

14

Кинетическая модель формирования кристаллов белка в капиллярах методом контрдиффузии

© А.С. Соколовский^{1,2}, М.Н. Лубов^{1,¶}, Н.А. Беседина¹,
Ю.В. Трушин^{1,2}, М.В. Дубина³

¹ Санкт-Петербургский национальный исследовательский академический университет РАН, Санкт-Петербург, Россия

² Санкт-Петербургский национальный исследовательский университет информационных технологий, механики и оптики, Санкт-Петербург, Россия

³ Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова, Санкт-Петербург, Россия

¶ E-mail: lubov@spbau.ru

Поступило в Редакцию 29 сентября 2017 г.

Предложена кинетическая модель и проведены компьютерные расчеты кристаллизации белка лизоцима. Определены условия образования таких кристаллов. С учетом полученных условий выращены отдельные кристаллы, пригодные для рентгенографического исследования. Разработанная модель позволяет предсказывать количество, размер и место зарождения кристалла внутри капилляра.

DOI: 10.21883/PJTF.2018.11.46203.17068

Кристаллизация белков является одним из перспективных направлений современной науки, поскольку позволяет 1) расширить понимание физики процессов образования кристаллов из водного раствора; 2) создать кристаллы из биополимеров и использовать их для исследований отработанными твердотельными методами, что необходимо для понимания пространственной структуры молекулы [1–3].

С термодинамической точки зрения кристаллизация белка подчиняется тем же закономерностям, что и кристаллизация любых других веществ [4–11]. Однако имеется ряд особенностей, которые существенно осложняют процессы формирования кристаллов белка: 1) кристаллизация белка из водного раствора; 2) высокая растворимость белка в воде, приводящая к необходимости добавления конденсирующего агента

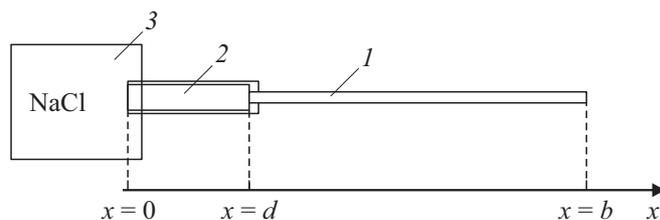


Рис. 1. Схематическое изображение системы для проведения эксперимента по кристаллизации белка. Капилляр (1) заполнен раствором белка: в точке $x = 0$ капилляр приводится в контакт с раствором конденсирующего агента (3), в промежутке от $x = 0$ до $x = d$ располагается буферный слой (2), заполненный агарозным гелем, в точке $x = b$ капилляр закупорен воском.

в раствор [1–3,12]; 3) наличие гидратной оболочки вокруг молекулы белка [2]; 4) ориентационно-зависимые взаимодействия молекул белка с поверхностью кристалла белка [13].

Целью настоящей работы является разработка кинетической модели зародышеобразования и роста отдельных кристаллов белка при кристаллизации в капиллярах методом контрдиффузии. Будем рассматривать рост кристаллов белка исходя из кинетического подхода его формирования [14–18]. Для этого необходимо записать самосогласованную систему кинетических уравнений изменения концентрации растворенных молекул белка, вероятности появления кристаллов и радиусов кристаллов.

В экспериментах по кристаллизации методом контрдиффузии молекулы белка диффундируют из капилляра в резервуар с конденсирующим агентом (NaCl), который в свою очередь диффундирует в обратном направлении (в капилляр) (рис. 1).

Изменение концентрации белка $C(x, t)$ в точках капилляра с координатами x с течением времени t происходит вследствие его диффузии из капилляра и ухода молекул белка на формирование кристаллов. Рост кристаллов белка в капилляре возможен, только когда концентрация молекул белка в растворе становится выше равновесного значения $C_0(x, t)$. Величина $C_0(x, t)$ зависит от концентрации конденсирующего агента и может быть определена по экспериментальным данным. Таким образом, чтобы найти концентрацию молекул белка, необходимо

записать балансное кинетическое уравнение. Исходя из отмеченного выше уравнение для изменения концентрации белка со временем имеет следующий вид:

$$\frac{\partial C(x, t)}{\partial t} = D \frac{\partial^2 C(x, t)}{\partial x^2} - \frac{4\pi}{\Omega} \sum_{k=1}^{n(t)} \frac{R_k^2(x, t)}{V_k} \frac{\partial R_k(x, t)}{\partial t}, \quad (1)$$

где D — коэффициент диффузии молекул белка; $R_k(x, t)$ — радиус k -го кристалла; $n(t)$ — число кристаллов белка к моменту времени t ; Ω — объем молекул белка; V_k — объем зон питания формирующегося k -го кристалла. В уравнении (1) в правой части первый член описывает диффузию молекул белка в капилляре, а второй — уход молекул белка из раствора на формирующиеся кристаллы. При отсутствии кристаллов белка в капилляре второй член в правой части (1) равен нулю.

