

5. Spirin A. S. Energetics and dynamics of the protein-synthesizing machinery // The Roots of modern biochemistry / Eds H. Kleinkauf et al.— Berlin; New York: Walter de Gruyter Co., 1988.— P. 512—533.
6. Translocation makes the ribosome less compact / A. S. Spirin, V. I. Baranov, G. S. Potubessov et al. // J. Mol. Biol.— 1987.— 194, N 1.— P. 119—128.
7. Изменение компактности рибосомы при транслокации / А. С. Спирин, В. И. Баранов, И. Н. Сердюк, Р. Май // Докл. АН СССР.— 1984.— 274, № 5.— С. 1260—1266.
8. Гаврилова Л. П., Смолянинов В. В. Изучение механизма транслокации в рибосомах. I. Синтез полифенилаланина в рибосомах *E. coli* без участия гуанозин-5'-трифосфата и белковых факторов трансляции // Молекуляр. биология.— 1971.— 5, № 6.— С. 883—890.
9. Traub P., Nomura M. Structure and function of *Escherichia coli* ribosomes. VI. Mechanism of assembly of 30S ribosomes *in vitro* // J. Mol. Biol.— 1969.— 40, N 3.— P. 391—413.
10. Traub P., Nomura M. Structure and function of *E. coli* ribosomes. V. Reconstitution of functionally active 30S ribosomal particles from RNA and proteins // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.— 1969.— 59, N 3.— P. 777—784.
11. Баранов В. И. Получение транслирующих рибосом с помощью колонок, содержащих иммобилизованную полиуридиловую кислоту // Биоорг. химия.— 1983.— 9, № 12.— С. 1650—1657.

Ин-т белка АН СССР, Пущино

Получено 10.04.90

УДК 577.352.4

© С. А. Пилецкий, И. Я. Дубей, Д. М. Федоряк, В. П. Кухарь, 1990

СУБСТРАТ-СЕЛЕКТИВНЫЕ ПОЛИМЕРНЫЕ МЕМБРАНЫ. ИЗБИРАТЕЛЬНЫЙ ПЕРЕНОС КОМПОНЕНТОВ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

Предложен метод синтеза полимерных мембран на основе сильносшитого диэтиламиноэтилметакрилата, обладающих избирательной проницаемостью для отдельных нуклеозидмонофосфатов. Изучены закономерности формирования селективной пористой структуры. Обсуждается возможный механизм переноса ионов. Метод может быть использован в области мембранного катализа, для разделения сложных смесей близких по свойствам компонентов, а также для формирования биосенсорных систем.

Введение. Быстрое развитие биоорганической химии клеточных мембран обусловило прогресс в познании таких их важнейших функций, как транспорт различных метаболитов, генерация энергии, взаимодействие клеток и их деление, передача нервного возбуждения, рецепция сигналов внешней среды и т. п.

Значительный успех в моделировании рецепторной функции мембран был достигнут при конструировании матричных полимеров. Данный метод основан на получении сильносшитого полимера в присутствии матричных молекул, впоследствии удаляющихся из него с освобождением каверн, структура которых обеспечивает селективное «узнавание» этих молекул (рис. 1). С помощью данного метода были синтезированы полимеры с высокой селективностью к сахарам [1], производным аминокислот [2], дезоксирибонуклеозидам [3], что свидетельствует о его широких практических возможностях.

По нашему предположению, матричные молекулы принимают участие в формировании всей системы пор полимера. В результате нековалентного взаимодействия матрицы с мономером и последующей полимеризации образуется система пор с диаметром, близким в некоторых местах к диаметру матричных молекул, вокруг которых происходит процесс образования полимера. Мембрана из такого полимера должна быть проницаема только для молекул, размер которых не превышает диаметра матрицы.

Для проверки настоящей гипотезы нами синтезирован ряд полимеров, селективных для дезоксиаденозина (dA), *L*-фенилаланина (*L*-Phe) и аденозинмонофосфорной кислоты (AMP). Селективность полученных полимеров исследовали электрофоретическим методом.

