

НОВЫЕ ВОЗМОЖНОСТИ АНАЛИТИЧЕСКОГО УЛЬТРАЦЕНТРИФУГИРОВАНИЯ ДЛЯ АНАЛИЗА ГИДРОДИНАМИЧЕСКИХ СВОЙСТВ БЕЛКОВ

© 2006 г. И. Н. СЕРДЮК*¹, О. Н. ЕВСЕЕВА²

¹*Институт белка РАН, Пуцино, Московская область;*
Лаборатория нейтронной физики ОИЯИ, Дубна, Московская область
²*Тульский государственный университет*

I. Введение. II. Определение коэффициентов седиментации макромолекул из седиментационного профиля стандартным методом. III. Уравнение Ламма и его решение при различных граничных условиях. IV. Программа *SEDFIT*. V. Основные результаты и дискуссия. VI. Заключение.

I. ВВЕДЕНИЕ

Еще в 1926 г. Тео Сведберг провел первые измерения молекулярных весов белков (миоглобин, гемоглобин) и пророчески предсказал, что белки – это макромолекулы, в которых атомы соединены ковалентными связями [25]. После этого открытия метод аналитического ультрацентрифугирования (АУЦ) почти полвека являлся источником сведений о структуре и молекулярной массе разнообразных биологических макромолекул [5, 19]. Пик популярности метода АУЦ пришелся на 50-е и 60-е годы прошлого столетия, когда целый ряд принципиальных достижений в молекулярной биологии был сделан с помощью ультрацентрифуги. Здесь прежде всего следует упомянуть опыты Месселсона и Сталя, которые с помощью ультрацентрифугирования в градиенте плотности доказали

Принятые сокращения: АУЦ – метод аналитического ультрацентрифугирования; БСА – бычий сывороточный альбумин.

Адрес для корреспонденции: serdyuk@vega.protres.ru

Работа выполнена при поддержке Федерального агентства по науке и инновациям, государственной контракт № 02.434.11.2033 от 26.10.2005.

полуконсервативный механизм редупликации ДНК [13], а также опыты Тиссиера, Уотсона и Шахмана, в которых были открыты рибосомы и с помощью скоростного ультрацентрифугирования обнаружено, что каждая рибосома состоит из двух неравных, лабильно ассоциированных субъединиц [26].

Однако в 80-х годах прошлого столетия метод АУЦ стал терять свою популярность среди молекулярных биологов. Причин для этого было несколько. Во-первых, в аналитических ультрацентрифугах того времени использовались фотографические методы регистрации, к тому же центрифуги не были соединены с компьютерами. Во-вторых, в то время еще не были развиты численные решения уравнения Ламма, описывающего основной процесс переноса вещества в ячейке ультрацентрифуги, что накладывало серьезные ограничения на интерпретацию седиментационных данных [2]. Так, седиментационные кривые анализировались в основном методом «средней точки», для применения которого требовалось наличие четко выраженного плато и базовой линии на седиментационной кривой, а исследование глобулярных белков было сильно затруднено их большой диффузией. И, наконец, в-третьих, к этому времени появился метод электрофореза, составивший сильную конкуренцию методу седиментации [14, 28].

Ситуация изменилась коренным образом к середине 90-х годов прошлого столетия. Появление нового поколения полностью автоматизированных аналитических ультрацентрифуг фирмы Beckman (Optima XL) [6], а также развитие новых подходов к решению уравнения Ламма, описывающего процесс переноса вещества в гравитационном поле ультрацентрифуги [7, 22, 23, 27], привело к возрождению метода АУЦ [18]. Для комплексного анализа седиментационных данных биологических макромолекул были развиты подходы, основанные на численном решении уравнения Ламма для различных граничных условий. Эти подходы позволяют использовать все пространство ячейки, не требуют в качестве обязательного условия их применения наличия четкого плато и отрыва мениска. В этой статье мы продемонстрируем возможность одного из них, называемого *SEDFIT*, для анализа данных скоростного ультрацентрифугирования [20]. Наш опыт его применения к белкам с молекулярной массой 10–70 кДа показывает, что из одного опыта по скоростному ультрацентрифугированию можно вычислить такие параметры молекулы, как константу седиментации, молекулярную массу и константу диффузии. Для белков с массой > 30 кДа вычисленные молекулярные массы в пределах 1–2% совпадают с теоретическими, рассчитанными

из известной последовательности аминокислот в белке. Для белков с массой <30 кДа ошибка в определении массы увеличивается и для белков с массой 15 кДа составляет $5-7\%$. На примере смесей белков показано, что программа *SEDFIT* позволяет разрешать компоненты в смеси, отличающиеся по молекулярной массе в два раза. Описаны эксперименты по разделению гетерогенной смеси, состоящей из трех белков, и сформулированы критерии такого разделения. Полученные данные открывают принципиально новые возможности для изучения комплексообразования между различными биологическими макромолекулами методом скоростного АУЦ.

II. ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОЭФИЦИЕНТОВ СЕДИМЕНТАЦИИ МАКРОМОЛЕКУЛ ИЗ СКОРОСТНОГО УЛЬТРАЦЕНТРИФУГИРОВАНИЯ СТАНДАРТНЫМ МЕТОДОМ

МЕТОД «СРЕДНЕЙ ТОЧКИ»

В экспериментах по скоростной седиментации ячейка центрифуги вначале содержит раствор, концентрация которого постоянна по всей длине ячейки. В процессе центрифугирования частицы движутся под действием гравитационной силы, мениск осветляется и формируется движущаяся граница (рис. 1). За скорость движения границы u стандартно принимается изменение радиальной координаты dr_{cp}/dt в средней точке (рис. 1). Значение скорости u можно представить как

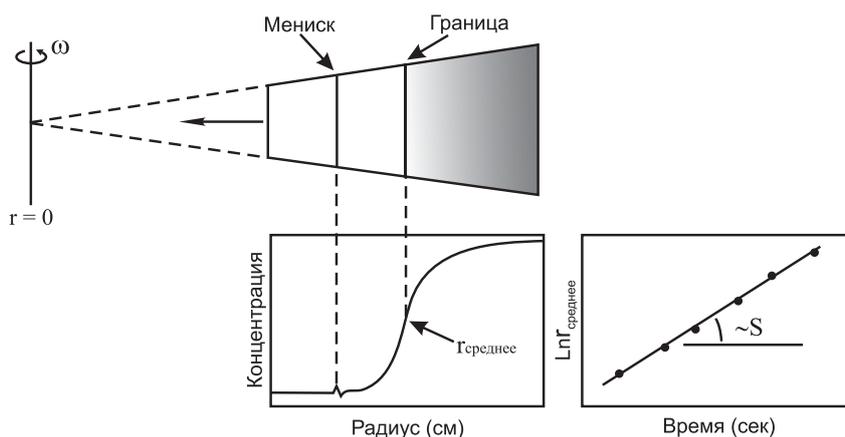


Рис. 1. Гипотетический профиль седиментации, показывающий положение мениска и движущейся границы.

$$u = \frac{dr_{cp}}{dt} = \omega^2 r s, \quad (1)$$

где ω – угловая скорость, s – константа седиментации. Из формулы (1) следует, что константа седиментации частицы есть скорость ее оседания u на единицу центробежного ускорения $\omega^2 r$.

