

§ 3.6. Методы исследования макромолекул

При любом химическом строении макромолекулы характеризуются определенной молекулярной массой (м. м.) или распределением молекулярных масс и, будучи клубками или глобулами, — размерами и формой. Остановимся на способах экспериментального определения этих характеристик.

Среди методов определения м. м. в физике полимеров имеют значение *осмометрия*, *вискозиметрия* и *седиментация в центрифуге*. Последний метод особенно широко применяется для изучения биополимеров.

Осмометрия основана на измерении осмотического давления $p_{осм}$ раствора полимера. Согласно закону Вант-Гоффа

$$p_{осм}/c = RT/M, \quad (3.55)$$

где c — концентрация раствора (в г/см³), M — м. м. (для полидисперсных полимеров M — среднечисленная м. м.). Уравнение (3.55) справедливо для идеальных растворов. Для неидеальных растворов (растворы полимеров всегда неидеальны)

$$p_{осм} = \frac{RT}{M}c + Bc^2 + Cc^3 \dots, \quad (3.56)$$

где B , C и т. д. — второй, третий и т. д. *вириальные коэффициенты*. Для разбавленных растворов можно пренебречь третьим и последующими членами. График зависимости $p_{осм}/c$ от c линеен и позволяет найти M и B .

Характеристическая вязкость раствора полимера

$$[\eta] = \lim_{c \rightarrow 0} \frac{\eta - \eta_0}{\eta_0 c^a} \quad (3.57)$$

где η — вязкость раствора, η_0 — вязкость чистого растворителя. Величина $[\eta]$ зависит от M . Оказывается, что для раствора полимерных клубков

$$[\eta] = AM^a, \quad (3.58)$$

причем $0,5 \leq a \leq 1,0$ в зависимости от проницаемости клубка для растворителя. Для полностью проницаемого клубка $a = 1,0$, для непроницаемого $a = 0,5$. Для жестких сфер $a = 0$, для длинных жестких стержней $a = 1,7$. Формулой (3.58) можно воспользоваться для нахождения м. м., если константы A и a определены из независимых данных.

Седиментационный метод состоит в осаждении макромолекул под действием центробежной силы в ультрацентрифуге, ротор которой вращается со скоростью до 10^4 — 10^5 об/мин. Центробежное ускорение много больше ускорения свободного падения g — в современных ультрацентрифугах оно доходит до $350\,000\,g$ ($70\,000$ об/мин). Кювета с раствором полимера, представляющая собой цилиндр с прозрачными окнами из кристаллического квар-

ца, помещается в ротор — наблюдение ведется оптическими методами.

Если скорость седиментации значительно превосходит скорость диффузии макромолекул, то они осаждаются. В кювете образуются две области — чистый растворитель и раствор полимера. Между ними находится переходная зона, в которой концентрация растворенного полимера сменяется от нулевого до некоторого максимального значения. По мере седиментации эта зона и ее граница перемещаются. Измеряется скорость движения границы по направлению к дну кюветы, т. е. от оси вращения ротора.

На макромолекулу действует центробежная сила $V_m \rho_m \omega^2 x$, где V_m — объем макромолекулы, ρ_m — ее плотность, ω — угловая скорость вращения ротора, x — расстояние от оси вращения. Но в растворе на макромолекулу действует архимедова сила, и эффективная центробежная сила равна $V_m (\rho_m - \rho_0) \omega^2 x$, где ρ_0 — плотность растворителя. Эта сила уравновешивается силой трения при поступательном перемещении $\kappa dx/dt$ (κ — коэффициент трения). В расчете на 1 моль получаем

$$N_A V_m \rho_m (1 - \bar{V}_m \rho_0) \omega^2 x = \kappa \frac{dx}{dt}, \quad (3.59)$$

где N_A — постоянная Авогадро, $\bar{V}_m = \rho_m^{-1}$ — удельный парциальный объем макромолекулы. Но, с другой стороны,

$$N_A V_m \rho_m = M. \quad (3.60)$$

Для разбавленных растворов κ выражается через коэффициент диффузии D по формуле Эйнштейна

$$\kappa = RT/D. \quad (3.61)$$

Из (3.59) — (3.61) следует формула Сведберга

$$M = \frac{RTs}{(1 - \bar{V}_m \rho_0) D}, \quad (3.62)$$

где s — коэффициент седиментации:

$$s = \frac{1}{\omega^2 x} \frac{dx}{dt} \equiv \frac{1}{\omega^2} \frac{d \ln x}{dt}. \quad (3.63)$$

Размерность s — секунда, обычно коэффициент седиментации измеряется в сведбергах (S), $1S = 10^{-13}$ с.

Последовательные во времени положения седиментирующей границы фотографируются в ультрафиолетовом свете. Измерив s , D , ρ_m и ρ_0 , можно определить M . Величина s зависит от концентрации раствора вследствие гидродинамического взаимодействия молекул. Значение s , экстраполированное к нулевой концентрации,

$$s_0 = \lim_{c \rightarrow 0} s_s \quad (3.64)$$

называется константой седиментации. Она тем выше, чем больше M . Так, значения s_0 для миоглобина 2,0 S, для гемоглобина 4,5 S, для фикоэритрина 12,0 S. Соответствующие значения м. м. 17 600, 68 000, 290 000.

