

01

Кристаллизация хлорида натрия из высыхающих капель белково-солевых растворов с разным содержанием белка

© Т.А. Яхно

Институт прикладной физики РАН,
603950 Нижний Новгород, Россия
e-mail: yakhta13@gmail.com

(Поступило в Редакцию 25 декабря 2014 г.)

Экспериментально доказана солевая природа кристаллических структур, образовавшихся при высыхании капель белково-солевых растворов с низким ($< 1 \text{ wt}\%$) и высоким (7 и 9 wt%) содержанием альбумина при физиологической (0.9 wt%) концентрации NaCl. Доказательства построены на рассмотрении динамики процесса фазовых переходов, морфологическом исследовании и различии физико-химических свойств белка и соли. Практическая значимость работы заключается в предоставлении дополнительной информации о распределении белка и соли в высыхающих жидкостях.

Взаимодействие различных ионов с молекулами белков в водном растворе является важной проблемой естествознания. Существует множество методологических подходов для проведения адекватных исследований в рамках данной проблемы. Среди них — статическое и динамическое светорассеяния, круговой дихроизм [1–3], ядерный магнитный резонанс [4], УФ-, ИК-, Raman- и флуоресцентная спектроскопии [5,6], использование флуоресцентных зондов [7]. В последние 20 лет во всем мире отмечается рост интереса исследователей к сложным физико-химическим процессам, происходящим в каплях, сидящих на твердой подложке [8]. Делаются попытки использования модели высыхающей капли и для исследования белково-солевых взаимодействий в биологических жидкостях. В качестве наиболее простых моделей биологических жидкостей обычно используют белково-солевые растворы.

Топография структур белка и соли в высохших пленках не всегда очевидна и часто трактуется по-разному. Так, в работе [9] описано формирование дендритных структур молекулами ДНК, при этом не было учтено присутствие в растворе хлорида натрия, дендритный рост которого из высыхающих капель белково-солевых растворов к тому времени уже был описан [10]. В работе [11] рассмотрено влияние различных натриевых солей на структуризацию высыхающих пленок BSA (бычьего сывороточного альбумина)-солевых смесей. Показано, что „характер структуризации BSA“ (образование дендритов) строго зависит от аниона. Авторы [12] с помощью атомно-силовой микроскопии (АСМ) провели исследование влияния различных хлоридов на образование дендритов „белково-солевыми смесями“. Описаны четыре класса структур: а) бесструктурные белково-солевые агрегаты, б) крупные белково-солевые мезокомпозиции, в) смешанные белково-солевые гели, г) для NaCl и KCl — микроскопически различающиеся фазы — псевдофрактальные паттерны. В работе [13] те же авторы не обнаружили явных признаков фазового разделения между BSA и NaCl, хотя наблюдавшиеся треугольные

кристаллиты склонны были считать кристаллами NaCl. В работе [14] был использован BSA, меченный флуорохромом. Авторы рассматривали под микроскопом высохшие капли белково-солевой смеси при освещении, возбуждающем свечение флуорохрома. Солевые структуры при этом ярко светились в силу присущего им высокого светорассеяния и были приняты авторами за альбумин. Критику этой работы можно найти в [15]. Авторы работы [16] наблюдали фрактальные кристаллические структуры в высохших каплях водных растворов, содержащих лизоцим и NaCl. Методом EDXS (Energy dispersive X-ray spectroscopy) ими было показано, что дендритные кристаллы состоят в основном из натрия и хлора в соотношении 1:1. Однако в заключении статьи авторы пишут о том, что все-таки считают наблюдаемые ими дендритные структуры кристаллами лизоцима по аналогии с „дендритными структурами BSA“, описанными в работах [11,12]. В работе [17] сказано, что при высыхании солевого раствора ДНК соль кристаллизуется на молекулах ДНК и образуются ДНК-солевые комплексы. Присутствие молекул ДНК усиливало (enhanced) кристаллизацию по сравнению с растворами, не содержащими ДНК.

Известно, что дендриты образуются из расплавов, паров или растворов при быстрой кристаллизации вещества в стесненных условиях роста вследствие неравномерного питания веществом отдельных частей растущих кристаллов [18]. Р.И. Минц и соавторы (1988) были первыми, кто выразил мнение, что при высыхании капель белково-солевых растворов реализуется механизм фрактального роста солевых кристаллов, обусловленный в первую очередь не неравновесностью кристаллизации, а возникающей в процессе ее неоднородностью пространства вследствие фазового расслоения соли и белка [10]. Методом математического моделирования было проведено исследование дендритного роста кристаллов соли в пересыщенном растворе в присутствии второго компонента, который, отгесняясь движущейся кристаллической поверхностью и достигая определенной кон-

центрации, переходил в другую фазу, создавая таким образом локальные препятствия росту [19]. К средам такого типа авторы относили белково-солевой раствор. Однако в работе [20] был проведен критический анализ данной модели и сделан вывод о ее несостоятельности. Недавно [21] дендритный рост кристаллов NaCl из гелей крахмала был выявлен экспериментально и подтвержден математическим моделированием. Собственные наблюдения автора также свидетельствуют о том, что дендритные структуры в высохших каплях белково-солевых растворов имеют солевую природу [22,23].

