

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ «ФЕДЕРАЛЬНЫЙ
НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР «КРИСТАЛЛОГРАФИЯ И
ФОТОНИКА» РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК»

ИНСТИТУТ КРИСТАЛЛОГРАФИИ ИМ. А.В. ШУБНИКОВА РАН

На правах рукописи

Марченкова Маргарита Александровна

**ОСОБЕННОСТИ РАЗЛИЧНЫХ СТАДИЙ КРИСТАЛЛИЗАЦИИ
ЛИЗОЦИМА И ПОЛУЧЕНИЕ ПЛАНАРНЫХ СТРУКТУР НА ОСНОВЕ
БЕЛКОВ ЦИТОХРОМА С И ЛИЗОЦИМА**

Специальность 01.04.18 – «Кристаллография, физика кристаллов»

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени

кандидата физико-математических наук

Научный руководитель:

член-корреспондент РАН, профессор Ковальчук Михаил Валентинович

Москва 2016

ОГЛАВЛЕНИЕ

Введение.....	6
Цели и задачи работы.....	7
ГЛАВА 1. Обзор литературы.....	14
1.1. Методы получения органических пленок.....	15
1.1.1. Центрифугирование (spin-coating).....	16
1.1.2. Методы «литья»: испарение растворителя (solvent evaporation), «ножевой» метод (doctor blade), метод подачи раствора (solution casting method), метод прямой адсорбции (solvent casting method).....	17
1.1.3. Метод погружения (dip coating).....	19
1.1.4. Метод Ленгмюра-Блоджетт.....	20
1.1.5. Самосборка (self assembly).....	26
1.1.6. Послойная сборка (layer-by-layer self assembly).....	27
1.2. Методы получения белковых кристаллов.....	28
1.2.1. Кристаллизация в объеме.....	29
1.2.2. Диффузия в парах.....	29
1.2.3. Встречная диффузия.....	30
1.2.4. Диализ.....	31
1.3. Исследования процесса получения пленок цитохрома и его взаимодействия с липидными монослоями.....	31
1.4. Исследования начальных этапов кристаллизации, процессов роста и получения тонких пленок лизоцима.....	37
1.5. Заключение.....	49

ГЛАВА 2. Аппаратурно-методические подходы для исследования процессов кристаллизации белков, а также кристаллов и планарных структур на их основе на полупроводящих и диэлектрических подложках	51
2.1. Получение пленок цитохром <i>c</i> -кардиолипидов	51
2.1.1. Процедура исследования кинетики адсорбции	52
2.1.2. Изучение π -A изотерм	53
2.2. Разработка метода изучения тонкой структуры органической планарной системы	53
2.2.1. Метод рефлектометрии	53
2.2.2. Метод стоячих рентгеновских волн	57
2.2.3. Разработка метода стоячих рентгеновских волн в условиях многоволнового взаимодействия рефлексов	59
2.3. Получение кристаллов лизоцима тетрагональной сингонии. Поиск условий кристаллизации	71
2.3.1. Подготовка растворов для кристаллизации	71
2.3.2. Процедура загрузки ячейки. Скрининг условий роста	72
2.4. Разработка герметичной ячейки для исследования упорядоченных белковых молекул на кристаллической подложке	73
2.5. Исследование растворов белков	78
2.5.1. Исследование растворов белков методом динамического рассеяния света	78
2.5.2. Исследование растворов белков методом малоуглового рассеяния рентгеновских лучей на дифрактометре АМУР-К	80
2.5.3. Исследование растворов белков методом малоуглового рассеяния рентгеновских лучей на синхротронной станции ДИКСИ	83

2.6. Заключение.....	85
ГЛАВА 3. Получение тонкопленочных структур белков цитохрома <i>c</i> и лизоцима.....	87
3.1. Влияние начальной концентрации цитохрома <i>c</i> в субфазе на процесс адсорбции на монослое кардиолипина ($\pi_0=5$ мНм ⁻¹)	87
3.2. Влияние начального давления монослоя кардиолипина на процесс адсорбции цитохрома <i>c</i>	89
3.3. Анализ изотерм сжатия.....	90
3.4. Получение планарных структур на основе лизоцима на подложках....	96
3.5. Заключение.....	102
ГЛАВА 4. Исследование <i>in situ</i> процессов роста и деградации кристаллов лизоцима тетрагональной сингонии на различных подложках	105
4.1. Результаты поиска условий кристаллизации лизоцима тетрагональной сингонии	105
4.2. Начальная стадия формирования кристаллов	107
4.3. Стадия сформированных кристаллов.....	109
4.4. Деградация кристаллов.....	111
4.5. Заключение.....	114
ГЛАВА 5. <i>In situ</i> исследования состояния молекул лизоцима на стадии начала процесса кристаллизации методом малоуглового рассеяния рентгеновских лучей	115
5.1. Молекулярное моделирование, основанное на анализе структуры тетрагональной формы лизоцима.....	115
5.2. Экспериментальная секция	117

5.2.1. Исследование растворов лизоцима методом динамического рассеяния света.....	117
5.2.2. Исследование растворов лизоцима методом малоуглового рассеяния рентгеновских лучей на дифрактометре АМУР-К.....	118
5.2.3. Исследование растворов лизоцима методом малоуглового рассеяния рентгеновских лучей на синхротронной станции ДИКСИ	122
5.3. Заключение.....	128
Выводы и основные результаты работы.....	130
Список литературы	132

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время активно разрабатываются гибридные наносистемы (ГНС), которые представляют собой сочетание органических и неорганических компонент. Такие системы обладают новыми уникальными свойствами, зачастую не являющимися простой суммой свойств отдельных компонент. Этим обуславливается перспективность применения ГНС практически во всех областях промышленности и медицины, а также актуальность задачи поиска новых методов их создания.

Существует два подхода к созданию ГНС. Первый, наиболее популярный, представляет собой создание материалов, имеющих наномасштабные размеры и сочетающих органические и неорганические компоненты, распределенные в объеме. На таких размерах значительно меняются свойства составляющих и, как следствие, свойства гибридного наноматериала достаточно трудно предсказать. Особую трудность в такой системе представляет организация связей между органической и неорганической компонентами и организация 3D архитектуры всей системы.

Второй подход, используемый в настоящей работе, предполагает создание планарных органических подсистем на неорганических подложках, которые могут представлять собой готовые технологические решения с заданными связями и 2D архитектурой.

В настоящей работе выбран ранее не использованный вариант органической подсистемы в виде пленки белка, поэтому особое значение имеет получение наиболее полных данных о структуре таких систем и их компонентах на всех этапах их формирования. Для решения этой задачи необходимо привлечение неразрушающих прецизионных методов исследования структуры, в том числе развитых для изучения неорганических кристаллов, и их адаптация к исследуемым объектам.

В качестве материала органической подсистемы выбраны белки цитохром *c* и лизоцим. Цитохром *c* – железосодержащий водорастворимый белок, выполняющий в клетке несколько функций. С одной стороны, он участвует в процессах внутриклеточного дыхания, поскольку способен к обратимому одноэлектронному взаимодействию: $\text{Fe}^{3+} + e^- \leftrightarrow \text{Fe}^{2+}$; окисленную форму ЦитС можно рассматривать в качестве антиоксиданта: $\text{O}_2^- + \text{Цит}(\text{Fe}^{3+}) \rightarrow \text{O}_2 + \text{Цит}(\text{Fe}^{2+})$; с другой стороны, будучи связанным с фосфолипидом митохондриальной мембраны кардиолипином, играет ключевую роль в запуске процесса запрограммированной гибели клетки – апоптоза. Поэтому данный белок является перспективным для создания различных сенсоров на его основе. Лизоцим – небольшой водорастворимый белок, является одним из наиболее изученных белков. В частности, ему посвящено наибольшее число работ, по исследованию процессов роста кристаллов и влиянию условий на структуру кристалла. Это позволяет получить достаточно крупные (0.2-0.6 мм) кристаллы этого белка в достаточно большом диапазоне условий и использовать его в качестве модельного объекта для адаптации методов структурной диагностики органических компонент ГНС.

Цели и задачи работы

Цели работы:

Развитие подходов к созданию и исследованию структуры гибридных наносистем, представляющих собой упорядоченные органические пленки белков цитохрома *c* и лизоцима на диэлектрических и полупроводниковых подложках; изучение особенностей различных стадий кристаллизации лизоцима.

В соответствии с поставленными целями в работе решались следующие задачи:

1. Разработка модификации метода стоячих рентгеновских волн в условиях многоволновой дифракции для изучения тонкой структуры приповерхностного слоя органических многослойных пленок;
2. Поиск условий для получения конденсированной пленки на основе белков цитохрома *c* и лизоцима;

3. Разработка специализированной ячейки для возможности проведения рентгеновских и оптических исследований пленок и кристаллов различных белков. Изучение *in situ* процесса роста кристаллов лизоцима тетрагональной сингонии;

4. Исследование начальных стадий процесса кристаллизации белка лизоцима тетрагональной сингонии в растворах. Выявление закономерностей образования олигомеров в кристаллизационном растворе и их связи со структурой.

Научная новизна:

1. Разработан модифицированный метод на основе метода стоячих рентгеновских волн в условиях многоволнового взаимодействия различных порядков дифракционного отражения от одного семейства атомных плоскостей. Его эффективность была показана на примере изучения тонкой структуры приповерхностного слоя органических многослойных пленок на неорганической подложке;

2. Впервые получены пленки белка цитохрома *c* с липидом тетраолеил кардиолипином, изучена кинетика взаимодействия данного белка с ленгмюровскими липидным монослоями, получены константы связывания белка цитохрома *c* с монослоями бычьего и тетраолеил кардиолипина. Выдвинуто предположение об изменении конформации белка («стратификация») при его адсорбции на границе раздела вода-воздух или при встраивании в монослой кардиолипина на поверхности жидкости: одна половина глобулы белка становится преимущественно гидрофобной, а другая – гидрофильной;

3. Разработана специализированная герметичная кристаллизационная ячейка с замкнутой атмосферой, позволяющая рентгеновскими и оптическими методами в режиме *in situ* исследовать рост белковых кристаллов и других подобных высокомолекулярных соединений. Проведены *in situ* исследования процессов зарождения, роста и деградации кристаллов лизоцима тетрагональной сингонии на различных подложках, в том числе на проводящем подслое оксида индия-олова

(ИТО), что позволяет изучать их структуру в условиях внешних воздействий (электрические поля, акустические волны);

4. Впервые установлена связь между комплексами молекул лизоцима, образующимися в растворе на ранней стадии кристаллизации, и структурой полученного при данных условиях белкового кристалла;

5. Впервые методом молекулярного моделирования из структуры кристалла лизоцима тетрагональной сингонии выделены возможные олигомеры, которые могут являться элементарным строительным блоком соответствующего кристалла, существование которых подтверждено методом малоуглового рассеяния рентгеновских лучей.

Практическая значимость:

Развитая в данной работе модификация метода стоячих рентгеновских волн в условиях многоволнового взаимодействия позволяет исследовать структуру тонких приповерхностных слоев органических многослойных систем.

Полученные пленки цитохром *c*-кардиолипидов можно использовать для изучения процессов, происходящих в митохондриальной мембране (в том числе ранние стадии апоптоза), и создания различных сенсоров на их основе.

Разработанная ячейка позволяет проводить рентгеновские и оптические *in situ* исследования пленок и кристаллов различных белков, в том числе изучать процессы роста и деградации кристаллов, и может быть использована для отработки технологии создания сенсоров на основе белковых структур.

Полученные результаты о взаимосвязи образования олигомеров с началом процесса кристаллизации позволяют предложить новый алгоритм поиска условий кристаллизации путем исследования кристаллизационных растворов и обнаружения в них олигомеров на самых ранних стадиях кристаллизации.

На защиту выносятся следующие основные результаты и положения:

1. Модифицированный метод стоячих рентгеновских волн без регистрации вторичных процессов в условиях многоволнового взаимодействия различных

порядков дифракционного отражения от одного семейства атомных плоскостей для изучения тонкой структуры приповерхностного слоя органических многослойных пленок;

2. Результаты кинетики формирования конденсированной пленки цитохром *c*-кардиолипид на поверхности жидкости в процессе адсорбции белка на липидном ленгмюровском монослое;

3. Результаты исследования *in situ* процессов роста и деградации кристаллов лизоцима тетрагональной сингонии на кристаллической подложке с помощью специализированной кристаллизационной измерительной ячейки;

4. Подход к изучению начальной стадии кристаллизации лизоцима, основанный на анализе структуры белкового кристалла, выделении его возможных элементарных строительных блоков и исследовании растворов в условиях кристаллизации методом малоуглового рассеяния рентгеновских лучей с целью обнаружения этих блоков;

5. Результаты исследования методом малоуглового рассеяния рентгеновских лучей изменения состояния молекул лизоцима в растворе на начальной стадии процесса кристаллизации: определение взаимосвязи между условиями роста и количеством октамеров, образовавшихся в кристаллизационном растворе.

Личный вклад автора:

Все результаты, представленные в работе, получены лично автором или при ее непосредственном участии.

Автором лично изготовлены все изученные образцы – монослои на поверхности жидкости, многослойные пленки, кристаллы белков.

Автором исследованы стадии формирования пленок кардиолипидина на поверхности жидкости, кинетика адсорбции цитохрома *c* на липидном монослое, упругие свойства сформированных белково-липидных пленок. Произведена обработка полученных данных.

Автор принимала участие в разработке кристаллизационной ячейки с замкнутой атмосферой и рентгенопрозрачным окном и использовала ее для роста кристаллов.

Автор принимала участие в проведении молекулярного моделирования различных олигомеров, выделенных из структуры кристалла лизоцима тетрагональной сингонии, а также структуры пленки стеарата свинца. Полученные модели использовались для интерпретации экспериментальных данных малоуглового рассеяния рентгеновских лучей от раствора лизоцима и стоячих рентгеновских волн в условиях многоволнового взаимодействия различных порядков дифракционного отражения от одного семейства атомных плоскостей от пленки стеарата свинца.

Автор непосредственно участвовала в проведении всех описанных в диссертационной работе рентгеновских экспериментах в лабораторных условиях и на источнике синхротронного излучения методами рентгеновской рефлектометрии, стоячих рентгеновских волн, рентгеновской дифрактометрии и малоуглового рассеяния рентгеновских лучей.

Обсуждение результатов и их интерпретация проводились совместно с научным руководителем и соавторами публикаций.

Апробация результатов работы:

Материалы, вошедшие в диссертационную работу, докладывались на молодежных конкурсах научных работ ИК РАН в 2013 и 2015 годах, а также на международных и национальных конференциях:

- XIII Курчатовская молодежная научная школа, Москва, 27-30 октября 2015.
- Седьмой международный научный семинар и пятая международная молодежная научная школа-семинар «Современные методы анализа дифракционных данных и актуальные проблемы рентгеновской оптики», В.Новгород, 24-30 августа 2015.

- Международная летняя школа для молодых ученых «Исследования материалов с высоким разрешением: основы и приложения», Германия, Зеллин 22-28 августа 2015.

- Совещание российских пользователей источников синхротронного и нейтронного излучений Москва, 2-3 июля 2015.

- Совещание по использованию рассеяния нейтронов и синхротронного излучения в конденсированных средах, Санкт-Петербург, Старый Петергоф, 27-31 октября 2014.

- 12th Biennial Conference on High-Resolution X-Ray Diffraction and Imaging (ХТОР 2014), Grenoble & Villard-de-Lans, September 14-19, 2014, P. 166

- VIII международная научная конференция «Кинетика и механизм кристаллизации. Кристаллизация как форма самоорганизации вещества», Иваново, 24-27 июня 2014.

Основные результаты работы отражены в следующих публикациях:

1. *А.Е. Благов, Ю.А. Дьякова, М.В. Ковальчук, В.Г. Кон, М.А. Марченкова, Ю.В. Писаревский, П.А. Просеков. Кристаллография. 2016. Том 61. № 3. С. 1 – 9.*

2. *M.V. Kovalchuk, A.E. Blagov, Yu.A. Dyakova, A.Yu. Gruzinov, M.A. Marchenkova, G.S. Peters, Yu.V. Pisarevskiy, V.I. Timofeev and V.V. Volkov. Crystal Growth & Design. 2016. Doi: 10.1021/acs.cgd.5b01662.*

3. *М.А. Марченкова, В.В. Волков, А.Е. Благов, Ю.А. Дьякова, К.Б. Ильина, Е.Ю. Терещенко, В.И. Тимофеев, Ю.В. Писаревский, М.В. Ковальчук. Кристаллография. 2016. том 61. № 1. С. 14 – 19.*

4. *М.А. Marchenkova, Yu.A. Dyakova, E.Yu. Tereschenko, M.V. Kovalchuk and Yu.A. Vladimirov. Langmuir. 2015. 31 (45). P. 12426.*

5. *М.В. Ковальчук, П.А. Просеков, М.А. Марченкова, А.Е. Благов, Ю.А. Дьякова, Е.Ю. Терещенко, Ю.В. Писаревский, О.А. Кондратьев. Кристаллография. 2014. том 59. № 5. С. 679–684.*

Структура и объем диссертации: Диссертация состоит из введения, 5 глав, выводов и списка цитируемой литературы. Объем диссертации составляет 144 страницы, включая 66 рисунков, 3 таблицы и список литературы из 138 наименований.

В главе 1 обозначена важность и перспективность ГНС за счет сочетания органических и неорганических компонент. Проведен анализ существующих методов создания органической части ГНС – органических тонких пленок и кристаллов белков.

В главе 2 описаны аппаратурно-методические подходы, примененные в работе, для исследования процессов кристаллизации белков, а также кристаллов и планарных структур на их основе на полупроводящих и диэлектрических подложках.

Глава 3 посвящена получению и исследованию пленок на основе белка цитохрома *c* и лизоцима для дальнейшего использования в качестве органической компоненты ГНС.

В главе 4 на примере кристалла лизоцима тетрагональной сингонии получены первые результаты *in situ* исследования стадий зарождения, роста и деградации белкового кристалла на подложках кремния методом высокоразрешающей рентгеновской дифрактометрии.

В главе 5 представлены результаты *in situ* исследования состояния молекул лизоцима на стадии начала процесса кристаллизации методом малоуглового рассеяния рентгеновских лучей.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

Исследования органических пленок на твердых подложках в настоящее время вызывают особый интерес в связи с возможностью их использования в качестве компонентов гибридных систем. Органические молекулы обладают широким спектром свойств, поскольку они выполняют все функции в живых системах, и в то же время современные технологии имеют большие возможности их направленного синтеза. Неорганические материалы в настоящее время широко и успешно применяются в различных областях промышленности, в том числе электронике, акустооптике, а отработанная технология их роста позволяет получать кристаллы с высокой степенью совершенства. Таким образом, гибридные системы, основанные на сочетании органических материалов и классических неорганических подложек, являются перспективными элементами для использования во многих областях науки и промышленности [1–4] для разнообразных устройств нового поколения.

В последнее годы наблюдается огромный прогресс в получении тонких органических пленок, обладающих различными оптическими и электрическими свойствами. Такие пленки успешно используются как компоненты в электронных устройствах, сенсорах, дисплеях, а также в качестве логических элементов. Например, OLED структуры вместе с неорганическими светодиодами используют для создания твердотельных источников света, при этом сочетание органо-неорганических структур позволяет объединить свойства как органических, так и неорганических материалов, такие как большой коэффициент люминесценции органических структур, так и высокую плотность носителей, подвижность носителей, устойчивые химические свойства, а также механическую стойкость неорганических [5–8]. Различные комбинации неорганических полупроводников и органических проводящих полимеров или донорно-акцепторных структур (например, порфирина-фуллереновые диады) могут являться кандидатами для конструирования гибридных органо-неорганических фотовольтаических

элементов [9]. Создаются различные перспективные для хранения энергии ГНС [10]. Так же в настоящее время широко разрабатываются различные биологические и химические сенсоры на основе органо-неорганических ГНС. Одними из перспективных ГНС являются неорганические наночастицы (квантовые точки), связанные с органическим лигандом, которые также являются перспективными материалами для флуоресцентной микроскопии, в качестве компонентов систем обработки и хранения информации, оптоэлектроники, светотехники и солнечных батарей [11,12]. Интересными и многообразными оказались физические и химические свойства углеродных нанотрубок, в полость которых введены различные атомы или молекулы, так называемых пиподов (от англ. «peapods» – горошины в стручках), а также их потенциал как перспективных материалов для микро- и наноэлектроники (нанодиодов, транзисторов, элементов памяти, логических систем и т.д.) и для эффективного аккумулирования водорода [13]. Органо-неорганические гибридные наноматериалы применяются в медицине при создании нанороботов, в качестве агентов для целенаправленной доставки лекарственных средств [14]. Крайне перспективными для разработки ГНС являются белковые молекулы прежде всего из-за широкого круга функциональных свойств.

1.1. Методы получения органических пленок

Для получения мономолекулярных пленок, в которых молекулы используются в качестве элементарных строительных блоков для разработки самоорганизующихся слоев определенной геометрии и функции, развито большое количество методов: центрифугирование, литье, метод Ленгмюра-Блоджетт, самосборка. Каждый метод имеет свои преимущества и недостатки и выбирается исходя из практического применения и желаемых характеристик пленок (толщина, однородность, площадь покрытия и др.).

1.1.1. Центрифугирование (*spin-coating*)

Метод центрифугирования (*spin-coating*) для получения тонких пленок применяется уже в течении нескольких десятилетий. Способ получения заключается в нанесении небольшого количества вещества (в жидком виде) на центр подложки и последующем вращении подложки с высокой скоростью (около 3000-5000 об/мин). За счет центробежного ускорения вещество распространяется по подложке, оставляя тонкую пленку материала на поверхности (рис. 1.1.). Толщина пленки и другие свойства будут зависеть от материала и свойств нанесенного вещества (вязкость, скорость сушки, процент твердого вещества, поверхностное натяжение и т.д.), а также параметров, выбранных для процесса центрифугирования. На свойства получаемых пленок оказывают влияние такие факторы, как конечная скорость вращения, ускорение и испарение. Одним из наиболее важных факторов метода центрифугирования является повторяемость, так как даже незначительные изменения параметров, которые определяют процесс формирования, могут привести к резкому изменению свойств полученной пленки.

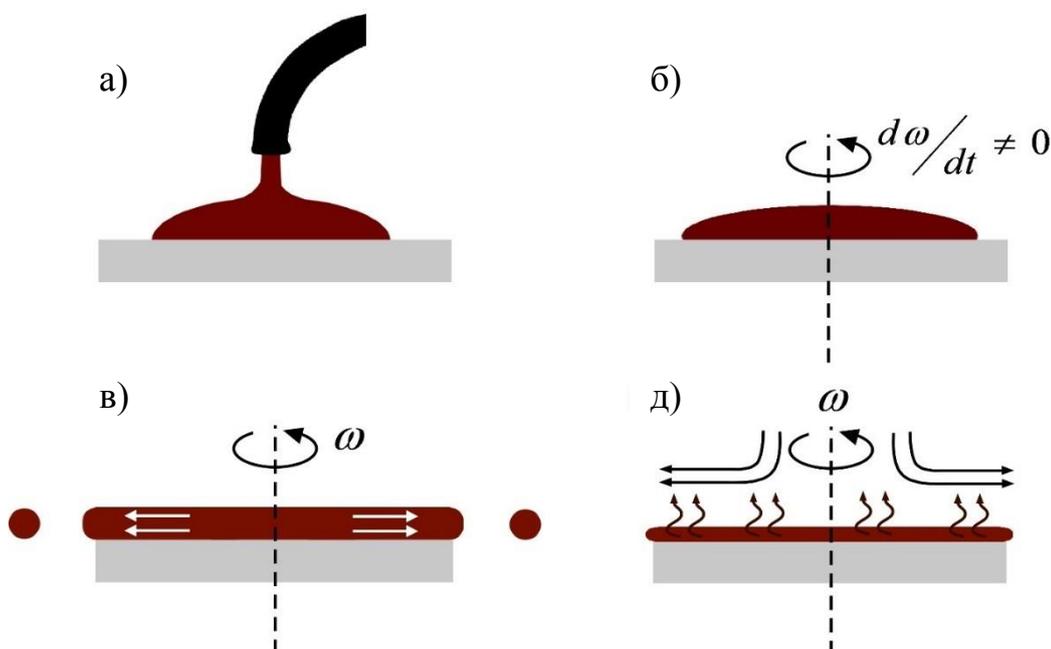


Рис. 1.1. Различные этапы метода центрифугирования. а) нанесение вещества; б) раскручивание подложки с ускорением; в) вращение подложки с постоянной скоростью, распределение вещества по подложке; г) испарение растворителя. [15]

С помощью данного метода можно получать достаточно однородные пленки, заданной толщины (менее 10 нм), однако при этом требуется большой расход вещества, пленки получаются достаточно малой площади, быстро высыхают (что уменьшает время для упорядочения молекул). Также к недостаткам метода следует отнести требование к строго горизонтальной поверхности подложки.

1.1.2. Методы «литья»: испарение растворителя (*solvent evaporation*), «ножевой» метод (*doctor blade*), метод подачи раствора (*solution casting method*), метод прямой адсорбции (*solvent casting method*)

Хотя еще в 1933 г. Хикки и др. получили микрокапсулы с использованием метода испарения растворителя (*solvent evaporation*) (рис. 1.2), полностью метод был разработан в 1979 г. [16,17]. Данный метод основан на нанесении капли растворенного вещества на планарную подложку и постепенном испарении растворителя.

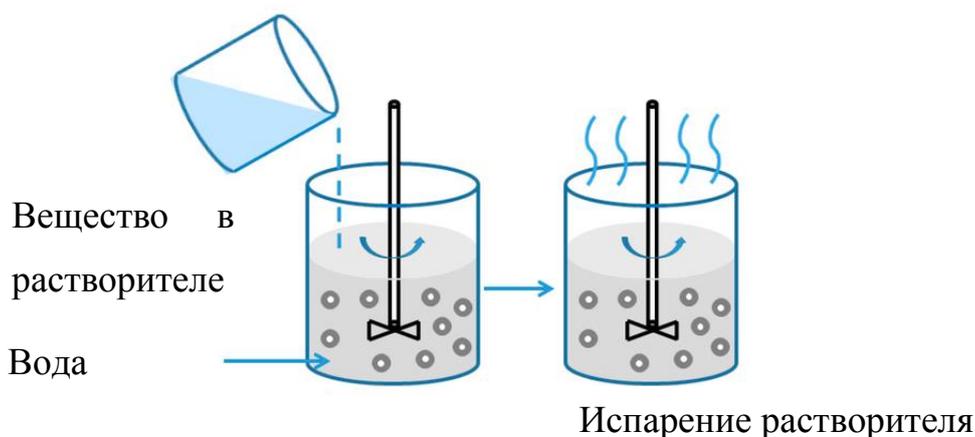


Рис. 1.2. Принципиальная схема получения тонких пленок методом испарения растворителя. [18]

К достоинствам данного метода можно отнести его простоту и малый расход материала. К недостаткам – ограничение площади получаемой пленки, трудности контроля толщины и, как следствие, неоднородность пленки.

Одним из перспективных методов получения органических тонких пленок заданной толщины является «ножевой» метод (*doctor blade*) (рис. 1.3). Раствор вещества наливается перед лезвием, установленном над подложкой под

определенным углом. Затем раствор пропускают между движущимся/стационарным ножом и движущейся/стационарной подложкой, при этом формируется органическая пленка.

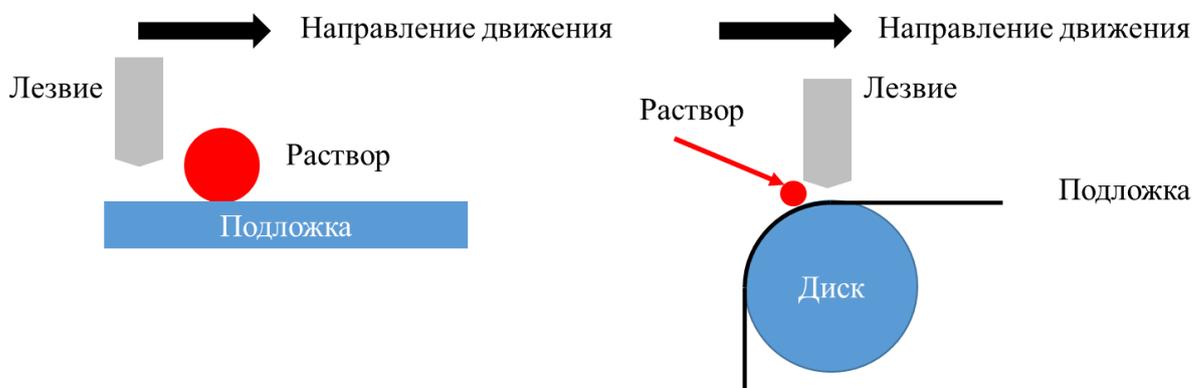


Рис. 1.3. Принципиальная схема получения тонких пленок ножевым методом. [19]

Преимуществами данного метода являются большая площадь и однородность получаемой пленки, малый расход вещества. К недостаткам данного метода можно отнести точность позиционирования ножа относительно подложки (~мкм), в следствии чего толщина пленки составляет более 150-200 нм.

Метод подачи раствора (*solution casting method*) представляет собой модификацию «ножевого», в котором острое лезвие заменено на специальное отверстие, через которое осуществляется подача раствора (рис. 1.4). Благодаря такому способу подачи можно получать упорядоченные тонкие пленки.

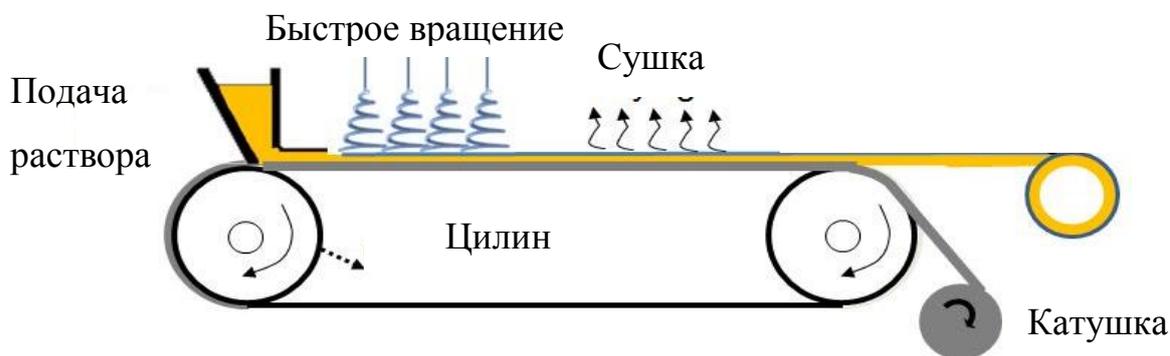


Рис. 1.4. Принципиальная схема получения тонких пленок методом подачи раствора. [20]

Метод прямой адсорбции (*solvent casting method*) также представляет модификацию «ножевого» метода. Лезвие ножа в данном методе находится в фиксированном положении, а подложка с раствором перемещается горизонтально, перпендикулярно лезвию (рис. 1.5). При этом распределенное вещество сразу подсушивают, что дает возможность получать структурированные пленки (в зависимости от скорости испарения растворителя).

