# Лекція. Біологічні молекули в розчині

План

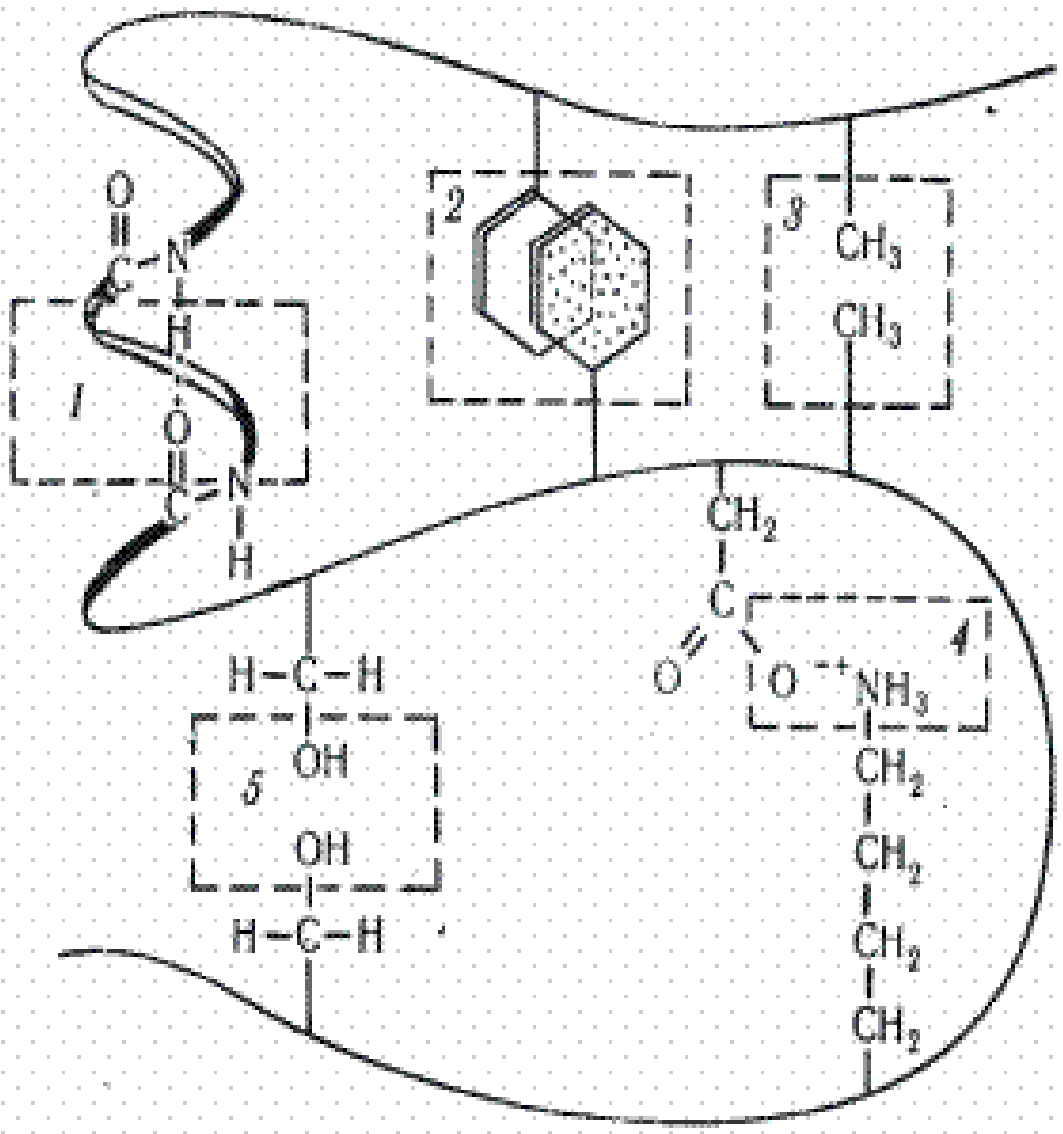
1. Конформація макромолекул
2. Взаємодії в біологічних маркомолекулах
3. Структура води та гідрофобні взаємодії
4. В’язкість біологічних розчинів
5. Дифузія макромолекул
6. Квазіпружне розсіювання світла
7. Швидкість седиментації
8. Електрофорез макромолекул