Поскольку вопрос о природе дендритов в высохших белково-солевых растворах до сих пор не имеет однозначной трактовки, автор считает целесообразным привести дополнительные аргументы в пользу их солевого происхождения.

1. Материалы и методы

Растворы бычьего сывороточного альбумина (BSA, V фракция, Австрия) разных весовых концентраций (0,7, 7 и 9%) были приготовлены растворением альбумина в физиологическом (0,9 wt%) растворе NaCl („хч“ Reaktiv, Inc., Russia) в дистиллированной воде. После многократного перемешивания растворов переворачиванием пробирок они были оставлены на ночь при комнатной температуре. На следующий день после повторного тщательного перемешивания растворы были размещены в виде капель объемом $3 \mu\text{l}$ (по 6–8 капель на стекло) с помощью микропипетки на 20 новых предметных стеклах (AрехLab), обработанных предварительно дистиллированной водой и этиловым спиртом, и оставлены высыхать в горизонтальном положении в условиях лаборатории ($T = 19\text{--}21^\circ\text{C}$, $H = 67\text{--}70\%$). Высохшие капли были исследованы под оптическим микроскопом Levenhuk (China) с цифровой видеокамерой, сопряженной с компьютером, а также под АСМ „Smena“ NT-MDT (Russia) с использованием сенсора CSG11.

Для выявления солевых структур в высохших на стекле каплях проводили денатурацию белка кратковременным контактом препаратов с фильтровальной бумагой, смоченной раствором 1 объема HCl (плотностью 1.19 g/cm^3) в 2 объемах 96% этанола. Данный раствор, денатурируя и растворяя альбумин, не растворяет NaCl [24]. В другом эксперименте фиксировали альбумин на стекле жаром [25]. Для этого прогревали стекла с высохшими на стекле каплями над пламенем спиртовки около 1 min. При этом белок уплотнялся и прочно прилипал к стеклу. Препараты охлаждали до комнатной температуры и погружали в дистиллированную воду. Солевые структуры начинали растворяться. Без процедуры фиксации альбумина погружение препаратов в воду приводило к полному растворению высохших каплей.

2. Результаты и обсуждение

Для выяснения реальной природы дендритов целесообразно рассмотреть динамику фазовых переходов в высыхающих каплях белково-солевых растворов, провести морфологическое исследование под оптическим и АСМ и подвергнуть высохшие капли таким физико-химическим воздействиям, на которые белок и соль реагируют по-разному.

2.1. Динамика фазовых переходов

Известно, что концентрация насыщения для NaCl при 20°C составляет $35.87 \text{ g/100 g H}_2\text{O}$ [24]. Если рассматривать сидящую высыхающую каплю 7% BSA в 0,9% NaCl объемом $3 \mu\text{l}$, то динамика потери ее массы в результате испарения выглядит следующим образом (рис. 1). Первые 3 min ($T = 21\text{--}22^\circ\text{C}$) испарение идет более интенсивно со средней скоростью 0.35 mg/min за счет большей испаряющей поверхности (купола) и отсутствия слоя насыщенного пара, лимитирующего испарение. После уплощения капли и формирования над ней слоя насыщенного пара испарение становится равномерным со скоростью 0.14 mg/min вплоть до полного испарения свободной воды (в самом конце отмечается второй нелинейный участок замедления скорости испарения). Расчеты показывают, что концентрация насыщения, после которой начинается кристаллизация соли, в высыхающей капле будет достигнута, когда объем воды сократится до $0.1 \mu\text{l}$. Эта точка указана на рис. 1 стрелкой. То есть высыхание капли сопровождается постепенным повышением концентрации соли в белково-солевом растворе вплоть до начала кристаллизации в самом конце испарения свободной воды. Фазовые превращения альбумина при этом (от мицеллообразования до геля) происходят в первой половине процесса испарения [26]. На рис. 2 показаны этапы кристаллизации NaCl из белково-солевых растворов с разным содержанием белка. Можно убедиться в том, что кристаллизация соли начинается после завершения формирования белкового

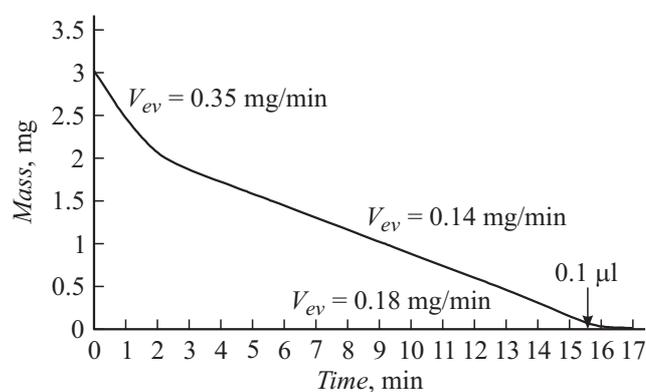


Рис. 1. Изменение массы высыхающей капли 7 wt.% BSA в 0,9 wt.% NaCl объемом $3 \mu\text{l}$ (экспериментальные данные [26]). Стрелкой указан момент начала кристаллизации NaCl.

