

рентгеновских лучей, но и плотниононизирующих α -частиц. Данные, приведенные на рис. 2 и 3 и в таблице, позволяют сделать вывод о следующих общих закономерностях модифицирующего действия лазерного излучения на выживаемость клеток радиочувствительного pol A1^- -мутанта бактерий *E. coli* K-12 до и после воздействия ионизирующими излучениями разных энергий: последующее лазерное облучение приводит к большей модификации выживаемости клеток, чем предварительное; 30-секундная экспозиция лазерного воздействия более эффективна, чем 15-секундная. Повышение выживаемости клеток радиочувствительного pol A1^- -мутанта бактерий *E. coli* K-12 при комбинированном лазерном и ионизирующих облучениях свидетельствует о том, что блокирование системы быстрой репарации (при наличии в клетке функционирующих систем сверхбыстрой и медленной репараций) не исключает модифицирующего действия лазерного излучения.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бреслер С. Е., Вербенко В. И., Калинин В. Л. Генетика, 16, 10, 1753—1763, 1980.
2. Восканян К. Ш., Симонян Н. В., Авакян Ц. М., Арутюнян А. Г. Радиобиология, 25, 4, 557—559, 1985.
3. Восканян К. Ш., Симонян Н. В., Авакян Ц. М., Арутюнян А. Г. Радиобиология, 26, 3, 557, 1986.
4. Youngs D. A., Bernstein J. A. J. Bacteriol., 113, 2, 901—906, 1973.

Ереванский физический институт ГКИАЭ СССР

Научно-исследовательский институт физики конденсированных сред

Ереванского государственного университета

Получено 15.XI 1985 г.

УДК 577.3.08

ИЗМЕРЕНИЕ ВЯЗКОУПРУГИХ СВОЙСТВ КРИСТАЛЛОВ БЕЛКОВ ПРИ НИЗКИХ ТЕМПЕРАТУРАХ

В. Н. МОРОЗОВ, С. Г. ГЕВОРКЯН

Описан метод измерения динамического модуля Юнга E и логарифмического декремента затухания θ кристаллов белков и аморфных пленок в интервале температур $-170 \div -25^\circ\text{C}$. Обнаружены две области температур, в которых происходит существенное изменение модуля: $-20 \div -30^\circ\text{C}$, где происходит небольшое скачкообразное увеличение модуля сильногидратированных образцов (с содержанием воды $0,2 \div 0,3$ от сухого веса белка), связанное с замерзанием относительно свободной воды, и $-40 \div -100^\circ\text{C}$, где происходит большое увеличение модуля, связанное с иммобилизацией поверхностных слоев белка и прочно связанной воды.

Նկարագրված է ապիտակուցների բյուրեղների և ամորֆ փաղանթների Յունգի դինամիկական մոդուլի E և մարման լոգարիթմական զերկրմանտի (θ) չափման եղանակը լայն ջերմաստիճանային տիրույթում ($-170 \div -25^\circ\text{C}$)։ Հայտնաբերված են ջերմաստիճանային երկու տիրույթներ, որոնք տեղի է ունենում մոդուլի էական փոփոխություն։ $-20 \div -30^\circ\text{C}$ տիրույթում տեղի է ունենում մոդուլի ոչ մեծ ֆոնիչրոսկ աճ, $-40 \div -100^\circ\text{C}$ տիրույթում տեղի է ունենում մոդուլի մեծ և կապված ապիտակուցի մոլեկուլում մակերևութային շերտերի շարժունակության կորրուսիոն հեղուկացում։

The method of measuring of Young's dynamic modulus E and logarithmic decrement of shading θ of protein crystals and amorphous membranes in the temperature range of $-170 \div 25^\circ \text{C}$ has been described. Two spheres of temperatures, in which great changes of modulus take place have been found out: $-20 \div -30^\circ \text{C}$, where not great step-like increase of modulus of highly hydrated protein samples (with water content of $0,25 \div 0,3$ g/g dry weight of protein) takes place and $-40 \div 190^\circ \text{C}$, where a large increase in modulus takes place, connected with the immobilization of surface layers of protein and tightly connected water.

Ключевые слова: кристаллы белков, аморфные пленки, вязкоупругие свойства, динамический модуль Юнга, логарифмический декремент затухания.

