Письма в ЖЭТФ, том 93, вып. 7, с. 453 – 458 © 2011 г. 10 апреля

Аномальное поведение мандельштам-бриллюэновского рассеяния света при тепловой денатурации лизоцима

А. В. Сванидзе[+], *В. П. Романов*[*], *С. Г. Лушников*[*1)]

[*]*Физико-технический институт им. А.Ф. Иоффе РАН, 194021 С. Петербург, Россия*

[+]*Санкт-Петербургский государственный университет, физический факультет, 198504 С. Петербург, Россия*

Поступила в редакцию 1 марта 2011 г.

Исследуется тепловая денатурация лизоцима при нагревании от 293 до 355 К с помощью мандельштам-бриллюэновского рассеяния (МБР) света. В окрестности 343 К, при переходе в гелиеподобное состояние, наблюдалось аномальное поведение скорости и затухания гиперзвука, которое сопровождалось уменьшением интенсивности компонент МБР в экспериментах с 180° геометрией рассеяния, и почти полное их гашение при 90° геометрии рассеяния. При изучении натрий-ацетатного буфера, используемого для приготовления белковых растворов, подобные аномалии в спектрах рассеяния света отсутствовали. Предложен механизм, описывающий поведение интенсивности компонент МБР света.

Изучение биополимеров при фазовых превращениях является сегодня одним из наиболее активно исследуемых направлений в физике конденсированных сред, так как помогает понять механизмы их функционирования. Недавние исследования показали, что изменение структуры и динамики биополимеров могут приводить к изменению их активности [1]. Примером подобных изменений может служить динамический переход в гидратированных белках, ДНК и РНК в окрестности Tg $\sim$ 200$-$220 К в стеклоподобную фазу [2]. Известно, что при этом переходе такие биополимеры, как белки, теряют свою активность в низкотемпературной фазе [3, 4]. Недавно был обнаружен структурный фазовый переход в тетрагональных кристаллах лизоцима, природа которого еще не изучена [5]. Еще одним примером фазового перехода в биополимерах является переход ДНК из А- в В-форму при гидратации [6, 7]. При изучении этого перехода методом неупругого рассеяния света была обнаружена мягкая оптическая мода, существование которой характерно для сегнетоэлектрических структурных фазовых переходов [8, 9].

Наиболее известным примером фазового превращения в белках служит тепловая денатурация – изменение нативной пространственной структуры белка при повышении температуры. Она изучается различными методами, такими как дифференциальная сканирующая калориметрия [10, 11], рассеяние света [12], нейтронов и рентгеновских лучей [13, 14] и др., что помогает воссоздать картину изменений, которые претерпевают разные белки под воздействием различных факторов. Одним из наиболее изученных белков, используемых в качестве модельного объекта, является лизоцим куриного яичного белка – небольшой глобулярный белок, состоящий из 129 ак. ост., и имеющий молекулярную массу порядка 14.4 kDa [15]. Первые эксперименты показали, что тепловая денатурация лизоцима может рассматриваться как кооперативный процесс, подчиняющийся закону "все или ничего" [12, 16, 17]. Однако позже были обнаружены промежуточные состояния при тепловой денатурации при низких pH [13, 18]. Как было показано недавно, в растворах с высокими концентрациями лизоцима тепловая денатурация проходит через разворачивание глобулы (unfolding), агрегирование и образование геля, в основе которого лежат кластеры больших агрегатов [19]. Нужно отметить при этом, что внутримолекулярные изменения структуры лизоцима наблюдаются при температурах, существенно ниже температуры денатурации, когда происходит изменение третичной структуры молекулы [13, 14, 20]. При исследовании температурной зависимости теплоемкости растворов лизоцима было обнаружено, что она имеет пик в окрестности 343 К. Высота пика растет с ростом концентрации лизоцима, а его ширина порядка 10–15 К, его форма примерно такая же, как в растворах в окрестности точки расслаивания [19].