После интегрирования получаем

$$\ln \frac{r_{cp}(t)}{r_{cp}(t_0)} = \omega^2 s (t - t_0). \quad (2)$$

Построение зависимости $\ln(r_{cp}(t)/r_{cp}(t_0))$ от $(t - t_0)$ позволяет вычислить константу седиментации макромолекул [2]. Заметим, что этот метод применим только для «идеальных» растворов, то есть одинаковых и не взаимодействующих макромолекул. В случае смеси, содержащей два типа макромолекул, которые имеют большие молекулярные массы (100 кДа и более) и достаточно сильно различаются между собой по молекулярной массе, можно вычислить две константы седиментации, характеризующие каждый тип молекул по отдельности. Однако в общем случае, когда молекулярно-весовое распределение заранее неизвестно, применение метода «средней точки» может приводить к большим ошибкам и в современной практике аналитического центрифугирования не используется. Кроме того, в качестве обязательного условия метод требует наличия на седиментограмме четкого плато и базовой линии, что затрудняет его применения к белкам с молекулярной массой меньше 30 кДа.

В заключение заметим, что для грубой характеристики полидисперсных систем наиболее подходящим является метод вторых моментов, дающий седиментационный коэффициент весового усреднения [2, 5].

III. УРАВНЕНИЕ ЛАММА И ЕГО РЕШЕНИЕ ПРИ РАЗЛИЧНЫХ ГРАНИЧНЫХ УСЛОВИЯХ

Уравнение Ламма описывает процесс транспорта вещества в ультрацентрифуге [5, 10]. Оно получается введением дополнительного члена в первое уравнение Фика, описывающего процесс диффузии

$$J_x = -D \frac{dC}{dx}. \quad (3)$$

Коэффициент пропорциональности в этом уравнении называется коэффициентом диффузии и имеет размерность см²/сек.

Допуская, что все молекулы движутся в направлении $+x$ со скоростью u , а поток в точке x равен $uC(x)$, получаем уравнение Фика в виде

$$J_x = -D \frac{dC}{dx} + s\omega^2 x C(x), \quad (4)$$

где $u = s\omega^2 x$.

Первый и второй члены в уравнении (4) описывают диффузионный и седиментационный поток, соответственно. Уравнение (4) справедливо только при условии движения молекул в идеальной ячейке без стенок и не соответствует условиям реальной ячейки в ультрацентрифуге. Вводя уравнение непрерывности $(dC/dt)_r = -1/r(dJ/dr)$ для радиальной (секторной) ячейки в уравнение (4), получаем

$$\left(\frac{dC}{dt}\right)_r = -\frac{1}{r} \left\{ \frac{d}{dr} \left[\omega^2 r^2 s C - Dr \left(\frac{dC}{dr}\right)_t \right] \right\}_t. \quad (5)$$

Это уравнение известно как уравнение Ламма и описывает диффузию со смещением в реальных экспериментальных условиях аналитического ультрацентрифугирования. Заметим, что переменные x и r в уравнениях (4) и (5) имеют одинаковый физический смысл расстояния. Различие состоит лишь в том, что под x понимается расстояние, которая проходит частица под действием гравитационной силы вообще, а под r – расстояние, которое проходит частица под действием той же силы в радиальном направлении в ячейке для центрифугирования.

ТОЧНЫЕ РЕШЕНИЯ

Уравнение Ламма не имеет аналитического решения [9, 10]. Его точное решение известно для двух предельных случаев: первый – «отсутствие диффузии» и второй – «отсутствие седиментации». При отсутствии диффузии уравнение (5) для раствора гомогенных макромолекул имеет решение

$$\begin{cases} C(x, t) = 0 & \text{при } x_M < x < \bar{x} \\ C(x, t) = C_0 \exp(-2s\omega^2 t) & \text{при } \bar{x} < x < x_0 \end{cases}, \quad (6)$$

где C_0 – начальная концентрация, мг/мл, а $\bar{x} = x_M \exp(s\omega^2 t)$, x_M – положение мениска, x_0 – положение дна. Рис. 2а показывает седиментационный профиль движущей частицы в первом случае. Его характерными чертами являются: наличие резкой границы, области плато и уменьшение концентрации в этой области из-за секториального разбавления.

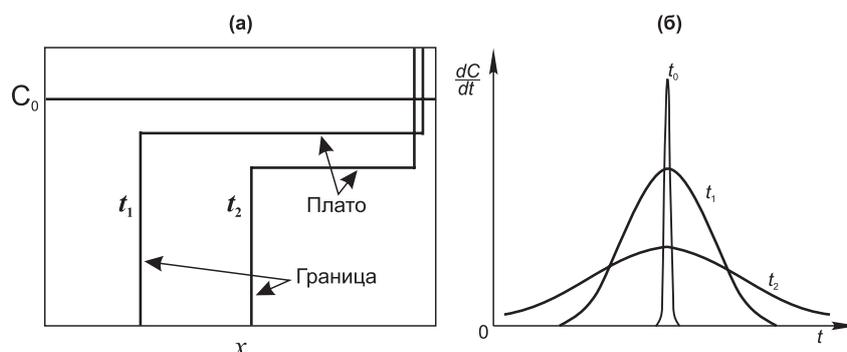


Рис. 2. Графическое представление уравнения (5) в первом предельном случае (а). Графическое представление уравнения (5) во втором предельном случае (б).

В пределе отсутствия седиментации уравнение (5) имеет вид:

$$\left(\frac{dC}{dt}\right)_r = -\frac{C_0}{2\sqrt{\pi Dt}} \exp\left(-\frac{x^2}{4Dt}\right). \quad (7)$$

Как видно из уравнения (7), форма первоначально тонкого слоя становится гауссовой. По мере протекания диффузии толщина слоя увеличивается пропорционально \sqrt{Dt} . Используя последнюю зависимость, можно вычислить коэффициент диффузии, исходя из толщины слоя. Рис. 2б показывает графическое представление уравнения (7). Граница остается практически неподвижной и расширяется со временем.

ПРИБЛИЖЕННЫЕ АНАЛИТИЧЕСКИЕ РЕШЕНИЯ

Современные компьютерные методы позволяют получать приближенные аналитические решения уравнения Ламма для различных граничных условий [9, 20, 22, 23, 27]. Два из них представляют наибольший практический интерес, поскольку позволяют учесть вклад диффузии в определяемую на опыте константу седиментации. Применимость каждого из них на практике зависит от конкретного соотношения вкладов седиментации и диффузии в движущуюся границу.

В основе первого метода, называемого по имени его создателей методом ван Холде-Вайшета, лежит хорошо известный факт, что седиментация вещества пропорциональна первой степени времени, тогда как его диффузия – корню квадратному из времени [27]. Отсюда следует, что экстраполяция к бесконечному времени должна устранить вклад диффузии в движущуюся границу. На первом шаге применения этого

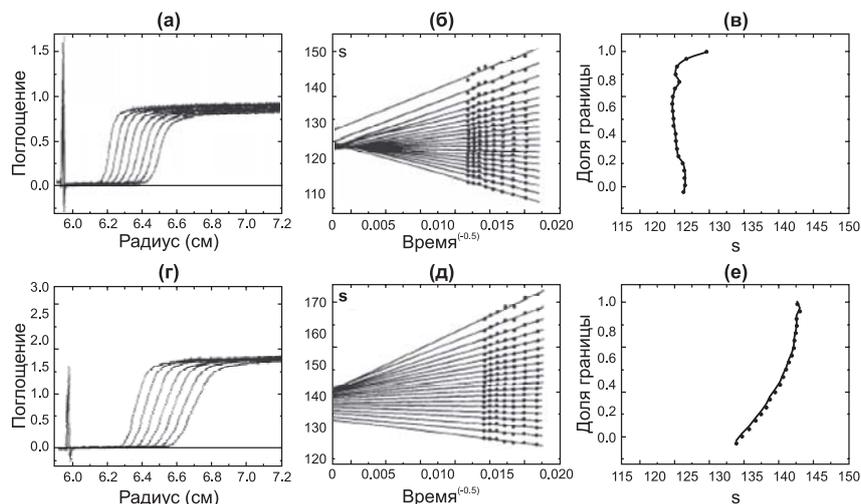


Рис. 3. Анализ седиментационной границы методом ван Холде-Вайшета.