Механические измерения могут дать представление не только об упругих силах внутри твердого образца, но и о процессах, связанных с молекулярным движением при релаксации механических напряжений в нем. Хорошо известно, что исследование температурных и частотных характеристик полимеров позволяет выявить целый набор релаксационных процессов, связанных как с движением различных сегментов главной цепи, так и с движением боковых остатков [3, 4].

Проблема внутримолекулярной подвижности в глобулярных белках имеет особое значение, так как с ней тесно связана функциональная активность белков [1]. Исследовать эту подвижность можно различными физическими методами, в том числе измерением механических характеристик твердых образцов глобулярных белков (монокристаллов, аморфных пленок) в широких частотном или температурном интервалах. В настоящей работе описан метод измерения механических характеристик и приведены данные, свидетельствующие о наличии релаксационных процессов при деформации твердых образцов глобулярных белков.

Материал и методика. Метод измерения динамического модуля Юнга и логарифмического декремента затухания (θ) в интервале частот $1 \div 100$ КГц основан на анализе электростатически возбуждаемых резонансных поперечных колебаний консолидно закрепленной кристаллической пластинки. Детальное описание метода, включающее выращивание кристаллов и изготовление образцов, необходимых для измерения, приведено в работе [7].

Для измерения в широком температурном интервале была сконструирована специальная камера, отличающаяся от описанной ранее полной герметичностью, а также тем, что в ней до минимума сведена возможность возникновения температурных градиентов. Последнее условие приобретает особую важность при работе с объектом, свойства которого зависят как от температуры, так и от влажности, так как даже небольшие температурные неоднородности внутри камеры способны вызвать существенные градиенты влажности, перераспределение воды, образование росы или высыхание образца. Кювета, разрез которой представлен на рис. 1, изготовлена из массивного куска латуни и конструктивно выполнена с двумя термостатированными стенками. Охлаждающая газовая смесь, проходящая через радиатор (5), обдувает внутреннюю стенку камеры, проходя через систему вертикальных отверстий. Затем газ обдувает верхнее и нижнее кварцевые окна (2, 6) и выходит наружу. Кювету помещали в кожух из пенопласта толщиной $1 \div 1,5$ см и ставили на столик измерительного микроскопа. Температуру в камере измеряли термометром. Воздух камеры непрерывно перемешивался в ходе эксперимента с помощью воздушной мешалки, имеющей форму язычка [7].

Процедура измерений заключалась в следующем: исследуемый образец, закрепленный в пинцете, вводили внутрь камеры, где поддерживалась температура 25°C . Степень гидратации образца задавали, поддерживая его в этих условиях в камере, на дне которой помещалась капля раствора CaCl_2 требуемой концентрации. Использовали так-

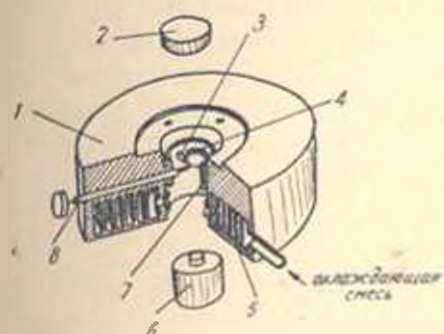


Рис. 1.

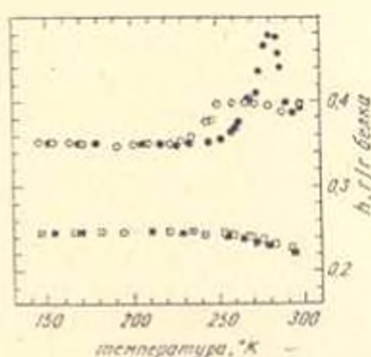


Рис. 2.

Рис. 1. Экспериментальная влажная камера для исследования вязкоупругих свойств белковых кристаллов в широкой температурной области. Обозначения см. в тексте.

Рис. 2. Изменение веса тетрагонального $\text{R}_{4,2,2}$ кристалла лизоцима из-за изменения гидратации при изменении температуры в ходе эксперимента. 1 — начальная влажность $A=90\%$ ($h=0,32$ г/г сухого веса). 2 — та же при влажности $A=60\%$ ($h=0,15$ г/г сухого веса).