Один из методов, широко используемый для исследования фазовых переходов в конденсированных средах – мандельштам-бриллюэновское рассеяние света (МБР) [21], достаточно редко применялся для изучения биополимеров. С помощью МБР исследовались упругие свойства кристаллов лизоцима при нагревании [22] и дегидратации [23, 24], а также при гидратации ДНК [6,7]. Анализировалось МБР в

[1)]e-mail: sergey.lushnikov@mail.ioffe.ru

растворе лизоцима [25] и в разбавленных растворах бычьего сывороточного альбумина и инсулина при изменении давления [26]. Было обнаружено, что температурные зависимости затухания и интенсивности компонент МБР имеют выраженную аномалию только в окрестности $T_1 \sim 343$ К, которая, по-видимому, связана с фазовым переходом "раствор–гель", а температурное поведение скорости гиперзвука при нагревании имеет 2 аномалии: в окрестности 343 К и при более низкой температуре – $T_2 \sim 333$ К, что соответствует, скорее всего, плавлению третичной структуры макромолекулы [27]. Таким образом, МБР света является информативным методом для изучения фазовых превращений в биополимерах.

Необходимо отметить, что большинство экспериментов по изучению белков проводятся с использованием разбавленных белковых растворов, в то время как общая концентрация белков в живой клетке достигает 250–300 мг/мл. Поэтому мы исследовали в настоящей работе растворы лизоцима с достаточно высокими концентрациям.

Для проведения экспериментов по МБР света приготавливался раствор лизоцима (Hen Egg White Lysozyme, lyophilized powder, Fluka) с концентрацией 250 мг/мл в 0.1 М натрий-ацетатном буфере с pH=4.6. Полученные результаты по МБР света в растворе лизоцима сравнивались с экспериментальными данными для чистого натрий-ацетатного буфера. Сравнение результатов экспериментов по МБР света в растворе лизоцима с рассеянием в буфере дает возможность изучить особенности распространения гиперзвука, связанные именно с фазовыми превращениями белка.

В качестве источника света в экспериментах использовался аргоновый лазер с длиной волны $\lambda = 514.5$ нм и с мощностью 250 мВт (на образце < 50 мВт). Луч лазера проходил через оптическую схему и фокусировался в образце. В оптическую схему был включен поляризатор, таким образом падающий свет был строго вертикально поляризованным. Рассеянный свет собирался и анализировался с помощью 6-проходного интерферометра Фабри-Перо (тандем системы Сандеркока). Расстояние между зеркалами интерферометра устанавливали 10 мм, что соответствовало свободному спектральному интервалу 15 ГГц. Время накопления одного спектра составляло 100 с. Эксперименты проводились с использованием двух разных геометрий рассеяния с углом между падающим и рассеянным светом θ – 180° и 90°, что предполагает различные значения волновых векторов ($\mathbf{q}$) согласно

$$\mathbf{q} = (2\pi n/\lambda)\sin(\theta/2), \tag{1}$$

где n – значение показателя преломления. Изучаемый раствор в стандартной кювете Hellma ($d = 10$ мм) помещали в термостат, постоянная температура в котором поддерживалась с помощью циркулирующей воды. Температуру раствора повышали от 293 до 355 К с точностью ± 0.1 °С.

На рис. 1 представлены экспериментальные спектры МБР света в NaAc буфере. На спектрах хорошо виден пик на несмещенной частоте и два дублета – компоненты МБР. Спектры МБР для раствора лизоцима в буфере показаны на рис. 2. На спектрах наблюдаются компоненты МБР, однако центральная компонента непосредственно в экспериментах не регистрировалась из-за ее большой интенсивности. Вместо этого на экспериментальных спектрах записывался опорный сигнал, используемый контрольным модулем интерферометра для подстройки. Поведение центральной компоненты качественно оценива-