метода расстояние между базисной линией и плато для каждого скана делится на N горизонтальных частей (обычно несколько десятков). N кажущихся седиментационных коэффициентов, s^* , вычисляются как

$$s^* = \ln \left(\frac{r/r_m}{\omega^2 t} \right), \quad (8)$$

где r и r_m есть радиусы каждого деления и мениска, соответственно. Затем полученные величины s^* откладываются против обратной величины корня квадратного из времени опыта $1/\sqrt{t}$ для каждого скана. Отрезок отсекаемой ординаты дает величину константы седиментации, поправленной на диффузию. Для гомогенного раствора макромолекул все линии должны пересекаться в одной точке, тогда как для гетерогенного – нет. Рис. 3 показывает профили седиментации для капсиды II Бактериофага T7 (панель а), анализ этих профилей методом ван Холде-Вайшета (панели б и в). Панели (г, д и е) соответствуют той же капсиде, но в которую добавлено некоторое количество субгеномной ДНК. Гетерогенный характер смеси очевиден.

Во втором методе, называемом по имени его создателя методом Стаффорда, седиментационные коэффициенты вычисляются из временных производных седиментационного профиля [23]. Кажущийся (т.е. не поправленный на диффузию) коэффициент седиментации $g^*(s)$, может быть вычислен из профиля (dc/dt) , как

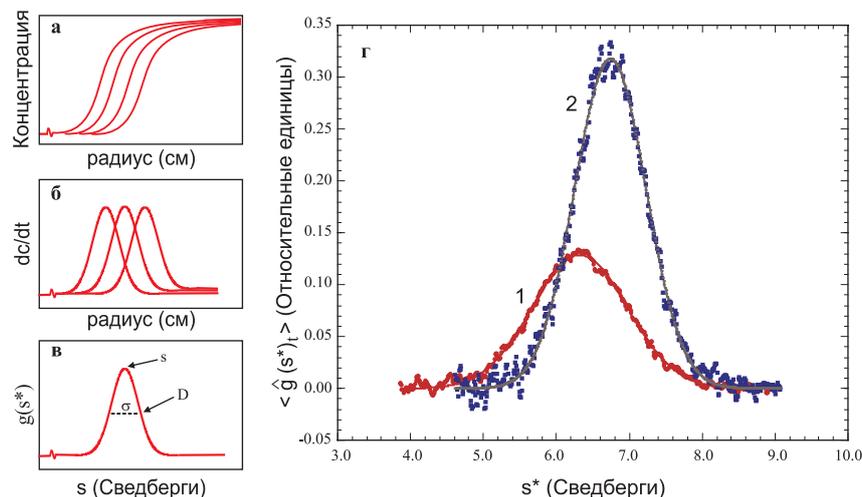


Рис. 4. Панели а, б, в представляют последовательность вычисления седиментационных и диффузионных коэффициентов из временных производных седиментационного профиля методом Стаффорда.

$$g^*(s)_t = \left(\frac{dC}{dt} \right)_{corr} \frac{1}{C_0} \frac{\omega^2 t^2}{\ln\left(\frac{r_m}{r}\right)} \left(\frac{r}{r_m} \right)^2, \quad (9)$$

где s есть коэффициент седиментации, ω – угловая скорость ротора, C_0 есть начальная концентрация вещества в ячейке, r и r_m – текущий радиус и радиус мениска, соответственно. Последовательность шагов при таком вычислении сводится к следующему (рис. 4). Близко расположенные профили (панель а) вычитаются, давая гауссовый профиль $g^*(s)$, зависящий от времени (панель б). После этого кривые нормализуются по времени, складываются (панель в), а затем нормализуются на площадь под кривой. Результирующий пик имеет гауссову форму, из его положения на оси абсцисс определяется константа седиментации, а из ширины пика – константа диффузии. Для получения последней в абсолютных единицах требуется пересчет площади под кривой на концентрацию. На панели (г) представлен конкретный пример вычисления молекулярных параметров для моноклонального антитела (1) и его комплекса с лигандом (2) методом Стаффорда. В обоих случаях вычисленные молекулярные массы близки к таковым, найденным методом масс-спектрометрии.

ЧИСЛЕННЫЕ РЕШЕНИЯ

Использование численных решений уравнения Ламма для прямого анализа данных аналитического ультрацентрифугирования известно уже около 30 лет [20]. Однако относительно недавно, в основном благодаря возросшей мощности компьютеров, они стали использоваться для анализа данных аналитического скоростного ультрацентрифугирования. Главное преимущество численных решений состоит в том, что с их помощью можно учесть практически все граничные условия, накладываемые конечной длиной центрифужной ячейки и эффектами диффузии.

Суть проблемы коротко сводится к следующему. В отсутствие взаимодействия между макромолекулами экспериментально наблюдаемый профиль непрерывного распределения масс может быть описан суперпозицией профилей $c(M)$, чья молекулярная масса располагается между M и $M + dM$. Если $L(M, r, t)$ обозначает седиментационный профиль монодисперсного вещества с массой M , находящегося на расстоянии r в момент времени t , то задача сводится к решению уравнения Фредгольма первого рода в условиях реального эксперимента

$$s(r, t) = \int c(M)L(M, r, t)dM + \varepsilon, \quad (10)$$

где $s(r, t)$ обозначает экспериментально наблюдаемый сигнал с ошибкой ε [20]. Заметим, что задачи такого рода часто встречаются в ряде областей физики. Типичным примером является динамическое рассеяния света [1].

В случае скоростного ультрацентрифугирования разбавленных растворов ядро $L(M, r, t)$ уравнения (5) и есть решение уравнения Ламма, которое теперь имеет вид

$$\left(\frac{dC}{dt}\right)_r = -\frac{1}{r} \left\{ \frac{d}{dr} \left[\omega^2 r^2 s(M)C - D(M)r \left(\frac{dC}{dr}\right)_t \right] \right\}_t, \quad (11)$$

где $s(M)$ и $D(M)$ есть седиментационные и диффузионные коэффициенты частицы, соответственно. Они оба сильно зависят от молекулярной массы и связаны между собой уравнением Сведберга.

$$s(M) = D(M) \frac{M(1 - \bar{v}\rho_0)}{RT} = \frac{M(1 - \bar{v}\rho_0)}{f}, \quad (12)$$

где ρ_0 есть плотность растворителя, R – газовая постоянная, T – температура, а f – коэффициент поступательного трения частицы [2]. Парциальный удельный объем частицы \bar{v} , как правило, не зависит от молекулярной массы в ряду полимергомологов – ряда частиц, в которых изменяется только молекулярная масса [8, 19].

