

ДОСЛІДЖЕННЯ ТЕРМІЧНОГО РОЗКЛАДУ АЛЬБУМІНУ МЕТОДОМ ТЕМПЕРАТУРНО-ПРОГРАМОВАНОЇ ДЕСОРБЦІЙНОЇ МАС-СПЕКТРОМЕТРІЇ

І.В. Гриценко, Б.Г. Місчанчук, Н.П. Галаган

*Інститут хімії поверхні Національної академії наук України
вул. Ген. Наумова 17, 03680 Київ-164*

Вивчено термічний розклад бичачого сироваткового альбуміну (БСА) у вільному та адсорбованому на модифікованих кремнеземах станах методом температурно-програмованої десорбційної мас-спектрометрії. Ізотерми адсорбції задовільно описуються рівнянням Ленгмюра. Термоліз молекул БСА починається з виділення води, далі розкладаються сірковмісні групи амінокислот, а завершується процес розкладом аміногруп. Температура розкладу залежить від ступеня гідрофобності поверхні кремнезему.

Thermal decomposition has been studied of bovine serum albumin (BSA) as free and adsorbed on modified silica surface by means of temperature-programmed desorption mass spectrometry. Adsorption isotherms are described satisfactorily by the Langmuir equation. The thermolysis of BSA molecules starts from water evaluation, then sulfur-containing groups are destroyed followed by destruction of amino groups. The decomposition temperature depends upon hydrophobicity of silica surface.

Вступ

Метод температурно-програмованої десорбційної мас-спектрометрії (ТПД МС) знайшов застосування для дослідження адсорбційних комплексів біомолекул з кремнеземом [1, 2]. Ми застосувати метод ТПД МС для дослідження особливостей адсорбції білкових молекул (зокрема БСА) на високодисперсному кремнеземі (ВДК), в тому числі з модифікованою поверхнею.

Експериментальна частина

Як об'єкти дослідження використовувалися: БСА (М-68000) фірми Sigma (фракція V), високодисперсний кремнезем марки А-300 з питомою площею поверхні 266 м²/г, кремнезему, модифіковані диметилдихлорсиланом або триметилхлорсиланом. Для модифікованих зразків ступінь заміщення вільних силанольних груп становив 15-20% (відповідно АМД-0,2 та АМТ-0,15) та 40% (АМД-0,4 та АМТ-0,4).

Адсорбцію БСА на ВДК проводили з 0,01-0,6% водних розчинів в статичних умовах при 21-23°C стандартним методом [3]. Співвідношення розчин : адсорбент було постійним і складало 10 мл : 100 мг. Час контакту ВДК з розчинами білку складав 2 год. Величину адсорбції бичачого сироваткового альбуміну визначали за різницею його концентрацій у вихідному та рівноважному розчинах методом Лоурі-Чюкалто [4] на фотоелектроколориметрії КФК-2. Максимум адсорбції БСА спостерігається при рН розчинів 4,8-5,0 [3]. Попередньо ВДК прожарювали 2 год. при 200°C.

Обладнання для температурно-програмованої десорбційної мас-спектрометрії включало монопольний мас-аналізатор МХ-7304А, вакуумну систему на основі насосу НМД 0.16-1, точний терморегулятор з підігрівачим елементом РІФ-101, кварцово-молібденову трубку для зразків та комп'ютерну систему реєстрації спектрів. Діапазон мас 1-400 Дальтон, чутливість - 10^{-8} г. Швидкість підвищення температури змінювалась від 0,05 до 30°C/хв.

Результати та їхнє обговорення

Величина адсорбції БСА збільшується зі збільшенням питомої поверхні та дисперсності кремнезему, ущільнення частинок зменшує адсорбцію [5]. Сорбційна здатність ВДК залежить від термообробки поверхні і підвищується після прожарювання до 700°C [6]. Величина адсорбції препаратів білка залежить від способу одержання, його чистоти та терміну зберігання. Зокрема, підвищення неоднорідності альбуміну сприяє збільшенню адсорбції.

Ізотерми адсорбції БСА на вихідному та модифікованих кремнеземах наведено на рис. 1; показники величини граничної адсорбції A_{∞} подано у табл. 1. Одержані значення граничної адсорбції співпадають з наявними в літературі [3, 4].

В процесі термолізу БСА (рис. 2) ідентифіковано три стадії виділення води з максимумами при 70, 235, 280°C. Перша стадія відповідає десорбції фізично сорбованої води.