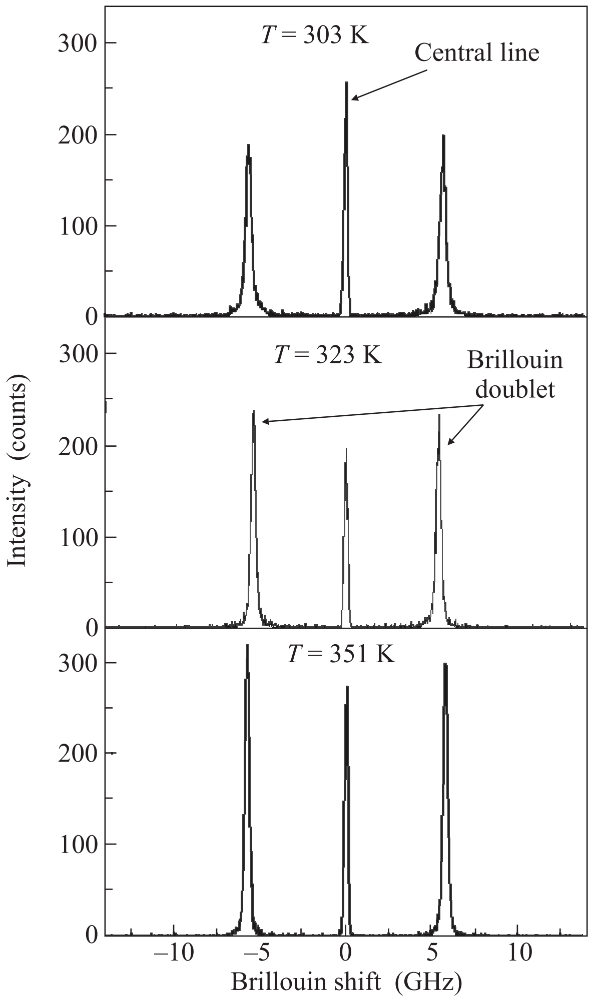

Рис. 1. Экспериментальные спектры МБР света в натрий-ацетатном буфере при изменении температуры

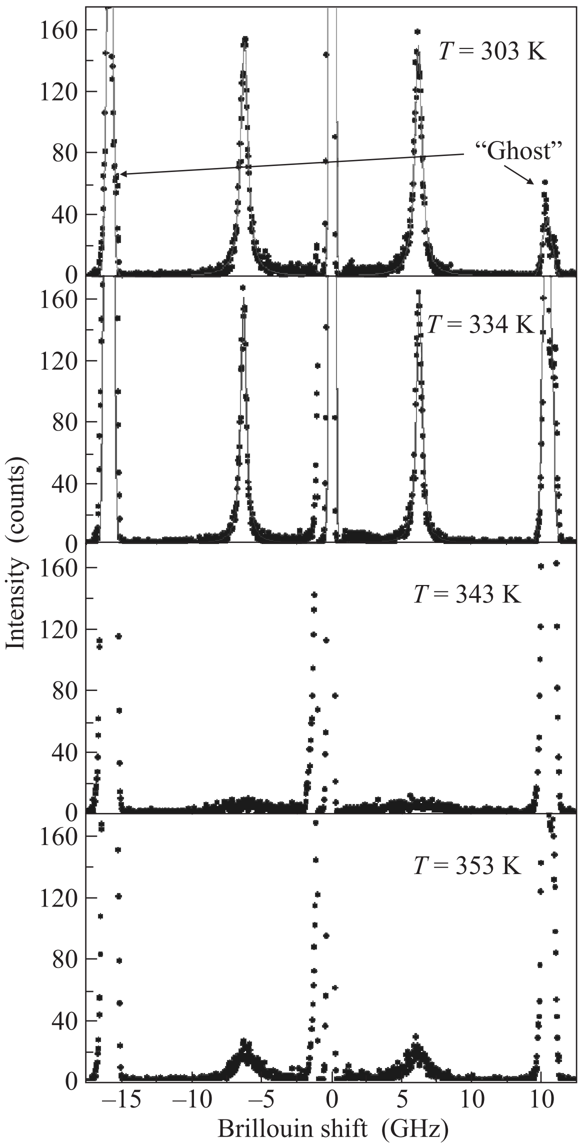

Рис. 2. Экспериментальные спектры МБР света в растворе лизоцима при изменении температуры. На двух верхних спектрах представлены примеры обработки согласно процедуре, описанной в тексте