же другой способ. Внутри термостатированного шкафа помещали 3—4 пробирки, заполненные раствором CaCl_2 концентрации, необходимой для создания в камере нужной влажности. Слабый ток воздуха пропускали последовательно через пробирки, насыщенный таким образом воздух подавали в камеру. Для этого в крышке были предусмотрены специальные отверстия для ввода и вывода газа. Эта процедура занимала несколько часов. По окончании ее крышку герметизировали, ставили на столик микроскопа, наден теплоизолирующий кожух, и приступали к эксперименту. Температуру камеры изменяли, пропуская через радиатор охлаждающую газовую смесь воздуха и азота. Скорость изменения температуры (1—2 град/мин) задавали, регулируя скорость потока охлаждающей смеси.

Степень изменения гидратации образцов при изменении температуры в процессе эксперимента регистрировали разработанным нами ранее прямым гравиметрическим методом [2].

В работе использовали кристаллы лизоцима куриного яич. фиксированные глутаровым альдегидом, и аморфные пленки бычьего альбумина. Методы изготовления пленок, выращивания и фиксации кристаллов и способы приготовления образцов из них описаны в работе [7].

Результаты и обсуждение. Контрольные измерения гидратации образцов были выполнены на тетрагональных кристаллах лизоцима, которые при высокой влажности содержат большое количество гидратной воды. Как видно из рис. 2, наиболее существенные изменения гидратации происходят в образцах, находящихся в условиях высокой влажности в области температур -20 — 45°C , однако и в этом случае изменения величины модуля Юнга E , вызванные изменениями гидратации в ходе опыта, должны быть малы. Приведенные на рис. 2 2%-ное увеличение массы кристалла при охлаждении соответствует 7%-ному увеличению количества гидратной воды (в соответствии с изотермой гидратации этих кристаллов [2]). Учитывая зависимость E от влаж-

ности, для этих кристаллов следует ожидать 2÷3%-ного уменьшения E в процессе охлаждения за счет изменения гидратации. Таким образом, изменение температуры во всем исследуемом диапазоне температур не приводит к сколько-нибудь значительным изменениям гидратации.

Были исследованы также температурные зависимости E и U тетрагональных $P4_32_12$ и моноклинных $P2_1$ кристаллов лизоцима и аморфных пленок бычьего сывороточного альбумина при разной степени гидратации. Типичная зависимость E ($^\circ$) для образцов с высоким содержанием воды ($h > 0.25 \div 0.3$ г/г сухого веса) представлена на рис. 3 (кр. 1).

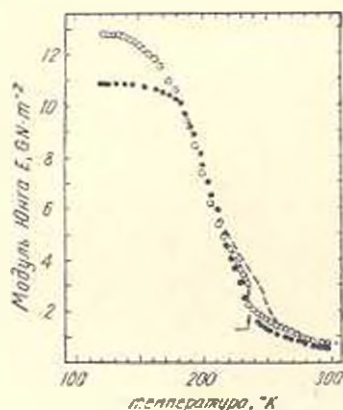


Рис. 3.

Рис. 3. Температурная зависимость модуля Юнга E тетрагональных $P4_32_12$ [направление (0,01)] кристаллов лизоцима при высокой влажности и влиянии глицерина: 1 — кристалл, вымоченный в 50 мМ Na-ацетатном буфере, pH 4,5, с 5%-ным NaCl, $A=94\%$, $h=0.37$ г/г; 2 — тот же кристалл, вымачиваемый в течение 12 ч в 50%-ном растворе глицерина на вышеуказанном буфере.

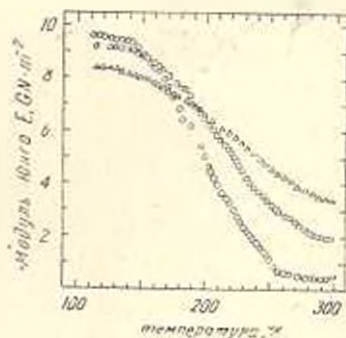


Рис. 4.

