

УДК 541.64+547.962

БИОХИМИЯ

М. И. МУСТАФАЕВ, В. В. ГОНЧАРОВ, В. П. ЕВДАКОВ,
член-корреспондент АН СССР В. А. КАБАНОВ

КОМПЛЕКСООБРАЗОВАНИЕ СОПОЛИМЕРОВ 4-ВИНИЛПИРИДИНА И 4-ВИНИЛ-N-ЦЕТИЛПИРИДИНИЙБРОМИДА С СЫВОРОТОЧНЫМ АЛЬБУМИНОМ

Сополимеры 4-винилпиридина с N-алкилированным 4-винилпиридином, обычно получаемые путем кватернизации поли-4-винилпиридина (П-4ВП) соответствующими галоидалкилами — перспективный класс полиэлектролитов, в которых электростатические взаимодействия заряженных групп в водной среде могут сочетаться с неполярными взаимодействиями алкильных фрагментов. Отсюда их способность к образованию полимыл (¹⁻²), в тех случаях, когда N-алкильная группа представляет собой достаточно длинную углеводородную цепочку. В разбавленных водных растворах при достижении некоторых критических содержаний N-алкилированных звеньев такие сополимеры претерпевают кооперативный конформационный переход, сопровождающийся повышением компактности (снижением гидродинамических размеров) макромолекул (³⁻⁶).

Важный аспект изучения кватернизованных поливинилпиридинов связан с их потенциальной способностью образовывать комплексы с белками, которую можно предполагать на основе имеющейся в литературе информации о кооперативном связывании полиэлектролитов.

Руководствуясь последним соображением, мы изучили взаимодействие сополимеров 4-винилпиридина и 4-винил-N-цетилпиридинийбромид с бычьим сывороточным альбумином (БСА). Сополимеры получили кватернизацией П-4ВП бромистым цетилом в нитрометане (СП-1) и в метаноле (СП-2). Реакцию вели в запаянных ампулах под аргоном. В обоих случаях использовалась фракция П-4ВП с $\bar{M}_n=10^5$. Синтез и фракционирование П-4ВП проводили согласно (^{6, 7}).

На рис. 1 приведены кинетические кривые кватернизации П-4ВП в среде нитрометана и метанола. Среднюю степень алкилирования β ($\pm 0,5\%$) определяли элементным анализом на содержание брома и азота, а также методом и.-к. спектроскопии по соотношению оптических плотностей полос незаряженных (1600 см^{-1}) и заряженных (1640 см^{-1}) пиридиновых звеньев. Во всех случаях были получены удовлетворительно совпадающие результаты.

На рис. 2 приведены зависимости характеристической вязкости и констант седиментации (S_0) сополимеров в водных растворах от β . Вязкость растворов сополимеров определяли в вискозиметре Убеллоде при

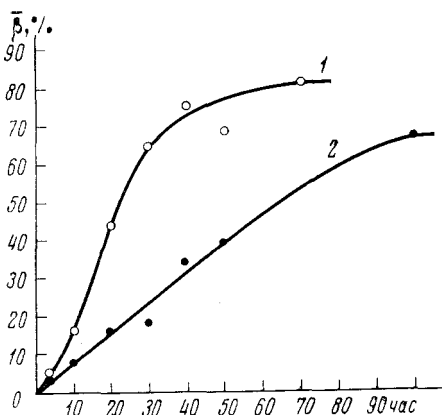


Рис. 1. Кинетика кватернизации П-4ВП бромистым цетилом в нитрометане (1) и в метаноле (2). Концентрация П-4ВП $\cdot 10^{-2}$ моль/л, десятикратный избыток бромистого цетила, 60°

$25 \pm 0,05^\circ$. В качестве растворителя был использован раствор $0,2 \text{ N NaCl}$ в $0,5\%$ CH_3COOH , pH 4,3. Время истечения растворителя составляло $120 \pm 0,1$ сек. Седиментационные измерения проводили на аналитической ультрацентрифуге «Спинко-Е» при $25,0 \pm 0,1^\circ$. Градиент показателя преломления регистрировали с помощью оптической схемы Фильпота — Свенсона с фазовой пластинкой. Скорость вращения ротора составляла 56 000 об/мин. Численный расчет коэффициентов седиментации (S_c) проводили по методике (⁸⁻⁹). Из рис. 2 видно, что в обоих случаях в некотором интервале, в соответствии с литературными данными, наблюдается уменьшение характеристической вязкости (⁴), которому сопутствует воз-