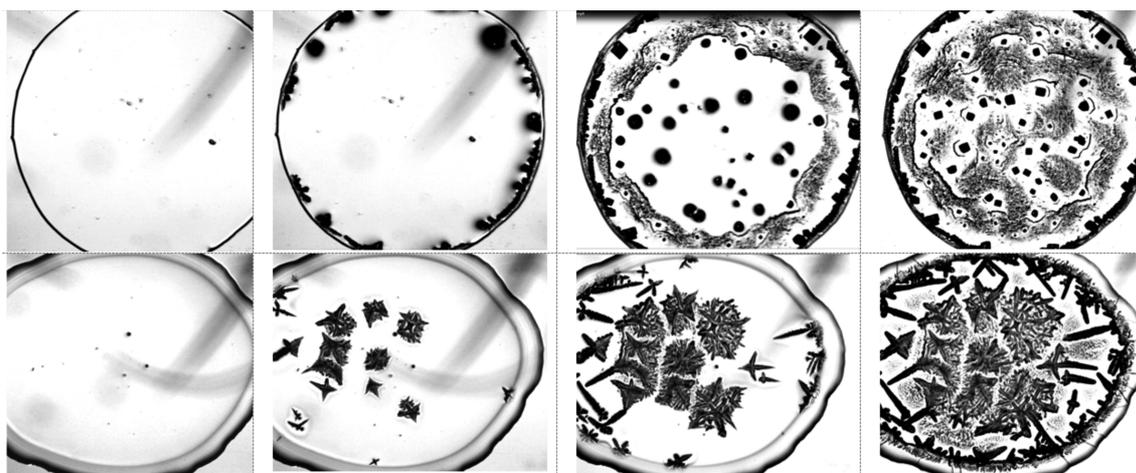


Рис. 2. Процесс кристаллизации соли в сидящих на стекле каплях объемом $2\mu\text{l}$ растворов BSA в 0.9 wt.% водном растворе NaCl, слева направо: верхний ряд — 0.7 wt.% BSA, нижний ряд — 9 wt.% BSA. Длительность процесса — 5 s ($\sim 5\%$ от времени высыхания целой капли).