Появление кристаллов белка в капилляре определяется вероятностью их зарождения $P(x, t)$, которая зависит от формы кристалла, его удельной поверхностной энергии и пересыщения раствора (отношения $C(x, t)/C_0(x, t)$). Для нахождения вероятности $P(x, t)$ капилляр разбивается на участки длиной Δx , такой, что в пределах данного участка концентрацию белка можно считать зависящей только от времени и не зависящей от координаты. Тогда вероятность $P(t)$ может быть записана как [9]

$$P(t) = 1 - \exp(-N(t)), \quad (2)$$

где $N(t) = \int_0^t W_v(\tau) d\tau$ — ожидаемое число кристаллов, $W_v(\tau)$ — скорость зародышеобразования в объеме, τ — время. Величину $W_v(\tau)$ можно рассчитать исходя из классической теории нуклеации [7].

В процессе роста кристаллы белка не взаимодействуют друг с другом и со стенками капилляра [18], а рост граней кристаллов белка происходит по островковому механизму [13]. При этом скорость роста $\partial R_k(x, t)/\partial t$ кристалла с радиусом $R_k(x, t)$ можно записать исходя из модели Колмогорова, Джонсона, Мела, Авраами [19–21]. Выражение для $\partial R_k(x, t)/\partial t$ с учетом скоростей присоединения r_+ и диссоциации r_-

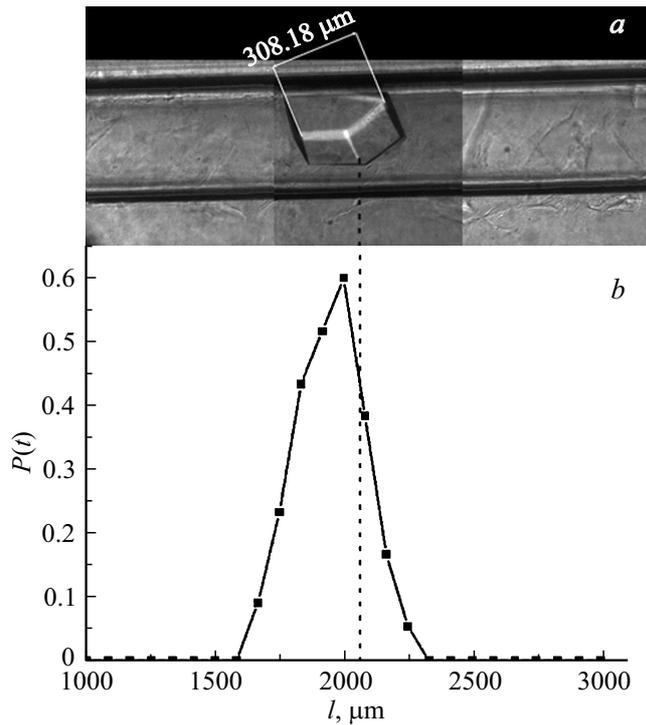


Рис. 2. Сравнение положения сформировавшегося кристалла белка лизоцима с рассчитанной вероятностью зарождения. *a* — расположение сформировавшегося кристалла белка лизоцима размером 308.18 μm на расстоянии $x = 2151.82 \mu\text{m}$, *b* — рассчитанная вероятность зарождения кристалла белка вдоль капилляра (l — длина капилляра).

молекул белка имеет следующий вид:

$$\begin{aligned} \frac{\partial R_k(x, t)}{\partial t} &= \left(\frac{6\Omega}{\pi} \right)^{1/3} \left[\frac{\pi W_s(x, t)(r_+ - r_-)^2}{3} \right]^{1/3} \\ &= [2\Omega W_s(x, t)(r_+ - r_-)^2]^{1/3}, \end{aligned} \quad (3)$$

где $W_s(x, t)$ — скорость зарождения островков на поверхности кристалла [7], $(6\Omega/\pi)^{1/3}$ — диаметр молекулы белка с учетом гидратной

оболочки. При расчете скоростей присоединения r_+ и диссоциации r_- необходимо учитывать, что молекулы белка могут присоединяться к растущему кристаллу в двух ориентациях, совпадая („ориентированно“) и не совпадая („неориентированно“) по ориентации с уже присоединившимися молекулами белка [13]. При этом диссоциировать могут только молекулы белка, присоединившиеся к кристаллу „неориентированно“. Таким образом, скорости r_+ и r_- можно записать как произведения диаметра молекулы $(6\Omega/\pi)^{1/3}$, частоты соответствующего процесса и вероятности того, что место присоединения не граничит с „неориентированной“ молекулой.