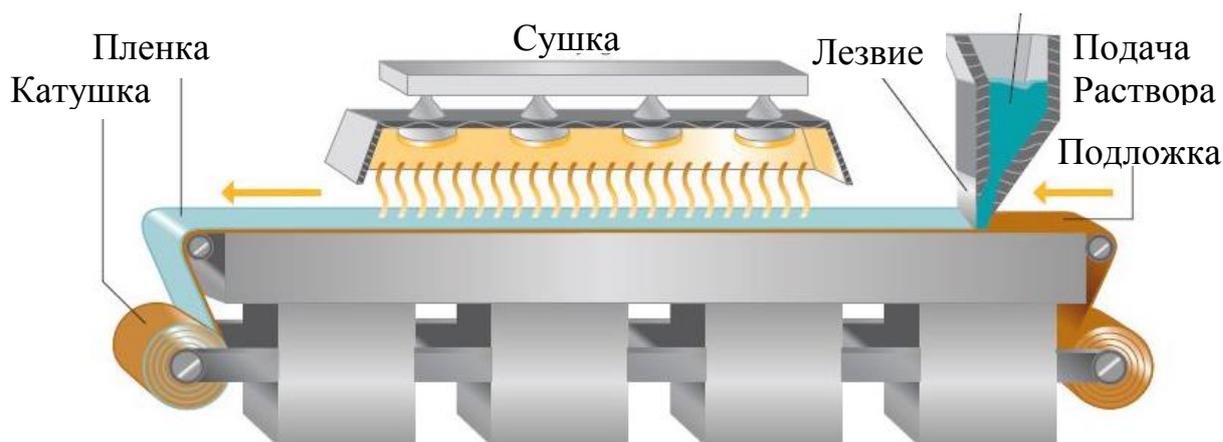


Рис. 1.5. Принципиальная схема получения тонких пленок методом прямой адсорбции. [21]

1.1.3. Метод погружения (*dip coating*)

Нанесение покрытий методом погружения осуществляется погружением подложки (с постоянной скоростью) и ее вытягиванием (так же с постоянной скоростью) из раствора с веществом, при этом избыток жидкости стекает с подложки, а оставшийся растворитель испаряется (рис. 1.6). Скорость движения подложки определяет толщину пленки: чем выше скорость, тем более толстый слой можно получить.

К преимуществам данного метода можно отнести возможность получения очень тонких пленок (вплоть до мономолекулярного, 2 нм [23]), их хорошую однородность и большую площадь покрытия. Недостатки в большом расходе вещества, большом времени получения пленок и получении пленок с двух сторон подложки.

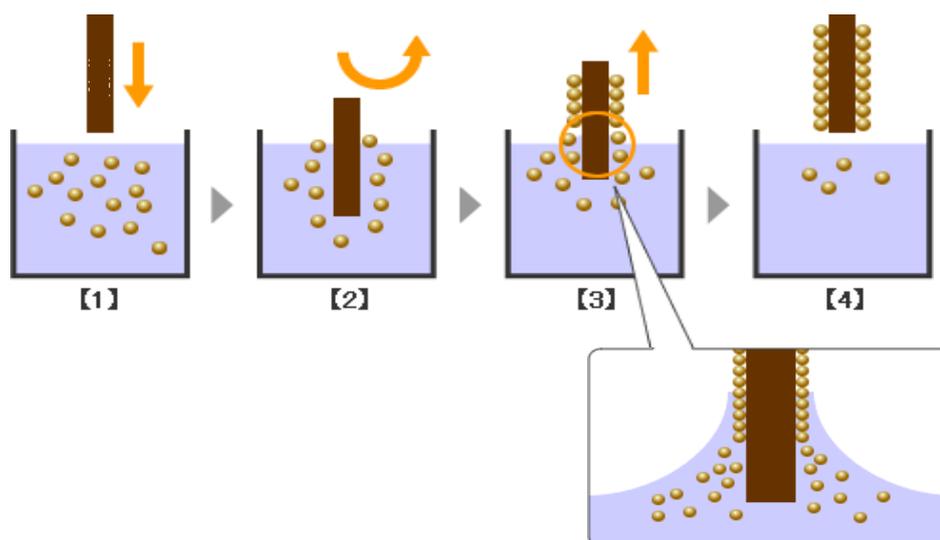


Рис. 1.6. Принципиальная схема получения тонких пленок методом погружения. [22]

1.1.4. Метод Ленгмюра-Блоджетт

Метод Ленгмюра-Блоджетт позволяет получать многослойные органические тонкие пленки заданного состава, структуры и толщины. При этом можно получать пленки с большой площадью однородности.

Метод формирования моно- и мультимолекулярных плёнок был разработан Ирвингом Ленгмюром и его ученицей Катариной Блоджетт в 1930-х годах [24]. Основная идея метода заключается в формировании на водной поверхности мономолекулярного слоя амфифильного вещества и последующем его переносе на твёрдую подложку.

Термодинамику монослоя поверхностно-активных молекул обычно изучают с помощью ленгмюровской ванны (рис. 1.7), основными элементами которой являются подвижный барьер, изменяющий площадь водной поверхности, занятую веществом, и весы для определения поверхностного натяжения (двумерный аналог давления) [25].

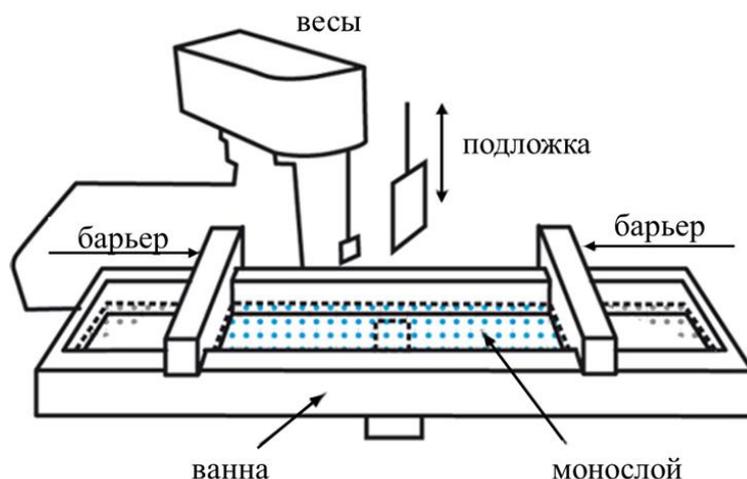


Рис. 1.7. Принципиальная схема эксперимента по формированию монослоя на поверхности субфазы.

Поверхностное давление (π), т. е. сила, нормированная на единицу длины барьера, определяется формулой:

$$\pi = \gamma_0 - \gamma, \quad (1.1)$$

где γ_0 – поверхностное натяжение субфазы в отсутствии монослоя и γ – поверхностное натяжение субфазы с монослоем. Для непосредственного измерения поверхностного натяжения используются весы Вильгельми [26].

Силы, действующие на пластинку Вильгельми (рис. 1.8), зависят от адгезии, парциального давления газа, плотности жидкости и др.

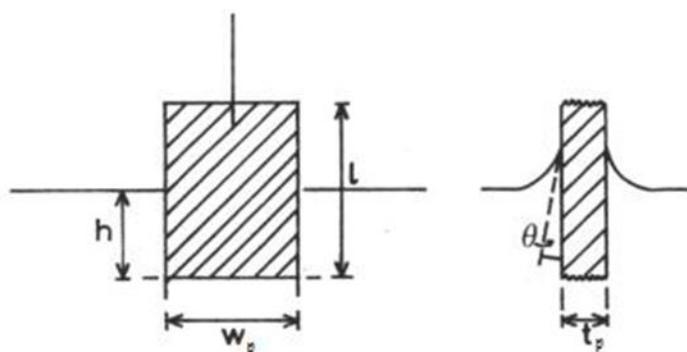


Рис. 1.8. Пластинка Вильгельми, частично погруженная в воду.

Здесь: w , l , – ширина и длина пластинки Вильгельми соответственно; h – глубина погружения в воду. Считаем, что t – толщина пластинки.

Результирующая сила, действующая на пластинку Вильгельми, состоит из трех составляющих:

$$F = \rho g l w t - \rho' g h w t + 2\gamma(t + w)\cos\theta \quad (1.2)$$

где ρ – плотность материала пластинки, ρ' – плотность субфазы, γ – поверхностное натяжение субфазы, поверхность которой покрыта монослоем, θ – контактный угол смачивания, g – ускорение свободного падения. Первое слагаемое – вес, второе – сила Архимеда, третье – поверхностное натяжение; Материал пластинки Вильгельми выбирается таким образом, чтобы $\theta = 0$.

Поверхностное давление – разность между силой, действующей на пластинку, погруженную в чистую воду, и силой, действующей на пластинку, погруженную в воду, поверхность которой покрыта монослоем:

$$\Delta F = 2(\gamma_0 - \gamma)(t + w) \quad (1.3)$$

Для пластинки Вильгельми характерно $w \gg t$. Тогда поверхностное давление:

$$\pi = \Delta F / 2w = \Delta m g / 2w \text{ (Н/м)} \quad (1.4)$$

где m – измеряемая весами Вильгельми величина [25,26].

Приготовление ленгмюровских пленок начинается с формирования монослоев поверхностно активных веществ (ПАВ) на межфазной границе жидкость/воздух. Для этого используют ленгмюровские ванны, которые заполняют водой и раствором солей (субфазой).

На поверхность субфазы наносят ПАВ (липиды, жирные кислоты, белки, амфифильные полимеры и др) в органическом испаряющемся растворителе (напр. хлороформе). На межфазной границе молекулы ориентируются так, что их полярные части оказываются погружены в жидкость, а гидрофобные фрагменты (углеводородные «хвосты») обращены к воздуху. Концентрация раствора рассчитывается таким образом, чтобы молекулы исследуемого вещества практически не взаимодействовали друг с другом [25,26].

Формирование конденсированного монослоя осуществляется с помощью подвижных барьеров, которые ограничивают рабочую площадь ленгмюровской ванны. С их помощью можно регулировать поверхностное давление путём изменения площади, покрытой ПАВ.

Для характеристики структуры монослоя строят изотерму сжатия (π -А изотерму) (рис. 1.9) – зависимость площади, приходящейся на одну молекулу, от поверхностного давления (измеряется изменяющаяся площадь рабочей поверхности ленгмюровской ванны и с помощью весов Вильгельми измеряется соответствующее поверхностное давление). Такая изотерма содержит информацию как об универсальных эффектах межмолекулярного взаимодействия в монослое, так и о специфике поведения сложной амфифильной молекулы при изменении поверхностного давления (ее переориентации, конформационных перестройках и т. д.).

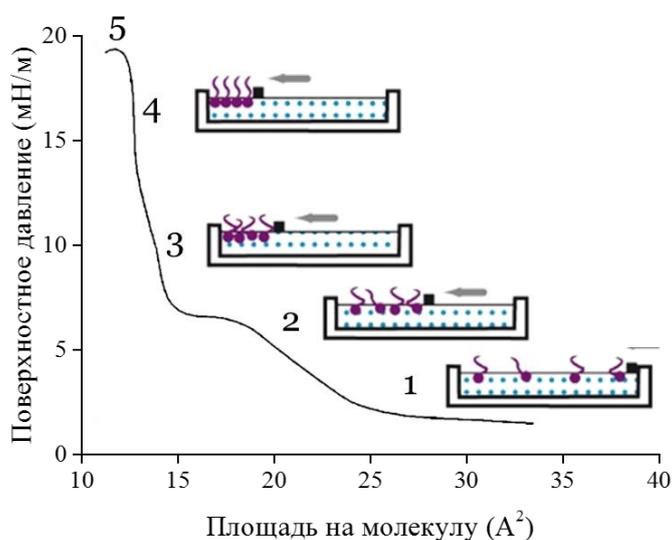


Рис. 1.9. π -А изотерма (слева) и ориентация молекул ПАВ, соответствующая различным двумерным фазам (справа).

При последовательном изотермическом сжатии изменяется структура мономолекулярной пленки, которая проходит через ряд двумерных состояний:

– фаза двумерного газа, когда амфифильные молекулы не взаимодействуют друг с другом;

– фаза жидкости, для которой характерны большие расстояния между «головками» молекул, в силу чего углеводородные «хвосты» молекул имеют беспорядочное расположение (*участок 1 на рис. 1.9*);

– изотропно-жидкая фаза (растянутая жидкость) – взаимодействие между молекулами сильное, но их ориентационная упорядоченность практически отсутствует (*участок 2 на рис. 1.9*);

– анизотропно-жидкая (жидкокристаллическая) фаза, при которой расстояния между молекулами таковы, что происходит взаимодействие «хвостов», приводящие к их упорядоченной ориентации. В среднем «хвосты» ориентированы вдоль нормали к поверхности, но сохраняют подвижность (*участок 3 на рис. 1.9*);

– двумерно-кристаллическая фаза, когда углеводородные «хвосты» теряют гибкость, их конфигурации становятся строго фиксированными, а положения атомов в соседних молекулах коррелированы (*участок 4 на рис. 1.9*);

– коллапс, когда упорядочивание разрушается из-за «наползания» молекул друг на друга вследствие высокого поверхностного давления (*участок 5 на рис. 1.9*).

Таким образом, зная фазовую диаграмму пленки, можно управлять её структурой и связанными с ней физико-химическими свойствами.

Для переноса сформированного монослоя подложка вертикально погружается в воду через монослой и затем поднимается (ЛБ, вертикальный «лифт») или горизонтально касается поверхности (ЛШ, горизонтальный «лифт») [25,26].

Последовательным переносом монослоев можно приготовить многослойную наноразмерную пленку из мономолекулярных (по толщине) слоев, причем в зависимости от способа переноса и типа подложки (гидрофильной или гидрофобной), формируются структуры с различной укладкой молекул в смежных слоях, так называемые X-, Y-, Z-структуры (*рис. 1.9*) [25,26].

При переносе пленок методом ЛБ поверхность подложки, на которую нужно перенести пленку, ориентируют вертикально. Ориентация же молекул на подложке

зависит от того, опускают ли подложку сквозь монослой в воду или, наоборот, поднимают из воды в воздух, а также от типа подложки (рис. 1.10).

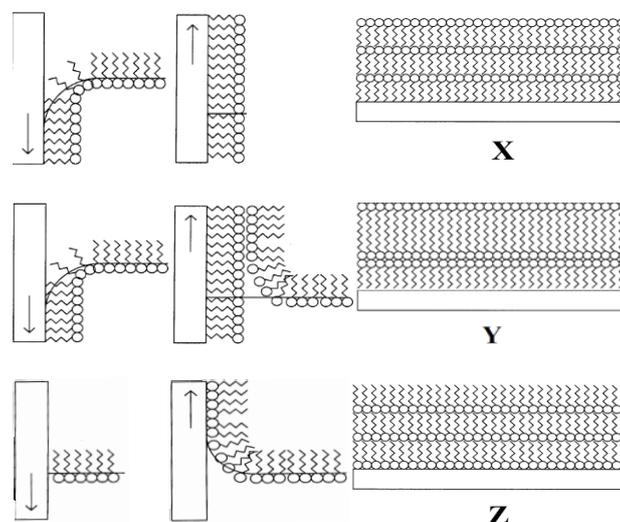


Рис. 1.10. Перенос монослоя на твердую подложку вертикальным и горизонтальным лифтом и типы (X, Y, Z) формируемых слоистых структур.

Повторяя перенос одного монослоя за другим в различных условиях, можно получать многослойные пленки трех разных типов (X, Y, Z), которые отличаются друг от друга своей симметрией. Например, в мультислоях X- и Z-типов отсутствует центр отражения – инверсии, и они обладают полярной осью, направленной от подложки или к подложке, в зависимости от ориентации разнесенных в пространстве положительного и отрицательного электрических зарядов, то есть в зависимости от направления электрического дипольного момента молекулы. Мультислой же Y-типа составлены из двойных слоев, или, как говорят, бислоев (они построены аналогично биологическим мембранам), и оказываются центрально-симметричными. При получении Y структуры автоматически выполняется условие гидрофильности или гидрофобности подложки для каждого последующего переносимого монослоя, поэтому технологически мультислой Y-типа получать легче всего [25].

Переход молекулы на твердую подложку термодинамически выгоден, но требует преодоления потенциального барьера и соответственно затраты времени. Именно поэтому процесс ЛБ не удается проводить с очень высокими скоростями.

Критерием степени покрытия подложки монослоем, является коэффициент переноса k , который определяется по формуле:

$$k = \frac{(S' - S'')}{S_n}, \quad (1.5)$$

где S' , S'' - площадь монослоя в момент начала переноса и после окончания переноса соответственно, S_n - площадь подложки.

Достоинствами данного метода безусловно являются контроль толщины получаемых пленок, возможность получать мономолекулярные и многослойные пленки определенного состава каждого монослоя, большая площадь однородности, а также возможность получения пленок на различных подложках. К недостаткам можно отнести непростую реализацию метода и использование в качестве переносимого вещества амфифильных молекул.

1.1.5. Самосборка (*self assembly*)

Самосборка представляет собой процесс, в котором неупорядоченная система уже существующих компонентов, отдельных либо связанных между собой, образует организованную структуру, как следствие конкретных, локальных взаимодействий между самими компонентами, без внешнего воздействия (*рис. 1.11*). Если компоненты представляют собой молекулы, процесс носит название молекулярной самосборки.

Самосборка может быть классифицирована как статическая или динамическая. При статической самосборке, упорядоченная структура как система приближается к равновесию, уменьшая свою свободную энергию. Процесс динамической самосборки, когда система уже существующих компонентов организована за счет конкретных взаимодействий, обычно носит название не «самосборка», а «самоорганизация».

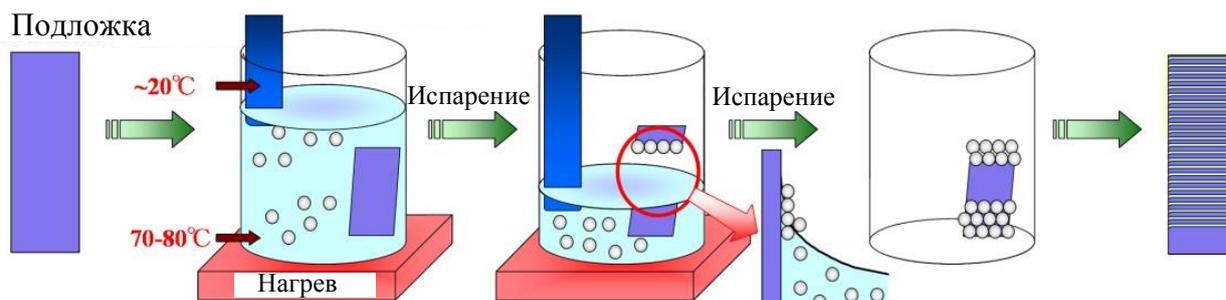


Рис. 1.11. Принципиальная схема получения тонких пленок методом самосборки. [27]

Самоорганизация может происходить с компонентами, имеющими размеры от молекулярного до макроскопического, при соблюдении соответствующих условий. Хотя большая часть работ выполнена на молекулярных компонентах, многие из интересных применений (таких как создание самособирающихся структур) были получены на частицах больших размеров (от нанометров до микрометров).

1.1.6. Послойная сборка (layer-by-layer self assembly)

Послойная сборка – технология изготовления тонких пленок путем нанесения чередующихся слоев противоположно заряженных материалов и промывкой между ними (рис. 1.12). Такое осаждение можно организовать с использованием различных методов: погружения, центрифугирования, спрея и др.

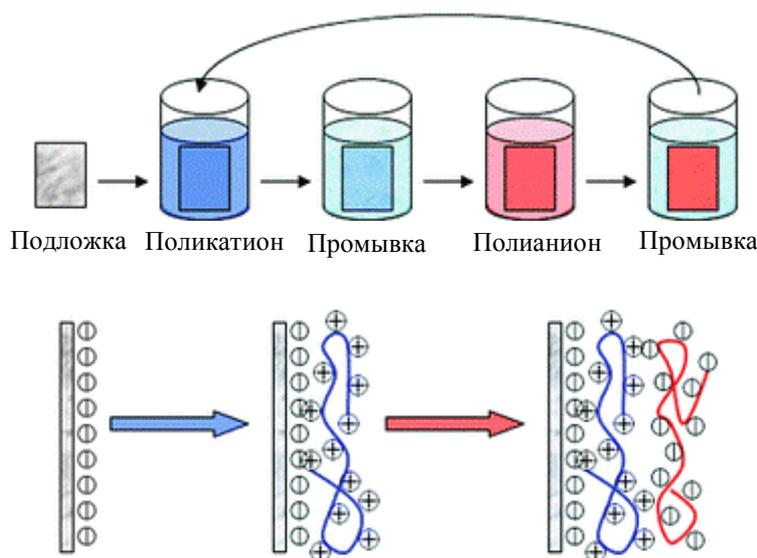


Рис. 1.12. Принципиальная схема получения тонких пленок методом послойной сборки. [28]

С помощью данной технологии можно получать тонкие пленки (5-1000 нм) необходимой толщины (с точностью до 1 нм) и состава из большого количества разнообразных систем, причем сборка может проводиться на любой заряженной поверхности. Несомненным достоинством метода является простота технологии: процесс можно проводить при комнатной температуре, на воздухе, на различных типах, формах и размерах подложек. Однако упорядочение молекул в полученных пленках ниже, чем получаемое с помощью методов ЛБ или самосборки.

1.2. Методы получения белковых кристаллов

Общим принципом кристаллизации макромолекул из растворов является снижение их растворимости до достижения пересыщения за счет варьирования таких параметров как рН, температура, концентрация осадителей и пр. Однако особые свойства макромолекул (конформационная гибкость, наличие нескольких минимумов растворимости, склонность к агрегации и денатурации) существенно затрудняют, а иногда делают невозможной их кристаллизацию. Таким образом, процесс кристаллизации представляет собой сложную самостоятельную задачу, а кристаллизация до сих пор в большей степени является эмпирической и наименее прогнозируемой стадией структурного исследования [29].

Наиболее простыми и распространенными методами кристаллизации являются: диффузия в парах, встречная диффузия, диализ и кристаллизация в объеме. Рассмотрим каждый метод подробнее [29,30], используя схему фазовой диаграммы (рис. 1.13).

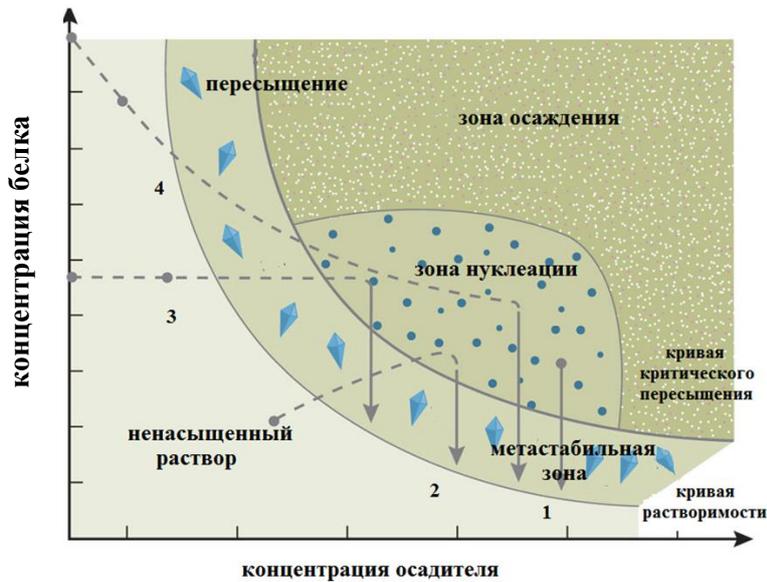


Рис. 1.13. Схема фазовой диаграммы с учетом различных методов кристаллизации, 1-кристаллизация в объеме, 2-диффузия в парах, 3-диализ, 4-встречная диффузия.

1.2.1. Кристаллизация в объеме

Кристаллизация в объеме является наиболее старым методом кристаллизации. Метод осуществляется простым смешиванием растворов белка и осадителя рис. 1.14. Раствор быстро переходит в пересыщенное состояние рис. 1.13 кривая 1. Затем происходит нуклеация. Образовавшиеся зародыши удаляют центрифугированием. Раствор переходит в метастабильную область, где и происходит дальнейший рост кристаллов.

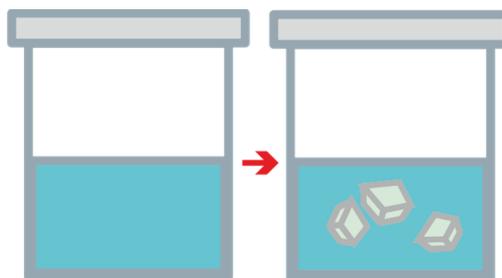


Рис. 1.14. Схема эксперимента по кристаллизации белков методом кристаллизации в объеме.

1.2.2. Диффузия в парах

Наиболее простым методом выращивания белковых кристаллов является диффузия в парах растворителя. Суть метода состоит в медленном испарении

растворителя из кристаллизационного раствора и в последующем увеличении концентрации белка и осадителя до достижения пересыщенного состояния. Для реализации данного метода необходимо разделить капли с кристаллизационным раствором, содержащим меньшее количество осадителя и раствором чистого осадителя *рис. 1.15*. Из-за разницы концентраций будет происходить процесс диффузии паров растворителя до достижения равновесия двух растворов. Постепенно раствор перейдет в насыщенное состояние *рис. 1.15 кривая 2*. В процессе нуклеации и образования кристаллов, происходит переход в метастабильную зону, где и продолжается дальнейший рост кристаллов.

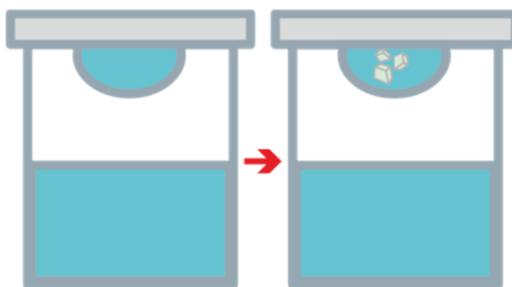


Рис. 1.15. Схема эксперимента по кристаллизации белков методом диффузии в парах.

Этот метод является очень удобным, особенно для проведения первичного скрининга условий кристаллизации. Существует несколько вариаций этого метода: сидячая и висячая капля, сэндвич. Метод диффузии паров в варианте сидячей капли удобен при выращивании кристаллов на различных подложках, где важным является их поверхность.

1.2.3. Встречная диффузия

Раствор белка и осадителя последовательно помещают один под другой в капилляр *рис. 1.16а*. В начальный момент раствор белка находится в ненасыщенном состоянии *рис. 1.13 кривая 4*. Затем в результате встречной диффузии белка и осадителя через границу раздела происходит переход раствора в насыщенное состояние. Вдоль капилляра образуется градиент концентраций. В процессе нуклеации и роста происходит постепенное уменьшение концентрации

белка. Раствор переходит в метастабильное состояние, где происходит только рост кристаллов.

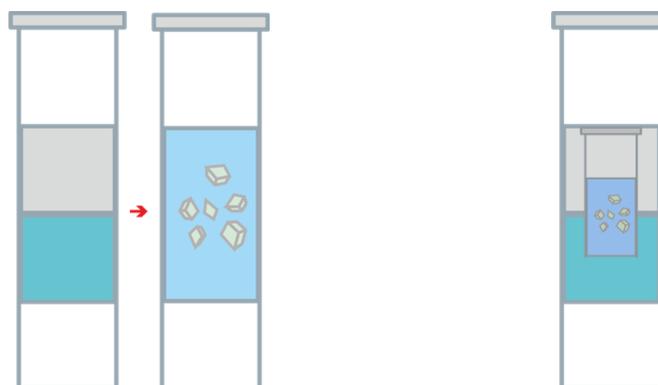


Рис. 1.16. Схема эксперимента по кристаллизации белков методами а) встречной диффузии и б) диализа.

1.2.4. Диализ

Для кристаллизации методом диализа используют полупроницаемую мембрану, которая препятствует прохождению молекул белка и может пропускать только молекулы растворителя. Раствор белка помещают в мембрану, представляющую из себя мешок, и опускают в кристаллизационный раствор *рис. 1.16б*. Меняя состав кристаллизационного раствора, можно добиться перехода раствора белка в пересыщенное состояние, где происходит нуклеация и рост кристаллов. Этот метод удобен тем, что в процессе эксперимента можно растворять кристаллы, изменяя состав раствора с внешней стороны мембраны, что позволяет проводить кристаллизацию несколько раз.

1.3. Исследования процесса получения пленок цитохрома и его взаимодействия с липидными монослоями

Цитохромами (Цит) называются железосодержащие белки. Они принадлежат к классу гемопротеинов, молекулы которых содержат железо, входящее в состав порфириновой группы, или гем. В 1925 г было установлено, что функция этих соединений связана с окислением. Существует три класса Цит: а, b и с.

Цитохром *c* (ЦитС) – водорастворимый белок небольших размеров (молекулярная масса около 12 кДА), состоящий из белковой части и гемма *c*. Гем ковалентно связан с апобелком (через SH-группы с Cys-14 и Cys-17). Это отличает Цит типа *c* от Цит *a*- и *b*- типов, где гемы связаны нековалентно.