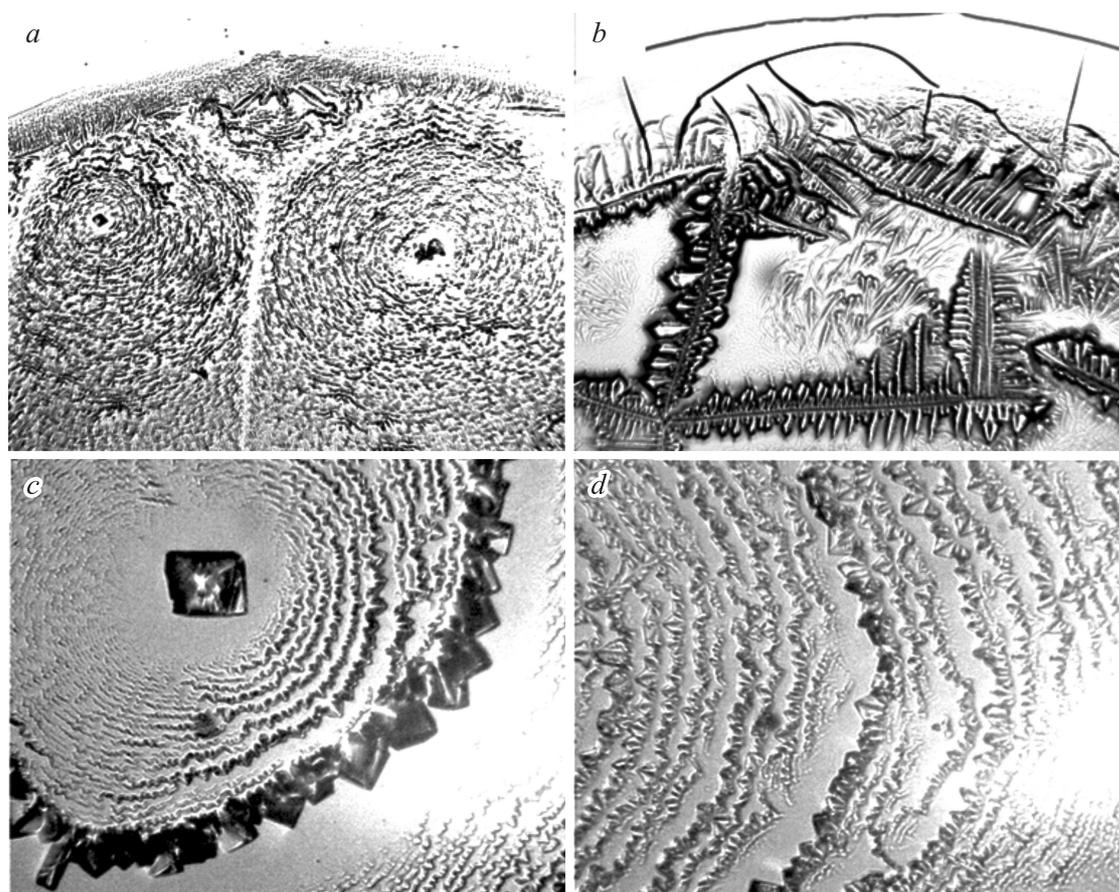


Рис. 3. Характерные кристаллические структуры в высохших на стекле каплях белково-солевых растворов. Верхний ряд (об. $\times 10$): 0.7 wt.% BSA (a) и 9 wt.% BSA в 0.9 wt.% водном растворе NaCl. Нижний ряд (об. $\times 10$): элемент структуры (a) — монокристалл, окруженный концентрическими кругами мелких поликристаллов (c), и поликристаллические структуры (d) при большем увеличении (об. $\times 40$).

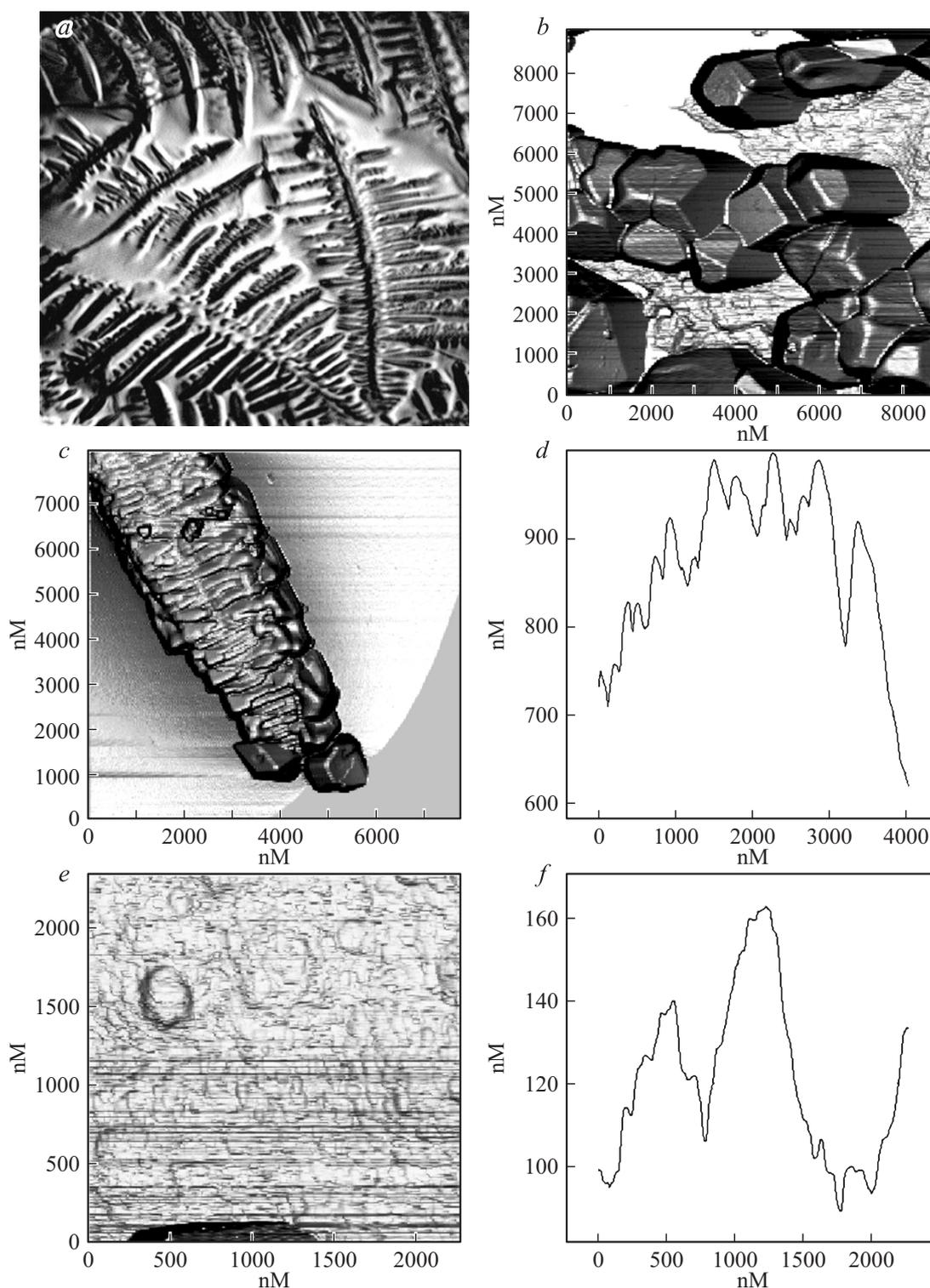


Рис. 4. Дендриты в высохших каплях 7 wt.% BSA в 0.9 wt.% NaCl: *a* — оптическая микроскопия (ув.×70), *b–f* — АСМ. Дендриты составлены из солевых кристаллов, расположенных на белковой подложке. Рельеф подложки более гладкий, чем рельеф солевых кристаллов.