Рис. 4. Зависимость модуля Юнга E моноклинных $P2_1$ кристаллов лизоцима [направление (0,1)] от температуры при разных исходных влажностях: 1 — $A=97\%$ ($h=0.27$ г/г сухого веса), $A=60\%$ ($h=0.13$ г/г сухого веса), $A=0.02\%$ ($h=0.05$ г/г сухого веса).

Она характеризуется большим плавным увеличением модуля при охлаждении в области температур $-40 \div -100^\circ\text{C}$ и небольшим скачкообразным переходом в области $-22 \div -35^\circ\text{C}$ (температура, при которой происходит скачок, меняется от опыта к опыту в указанном интервале). Первый из указанных переходов, происходящий в широком температурном интервале, похож на переходы в полимерах, например, связанные с иммобилизацией боковых цепей [5]. Мы будем называть его стеклованием. Стеклование в кристаллах и пленках белков наблюдается при содержании гидратной воды $h > 0.1 \div 0.15$ г/г сухого веса белка, и только потеря этой прочно связанной воды приводит к исчезновению стеклования. Это иллюстрирует рис. 4, где показано, как с уменьшением влажности изменяется зависимость E (t) для моноклинных кристаллов лизоцима. Таким образом, стеклование в твердых образцах белков наблюдается уже при минимальных значениях гидратации и отражает, по-видимому, свойства белковых глобул и прочно связан-

ной с ними воды. Убедительно доказывает это результат опыта с кристаллом, вымоченным в 50%-ном глицерине (рис. 3, кр. 2). Как известно, около 90% всего объема кристалла белка, занятого водой, доступно небольшим молекулам растворенного вещества [6]. Свойства водно-глицериновой смеси существенно отличаются от свойств воды, и в то же время кривая, отражающая стеклование с глицерином (рис. 3, кр. 2), не отличается от таковой без глицерина (кр. 1), если не считать небольших различий в начальном и конечном уровнях модуля.

Таким образом, относительно свободная вода (2/3 от всей гидратной воды) не влияет на процесс стеклования, он связан со стеклованием в самой глобуле или в участках, включающих прочно связанную воду. Так как основной вклад в величину модуля Юнга E при комнатной температуре и высокой влажности вносит деформация глобул в области межмолекулярных контактов [7], а модуль при стекловании изменяется многократно, можно предполагать, что именно иммобилизацию поверхностных групп в белке и прочно связанной воды отражает наблюдаемое механическое стеклование.

Скачок модуля в области $-22 \pm 35^\circ\text{C}$ несомненно отражает замерзание относительно свободной воды в кристаллах. Он наблюдается только при содержании $h > 0,25 \div 0,3$ г/г сухого веса, и, как видно из рис. 3, вымачивание кристаллов в 50%-ном глицерине также приводит к его полному исчезновению. Наличие такого скачка при больших значениях гидратации хорошо коррелирует с калориметрическими данными, согласно которым пик теплоемкости за счет замерзания воды в белковых образцах удается получить только при $h > 0,3$ г/г сухого веса белка [5].

Результаты настоящей работы показывают, что при физиологических условиях отдельные области белковых глобул (скорее всего, поверхностные) обладают избыточной подвижностью, которая может быть заморожена при температурах ниже -40°C .

Авторы выражают признательность Т. Я. Морозовой, Л. В. Абатурову и Э. А. Бурштейну за обсуждение результатов работы.

ЛИТЕРАТУРА

1. Блэкфелд Л. А. Проблемы биологической физики. М., 1974.
2. Геворкян С. Г., Морозов В. Н. Биофизика, 28, 6, 944—948, 1983.
3. Ферри Дж. Вязкоупругие свойства полимеров. М., 1963.
4. Хоккинс Дж. Л., Куркоджиян С. Р. Физическая акустика, свойства полимеров и жидкой акустика. 2, ч. 15, М., 1969.
5. Kuntz J. D., Kauzmann W. Adv. Prot. Chem. 28, 239—345, 1974.
6. Loz B., Richards F. M., Berger J. E. J. Amer. Chem. Soc., 78, 1107—1111, 1956.
7. Morozov V. N., Morozova T. Ya. Biopolymers, 20, 3, 451—467, 1981.

Ереванский физический институт ГНАЭ СССР

Поступило 15.XI 1985 г.