При меньших скоростях вращения ультрацентрифуги может установиться равенство встречных седиментационного и диффузионного потоков. При достаточно больших коэффициентах диффузии равновесие устанавливается быстро и наблюдается равновесное распределение вещества.

Если c — концентрация растворенного полимера на расстоянии x от оси вращения, то число молекул, седиментирующих за время dt через единицу поверхности, перпендикулярной оси x , равно

$$c \frac{dx}{dt} dt,$$

где dx/dt — скорость седиментации на расстоянии x . За то же время dt количество диффундирующего через то же сечение растворенного вещества равно $D(dc/dx)dt$. В равновесии

$$c \frac{dx}{dt} = D \frac{dc}{dx}. \quad (3.65)$$

Но, согласно (3.62) и (3.63),

$$\frac{dx}{dt} = s\omega^2 x = \frac{M(1 - \bar{V}_m \rho_0)}{RT} D\omega^2 x. \quad (3.66)$$

Подставляя (3.66) в (3.65), получаем второе уравнение Сведберга, уже не содержащее коэффициента диффузии D :

$$M = \frac{RT}{(1 - \bar{V}_m \rho_0) \omega^2 x} \frac{d \ln c}{dx}. \quad (3.67)$$

Интегрируя это уравнение в интервале между x_1 и x_2 , находим

$$M = \frac{2RT}{(1 - \bar{V}_m \rho_0) \omega^2} \frac{\ln(c_2/c_1)}{x_2^2 - x_1^2}. \quad (3.68)$$

В методе Арчибальда, требующем меньших затрат вещества и времени, исследуется не само равновесие, а приближение к нему. Потоки вещества через мениск и дно кюветы нулевые, независимо от достижения равновесия. Из (3.65) и (3.66) следует

$$\frac{1}{x_m} \frac{1}{c_m} \left(\frac{dc}{dx} \right)_m = \frac{1}{x_0} \frac{1}{c_0} \left(\frac{dc}{dx} \right)_0 = \frac{s\omega^2}{D}. \quad (3.69)$$

Индекс m относится к мениску, 0 — к дну кюветы. Из (3.69) и (3.66) получаем

$$M = \frac{RT}{(1 - \bar{V}_m \rho_0) \omega^2} \frac{(dc/dx)_m}{x_m c_m}, \quad (3.70)$$

$$M = \frac{RT}{(1 - \bar{V}_m \rho_0) \omega^2} \frac{(dc/dx)_0}{x_0 c_0}.$$

Для гомогенного полимера эти два значения M совпадают.

Для биофизики важен метод *седиментации в градиенте плотности*. В концентрированном растворе низкомолекулярного вещества (в CsCl, в сахарозе и т. д.) при ультрацентрифугировании устанавливается градиент концентрации, т. е. градиент плотности растворителя макромолекул $d\rho_0/dx$. В таком растворе макромолекулы будут располагаться в той части кюветы, в которой $s = 0$, т. е. согласно (3.66), $\bar{V}_m \rho_0 = 1$ или $\rho_0 = \rho_m$. Иными словами, макромолекулы локализируются в той области кюветы, где плотность концентрированного раствора совпадает с плотностью макромолекул (ρ_m измеряется непосредственно). Гетерогенная смесь макромолекул разделяется и наблюдается спектр плотностей. Этот метод с большой эффективностью применяется при изучении нуклеиновых кислот.

Диффузия описывается уравнением Фика

$$\frac{\partial c}{\partial t} = D \frac{\partial^2 c}{\partial x^2}. \quad (3.71)$$

С помощью (3.71) находится D . Градиент концентрации и скорость ее изменения определяются оптическими методами. В специальной кювете осторожно наслаивают чистый растворитель на раствор и исследуют преломление или интерференцию света.

Для реальных растворов достаточно высокой концентрации вместо формулы Эйнштейна (3.61) справедливо выражение (ср. (3.56)),

$$D = \frac{1}{\kappa} (RT + 2VMc + 3CMc^2 + \dots), \quad (3.72)$$

т. е. D зависит от концентрации. Коэффициент трения κ зависит от формы макромолекулы и ее проницаемости для растворителя. Для твердых сфер радиуса r справедлив закон Стокса

$$\kappa_{сф} = 6\pi\eta_0 r. \quad (3.73)$$

Для несферических частиц коэффициенты трения различны для направлений движения, совпадающих с продольной и поперечной осями частицы. Средний коэффициент трения для эллипсоида больше, чем для сферы того же объема. Для длинных стержнеобразных молекул коэффициент трения и вязкость особенно велики.