ЦитС – белок с двойной функцией в клетке. С одной стороны, он является одноэлектронным переносчиком, свободно связанным с внутренней мембраной митохондрий, и необходимым компонентом дыхательной цепи. С другой стороны, при определенных условиях он может отсоединяться от мембраны и плавать в межмембранном пространстве. Будучи связанным с фосфолипидами, содержащимися в *митохондриальной мембране*, прежде всего, с *кардиолипином (КЛ)*, ЦитС осуществляет запуск апоптоза (программируемой гибели клетки) путем катализа *перекисного окисления липидов* во внутренней митохондриальной мембране. Одним из подтверждений данной точки зрения является тот экспериментальный факт, что микроинъекция ЦитС в клетки разных типов вызывает апоптоз. Апоптоз занимает центральное место в таких фундаментальных биологических процессах, как рост, пролиферация, дифференциация, смерть, воспаления и иммунитет.

Выход ЦитС из митохондрий может происходить в результате нескольких процессов [31]. Один из них связан с увеличением объема (набуханием) матрикса митохондрий и разрывом наружной мембраны под действием давления со стороны внутренней мембраны, площадь которой значительно больше, чем площадь мембраны наружной. Но более частая причина – перекисное окисление липидов, которое также приводит к набуханию матрикса и разрыву наружной мембраны митохондрий [32,33].

В дальнейшем в работах [34,35] было показано, что непосредственным участником процесса выхода ЦитС из митохондрии является КЛ – фосфолипид (ФЛ), входящий в состав внутренней мембраны митохондрий, количество ЦитС в цитозоле увеличивается с уменьшением содержания кардиолипина в мембране

митохондрии. Так же интерес представляет появление пероксидазной активности у мембраносвязанного ЦитС и возрастание этой активности в 5 раз при увеличении содержания в мембране кардиолипина, при этом связанный с кардиолипином ЦитС может окислять как сам КЛ, так и другие липиды во внутренней мембране митохондрии, в результате чего происходит формирование проводящих каналов во внешней мембране и выход ЦитС в цитозоль.

Таким образом, центральное место в апоптозе по митохондриальному пути занимает выход ЦитС из митохондрии в цитозоль, а наиболее вероятным процессом, приводящим к этому – взаимодействие ЦитС с КЛ.

Кардиолипин – фосфолипид, получил свое название, поскольку был впервые выделен в 1942 году из говяжьего сердца. Он входит в состав в основном внутренней мембраны митохондрий эукариотических клеток, в составе клеточных мембран не обнаружен. КЛ обладает интересной и необычной структурой, представляя собой двойной фосфолипид (дифосфатидилглицерол), состоящий из фосфатидилглицерина и фосфатидной кислоты. Имеет четыре хвоста ненасыщенных жирных кислот и два остатка ортофосфорной кислоты.

Одним из вариантов взаимодействия ЦитС с КЛ является образование мембранно-связанного ЦитС (МС ЦитС), т.е. комплекса, состоящего из молекулы ЦитС и прилегающего участка липидного бислоя мембраны. Гипотеза о структуре такого комплекса была впервые предложена Брауном и сотрудниками в 1977 году [36].

Квинн и Доусон исследовали взаимодействие монослоев фосфатидилэтанламина (ФДЭА) с растворенным в водной субфазе [^{14}C]карбоксиметилированным ЦитС [37]. При этом были проведены измерения поверхностной радиоактивности, поверхностного давления и потенциала. Было обнаружено, что при небольшой величине поверхностного давления (ниже 24 мНм^{-1}) и фиксированной величине площади плёнки происходил быстрый рост давления и поверхностного потенциала (в течение 20 мин), сопровождавшийся

более медленным ростом радиоактивности в плёнке (в течение 120 мин) (*рис. 1* в работе [38]).

Рост давления, как и рост радиоактивности, линейно зависел от количества цитохрома, введенного в субфазу, до наступления насыщения ((*рис. 2* в той же работе)).

По мере увеличения исходного давления в плёнке прирост давления в результате связывания ЦитС линейно снижался и становился равным нулю при 24 мНм^{-1} (*рис. 3*). Параллельно этому уменьшался поверхностный потенциал.

Обычный и карбоксиметилированный ЦитС мало различались по этим показателям (*рис. 4*). Связанный с монослоем ЦитС не выходил из монослоя при удалении белка из субфазы.

Весьма интересны данные о динамике давления пленки при скачкообразных изменениях внешнего давления за счет варьирования площади (*рис. 6* в работе [38]). При низком исходном давлении (2 мНм^{-1}) ЦитС встраивается в липидный монослой и поверхностное давление в пленке растет до некоего предела. При резком сжатии пленки, так что давление скачкообразно повышается до 40 мНм^{-1} , давление снижается, указывая на выход ЦитС из пленки. При обратном снижении давления до 2 мНм^{-1} (за счет расширения площади плёнки) картина повторяется: ЦитС начинает снова встраиваться, и давление растет (*рис. 6*).

Было показано также, что значительную роль во взаимодействии пленки и ЦитС играют электростатические силы, поскольку скорость встраивания снижалась при увеличении ионной силы раствора в субфазе, а скорость выхода ЦитС из плёнки при этом увеличивалась. По этой же причине все показатели связывания ЦитС с монослоем определенным образом изменялись с изменением рН в субфазе (*рис. 11-13*).

В следующей работе Квинн и сотрудники продолжили эти исследования, расширив круг изученных ФЛ: наряду с электронейтральным фосфатидилхолином (ФХ) изучались отрицательно заряженные (анионные) фосфолипиды: фосфатидная

кислота (ФК) и КЛ [37]. Использовались два показателя взаимодействия ЦитС с монослоем: *адсорбция* (увеличение радиоактивности для меченного ЦитС) и *встраивание* (penetration) – увеличение давления в пленке после введения цитохрома в субфазу (В случае ФХ скорость встраивания существенно увеличивалась при увеличении давления в плёнке с 2 до 8 мНм⁻¹ (рис. 1 в [37])). КЛ встраивался гораздо быстрее, и конечный прирост давления был заметно выше, чем для ФХ.

Для всех ФЛ сохранялась отрицательная линейная зависимость между величиной начального давления и Δp и ΔV (рис. 2 и 3 в [37]), при этом адсорбция белка (точнее – связывание с пленкой) от начального давления не зависела в случае ФК (рис. 3) и даже увеличивалась (примерно в полтора раза) в случае КЛ (рис. 5 в [37]).

В случае высокого начального давления в монослое КЛ (30 мН/м) дальнейшего роста давления не происходит, хотя наблюдается накопление меченного белка в пленке; это говорит о связывании ЦитС с липидной плёнкой без встраивания участков белковой молекулы в эту плёнку (рис. 6).

Другие измеряемые параметры, в том числе влияние рН и ионной силы были теми же, что и в предыдущей работе с дипальмитоилфосфатидилхолином (ДПФХ) [38].

Примерно те же подходы были использованы Квинном и сотрудниками при изучении взаимодействия ЦитС, бычьего сывороточного альбумина и др. при низком поверхностном давлении (2 мНм⁻¹) монослоев стеариновой кислоты (СК), ФХ и фосфатидилэтаноламина (ФЭА) [39].

В работе Разумаса и сотрудников исследовались свойства монослоев белков, в том числе ЦитС, на границе раздела 150 мМ NaCl раствор/воздух, используя тефлоновую лэнгмюровскую ванну, давление при этом измерялось методом Вильгельми с помощью очищенной платиновой пластики, погруженной в ванну. После введения геминхлорида и гемовых белков ЦитС (2), микропероксидазы-8 (3)

и микропероксидазы-11 (4) наблюдался рост поверхностного давления, свидетельствующий об образовании белковой пленки на поверхности воды (рис. 1 в работе [40]).

В работе [41] показано формирование монослоя ЦитС. При низком давлении молекулы ЦитС остаются на границе раздела вода-воздух, тогда как при высоком давлении части ЦитС повторно растворяется в субфазе.

Монослои СК, дипальмитоилфосфатидной кислоты (ДПФК), ДПФХ, яичного ФХ, образованные на границе раздела вода/воздух, сильно нарушаются при введении ЦитС в субфазу. Эти изменения в основном происходят из-за адсорбции и проникновения ЦитС на границе вода/воздух, которым способствует электростатическое взаимодействие между ЦитС и анионным ПАВ [41].

В работе [42] исследовали взаимодействие рибонуклеазы и ЦитС с димиристоилфосфатидной кислотой, димиристоилфосфатидилэтанол аимном, димиристоилфосфатидилхолином, ДПФХ, РОРС, DPPE, POPE и DPPA. Было показано, что рибонуклеаза и ЦитС, водорастворимые и положительно заряженные белки, притягиваются к противоположно заряженным ФЛ на границе раздела воздух/вода. Для рибонуклеазы это притяжение слабее, чем для ЦитС. В случае с цвиттерионными ФЛ подтягивание (проникновение) белка существенно зависит от конденсированного состояния ФЛ монослоя (гидрофобных взаимодействий). Возможное изменение конформации этих белков позволяет им встраиваться гидрофобной частью в монослой ФЛ. ЦитС и рибонуклеаза не только взаимодействуют с ФЛ, но и образуют агрегаты на поверхности раздела.

В работе [43] изучали связывание водорастворимого ЦитС с водонерастворимым монослоем диолеилфосфатидилхолина (ДОФХ). С помощью поверхностных давления, потенциала и элипсометрии показано, что (I) ЦитС не адсорбируется на монослой ДОФХ, сжатого до 20 мНм^{-1} , (II) постепенное включение ЦитС происходит при уменьшении поверхностного давления, и (III) при растяжении адсорбированный белок десорбируется из монослоя при $14 < \pi < 22$.

Для того чтобы определить, можно ли объяснить эти результаты внутренними свойствами отдельно ДОФХ и ЦитС, измеряли поверхностные давление, потенциал и эллипсометрию чистого ЦитС: (I) кристаллического (II) растворенного в этаноле: Н₂О (2:1, об/об), и (III), адсорбированного на поверхности раздела воздух/вода после введения в субфазу. ЦитС образует нерастворимый монослой на поверхности при давлениях ниже 8-10 мНм⁻¹, которые постепенно растворяется при более высоких поверхностных давлениях. Затем поверхностное давление регулирует организацию белка на границе раздела воздух-вода и растворитель не влияет на его конформацию. Изотермы поверхностного потенциала системы ДОФХ (18:1) - ЦитС, полученные при различных поверхностных давлениях, можно объяснить простым правилом аддитивности. Показано, что продолжительная (непрерывная) адсорбция ЦитС происходит при формировании монослоя ДОФХ ниже 8-10 мНм⁻¹. При давлении выше 14 мНм⁻¹, как изотермы сжатия, так и эллипсометрические данные, демонстрируют полную десорбцию ЦитС из монослоя ДОФХ. Также обсуждается применимость такой модельной системы для моделирования биомембран.

Несмотря на то, что в ряде работ было дано достаточное подробное описание поведения ЦитС с липидными монослоями, данному явлению не было дано физической интерпретации. В настоящей работе проводится систематическое исследование комплекса ЦитС - КЛ путем измерения кинетики его образования и изотерм поверхностное давление-площадь. Особое внимание уделяется сравнению данных в случае природного и синтетического КЛ, полученных для комплексов на разных начальных условиях формирования.

1.4. Исследования начальных этапов кристаллизации, процессов роста и получения тонких пленок лизоцима

Кристаллизация белков представляет обширную область исследований, при этом весьма важным и трудоемким является поиск условий кристаллизации. В настоящее время разработано множество методов кристаллизации белков [44,45].

Однако, подбор условий кристаллизации зачастую все еще происходит методом проб и ошибок, и поэтому трудно предсказать возможность получения качественных кристаллов, которые будут давать достаточно хорошие дифракционные картины [29].

Качество полученных кристаллов зависит от многих параметров, таких, как способ роста, скорость испарения, концентрация осадителя и белка, температура при кристаллизации [46], равно как и характеристики пересыщенного раствора [47–50]. Наиболее часто используемые методы белковой кристаллизации основаны на статистическом анализе процессов роста при проведении экспериментов в широком диапазоне начальных условий [51].

Кристаллы белков используются для определения их структуры. Изучение механизмов кристаллизации важно не только для построения адекватной схемы выбора начальных условий, но и для поиска путей создания гибридных систем, включающих в себя молекулы белков в качестве функциональных элементов. Детальное изучение процессов, происходящих на ранней стадии нуклеации, позволит развить методы предсказания условий кристаллизации и контроля самого процесса. Одним из наиболее важных аспектов является определение структуры элементарных физических единиц, которые участвуют в пошаговом построении ядра и росте кристалла.

Возможность формирования комплексов в пересыщенном растворе обсуждалась в некоторых работах по изучению процесса кристаллизации белков [52–57].

В работах, посвященных описанию процесса кристаллизации макромолекулярных комплексов, наиболее изученным является рост кристалла лизоцима из куриного яйца (HEWL) тетрагональной сингонии ввиду малой трудоемкости процесса и доступности реагента. Имеется также достаточно сведений об условиях кристаллизации лизоцима тетрагональной сингонии.

В работе [58] исследовали раствор лизоцима (20 мг/мл) с хлоридом натрия (2.5 % w/v) в натрий ацетатном буфере (40 мМ, рН 4.6) методом динамического рассеяния света (ДРС), такие условия соответствуют условиям роста кристалла лизоцима тетрагональной сингонии. Процессом кристаллизации управляли при помощи температуры, так как растворимость лизоцима сильно зависит от температуры [59]. Измерения при каждой температуре проводили до момента, когда вырастали кристаллы размером 150-200 мкм. При исследовании данного раствора при 20 °С было показано, что раствор был немного ненасыщенным (растворимость лизоцима при данной температуре составила 22 мг/мл). Измеренный гидродинамический радиус составил 22.5 Å, что близко по значению к полученному в работе [60] (21.2 Å). Из этого был сделан вывод, что в таких условиях раствор состоит из невзаимодействующих одиночных молекул лизоцима. При понижении температуры до -2 °С и выдерживании раствора в течение 5 ч, гидродинамический радиус начинал увеличиваться и достигал своего максимального значения (33 Å) через примерно 10-11 ч. Затем величина радиуса начинала уменьшаться и достигала своего начального значения. Через 10-13 ч после достижения максимальной величины гидродинамического радиуса на пластинке, помещенной после измерительной кюветы перпендикулярно падающему лучу, возникали темные и светлые дифракционные кольца, что соответствовало появлению кристаллов с размерами около 30 мкм. Кристаллы достигали размеров 150-200 мкм в течение двух дней. Измерения, проведенные с помощью оптического микроскопа, показали, что морфология полученных кристаллов с точностью совпадает с морфологией кристаллов лизоцима тетрагональной сингонии, получаемой из раствора хлорида натрия при температурах ниже 25 °С.

Для проверки, соответствует ли гидродинамический радиус размеру критического зародыша лизоцима, были проведены аналогичные эксперименты при -5 °С. При этом отношение максимального гидродинамического радиуса к

начальному составил 1.75 (в отличии от предыдущего опыта 1.55), а время кристаллизации сократилось до 11-12 ч (почти вдвое по сравнению с 22 ч в прошлом опыте). Согласно теории нуклеации, при насыщении размер зародыша должен уменьшаться. Из этого был сделан вывод, что гидродинамический радиус не может соответствовать только критическому размеру зародыша, так как он увеличивается при насыщении. На самом деле, он отражает как образование критического зародыша, так и взаимодействие между молекулами.

Таким образом, был сделан вывод, что при исследованных степенях пересыщения фаза зародышеобразования представляет собой очень быстрый процесс по сравнению с ростом кристалла. Критический зародыш может состоять только из нескольких молекул. Рост кристалла осуществляется за счет присоединения либо одиночных молекул лизоцима, либо очень маленьких агрегатов к кристаллу.

В работе [54] исследовали раствор лизоцима (при относительном пересыщении $\sigma = 2.58$ и $\sigma = 4.68$) с 7 % хлоридом натрия, растворенных в 50 мМ натрий ацетатном буфере, рН 4.5, методом ДРС при температуре 26.5 °С. Также исследовали скорости роста граней кристаллов методом оптической микроскопии при таких же условиях. Было показано, что до образования кристаллов в растворе присутствуют агрегаты с размерами 5.62 и 7.50 нм для $\sigma=2.58$ и $\sigma=4.68$ соответственно. При этом был сделан вывод, что с увеличением концентрации белка растет размер агрегатов.

При исследовании морфологии кристаллов показано, что через 45 мин после начала роста грань (110) кристалла при $\sigma = 4.68$ меньше, чем при $\sigma = 2.58$. С ростом кристалла грань (110) при $\sigma = 4.68$ постепенно увеличивается и в итоге, кристалл имеет такую же форму как кристалл при $\sigma = 2.58$.

Из данных о размерах мономеров 3.79 нм × 2.8 нм × 2.8 нм, было сделано предположение, что агрегаты с размером 5.62 нм соответствует тетрамерам, а агрегаты с размером 7.50 нм соответствуют октамерам. Из-за разницы в скоростях

роста граней был сделан вывод о том, что тетрамеры участвуют в росте граней (101), а октамеры – (110).

В работе Боуэ и др. [61] процесс кристаллизации раствора HEWL исследовался методом малоуглового рассеяния нейтронов (МУРН). Кристаллизация проводилась в условиях роста кристаллов лизоцима тетрагональной сингонии с использованием тяжелой воды. Было показано, что при условиях кристаллизации радиус инерции был выше, чем в монодисперсных системах мономеров, но ниже, чем в монодисперсных системах олигомеров. В исследуемых растворах присутствовали олигомеры с эффективными радиусами: 13.5 Å, 20.5 Å, 27.2-27.7 Å, 31.8-32.6 Å, которые, вероятнее всего, являются соответственно мономерами, димерами, тетрамерами и октамерами. На основе этих результатов были сделаны выводы, что в ненасыщенном растворе присутствуют мономер и димеры, в насыщенном только димеры, а в пересыщенном тетрамеры и октамеры. Также было сделано предположение, что тетрамеры являются минимальными строительными единицами роста. Октамеры в свою очередь являются строительными единицами роста необходимыми для образования критических зародышей и также максимальными единицами роста кристалла. Также был продемонстрирован рост радиуса инерции с понижением температуры раствора.

К сожалению, кривые рассеяния были записаны только в малоугловом диапазоне. Данные результаты не дают полной картины в части типов олигомеров и их распределений по размерам. Авторам не удалось достичь хорошей воспроизводимости результатов, вероятно, из-за специфики методики подготовки образца (недостаточной чистоты процедур фильтрации и центрифугирования).

В работе Дюкруа и др. [62] с помощью малоуглового рассеяния рентгеновских лучей (МУРР) исследовали влияние различных солей на взаимодействие между молекулами лизоцима в ненасыщенных растворах в 50 мМ натрий ацетатном буфере при постоянном рН 4.5 и температуре 18 °С.

Было показано, что в разбавленном растворе лизоцима белок находится в виде мономеров. При увеличении концентрации мономеры остаются в растворе, а отталкивающее белок-белковое взаимодействие все более проявляется на кривых рассеяния. При добавлении одновалентных солей раствор лизоцима остается монодисперсным (в составе только мономеров), не переходя к нуклеации. Однако добавление сульфата аммония приводит к формированию полидисперсных олигомеров в растворе.

При более высокой концентрации лизоцима (когда на кривой рассеяния проявляется эффект межчастичной интерференции) при низкой ионной силе раствора наблюдалось отталкивание между молекулами, а при повышении ионной силы наблюдается притяжение между молекулами, которое приводит к изменению состояния белковых молекул и началу кристаллизации. Данный эффект непрерывно наблюдался независимо от характера добавленной соли и возрастал при увеличении ее концентрации.

В то время как все катионы (Li^+ , Na^+ , K^+ , NH_4^+ , Cs^+) показали одинаковый эффект, между анионами наблюдались значительные различия в их эффективности изменения потенциала взаимодействия. Был установлен такой же порядок анионов (SCN^- , паратолуол сульфат, NO_3^- , Cl^- , H_2PO_4^-), который наблюдали при эффективности снижения растворимости лизоцима и инициирования кристаллизации.

Более того, были исследованы температурные и дифференциальные анионные эффекты, которые влияли на растворимость и взаимодействия в растворах HEWL [63].

В работах [64,65] изучали скорости роста грани (110) кристаллов лизоцима тетрагональной сингонии в зависимости от степени пересыщения белка в растворе. Был проведен анализ данных с помощью модели диффузии для определения эмпирической зависимости между скоростью роста и локального пересыщения на границе раздела. Рост кристалла из раствора можно рассматривать как

двухстадийный процесс: сначала идет транспорт растворенного белка к границе роста, затем происходит встраивание частиц в кристаллическую решетку на границе роста. На основании полученных данных в работе Пуси и др. [64] было выдвинуто предположение о том, что олигомеры в растворе белка с осадителем (димеры и тетрамеры) участвуют в росте кристалла.

Измерения усредненных или макроскопических скоростей роста грани (110) кристаллов лизоцима тетрагональной сингонии проводили в работе [66] при различных концентрациях белка в зависимости от температуры (4-22 °С) при разных значениях рН и концентрации соли. Зависимости скорости роста от перенасыщения были схожи с полученными в предыдущих работах микроскопическими скоростями роста. Тем не менее, было обнаружено, что при высоких значениях пересыщения скорости роста достигают максимума, а затем начинают уменьшаться. Обнаружить «мертвую зону» не удалось, однако было определено, что, скорость роста асимптотически стремилась к нулю при очень низком значении пересыщения. Данные скорости роста также продемонстрировали зависимость от рН и концентрации соли. Такая зависимость не может быть охарактеризована исключительно пересыщением. Кроме того, предложен полный механизм роста кристаллов лизоцима, включая формирование агрегатов-единиц роста, перенос массы единицы роста к границе раздела кристалла и рост граней кристаллов за счет присоединения к ним единиц роста. Такой механизм может обеспечить более последовательное объяснение наблюдаемых тенденций скорости роста, чем механизмы, предложенные другими исследователями. Возможно, взаимодействия в кристаллизационном растворе, приводящие к образованию агрегатов-единиц роста, столь же важны, как и те взаимодействия, которые происходят на границе раздела кристалла. Именно эти процессы и могут отвечать за различия между ростом кристаллов и белковых молекул.

В работе [67] Надаража и Пуси исследовали скорости роста грани (110) кристаллов лизоцима тетрагональной сингонии, которые показали сложную

зависимость от степени перенасыщения. В более ранних исследованиях было показано, что такие тенденции роста можно объяснить образованием агрегатов-строительных единиц кристалла. В частности, упаковка молекул и взаимодействия в процессе роста кристалла объяснены образованием спиралей вдоль винтовой оси 4_3 .

В данной работе была рассмотрена кристаллическая структура кристаллов лизоцима тетрагональной сингонии и проанализированы связи между молекулами. На основе такого анализа бы выявлено, что рост грани (110) представляет собой двухступенчатый процесс: сильные межмолекулярные связи вызывают быстрое образование и накопление в объеме раствора лизоцима агрегатов винтовой осью 4_3 , в то время как более слабые связи в основном ответственны за более медленное присоединение единиц роста к грани кристалла. Процесс образования агрегатов в объеме происходит намного быстрее процесса присоединения к граням кристалла. Это связано с силой связей.

Ни одна из стандартных моделей скорости роста, проверенных в данной работе, с мономерами в монодисперсном растворе лизоцима в качестве единиц роста или тетрамерами в растворах с распределением агрегатов, не может объяснить наблюдаемые тенденции скорости роста в зависимости от температуры и концентрации лизоцима. Скорости роста в двух дислокационных и одной модели двумерного зарождения с октамером в качестве единицы роста превосходно согласуются с измеренными в эксперименте; это согласуется с результатами анализа структуры кристаллов лизоцима тетрагональной сингонии и микроскопических наблюдений роста данных кристаллов [66]. С помощью микроскопических исследований было показано, что даже с октамером в виде единицы роста, при меньшем пересыщении белка более точные результаты дает дислокационная модель, а при высоком – модель двумерного зарождения; отличия в расчетах при использовании двух разных дислокационных моделей были незначительными.

Также было отмечено, что при уменьшении температуры или при увеличении концентрации белка, происходит рост концентрации олигомеров более высоких порядков.

В работе [68] исследовали механизмы роста грани (101) кристаллов лизоцима тетрагональной сингонии с помощью математического моделирования. Как и в предыдущей работе рассматривались различные модели роста кристаллов лизоцима тетрагональной сингонии за счет присоединения мономеров, тетрамеров и октамеров к растущей грани. Расчеты показали, что лучше всего подходит модель, содержащая единицы роста в виде тетрамеров или октамеров. Анализируя результат исследования, было сделано предположение о том, что рост грани может осуществляться различными единицами роста, средний размер которых располагается между размерами тетрамеров и октамеров.

Работа [69] посвящена исследованию механизмов роста кристаллов лизоцима тетрагональной сингонии методом атомно-силовой микроскопии (АСМ). В работе исследовали ступени роста кристалла. Показано, что одиночное сканирование вдоль $[\bar{1}10]$ направления соответствует ширине единиц роста с винтовой осью 4_3 : 5.6 нм и 11.2 нм. Средний размер стандартного отклонения размера единицы роста по всем сканам составило 1.2 нм.

Распределение размеров единиц роста, полученное из 65 сканов в направлении $[001]$ (вдоль винтовой оси 4_3), то есть, фактически, высота единицы роста, отвечающая количеству витков спирали 4_3 , составляет 3.8 нм (один), 7.6 (два), 11.4 нм (три). Данные размеры соответствуют, по мнению авторов, одной и двум единицам с винтовой осью симметрии 4_3 . На основе полученных данных о размерах ступеней были сделаны выводы о том, что тетрамер, соответствующий одному витку спирали 4_3 , является минимальной единицей роста для грани (110). Результаты этой работы хорошо согласуются с результатами анализа периодических цепей связи (ПЦС) [67,70–72] и полученными ранее экспериментальными данными [73].

В предыдущих исследованиях структуры кристаллов лизоцима тетрагональной сингонии методом АСМ и методом ПЦС было выдвинуто предположение, что грань (110) состоит из цепей молекул, которые располагаются по отношению друг к другу по винтовой оси 4_3 , параллельной грани кристалла. Для подтверждения этого предположения в работе [74] были получены и обработаны фотографии АСМ высокого разрешения. С помощью компьютерной программы были сконструированы теоретические АСМ изображения, соответствующие определенной упаковке молекул и форме наконечника иглы АСМ. Параметры упаковки и форму иглы меняли, чтобы получить максимально возможную корреляцию между экспериментальными и теоретическими изображениями. Предположение, основанное на ПЦС анализе, о расположении/упаковке молекул вокруг винтовой оси 4_3 была подтверждена, так как как альтернативное расположение, состоящее из молекул, связанных друг с другом по оси 2_1 , не наблюдалось. Тем не менее, было установлено, что структура поверхности существенно отличается от кристаллографического расположения молекул в объеме кристалла. Было обнаружено, что молекулы на границе упакованы плотнее относительно оси 4_3 , чем молекулы, находящиеся в объеме кристалла. В процессе роста и покрытия поверхности новыми слоями молекул происходит релаксация молекул первоначальной границы в правильное кристаллографическое расположение. Если такое перераспределение действительно происходит на грани (110) кристаллов лизоцима тетрагональной сингонии, то эта работа является первой в мире, в которой показано что на поверхности белкового кристалла происходит реорганизация молекул, которая в какой-то мере соответствует реконструкции поверхности, широко наблюдаемой на неорганических кристаллах. Данное исследование представляет новый подход более точного определения механизмов молекулярной упаковки на гранях белковых кристаллов методом АСМ.

В [75] методом высокоразрешающей атомной сканирующей микроскопии проводили анализ ступеней роста грани (110) кристаллов лизоцима тетрагональной сингонии. Несмотря на то, что большинство ступеней являются бимолекулярными с высотой 5.5 нм, как было показано в работе [69], в данной работе также были обнаружены ступени с высотой в половину меньшей. Последнее открытие можно было бы отнести к появлению одномолекулярных слоев в дополнение к бимолекулярным. Такие одномолекулярные слои всегда появлялись попарно. Морфологию обеих поверхностей и (110), и (101) удалось исследовать на молекулярном уровне. На основе предложенной структуры [69] высота элементарных ячеек на грани (110) и грани (101) на молекулярном уровне должна отличаться на АСМ-изображениях. Сравнение соответствующих топографических изображений подтверждает предложенную кристаллографическую структуру поверхности. Сравнение высоты рельефа соответствующих граней указывает на то, что грань (110) является относительно гладкой (с шероховатостью менее 0.2 нм) по сравнению с гранью (101) (с шероховатостью около 1.5 нм).

Белковые молекулы имеют неправильную геометрию и отсутствие сильных ионных связей в соответствующих кристаллах. Таким образом, вполне вероятно, что крупные единицы кристаллизации возникают в объеме раствора случайным образом. Рост кристаллов лизоцима требует переноса таких единиц из объема раствора и их прикрепления к поверхности кристалла. Изображения поверхности грани (101) указывают на присоединение к растущей грани агрегатов белка, а не отдельных мономеров из раствора. Однако нельзя исключать, что мономеры лизоцима так же прикрепляются к поверхности и диффундируют к ступеням роста быстрее, чем время одного сканирования. Результаты показывают, что образование агрегатов лизоцима в растворе приводит к росту/образованию ступеней роста грани (110) молекулярной, а также бимолекулярной высоты.

Процесс кристаллизации лизоцима изучали с помощью АСМ [76]. В работе представлены результаты исследования морфологии и кинетики роста нескольких

граней кристаллов лизоцима орторомбической и моноклинной сингонии. На основе полученных данных исследования грани (010) кристаллов лизоцима орторомбической сингонии об удвоенном параметре решетки вдоль осей a и b сделан вывод, что при взаимодействии раствора с поверхностью грани происходит реконструкция последней.

Кристаллы лизоцима растут по дислокационному механизму при параметре пересыщения $s < 3$ ($s = c/c_0 - 1$). Показаны дефекты на ступенях кристалла, их плотность мала на столько, что они не взаимодействуют. Движение ступеней происходит за счёт заравнивания дефектов единицами роста. Глубина дефектов составляет от 7.2 нм, что соответствует параметру элементарной ячейки вдоль оси b .

Из ранних работ известно [77–79], что зарождающиеся кристаллиты белка взаимодействуют со ступенями графозпитаксиальной структуры и осаждаются на них ориентированным образом. Рост биокристаллов реализуется присоединением монокристаллических блоков биологических макромолекул к торцам микро- или макроступеней, созданных на поверхности кристаллизационной подложки.