валика по краям капли и плоской площадке альбумина в центре. По данным экспериментов, на формирование белкового валика уходит $\sim 70\%$ альбумина, содержащегося в капле [27]. С помощью математического

моделирования показано [28], что распределение соли по плоской поверхности капли в силу диффузионных процессов должно быть примерно однородным. Однако это распределение зависит от объемной доли белка: при

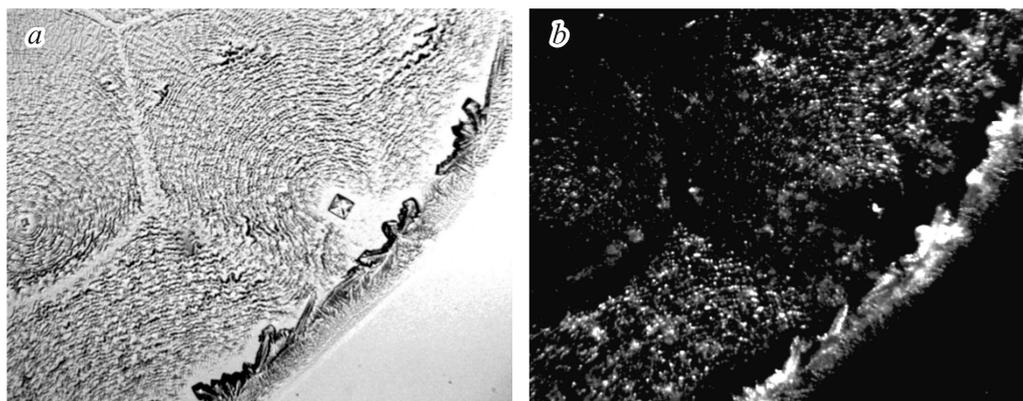


Рис. 5. Фрагмент высохшей на стекле капли 0.7 wt.% BSA в 0.9 wt.% водном растворе NaCl в проходящем свете (*a*) и при боковом освещении (*b*). Об.×10. Кристаллические структуры светятся отраженным светом.