Материалы и методы. В работе использовали dA, L-Phe, AMP («Serva», ФРГ), гуанозинмонофосфат аммония (СКТБ БАВ, Новосибирск). Этиленгликольдиметакрилат и ДЭАЭ-метакрилат отечественного производства дополнительно очищали хроматографией на силикагеле 40/100 («Chemapol», ЧСФР) в линейном градиенте концентрации (0→10 %) метанола в хлороформе. Использовали источник постоянного тока ПЭФА-1 (СССР). Для измерения электропроводности растворов электролитов применяли кондуктометр ОК-102/1 («Radelkis», ВНР).

Получение мембран. Полимеризацию проводили по методике [3]. Состав полимеризационной смеси (таблица) в значительной степени продиктован требованием растворимости матричного соединения. Мономерную смесь помещали в чашку Петри слоем толщиной около 0,5 мм, закрывали и выдерживали в термостате 1 сут при 80 °С. Вырезали кружки диаметром 3 см, которые герметично присоединяли к торцу стеклянной трубки, образуя таким способом камеру 2.

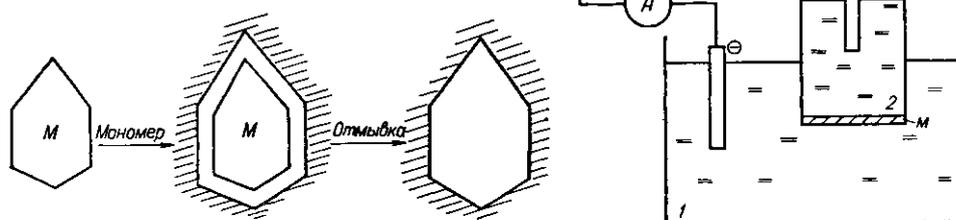


Рис. 1. Схема синтеза полимеров с «отпечатками» матричных молекул; *M* — матрица
Fig. 1. Scheme of polymers synthesis with «imprints» of template molecules. *M* — template

Рис. 2. Схема измерительной ячейки: 1 — катодная камера с изменяющейся концентрацией электролита; 2 — анодная камера; *m* — ионселективная мембрана
Fig. 2. Scheme of measuring cell: 1 — cathode compartment with alternating electrolyte concentration; 2 — anode compartment; *m* — ion-selective membrane

Изучение мембран. Субстратную специфичность мембран исследовали с помощью простого устройства, схема которого приведена на рис. 2. Растворы электролитов, в которые погружены платиновые электроды, разделены полимерной мембраной *m*. Через систему пропускали постоянный ток напряжением 200 В и фиксировали зависимость силы тока, проходящего через систему, от концентрации электролита в камере 1.

Определение пористости мембран. Для измерения пористости полимер ПЗ размолоти в фарфоровой ступке, при помощи сит выделили фракцию частиц с диаметром 50—65 мкм. Пористость определяли сорбционным методом по методике [6], включающей использование вакуумной сорбционной установки с кварцевыми спиральными весами Мак-Бена (чувствительность 0,16 мм/мг) с применением статического массового метода, основанного на определении равновесного количества сорбированного вещества по изменению массы сорбента. В установке поддерживали температуру 303 К с точностью ±0,2 К. Для достижения сорбционного равновесия образцы выдерживали в парах растворителя в течение суток. В качестве сорбата использовали воду.

Определение концентрации ДЭАЭ-групп. Образец полимера ПЗ размолоти в фарфоровой ступке, при помощи сит отобрали фракцию с диаметром частиц 50—65 мкм, промыли на стеклянном фильтре ацетонитрилом, 0,5 М NaCl, далее многократно — водой, дважды 0,1 М NaOH и затем снова водой до нейтральной реакции элюата. Образец высушивали и навеску титровали 0,01 М HCl с помощью иономера ЭВ-74 (СССР).

Результаты и обсуждение. В ходе электрофоретического изучения мембран было установлено, что полимеры П1 и П2 ток не проводят. В дальнейшем изучали селективность мембран ПЗ.