лось по поведению "духов" ("ghost") в спектрах рассеяния, которые остаются из-за неполного погашения центральной компоненты следующего порядка рассеяния [21]. На рис. 2 приведен пример обработки полученных экспериментальных спектров. Спектры рассеяния описывались суммой гауссиана, соответствующего центральной компоненте и "ghost" (рэлеевское рассеяние), и двух лоренцианов, которые описывали дублет МБР.

Скорость звука (u) и затухание (Γ) связаны с данными, полученными в эксперименте следующими соотношениями:

$$\pm\frac{\Delta\omega}{\omega} = 2n\frac{u}{C}\sin\frac{\theta}{2}, \qquad (2)$$

$$\delta\omega = q^2\Gamma, \qquad (3)$$

где $\Delta\omega$ – сдвиг частоты компонент МБР, $\delta\omega$ – полуширина на полувысоте компонент МБР, c – скорость света в вакууме. Данные выражения позволили получить температурные зависимости поведения сдвига частоты и полуширины на полувысоте дублетов МБР (рис. 3). Для удобства мы представили на рис. 3 относительные изменения скорости, $\partial u = (u - u_0)/u_0$, и затухания, $\partial\Gamma = (\Gamma - \Gamma_0)/\Gamma_0$, гиперзвуковых волн в растворе лизоцима. В качестве опорной точки было выбрано значение скорости u_0 и затухания Γ_0 при комнатной температуре. Температурным изменением показателя преломления раствора лизоцима мы пренебрегали в силу его малости.

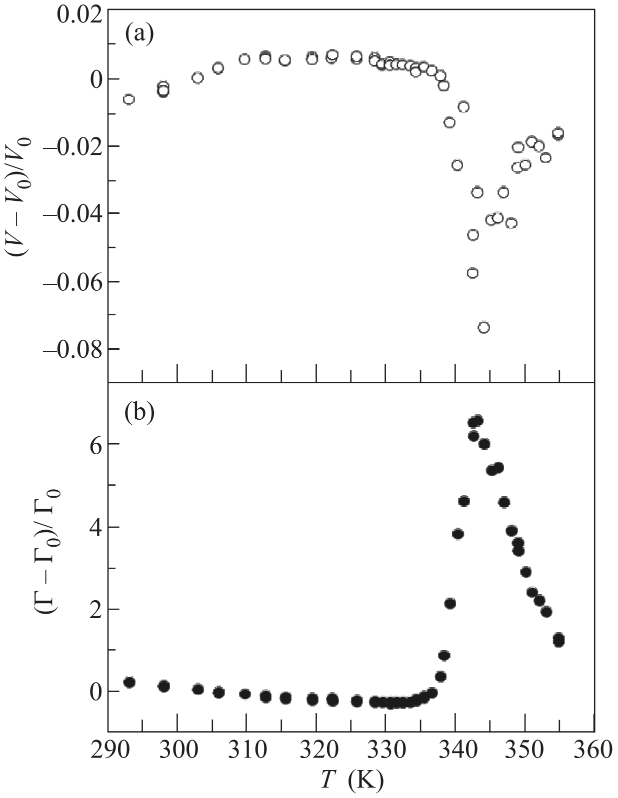

Рис. 3. Температурное поведение относительного изменения скорости и затухания гиперзвука в растворе лизоцима

Анализ экспериментальных спектров позволил построить температурную зависимость относительного изменения интегральной интенсивности компонент МБР для буфера и для раствора лизоцима (рис. 4). Данные нормировались к значениям интегральных интенсивностей, полученных при 303 К.