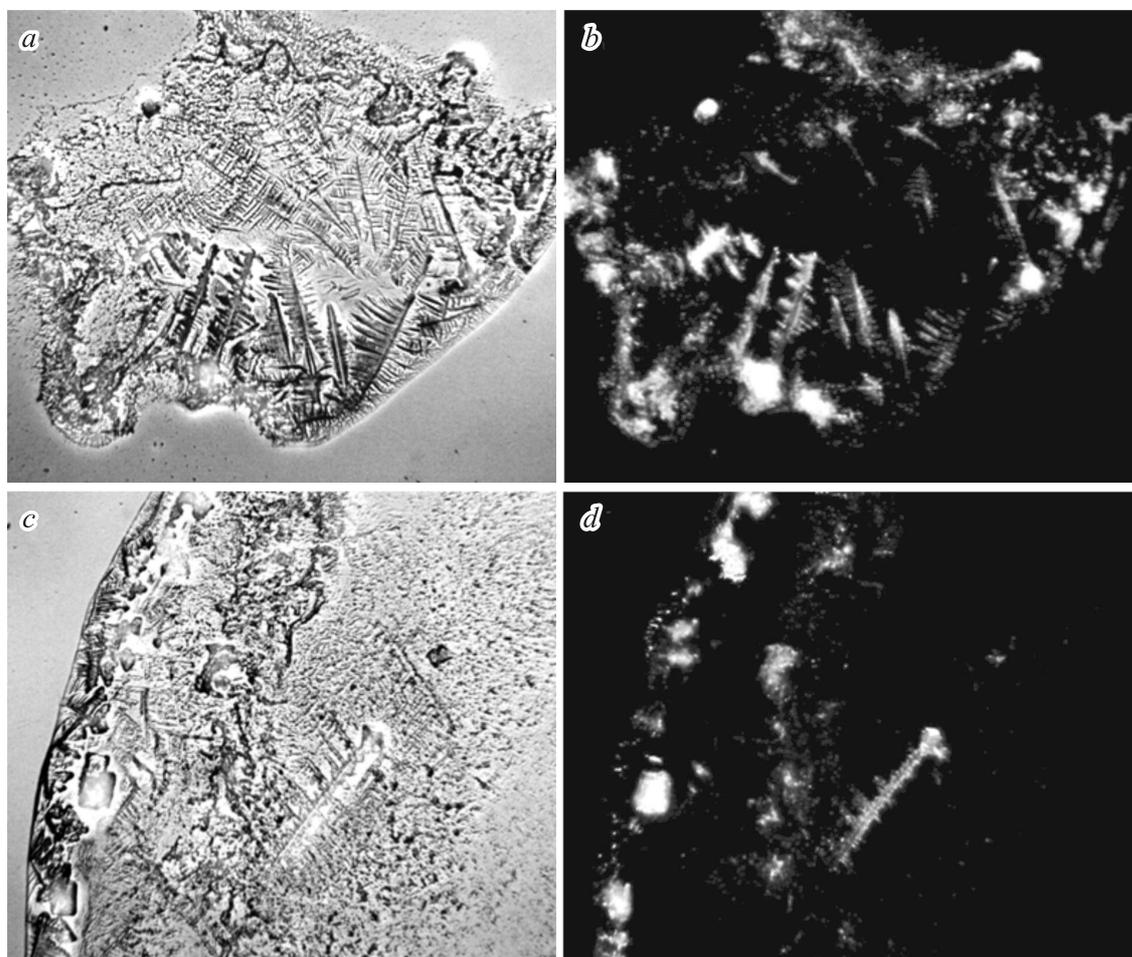


Рис. 6. Фрагменты высохших на стекле капель 9 wt.% BSA в 0.9 wt.% водном растворе NaCl после денатурации белка: в проходящем свете (*a, c*) и при боковом освещении (*b, d*). Об.×10. Отражающие свет кристаллические структуры сохранились.

малом содержании альбумина ($\Phi_0 = 0.06$) концентрация соли по периферии высыхающей капли несколько выше, чем в центре, а при большом ($\Phi_0 = 0.24$) — соли несколько больше в центральной части. На рис. 2 кристаллизация соли в пробе с низким содержанием

альбумина начинается с периферии капли, а в пробе с высоким содержанием альбумина — с центра, что согласуется с моделью [28]. Процесс кристаллизации соли занимает $\sim 5\%$ от времени полного высыхания капли. Начало образования характерных структур сов-

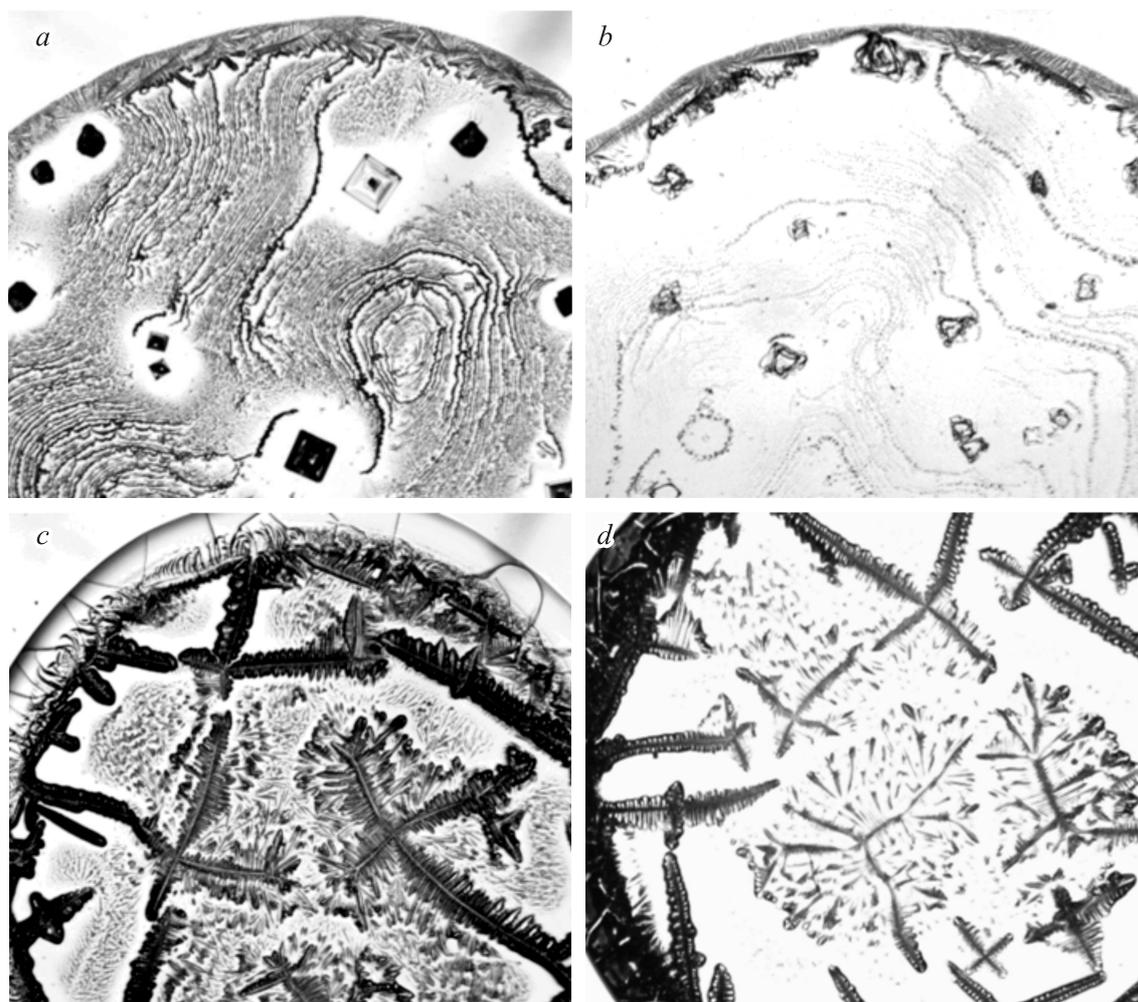


Рис. 7. Высохшие капли белково-солевых растворов: верхний ряд — 0.7 wt.% BSA в 0.9 wt.% водном растворе NaCl (об. \times 4). Нижний ряд — 9 wt.% BSA в 0.9 wt.% водном растворе NaCl. Слева (a, c) — до обработки, справа (b, d) — после фиксации жаром и промывки в воде. Солевые структуры частично растворились.