# Методи дослідження макромолекул

| Метод | Інформація про структуру, форму і динаміку макромолекул |
|---|---|
| Дифракція Х-променів | Просторова структура, форма і розмір; вторинна структура |
| Дифракція нейтронів | Просторова орієнтація доменів і субодиниць у молекулярних асоціатах |
| Електронна мікроскопія | Форма і розмір макромолекул і упаковка їх субодиниць |
| Спектрофотометрія | Оптичні характеристики |
| Диференційна спектрофотометрія | Конформаційні зміни |
| ІЧ-спектроскопія | Вторинна структура і коливальна динаміка |
| Романівська спектроскопія | Конформаційні зміни і вторинна структура |
| Квазіпружне розсіювання світла | Коефіцієнт дифузії та форма |
| Круговий дихроїзм і дисперсія оптичного обертання | Вторинна структура макромолекул; ступінь зв’язування з лігандами |
| Флуоресцентний аналіз | Конформаційні стани; рухомість хромофорних груп і динаміка |
| Передача енергії електронного збудження | Просторове розміщення хромофорів |
| Електронний парамагнітний резонанс | Конформація |
| Ядерний магнітний резонанс | Конформація і динаміка структури |
| Електрофорез | Молекулярна маса і субодиничний склад |
| Дифузометрія | Молекулярна маса і форма |
| Седиментаційний аналіз | Молекулярна маса |

(c) Babsky

# Слабкі взаємодії у білках




1 – водневий зв’язок між пептидними групами в а-спіралі;
2 – гідрофобні взаємодії між неполярними залишками фенілаланіну;
3 – дисперсійні взаємодії між неполярними залишками аланіну;
4 – електростатичні взаємодії між зарядженими залишками лізину і аспарагінової кислоти;
5 – диполь-дипольні взаємодії між N-H групами пептидного зв’язку

# Електростатичні взаємодії у макромолекулах

- Між іонізованими боковими групами в білках.
- Енергія цих взаємодій ($W_e$):

$$W_{\mathrm{e}} = \frac{1}{4\pi\varepsilon_0}\frac{q_1 q_2}{\varepsilon r},$$

де $q_1q_2$ – електричні заряди груп, r – відстань між групами, ε – діелектрична стала.

- Біля поверхні (полярне оточення) $W_e$ менша, ніж всередині (гідрофобне оточення) молекули.
- Вільна енергія цих зв’язків – 40 – 200 кДж/моль.

# Ван-дер-Ваальсові взаємодії

Близькодіючі ~ $10^{-9}$ м

Й.Д. ван-дер-Ваальс (1837-1923)

- **Дисперсійні взаємодії**

- Між нейтральними неполярними групами

$$W_{дис} = \frac{3}{2}\frac{I_1 I_2}{I_1 + I_2}\frac{\alpha_1 \alpha_2}{r^6},$$

де $I_1 I_2$ – потенціали іонізації груп, $\alpha_1$ $\alpha_2$ – поляризованості груп.

$W_{дис}$ = 4 – 40 кДж/моль

- **Диполь-диполь (орієнтаційні) взаємодії**

- Між полярними групами за сталими дипольними моментами $\mu_1$ $\mu_2$

$$W_{дд} = \frac{1}{6\pi\varepsilon_0 k_0 T}\frac{\mu_1^2 \mu_2^2}{\varepsilon r^6},$$

де T – температура, $k_0$ – стала Больцмана.

Коли постійний диполь полярної молекули індукує дипольний момент у сусідній неполярній молекулі виникає взаємодія диполь-індукований диполь з енергією:

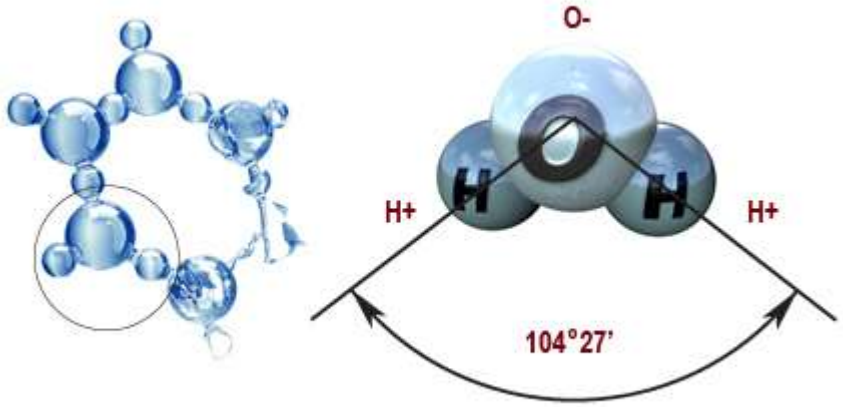
$$W_{ді} = \frac{1}{2\pi\varepsilon_0}\frac{\alpha\mu^2}{\varepsilon r^6},$$

де μ - дипольний момент полярної групи, α - поляризованість неполярної групи.

$W_{дд}$ і $W_{ді}$ 0,4 до 4 кДж/моль.