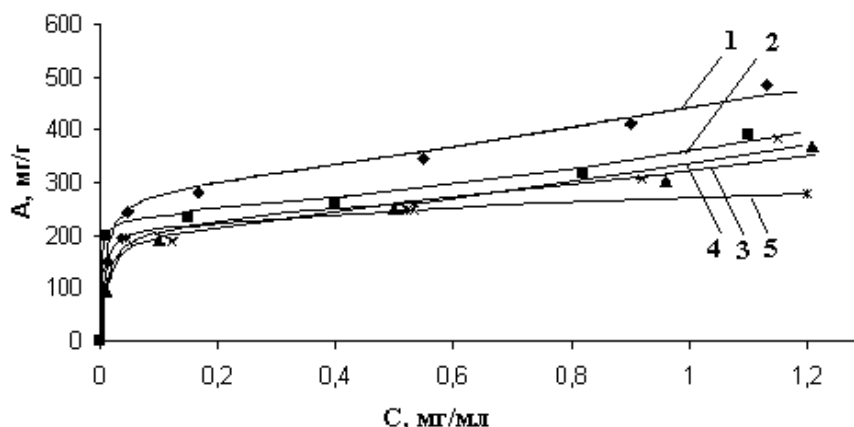


Рис. 1. Ізотерма адсорбції БСА на вихідному аеросилі (1) та кремнеземах з різною гідрофобністю (2 –АМД-0,2; 3 –АМД-0,4; 4 –АМТ-0,15; 5 –АМТ-0,4).

Таблиця 2. Величина адсорбції БСА на кремнеземах з різною гідрофобністю

Кремнезем	Гранична адсорбція, мг/г
А-300	380
АМД-0,4	280
АМД-0,2	300
АМТ-0,4	280
АМТ-0,15	250

Процес термолізу розпочинається із відщеплення сірковмісних амінокислот цистеїну та метіоніну при температурі близько 210°C. Цей процес відбувається в аномально вузькому температурному інтервалі, що вказує на кооперативний характер цієї початкової стадії термічного розкладу. Структурне перетворення молекули білка, що

супроводжується виділенням сірководню, розпочинає першу та другу стадії процесу розкладу амінокислот БСА, що супроводжується появою в мас-спектрі інтенсивних піків органічних фрагментів та води, з максимумами при 235 та 280°C. Процес закінчується при температурі близько 400°C. Серед інших характерних особливостей термічного розкладу БСА слід відзначити виділення амоніаку, що свідчить про термоліз аміногруп.

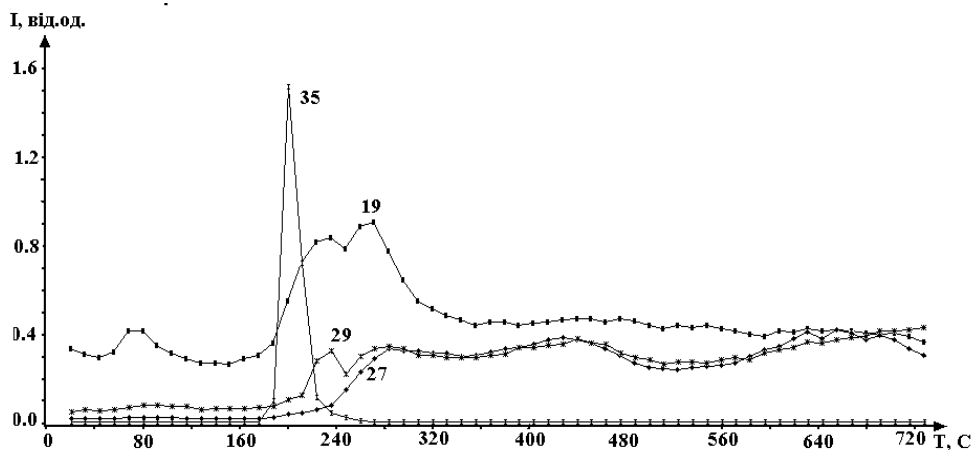


Рис. 2. Термограма розкладу масивного зразка БСА для компонент 19 (H_2O), 27 (HCN), 29 (C_2H_5) та 35 (H_3S^+) а.о.м.

При термолізі БСА, адсорбованого на гідрофільному кремнеземі, спочатку (максимум 80°C) спостерігається виділення фізично зв'язаної води, а потім – термічний розклад амінокислот з одночасним виділенням води і органічних речовин (максимуми 220 і 300°C). На термограмі (рис. 3) співвідношення між піками органічних фрагментів і води більше, ніж у вільного БСА. Максимум, що відповідає виділенню сірководню, більш розмитий, що пояснюється адсорбцією. З деструкції сірковмісних амінокислот розпочинається розклад білка, який завершується деструкцією аміногруп при 560°C.