IV. ПРОГРАММА *SEDFIT*

ОСНОВНОЙ ПРИНЦИП РАБОТЫ

Программа *SEDFIT** – это специализированная компьютерная программа, предназначенная для анализа данных аналитического ультрацентрифугирования [20]. Как показывает обсуждение в предыдущем параграфе, анализ данных скоростной седиментации частиц, имеющих непрерывное распределение по размерам, требует знания двух функциональных зависимостей от размера: $c(M)$ и $s(M)$ или $D(M)$. Поскольку решение уравнения (11) относится к числу «некорректно поставленных» задач, то весьма трудно вычислить одновременно $c(M)$ и $s(M)$ из реальных экспериментальных данных, которые всегда имеют определенный уровень шума. На практике это означает, что большой набор различных $c(M)$ соответствует одному экспериментально наблюдаемому сигналу $s(r, t)$. Более того, при решении уравнений типа (11) часто возникают артефактные осцилляции [17].

В программе *SEDFIT* проблема устойчивости достигается наложением физически разумного ограничения на решение – положительностью получаемых величин. Кроме того, в уравнение (10) добавляется стабилизирующий член, называемый регуляризационным [15]. Проблема однозначности требует введения априорного знания парциального удельного объема \bar{v} и гидродинамической формы частицы, вычисляемой как отношение ее реального коэффициента трения к минимальному $f/f_{\text{мин}}$. Для сферической белковой частицы с общепринятой величиной гидратации (0,3 грамма воды на грамм белка) это отношение равно 1,2. Для большинства глобулярных белков это отношение равно 1,25–1,35, свидетельствуя об их малой асимметрии [2]. Поскольку для белков парциальный удельный объем можно достаточно точно рассчитать из аминокислотной последовательности [8], то именно отношение $f/f_{\text{мин}}$ чаще всего используется как подгоночный параметр. Заметим, что отношение $f/f_{\text{мин}}$ не тождественно отношению f/f_0 , которое отражает геометрический эффект отличия формы частицы от сферической. Для сферической частицы $f/f_0 = 1$ [2].

* Компьютерная программа *SEDFIT* создана в Национальном институте здоровья США П. Шукком (P. Schuck) (<http://www.nih.gov>) и находится в свободном доступе (<http://www.biochem.ulthscsa.edu/auc/software>).

МЕТОДИКА АНАЛИЗА СЕДИМЕНТАЦИОННЫХ ДАННЫХ
С ПОМОЩЬЮ ПРОГРАММЫ *SEDFIT*

Практическое использование программы *SEDFIT* требует ввода следующей информации: координат мениска (красная линия), дна (синяя линия), внешней (ярко-зеленая линия) и внутренней (темно-зеленая линия) границы расчета. Их положение на седиментационной диаграмме иллюстрируется на рис. 5. Далее вводятся следующие параметры: разрешение по s (обычно 0,01), интервал предполагаемых значений s , плотность ρ_0 и вязкость η_0 растворителя, парциальный удельный объем \bar{v} и гидродинамическая форма $f/f_{\text{мин}}$ исследуемой молекулы. Обычно расчет начинается с величины $f/f_{\text{мин}} = 1,2$, соответствующей сферической форме гидратированной частицы. После чего программа рассчитывает s и M для выбранных параметров, а затем ищет оптимальную величину гидродинамической формы молекулы $f/f_{\text{опт}}$. В заключение заметим, что в отличие от методов ван Холде-Вайшета и Стаффорда, которые являются безмодельными, то есть не требуют никакой априорной информации об изучаемой молекуле, программа *SEDFIT* требует такой информации в виде плотности и вязкости растворителя и парциального удельного объема. Следствием введения такой информации является более высокое разрешение по s и M , получаемое в этом методе, по сравнению с методами ван Холде-Вайшета и Стаффорда.

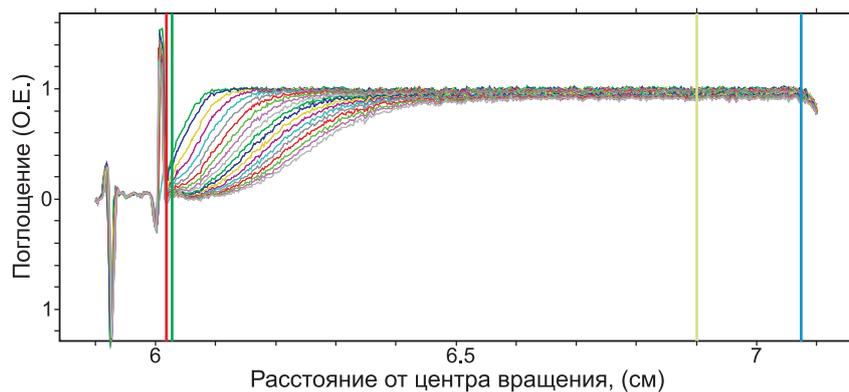


Рис. 5. Схематическое представление седиментограммы образца в ячейке для ультрацентрифугирования.

ЕДИНСТВЕННОСТЬ И УСТОЙЧИВОСТЬ ПОЛУЧАЕМЫХ РЕШЕНИЙ

Как уже упоминалось, решение уравнения (11) относится к числу «некорректно поставленных» задач. На практике это означает, что для данного массива экспериментальных данных всегда существует некий набор возможных значений параметров, то есть вычисляемые параметры s , M , $f/f_{\text{онт}}$ и D колеблются относительно некоторых средних значений. Масштаб этих колебаний, как видно из табл. 1, не превышает 1%. Кроме того, дополнительную погрешность может вносить ошибка в определении координат мениска и дна (обычно $\pm 0,0001$ см). Та же таблица показывает, что введение вдвое большей ошибки в координате мениска не приводит к существенному изменению в вычисляемых параметрах, что говорит об устойчивости получаемых расчетных значений s , M и $f/f_{\text{онт}}$. Отметим, что величина коэффициента диффузии определяется из уравнения (12) на основе найденных значений M , s и известного архимедового фактора $(1 - \bar{v}\rho_0)$.

Таблица 1

Масштаб изменений в выходных параметрах M , s , $f/f_{\text{онт}}$ и D при использовании одного и того же входного набора данных $s(r, t)$ для коровьего α -лактальбумина

Координаты мениска	Молекулярная масса M (в кДа)	Коэффициент седиментации s (в ед. Сведберга)	Коэффициент трения $f/f_{\text{онт}}$	Коэффициент диффузии D (в ед. Фика)
6,1000	15,17	1,640	1,248	10,32
6,1000	15,38	1,657	1,253	10,28
6,1000	15,24	1,648	1,253	10,33
6,1000	15,15	1,640	1,251	10,34
6,1000	15,31	1,647	1,256	10,28
среднее	$15,25 \pm 0,04$	$1,646 \pm 0,003$	$1,252 \pm 0,001$	$10,31 \pm 0,03$
6,1002	15,11	1,643	1,249	10,38
6,0998	15,19	1,650	1,249	10,37

V. ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ДИСКУССИЯ

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ГИДРОДИНАМИЧЕСКИХ ПАРАМЕТРОВ БЕЛКОВ В ИЗОЛИРОВАННОМ СОСТОЯНИИ

Для проверки возможностей работы программы *SEDFIT* были выбраны шесть белков, молекулярные массы которых располагаются в интервале 12–67 кДа. Отметим, что для белков с молекулярной массой 10–20 кДа диффузия очень велика, что сильно затрудняет точное вычисление их константы седиментации стандартным методом [2, 19].