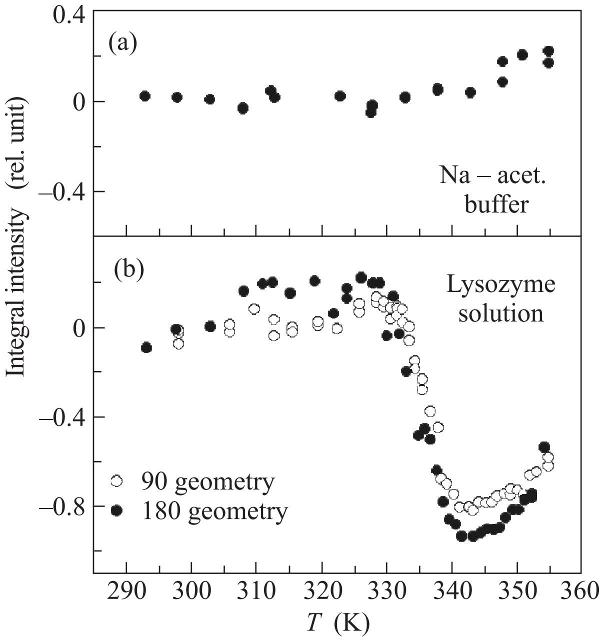

Рис. 4. Температурное поведение интегральной интенсивности компонент МБР в натрий-ацетатном буфере и в растворе лизоцима при экспериментах в двух геометриях рассеяния с $\theta = 180^\circ$ и 90°

Обратимся к рассмотрению поведения спектров МБР для раствора лизоцима и буфера. На рис. 1 представлены в качестве примера три спектра для буфера, полученные при 303, 323 и 351 К, для визуализации температурной эволюции МБР света в этом растворе в 90°-геометрии рассеяния. Хорошо видно, что с повышением температуры интенсивность компонент МБР слабо и монотонно возрастает во всем исследуемом интервале температур. Это соответствует представлениям о распространении гиперзвуковых волн в маловязких жидкостях и, в частности, в воде (или температурном поведении интенсивности компонент МБР для маловязких жидкостей) [28]. В отличие от буфера, спектры МБР для раствора лизоцима очень сильно изменяются с ростом температуры (рис. 2). Сравнительный анализ температурной зависимости относительного изменения интегральной интенсивности рассеяния в растворе лизоцима и в натрий-ацетатном буфере, представлен на рис. 4. Хорошо видно (рис. 4a), что при нагревании натрий-ацетатного буфера величина интегральной интенсивности рассеяния света в нем монотонно и слабо изменяется во всем рассматриваемом нами температурном интервале. Интенсивность рассеяния света в растворе лизоцима также монотонно возрастает с ростом температуры до $T \approx 330$ К (рис. 4b), подобно поведению интенсивности рассеяния в буфере. Дальнейшее нагревание приводит к резкому уменьшению интегральной интенсивности компонент МБР, и минимум достигается в окрестности температуры 343 К. Затем ее значение опять начинает слабо монотонно возрастать. Интересно, что в случае обоих геометрий рассеяния температурное поведение относительных значений интегральной интенсивности подобно.

Существенной особенностью поведения компонент МБР является очень сильное уменьшение их интегральной интенсивности при приближении к T_1 со стороны низкотемпературной фазы. Столь же аномальным в данной области температур является поведение скорости и затухания гиперзвуковых волн (рис. 3). На рис. 3 хорошо видно уменьшение скорости в окрестности T_1 и увеличение затухания. В этой же области температур наблюдался сильный рост интенсивности центральной компоненты (рис. 5). Эти эффекты можно объяснить, учитывая, что в данной области температур происходит фазовый переход типа “раствор–гель”.

