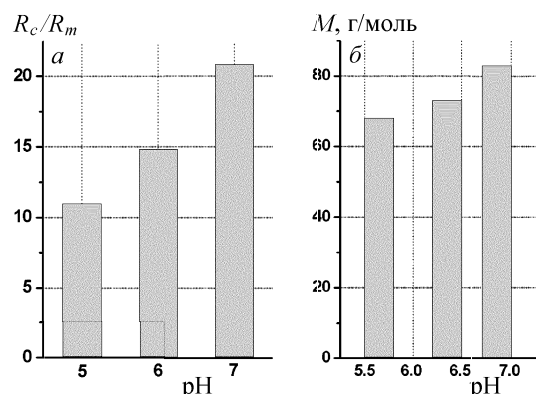


Рис. 5. Отношение эффективных радиусов кластеров R_c к радиусам исходных макромолекул альбумина R_m в зависимости от pH раствора альбумин + $\text{CoCl}_2 + \text{H}_2\text{O} + \text{HCl}$ ($\mu = 0.015$) (a) и зависимость эффективной молярной массы рассеивающих частиц M от pH раствора альбумин + $\text{CoCl}_2 + \text{H}_2\text{O} + \text{NaOH}$ ($\mu = 0.03$) (б)

R_m — эффективный радиус молекулы белка при изменении поверхностного заряда макромолекулы (т. е. рН раствора). Характерный минимум размеров кластеров находится вблизи изоэлектрической точки альбумина (рН ≈ 5).

При изменении концентрации ионов водорода в растворе, содержащем ионы кобальта, наблюдалась обратимость процесса кластеризации, когда относительный размер кластеров вначале уменьшался в интервале рН 4–5, а затем увеличивался при рН от 5 до 6. Подобная зависимость наблюдалась и при другой концентрации иона кобальта. Полученные данные хорошо согласуются с результатами исследования влияния ионов кобальта на параметр статического рассеяния света в растворах альбумина. На рис. 5, б приведена зависимость эффективной массы рассеивающих частиц (кластеров) от рН раствора, полученная методом статистического светорассеяния.

Заключение

1. Методом ЯМР-релаксации получены параметры сорбции ионов кобальта на поверхности макромолекулы альбумина. Обнаружено, что имеются центры сильной и слабой сорбции, и рассчитано их число.

2. Методом динамического светорассеяния определены относительные размеры макромолекулярных дипольных кластеров. Изучены изменения этой величины как функции поверхностного заряда макромолекул (величины рН в диапазоне 4–7 ед.).

3. Сравнение результатов двух оптических методов — интегрального и динамического светорассеяния — показывает, что в случае ионов кобальта наблюдается рост эффективного радиуса и массы рассеивающих молекул в области рН > 5 .

Литература

1. Petrova G.P., Petrusevich Yu.M., Evseevicheva A.N. // Gen. Physiol. and Biophys. 1998. 17, N 2. P. 97.
2. Петрова Г.П., Петрусевич Ю.М., Евсеевичева А.Н. // Вестн. Моск. ун-та. Физ. Астрон. 1998. №4. С. 71 (Moscow University Phys. Bull. 1998. N 4. P. 91).
3. Мэлвин-Хьюз Э.И. Физическая химия. М., 1964.
4. Маршалл Э. Биофизическая химия. М., 1981.
5. Спектроскопия оптического смешения и корреляция фотонов / Ред. Г. Камминс, Э. Пайк. М., 1978.

Поступила в редакцию
15.07.04