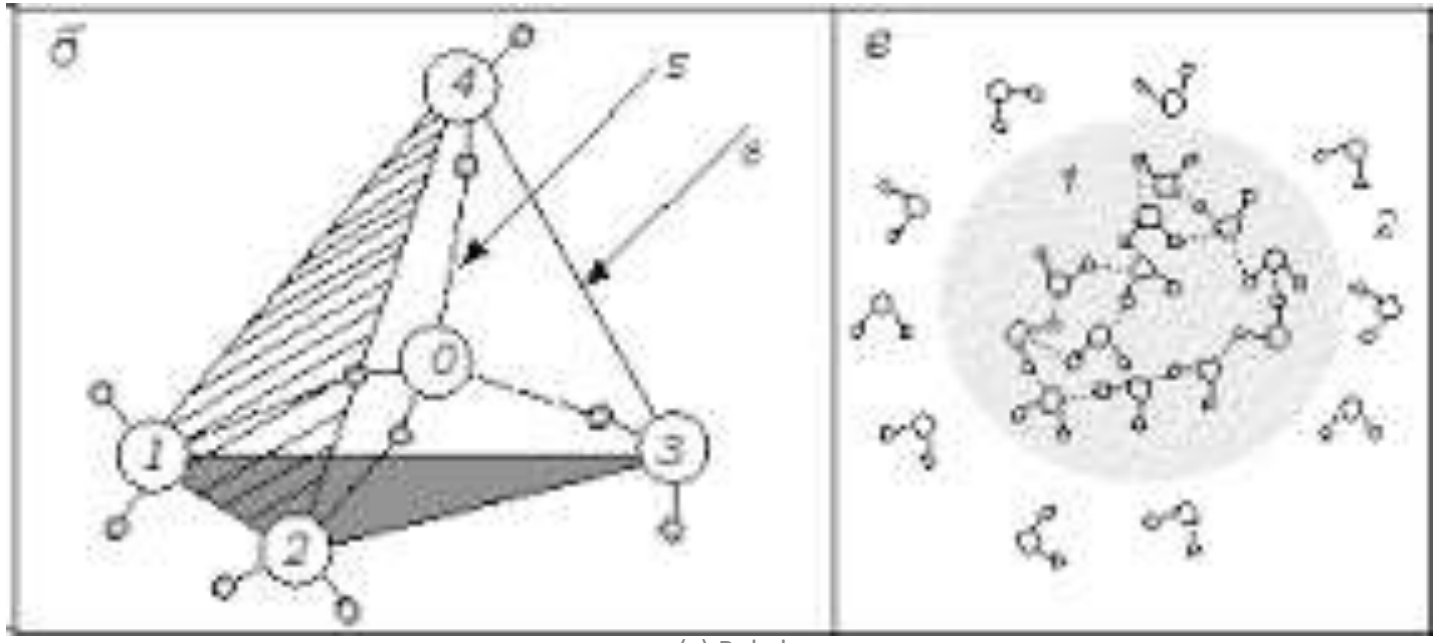
# Особливості молекули води

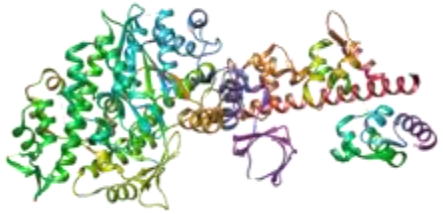
- Довжина ОН-зв'язку - 0,096 нм
- Кут 2α = 104°
- Асиметрія зарядів утворює дипольний момент μ = 1,82 Д (дебай).
- Діалектична проникність ε = 78,54
- Поверхневий натяг  = 0,072,75 дин/см (Т=298 К)
- Збільшення об’єму при замерзанні та зменшення - за плавлення льоду
- Висока теплоємність с = 75,3 Дж / моль · К
- Кожна молекула води і донор, і акцептор водневих зв’язків



# Дві моделі рідкої води

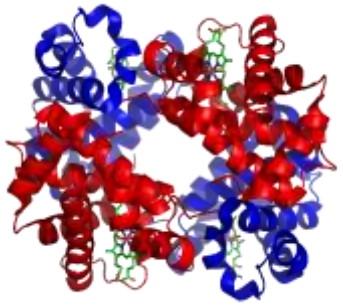
- **Неперервної структури**: єдина тримірна структура тетраедрично скоординованих молекул, у якій фактори зовнішнього середовища деформують водневі зв’язки, але не розривають їх
- **Миготливих кластерів**: кластери – короткотривалі асоціати ($10^{-10}$ -$10^{-11}$ с), які постійно утворюються і розпадаються; за 293°К 70% - кластери, 30% - не асоційовані молекули