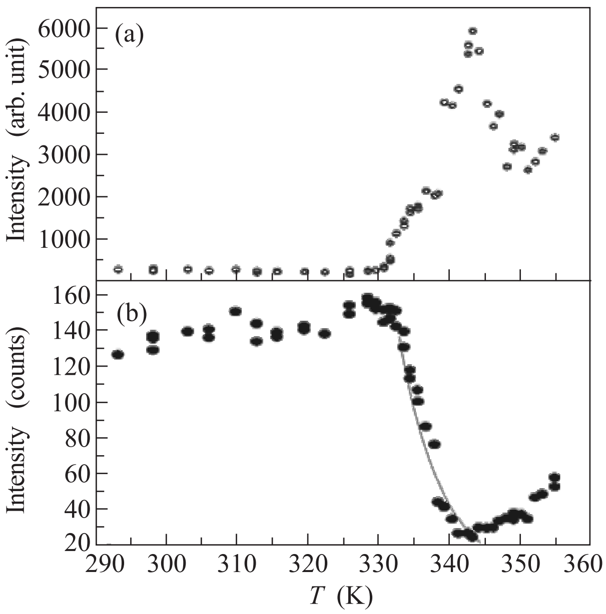

Рис. 5. Температурная зависимость интенсивности центральной компоненты (a) и МБР дублета (b), полученные в экспериментах с $\theta = 90^\circ$. Сплошной линией на рис. (b) показаны результаты расчетов согласно выражению (9), см. текст

Рассмотрим поведение компонент МБР в окрестности точки перехода. Появление компонент МБР в жидкостях обусловлено рассеянием света на адиабатических флуктуациях плотности. При данной геометрии рассеяния спектральная интенсивность компонент дублета на частоте ω, отсчитываемой от частоты падающего света, имеет вид [29]

$$I_B(\omega) = \frac{I_0 V R_{sc}(\rho)}{2\pi r^2} e^{-\sigma l} \times$$
$$\times \left[\frac{\Gamma_{BD}}{(\omega - uq)^2 + \Gamma_{BD}^2} + \frac{\Gamma_{BD}}{(\omega + uq)^2 + \Gamma_{BD}^2} \right], \quad (4)$$

где I_0 – интенсивность падающего света, V – рассеивающий объем, $R_{sc}(\rho)$ – константа рассеяния на адиабатических флуктуациях плотности, r – расстояние от рассеивающего объема до точки наблюдения, σ – коэффициент экстинкции, l – путь, проходимый светом в среде, $\Gamma_{BD} = q^2(4\eta/3+\zeta)/2\rho$, η и ζ – коэффициенты сдвиговой и объемной вязкости, ρ – плотность. Скорость звука и коэффициенты вязкости определены на частоте дублета.

Интенсивность центральной компоненты в исследуемой системе формируется за счет рассеяния на флуктуациях параметра порядка, связанных с переходом типа "раствор–гель". Константу рассеяния на этих флуктуациях можно записать в виде

$$R_{sc}(\psi) = \frac{\pi^2}{\lambda^4} \left(\frac{\partial \varepsilon}{\partial \psi} \right)^2 \langle |\delta\psi|^2 \rangle, \quad (5)$$

где $\delta\psi$ – флуктуации параметра порядка, ответственного за фазовый переход.

В окрестности фазового перехода второго рода

$$\langle |\delta\psi|^2 \rangle \sim \left(\frac{|T - T_C|}{T_C} \right)^{-\gamma} \equiv \tau^{-\gamma}, \quad (6)$$

где T_c – критическая температура, γ – критический индекс восприимчивости. Для микроэмульсий и мицеллярных растворов значение γ лежит в интервале 0.8–1.2 [29, 30].

Приближение к точке фазового перехода приводит к резкому возрастанию интенсивности центральной компоненты (рис. 5а) и увеличению потерь света на рассеяние, то есть к росту коэффициента экстинкции σ, что согласуется с данными, приведенным в работе [31]. Явное выражение для коэффициента экстинкции с использованием приближения Орнштейна-Цернике имеет вид [32]

$$\sigma = \pi R_{sc}(\psi) \left[\frac{2\alpha^2 + 2\alpha + 1}{\alpha^3} \ln(1 + 2\alpha) - 2\frac{1+\alpha}{\alpha^2} \right], \quad (7)$$

$\alpha = 2(kr_c)^2$, $k = 2\pi n/\lambda$, $r_C = r_0 \tau^{-\nu}$ – радиус корреляции, ν – критический индекс.