После префореза в течение 40 мин камеру 2 заполняли раствором гуанозинмонофосфата (GMP, 11 ммоль/л), который не должен проходить через мембрану и служить таким образом переносчиком тока. Камеру 1 заполняли растворами KH_2PO_4 , AMP и GMP различной кон-

центрации и определяли проводимость ячейки. На рис. 3 приведены результаты этих исследований.

Согласно полученным данным, для равных концентраций растворов нуклеозидмонофосфатов в случае АМР ток в системе значительно больше. Это не связано с большей ионной силой раствора АМР (измеренные электропроводности растворов АМР и GMP (0,1 ммоль/л) практически равны: 67 и 67,5 мкСм соответственно).

Результаты эксперимента свидетельствуют о том, что поток анионов АМР через мембрану к аноду значительно больше, чем поток

Состав полимеризационной смеси мембран
Content of polymerizing mixture of membranes

Полимер	ЭГДМ, г	Матрица, мг	ДЭАЭ-М, г	ДФА, мл	Н ₂ О, мл	ДАК*, мг
П1	5	dA, 250	—	5	0,2	25
П2	4,8	L-Phe, 70	0,2	5	0,2	25
П3	4,3	АМР, 250	0,75	5	0,2	25

*Динитрил азобисизомаляной кислоты.

анионов GMP в тех же условиях. Следовательно, мембрана из полимера П3 обладает свойством селективного переноса АМР, матричного соединения, участвовавшего в формировании структуры полимера.

Частицы с диаметром, меньшим диаметра пор, необязательно свободно проходят через мембраны: они могут задерживаться мембраной в том случае, если на них действует сила притяжения со стороны поверхности пор — электростатическая, вандерваальсова, водородная связь [4]. В принципе, и разные скорости диффузии частиц сквозь мембрану, возможно, связаны с тем, что они с разной силой взаимодействуют с поверхностью пор, например с ионогенными группами полимера. Однако АМР и GMP настолько близки по свойствам, что в условиях эксперимента этой разницей можно пренебречь. Отметим, что для АМР и GMP существует предельный ток, 22 и 5 мА соответственно. Это свидетельствует о том, что для данной разницы потенциалов существует предельная скорость диффузии, которая далее не возрастает с ростом концентрации электролита и определяется свойствами мембраны. Ток насыщения для АМР примерно равен таковому для КН₂РО₄. Для GMP насыщение наступает при меньшей концентрации, чем для АМР (0,13 и 0,3 ммоль/л соответственно).

Рассмотренный выше процесс — это, в сущности, электродиализ, т. е. разделение веществ на основе разных скоростей диффузии через мембрану, которая имеет для них разную проницаемость. Однако полученная нами мембрана обладает большей селективностью, чем обычные мембраны для диализа и ультрафильтрации, так как они не позволяют разделять близкие по структуре и свойствам вещества.

Полимерные мембраны П1 и П2 не являются токопроводящими даже для такого электролита, как раствор КН₂РО₄. Вероятно, это связано с тем, что матричные молекулы dA и L-Phe не заряжены в условиях полимеризации, а указанный процесс требует присутствия заряженных групп в полимере. В случае полимера П1 в полимеризационной смеси отсутствовал ДЭАЭ-М, способный к ионизации. В случае полимера П2 ДЭАЭ-М, по-видимому, не способен протонироваться фенилаланином и образовывать с ним комплекс. В полимере П3 ДЭАЭ-группы ионизированы АМР. Это подтверждается тем, что АМР растворяется в поляризационной смеси только в присутствии ДЭАЭ-М.