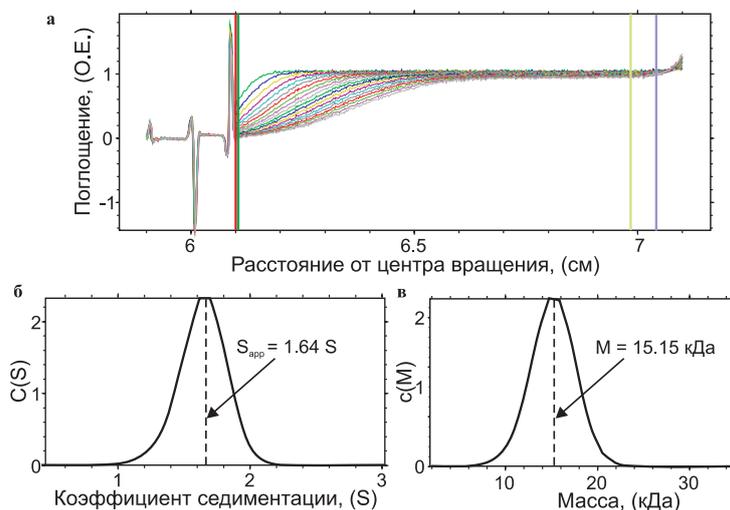


Рис. 6. а) Седиментограмма человеческого α -лактальбумина. б) и в) Восстановленные распределения в координатах $c(s)$ от s и $c(M)$ от M , соответственно.

На рис. 6а приведена седиментограмма для человеческого α -лактальбумина, а на рис. 6б и 6в результаты восстановления в координатах $c(s)$ и $c(M)$, соответственно. Как видно из этих рисунков, распределение по константе седиментации и по молекулярной массе унимодально. Вычисляемые величины констант седиментации s , оптимальной гидродинамической формы f/f_{opt} и молекулярной массы составляют, соответственно, $s_{20w} = 1,64$ S, $f/f_{opt} = 1,25$. Вычисляемая молекулярная масса M составляет 15,15 кДа, что на 7% отличается от теоретической величины, рассчитанной из первичной последовательности (14,186 кДа). Приблизительно такая же ошибка получается и для другого белка, α -лактальбумина из коровьего молока, имеющего близкую молекулярную массу (табл. 2).

На рис. 7а приведена седиментограмма другого белка, бычьего сывороточного альбумина, а на рис. 7б и 7в – результаты восстановления в координатах $c(s)$ и $c(M)$, соответственно. Как видно из этих рисунков, распределение по константе седиментации и по молекулярной массе для этого белка бимодально. Вычисляемые величины констант седиментации и молекулярной массы составляют для основного пика, соответственно, $s_{20w} = 4,34$ S и $M = 65,64$ кДа. Последняя величина всего на 1,5% отличается от теоретической, рассчитанной из первичной последовательности (66,43 кДа). Для второго пика константа седиментации равна 7,4 S, молекулярная масса – 135 кДа, что соответствует величинам, ожидаемым для димера БСА.

Таблица 2
Гидродинамические параметры для шести белков, вычисленных из одного опыта по скоростному ультрацентрифугированию с помощью программы SEDFIT

Белок	Расчитанные значения из первичной поделователности		Экспериментальные значения, полученные с помощью программы SEDFIT			
	парц. уд. объем \bar{v} (см ³ /г)	мол. масса M (в кДа)	мол. масса M (в кДа)	коэффициент седиментации s (в ед. Сведберга)	коэффициент трения $f/f_{\text{опт}}$	коэффициент диффузии D (в ед. Фика)
Лошадиный апо-цитохром <i>c</i>	0,745	12,14	9,14	1,08	1,36	11,27
α -лактальбумин*	0,729	14,19	16,24	1,73	1,34	9,57
Человеческий α -лактальбумин	0,745	16,22	15,15	1,64	1,25	10,34
Бычья карбоангидраза	0,733	28,89	31,73	2,68	1,31	7,76
Яичный овальбумин	0,738	42,75	42,66	3,25	1,29	7,08
БСА в трис-буфере	0,733	66,43	65,64	4,34	1,32	6,03
БСА в трис-буфере + глицерин	0,733	66,43	65,74	4,30	1,39	5,96
БСА в фосфатном буфере	0,733	66,43	65,90	4,31	1,33	6,01

* - α -лактальбумин из коровьего молока

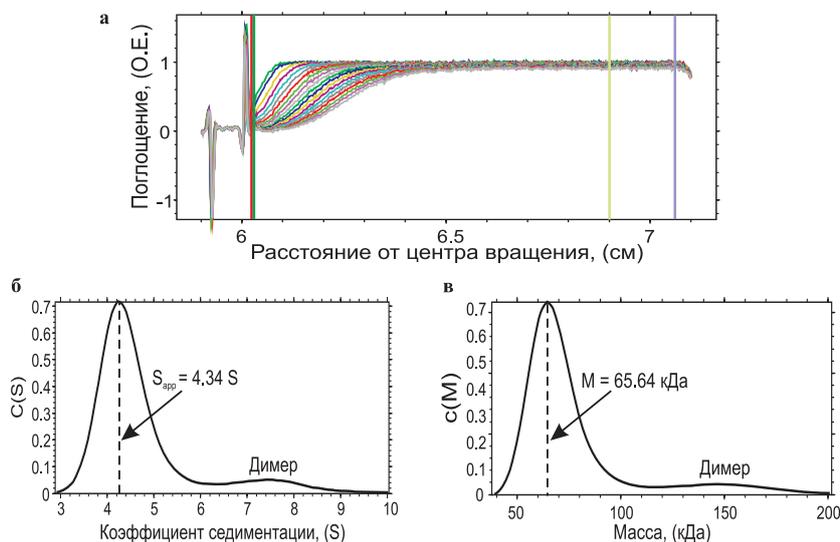


Рис. 7. а) Седиментограмма БСА. б) и в) Восстановленные распределения в координатах $c(s)$ от s и $c(M)$ от M , соответственно.

Результаты определения гидродинамических параметров всех шести белков с помощью программы *SEDFIT* суммированы в табл. 2. Отметим, что эксперименты для сывороточного альбумина в разных буферах, включая глицерин, дают очень близкие результаты. Так, экспериментальные величины констант седimentации и молекулярных масс для всех четырех опытов совпадают в пределах 1–2%. Во всех препаратах БСА детектируется небольшое количество димеров. Отметим, что точность определения гидродинамических параметров белков падает по мере уменьшения их молекулярной массы. Так, для белков с молекулярной массой около 15 кДа (α -лактальбумины) ошибка в определении молекулярных масс составляет около 5–7%.