Проведенные ранее исследования не раскрывают полностью механизмы роста белковых кристаллов и не дают точного ответа на вопрос, какие именно олигомеры являются единицами роста кристаллов лизоцима тетрагональной сингонии. Можно отметить ряд недостатков этих работ. Исследования с использованием МУРН были проведены в малом угловом диапазоне, были получены только эффективные радиусы без восстановления формы олигомеров. Метод ДРС также не позволяет определить форму рассеивающих частиц и распределение по концентрациям. Этот метод не является таким высокоточным, как МУРР или МУРН. Работа с использованием этого метода дает информацию только о размерах рассеивающих частиц. Исследования роста граней методом АСМ не позволяет определить единицы роста так, как исследования проводились уже на растущем кристалле. Несмотря на то, что метод является высокоточным, он может определить только

поверхностный рельеф граней, ступени роста и их размеры. Поэтому определения механизмов роста белковых кристаллов требует дальнейших исследований с использованием высокоточного оборудования.

1.5. Заключение

Анализ литературы показал, что несмотря на большое количество методов создания как упорядоченных тонких пленок, так и кристаллов, развитие подходов к созданию планарных структур на основе белков является актуальной задачей.

В ряде работ было дано достаточное подробное описание поведения ЦитС (использованного в данной работе) с липидными монослоями, однако данному явлению не было дано физической интерпретации, не были исследованы упругие свойства полученных пленок. Работы по получению планарных структур лизоцима (модельного белка, использованного в данной работе) практически отсутствуют.

Исследования начальных стадий кристаллизации, а также процессов роста белковых кристаллов проводили в основном методом атомно-силовой микроскопии, который дает информацию о морфологии поверхности, а не структуре кристалла.

Несмотря на большое число работ, посвященных изучению механизма кристаллизации лизоцима тетрагональной сингонии, до сих пор не было определено, какой элемент является структурной единицей роста. Во всех вышеупомянутых публикациях было отмечено, что в процессе роста кристалла участвуют не только мономеры, но и агрегаты. Природа и структура этих агрегатов не определялась, поэтому не были сделаны предположения об их упорядоченности. Также отсутствует экспериментальное доказательство корреляции между формированием комплексов в растворе и начальной стадией кристаллизации. Наконец, не был описан процесс роста кристалла на молекулярном уровне, в силу чего структура олигомеров, непосредственно участвующих в процессе, остается неизвестной.

В этой связи необходимо не только развить подходы создания планарных структур на основе белков, но и разработать подход к неразрушающему *in situ* исследованию процессов роста кристаллов, а также исследовать начальные процессы кристаллизации лизоцима.

ГЛАВА 2. АППАРАТУРНО-МЕТОДИЧЕСКИЕ ПОДХОДЫ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ ПРОЦЕССОВ КРИСТАЛЛИЗАЦИИ БЕЛКОВ, А ТАКЖЕ КРИСТАЛЛОВ И ПЛАНАРНЫХ СТРУКТУР НА ИХ ОСНОВЕ НА ПОЛУПРОВОДЯЩИХ И ДИЭЛЕКТРИЧЕСКИХ ПОДЛОЖКАХ

2.1. Получение пленок цитохром *c*-кардиолипин

В работе использовали тетраолеилкардиолипин (ТОКЛ) (115404-77-8 Avanti), бычий кардиолипин (БКЛ) (MFCD00071040 Sigma), цитохром *c* (horse heart MFCD00130890 Sigma). Все эксперименты проводились при температуре 18.5 ± 0.5 °С, с использованием фосфатного буфера (10мМ $\text{NaH}_2\text{PO}_4 + \text{Na}_2\text{HPO}_4$, pH 7.4) (ФБ). Буфер готовили на основе воды, очищенной путем фильтрации через Milli-Q (Millipore), удельное сопротивление воды было 18МОм*см. Перед каждым экспериментом ванну мыли этанолом и промывали большим количеством тридистиллированной воды.

Изготовление образцов для данной работы проводилось на автоматизированной установке Ленгмюра-Блоджетт KSV5000 LB (Финляндия) (рис. 2.1).

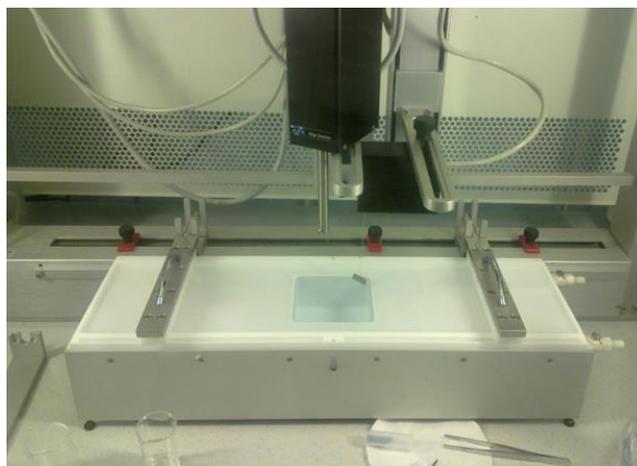


Рис. 2.1. Фотография установки Ленгмюра-Блоджетт KSV5000 LB

В ламинарном шкафу размещена симметричная односекционная тефлоновая кювета (называемая ленгмюровской ванной) на антивибрационном столе, по бортам которой осуществляется встречногласованное передвижение

тефлоновых барьеров. Поверхностное давление на границе раздела «субфаза – газ» контролируется электронным датчиком поверхностного давления (весы Вильгельми). Блок управления связан с двигателем перемещения барьеров и обеспечивает поддержание заданного поверхностного давления (определяемого из изотермы сжатия и соответствующего упорядоченному состоянию монослоя) в процессе переноса монослоя на поверхность подложки. Подложка фиксируется в держателе под определенным углом к поверхности субфазы и перемещается гидравлическим устройством (диппер) с помощью привода. Перед технологическим циклом осуществляется предварительная подготовка поверхности субфазы устройством очистки посредством насоса. Технологический цикл выполняется в автоматическом режиме и управляется компьютером.

Ленгмюровские ванны и барьеры изготовлены из тефлона, для обеспечения химической инертности, образования мениска и предотвращения утечки субфазы. Размер поверхности ванны KSV5000 LB – 570x150 мм². Диапазон скоростей горизонтального перемещения барьеров и вертикального перемещения подложки соответственно: $V_B=(0.01 - 400)$ мм/мин и $V_{П}=(0.01 - 85)$ мм/мин. Диапазон измерений датчика поверхностного давления (весы Вильгельми) составляет (0 – 150) мН/м. Точность измерения поверхностного давления составляет 4 мкНм⁻¹. Платиновая пластинка Вильгельми имеет размер 20x10 мм².

2.1.1. Процедура исследования кинетики адсорбции

На субфазу фосфатного буфера без цитохрома с наносили 27 ± 3 нмоль липида (если иное не указано). Через 10 мин после нанесения сжимали монослой со скоростью 10 мм/мин до заданного поверхностного давления π_0 . Уточнение количества нанесенного липида проводили путем сопоставления изотерм, полученных в каждом эксперименте, с изотермой кардиолипина калиброванного раствора (с известной концентрацией). Через 10 мин (время, необходимое для стабилизации монослоя) цитохром *c* вводили микрошприцом под монослой. Затем

для ускорения диффузии белка субфазу перемешивали в объеме. В эксперименте регистрировали изменение во времени поверхностного давления при фиксированной площади пленки.

2.1.2. *Изучение π -A изотерм*

Для исследования стабильности и обратимости (упругости) формируемой белково-липидной системы после стабилизации процесса встраивания белка (выхода на максимальное поверхностное давление) мы записывали изотерму сжатия-растяжения. Скорость барьеров и при сжатии, и при растяжении была постоянной $v = 20$ мм/мин. Для каждого образца с целью проверки обратимости белково-липидной системы было выполнено 5 циклов «сжатие-растяжение».

2.2. Разработка метода изучения тонкой структуры органической планарной системы

2.2.1. *Метод рефлектометрии*

Метод рентгеновской рефлектометрии наиболее широко используется для исследования качества поверхности и определения параметров (шероховатостей границ раздела, толщин слоев, плотностей по толщине слоистой системы) планарных периодических и аperiodических наносистем, в том числе органических [80,81] пленок, многослойных систем на их основе и монослоев на поверхности жидкости [82]. Рефлектометрический эксперимент основан на регистрации зависимости интенсивности зеркальной компоненты рентгеновского отражения от угла скользкого падения (θ) на поверхность пленки.

По аналогии с оптикой видимого света, для которой существует полное внутреннее отражение при переходе из более плотной в оптически менее плотную среду, для рентгеновского излучения при отражении от границы «вакуум ($n = 1$)/вещество ($n_2 < 1$)» существует полное внешнее отражение – в пределах диапазона углов скольжения $0 < \theta < \theta_c$ (θ_c – критический угол полного внешнего отражения), для которых $\theta_2 = 0$ (рис. 2.2), т.е. рентгеновский пучок «вытесняется» из образца,

практически полностью отражаясь от границы раздела. При этом над границей раздела в результате интерференции падающей и зеркально отраженной волн формируется стоячая волна, а под отражающей поверхностью распространяется преломленная эванесцентная волна (рис. 2.2) [83].

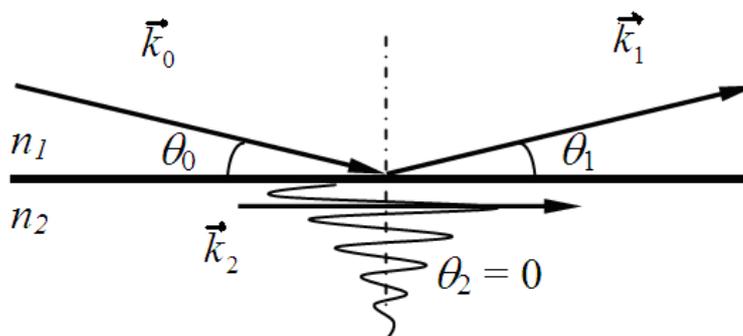


Рис. 2.2. Взаимодействие рентгеновского излучения с отражающей поверхностью в условиях ПВО ($\theta \leq \theta_c$), \vec{k}_0 – падающее, \vec{k}_1 – отраженное и \vec{k}_2 – прошедшее излучения, соответственно.

Величина критического угла ПВО θ_c определяется из закона (6) с учетом (7):

$$\cos \theta_c = 1 - \delta - i\beta \quad (2.1)$$

если поглощением можно пренебречь, то

$$\theta_c \approx (2\delta)^{1/2} \quad (2.2)$$

Из формулы (2.2) следует, что критический угол ПВО зависит от плотности отражающей поверхности и от длины волны.

Без учета поглощения при $\theta < \theta_c$ интенсивность отраженного излучения равна интенсивности падающего. При $\theta > \theta_c$ отношение интенсивностей быстро падает пропорционально θ^4 (рис. 2.3).

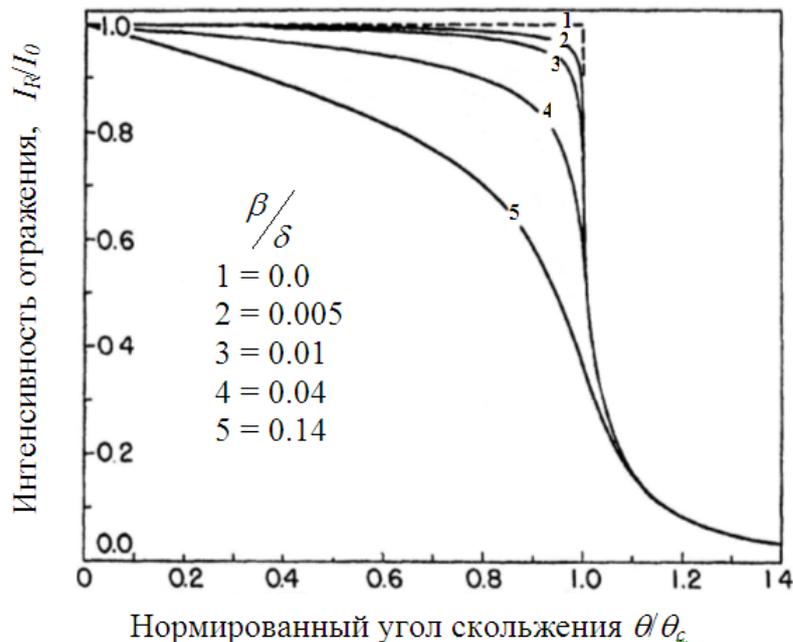


Рис. 2.3. Кривые рентгеновской рефлектометрии от кремниевой подложки (а) и от пленки на кремниевой подложке (б). Угловая зависимость интенсивности рентгеновского отражения от границы раздела двух сред, нормированная на интенсивность падающего излучения, рассчитанная для различных значений величины θ/θ_c : 1 – поглощения в материале нет, 2, 3 – материал слабопоглощающий, 4, 5 – поглощение в материале велико. По оси х отложен угол скольжения, нормированный на критический угол ПВО.

На вид кривой зеркального отражения от границы раздела также оказывает влияние ее шероховатость. Шероховатость приводит к уменьшению интенсивности отраженного излучения, что понижает коэффициент отражения (ниже 1) при скользких углах $\theta < \theta_c$. При углах $\theta > \theta_c$ шероховатость поверхности вызывает резкое уменьшение коэффициента отражения (рис. 2.3а).

Если отражение рентгеновского излучения осуществляется от нескольких границ раздела: при взаимодействии рентгеновского излучения со слоистой средой каждая из границ раздела расщепляет падающую волну на отраженную и прошедшую, давая набор когерентных волн, распространяющихся в определенных направлениях. Интерференция этих волн вызывает изменение в угловой зависимости рентгеновского отражения – появляются экстремумы, обусловленные

изменением разности фаз когерентных волн в зависимости от угла падения излучения (рис. 2.4б).

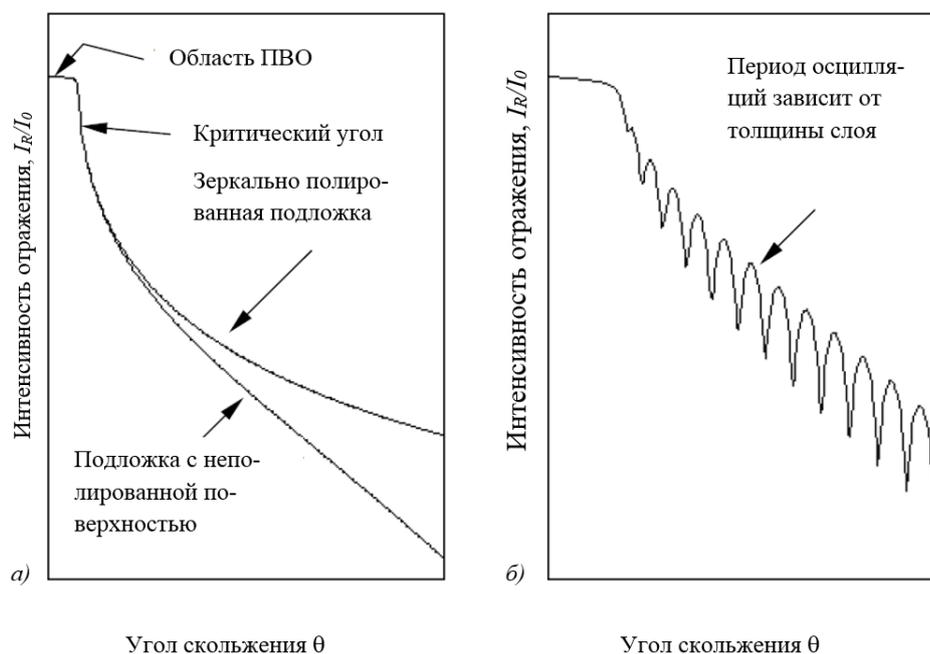


Рис. 2.4. Кривые рентгеновской рефлектометрии от кремниевой подложки (а) и от пленки на кремниевой подложке (б).

Отраженная волна складывается из волн, претерпевших отражение на каждой из границ раздела, которые интерферируют между собой, имея разность хода (рис. 2.5):

$$\Delta = (MN + NK)n_f - MD \quad (2.3)$$

где n_f - показатель преломления пленки.

При изменении угла падения вследствие интерференции волн, отраженных от границ раздел «внешняя среда-пленка» и «пленка-подложка» возможна регистрация осцилляций интенсивности рентгеновского отраженного пучка – «толщинных» осцилляций. Период осцилляций будет определяться разностью хода волн (формула (2.3)).

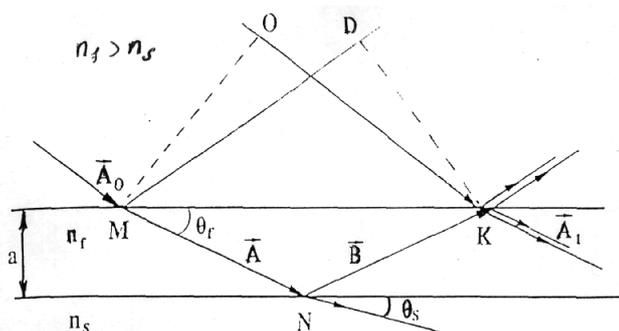


Рис. 2.5. Отражение рентгеновских лучей при скользящих углах от структуры вакуум/пленка/подложка.

Положения экстремумов на кривой отражения определяются из выражения:

$$\theta_i^2 = \theta_c^2 + (m_i + \Delta m)^2 \lambda^2 / 4a^2 \quad (2.4)$$

где m_i - целое число, Δm либо 0 либо $1/2$ (если нет сдвига фаз при отражении от границы пленка/подложка ($n_f > n_s$), то 0 для максимума и $1/2$ для минимума, в противном случае, при отражении возникает разность фаз $\lambda/2$ и значение Δm обратное.), a – толщина слоя.

Из формулы (2.4) следует, что расстояние между соседними толщинными осцилляциями $\Delta\theta$ определяется выражением:

$$\Delta\theta \approx \lambda / (2a) \quad (2.5)$$

Таким образом, кривая рентгеновской рефлектометрии дает информацию о плотности, толщине и шероховатости поверхности многослойных пленок или подложек.

2.2.2. Метод стоячих рентгеновских волн

Метод стоячих рентгеновских волн (СРВ) основан на одновременной регистрации угловой зависимости рентгеновского отражения и интенсивности выхода вторичных излучений, возникающих при поглощении рентгеновского излучения в условиях дифракции или полного внешнего отражения (ПВО), когда в образце формируется отраженная волна большой амплитуды и, как следствие, стоячая рентгеновская волна. Период СРВ равен периоду кристалла. Важная особенность волнового поля СРВ — смещение узлов и пучностей относительно

атомных плоскостей внутри кристалла при изменении угла падения рентгеновского пучка в пределах брэгговского пика. Это приводит к резким модуляциям интенсивности вторичного излучения, возникающего при неупругом рассеянии рентгеновских лучей. [84] Форма угловой зависимости выхода вторичного излучения строго зависит от положения атомов-источников вторичного излучения, причем значительные изменения на этих кривых наблюдаются даже тогда, когда смещения атомов составляют малые доли межплоскостного расстояния кристалла. Это означает, что за счет спектроскопического выделения сигнала от атомов определенного сорта можно с высокой точностью определить местоположение этих атомов в кристалле и на его поверхности. Такое сочетание высокого пространственного разрешения рентгеновских лучей и спектроскопии вторичных излучений позволяет получать принципиально новую структурную информацию, недоступную традиционным рентгеновским методам. [85]

Данный метод широко используется для исследования структуры тонких органических пленок, в том числе монослоев на поверхности жидкости.

Принципиальная экспериментальная схема исследований методом СРВ представлена на *рис. 2.6*.

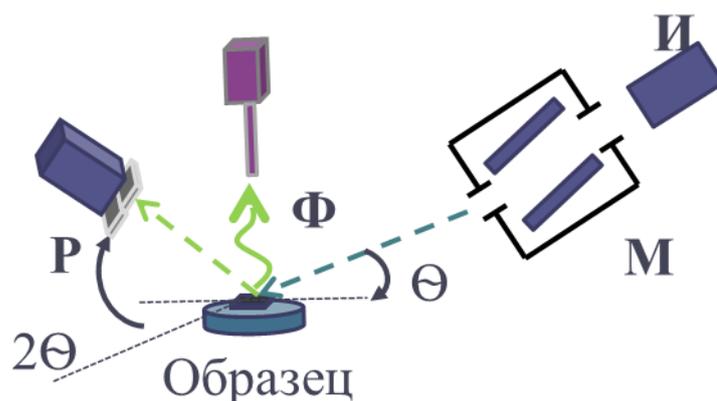


Рис. 2.6. Экспериментальная схема проведения исследований методом стоячих рентгеновских волн: И - источник, Ф – флуоресцентный детектор, РД – детектор.

Угол падения рентгеновского пучка θ изменяют с некоторым шагом в угловой области дифракции или ПВО. Для каждого угла θ измеряют интенсивность отраженного рентгеновского пучка и записывают спектр характеристического флуоресцентного излучения. Чтобы получить угловую зависимость выхода флуоресценции от атомов какого-то определенного сорта, интегральную интенсивность соответствующего пика на спектрах характеристического флуоресцентного излучения представляют как функцию угла θ .

2.2.3. Разработка метода стоячих рентгеновских волн в условиях многоволнового взаимодействия рефлексов

Одной из особенностей органических структур являются на порядок бóльшие по сравнению с неорганическими периодическими объектами (гетероструктурами, монокристаллами) межплоскостные расстояния. В соответствии с законом Вульфа-Брэгга по мере увеличения межплоскостного расстояния брэгговские пики, соответствующие различным рефлексам, будут смещаться в область меньших углов, а угловое расстояние между ними будет уменьшаться. В связи с этим в результате дифракционного отражения рентгеновского излучения от органической слоистой структуры с большим периодом повторяемости даже дифракционные максимумы, соответствующие различным порядкам одного и того же отражения, будут располагаться на угловой оси настолько близко, что станет возможным наблюдать их взаимодействие друг с другом. Это свойство позволило разработать модификацию метода стоячих рентгеновских волн без измерения вторичных процессов [86–89], в котором используется многоволновое взаимодействие дифракционных отражений, соответствующих разным гармоникам одного рефлекса. Данный фазочувствительный метод использован для исследования структуры многослойной пленки стеарата свинца на кремниевой подложке.

2.2.3.1. Исследуемые образцы

Методом Ленгмюра-Блоджетт на силанизированной кремниевой подложке была получена органическая пленка, представляющая собой периодическую

систему восьмидесяти слоев стеарата свинца. Монослой стеарата свинца были сформированы на поверхности водной субфазы и перенесены на твердую подложку с помощью установки KSV 5000, KSV Instruments, Финляндия. В качестве субфазы использовали чистую воду, полученную с помощью системы Simplicity 185, Millipore (сопротивление воды составляло 18 МОм*см) с добавлением $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$, концентрация которого составляла $3 \cdot 10^{-5}$ Моль/л, $\text{pH} = 7.2$. Температура в помещении поддерживалась постоянной и составляла $(20.0 \pm 0.5)^\circ\text{C}$. На поверхность водной субфазы с помощью микролитового шприца наносили раствор стеариновой кислоты в хлороформе, с концентрацией 0.7 мг/мл, затем монослой поджимали с помощью двух симметричных подвижных барьеров до давления 25 мН/м. Сформированный монослой переносили на силанизированную кремниевую подложку с ориентацией [100]. Силанизация подложки осуществлялась в соответствии с методикой, описанной в [90]. Для получения исследуемых образцов использовались подложки Si с шероховатостью, не превышающей 10 Å.

2.2.3.2. Эксперимент

Для изучения структуры получившейся многослойной структуры были проведены комплексные исследования образца несколькими рентгеновскими методами, а именно, рефлектометрии, двухкристальной дифрактометрии и стоячих рентгеновских волн в условиях многоволновой дифракции. Эксперименты проводились на автоматизированном рентгеновском дифрактометре SmartLab Rigaku, оснащенный источником излучения с вращающимся анодом (Cu) мощностью 9 кВт.

На первом этапе работы исследуемые образцы PbSt_2 на подложках Si изучались методом рентгеновской рефлектометрии с целью оценки степени совершенства получаемых структур и уточнения параметров их слоистой модели (толщина, неидеальность межслоевых границ, однородность по глубине). По полученным данным рефлектометрии для дальнейших исследований отбирались наиболее

совершенные структуры. Ранее методы получения пленок Ленгмюра-Блоджетт из PbSt_2 на подложках Si были развиты при исследовании термостабильности таких систем в [90], где представлены зависимости рентгеновской рефлектометрии, аналогичные получаемым в настоящей работе, поэтому здесь они не приводятся (можно и привести). Также, в указанной работе показано, что такие многослойные ленгмюровские пленки имеют весьма совершенную структуру и термостабильны при температурах, сравнимых с комнатной (вплоть до $\approx 60^\circ$).

Рентгенодифракционные эксперименты проводились в $(+n - m)$ схеме двухкристальной дифрактометрии в горизонтальной геометрии с использованием системы щелей перед детектором, обеспечивающей угловое разрешение 0.025° . Излучение от источника коллимировалось симметричным монохроматором с прорезным каналом $\text{Ge-}220 \times 2$, использовалась характеристическая линия рентгеновского излучения $\text{Cu K}_{\alpha 1}$. После монохроматора пучок ограничивался щелью 0.05 мм (в плоскости дифракции) перед исследуемым образцом. Интенсивность дифрагированного излучения регистрировалась NaI детектором.

В эксперименте были измерены угловые зависимости интенсивности дифракционных отражений пленки PbSt_2 , как в симметричной, так и в асимметричной геометрии. При этом в качестве исследуемых рефлексов использовались разные порядки отражения от системы атомных плоскостей (001), расположенных параллельно поверхности образца и оси c элементарной ячейки построенной модели (см. раздел «Обсуждение результатов», *рис. 2.10*) и имеющих наибольшее межплоскостное расстояние.

На *рис. 2.7*, с использованием построения Эвальда (*рис. 2.7a*), схематично показана геометрия сканирования, соответствующая измерениям, проводимым в эксперименте. Во время измерений образец покоился на стандартном держателе для исследования пластин, а источник излучения и детектор перемещались вокруг него по окружности. Использование приемных щелей позволило реализовать в экспериментах различные виды углового сканирования, так называемые θ - 2θ - и

ω -сканирование (рис. 2.7б), широко используемые в рентгеновской высокоразрешающей дифрактометрии (см., например, [91]).

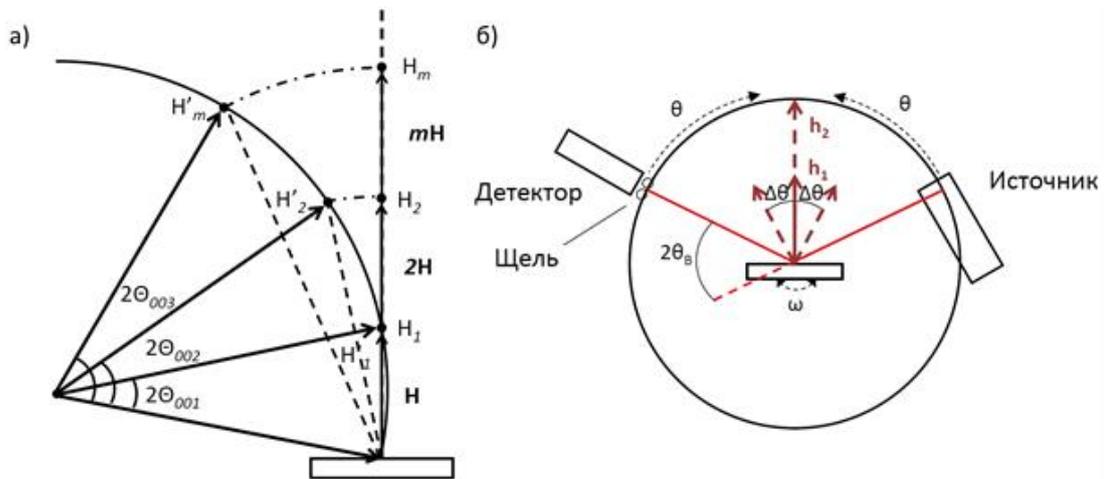


Рис. 2.7. Схематичное изображение геометрии сканирования в обратном пространстве с использованием построения Эвальда (а) и рентгенодифракционная схема, соответствующая измерениям, проводимым в эксперименте (б). Подробное описание см. в тексте.

Регистрация симметричного (сильного) дифракционного отражения осуществляется путем θ - 2θ -сканирования в направлении вектора \mathbf{H}_m (рис. 2.8а,б) в окрестности узла обратной решетки \mathbf{H}_m (m – целое число, соответствующее порядку отражения), т.е. в малой угловой области вблизи углов Брэгга отражений типа $00l$.

Регистрация несимметричного (слабого) отражения осуществляется путем ω -сканирования по дуге $\mathbf{H}'_m \mathbf{H}_m$ (рис. 2.7а,б) практически перпендикулярно вектору \mathbf{H}_m при малой отстройке от узла обратной решетки \mathbf{H}_m , что также соответствует угловой отстройке от точного брэгговского положения для рефлексов $00l$, но при фиксированной сумме угла падения (θ_i) и приемного угла (θ_f), равной величине двойного угла Брэгга выбранного рефлекса.

Рассмотрим для примера регистрацию кривой слабого отражения на примере отражения (003). Для регистрации слабого отражения (003) при сильном отражении (001) источник устанавливается под углом Брэгга отражения 001, $\omega = \theta_i = \theta_{001}$, а детектор под таким углом θ_f , который отраженный пучок составляет с поверхностью кристалла, так чтобы $\theta_f = 2\theta_{003} - \theta_{001}$, где θ_{003} – угол Брэгга

отражения (003). Затем осуществляется запись кривой отражения в зависимости от изменения угла ω в малом диапазоне углов вблизи брэгговского угла сильного отражения 001.

Удобство описанной геометрии эксперимента состоит в ее простоте и в том, что настройка на любую комбинацию сильного и слабого отражений вида (00 l) легко реализуема посредством выбора соответствующих углов для ориентации источника и детектора в ходе θ - 2θ - и ω -сканирования. В работе были исследованы четыре разные комбинации сильного и слабого отражений, соответственно, (001, 002), (001, 003), (002, 003) и (003, 002). Совокупный анализ всех случаев дает намного больше информации, чем какой-либо один случай, в частности, позволяет сделать вывод о смещении атомных слоев вблизи поверхности.