падает по времени с достижением в капле критической концентрации соли. Таким образом, рассмотрение динамики фазовых переходов при высыхании капли белково-солевого раствора говорит в пользу солевой природы дендритных структур. Рассмотрим эти структуры более подробно.

2.2. Морфологическое исследование

На рис. 3 показана типичная картина кристаллизации NaCl из растворов BSA малой (a, c, d) и большой (b) концентраций. Для малой концентрации белка характерны расположенные в периферической части капли концентрические круги мелких поликристаллов соли с крупным монокристаллом в центре. Вокруг каждого крупного кристалла видна оптически пустая зона, возникшая в результате обеднения солью раствора, отступающего от центра (кристалла) к периферии вследствие испарения воды. Продвижение этой волны сопровождается нерегулярным выпадением мелких поликристаллов по мере

чередования фаз пересыщения-недосыщения раствора. Именно эти структуры в работе [14] трактуются как белковые. В каплях с большим содержанием белка соль кристаллизуется в основном в виде дендритов. При большом увеличении микроскопа (рис. 4, a) видно, что дендриты как бы „прорастают“ из аморфного белка. То есть к моменту начала кристаллизации соли альбумин находится в обратимо осажденном состоянии вследствие высаливания [29] и не может участвовать в образовании кристаллов. С помощью АСМ можно видеть, что кристаллические солевые структуры расположены поверх слоя альбумина, имеющего более гладкий рельеф (рис. 4, b–f). При рассмотрении в оптическом микроскопе при боковом освещении кристаллические структуры ярко светятся отраженным светом (рис. 5). Прослойки белка между соевыми узорами остаются темными. Морфологическое исследование показало, что солевые и белковые структуры в высохших каплях четко различимы.

2.3. Различия физико-химических свойств белка и соли

Для выявления белка и соли в высохших каплях белково-солевых растворов на часть препаратов воздействовали кислотнo-спиртовой смесью. При этом происходит дегидратация и гидролиз альбумина [30], что сопровождается разрушением структуры и целостности белкового слоя. Соль при таком воздействии остается в неизменном виде. После денатурации белка характерные кристаллические структуры сохранялись, что подтверждается наблюдением как в проходящем свете, так и при боковом освещении препарата (рис. 6). Это свидетельствует в пользу солевой природы кристаллических структур.

Проведем другой эксперимент. Для этого используем один из гистологических приемов фиксации мазков биологического материала на стекле — фиксацию жаром. После прогрева белок денатурирует и образует нерастворимые агрегаты, прочно сидящие на стекле. При погружении в воду такого препарата солевые фигуры, расположенные на тонком слое белка, растворяются (рис. 7). Этот факт подтверждает, что рассматриваемые структуры являются поликристаллами соли.

Таким образом, ни один из приведенных здесь экспериментов не дает оснований для сомнения в четком фазовом разделении BSA и NaCl, происходящем при высыхании капель белково-солевых растворов. Причем кристаллические структуры образуются солью.

Заключение

Кристаллизация соли из высыхающих капель белково-солевых растворов отличается значительным полиморфизмом и при исходной физиологической концентрации NaCl происходит в самом конце испарения свободной воды. При одинаковом содержании соли в исходных растворах решающее значение имеет концентрация белка, определяющая радиальное распределение соли и свойства белковой матрицы. Приведены доказательства солевой природы структур, образующихся при высыхании капель белково-солевых растворов на стеклянной подложке. Доказательства построены на следующих аргументах:

- 1) динамике процесса фазовых переходов,
- 2) морфологическом исследовании,
- 3) различии физико-химических свойств белка и соли.

При малом содержании белка в физиологическом растворе хлорида натрия (менее 1 wt%) основным структурным элементом солевого узора является фигура с одним—двумя крупными монокристаллами в центре, окруженными дугами, состоящими из мелких поликристаллов. При содержании белка, близком к физиологическому (7—9 wt%) соль кристаллизуется преимущественно в виде разнообразных дендритных структур, что может быть связано с большей вязкостью и неоднородностью среды.

Автор надеется, что приведенные данные будут полезны исследователям, работающим с высыхающими каплями белково-солевых растворов.

Работа выполнена в рамках государственного задания ИПФ РАН: проект № 0035-2014-0008. Автор глубоко признателен профессору д.ф.-м.н. Ю.Ю. Тарасевичу и к.б.н. В.В. Матвееву за критические замечания, к.ф.-м.н. А.В. Кирсанову за помощь в проведении АСМ исследования.