Построение зависимости $s_{20w} \bar{v}^{1/3} / (1 - \bar{v} \rho_0)$ от молекулярной массы M в двойном логарифмическом масштабе дает хорошо известное соотношение [2]. Для пяти исследованных белков эта зависимость имеет вид прямой линии с наклоном $2/3$, характерным для глобулярных белков [2]. Шестой белок, апоцитохром, не лежит на прямой линии. Он имеет константу седimentации существенно меньше по сравнению с ожидаемой для глобулярного состояния. Такая константа седimentации свидетельствует о том, что белок находится в состоянии расплавленной глобулы, гидродинамические

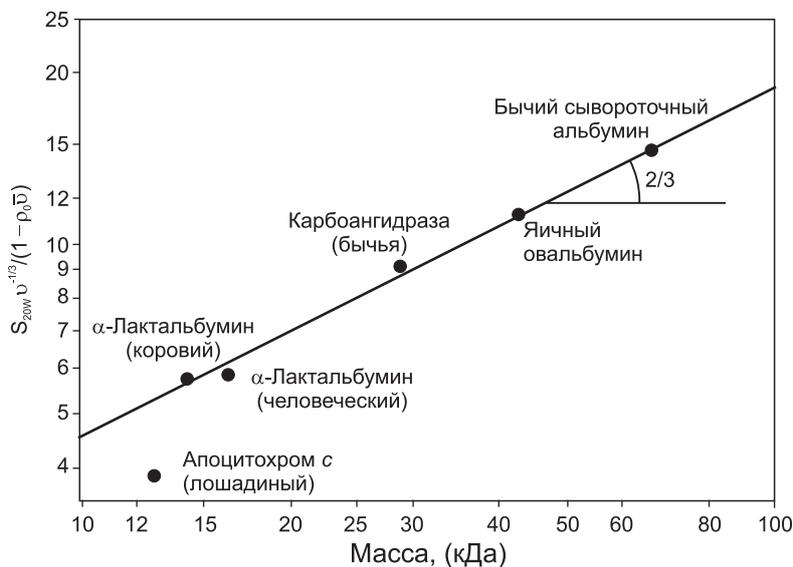


Рис. 8. Зависимость $s_{20w} \bar{v}^{1/3} / (1 - \bar{v} \rho_0)$ от молекулярной массы M в двойном логарифмическом масштабе для шести исследованных белков.

размеры которой на 20–30% превосходят таковые характерные для глобулярного состояния [3, 4] (рис. 8).

Значения оптимизированных коэффициентов трения $f/f_{\text{опт}}$, найденные с помощью программы *SEDFIT* (пятая колонка табл. 2), располагаются в интервале 1,25–1,39. Эти значения также свидетельствуют о том, что все исследованные белки являются частицами с небольшой степенью вытянутости.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ГИДРОДИНАМИЧЕСКИХ ПАРАМЕТРОВ МОЛЕКУЛЫ БЕЛКА В СМЕСИ С ДРУГИМИ БЕЛКАМИ

Как видно из вышеизложенного, программа *SEDFIT* корректно определяет гидродинамические параметры исследованных белков, а для одного из них (БСА) визуализирует небольшое количество примеси, которое по полученным параметрам соответствует димеру белка. В этой связи возникает вопрос о практической возможности программы *SEDFIT* для разделения компонентов в смеси. С этой целью мы исследовали смеси двух или более белков, гидродинамические параметры которых в изолированном состоянии представлены в табл. 2.

При выборе пар белков для исследования, однако, надо иметь в виду одно обстоятельство, касающееся выбора угловой скорости.

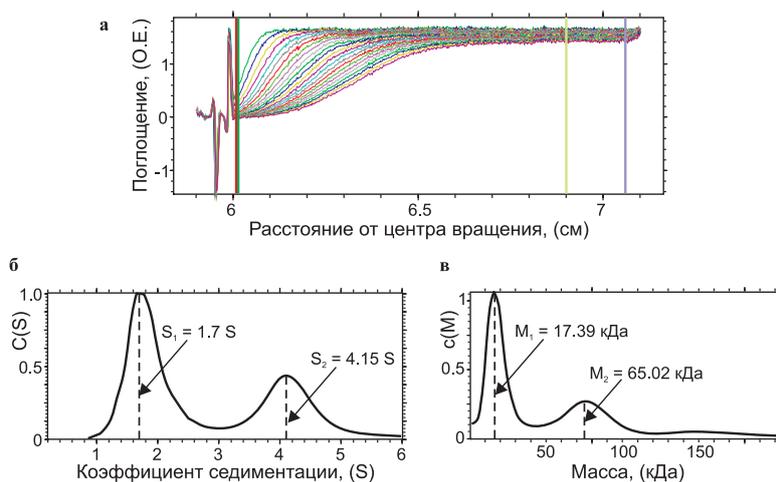


Рис. 9. а) Седиментограмма смеси двух белков, состоящей из БСА и коровьего α -лактальбумина. б) и в) Восстановленные распределения в координатах $c(s)$ от s и $c(M)$ от M , соответственно.

Если различие в ожидаемых константах седиментации велико, то оптимальная скорость для быстрого компонента может быть неоптимальной для медленного компонента и наоборот. Поэтому выбор скорости всегда является компромиссом.

Рис. 9а показывает седиментограмму смеси двух белков, состоящей из α -лактальбумина коровьего молока и БСА в трис-буфере, а рис. 9б и 9в – результаты восстановления в координатах $c(s)$ и $c(M)$, соответственно. Отношение молекулярных масс этих двух белков равно 4,7. Как видно из седиментограммы, хотя визуально четкое разделение компонентов на седиментограмме не наблюдается, однако программа *SEDFIT* свидетельствует о наличии двух компонентов в смеси и небольшой примеси третьего компонента, который по своим параметрам, как мы указывали ранее, является димером БСА. Параметры каждого из двух больших пиков в смеси близки к параметрам, определенным для каждого белка в изолированном состоянии (см. табл. 2). Достижимое при этом согласие с данными о молекулярной массе низкомолекулярного компонента, однако, не так велико, как можно было бы ожидать, исходя из седиментограммы БСА и его димеров (рис. 7).

На рис. 10а представлена седиментограмма смеси двух белков, состоящей из бычьей карбоангидразы и БСА в трис-буфере, а на

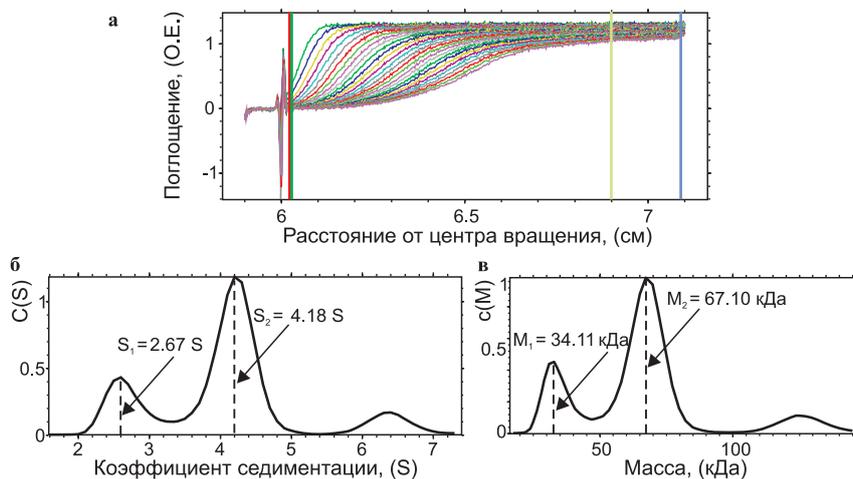


Рис. 10. а) Седиментограмма смеси двух белков, состоящей из БСА и бычьей карбоангидразы. б) и в) Восстановленные распределения в координатах $c(s)$ от s и $c(M)$ от M , соответственно.

рис. 10б и 10в – результаты восстановления в координатах $c(s)$ и $c(M)$, соответственно. Для этих белков отношение молекулярных масс равно 2,3. Как видно из них, хотя визуально разделение компонентов не наблюдается вовсе, однако программа *SEDFIT* четко свидетельствует о наличии двух компонентов в смеси. Параметры каждого из белков в смеси близки к параметрам, определенным для каждого белка в изолированном состоянии (табл. 2).