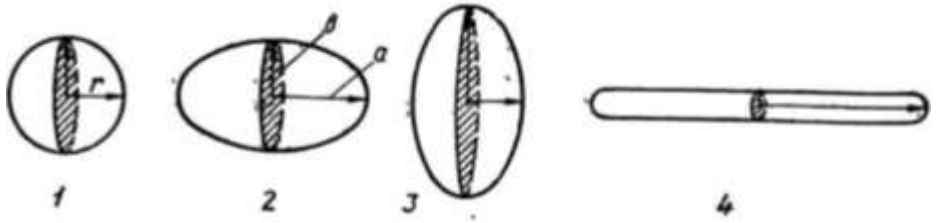
**Міозин**

# В’язкість біологічних розчинів



**Гемоглобін**

- Рух і в'язкість макромолекул у розчинах залежить від їх форми і розмірів




- Зв'язок питомої в’язкості з показниками макромолекул (А. Ейнштейн):

$$\eta_{пит} = \nu n_0 V = \nu \Phi,$$

*де $\eta_{пит}$ – питома в’язкість, $n_0$ – число макромолекул в одиниці об'єму розчину, V – об’єм макромолекули, ν – фактор форми (коефіцієнт Сімхи), Ф – об’єм макромолекул, який вони займають у розчиннику*

- Усі макромолекули гідратовані і це впливає на в’язкість:

$$[\eta] = \nu(\tilde{V}_2 + \delta\tilde{V}_1),$$

*де [η] характеристична в’язкість, ν – фактор форми, $\tilde{V}_1$ – парціальний питомий об’єм чистої води, $\tilde{V}_2$ - парціальний питомий об’єм макромолекули, δ – ступінь гідратації молекули*

# Дифузія макромолекул

**Поступальна дифузія**: хаотичне переміщення макромолекул з високої концентрації в низьку. Згідно з першим *законом Фіка* мимовільний дифузійний потік речовини J (dn/dt) пропорційний градієнту концентрації (δC/δx)*:*

$$J = \frac{dn}{dt} = -DS\frac{\delta C}{\delta x}$$

*де n – кількість молів дифундуючих молекул, S – площа дифузії макромолекул, D – коефіцієнт дифузії (м$^2$/с), негативний знак (-) - дифузія у напрямку зменшення концентрації*

- Молекулярна маса (M) сферичних макромолекул обернено пропорційна коефіцієнту дифузії D в кубі:

$$M = mN_0 = \frac{N_0\rho}{162\pi^2}\left(\frac{k_0T}{\eta}\right)\frac{1}{D^3}$$

*де ρ – питома густина ММ, η- в'язкість розчину, r – радіус сферичної макромолекули, T - температура.*

- D вимірюється спектрофотометрично за часом розмивання межі поділу розчинник – розчинник макромолекул. За *законом Ламберта-Бера* оптична густина розчину пропорційна концентрації макромолекул

**Обертальна дифузія**: характерна для видовжених молекул (міозин, тропоміозин, ДНК…)

- Швидкість зміни орієнтації макромолекул завдяки градієнта густини δρ/δф:

$$\frac{dn}{dt} = -\theta\frac{\delta\rho}{\delta\phi}$$

*де* θ *– коефіцієнт обертальної дифузії, с$^{-1}$*

- Подібно до поступальної дифузії θ обернено пропорційний коефіцієнту внутрішнього тертя за обертання ($f_r$):

$$\theta = \frac{k_0T}{f_r}$$

- Для експериментального визначення обертальної дифузії *методом подвійного променезаломлення* вимірюють анізотропію розчину, яка виникає завдяки орієнтації витягнутих макромолекул

# Квазіпружне розсіювання світла

- Цим методом визначають динамічні властивості макромолекул: коефіцієнти поступальної та обертової дифузії, час релаксації… Рухомі макромолекули змінюють довжину хвилі падаючого світла від дуже монохроматичного джерел світла (*лазер*) завдяки *ефекту Доплера* і створюють певний розподіл розсіяного світла за довжиною хвиль (або частотами). Спектр розсіяного світла є *розподілом Лоренца* для оптично **ізотропних** макромолекул у розчині:

$$I(q,\omega) = \frac{N}{\pi}\alpha^2\left(\frac{q^2 D}{\omega^2 + (qD)^2}\right)$$

*де I(q,ω) – інтенсивність розсіяного світла; ω=2πν – кругова частота; ν – частота світла; N – середня кількість молекул в одиничному об'ємі;* $q = \frac{4\pi}{\lambda} sin\frac{\varphi}{2}$ *– фактор розсіювання; φ - кут, під яким вимірюється розсіяне світло; D – коефіцієнт поступальної дифузії; α – молекулярна поляризованість.*

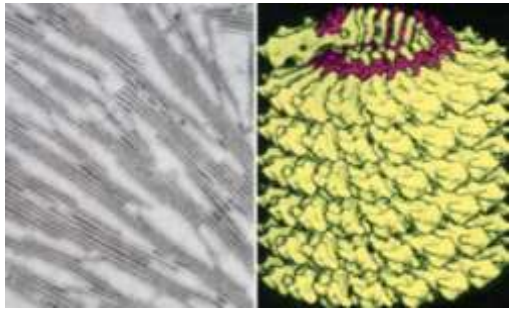
- I(q,ω) для оптично **анізотропних** макромолекул (модель витягнутих циліндрів), котрі в розчині проявляють незалежні обертальну і поступальну дифузії, записується так:

$$I(q,\omega) = \frac{N}{15\pi}(\alpha\| - \alpha\perp)^2\left(\frac{q^2 D + 60}{\omega^2 + (q^2 D + 60)^2}\right)$$