Список литературы

- [1] Cannon W.R., Talley N.D., Danzig B.A., Liub X., Martinez J.S., Shreve A.P., MacDonald G. // *Biophys. Chem.* 2012. Vol. 163–164. P. 56–63.
- [2] Wakamatsu T. // *American J. Analytic. Chem.* 2014. N 5. P. 581–588.
- [3] Горюнов А.С., Борисова А.Г., Колодей В.А., Рожков С.П. // Тр. КарНЦ РАН. Т. 2. Петрозаводск: КарНЦ РАН, 2012. С. 154–158.
- [4] Андрианов А. Конформационный анализ белков: теория и приложения. Минск: Беларус. наука, 2013. 518 с.
- [5] Badiger M.V., Gupta N.R., Eckelt J., Wolf B.A. // *Macromol. Chem. Phys.* 2008. Vol. 209. P. 2087–2093.
- [6] Azegami S., Tsuboi A., Izumi T., Hirata M., Dubin P.L., Wang B., Kokufuta E. // *Langmuir.* 1999. Vol. 15. P. 940–947.
- [7] Миллер Ю.И., Добрецов Г.Е. // Клиническая лабораторная диагностика. 1994. № 5. С. 20–23.
- [8] Larson R G. // *AIChE Journ.* 2014. Vol. 60. N 5. P. 1538–1571. [Электронный ресурс]. Режим доступа: <http://dx.doi.org/10.1002/aic.14338>.
- [9] Sclavi B., Peticolas W.L., Powell J.W. // *Biopolymers.* 1994. Vol. 34. N 8. P. 1105–1113.
- [10] Милиц П.И., Скопинов С.А., Яковлева С.В. // Письма в ЖТФ. 1988. Т. 14. Вып. 3. С. 2204–2207.
- [11] Lazar A.N., Shahgaldian P., Coleman A.W. // *J. Supramolecul. Chem.* 2001. N 1. P. 193–199.
- [12] Annarelli C.C., Reyes L., Fornazero J., Bert J., Cohen R., Coleman A.W. // *Crystal Engineering.* 2000. N 3. P. 173–194.
- [13] Annarelli C., Reyes L., Fornazero J., Bert J., Cohen R., Coleman A.W. // *Crystal Engineering.* 1999. Vol. 2. N 1. P. 79–89.
- [14] Chen G., Mohamed J.G. // *Eur. Phys. J. E. Soft Matter.* 2010. Vol. 33. N 1. P. 19–26.
- [15] Yakhno T.A. // *Phys. Chem.* 2011. Vol. 1. N 1. P. 10–13.
- [16] Gorr H.M., Zueger J.M., McAdams D.R., Barnard J.A. // *Colloid. Surf. B: Biointerfaces.* 2013. Vol. 103. P. 59–66.
- [17] Perepelytsya S.M., Glibitskiy G.M., Volkov S.N. // *Biopolymers.* 2013. Vol. 99. N 8. P. 508–516.
- [18] Большая советская энциклопедия в 30 т. 1969–1978 г. Ред. А.М. Прохоров, Н.К. Байбаков, А.А. Благоданов и др. М.: Советская энциклопедия. Изд. 3-е. [Электронный ресурс]. Режим доступа: <http://dic.academic.ru/dic.nsf/bse/160856/%D0%94%D0%B5%D0%BD%D0%B4%D1%80%D0%B8%D1%82>
- [19] Мартюшев Л.М., Селезнев В.Д., Скопинов С.А. // Письма в ЖТФ. 1997. Т. 23. Вып. 13. С. 1–6.

- [20] *Tarasevich Yu.Yu.* // ЖТФ. 2001. Т. 71. Вып. 5. С. 123–125.
- [21] *Dutta T., Giri A., Choudhury M.D., Tarafdar S.* // Colloid. Surf. A: Physicochem. Eng. Aspects. 2013. Vol. 432. P. 127–131.
- [22] *Яхно Т.А., Яхно В.Г., Санин А.Г., Санина О.А., Пелюшенко А.С.* // ЖТФ. 2004. Т. 49. Вып. 8. С. 1055–1063.
- [23] *Яхно Т.А., Санин А.Г., Санина О.А., Яхно В.Г.* // Биофизика. 2011. Т. 56. № 6. С. 1016–1022.
- [24] Химическая энциклопедия [Электронный ресурс]. Режим доступа: http://www.chemport.ru/data/chemipedia/article_2342.html
- [25] Микроскопическая техника. Руководство Под ред. Д.С. Саркисова, Ю.Л. Перова. М.: Медицина, 1996. 544 с.
- [26] *Яхно Т.А., Казаков В.В., Санина О.А., Санин А.Г., Яхно В.Г.* // ЖТФ. 2010. Вып. 7. С. 17–23.
- [27] *Yakhno T.* // JCS. 2008. Vol. 318. P. 225–230.
- [28] *Tarasevich Yu.Yu., Vodolazskaya I.V., Bondarenko O.P.* // Colloid. Surf. A: Physicochem. Eng. Aspects. 2013. Vol. 432. P. 99–103.
- [29] *Неницеску К.Д.* Органическая химия. Т. 2 / Под ред. акад. М.И. Кабачника. М.: ИИЛ, 1963. С. 434.
- [30] *Чиркин А.А.* Практикум по биохимии. Минск: Новое знание, 2002. 512 с.