Рис. 11а показывает седиментограмму смеси двух белков, состоящей из овальбумина и БСА в трис-буфере, а рис. 11б и 11в – результаты восстановления в координатах $c(s)$ и $c(M)$, соответственно. Отношение молекулярных масс этих двух белков равно 1,55. Как видно из них, программа *SEDFIT* не разделяет компоненты смеси, кроме визуализации димеров БСА, как и в предыдущих случаях. Основной пик является сложным, его параметры близки к средним значениям для двух компонентов смеси. Этот результат показывает, что в исследованном интервале молекулярных масс для уверенного разделения белков в смеси отношение их молекулярных масс должно быть равно или больше 2.

При выполнении этого условия с помощью программы *SEDFIT* можно разделить смесь трех белков. На рис. 12а представлена седиментограмма смеси белков, состоящей из апоцитохрома, карбоангидразы и сывороточного альбумина, а на рис. 12б и 12в – резуль-

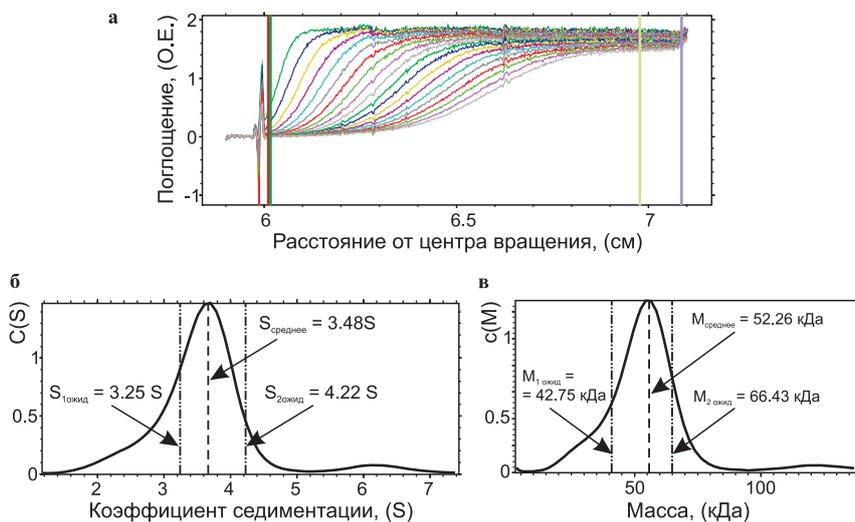


Рис. 11. а) Седиментограмма смеси двух белков, состоящей из БСА и яичного овальбумина. б) и в) Восстановленные распределения в координатах $c(s)$ от s и $c(M)$ от M , соответственно.

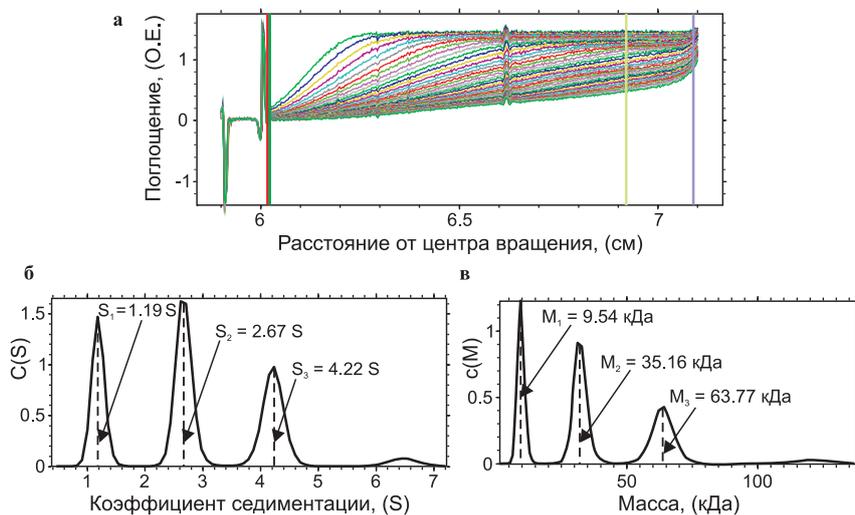


Рис. 12. а) Седиментограмма смеси трех белков, состоящей из БСА, карбоангидразы и апоцитохрома. б) и в) Восстановленные распределения в координатах $c(s)$ от s и $c(M)$ от M , соответственно.

таты восстановления в координатах $c(s)$ и $c(M)$, соответственно. Соотношение молекулярных масс в этом случае составляет 1 : 2,4 : 5,5. Примечательно, что и в этом случае детектируется четвертый компонент – небольшое количество димеров БСА.

Табл. 3 суммирует результаты применения программы *SEDFIT* для анализа смесей белков. Из нее видно, что точность вычисления гидродинамических параметров в смеси наиболее высока для высокомолекулярного компонента. Так, параметры для БСА в смеси с точностью до нескольких процентов согласуются с параметрами, измеренными для индивидуального белка. Примечательно, что из четырех гидродинамических параметров, представленных в табл. 3, ошибка минимальна для константы седиментации, причем это характерно для всех исследованных белков.

VI. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В работе продемонстрированы принципиальные возможности программы *SEDFIT* для анализа индивидуальных белков и их смесей. Подчеркнем, что программа *SEDFIT* не требует достижения плато для раствора и растворителя, что позволяет использовать все пространство ячейки для анализа и тем самым выгодно отличается как от метода «средней точки», так и от многих других программ. Однако для своей реализации программа *SEDFIT* требует априорной информации о параметрах плотности ρ_0 и парциального удельного объема \bar{v} частицы. Следствием введения такой информации является более высокое разрешение по s и M , получаемое в этом методе, по сравнению с другими методами. Заметим, что требования к точности вводимых величин параметров \bar{v} и ρ_0 довольно высоки – не хуже 2–3 единиц в третьем знаке после запятой. Наш опыт применения программы *SEDFIT* для анализа гидродинамических параметров белков в интервале молекулярных масс 10–70 кДа подтверждает высокое разрешение по s и M . Так, только из *одного* опыта по скоростному ультрацентрифугированию можно вычислить константу седиментации белка, его оптимальный коэффициент трения, молекулярную массу и коэффициент диффузии. Интересно, что из вышперечисленных параметров наиболее точно определяется константа седиментации, причем точность ее определения (в отличие от других параметров) слабо зависит от молекулярной массы исследуемого белка. Это позволяет использовать полученные данные для характеристики гидродинамических размеров даже такого маленького белка, как апоцитохром, демонстрируя отличие его конформации (расплавленная глобула) от глобулярной конформации остальных исследованных белков.