Поскольку межплоскостное расстояние в направлении вектора дифракции ($d = 50 \text{ \AA}$) намного превышает длину волны Cu K $_{\alpha 1}$ излучения ($\lambda = 1.54 \text{ \AA}$), угол Брэгга для первого порядка отражения мал, $\theta_{001} = 0.8827^\circ$. Малость угла, с одной стороны, увеличивает амплитуду отражения единицей длины по нормали к поверхности пленки. С другой стороны, это приводит к уменьшению разницы углов Брэгга между соседними порядками отражения.

В силу вышесказанного угловая ширина дифракционных отражений увеличивается, и это позволяет регистрировать очень слабую асимметричную дифракцию в отражение (рефлекс) соседнего порядка, например, (002) в том случае, когда условие Брэгга выполняется на основном рефлексе, например, (001). Если отражение реализуется одновременно в несколько пучков, то можно говорить о специальном случае многоволновой дифракции, в котором отражение в сильный рефлекс достаточно велико и реализуется динамически, а отражение в слабые рефлексы происходит кинематически, но при этом в условиях формирования в кристалле СРВ.

Такой случай был описан ранее в [86–89] и назван *методом стоячих рентгеновских волн без использования вторичных излучений*. В типичных

совершенных кристаллах (с параметрами решетки $\sim 5 \text{ \AA}$, например, Si, Ge, GaAs и др.) для экспериментальной реализации метода требуется специально ориентировать исследуемый кристалл вращением вокруг двух осей [92,93]. При этом всегда используются отражения, векторы обратной решетки которых направлены под углом друг к другу. В настоящей работе указанный метод был впервые реализован для параллельных векторов обратной решетки, соответствующих разным порядкам семейства отражений ($00l$).

Известно, что слабое отражение происходит из тонкого поверхностного слоя кристалла и реагирует на фазу амплитуды отражения в сильный рефлекс. По этой причине кривые угловой зависимости всегда имеют несимметричный характер дисперсионной кривой с минимумом и максимумом по обе стороны от центра области отражения в сильный рефлекс. Если же плоскости в поверхностном слое смещены относительно их положений в идеальной решетке кристалла, то это смещение сразу проявляется в характере угловой зависимости слабого отражения и может быть определено из сравнения с численным расчетом.

Этот факт метода стоячих рентгеновских волн впервые теоретически обсуждался в [94] и детально описан в обзоре [95]. Использование новой модификации метода стоячих рентгеновских волн для ленгмюровских пленок стеарата свинца позволяет изучать структуру приповерхностного слоя пленки без сложной юстировки кристалла, и использовать различные варианты комбинаций сильного и слабого отражений при неподвижном образце.

В [96–98] изучались многослойные структуры, в том числе, ленгмюровские пленки на твердых подложках. Отметим, что в этих работах возможность многоволнового взаимодействия рентгеновских лучей не учитывалась, а исследования были направлены, главным образом, на определение влияния шероховатости поверхности на главное отражение.

Несмотря на то, что слабое отражение имеет весьма малую интенсивность по сравнению с сильным отражением для его измерения оказалось достаточным

использовать лабораторный источник рентгеновского излучения, что позволяет широко использовать данный метод для исследования ленгмюровских пленок разного типа.

2.2.3.3. Результаты эксперимента

На *рис. 2.8* представлены угловые зависимости следующих комбинаций сильного и слабого рефлексов, соответственно: (001, 002), (001, 003). На *рис. 2.9(a)* представлена кривая дифракционного отражения сильного рефлекса (001), фрагмент (б) показывает «хвост» КДО рефлекса (002) в области сильного отражения (001), а фрагмент (в) – «хвост» КДО рефлекса (003) в области сильного отражения (001). Видно, что для измерения третьей кривой не хватает фотонов, поэтому статистический шум весьма заметен, но все же можно сделать вывод о том, что асимметрия кривой 003 отражения имеет такой же знак, как и в случае 002 отражения. Следует также отметить, что асимметрия кривых слабого отражения неполная, минимум существенно слабее максимума.

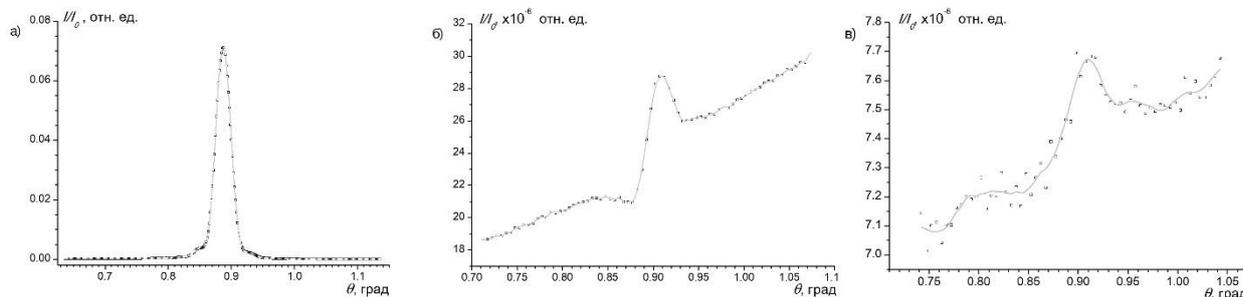


Рис. 2.8. Экспериментальные зависимости дифракционных отражений многослойной пленки стеарата свинца: а) – симметричное отражение 001; б, в) – слабые асимметричные отражения 002 и 003, соответственно, вблизи брэгговского положения для рефлекса 001.

На *рис. 2.9* показаны угловые зависимости для комбинаций сильного и слабого рефлексов (002, 003) и (003, 002). Фрагмент (а) представляет две кривые отражения сильных рефлексов (002) и (003), фрагмент (б) – «хвост» КДО отражения (003) в области брэгговского положения рефлекса (002), а фрагмент (в) – «хвост» КДО рефлекса (002) в области сильного отражения (003). Здесь интересно, что кривая

слабого отражения для третьего случая имеет очень слабую дисперсию, а аналогичная кривая для четвертого случая имеет дисперсию, обратную к той, которая наблюдается для первого случая, то есть у нее максимум слева, а минимум справа.

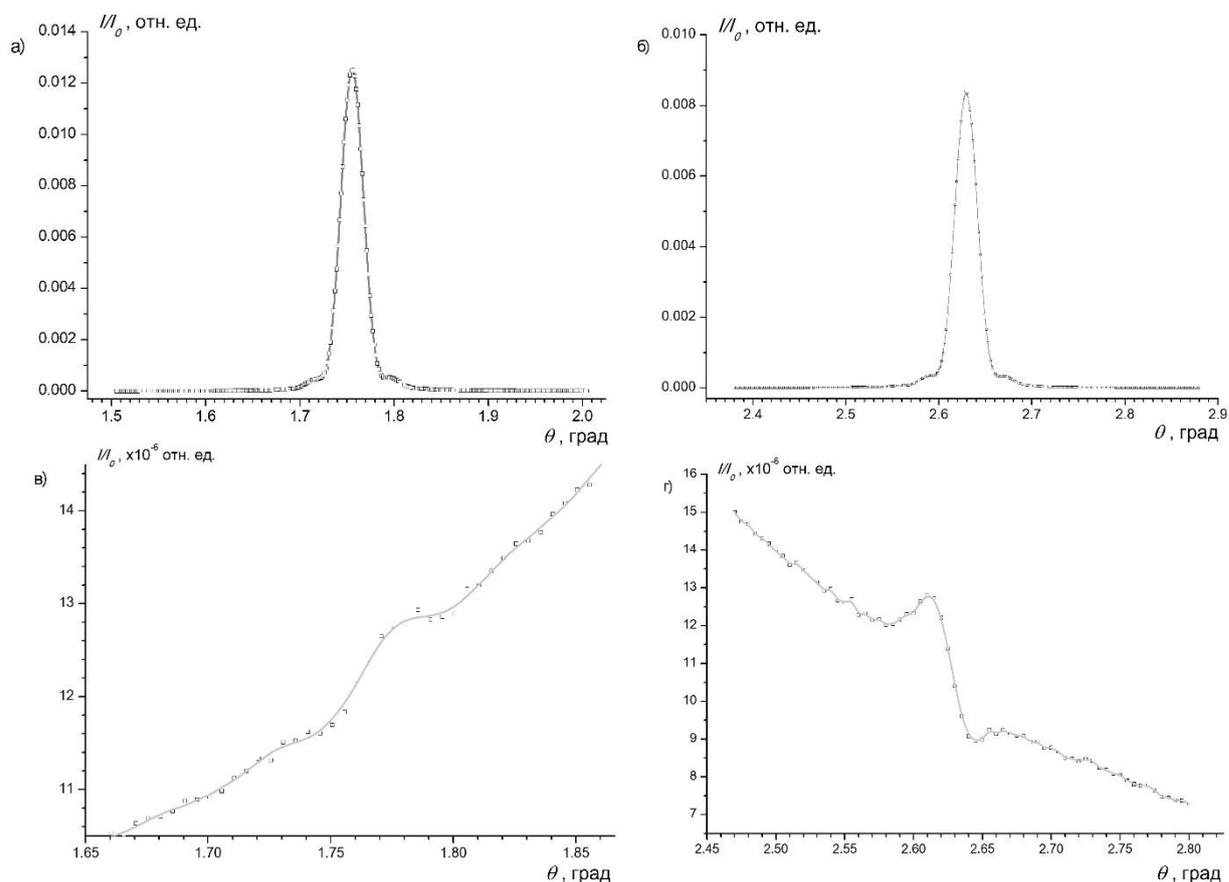


Рис. 2.9. Экспериментальные зависимости дифракционных отражений многослойной пленки стеарата свинца: а, б) – симметричные отражения 002 и 003, соответственно; в, г) – слабые асимметричные отражения 003 и 002 вблизи брэгговских положений для рефлексов 002 и 003, соответственно.

2.2.3.4. Обсуждение результатов

На основании анализа изотермы сжатия и литературных данных о структуре мы построили модель элементарной ячейки, которая представлена на рис. 2.10. Известно, что элементарная ячейка стеарата свинца является псевдоромбической (моноклинной, с углами близкими к 90°) [99]. При этом углеводородные цепи располагаются перпендикулярно подложке, а параметры ячейки могут

незначительно меняться в зависимости от условий получения пленок [100]. Из эксперимента по величине двойного угла дифракционного отражения 001 было определено, что при выбранных условиях нанесения пленки стеарата свинца параметр $c = 50 \text{ \AA}$. Кристалл имеет 40 периодов, таким образом, он представляет собой многослойную пленку толщиной около 2000 \AA .

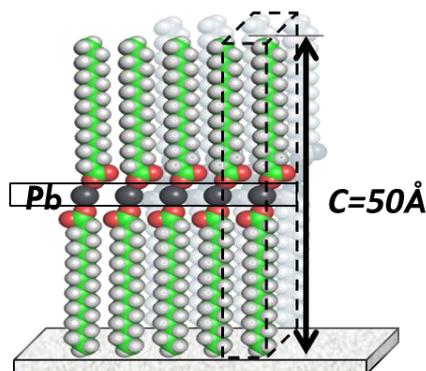


Рис. 2.10. Модель элементарной ячейки стеарата свинца на твердой подложке.

Химическая формула стеарата свинца имеет вид $(\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{16}\text{COO})_2\text{Pb}$, соответственно кристалл имеет 111 атомов в элементарной ячейке. Координаты атомов в элементарной ячейке, полученные из построенной модели, использовались для расчета структурных факторов, которые описывают фазовые соотношения при рассеянии рентгеновских лучей одной элементарной ячейкой кристалла.

Расчет теоретических кривых коэффициента дифракционного отражения (КДО) в сильный и слабый рефлексы для всех четырех случаев, измеренных экспериментально выполнялся в приближении падающей плоской монохроматической волны. Фурье компоненты поляризуемости (дифракционные параметры) вычислялись по программе, описанной в [101]. Важно отметить, что кристалл не имеет центра симметрии, и замена X_{n0} на X_{0n} и наоборот, вообще говоря, может дать разный ответ. Но все же оказалось, что действительные части слабо различаются, а мнимые части не так сильно влияют на результат. На *рис. 2.11* показаны расчетные кривые КДО для сильных отражений 001, 002 и 003. Кривая

001 показана как есть, а кривые 002 и 003 умножались на коэффициенты 4.56 и 8.92 соответственно для того, чтобы максимальные значения кривых совпадали. Как следует из рисунка, форма кривых для всех отражений меняется очень незначительно, что вполне ожидаемо, потому что толщина пленки меньше длины экстинкции (10).

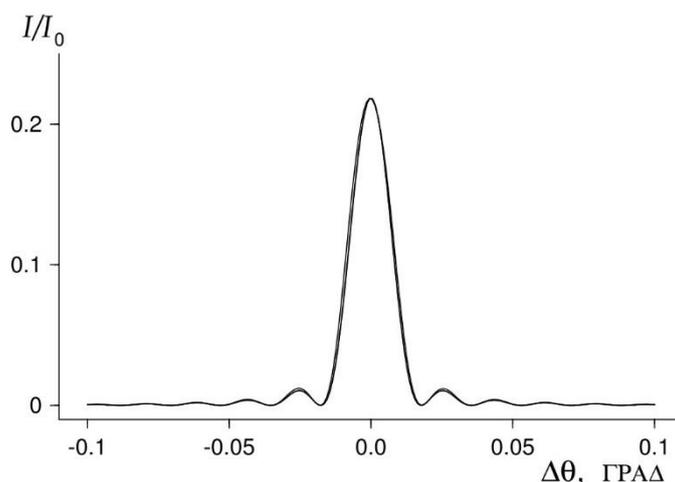


Рис. 2.11. Теоретические зависимости КДО многослойной пленки стеарата свинца для сильных симметричных отражений 001, 002 и 003. Подробности см. в тексте.

На *рис. 2.12* показаны кривые КДО для слабых отражений во всех четырех случаях, рассмотренных экспериментально. Вертикальная ось на четырех фрагментах подписана таким образом, что нижний индекс указывает слабое отражение, а верхний индекс – сильное отражение. Жирными линиями показаны кривые, рассчитанные с учетом дополнительной фазы, а тонкими линиями показаны кривые рассчитанные для идеального кристалла.

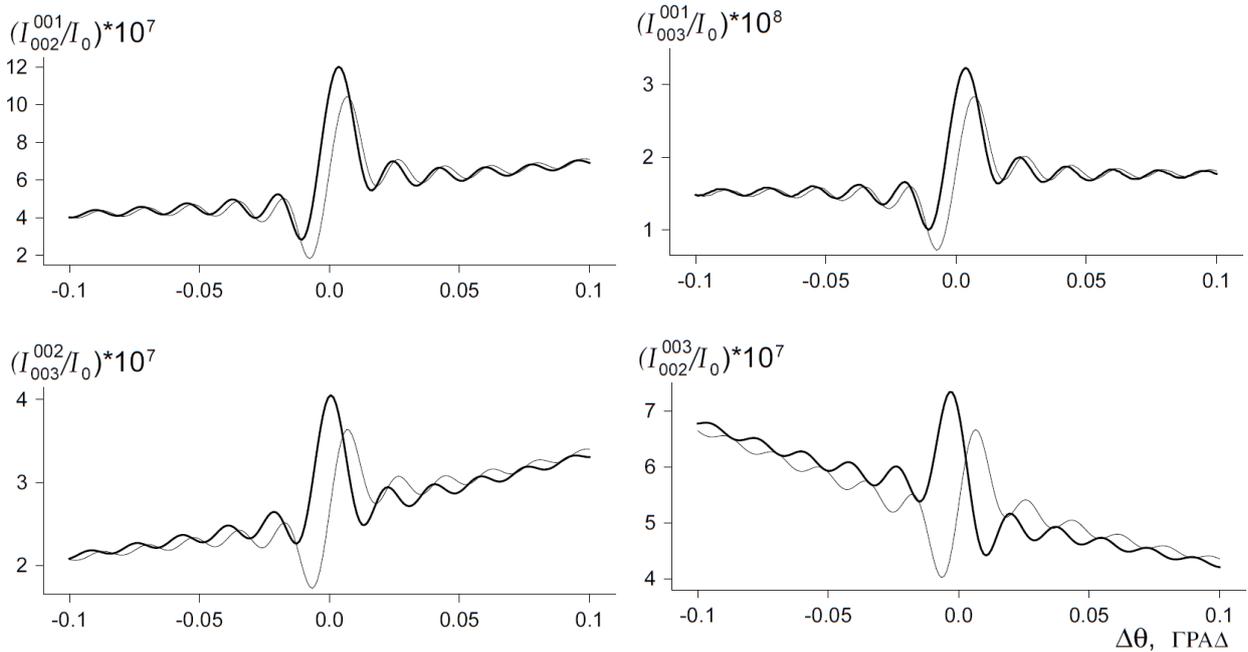


Рис. 2.12. Теоретические зависимости КДО многослойной пленки стеарата свинца для слабых асимметричных отражений 002 (001), 003 (001), 003 (002) и 002 (003). Первым указано слабое отражение, а в скобках – сильное отражение, вблизи брэгговского положения которого показана зависимость. Подробности см. в тексте.

Сравнение теоретических и экспериментальных кривых показывает, что экспериментальные кривые все же уширены и искажены инструментальной функцией, но это искажение невелико. Так полуширина сильного отражения 001 в эксперименте равна 0.03° против 0.02° на теоретической кривой. Легко заметить, что учет дополнительной фазы значительно улучшает согласие расчетных и экспериментальных кривых. В случаях 002 (001), 003 (001) и 003 (002) знак дисперсии кривых одинаков как с фазой, так и для идеальной пленки, но форма кривых с фазой значительно ближе к эксперименту.

Интересно, что в случае 002 (003) учет фазы позволяет правильно описать дисперсию кривой, которая близка к экспериментальной, в то время как для идеального кристалла она имеет другой знак. Выше, первым указан слабый рефлекс, а в скобках – сильный рефлекс. Таким образом, сравнение экспериментальных кривых с расчетными показывает, что полученная пленка не

является идеальной. Она деформирована, причем мы можем судить только о деформации приповерхностного слоя, на которую указывают кривые слабого отражения. Кривые сильного отражения такой информации не содержат.

Сравнение результатов позволяет предположить, что слой ионов свинца, находящийся в приповерхностной области пленки, в усреднении по области засветки сдвинут по вертикали таким образом, что возникает дополнительная фаза $\pi/4$ для отражения 001. То есть смещение равно $u = c/8$ в направлении внешней нормали. Смещение определяется с точностью до постоянной решетки, поэтому другим вариантом является $u = -7c/8$. При этом для отражения 002 фаза равна $\pi/2$, а для отражения 003 она равна $3\pi/4$.

Такой сдвиг ионов свинца в приповерхностных слоях можно объяснить одним из двух способов: 1) поверхность пленки неоднородна в латеральной плоскости, то есть имеются шероховатости, сопоставимые с толщиной бислоя стеарата свинца; 2) гидрофобные хвосты последнего слоя стеарата свинца наклонены по отношению к внешней нормали к поверхности под углом 40° (угол между гидрофобными хвостами молекул и подложкой составляет 50° , как показано на *рис. 2.14*). Однако в случае наличия большой шероховатости верхнего слоя, при изменении площади засветки образца менялся бы профиль дисперсионной кривой, чего в эксперименте не наблюдалось. Наиболее вероятным является второй случай: на границе раздела «объемный образец – воздух» молекулы стеарата свинца наклонены. Угол между углеводородными «хвостами» стеарата свинца в модели верхнего слоя, представленной на *рис. 2.14*, соответствует приближению одиночной молекулы, не находящейся в кристалле. Таким образом, можно сделать вывод о том, что структуры приповерхностного слоя отличается от структуры слоев, находящихся в объеме пленки.

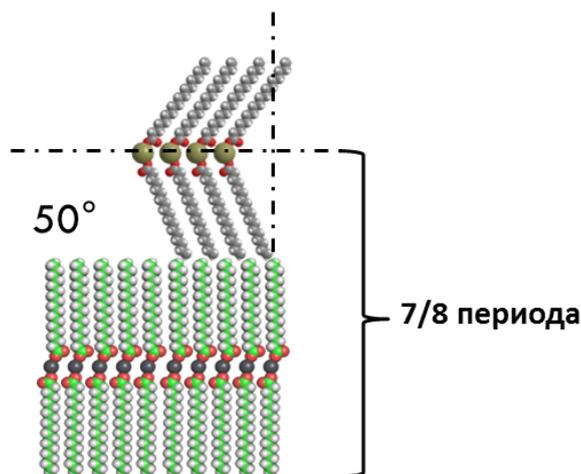


Рис. 2.13. Модель многослойной периодической пленки стеарата свинца. Схематично показано изменение структуры приповерхностного слоя многослойной пленки, обусловленное наклоном молекул верхнего слоя относительно внешней нормали к ее поверхности.

Поскольку в данном эксперименте мы регистрируем сигнал, усредненный по площади засветки, для более точного определения, какой именно из двух возможных вариантов нарушения совершенства приповерхностных слоев реализуется в данном случае, необходимо провести дополнительное исследование.

2.3. Получение кристаллов лизоцима тетрагональной сингонии. Поиск условий кристаллизации

Кристаллы лизоцима тетрагональной сингонии в данной работе получали методом диффузии в парах (см. п. 1.2.2).

2.3.1. Подготовка растворов для кристаллизации

Для приготовления растворов для кристаллизации использовали лизоцим из куриного яйца (HEWL) фирмы Sigma-Aldrich (CAS #12650-88-3) без дополнительной очистки и хлорид натрия (CAS# 7647-14-5) в качестве осадителя с высоким классом чистоты фирмы Helicon. Все растворы готовили на основе ультрачистой воды Millipore (18 МОм*см).

Необходимое количество белка и осадителя растворяли в 0.1 М натрий-ацетатном буфере, pH=4.55, Helicon (CAS #6131-90-4). Затем проводили фильтрацию растворов от крупных частиц с помощью мембранных фильтров

(Millex) с диаметром пор 0.22 мкм. Далее раствор белка подвергался дополнительной очистке для исключения нахождения в растворе агрегатов молекул, которые могли бы повлиять на результат кристаллизации. Для этого раствор центрифугировали в течении 10 минут с частотой 10000 оборотов в минуту. Изначально готовили растворы высокой концентрации, затем их доводили до нужной концентрации. Концентрацию растворов белка проверяли с помощью спектров поглощения на длине волны 280 нм в кварцевых кюветах (длина оптического пути 1 см) на спектрофотометре Cary 5000 (Varian, Австралия).

2.3.2. Процедура загрузки ячейки. Скрининг условий роста

Рост кристаллов происходил в специальных планшетах Hampton research *рис. 2.14а*. На силиконизированное покровное стекло наносили каплю белка объемом 3 мкл и осадителя объемом 3 мкл. В резервуар ячейки для кристаллизации наливали 500 мкл осадителя. Ячейки закрывали покровными стеклами. Края ячейки предварительно были смазаны вакуумной смазкой для обеспечения лучшей герметичности.

При скрининге условий кристаллизации концентрация белка в капле составляла 10 мг/мл, 20 мг/мл, 30 мг/мл, 40 мг/мл, а концентрация осадителя в капле – 5 мг/мл, 15 мг/мл, 25 мг/мл, 35 мг/мл, 45 мг/мл, 55 мг/мл. Схема эксперимента представлена на *рис. 2.14б*.

После загрузки планшет оставляли при температуре 18°C в течение 7 дней. Ежедневно появившиеся кристаллы исследовали с помощью оптического микроскопа Eclipse LV150 (Nikon, Япония).

а)

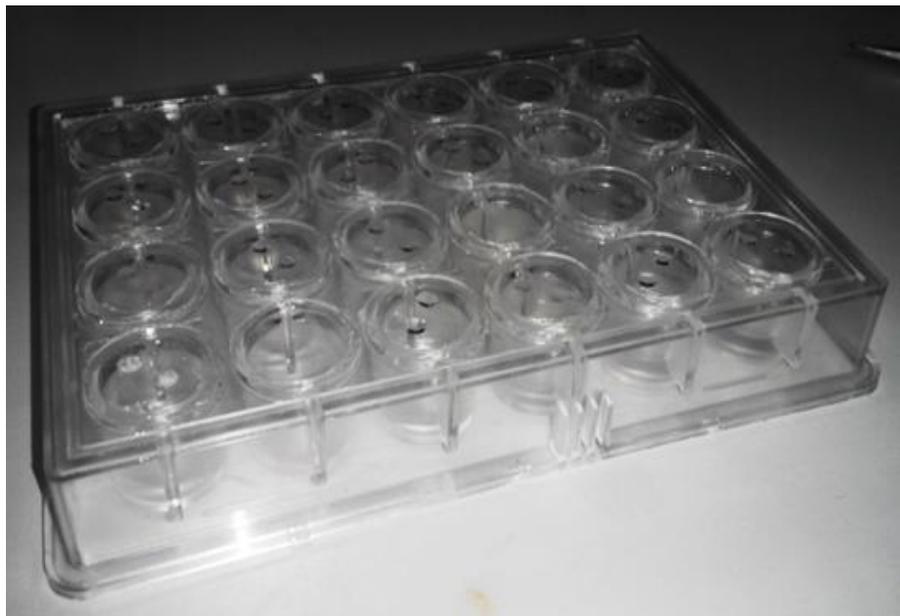


Рис. 2.14. а) Пластика для кристаллизации методом диффузии в парах Hampton research; б) Схема эксперимента по скринингу условий кристаллизации в пластике.

2.4. Разработка герметичной ячейки для исследования упорядоченных белковых молекул на кристаллической подложке

Для характеристики белковых кристаллов, выращенных на подложках, традиционно применяют метод рентгеноструктурного анализа, однако для этого

необходимо снять белковый кристалл с подложки и, поместив в специальный криораствор, заморозить. Для того, чтобы проводить неразрушающие исследования структуры белкового кристалла непосредственно на подложке, а также для возможности изучения *in situ* процессов роста и деградации кристаллов, в ИК РАН была разработана специализированная кристаллизационная ячейка с замкнутой атмосферой (рис. 2.15).

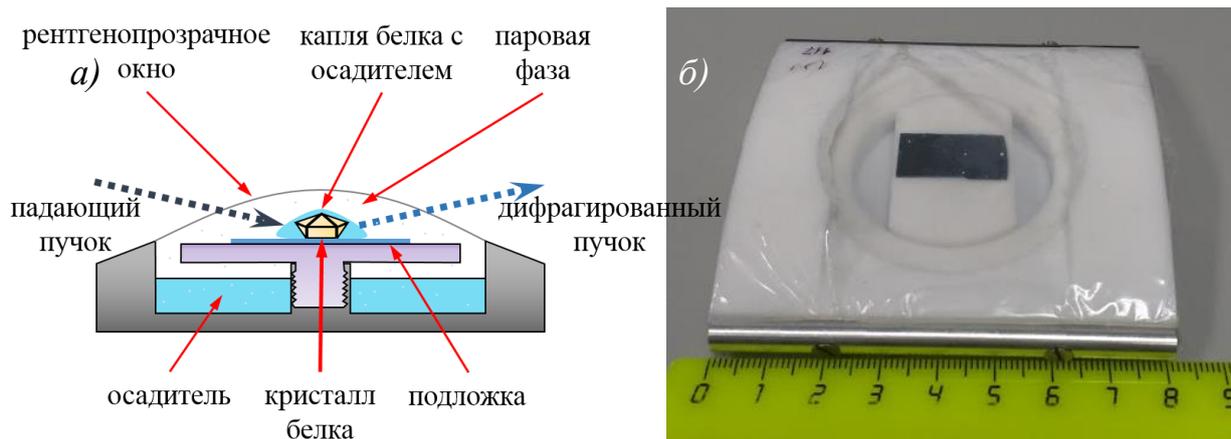


Рис. 2.15. Разработанная герметичная кристаллизационная ячейка для получения белковых кристаллов на кристаллической подложке с рентгенопрозрачным окном. а) схематическое изображение; б) внешний вид.

Ячейка выполнена из фторопласта-4 (политетрафторэтилена) размером $70 \times 80 \times 15 \text{ мм}^3$ (рис. 2.15) и состоит из двух основных частей: корпуса и чаши, фиксированной на основании. Нижняя часть корпуса позволяет крепить ячейку на гониометр рентгеновского дифрактометра в горизонтальной геометрии, когда плоскость дифракции располагается вертикально (в частности, на синхротронной станции). Конструкция ячейки позволяет реализовать различные экспериментальные схемы: дифракцию в скользящей геометрии, сильно асимметричную дифракцию (диапазон 2θ до 180°); схемы в геометрии полного внешнего отражения (в области малых углов, порядка нескольких критических α_c); *in-plane* и *out-of-plane* геометрии (диапазон по $2\theta/\chi$ до 35°). Используемые материалы и конструкция ячейки рассчитаны на обеспечение химической чистоты внутреннего объема ячейки и ее герметичности в течение, примерно, четырех

недель. Верхняя часть внутреннего объема представляет собой окно из материала прозрачного для света (что необходимо для осуществления контроля роста кристаллов методами оптической микроскопии) и слабо поглощающего в рентгеновском диапазоне.

Таким образом, ячейка обеспечивает возможность получения изображений на оптическом микроскопе и проведения рентгенодифракционных *in situ* – исследований и измерения, например, кривых качания кристаллов в процессе их роста.

Рост кристаллов. Для проверки герметичности ячейки и проверки реализации кристаллизационных условий методом диффузии в парах (*n. 1.2.2*) в варианте «сидячей капли» [102] были получены кристаллы лизоцима тетрагональной сингонии. Подложки размещались в центральной зоне пьедестала кристаллизационной ячейки, возвышающегося над резервуаром с осадителем. Использовались подложки из монокристаллов кремния (Si) как с эпитаксиальной структурой, так и с гладкой поверхностью. Температура в помещении, в котором проводился процесс кристаллизации, поддерживалась постоянной с точностью 0.5°C и составляла 19 °C. На подложки Si, расположенные на пьедестале, при помощи микропипеток наносили раствор белка в буфере, а затем раствор осадителя по 3 мкл соответственно. Также 500 мкл раствора осадителя наносили по краю пьедестала с подложками и в специальном резервуаре. В результате полученные кристаллы имели ту же огранку и бóльшие размеры, чем полученные в *n.2.1*. Выросшие кристаллы оставались без видимых дефектов на протяжении почти месяца.

Процесс формирования кристаллов занимал 48–96 ч, в то время как кристаллы максимальных размеров вырастали через ~7–9 суток (~190 ч) после начала кристаллизации. Линейные размеры кристаллов составляли от 350 до 800 мкм, высота кристаллов составляла в среднем 300 мкм (от 150 до 450 мкм).