Вдали от окрестности критической точки $kr_c \ll 1$ коэффициент экстинкции приближенно имеет вид

$$\sigma = \frac{8\pi}{3} R_{sc}(\psi) \sim \tau^{-\gamma}. \quad (8)$$

Так как константа рассеяния от адиабатических флуктуаций плотности меняется слабо, то интегральная интенсивность компонент МБР в критической области может уменьшаться в соответствии с потерями на рассеянии на флуктуациях параметра порядка. Это имеет силу как для луча в кювете, приходящего от источника к рассеивающей области, так и рассеянных лучей, распространяющихся по направлению к точке наблюдения. Таким образом, интенсивности компонент МБР должны убывать как

$$I_B \propto \exp \left[-\frac{8\pi}{3} R_{sc}(\psi) l \right]. \quad (9)$$

Мы проанализировали поведение компонент МБР, полученных в результате экспериментов с раствором лизоцима, полагая, что $\gamma \sim 1$. Результат анализа показан на рис. 5. Хорошо видно, что температурная зависимость интенсивности дублета МБР в области $T < T_1$ хорошо описывается в рамках предложенного механизма. Полный путь, пройденный падающим и рассеянным светом в кювете, был порядка 1 см. Максимально достигнутое значение коэффициента экстинкции оказалось порядка 2 см$^{-1}$. Такое большое значение коэффициента экстинкции качественно согласуется с поведением системы, которая в этой области температур сильно опалесцирует. Дальнейшее нагревание раствора лизоцима приводит к тому, что при $T > T_1$ раствор переходит в гелеобразное состояние [19]. Интенсивность МБР дублетов увеличивается выше точки фазового перехода T1 (см. рис. 2, 4, 5). Поведение МБР света в фазе с гелеобразным состоянием лизоцима определяется силой связи полимерной сетки с жидкостью и является предметом отдельного исследования. Вернемся к рис. 4, где представлены относительные изменения интенсивности МБР дублетов для двух геометрий эксперимента. Нами уже упоминалось, что поведение интенсивности в различных геометриях – подобно в окрестности T_1. Учитывая это, можно сказать, что предложенный механизм хорошо описывает поведения интенсивностей дублетов МБР в разных геометриях рассеяния (то есть не зависит от волнового вектора) при $T < T_1$.

Отметим, что измерение температурной зависимости компонент МБР в опалесцирующих системах практически не проводилось. Сложность состояла в том, что сильно возрастающая центральная компонента маскирует компоненты МБР. Нам удалось преодолеть эту проблему, используя высококонтрастный многопроходной интерферометр Фабри-Перо системы Сандеркока.

Таком образом, нами предложен механизм, объясняющий поведение интенсивности спектров рассеяния Мандельштам-Бриллюэна в окрестности перехода “раствор–гель”, который происходит при тепловой денатурации лизоцима в растворе с высокой концентрацией белка. Использование температурной зависимости компонент МБР может быть эффективным методом анализа опалесцирующих систем, поскольку анализ центральной компоненты в этом случае осложняется вкладом рассеяний высших кратностей. Для компонент МБР этот вклад типа двукратного рассеяния на адиабатических флуктуациях плотности и флуктуациях параметра порядка менее существен, поскольку за счет промежуточного рассеяния в широком интервале углов положение пиков размывается и их вклад будет пренебрежимо мал.

Авторы работы выражают благодарность C. Pruner, H. Brandstetter and A. Asenbaum за помощь и поддержку в проведении МБР измерений, W. Schroer и Emmerich Wilhelm – за плодотворную дискуссию. АВС благодарит Университет г. Зальцбурга за финансовую поддержку. Эта работа поддержана частично грантами Российского фонда фундаментальных исследований # 08-02-00112, # 10-02-00511.