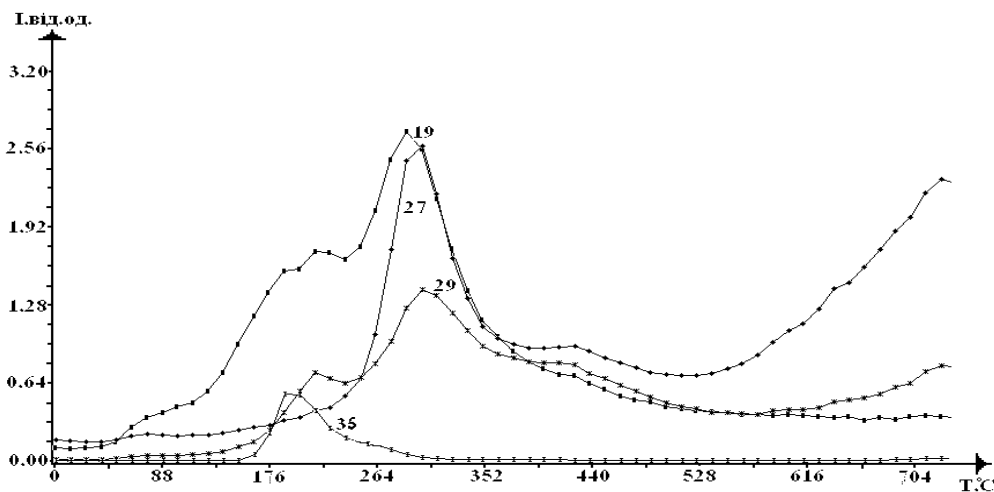


Рис. 3. Термограма розкладу адсорбованого на кремнеземі БСА для компонент 19, 27, 29 та 35 а.о.м.

Аналіз термічного розкладу БСА, адсорбованого на модифікованих ВДК, на прикладі АМД-0,4 і АМТ-0,4 (рис. 4, 5), показує наявність трьох стадій виділення води при 120, 230, 310 °C. Десорбція фізично зв'язаної води відбувається протягом першої стадії. Процес термолізу адсорбованої молекули БСА починається, як і у випадку вільної форми, з розщеплення сірковмісних амінокислот з максимумом 190°C. Але виділення сірководню

відбувається у більш широкому температурному інтервалі. Це можна пояснити адсорбцією H_3S^+ на поверхні ВДК, в результаті чого процес термодесорбції уповільнюється. Інтенсивність виділення сірководню з БСА на АМТ-0,4 вища. На другій та третій стадії розкладу амінокислот спостерігається одночасний вихід води та органічних фрагментів з максимумами при 220 і 310°C. Розклад адсорбованого БСА у порівнянні з неадсорбованим характеризується підвищенням інтенсивності виділення HCN з максимумом при 310°C.

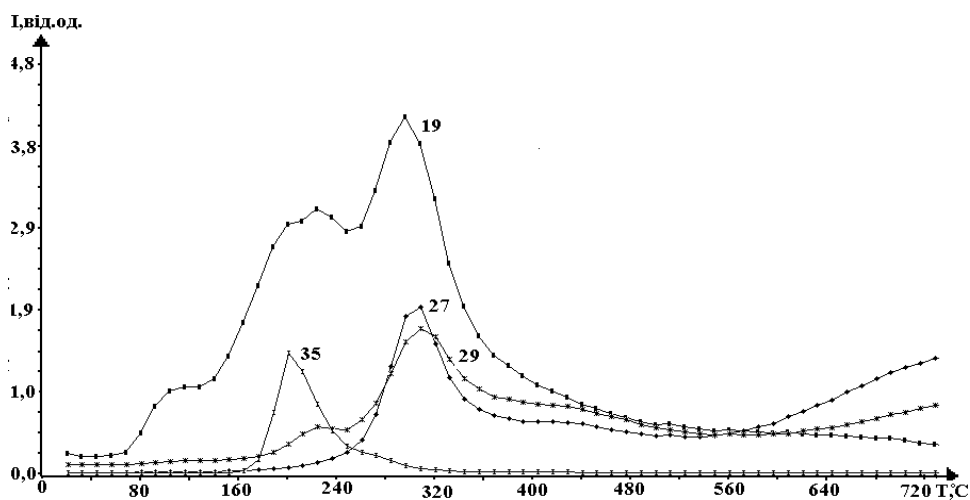


Рис. 4. Термограма розкладу БСА, адсорбованого на АМД-0,4 (для компонент 19, 27, 29 та 35 а.о.м.).