Первоначально ячейка с каплями растворов белка и осадителя помещалась в оптический микроскоп для наблюдения процесса зарождения и начального этапа кристаллизации лизоцима. На указанных стадиях кристаллизации фиксировались размеры, грани кристаллов, их количество в каждой капле и т.д. В дальнейшем микроскопические изображения кристаллов получали перед каждой серией рентгенодифракционных измерений.

Основной задачей рентгенофазового анализа является идентификация различных фаз в смеси кристаллических веществ и определение их относительной ориентации на основе создаваемой ими дифракционной картины. Наиболее часто применяемый практический метод рентгенофазового анализа – метод порошка. Он является одним из основных в химии твёрдого тела в силу его простоты и универсальности. Рентгеновский сфокусированный пучок падает на образец под некоторым углом θ , детектор располагается под углом 2θ к падающему пучку. В эксперименте регистрируют интенсивность дифрагированного пучка, изменяя угол падения, при этом угол между детектором и падающим пучком остается равным 2θ .

Данный метод позволяет определить межплоскостное расстояние по измеренному углу рассеяния (угол между падающим и дифрагированным пучками), идентифицировать вещество по межплоскостным расстояниям, найти и уточнить параметры элементарной ячейки, произвести качественный и количественный фазовый анализ, определить микронарушения структуры, а также чистоту вещества, наличие примесей. Исследования структуры белковых растворов.

Реализация рентгенодифракционных экспериментов. На стадии формирования кристаллов, начиная с размеров $\sim 200\text{--}300$ мкм, кристаллизационная ячейка устанавливалась на гониометр рентгеновского дифрактометра и проводилась серия рентгенодифракционных *in situ*-экспериментов. Измерения проводились на

протяжении всего «цикла жизни» кристаллов, вплоть до деградации и разрушения кристаллической структуры.

Рентгенодифракционные эксперименты выполнялись на дифрактометре SmartLab Rigaku [103] в стандартной схеме высокоразрешающей двухкристальной дифрактометрии в геометрии на отражение. Дифрактометр оснащен источником излучения с вращающимся молибденовым анодом мощностью 9 кВт. Интенсивность дифрагированного пучка регистрировалась сцинтилляционным (NaI) детектором. Пучок формировался с использованием симметричного двукратного монохроматора Ge (220), после чего устанавливались щели, ограничивающие падающий пучок в плоскости дифракции (0.03–1.00 мм) и поперечном направлении (5.0, 2.0 или 0.5 мм). Это позволяло использовать спектральную линию $\text{MoK}_{\alpha 1}$ ($\lambda = 0.70932 \text{ \AA}$), а также варьировать пространственное разрешение (локальность) измерений при проведении экспериментов. При этом имелась возможность регулировки двух приемных щелей, расположенных перед детектором на расстоянии 113.0 мм друг от друга, в диапазоне 0.03–20.00 мм.

Также дифрактометр оснащен специальной XY-подвижкой (диапазон перемещения охватывает всю подложку), что позволило установить исследуемый образец относительно пучка в требуемом положении с точностью 0.01 мм. Указанные размеры щелей и весьма точное XY-позиционирование подложки относительно пучка позволяют сформировать пятно засветки $\sim 0.1 \times 0.5 \text{ мм}^2$ и локализовать отдельные кристаллы для рентгенодифракционных *in situ*-исследований.

После установки ячейки на гониометре измерения проводились по следующей схеме. Рентгеновский пучок на образце позиционировался так, чтобы отражение осуществлялось от подложки Si, не захватывая капли с белком (k1) или осадителем (k2). В этом положении проводилась стандартная юстировка ориентации кристаллической подложки для проведения измерений методом высокоразрешающей двухкристальной дифрактометрии [104].

2.5. Исследование растворов белков

Для исследования структуры белкового раствора – применяли традиционные для исследования структуры белковых молекул в растворах, в условиях, приближенных к существующим в живых организмах, методы рассеяния: динамическое рассеяние света и малоугловое рассеяние рентгеновских лучей.

2.5.1. Исследование растворов белков методом динамического рассеяния света

Метод динамического рассеяния света (ДРС) (также известен как метод фотон-корреляционной спектроскопии или квазиупругого рассеяния света) является одним из наиболее распространенных методов, используемых для определения размера эмульсий, мицелл, полимеров, белков, наночастиц или коллоидных частиц, диспергированных или растворенных в жидкости. Проходящий через среду со сферическими броуновскими частицами монохроматический луч света (лазерный луч), попадая на движущуюся частицу, вызывает изменение частоты (Доплеровский сдвиг), интенсивности и направления движения света (*рис. 1.16*). Это изменение зависит от размера частицы. Измеряя и анализируя флуктуацию интенсивности рассеяния света (а именно частоту осцилляций интенсивности света относительно среднего значения, используя автокорреляционную функцию), можно вычислить коэффициент диффузии, рассчитать распределение частиц по размерам и дать описание движения этой частицы в растворе (в среде).

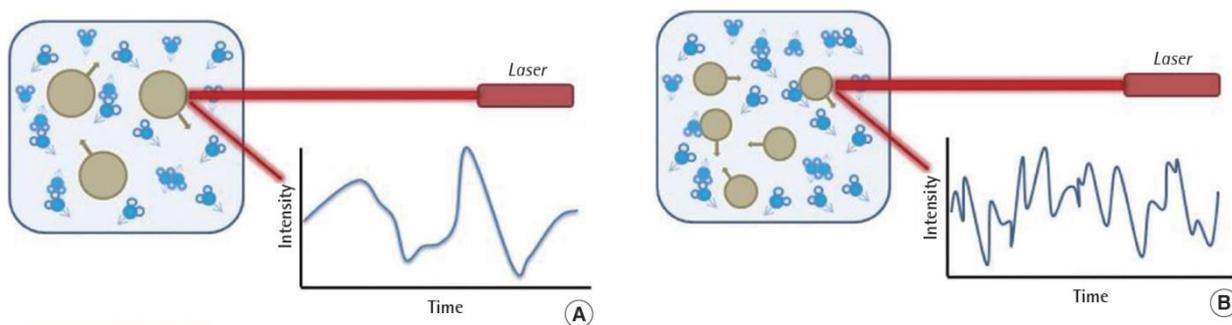


Рис. 1.16. Гипотетическое динамическое рассеяние света в двух вариантах: а) частицы большего размера; б) частицы меньшего размера. [105]

Разрешающая способность данного метода от нескольких нанометров до нескольких микрон. Метод ДРС используют для исследования монодисперсных растворов слабой концентрации.

Этот метод имеет ряд преимуществ: прежде всего короткое время проведения эксперимента, быстрая настройка и почти полностью автоматизированный процесс измерений, позволяет использовать данный метод для проведения обычных (стандартных, повседневных, рутинных) измерений, не имея большого опыта. Кроме того, этот метод исследования является достаточно недорогим.

Коммерческие приборы, определяющие размеры частиц, в основном работают только в одном режиме: угол рассеяния 90° и длина волны $\lambda = 675$ нм (красный свет). Обычно в таких системах пренебрегают зависимостью от концентрации рассеивающих частиц. Использование более сложного экспериментального оборудования (проектор, коротковолновый источник света), приводит не только к усложнению метода и увеличению его стоимости, но и к значительному расширению его возможностей.

Несмотря на то что с помощью ДРС, в принципе, можно отличить мономер белка от димера в растворе, для определения мелких олигомеров в растворе данный метод является гораздо менее точным, чем классическое рассеяние света или скорость оседания. Преимуществом использования ДРС является возможность анализа образцов, содержащих ярко выраженное распределение сильно различающихся по молекулярной массе видов частиц (например, мономера белка и различных размеров его агрегатов, отличающихся более чем в 2,5 раза!), а также для обнаружения очень небольших количеств (в большинстве случаев $<0,01\%$) частиц с высокой молекулярной массой. Кроме того, в отличие от метода хроматографии при измерении размеров агрегатов белка методом ДРС, хроматографического разделения не происходит, а значит, не происходит потеря агрегатов белка (как это бывает в хроматографической колонке).

Кроме того, с помощью ДРС можно также измерить абсолютные величины некоторых параметров, представляющих интерес, таких как молекулярная масса, радиус инерции, константы поступательной диффузии и так далее. Тем не менее, анализ может быть затруднен из-за тепловых колебаний молекул в растворе (отклонения молекул от своего среднего положения) а также для нежестких макромолекул.

В данной работе методом ДРС были исследованы растворы лизоцима и лизоцима с осадителем в условиях кристаллизации тетрагональной формы лизоцима. Измерения проводили на приборе Zetasizer Nano – ZS (Malvern Instruments Ltd.) в ячейке с поддержанием температуры $\pm 0,5^\circ\text{C}$ на длине волны $\lambda = 633 \text{ нм}$, при угле рассеяния 173° (рис. 2.17).

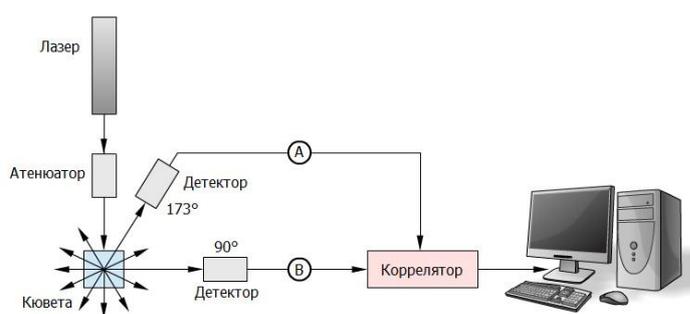


Рис. 2.17. Схема эксперимента (слева) и внешний вид прибора Zetasizer Nano – ZS (справа) для измерения рассеяния света от раствора белка.

2.5.2. Исследование растворов белков методом малоуглового рассеяния рентгеновских лучей на дифрактометре АМУР-К

Малоугловое рассеяние рентгеновского лучей (МУРР) и нейтронов (МУРН) – одни из наиболее эффективных дифракционных методов экспериментального исследования органических наноструктур в растворах [106]. Важнейшей особенностью метода малоуглового рассеяния является возможность анализа внутренней структуры разупорядоченных систем. Зачастую его применение – единственный способ получения структурной информации о системах с хаотическим распределением неоднородностей плотности.

Наличие в полидисперсной системе равномерно распределенных неоднородностей, размеры которых лежат в диапазоне от 1 до 100 нм, приводит к рассеянию рентгеновских лучей под малыми углами ($< 30^\circ$). При исследовании зависимости интенсивности рассеянного излучения от угла рассеяния можно определить такие характеристики наноразмерных элементов, как их форма и размер, фазовый состав, внутренняя структура, ориентация и распределение.

Источниками рентгеновского излучения в экспериментах служат как рентгеновские трубки (длина волны излучения $\lambda = 0,1-0,2$ нм), так и синхротронное излучение ($\lambda = 0,03-0,35$ нм). Монохроматичность узкого пучка первичного излучения достигается с помощью специальных коллимационных систем. Проходя сквозь образец, пучок рассеивается и регистрируется при помощи детекторов (рис. 2.18.). Размер и форму частиц находят на основе зависимости интенсивности рассеянного излучения от угла рассеяния.

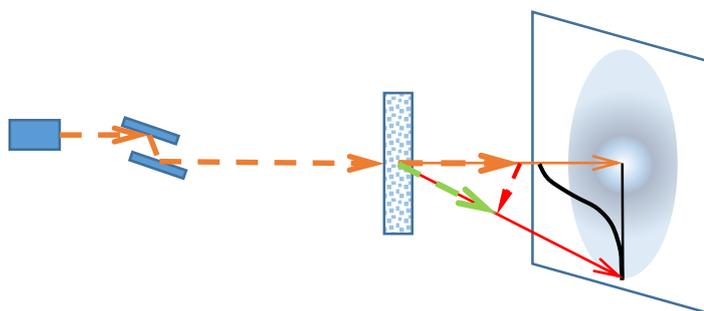


Рис. 2.18. Схема эксперимента для измерения малоуглового рассеяния рентгеновских лучей от раствора белка.

С помощью МУРР можно получать информацию не только о размерах и форме частиц, но также и о структуре неупорядоченных или частично упорядоченных систем: белковых молекул, поверхностно-активных веществ, различных дисперсных систем (например, пигментов в краске, клеток крови), эмульсий, волокон, катализаторов, полимеров и нанокомпозитов, жидких кристаллов.

Методом МУРР были исследованы растворы лизоцима и лизоцима с осадителем в условиях кристаллизации тетрагональной формы лизоцима.

Для изучения состояние молекул лизоцима в растворе на начальной стадии процесса кристаллизации, исследуемые образцы помещали в кварцевые капилляры диаметром 1 мм со стенками толщиной 10 мкм (рис. 2.19).

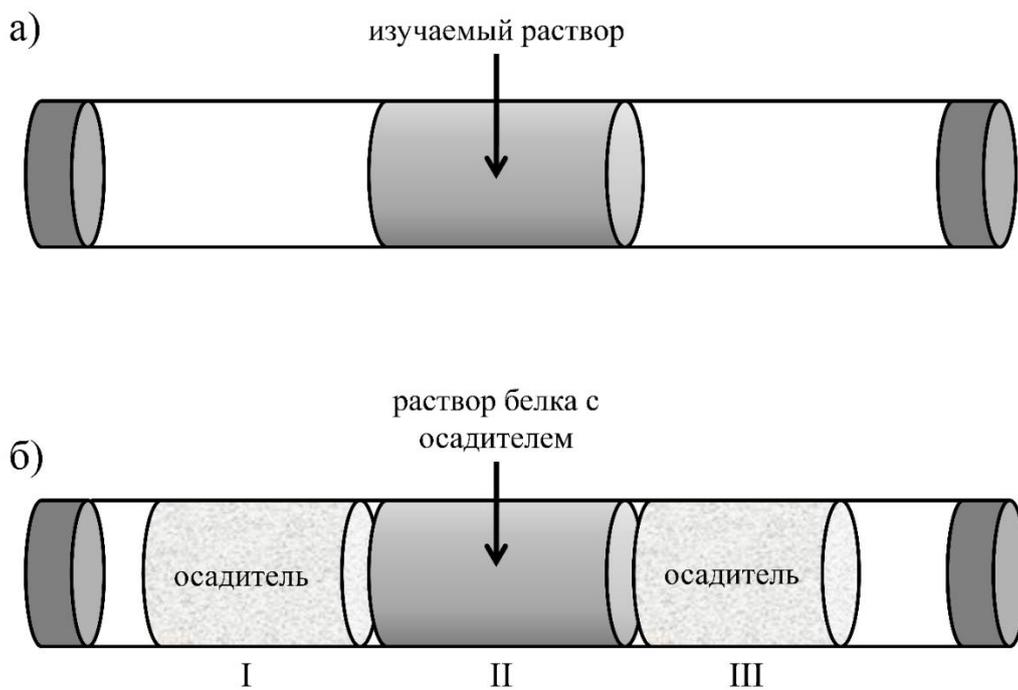


Рис. 2.19. Схемы загрузки измерительного капилляра. а) – для изучения раствора белка или раствора белка с осадителем, б) – для изучения раствора белка с осадителем в кристаллизационной ячейке.

Исследования проводили при двух типах загрузки капилляра. В первом случае в капилляр помещали только один раствор (рис. 2.19а) – осадителя, белка или белка с осадителем. Во втором случае моделировали процесс кристаллизации белка методом диффузии паров (рис. 2.19б), для этого в центр капилляра (кристаллизационной ячейки) (II) помещали концентрированный раствор белка (40 мг/мл) с осадителем (25 мг/мл), а по краям (I, III) – раствор осадителя (50 мг/мл). В обоих случаях с двух сторон после загрузки капилляры плотно закрывали.

Измерения интенсивности рассеяния проводились на автоматическом малоугловом рентгеновском дифрактометре «АМУР-К» [107] (рис. 2.20) с линейным беспараллаксным однокоординатным позиционно-чувствительным

детектором ОДЗМ при фиксированной длине волны излучения λ , равной 0.1542 нм (CuK $_{\alpha}$ -линия острофокусной трубки с медным анодом, монохроматор из пиролитического графита), и коллимационной системой Кратки. Сечение рентгеновского пучка на образце составляло 0.2×8 мм.



Рис. 2.20. Внешний вид дифрактометра АМУР-К для измерения малоуглового рассеяния рентгеновских лучей от раствора белка.

Капилляры устанавливали в вакуумную камеру дифрактометра на расстоянии 700 мм от камеры детектора. Время измерений одного образца составляло 1 час. Экспериментальные данные нормировались на интенсивность падающего пучка, после чего в них вводилась поправка на коллимационные искажения. Все расчеты проводили по данным с введенной поправкой. В аналогичных условиях проводили измерения растворителя, интенсивность рассеяния от которого вычитали из данных рассеяния образцами.

2.5.3. Исследование растворов белков методом малоуглового рассеяния рентгеновских лучей на синхротронной станции ДИКСИ

Для более детального изучения взаимодействия молекул белков в кристаллизационном растворе и определения, что является строительным блоком белкового кристалла, необходимо использовать более мощное излучение и исследовать кристаллизационные растворы при условиях, когда кристаллизация не происходит, когда она затруднена и при оптимальных условиях кристаллизации. Подбирать условия кристаллизации можно путем изменения концентраций белка и осадителя, однако в таком случае исследуемый раствор будет всегда разным. Другой путь изменения условий – варьирование температуры раствора. При этом

изменяется растворимость белка (в данном случае лизоцима [59,108,109]) и, как следствие, меняется фазовое состояние кристаллизационного раствора.

Дальнейшие измерения проводили на синхротронной станции ДИКСИ (НИЦ «Курчатовский институт», г. Москва) [110] при фиксированной длине волны 1.62 Å. Картины рассеяния регистрировали высокоскоростным двумерным детектором Pilatus3 1M при расстоянии образец-детектор 300 мм и времени экспозиции 5 мин. Сечение пучка, сформированного по трехщелевой схеме коллимации, было равно 0.4x0.6 мм. Калибровку угловой шкалы измерений проводили путем обработки дифракционной картины от поликристаллического порошка бегената серебра [111]. Для интегрирования двумерных картин рассеяния и первичной обработки использовали программы Fit2D [112] и Primus (из пакета ATLAS) [113].

Образцы помещали в тонкостенные стеклянные капилляры диаметром 1.5-2 мм и толщиной стенки 0.01 мм. Для реализации изменения кристаллизационных условий в растворе использовали специальную термостатируемую ячейку (рис. 2.21): капилляры помещали в латунный держатель с проточным теплоносителем, подключенный к водяному термостату.



Рис. 2.21. Специальная термостатируемая ячейка, подключенная к водяному термостату, для исследования белковых растворов при различных кристаллизационных условиях.

Температуру контролировали цифровым термодатчиком, расположенным в непосредственной близости от образца. Перед началом измерений образец выдерживали при заданной температуре в течение 5 минут. Путем сопоставления

кривых МУРР от белковых растворов, снятых через 5, 10, 20 минут от достижения заданной температуры, было выявлено отсутствие каких-либо эффектов, связанных с радиационными повреждениями образца, поскольку поперечное сечение первичного пучка было достаточно большим, а его интенсивность не превышала 10^9 фотонов/с.

2.6. Заключение

Для исследования особенностей различных стадий кристаллизации лизоцима был проведен скрининг условий, выбраны оптимальные условия кристаллизации и получены кристаллы белка.

Для исследования структуры белкового раствора было проведено исследование кристаллизационного раствора методом динамического рассеяния света. Данный метод показал общий характер изменения размеров частиц в растворе при условиях кристаллизации. Однако существующий на данный момент математический аппарат для данного метода не позволяет определить структуру раствора и распределение частиц по размерам.

Также был применен метод малоуглового рассеяния рентгеновских лучей, который позволил изучить структуру белкового раствора при условиях кристаллизации. Предварительные эксперименты проводили на лабораторном дифрактометре в ИК РАН. Для более детального изучения взаимодействия молекул белков в кристаллизационном растворе использовали более мощное излучение, эксперименты проведены на синхротронной станции ДИКСИ, НИЦ КИ. Для варьирования температуры изучаемого раствора и изменения условий кристаллизации была собрана специальная термостатируемая ячейка, которая позволила проводить эксперименты в нужном диапазоне температур.

Для исследования *in situ* процессов роста белковых кристаллов непосредственно на подложках неразрушающими методами была разработана специализированная кристаллизационная герметичная ячейка с

рентгенопрозрачным окном. Такая ячейка позволяет проводить *in situ* исследования методом оптической микроскопии и рентгеновскими методами.

Для исследования структуры планарных органических пленок была разработана модификация метода стоячих рентгеновских волн без регистрации вторичного излучения при многоволновом взаимодействии различных порядков рефлексов одной системы плоскостей. Метод был апробирован на многослойной пленке стеарата свинца. Показано, что структура верхнего слоя значительно отличается от структуры объема образца.

ГЛАВА 3. ПОЛУЧЕНИЕ ТОНКОПЛЕНОЧНЫХ СТРУКТУР БЕЛКОВ ЦИТОХРОМА С И ЛИЗОЦИМА

Несмотря на то, что в ряде работ было дано достаточное подробное описание поведения ЦитС с липидными монослоями, данному явлению не было дано физической интерпретации, не были исследованы упругие свойства полученных пленок. В настоящей работе проводится систематическое исследование формирования пленок на основе ЦитС-КЛ путем измерения кинетики его образования и изотерм поверхностное давление-площадь. Особое внимание уделяется сравнению данных в случае природного и синтетического КЛ, полученных для комплексов при разных начальных условиях формирования.

3.1. Влияние начальной концентрации цитохрома *c* в субфазе на процесс адсорбции на монослое кардиолипина ($\pi_0=5$ мНм⁻¹)

Пример получаемых зависимостей поверхностного давления от времени показан на *рис. 3.1*. В соответствии с моделью псевдо-первого порядка кинетики адсорбции [114] и предполагая, что увеличение давления пропорционально количеству белка, встроившегося в монослой, можно получить уравнение:

$$\pi = \pi_0 + \Delta\pi_\infty[1-\exp(-\beta t)], \quad (3.1)$$

где π_0 – выбранное начальное давление, $\Delta\pi_\infty$ – конечное приращение поверхностного давления за бесконечно долгое время, а β – константа псевдопервого порядка скорости взаимодействия цитохрома *c* с кардиолипином, *t* – время после добавления цитохрома *c*. При избытке цитохрома $\beta = k/c_0$, а при избытке липида $\beta = k/l_0$, где c_0 – начальная концентрация цитохрома *c* в водной фазе, а l_0 – начальное количество липида в монослое, *k* – бимолекулярная константа реакции.

Для определения параметров адсорбции все кривые обрабатывали функцией (3.1), используя стандартные алгоритмы программы OriginPro.

Величина $d\pi/dt$ на начальном участке кривой (см. *рис. 3.1*) характеризует скорость взаимодействия добавленного ЦитС с монослоем КЛ. С течением времени

(по мере связывания белка с липидом) скорость убывает, так как на липидном монослое снижается количество мест связывания с ЦитС.

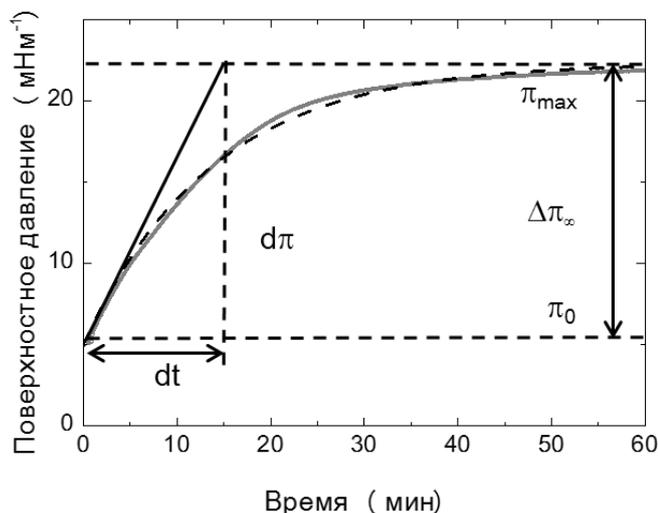


Рис. 3.1. Кинетика изменения давления при введении ЦитС (250 нМ) под монослой 27.4 нмоль ТОКЛ. Серая сплошная кривая – экспериментальные данные, черная штриховая линия – аппроксимация экспериментальных данных

На рис. 3.2 представлены параметры обработки кривых кинетики адсорбции для монослоев БКЛ и ТОКЛ, полученные при разной концентрации ЦитС в субфазе.

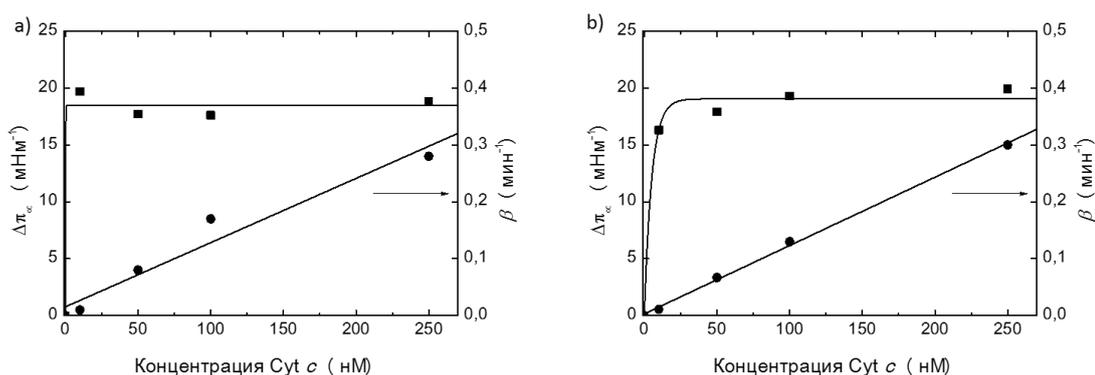


Рис. 3.2. Параметры кинетики адсорбции, полученные при обработке данных с помощью уравнения 3.1, для различной концентрации белка в субфазе. а) 26.4±0.5 нмоль монослой БКЛ; б) 28.4±1.0 нмоль монослой ТОКЛ. $\Delta\pi_{\infty}$ – конечное приращение поверхностного давления; β – константа псевдо-первого порядка.

Максимальное увеличение поверхностного давления во всех экспериментах было одинаковым и составляло $18.6 \pm 1,0$ мНм⁻¹ для БКЛ и 18.1 ± 1.8 мНм⁻¹ для ТОКЛ. То есть при заданном начальном давлении количество встроенного ЦитС в монослой не зависит от вводимого количества белка и одинаково как для природного, так и для синтетического КЛ.

Вероятно, именно количество мест связывания (то есть количество липидов) в липидном монослое является единственным ограничивающим фактором для связывания белка, а не концентрация белка, так как ЦитС был в избытке во всех экспериментах. Примечательно, что это количество одинаково для натурального и синтетического КЛ. В противоположность этому, скорость связывания белка (β) была пропорциональна его концентрации в субфазе, по крайней мере, до концентрации 100 нМ, и снова приблизительно равна в случае натурального и синтетического ФЛ (рис.3.2).

3.2. Влияние начального давления монослоя кардиолипина на процесс адсорбции цитохрома c

Приведенные выше данные были получены при малых значениях исходного поверхностного давления в липидном монослое (5 мНм⁻¹). При более высоких исходных давлениях характер кинетических кривых существенно меняется (рис. 3.3). На рис. 3.3 приведены результаты исследования влияния начального давления π_0 на кинетику встраивания ЦитС при одинаковом количестве липида (l_0) и белка (c_0).

Прежде всего, максимальный прирост давления в присутствии белка ($\Delta\pi_\infty$) уменьшался с увеличением начального давления липидного монослоя (π_0), причем зависимость была линейной. Ранее эта закономерность наблюдалась Квином и сотрудниками в случае монослоев ФЛ [37,38], включая БКЛ [37], но не получила количественного объяснения. На самом деле, $\Delta\pi_\infty$ (Нм⁻¹) численно равна изменению плотности поверхностной энергии ΔW (Джм⁻²) при встраивании ЦитС в липидный монослой, так что можно считать, $\Delta\pi_\infty$ является энергией связи белка.

Эта энергия уменьшается при повышении начального давления монослоя, потому что меньшее число белковых молекул может встроиться в липидный монослой. Для лучшего понимания этих закономерностей необходимо исследовать изотермы «давление-площадь», полученные для КЛ и пленок комплекса ЦитС-КЛ.

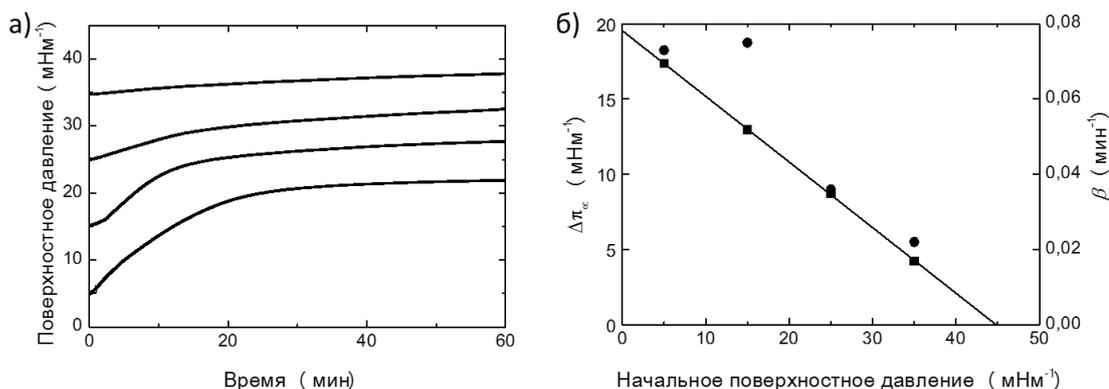


Рис. 3.3. а) Кинетика изменения давления для монослоя ТОКЛ(27нмоль±3), сформированного до различного начального давления π_0 , и последующем введении ЦитС (50 нМ) в субфазу. б) Зависимость прироста поверхностного давления пленки ($\Delta\pi_\infty$), константы псевдо-первого порядка (β) от начального поверхностного давления монослоя (π_0).