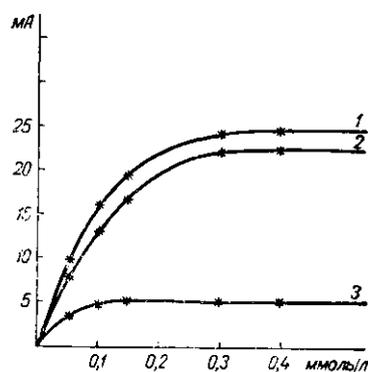
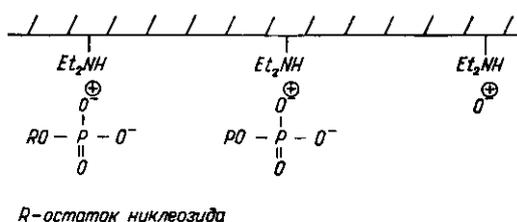


Рис. 3. Зависимость силы тока в системе от концентрации электролита в камере 1: 1 — для КН₂РО₄; 2 — для АМР; 3 — для GMP

Fig. 3. Dependence of current strength in the system on the concentration of electrolyte in cathode compartment: 1 — for КН₂РО₄; 2 — for АМР; 3 — for GMP

Из вышеизложенного следует, что ионселективная мембрана должна строиться из ионизированных мономеров, образующих комплекс с матричными молекулами. Для большей скорости массопереноса мембрана должна быть высокопористой. Общий объем пор полимера ПЗ, W_0 , измеренный сорбционным методом, составляет $0,68 \text{ см}^3/\text{г}$.

В полимере ПЗ матричные молекулы находятся внутри пор, поверхность которых покрыта заряженными группами. Концентрация ДЭАЭ-групп в полимере ПЗ составляет 110 мкмоль/г (по данным потенциометрического титрования). Прохождение ионов через ионообменную мембрану можно описать по механизму «прыжковой» проводимости [5]. В результате переноса под действием разности потенциалов реализуются перескоки заряженных частиц между местами их связывания — ионогенными группами, распределенными по поверхности пор:



Таким образом, в настоящей работе осуществлено моделирование клеточных мембран на основе синтетических полимерных материалов. Показано, что матричные полимеры, являясь хорошими моделями рецепторов, могут также осуществлять избирательный перенос низкомолекулярных природных соединений. Вероятно, полученные результаты могут быть использованы в области мембранного катализа, для разделения сложных смесей близких по свойствам компонентов, а также для формирования биосенсорных систем.

Авторы выражают благодарность И. Д. Атаманенко (Ин-т коллоид. химии и химии воды АН УССР, Киев) за оказанную помощь в измерении пористости полимеров.

SUBSTRATE-SELECTIVE POLYMERIC MEMBRANES. SELECTIVE TRANSFER OF NUCLEIC ACIDS COMPONENTS

S. A. Piletsky, I. Ya. Dubey, D. M. Fedoryak, V. P. Kukhar

Institute of Bioorganic Chemistry and Oil Chemistry,
Academy of Sciences of the Ukrainian SSR, Kiev

Summary

The selective polymeric membranes for nucleic acids components were prepared using «template polymerization» technique. The possible mechanisms of the selective porous structure formation and ion transfer are discussed.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Wulff G., Sarhan A., Zabrocki K. Enzyme-analogue built polymers and their use for the resolution of racemates // *Tetrahedron Lett.*—1973.—14, N 44.—P. 4329—4332.
2. Andersson L., Selligren B., Mosbach K. Imprinting of amino acid derivatives in macroporous polymers // *Ibid.*—1984.—25, N 45.—P. 5211—5214.
3. Пилецкий С. А., Кухарь В. П., Федоряк Д. М. Получение полимерных сорбентов, селективных к компонентам нуклеиновых кислот // *Укр. хим. журн.*—1989.—55, № 8.—С. 872—875.
4. Брок Т. Мембранная фильтрация.— М.: Мир, 1987.— 464 с.
5. Тимашев С. Ф. Физико-химия мембранных процессов.— М.: Мир, 1988.— 240 с.
6. Цилипоткина М. В. Изучение структуры полимеров сорбционным методом // *Соврем. физ. методы исследования полимеров.*— М.: Химия, 1982.—С. 198—209.

Ин-т биоорг. химии и нефтехимии АН УССР, Киев

Получено 17.04.90