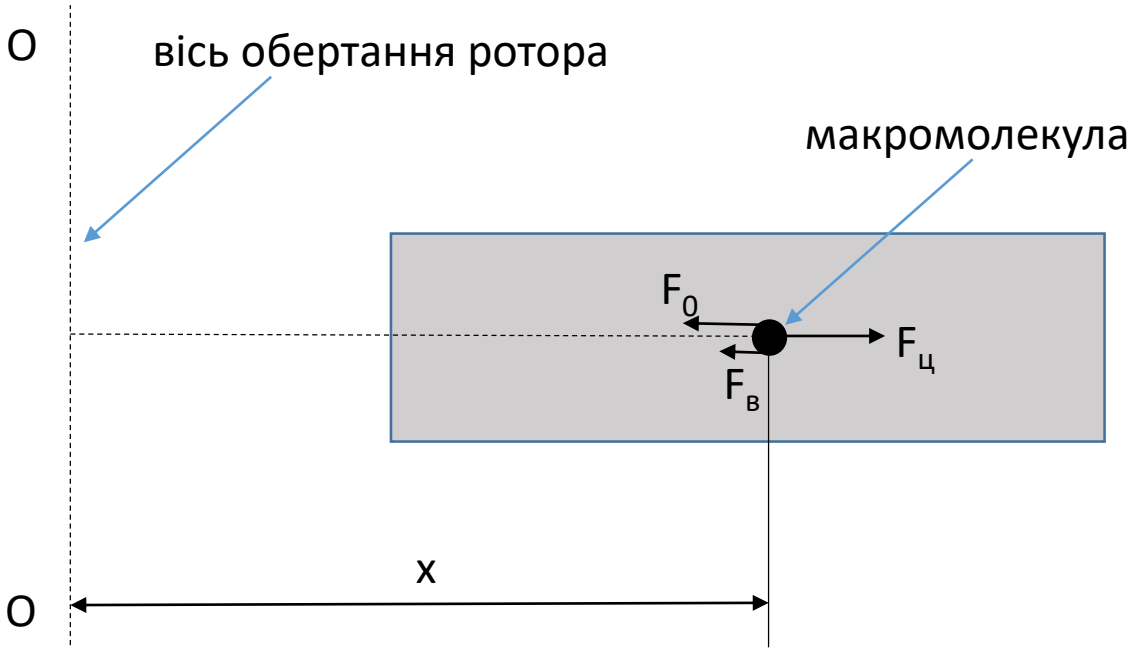
*де* $\alpha\| - \alpha\perp$ *- компоненти поляризованості паралельно і перпендикулярно до осі циліндра*

- Коефіцієнти поступальної та обертальної дифузії

вірусу тютюнової мозаїки: 0,29 x $10^{-11}$ $м^2/с$ і 360 $с^{-1}$ →



# Седиментація макромолекул




Дія сил на макромолекулу за центрифугування

- Осідання часток у рідині за дії сили тяжіння. Для макромолекул сила гравітації настільки мала, що дія випадкових зіткнень з молекулами розчинника значно перевищує седиментацію молекул. Для цього створюють центробіжні прискорення більші за g у $10^4$ – $10^5$ разів.
- **Метод швидкості седиментації**. Для визначення М.м. великих макромолекул. За деякий час сили, які діють на макромолекули зрівноважуються:

$$F_ц = F_в + F_o \qquad (1)$$

- Центробіжна сила:

$$F_ц = m\omega^2 x = 4/3\ \pi r^3 \rho \omega^2 x, \qquad (2)$$

де m і r – відповідно маса і радіус макромолекули, ρ – її питома густина, x – відстань від осі ротора до макромолекули в кюветі

- Кутова швидкість: ω ($c^{-1}$): $\omega = \pi n / 30$, (3)

де n – швидкість обертання ротора, $хв^{-1}$

- Виштовхувальна сила:

$$F_в = m_0\omega^2 x = 4/3\ \pi r^3 \rho_0 \omega^2 x, \qquad (4)$$

де $m_0$ – маса виштовхнутої рідини, $\rho_0$ – питома густина розчинника.

- Сила опору: $F_o = fv$, (5)

де f – коефіцієнт внутрішнього тертя.