Информацию о м. м. и форме макромолекул дают оптические методы исследования. Интенсивность света, рассеянного раствором полимера, зависит от M . Вследствие рассеяния интенсивность света, проходящего через раствор, ослабляется по закону

$$I = I_0 \exp(-\chi l), \quad (3.74)$$

где I_0 — интенсивность падающего света, l — путь, проходимый лучом света в растворе, χ — коэффициент мутности. Теория рассеяния света дает

$$\chi = \frac{8\pi}{3} HcM_s \quad (3.75)$$

где

$$H = \frac{4\pi^2 n_0^2}{N_A \lambda^4} \left(\frac{dn}{dc} \right)^2. \quad (3.76)$$

Здесь n_0 и n — показатели преломления растворителя и раствора, λ — длина волны света, N_A — постоянная Авогадро. Значение M находится из измерения коэффициента мутности.

При рассеянии света макромолекулами, размеры которых соизмеримы с длиной волны света, наблюдается эффект Ми — специфическая угловая зависимость интенсивности рассеянного света: большая интенсивность света, рассеянного вперед, чем назад. Эффект Ми определяется интерференцией световых волн, которые рассеиваются разными частями молекулы с различающимися фазами.

С эффектом Ми связан забавный эпизод в истории биофизики. В спектре крови не удавалось наблюдать некоторые полосы поглощения, свойственные гемоглобину в растворе. На этом основании утверждалось, что гемоглобин в эритроцитах находится в измененном состоянии. В дальнейшем выяснилось, что поглощение света гемоглобином маскировалось эффектом Ми — усиленным рассеянием света вперед эритроцитами.

Дебай вычислил функцию рассеяния $P(\vartheta)$, т. е. отношение интенсивности света, рассеянного под углом ϑ , к интенсивности падающего света:

$$P(\vartheta) = I_\vartheta / I_0, \quad (3.77)$$

для макромолекул различной формы — для сфер, эллипсоидов, стержней. Измерение функции рассеяния дает возможность определить форму макромолекулы. Метод Зимма позволяет одновременно измерять м. м. и размеры макромолекул.

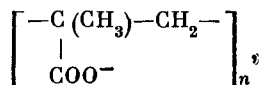
Весьма ценную информацию о биополимерах дает изучение рассеяния рентгеновских лучей их растворами (см. гл. 5).

Для определения формы макромолекул (а также их анизотропной поляризуемости) пользуются и двойным лучепреломлением в потоке (*динамооптический эффект Максвелла*). Динамооптиметр представляет собой два коаксиальных цилиндра, между стенками которых находится исследуемая жидкость — раствор полимера. Внутренний цилиндр — ротор — вращается вокруг общей оси, увлекая за собой жидкость. В ней устанавливается градиент скорости — слой, примыкающий к стенке ротора, движется с наибольшей скоростью, слой, примыкающий к стенке неподвижного цилиндра, неподвижен. В результате макромолекулы ориентируются в растворе и подвергаются растягивающему усилию. Жидкость становится анизотропной, подобной двухосному кристаллу. Двойное лучепреломление наблюдается в направлении, параллельном оси динамооптиметра. Его измерение дает указанные сведения.

Напротив, метод двойного лучепреломления в электрическом поле (эффект Керра) мало перспективен в случае биополимеров. Биополимеры являются полиэлектролитами — макромолекулы несут на себе заряды и поэтому не только ориентируются, но и перемещаются в электрическом поле.

§ 3.7. Полиэлектролиты

Многие макромолекулы, в том числе белки и нуклеиновые кислоты, в водном растворе являются макроионами, несут множество заряженных групп. Такова, например, полиметакриловая кислота



являющаяся полианионом. Биополимеры представляют собой полиамфолиты, т. е. они содержат и анионные, и катионные группы. В белках фигурируют кислотные (Глу, Асп, Тир) и основные (Арг, Гис, Лиз) остатки (см. с. 25), в нуклеиновых кислотах наличествуют кислотные фосфатные группы и основные группы $\text{N}\equiv$, $\text{HN}=\text{}$, $\text{N}_2\text{N}-$ азотистых оснований.

Существуют как твердые макроионы (глобулярные белки и др.), так и гибкие полиэлектролитные цепи. Очевидно, что свойства таких макромолекул существенно зависят от взаимодействия содержащихся в них зарядов. Величины этих зарядов определяются степенями диссоциации ионогенных групп и окружающей их ионной атмосферой.

Конформация гибкой полиэлектролитной цепи определяется условием минимума для суммы конформационной и электрической свободной энергий. Естественно, что наличие одноименных зарядов в цепи означает их взаимное отталкивание, которое приводит к разворачиванию клубка, к увеличению его размеров. Электростатическая свободная энергия клубка вычисляется с учетом ионной атмосферы. Флори построил теорию размеров цепей полиэлектролитов, сходную с предложенной им же теорией объемных эффектов (с. 77). Предполагается, что клубок вместе с иммобилизованным им растворителем в целом электрически нейтрален. Расчет показывает, что электростатические взаимодействия не могут превратить клубок в вытянутую цепь — происходит лишь раздувание клубка. Это согласуется с экспериментальными данными — с зависимостью характеристической вязкости $[\eta]$ от м. м. В более строгой статистической теории заряженных макромолекул учитывается, что из-за экранирования противоположными заряженными группами макромолекулы, расположенные далеко друг от друга по цепи, взаимодействуют лишь при случайном их сближении в результате флуктуаций. Из этой теории следует, что конформационные свойства заряженных макромолекул занимают