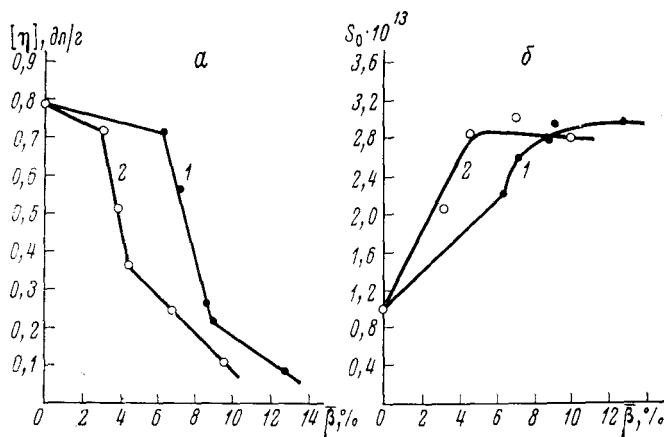


Рис. 2. Зависимость $[\eta]$ (а) и S_0 (б) от $\bar{\beta}$ для СП-1 (1) и СП-2 (2). Растворитель $0,5\%$ $\text{CH}_3\text{COOH} + 0,2 \text{ N NaCl}$, pH 4,3, 25°

растание S_0 . Примечательно, однако, что СП-1 и СП-2 претерпевают конформационный переход при несколько различных $\bar{\beta}$. Последний результат можно объяснить различным композиционным распределением N-алкилированных звеньев в СП-1 и СП-2. Это предположение представляется весьма вероятным в свете известных данных (¹⁰) по хлорированию полиэтилена в растворе, где в зависимости от степени межмолекулярной ассоциации полиэтилена было установлено сильное различие в распределении хлорированных звеньев в частично превращенных продуктах. В нашем случае метанол является лучшим растворителем как для исходного полимера, так и для продукта частичной кватернизации. Поэтому естественно ожидать, что СП-2 обладает меньшей композиционной неоднородностью, чем СП-1.

Различия между системами СП-1 и СП-2 критическим образом выявились при изучении их взаимодействия с альбумином в водных растворах.

Взаимодействие СП-1 и СП-2 и БСА исследовали методом скоростной седиментации. Седиментационные опыты проводились со свежеприготовленными смесями. БСА (фирмы «Ciech» Польша) предварительно был охарактеризован методами седиментации и дисперсии оптического вращения. Полученные характеристики хорошо совпали с литературными данными (¹¹).

На рис. 3 приведены седиментограммы для смесей СП-1 + белок (а) и СП-2 + белок (б). Как следует из этого рисунка, растворы, содержащие сополимеры и белок, в выбранных молярных соотношениях характеризуются бимодальными распределениями седиментирующих компонентов. Сравнение значений коэффициентов седиментации соответствующих пикам I и II смеси и компонентов в отдельности (S_c белка, СП-1 и СП-2 в аналогичных условиях соответственно равны: 4,2 св, 1,22 св, 1,24 св) показывает, что как в растворе СП-1, так и в растворе СП-2 происходит

практически полное связывание белка сополимерами: на седиментограммах отсутствует пик, характеризующий коэффициент седиментации 4,2 св. Быстро седиментирующее вещество (в обоих случаях пик II) представляет собой комплекс СП-1 + белок ($S_c=3,2$ св) или СП-2 + белок ($S_c=3,05$ св). Значение S_c медленно седиментирующего вещества (пик I) в системе СП-2 + белок равно 1,24 св, т. е. соответствует не вступившему в реакцию свободному сополимеру СП-2. Таким образом комплексообразование при выбранном соотношении компонентов сопровождается нарушением равномерного распределения белковых глобул между сорбирующими макромолекулами по принципу «все или ничего». Значение S_c , характери-

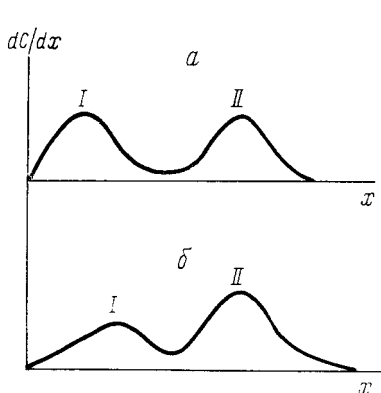


Рис. 3

Рис. 3. Седиментационные диаграммы для смесей СП-1+БСА (а) и СП-2+БСА (б). Растворитель 0,5% CH_3COOH , pH 4,3, 25°, $\bar{\beta} \approx 7\%$, соотношение компонентов эквимолекулярное (в расчете на макромолекулы), время центрифугирования 70 мин. dc/dx — градиент концентрации, x — расстояние от центра вращения ротора в произвольных единицах

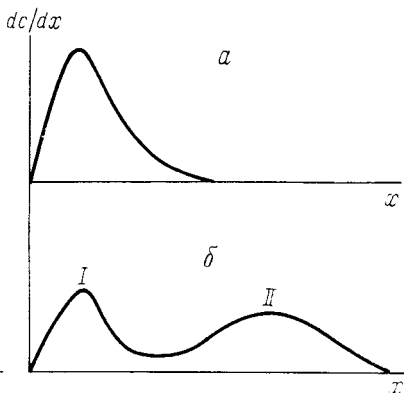


Рис. 4

Рис. 4. Седиментационные диаграммы: а — для смеси П-4ВП+СП-2, соотношение компонентов эквимолекулярное (в расчете на макромолекулы); б — для смеси П-4ВП+СП-2+БСА, соотношение компонентов в расчете на макромолекулы 1:1:2. Остальные обозначения те же, что и для рис. 3