# Седиментація макромолекул

**Метод швидкості седиментації** (продовження)

- Визначаєм масу макромолекули:

$$m = \frac{f}{\left(1-\frac{\rho_0}{\rho}\right)}\frac{v}{\omega^2 x} \qquad (6)$$

- Вводимо коефіцієнт седиментації s (c) – відношення швидкості седиментації v до кутового прискорення $\omega^2 x$:

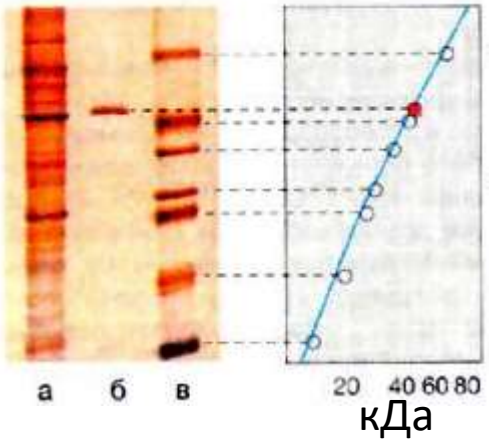
$$s = \frac{v}{\omega^2 x} = \frac{dx}{dt}\frac{1}{\omega^2 x} = \frac{1}{\omega^2}\frac{d(\ln x)}{dt} \qquad (7)$$

- Якщо підставити у формулу (6) s, парціальний об'єм V, замінити f на коефіцієнт поступальної дифузії і помножити на число Авогадро $N_0$, то отримаєм М.м. макромолекули (формула Сведберга):

$$M = mN_0 = \frac{RTs}{D(1-\rho_0 V)} \qquad (8)$$

- **Метод седиментаційної рівноваги…**

# Електрофорез макромолекул




- Рух часток у рідкій фазі за дії електричного поля. За деякий час макромолекули починають рухатись рівномірно з швидкістю:

$$qE = fv,$$

- де q – сумарний заряд макромолекул, E – напруженість електричного поля, f – коефіцієнт внутрішнього тертя, v – швидкість руху макромолекули
- Відношення v до E називається *електрофоретичною рухомістю* u, $м^2/с \cdot В$:

$$u = v / E = q / f$$

- Для сферичних макромолекул $f = 6\pi\eta r$ і тоді $u = q / 6\pi\eta r,$

де η – в'язкість середовища, r – радіус макромолекули

- Електрофорез з додецилсульфатом натрію (ДСН) використовують для визначення М.м. і субодиничного складу. ДСН денатурує білок, а β–меркаптоетанол розриває дисульфідні зв'язки. ДСН ліквідує відмінності зарядів у нативних білках і формує циліндри зі сталим діаметром, але різною довжиною.
- За матрицю використовують поліакриламідний гель (ПАГ). Експериментально з'ясовано зв'язок між електрофоретичною рухомістю і логарифмом М.м.:

$$u = b - a \lg M,$$

де a і b – сталі величини, які залежать від властивостей ПАГ.