3.3. Анализ изотерм сжатия

Для изучения упругих свойств образованной белково-липидной пленки, для всех экспериментов, описанных выше, были получены π -A изотермы после того, как было достигнуто плато на кривой кинетики адсорбции. На *рис. 3.4* представлены изотермы ТОКЛ до (1) и после (2) введения разного количества ЦитС под монослой при различном поверхностном давлении. Следует отметить, что повторно полученные циклы «сжатия-растяжения» имеют одинаковую форму, что предполагает обратимость и повторяемость процесса; На *рис. 3.4* показан только первый цикл. Во всех экспериментах изотермы сжатия и растяжения для монослоев КЛ были одинаковыми (кривые слева (1) на *рис. 3.4а-з*), что характерно для ФЛ [115,116].

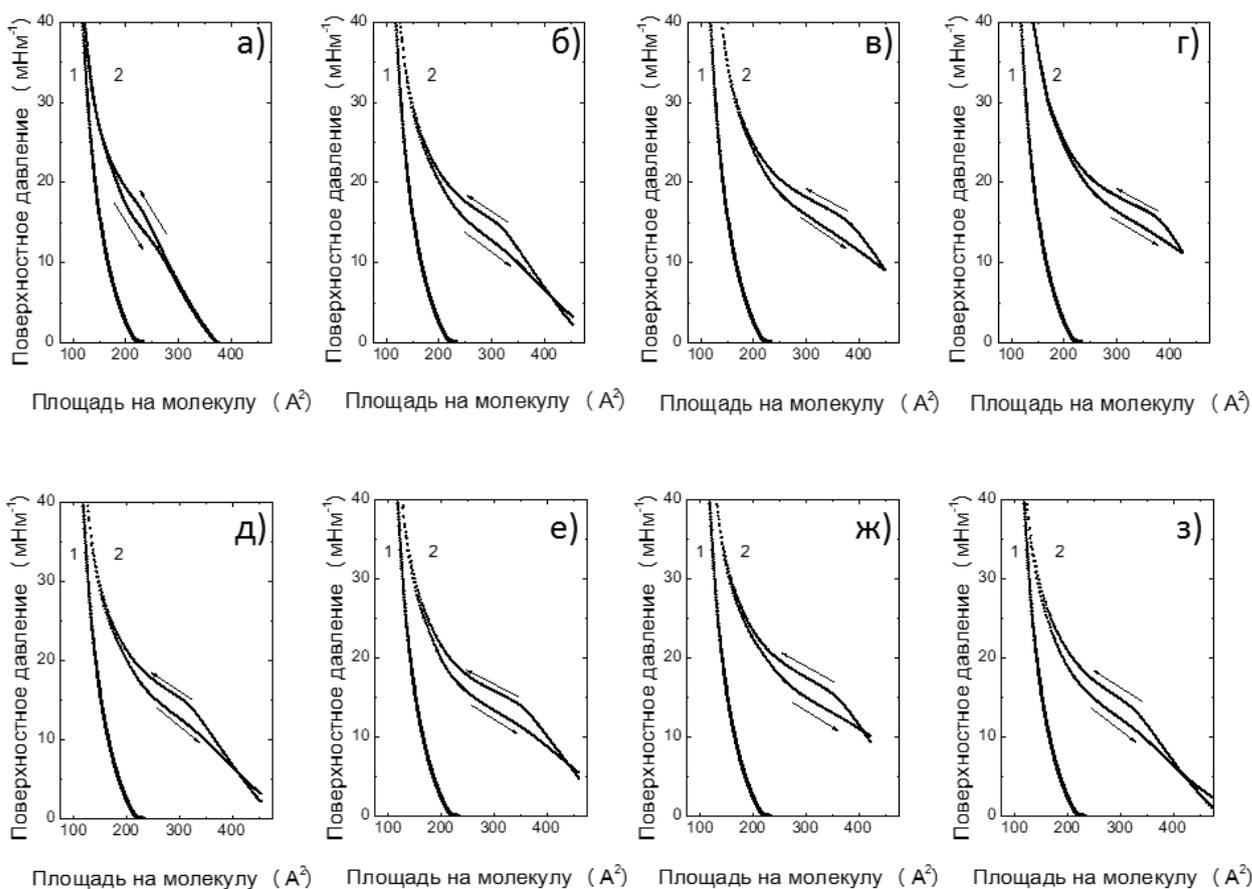


Рис. 3.4. Изотермы ТОКЛ до (1) и после (2) введения разного количества ЦитС под монослой при различном поверхностном давлении. а) $c_0 = 10$ нМ, $l_0 = 29.4$ нмоль, $\pi_0 = 5$ мНм⁻¹; б) $c_0 = 50$ нМ, $l_0 = 27.4$ нмоль, $\pi_0 = 5$ мНм⁻¹; в) $c_0 = 100$ нМ, $l_0 = 27.7$ нмоль, $\pi_0 = 5$ мНм⁻¹; д) $c_0 = 250$ нМ, $l_0 = 29.4$ нмоль, $\pi_0 = 5$ мНм⁻¹; е) $c_0 = 50$ нМ, $l_0 = 27.4$ нмоль, $\pi_0 = 5$ мНм⁻¹; ф) $c_0 = 50$ нМ, $l_0 = 26.9$ нмоль, $\pi_0 = 15$ мНм⁻¹; г) $c_0 = 50$ нМ, $l_0 = 29.5$ нмоль, $\pi_0 = 25$ мНм⁻¹; г) $c_0 = 50$ нМ, $l_0 = 26.1$ нмоль, $\pi_0 = 35$ мНм⁻¹; l_0 – количество липида, c_0 – концентрация белка, π_0 – начальное поверхностное давление.

Изотермы пленок ЦитС-КЛ, сформированных, как описано выше, имеют различную форму, а именно, в отличие от изотермы чистого липида на изотерме белково-липидной пленки появляется плечо, что подразумевает своего рода фазовый переход при 16 мНм⁻¹. Эти данные находятся в хорошем согласии с результатами, полученными Сен-Пьером-Шазале и сотр. На пленках адсорбированного ЦитС на других ФЛ [42]. Интересно, что давление этого фазового перехода равно 16 мНм⁻¹ и совпадает с полученным давлением для

монослоя чистого ЦитС, хотя равновесие системы достигалось в течение 15 ч, а стабильность монослоя в значительной мере зависит от поверхностного давления. В нашей работе мы не проводили специальное исследования монослоя ЦитС, но для монослоя, полученного как описано в [41], полученные изотермы имели тот же характер, за исключением давления фазового перехода: в нашем случае оно было ниже на 4 мНм^{-1} (рис. 3.6а).

Другой важной особенностью изотерм белково-липидной системы является наличие гистерезиса: кривая растяжения (нижняя часть петли) не совпадает с кривой сжатия (верхняя часть). При проведении повторного цикла сжатия-растяжения на одной и той же системе несколько раз с разными скоростями сканирования (рис. 3.5) эффект остается. То есть данный эффект нельзя объяснить недостаточным временем установления равновесия в системе.

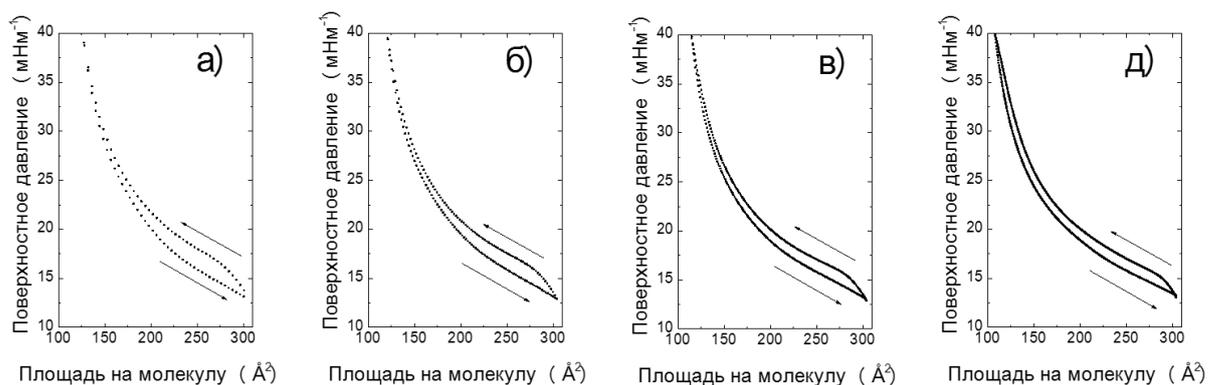
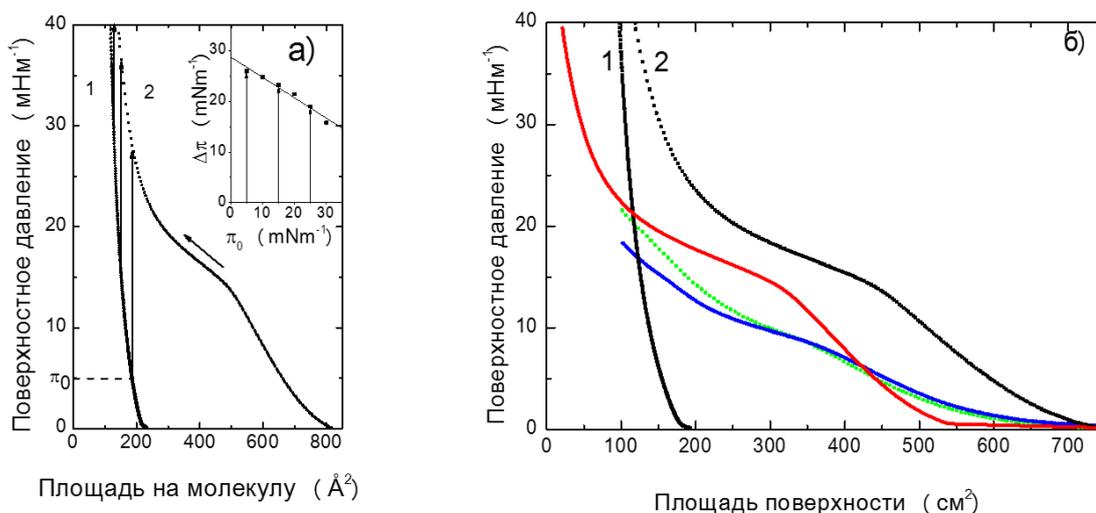


Рис. 3.5. Циклы изотерм сжатия-растяжения для 50 нмоль ТОКЛ после введения ЦитС (250нМ) под монослой на начальном давлении $\pi_0 = 5 \text{ мНм}^{-1}$.

Прямая и обратная скорость барьеров была одинаковой и составляла:
 а) 20 мм/мин; б) 10 мм/мин; с) 5 мм/мин; г) 2 мм/мин.

Независимый от времени гистерезис, как известно, является следствием диссипации части энергии при сжатии-растяжении монослоя. Поскольку гистерезис наблюдается только в пленках, содержащих белок, можно предположить, что в процессе включения в и / или высвобождения ЦитС в монослой КЛ с белком происходят конформационные изменения.

Вертикальными стрелками на *рис. 3.6 а* показан прирост давления в результате проникновения ЦитС в монослой ТОКЛ. В результате получилась линейная зависимость приращения поверхностного давления от начального давления монослоя, как было продемонстрировано нами в случае прямого измерения (*рис. 3.3б*) и Петером Квином [37,38].



*Рис. 3.6. а) Изотерма 13.5 нмоль ТОКЛ до (1) и после (2) введения 50 нМ ЦитС под монослой, сформированный до $\pi_0 = 5 \text{ мНм}^{-1}$. а) вставка – зависимость $\Delta\pi$ от π_0 ; б) Сравнение изотерм сжатия ЦитС отдельно и встроенного в монослой ТОКЛ. Кривые 1 и 2 – те же, что на *рис. 7а*; красным – изотерма цитохрома в пленке, полученная как разница кривых 2 и 1; зеленым – 165 нмоль цитохрома (растворенного в ФБ), нанесенного на поверхность субфазы, не содержащей белок; синим – 5.7 нмоль ЦитС (растворенного в ФБ и этаноле, 2:1 v/v), нанесенного на поверхность субфазы, не содержащей белок. π_0 – поверхностное давление; $\Delta\pi$ – приращение поверхностного давления при введении белка под монослой липида.*

Изотермы сжатия для монослоев ЦитС, полученных без добавления и с добавлением этанола, имеют один и тот же вид. Обе системы обратимы. Молекулы на поверхности образуют монослой, как это представлено на *рис. 3.6б*, по-видимому, претерпевая некоторые конформационные изменения. В том случае, когда раствор ЦитС предварительно смешивали с этанолом, получить монослой было гораздо легче. При взаимодействии ЦитС этиловым спиртом конформация белка меняется. Уже «подготовленному» белку с явно выделенными гидрофильной

и гидрофобной частями легче образовать монослой. Количество белка, необходимое для получения одинаковой изотермы сжатия в описанных двух случаях, отличается почти в 30 раз. Для образования монослоя из цитохрома при добавлении этанола, необходимо 5.7 нмоль, без добавления – 165 нмоль.

Количественный анализ изотерм позволяет оценить соотношение белка и липида в пленке. *Рис. 3.6б* (красным) получен из *рис. 3.6а*. Согласно этой кривой площадь, занимаемая молекулами ЦитС уменьшается в два раза при давлении до 12 мНм⁻¹. Затем эта площадь резко убывает. Белок как бы выдавливается из монослоя липида.

По экспериментальным данным (*рис. 3.6б*, красным) можно найти количество, приходящегося белка на один липид:

$$\text{белок / липид (моль/моль)} = (A_{lp} - A_l) / A_p$$

где A_l , A_{lp} – средняя площадь, занимаемая ЦитС в комплексе с липидом на поверхности, приходящаяся на один липид.

Отношение изменяется от 0.76 при низком давлении до 0.025 при 40 мНм⁻¹. Это означает, что при низком давлении на 1 встроившийся белок приходится 1.5 липида, а при высоком давлении – 40. Чем выше давление, тем труднее молекуле белка встроиться в липидный монослой. Равновесие сдвигается влево с увеличением давления.



Данные вычисления сделаны в предположении, что белок является несжимаемой сферой с неизменной конформацией. Однако, сложный характер изотерм, наличие гистерезиса, похожее по ведению чисто белого монослоя белково-липидной пленкой говорят о том, что белок все же меняет свою конформацию при встраивании в монослой КЛ.

Сравнение π -А изотерм для монослоев, образованных ЦитС [41], ЦитС + нейтральными или анионными ФЛ [42] и ЦитС + КЛ показало поразительное

сходство кривых в частях, определенных присутствием белка. Во всех случаях эти кривые были аналогичны показанным на рис. 3.6.

Сходство между изотермами предполагает сходство в механизмах адсорбции белка на поверхности воды при отсутствии липидов и в ситуации, когда поверхность покрыта амфифильными молекулами липидов. Адсорбция является результатом взаимодействия полярных групп на поверхности белка с молекулами воды на границе раздела фаз в случае, когда гидрофобные участки поверхности белка, не должны контактировать с водой. В водных растворах ЦитС, со всех сторон равномерно покрытый полярными и гидрофобными аминокислотными остатками (рис. 3.7), изменит свою конформацию при адсорбции на поверхности воды так, чтобы максимально заряженные и полярные группы остались в объеме субфазы, то есть в контакте с водой. Это будет происходить независимо от того, будут ли более гидрофобные части поверхности белка контактировать с воздухом, с молекулами фосфолипидов или друг с другом (рис. 3.7).

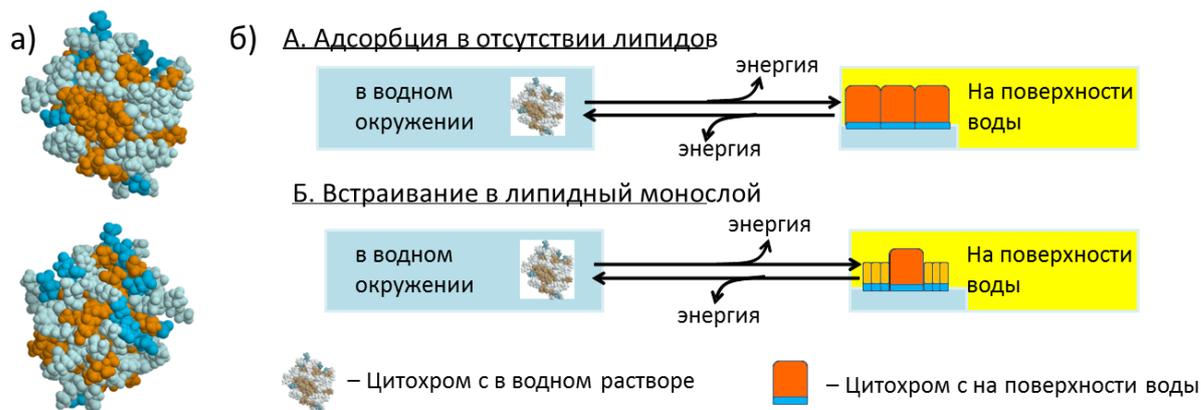


Рис. 3.7. а) Структура поверхности ЦитС. Атомы показаны как сферы с радиусами Ван-дер-Ваальса. Положительно заряженные аминокислотные остатки, показанные синем, полярные – голубым, другие – коричневым. Структура молекулы показана с двух противоположных сторон (PDB: 1AKK); б) гипотетическая схема молекулы ЦитС с конформационным переходом во время его адсорбции и десорбции на и от поверхности воды.

Одним из доказательств конформационного перехода в процессе адсорбции или десорбции ЦитС на поверхности воды является наличие петель гистерезиса, полученные для монослоев как чистого ЦитС [41], так и для белково-ФЛ

монослоев, в то время как ФЛ не проявляют таких свойств. ([42] и *рис. 3.4, 3.5*). Теоретически, такой цикл может появляться, если время адсорбции одного и того же порядка, что и время скрининга (равновесие не успевает установиться в каждой экспериментальной точке). В специальной серии экспериментов, мы показали, что замедление скрининга по площади не влияет на размер петли гистерезиса (*рис. 3.5*).

Данные, полученные в настоящей и предыдущих работах [117,118] позволяют преодолеть разрыв между возникновением изгиба мембраны, индуцированного ЦитС, включением белка в липидный бислои, и образованием пор в бислое (*рис. 3.8*).

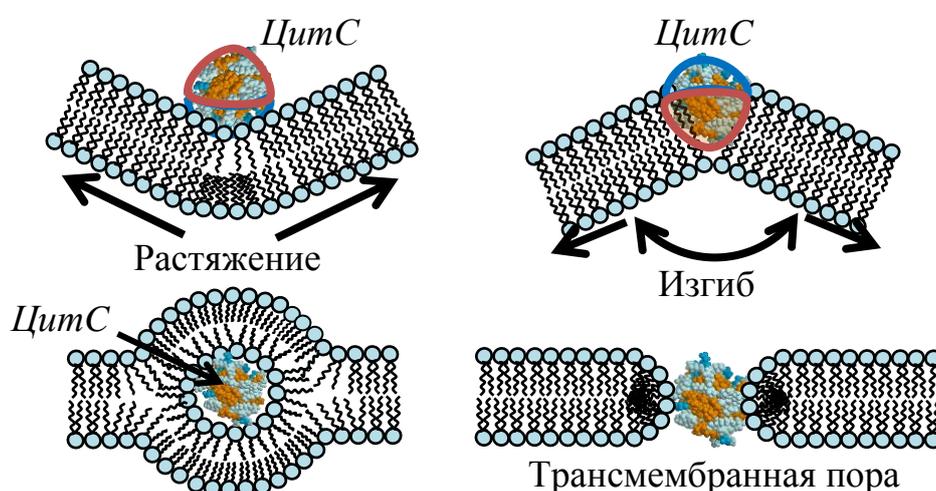


Рис. 3.8. Электростатическая адсорбция (А) и гидрофобное встраивание ЦитС в ФЛ бислои (Б) с последующим образованием гидрофобных наносфер ЦитС-КЛ в бислое (В) или трансмембранных гидрофильных пор (Г).

3.4. Получение планарных структур на основе лизоцима на подложках

Поскольку сам белок ЦитС и его комплекс с КЛ, образованный на поверхности жидкости, является сложной системой, перенос и организация такой пленки на твердой подложке представляет нетривиальную задачу. Поэтому для развития методов создания тонких кристаллических структур на подложках в работе использовали белок лизоцим, структура которого является хорошо изученной, а условия кристаллизации находятся в широком диапазоне. Монослои лизоцима так же были получены с помощью ленгмюровской технологии и развиты модификации

различных методов получения тонких пленок и кристаллов для получения кристаллических пленок лизоцима.

Кристаллизация лизоцима на белковых тонких пленках. Плоские кристаллы были получены по методике, описанной в [119]. Сначала подбирали условия формирования ленгмюровских монослоев лизоцима на установке KSV5000 LB (KSV Instruments), ИК РАН. Затем методом ЛШ монослои лизоцима переносили на подложки и полученные многослойные белковые пленки использовали в качестве подложек для кристаллизации лизоцима методом диффузии в парах [120] в условиях роста кристаллов лизоцима тетрагональной сингонии.

Кристаллы лизоцима, полученные *методом диффузии в парах на тонких пленках лизоцима*, представлены на *рис. 3.9*.

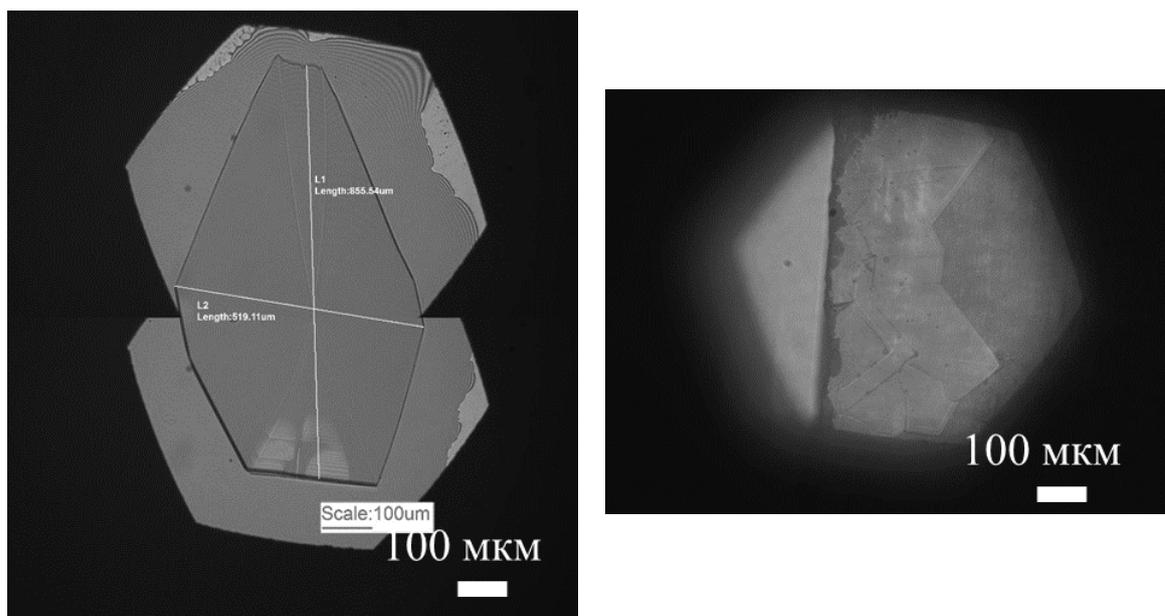


Рис. 3.9. Кристаллы лизоцима, полученные на пленках лизоцима. Условия получения представлены в тексте.

Для формирования монослоя лизоцима на водную субфазу наносили 800 мкл раствора лизоцима в натрий-ацетатном буфере с концентрацией 20 мг/мл. Скорость формирования монослоя составляла 100 мм/мин. На *рис. 3.10а* представлена полученная изотерма сжатия лизоцима. Полученные монослои лизоцима

переносили на кремниевую подложку (5 слоев) при поверхностном давлении 14 мНм^{-1} .

Кристаллизацию проводили при следующих условиях: концентрация белка и осадителя в капле 40 мг/мл и 25 мг/мл соответственно (6 мкл , $1/1$, v/v), концентрация осадителя в резервуаре 50 мг/мл , 500 мкл .

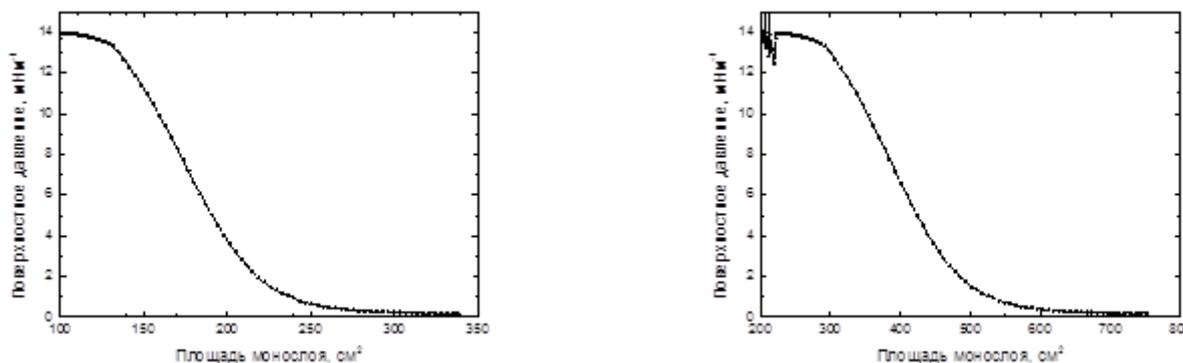


Рис. 3.10. Изотерма лизоцима (800 мкл, 20 мг/мл) на водной субфазе. Скорость формирования монослоя составляла 100 мм/мин.

На *рис. 3.10б* приведена изотерма лизоцима, полученная при следующих условиях: на водную субфазу наносили 1100 мкл раствора лизоцима в натрий-ацетатном буфере с концентрацией 40 мг/мл . Скорость формирования монослоя составляла 50 мм/мин . После достижения поверхностном давлении 14 мН/м под монослой вводили 1.09 мл , 219 мг/мл раствора хлорида натрия в натрий-ацетатном буфере (как в первой части данной главы). Конечная концентрация хлорида натрия в субфазе составляла 4 мМ . После этого были получены пленки лизоцима 85 слоев.

Концентрация белка и осадителя в капле 40 мг/мл и 25 мг/мл соответственно (6 мкл , $1/1$, v/v), концентрация осадителя в резервуаре 50 мг/мл , 500 мкл .

Максимальные размеры кристаллов, полученных таким методом, составляли около 1.5 мм .

Кристаллизация лизоцима в объеме между подложками. Метод кристаллизации в объеме [29] был модифицирован и реализован между двумя подложками. Выбор подложек зависит от целей работы, а также от методов

исследования. В данной работе кристаллизацию осуществляли между двумя майларовыми пленками для возможности проведения в дальнейшем рентгеновских исследований получившихся кристаллов. Предварительно на одну пленку методом ЛШ было перенесено 5 монослоев лизоцима. Далее на подложку наносили раствор белка/белка с осадителем и закрывали второй подложкой.

Результаты кристаллизации лизоцима в объеме между подложками представлены на *рис. 3.11*.

Для формирования монослоя лизоцима на водную субфазу наносили 1 мл раствора лизоцима в натрий-ацетатном буфере с концентрацией 40 мг/мл. Скорость формирования монослоя составляла 20 мм/мин. При поверхностном давлении 12 мН/м был осуществлен перенос 5 монослоев на майларовую пленку.

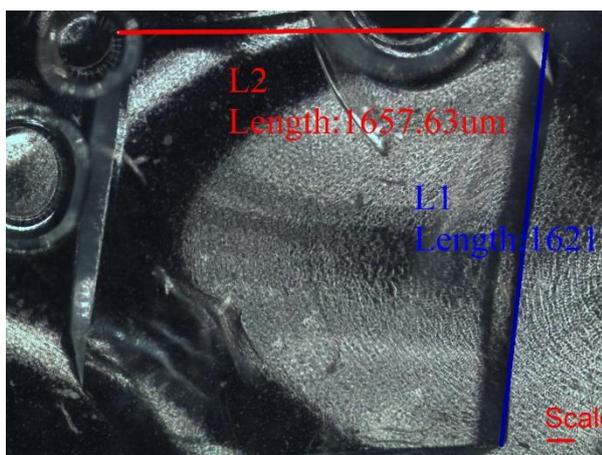


Рис. 3.11. Кристаллы лизоцима, полученные между майларовыми пленками. Условия получения представлены в тексте.

Кристаллизацию проводили при следующих условиях: концентрация белка и осадителя в капле 40 мг/мл и 25 мг/мл соответственно (6 мкл, 1/1, v/v), концентрация осадителя в резервуаре 50 мг/мл, 500 мкл.

Полученные таким методом кристаллы имели размер 1.5 мм (*рис. 3.11*)

«Ножевой» метод. К настоящему времени похожий метод был разработан для получения свободно подвешенных пленок смектических жидких кристаллов [121,122]. В настоящей работе раствор белка лизоцима в натрий-ацетатном буфере или раствор белка лизоцима с хлоридом натрия различных концентраций наносили

на край подложки. Затем с помощью наклонно расположенного покровного стекла каплю раствора распределяли по поверхности подложки, продвигая покровное стекло от одного края к другому (рис. 3.12). Подготовленные таким способом образцы помещали в кристаллизационные ячейки, где в парах осадителя образцы оставляли на день.

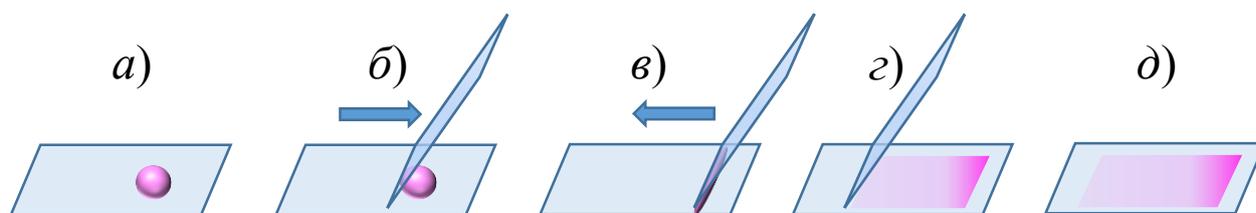


Рис. 3.12. Схематическое изображение последовательности действий (а-д) в «ножевом» методе получения тонких белковых пленок.