зующее пик I для системы СП-1 + белок, в отличие от предыдущего случая, не совпадает с S_c свободного СП-1: оно равно 0,4 св и может соответствовать только какому-то иному комплексу белка с другим полимерным компонентом, присутствующим в системе. Следовательно, СП-1 в отличие от СП-2 при взаимодействии с белком образует два типа комплексов, причем один из них имеет практически тот же коэффициент седиментации, что и комплекс, образовавшийся в системе, СП-2 + белок.

Проведенные нами независимые исследования показали, что неквавторнизованный П-4ВП образует комплекс с сывороточным альбумином в аналогичных условиях. Коэффициент седиментации этого комплекса при pH 4,3 составляет 0,38 св, т. е. в пределах ошибки измерения совпадает с коэффициентом седиментации, характеризующим пик I в системе СП-1 + белок.

На рис. 4 приведена седиментограмма заведомо приготовленной смеси П-4ВП и СП-2 (а). Из рисунка видно, что П-4ВП и СП-2 седиментируют вместе (S_c П-4ВП и СП-2 равны: 1 св и 1,24 св, соответственно). При добавлении белка к указанной смеси (рис. 4, б) на седиментограмме появляются два пика. Относительно быстро седиментирующее вещество (пик II) имеет значение коэффициента седиментации, близкое к значению S_c комплекса СП-2+белок, равное 3,4 св, а пик I соответствует П-4ВП ($S_c=0,98$ св). Следовательно, сывороточный альбумин в смеси сополимера и гомополимера в первую очередь комплексуется с сополимером и таким

путем фракционирует смесь П-4ВП + СП-2, выделяя из нее кватернизованные макромолекулы (соотношение компонентов в данном случае специально выбрано так, чтобы введенного белка не хватило для связывания с некватернизованным П-4ВП). На основании этих данных можно предположить, что пик I на седиментограмме системы СП-1 + белок также соответствует комплексу альбумина с практически некватернизованной фракцией П-4ВП, которой нет в СП-2 и присутствие которой в СП-1 обусловлено тем, что синтез СП-1 (кватернизация) проводился в микрогетерогенной системе (нитрометан).

Таким образом, предполагавшееся различие в композиционном распределении сополимеров при одном и том же среднем составе, обусловленное различной химической предысторией сополимеров, отчетливо выявилось при образовании комплексов с альбумином. Оказалось, что комплексы альбумина с сополимером, содержащим небольшое количество длинных гидрофобных фрагментов, которые, по-видимому, играют роль в связывании белковых глобул, значительно прочнее, чем комплексы белка с чистым П-4ВП.

Полученный результат представляет определенный интерес в плане выявления композиционной неоднородности синтетических водорастворимых полимеров сложного состава путем их комплексообразования с белками. Важнее, однако, рассматривать этот результат в плане постановки задачи изучения конкретных механизмов кооперативного связывания белков синтетическими поногенными сополимерами с целью иммобилизации ферментов, стабилизации или разрушения их третичной структуры, специфической сорбции белков на поверхностях, выяснения механизмов физиологической активности синтетических полиэлектролитов и т. д.

Московский государственный университет
им. М. В. Ломоносова

Поступило
9 VI 1975

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ U. P. Strauss, N. L. Gershfeld, J. Phys. Chem., v. 58, 747 (1954). ² U. P. Strauss, N. L. Gershfeld, E. H. Grook, J. Phys. Chem., v. 60, 577 (1954). ³ U. P. Strauss, P. L. Williams, J. Phys. Chem., v. 65, 1390 (1961). ⁴ В. А. Касакин, Диссертация 1971. ⁵ U. P. Strauss, E. G. Jackson, J. Polym. Sci., v. 6, 649 (1951). ⁶ E. B. Fitzgerald, R. M. Fuoss, Ind. Eng. Chem., v. 42, 1603 (1950). ⁷ A. G. Boyes, U. P. Strauss, J. Polymer Sci., v. 22, 463 (1956). ⁸ H. K. Schachman, Ultracentrifugation, Diffusion and Viscosimetry, In: Methode of Enzymology, v. 4, N. Y., 1957. ⁹ В. А. Цветков, В. Е. Эскин, С. Я. Френкель, Структура макромолекул в растворах, «Наука», 1964. ¹⁰ В. П. Шибачев, П. А. Платз, Р. К. Грушина, В. А. Каргин, Высокомолекулярные соединения, т. 6, 231 (1964). ¹¹ W. F. Harrington, P. Johnson, R. H. Ottewill, Biochem. J., v. 62, 569 (1956).