Таблица 3
Сравнение гидродинамических параметров для четырех белков в изолированном состоянии и в смеси, вычисленных с помощью программы SEDFIT

Образец	Апо-цитохром <i>c</i> (лошадиный)	α -Лактальбумин (коровий)	Карбоангидраза (бычья)	БСА
Расчетная мол. масса (кДа)	12,14	14,19	28,98	66,43
Парц. уд. объем (см ³ /г)	0,745	0,729	0,733	0,733
Экспериментальные параметры	<i>M</i> <i>s</i> <i>ff</i> _{отп} <i>D</i>			
Белок в изолир. состоянии	9,1 1,1 1,36 11,3	16,2 1,7 1,34 9,6	31,7 2,7 1,31 7,8	65,6 4,3 1,32 6,0
			65,7 4,3 1,39 6,0	65,9 4,3 1,33 6,0
			65,0 4,1 1,39 5,8	
Смесь БСА и α -лактальбумина		17,4 1,7 1,39 8,8		
Смесь БСА и карбоангидразы			34,1 2,7 1,38 7,2	67,1 4,2 1,38 5,7
Смесь БСА, карбоангидразы и апо- цитохрома <i>c</i>	9,5 1,2 1,36 11,2		32,2 2,7 1,36 7,8	63,8 4,2 1,36 6,0

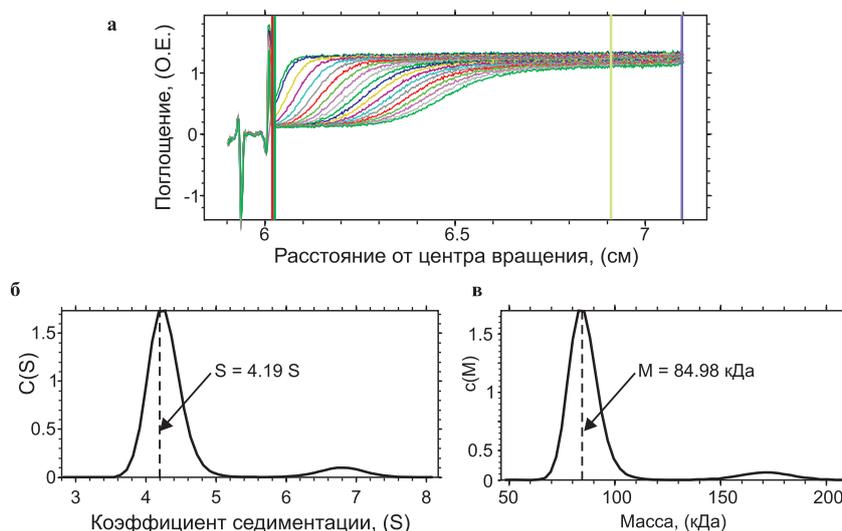


Рис 13. а) Седиментограмма фактора транскрипции NFκB. б) и в) Восстановленные распределения в координатах $c(s)$ от s и $c(M)$ от M , соответственно.

Точность других вычисляемых параметров зависит от величины молекулярной массы. Так, для белков с массой > 30 кДа вычисленные молекулярные массы в пределах 1–2% совпадают с теоретическими, рассчитанными из известной последовательности аминокислот в белке. Для белков с массой < 30 кДа ошибка в определении массы увеличивается и для белков с массой 15 кДа составляет 5–7%. Для еще меньших молекулярных масс ошибка еще больше. Последний факт свидетельствует о том, что для анализа маленьких белков или пептидов, когда вклад диффузии существенно больше вклада седиментации, следует предпочесть другие программы, ориентированные для решения именно таких задач [16].

Исследованные смеси белков показывают, что программа позволяет разрешать компоненты смеси, отличающиеся по молекулярной массе не менее, чем в два раза; это же правило должно выполняться и для смеси, состоящей из трех белков. Это обстоятельство открывает путь для изучения функциональной димеризации, столь характерной для многих биологических процессов, методом скоростного аналитического ультрацентрифугирования.

На рис. 13 в качестве примера приведена седиментограмма фактора транскрипции NFκB, функционирующего в клетке в качестве димера, состоящего из двух рекомбинантных субъединиц с молекулярной

массой 43 кДа каждая. Программа *SEDFIT* демонстрирует кроме основного пика, соответствующего димеру NFκB с массой 85 кДа, присутствие некоторой доли тетрамера.

В заключение заметим, что применение программы *SEDFIT* оптимально для работы с биологическими макромолекулами, для которых константы седиментации лежат в интервале 2–6 единиц Сведберга. Именно в этом интервале она дает наиболее высокое разрешение. Такое высокое разрешение может быть достигнуто и при использовании других методов, в которых угловая скорость в процессе центрифугирования не постоянна, а изменяется по соответствующему закону [12, 24]. Справедливости ради надо заметить, что такого рода методы наиболее эффективны, когда компоненты в смеси довольно сильно отличаются по молекулярной массе (более чем в 2–3 раза) [24].

В заключение авторы благодарят Е.Н. Барышникову и В.Н. Шип за представление препаратов белков и А.Н. Туркина за помощь в проведении экспериментов на ультрацентрифуге XL.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Berne, B.J., Pecora, R.* (1976) *Dynamic Light Scattering*. New York: Wiley.
2. *Cantor, Ch.R., Schimmel, P.R.* (1984) *Biophysical Chemistry*. San Francisco: Freeman and Company. Vol. 2.
3. *Dolgikh, D.A., Gilmanshin, R.I., Brazhnikov, E.V., Semisotnov, G.V., Venyaminov, S.Yu., Ptitsyn, O.B.* (1981) *FEBS Lett.*, **136**, 311–315.
4. *Dolgikh, D.A., Kolomiets, A.P., Bolotina, I.A., Ptitsyn, O.B.* (1984) *FEBS Lett.*, **164**, 88–92.
5. *Fujita, H.* (1962) *Mathematical Theory of Sedimentation Analysis*. New York: Academic Press.
6. *Geibeler, R.* (1992) The Optima XL-A: A new analytical ultracentrifuge with a novel precision absorption optical system. In: *Analytical Ultracentrifugation in Biochemistry and Polymer Science* / Eds. S.E.Harding, A.J.Rowe, J.C.Horton. Royal Society of Chemistry.
7. *Hansen, J.C., Lebowitz, J., Demeler, B.* (1994) *Biochemistry*, **33**, 13155–13163.
8. *Harpaz, Y., Gerstein, M., Chothia, C.* (1994) *Structure*, **2**, 641–649.
9. *Hensley, P.* (1996) *Structure*, **4**, 367–373.
10. *Lamm, O.* (1929) *Akr. Mat. Astr. Fys.*, **21**, 1–2.
11. *Laue, T.M., Stafford, W.F., III* (1999) *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, **28**, 75–100.
12. *Machtle, W.* (1999) *Biophys. J.*, **76**, 1080–1091.
13. *Meselson, M., Stahl, F.W.* (1958) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **44**, 671–682.
14. *O'Farrell, P.Z.* (1975) *J. Biol. Chem.*, **250**, 4007–4021.
15. *Philips, D.L.* (1962) *J. Assoc. Comput.*, **9**, 84–97.
16. *Philo, J.S.* (1997) *Biophys. J.*, **72**, 435–445.
17. *Provencher, S.W.* (1982) *Comp. Phys. Comm.*, **27**, 229–242.
18. *Schachman, H.K.* (1989) *Nature*, **341**, 259–260.

19. *Schachman, H.K.* (1959) *Ultracentrifugation in Biochemistry*. New York and London: Academic Press.
20. *Schuck, P.* (2000) *Biophys. J.*, **78**, 1606–1619.
21. *Schuck, P., MacPhee, C.E., Howlett, G.J.* (1998) *Biophys. J.*, **74**, 499–474.
22. *Schuster, T.M., Toedt, J.M.* (1996) *Biophys. Methods*, **6**, 650–658.
23. *Stafford, W.F., III* (1994) *Methods Enzymol.*, **240**, 478–501.
24. *Stafford, W.F., III, Braswell, E.H.* (2004) *Biophys. Chem.*, **108**, 273–279.
25. *Svedberg, T., Pedersen, K.O.* (1940) *The Ultracentrifuge*. London: Oxford University Press.
26. *Tissieres, A., Watson, J.D.* (1958) *Nature*, **82**, 778–790.
27. *van Holde, K.E., Weistchet, W.O.* (1978) *Biopolymers*, **17**, 1387–1403.
28. *Weber, K., Osborn, M.* (1969) *J. Biol. Chem.*, **244**, 4406–4412.