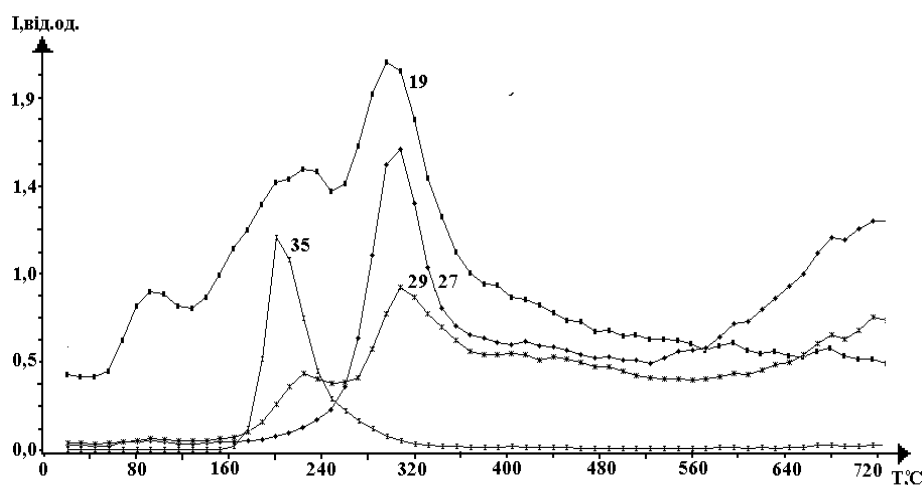


Рис. 5. Термограма розкладу БСА, адсорбованого на АМТ-0,4 (для компонент 19, 27, 29 та 35 а.о.м.).

Загальна структура термолізу БСА, адсорбованого на АМТ-0,4 і АМД-0,4, за положенням максимумів схожа, але співвідношення інтенсивностей максимумів органічних фрагментів до максимумів виділення води вдвічі більше для АМД-0,4 у порівнянні з АМТ-0,4. Процес термолізу закінчується при 560°C розкладом аміногруп. При подальшому підвищенні температури відбувається обуглення органічних залишків, що пояснює підвищення інтенсивності ліній 27 та 29 на термограмі.

Модифіковані кремнеземи надані співробітником Інституту хімії поверхні НАН України П.О. Куземою.

Висновки

Зміна ступеня гідрофобності поверхні модифікованих кремнеземів у порівнянні з вихідним визначає їхню сорбційну здатність щодо БСА. Ізотерми адсорбції БСА на модифікованих кремнеземах мають ленгмюрівську форму. Загальним при термолізі БСА у вільному та адсорбованому станах є виділення води, що відбувається в три стадії, температура яких залежить від стану білка. Термоліз вільного БСА розпочинається із розкладу сірковмісних амінокислот. Адсорбція БСА на ВДК дещо змінює характер термолізу: виділення сірководню відбувається в більш широкому температурному інтервалі, підвищується інтенсивність виділення HCN. Розклад аміногруп завершує термоліз білка.

Література

1. Pokrovskiy V.A. Temperature-programmed mass spectrometry of biomolecules in surface chemistry studies // *Rapid Comm. Mass Spectr.* – 1995. – V. 9. – P.588-591.
2. TPD MS studies on adsorption immobilization of phenothiazine antidotes / T.V. Kulik, N.P. Galagan, V.V. Khrapak, V.A. Pokrovskiy // *Proc. 49th Conf. on Mass Spectrometry (Chicago, Illinois, May 27-31, 2001).*
3. Тертишная Е.В. Геращенко И.И., Луцюк Н.Б., Миронюк И.Ф., Сушко Р.В. Влияние технологических особенностей производства высокодисперсного кремнезема на его белоксорбирующую способность // *Укр. хим. журн.* - 1996. - Т. 62, № 12. - С.87-90.
4. Геращенко И.И., Тертишная Е.В., Луцюк Н.Б., Богомаз В.И. Сравнительное изучение сорбционной способности кремнеземсодержащих фаз различной природы по отношению к белку // *Укр. хим. журн.* - 1992. - Т. 58, № 6. - С.460-462.
5. Геращенко И.И., Луцюк Н.Б., Изменение сорбируемости ряда глобулярных белков на кремнеземе в присутствии трипсина // *Укр. хим. журн.* - 1992. - Т. 58, № 8. - С.632-626.
6. Тарасевич Ю.И., Монахова Л.И. Взаимодействие глобулярных белков с поверхностью кремнеземов // *Коллоидн. журн.* – 2002. – Т. 64, № 4. – С.535-540.