Из выражений (1)–(3) с учетом уравнения диффузии для конденсирующего агента (см., например, [18]) получается самосогласованная система кинетических уравнений для концентрации белка, вероятности появления критических зародышей и размеров кристаллов, из решения которой можно определить распределение вероятности появления кристаллов в капилляре, а также оценить размеры кристаллов белка.

Проведены компьютерные расчеты формирования и роста кристаллов белка лизоцима. Получены распределения по длине капилляра вероятности зарождения кристаллов белка, которая позволяет оценить возможные положения появления кристаллов, их число и средний размер. Из этих данных определены оптимальные условия экспериментального роста отдельных кристаллов белка: значения начальных концентраций белка $C_0 = 80$ и 100 mg/ml, температура 20°C , время роста $t = 24$ h. Экспериментально выращены кристаллы белка лизоцима. На рис. 2 представлено положение кристалла лизоцима в капилляре при $C_0 = 80$ mg/ml, а также распределение вероятности зарождения кристаллов $P(t)$ по длине капилляра. Сравнение полученных результатов для экспериментов при $C_0 = 100$ mg/ml дало хорошее совпадение.

Таким образом, предложенная модель роста кристаллов белка позволяет оценить условия формирования отдельных кристаллов белка для их последующего рентгенографического исследования.

Список литературы

- [1] Bernal J.D. // Z. Kristallogr. Cryst. Mater. 1931. V. 78. N 1-6. P. 363–369.
- [2] Franklin R.E., Gosling R.G. // Nature. 1953. V. 171. N 4356. P. 740–741.

- [3] *DeLucas L.J., Bray T.L., Nagy L., McCombs D., Chernov N., Hamrick D., Cosenza L., Belgovskiy A., Stoops B., Chait A.* // J. Struct. Biol. 2003. V. 142. N 1. P. 188–206.
- [4] *Гиббс Дж.В.* Термодинамика. Статистическая механика. М.: Наука, 1982. 584 с.
- [5] *Landau L.D., Lifshitz E.M.* Course of theoretical physics. V. 5. Statistical physics. Oxford: Pergamon, 1980. 484 p.
- [6] *Любов Б.Я.* Кинетическая теория фазовых переходов. М.: Металлургия, 1989. 264 с.
- [7] *Зельдович Я.Б.* // ЖЭТФ. 1942. Т. 12. В. 11/12. С. 525–538.
- [8] *Dubrovskii V.G.* Nucleation theory and growth of nanostructures. Heidelberg: Springer, 2014. 601 p.
- [9] *Kashchiev D.* Nucleation: basic theory with applications. Oxford: Butterworth–Heinemann, 2000. 530 p.
- [10] *Кристьян Дж.* Теория превращений в металлах и сплавах. М.: Мир, 1978. 866 с.
- [11] *Хачатурян А.Г.* Теория фазовых превращений и структура твердых растворов. М.: Наука, 1974. 384 с.
- [12] *McPherson A.* Crystallization of biological macromolecules. 3rd ed. N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999. 586 p.
- [13] *Schmit J.D., Dill K.* // J. Am. Chem. Soc. 2012. V. 134. N 9. P. 3934–3937.
- [14] *Trushin Yu.V.* Theory of radiation processes in metal solid solutions. N.Y.: Nova Sci. Publ. Inc., 1996. 411 p.
- [15] *Лубов М.Н., Куликов Д.В., Трушин Ю.В.* // ЖТФ. 2010. Т. 80. В. 1. С. 85–91.
- [16] *Лубов М.Н., Елисеев И.Е., Трушин Ю.В., Дубина М.В., Наточин Ю.В.* // Письма в ЖТФ. 2013. Т. 39. В. 21. С. 18–22.
- [17] *Куликов Д.В., Лубов М.Н., Трушин Ю.В., Харламов В.С.* // Письма в ЖТФ. 2015. Т. 41. В. 19. С. 90–95.
- [18] *Sokolovskiy A.S., Trushin Yu.V., Lubov M.N., Eliseev I.E., Yudenko A.N., Dubina M.V.* // J. Phys.: Conf. Ser. 2016. V. 741. N 1. P. 012053.
- [19] *Колмогоров А.Н.* // Изв. АН СССР. Сер. мат. 1937. Т. 1. В. 3. С. 355–359.
- [20] *Johnson W.A., Mehl R.F.* // Trans. Am. Inst. Min. Met. Pet. Eng. 1939. V. 135. N 8. P. 416–458.
- [21] *Avrami M.* // J. Chem. Phys. 1941. V. 9. N 2. P. 177–184.