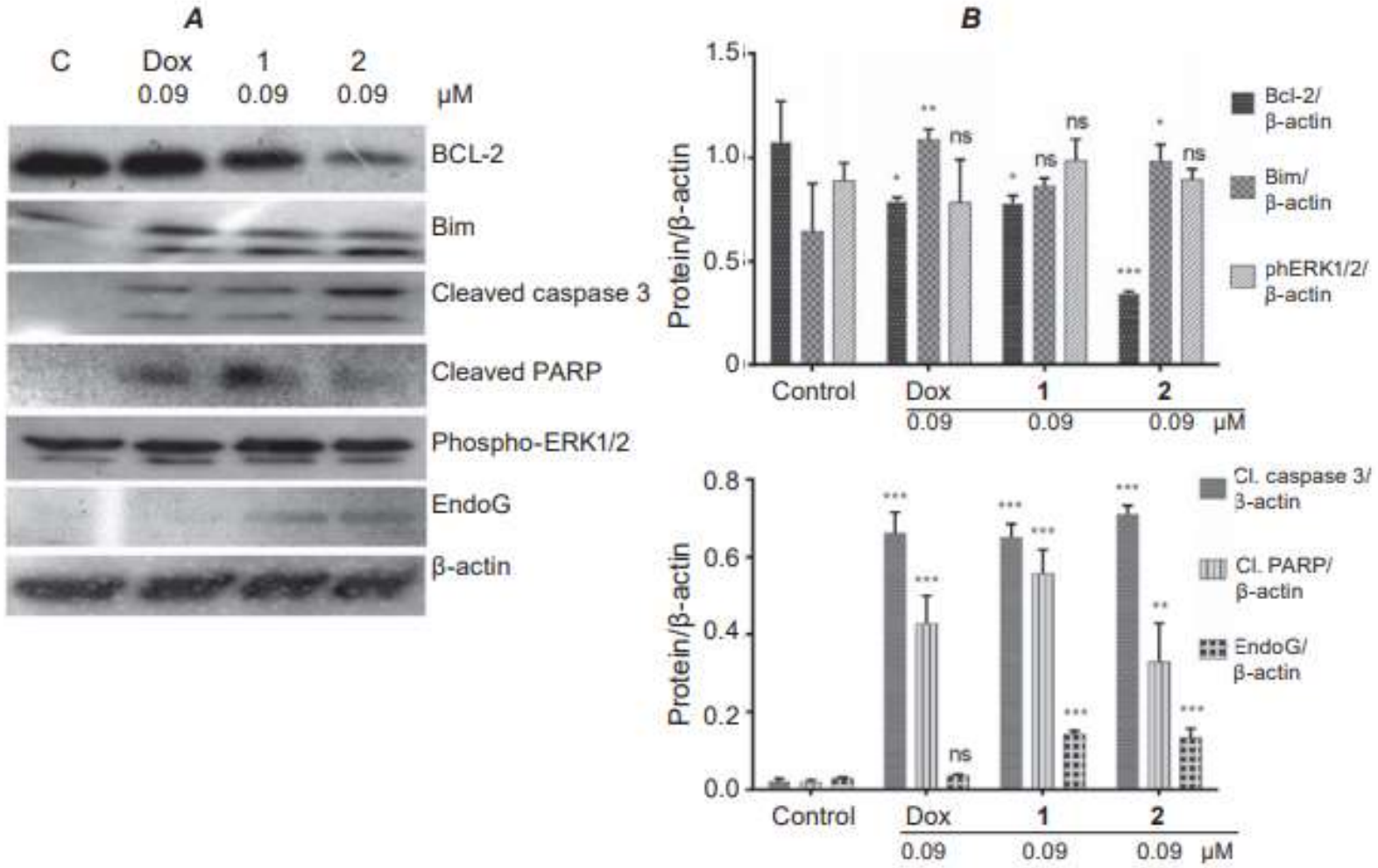



*Fig. 1. The effect of compounds **1**, **2**, and doxorubicin (Dox) on the level of apoptosis-initiating proteins in human leukemia HL-60 cells: **A** – Western-blot analysis of proteins; **B** – densitometry of protein amount. Cells were treated for 48 h with compounds **1**, **2** and Dox. * $P \leq 0.05$; ** $P \leq 0.01$;*** $P \leq 0.001$, ns – non-significant changes (difference compared with the non-treated control cells). C – control (untreated) cells; Cl – cleaved; EndoG – endonuclease G; ERK – extracellular signal-regulated kinase; PARP – poly (ADP-ribose) polymerase; ph – phosphorylated*

Finiuk N et al. Apoptosis induction in human leukemia cells by novel 2-amino-5-benzylthiazole derivatives. *Ukr Biochem J.* 91(2): 26-36, 2019.

# Взаємодія макромолекул у сольовому розчині (теорія Дебая-Хюккеля)

- Енергія взаємодії між ММ залежить від іонів навколишнього середовища. Заряджена ММ притягує протиіони і змінює електричний потенціал. Потенціал і відстань описуються *рівнянням Пуассона* про неперервний потік електричних зарядів:

$$\frac{\delta^2\psi}{\delta x^2} = -\frac{\rho}{\varepsilon_0\varepsilon}$$

де x – відстань між двома ММ, ψ- заряд, який створює ММ, ε– діелектрична стала, ρ - густина заряду у розчині, $\varepsilon_0$ = 8,85 x $10^{-12}$ Кл /В · м

- П. Дебай і Е. Хюккель припустили:

1) На певній відстані від ММ розчин стає електронейтральним

2) Електрична енергія іона значно менша за теплову

- В результаті низки перетворень диференціальних рівнянь отримали досить просту формулу:

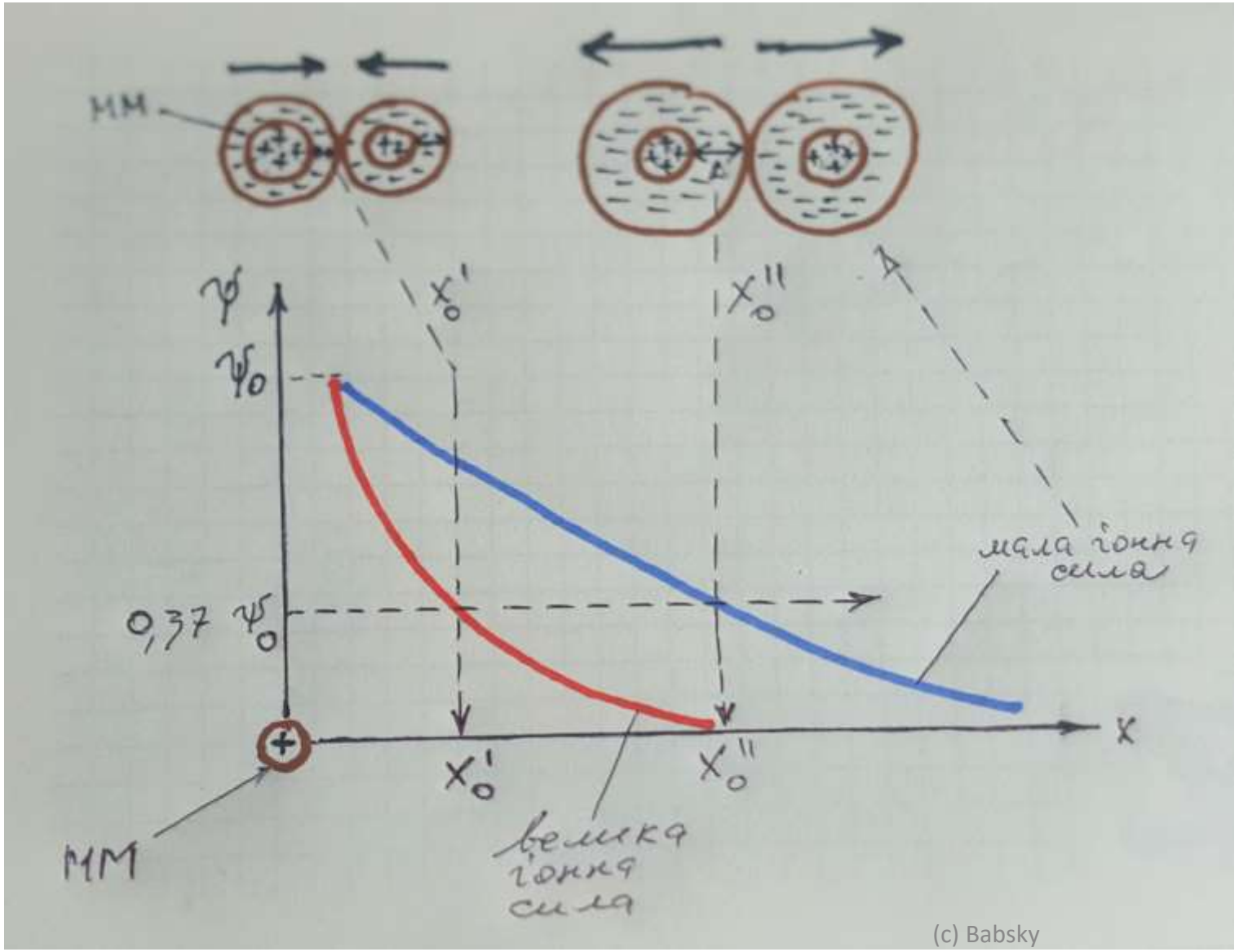
$$\Psi = \psi_0 e^{-px},$$

де $\psi_0$ – потенціал на поверхні макромолекули

- Потенціал ММ зменшується із зростанням відстані за експоненційним законом. Відстань $x_0$, на якій потенціал зменшується в е раз, тобто $\psi=0{,}37\psi_0$, називають *дебаєвською довжиною*. $x_0$ визначає товщину іонної оболонки, яка оточує кожну макромолекулу. Якщо вирахувати іонну силу розчину $\mu$, то ця величина буде:

$$x_0 = \frac{1}{p} = \sqrt{\frac{\varepsilon_0\varepsilon RT}{2F^2\mu}}$$

# Взаємодія макромолекул у сольовому розчині




- За великої іонної сили (висока концентрація солі) оболонка іонів стає тонкою (протиіони притискаються до ММ), а коли іонна сила мала (розведений розчин) оболонка іонів значно зростає. Розчини KCl чи NaCl: $C_i = 10^{-2}$ моль/л, $x_0$ = 3,04 нм; $C_i = 10^{-4}$ моль/л, $x_0$ = 30,4 нм
- Взаємодія великих заряджених ММ визначається сумою ван-дер-Ваалівської сили притягання та електростатичного відштовхування. У розведеному розчині переважають сили відштовхування внаслідок великих оболонок протиіонів і, навпаки, у концентрованих - $\mu$ збільшується, а $x_0$- зменшується.

# Теорія сильних електролітів Дебая - Хюккеля

Петер Дебай
1884 - 1966

Еріх Хюккель
1896 - 1980

# Література


1. Костюк П.Г., Зима В.Л., Магура І.С. та ін.. Біофізика. – Київ: вид-во «Київський університет», 2008. – 567 с.
2. Зима В.Л. Біофізика: Збірник задач. – Київ: Вища школа, 2001. — 124 с.
3. Ємчик Л.Ф., Кміт Я.М. Медична та біологічна фізика. – Львів: Світ, 2003. – 450с.
4. Санагурський Д.І. Об’єкти біофізики. – Львів: вид-во ЛНУ імені Івана Франка, 2008. – 522 с.
5. Таланов С.О., Федоренко О.А., Плиска О.І., Лазоришинець В.В. Біофізика: Курс лекцій. - Київ: вид-во НПУ імені М.П.Драгоманова, 2014. – 209 с.
6. Тіманюк В.О., Животова О.М. Біофізика: Навч. посібн. для студ. фармац. вищ. навч. закладів. - Харків: вид-во НФАУ: Золоті сторінки, 2001. – 204 с.