1. H. Lodish, A. Berk, C. A. Kaiser et al., *Molecular cell biology*, W. H. Freeman and Company, New York, 2008.
2. S. Khodadadi, J. H. Roh, A. Kisliuk et.al., Biophys. J. **98**, 1321 (2010).
3. B. F. Rasmussen, A. M. Stock, D. Ringe, and G. A. Petsko, Nature **357**, 423 (1992).
4. Yuji Miyazaki, Takasuke Matsuo, Hiroshi Suga, J. Phys. Chem. B **104**, 8044 (2000).
5. A. V. Svanidze, H. Huth, S. G. Lushnikov et al., Appl. Phys. Lett. **95**, 260729 (2009).
6. S. M. Lindsay, S. A. Lee, J. W. Powell et al., Biopolymers **27**, 1015 (1988).
7. T. Weidlich, S. M. Lindsay, and A. Rupprecht, Phys. Rev. Lett. **61**, 1674 (1988).
8. J. F. Scott, Rev. Mod. Phys. **46**, 83 (1974).
9. А. Брус, Р. Каули, *Структурные фазовые переходы*, М.: Мир, 1984.
10. G. Privalov, V. Kavina, E. Freire, and P. L. Privalov, Anal. Biochem. **232**, 79 (1995).
11. A. Hedoux, R. Ionov, J.-F. Willart et al., J. Chem. Phys. **124**, 014703 (2006).
12. D. F. Nicoli and G. B. Benedek, Biopolymers **15**, 2421 (1976).
13. M. Hirai, S. Arai, and H. Iwase, J. Chem. Phys. B **103**, 549 (1999).
14. S. Arai and M. Hirai, Biophys. J. **76**, 2192 (1999).
15. C. C. F. Blanke, D. F. Koenig, G. A. Mair et.al., Nature **206**, 757 (1965).
16. C. Tanford, Adv. Protein Chem. **23**, 121 (1968).
17. C. Tanford, Adv. Protein Chem. **24**, 1 (1970).
18. R. J. Green, I. Hopkinson, and R. A. L. Jones, Langmuir **15**, 5102 (1999).
19. S. Raccosta, M. Manno, D. Bulone et.al., Eur. Biophys. J. **39**, 1007 (2010).
20. F. Meersman and K. Heremans, Biochemistry **42**, 14234 (2003).
21. J. M. Vaughan, *The Fabry-Perot Interferometer*, Adam Hilger, Bristol and Philadelphia, 1989, p. 612.
22. A. V. Svanidze, S. G. Lushnikov, and S. Kojima, Письма в ЖЭТФ **84**, 646 (2006).
23. S. Speziale, F. Jiang, C. L. Caylor et al., Biophys. J. **85**, 3202 (2003).
24. E. Hashimoto, Y. Aoki, Y. Seshimo et al., Jpn. J. Appl. Phys. **47**, 3839 (2008).
25. F. Aliotta, M. E. Fontanella, S. Magazu, and F. Wanderlingh, Phys. Chem. Liq. **23**, 163 (1991).
26. H. B. Bohidar, Colloid Polym. Sci. **267**, 292 (1989).
27. A. V. Svanidze, S. G. Lushnikov, and S. Kojima, Письма в ЖЭТФ **90**, 85 (2009).
28. O. Conde, J. Teixeira, and P. Papon, J. Chem. Phys. **76**, 3747 (1982).
29. Л. А. Зубков, В. П. Романов, УФН **14**, 615 (1987).
30. М. А. Анисимов, *Критические явления в жидкостях и жидких кристаллах*, М.: Наука, 1987.
31. A. Asenbaum, C. Pruner, H. W. Schroer et al., J. of Mol. Liq. **158**, 7 (2011).
32. V. G. Puglieli and N. C. Ford, Phys. Rev. Lett. **25**, 143 (1970).