Полученные пленки изучались с помощью оптической микроскопии в отраженном свете на оптическом микроскопе Eclipse LV175 (Nikon) и с помощью рентгеновской рефлектометрии. на многофункциональном рентгеновском дифрактометре SmartLab (Rigaku), оснащенный источником излучения с вращающимся анодом (Cu, 8 кэВ) мощностью 9 кВт. Пучок формировался с использованием параболического многослойного зеркала Гёбеля (угловая расходимость 0.01°), после чего устанавливались 50 мкм щели, ограничивающие падающий и отраженный пучок в плоскости дифракции (угловое разрешение 0.03°), и щели Соллера для ограничения пучка в поперечном направлении (угловое разрешение 0.5°). Запись угловых зависимостей проводилась с шагом $\Delta\Theta=0.01^\circ$, время $t=1$ с в точке.

Полученные «ножевым» методом пленки лизоцима представлены на рис. 3.13. На подложку наносили 3 мкл раствора лизоцима в натрий-ацетатном буфере, 40 мг/мл. Резервуар заполняли 500 мкл раствором хлорида натрия в натрий-ацетатном буфере, 50 мг/мл. Время образования таких пленок составляло от 15 мин.

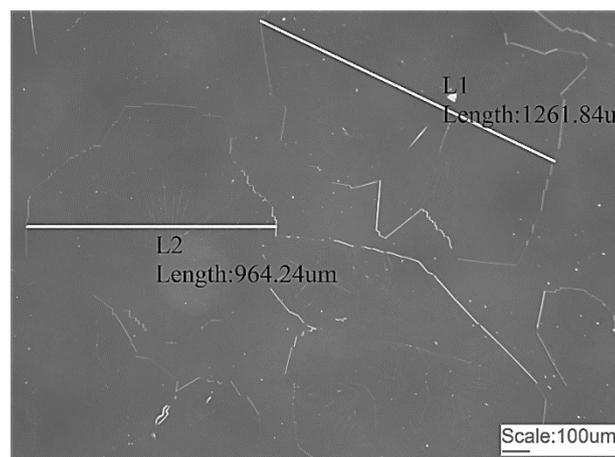
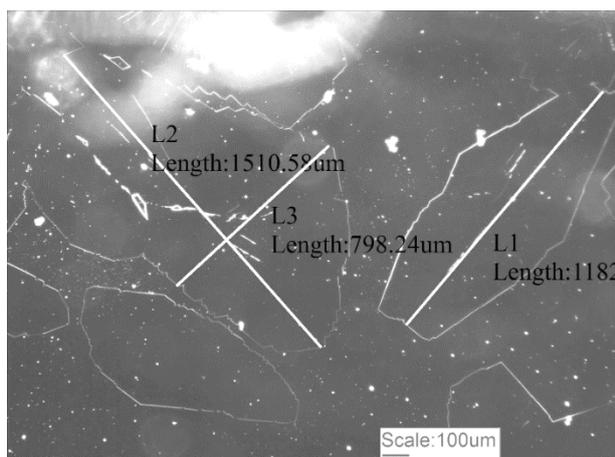
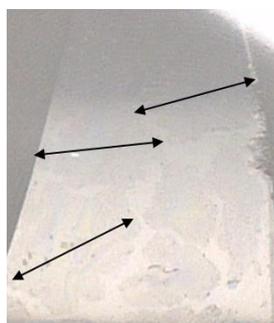


Рис. 3.13. Пленки лизоцима, полученные «ножевым» методом. На подложку наносили 3 мкл раствора лизоцима в натрий-ацетатном буфере, 40 мг/мл. Резервуар заполняли 500 мкл раствором хлорида натрия в натрий-ацетатном буфере, 50 мг/мл.

Максимальный латеральный размер подготовленных таким способом пленок лизоцима составлял около ~ 1 см и был получен при концентрации лизоцима 80 мг/мл в капле (рис. 3.14) и хлорида натрия 50 мг/мл в резервуаре.



$\text{Ø} \sim 1$ см

Рис. 3.14. Пленки лизоцима, полученные «ножевым» методом. На подложку наносили 3 мкл раствора лизоцима в натрий-ацетатном буфере, 80 мг/мл. Резервуар заполняли 500 мкл раствором хлорида натрия в натрий-ацетатном буфере, 50 мг/мл.

Структуру полученной пленки исследовали методом рентгеновской рефлектометрии (рис. 3.15).

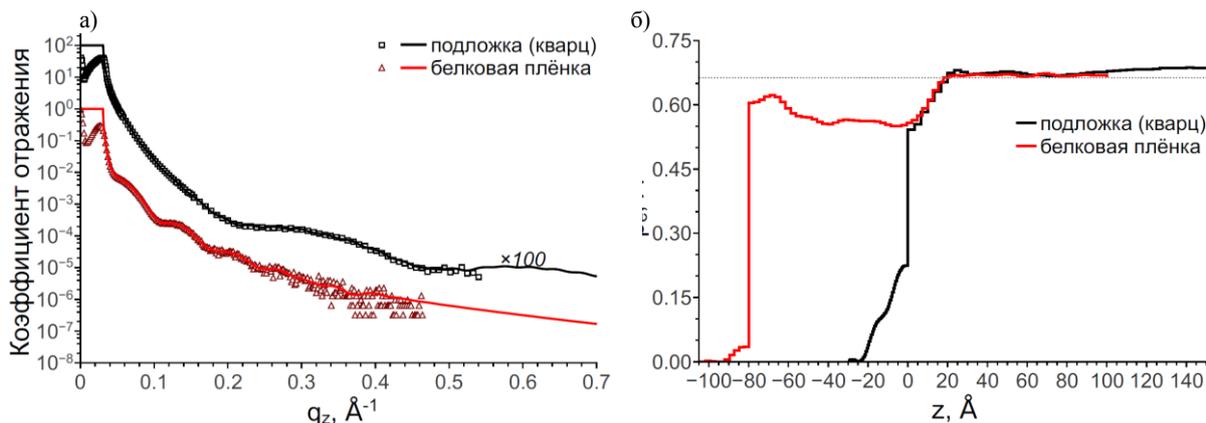


Рис. 3.15. Угловые зависимости зеркальной компоненты рентгеновского отражения (а) и восстановленный профиль электронной плотности (б) для пленок лизоцима, полученных «ножевым» методом (красным), и подложки (черным). Условия получения пленки представлены в тексте.

Восстановление распределения электронной плотности по глубине проведено в рамках модельно-независимого подхода, основанного на асимптотическом продолжении угловой зависимости коэффициента отражения в область больших углов скольжения [123]. Толщина полученной пленки составила 80 \AA .

3.5. Заключение

Проведенные в работе исследования взаимодействия между цитохромом *c* и ленгмюровским монослоем бычьего кардиолипина и тетраолеил кардиолипина показали, что увеличение поверхностного давления во времени при встраивании белка в монослой кардиолипина подчиняется уравнению: $\pi = \pi_0 + \Delta\pi_\infty [1 - \exp(-\beta t)]$, где β – скорость связывания цитохрома *c* с монослоем – прямо пропорциональна начальной концентрации цитохрома c_0 .

При различных условиях (разных количествах фосфолипида в монослое, количества белка в субфазе и различном начальном давлении липидной пленки) количество встроенного цитохрома *c* и константа скорости встраивания белка в монослой кардиолипина была во всех случаях примерно одинаковой и была практически одной и той же у синтетического тетраолеил кардиолипина, устойчивого к окислению молекулярным кислородом, и у природного кардиолипина, содержащего полиненасыщенные жирнокислотные цепи и легко

окисляемого кислородом воздуха. Это говорит о том, что данные, полученные с использованием природного кардиолипина в наших экспериментах и в опытах других авторов [37,124–126] не осложнялись изменением свойств монослоя в результате его спонтанной пероксидации, которая активно протекает в комплексах цитохрома *c* с липосомами, содержащими природный кардиолипин [127].

Изотермы поверхностное давление-площадь, полученные для чистого цитохрома *c* и для системы цитохром-кардиолипин, имеют одинаковую форму: в обоих случаях белковая глобула располагает гидрофильные группы в водной фазе, независимо от того, являются ее гидрофобные группы в контакте с воздухом или углеводородными хвостами молекул кардиолипина. Небольшие изменения конформации белка в 30%-ном растворе этанола во много раз увеличивают адсорбцию цитохрома *c* на поверхности субфазы. Также на белково-липидных пленках показано существование петли гистерезиса в циклах сжатие-растяжение даже при очень медленном изменении площади, которые были воспроизводимы в повторяющихся циклах. Эти результаты показывают, что изменение конформации цитохрома *c* происходит во время его адсорбции на поверхности воды или при встраивании в монослой кардиолипина. Возможно, что в бислойных мембранах, содержащих кардиолипин, проникновение цитохрома *c* в липидный монослой может приводить к образованию складки на мембране с последующим образованием либо «бабблов» внутри бислоя, либо гидрофобных наносфер цитохром *c*-кардиолипин [128], или появлением гидрофильных пор, описанных в работе Бергстром [52]. Эти события могут вызвать развитие апоптоза.

Разработаны способы получения двумерных органических пленок белков на кристаллических подложках для получения планарных пленок или тонких плоских кристаллов на основе модификации известных методов получения белковых кристаллов (метод диффузии в парах, кристаллизации в объеме) и тонких органических пленок (метод Ленгмюра-Блоджетт, «ножевой» метод). Данные методы были апробированы на примере лизоцима для получения пленок

достаточно большой площади (латеральный размер ~ 1 см), пригодных для формирования ГНС. Описанные методы можно применять и для получения плоских пленочных структур многих других белков.

ГЛАВА 4. ИССЛЕДОВАНИЕ *IN SITU* ПРОЦЕССОВ РОСТА И ДЕГРАДАЦИИ КРИСТАЛЛОВ ЛИЗОЦИМА ТЕТРАГОНАЛЬНОЙ СИНГОНИИ НА РАЗЛИЧНЫХ ПОДЛОЖКАХ

Результаты поиска условий кристаллизации лизоцима тетрагональной сингонии

Из результатов первичного скрининга (п. 2.3) были выбраны условия: концентрация белка 40 мг/мл и осадителя от 15 до 35 мг/мл с шагом 5 мг/мл для поиска оптимальных условий. Кристаллизация проводилась в более узком диапазоне концентраций белка и осадителя по процедуре п.2.2.1 в течение 3 дней.

Результаты скрининга условий кристаллизации лизоцима тетрагональной сингонии (см. п. 2.3.2) представлены ниже. Кристаллы выросли в ячейках: А2, А3, А5, А6, В4, В5. Соответствующие этим ячейкам условия: а) 40 мг/мл и 15 мг/мл; б) 40 мг/мл и 25 мг/мл; в) 40 мг/мл и 45 мг/мл; г) 30 мг/мл и 35 мг/мл; д) 30 мг/мл и 45 мг/мл; е) 40 мг/мл и 55 мг/мл. Результаты представлены на *рис. 4.1*.

При малых концентрациях осадителя 5-15 мг/мл и больших концентрациях белка 40 мг/мл растут маленькие кристаллы размером 100-200 мкм с ровными гранями (*рис. 4.1а*). С увеличением концентрации осадителя до 25-35 мг/мл размер кристаллов увеличивается до 400-500 мкм. Грани остаются ровными (*рис. 4.1б*). При увеличении концентрации осадителя до 45-55 мг/мл вырастают дефектные кристаллы разных размеров (*рис. 4.1в*). При малых концентрациях белка 30 мг/мл и больших концентрациях осадителя вырастают маленькие кристаллы 50-100 мкм с ровными гравями (*рис. 4.1г*). При малых концентрация белка и больших осадителя вырастают много сросшихся и дефектных мелких кристаллов 50-100 мкм (*рис. 4.1д*). Все полученные кристаллы принадлежать к тетрагональной форме, за исключением кристаллов, выращенных при очень большой концентрации осадителя; они представляют из себя много игольчатых кристаллов с единым центром (*рис. 4.1е*).

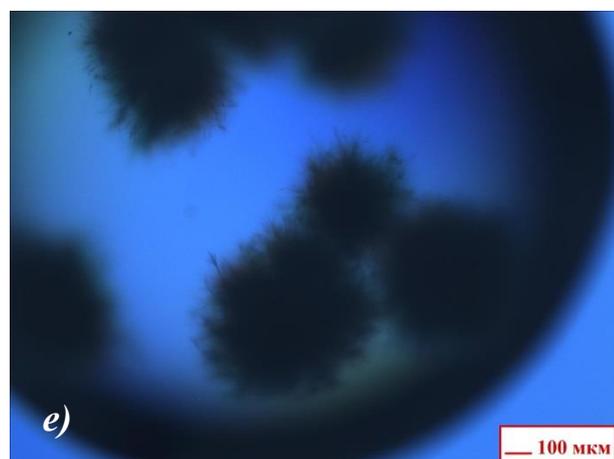
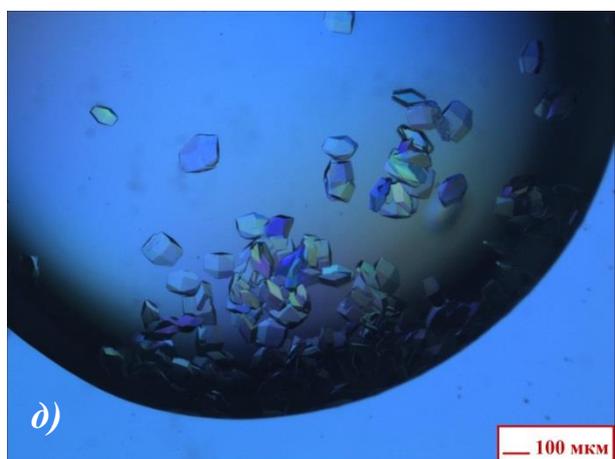
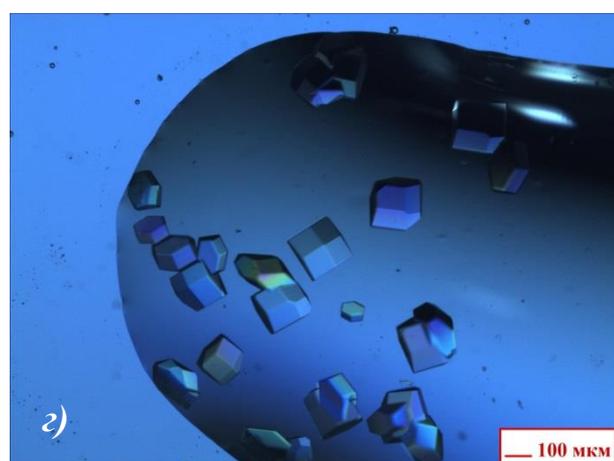
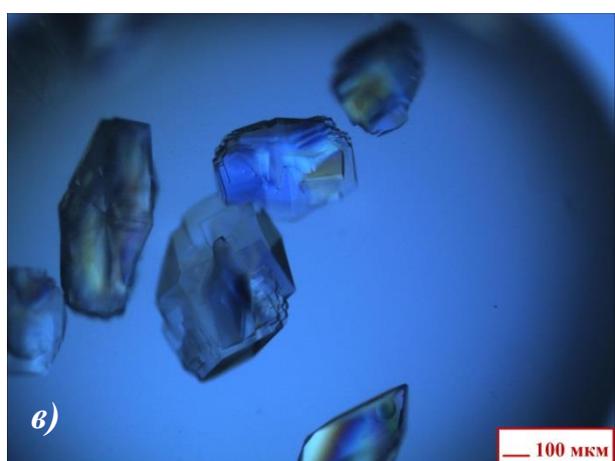
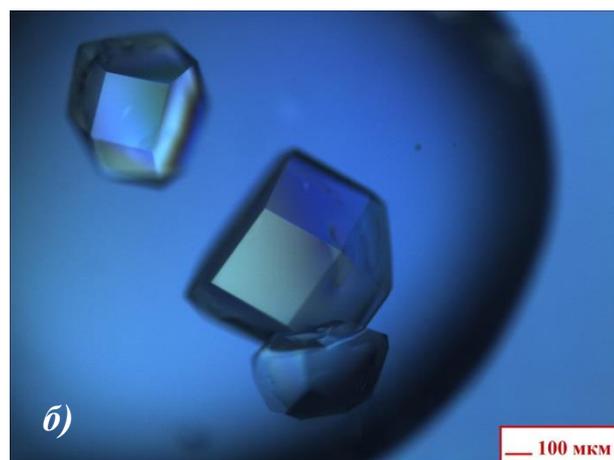
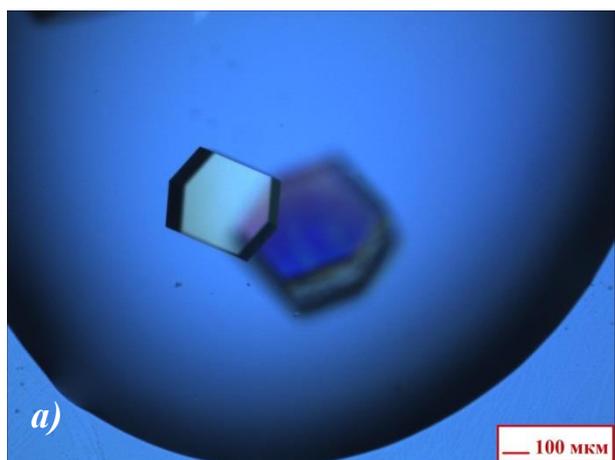


Рис. 4.1. Кристаллы лизоцима тетрагональной сингонии, выращенные в условиях с концентрациями белка и осадителя соответственно: а) 40 мг/мл и 15 мг/мл; б) 40 мг/мл и 25 мг/мл; в) 40 мг/мл и 45 мг/мл; г) 30 мг/мл и 35 мг/мл; д) 30 мг/мл и 45 мг/мл; е) 40 мг/мл и 55 мг/мл.

В результате скрининга условий кристаллизации белка лизоцима были подобраны оптимальные условия для выращивания кристаллов тетрагональной

формы больших размеров без видимых дефектов. Следующие этапы работы проводились при концентрациях белка и осадителя 40 мг/мл и 25 мг/мл соответственно.

4.2. Начальная стадия формирования кристаллов

Первые рентгеновские измерения были проведены через 96 ч после загрузки кристаллизационной ячейки (помещения на подложку из кремния раствора белка и осадителя и герметизации ячейки). Средний размер кристаллов составлял ~ 200–300 мкм.

Проводилась серия θ - 2θ -сканирований в диапазоне углов 2θ от 1° до 6° в трех положениях области засветки ячейки рентгеновским пучком. Первое положение (отмеченное индексом I на *рис. 4.2б*) соответствует отражению от капли с белком, тогда как второе и третье положения (отмеченные индексами II и III на *рис. 4.2б*) соответствовали отражению от кремниевой подложки и от капли с осадителем соответственно. Регистрировалось рентгеновское рассеяние от капли с кристаллами белка (k_1), подложки Si и капли осадителя без белка (k_2), используемой в качестве репера (*рис. 4.2б*). Измерения проводились в поисковом режиме, щель перед детектором не устанавливалась. Полученные зависимости представлены на *рис. 4.2а* для трех указанных положений пучка I, II, III (*рис. 4.2б*).

Отметим, что шкала углов θ - 2θ на *рис. 4.2а* соответствует указанной выше юстировке ориентации кристаллической подложки относительно рентгеновского пучка. В этом случае углы отсчитываются от нулевого положения, в котором пучок параллелен поверхности подложки Si. При этом щель перед детектором не устанавливалась, вследствие чего точные углы Брэгга регистрируемых рефлексов могут значительно отличаться от углов, на которых они расположены по шкале *рис. 4.2а*. Индексация дифракционных пиков и определение соответствующих им точных углов Брэгга проводились в дальнейших измерениях (разд. «Стадия сформированных кристаллов»).

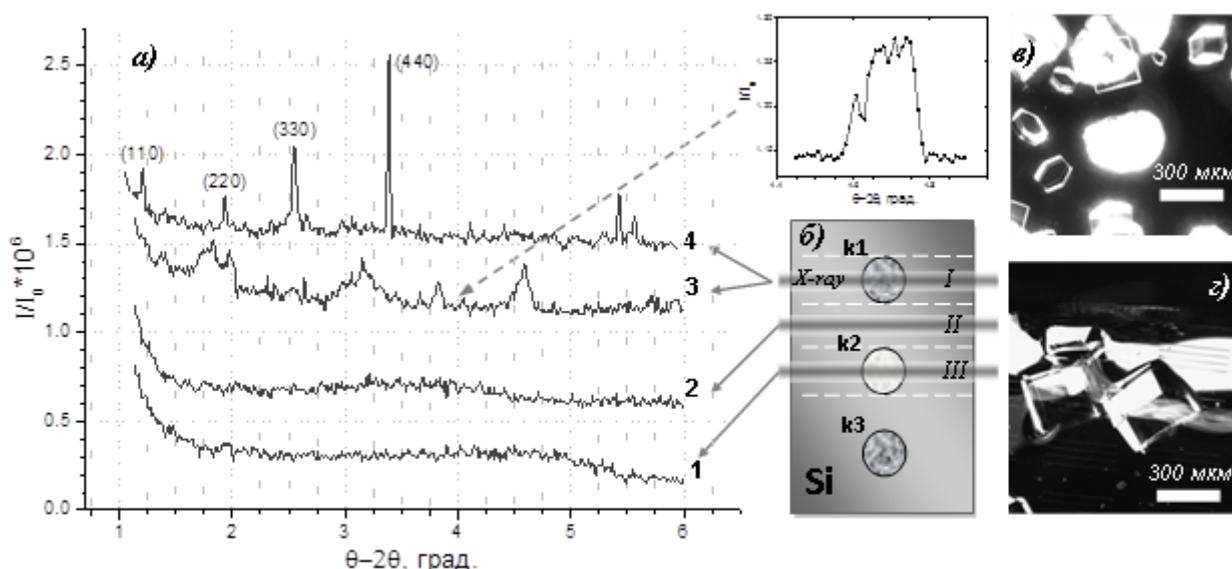


Рис. 4.2. Экспериментальные рентгеновские зависимости θ - 2θ -сканирования (1 – 4) на начальной стадии формирования кристаллов тетрагонального лизоцима (а). Схематично показаны расположение на подложке Si капель, в которых происходит кристаллизация белка (k1 и k3), «реперной» капли осадителя без белка (k2), и положения рентгеновского пучка при проведении измерений (I – III) (б). Изображения, полученные на оптическом микроскопе на стадии зарождения (в) и начальной стадии роста (г) кристаллов: 1 – «реперная» капля (k2) осадителя без белка, положение III; 2 – рассеяние от подложки Si, положение пучка II; 3, 4 – капля с кристаллами, положение I, на стадии зарождения (3), через 96 ч после загрузки ячейки, и на начальной стадии роста (4), через 122 ч после загрузки ячейки. На вставке – дифракционный пик на стадии зарождения кристаллов. Наблюдается расщепление пика и уширение дифракционной кривой.

На графиках рис. 4.2а видно, что в отличие от рассеяния от подложки и «пустой» капли осадителя (кривые 1, 2), при рассеянии от капли с кристаллами через 96 ч (кривая 3) наблюдается дополнительное рассеяние (дифракционные пики) от кристаллов лизоцима.

Аналогичным образом проводились измерения на следующий день (122 ч после начала кристаллизации). Как и в предыдущем случае, проводилась стандартная юстировка образца при позиционировании пучка в положении II (рис. 4.2б). Затем путем θ - 2θ -сканирования регистрировалось рассеяние от капель k1 и k2.

Полученная зависимость от капли с кристаллами представлена на экспериментальной кривой 4 *рис. 4.2а*.

Из *рис. 4.2а* видно, что при переходе от кривой 3 к кривой 4 за 26 ч дифракционные пики не только формируются более узкими и интенсивными, но и происходит их смещение по шкале углов θ - 2θ . При этом некоторые пики по истечении указанного времени исчезают, например, пики в диапазоне углов 3.5° – 5° , имевшие место на кривой 3, практически отсутствуют на кривой 4.

Проведенный анализ дифракционных пиков на стадии формирования – вставка на *рис. 4.2*, пик вблизи угла θ - $2\theta \approx 3.8^\circ$ – показал, что уширение данных пиков связано с их сложной структурой, в частности с расщеплением дифракционной кривой, что, вероятно, отражает малые размеры и «рыхлую» структуру кристаллов на стадии их зарождения. Аналогичный вид кривых дифракционного отражения (КДО) наблюдается в кристаллах с такими дефектами кристаллической структуры, как двойники, блоки, зерна и т.п.

«Улучшение» КДО, наблюдаемое на кривой 4 по сравнению с кривой 3, может быть связано как с увеличением размеров кристаллов лизоцима, так и с более высоким совершенством их структуры, которое обычно происходит при росте и оформлении спонтанно зародившихся кристаллов.

4.3. Стадия сформированных кристаллов

Следующие измерения КДО и их индексация проводились через 192 ч на стадии роста, когда кристаллы уже сформировались и достигали размеров ~ 500 – 700 мкм. Для измерений с высоким угловым разрешением был выбран самый яркий дифракционный пик, вблизи $2\theta \approx 3.4^\circ$ (кривая 4, *рис. 4.2а*). Проведенная процедура точной юстировки выбранного рефлекса и записи его КДО позволила определить его брэгговский угол $2\theta = 2.9145^\circ$ и соответственно индексы отражения – (440). Полученная КДО представлена на вставке *рис. 4.3а*.

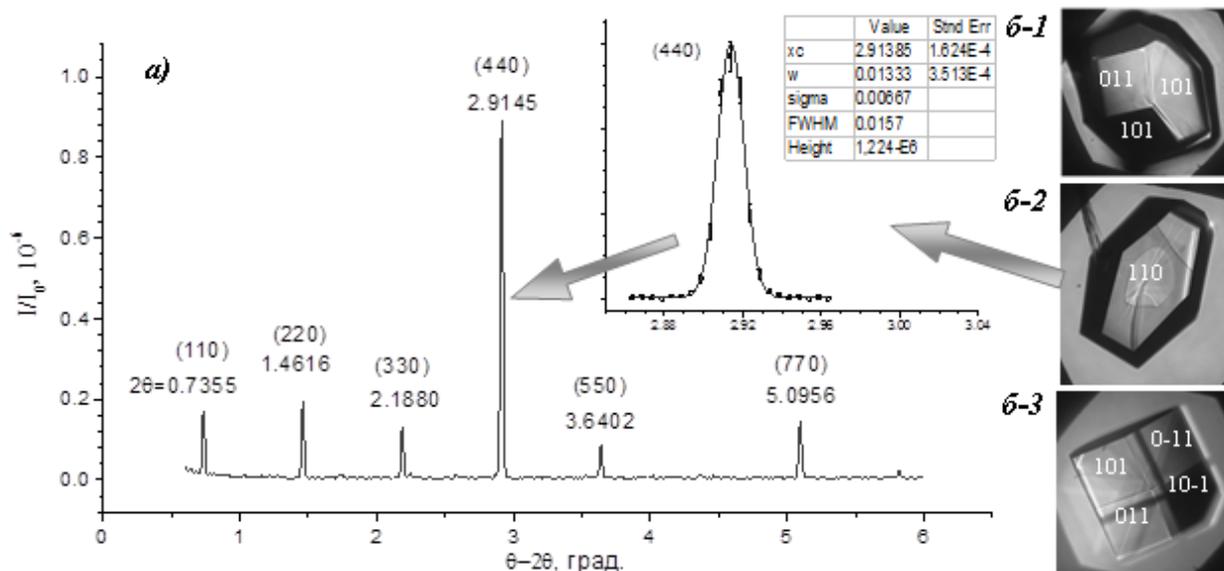


Рис. 4.3. Обзорная экспериментальная кривая θ - 2θ -сканирования. Представлена серия дифракционных пиков кристаллов тетрагонального лизоцима; отмечены брэгговские углы 2θ , соответствующие регистрируемым порядкам отражения 110. На вставке – КДО (440), полуширина (FWHM) составляет 28.3 угл. с (а). Фото трех основных форм выращенных кристаллов; отмечены индексы граней кристаллов (б). Дифракционные пики соответствуют ориентации кристалла, показанного на рис. б-2.

В ходе процедуры определения брэгговского угла 2θ использовались щели перед детектором размером 0.05 и 0.2 мм. Представленная на рис. 4.3а зависимость θ - 2θ получена с установленными щелями перед детектором после юстировки 2θ -рефлекса (440), вследствие чего углы, на которых расположены дифракционные пики (по шкале рис. 4.3а), отличаются от углов, представленных на рис. 4.2а.

Были проведены расчеты с использованием данных [129] (пр. гр. $P4_32_12$, параметры решетки $a = b = 79.535$, $c = 38.118$ Å). В таблице приведены значения углов Брэгга, полученные из эксперимента и в результате указанных расчетов, также приведены соответствующие им индексы отражений и экспериментальные значения полуширин КДО (FWHM).

Из таблицы видно, что регистрируемые в эксперименте дифракционные отражения соответствуют отражениям от грани (110) и значения полуширин КДО свидетельствуют о высоком качестве выращенных кристаллов. Однако

сравнительно большие значения полуширин для отражений высоких порядков свидетельствуют о том, что кристаллическая решетка исследуемых белков не являлась идеальной.

Таблица 4.1. Величины углов Брэгга кристалла Лиз, полученные в эксперименте ($2\theta_{\text{эксп}}$) и в результате расчетов ($2\theta_{\text{расч}}$), соответствующие им индексы hkl отражений и экспериментальные значения полуширин КДО (FWHM).

hkl	$2\theta_{\text{расч}}$, град	$2\theta_{\text{эксп}}$, град	FWHM, град	FWHM, угл. с
(110)	0.7226	0.7355	0.0083	29.9
(220)	1.4453	1.4616	0.0080	28.8
(330)	2.1680	2.1880	0.0083	29.9
(440)	2.8909	2.9145	0.0087	31.1
(550)	3.6138	3.6402	0.0081	29.0
(770)	5.0601	5.0956	0.0098	35.1

Регистрируемая дифракционная картина оставалась стабильной в течение длительного времени (более 100 ч) и кристаллы сохранялись до полного испарения осадителя, предотвращающего разложение белка. После испарения осадителя начиналась стадия деградации кристаллов.

4.4. Дегградация кристаллов

На *рис. 4.4* показана эволюция дифракционной кривой, приведенной на *рис. 4.3*, в процессе испарения осадителя, иллюстрирующая деградацию (разрушение) кристаллической структуры выращенных белковых кристаллов тетрагонального лизоцима.

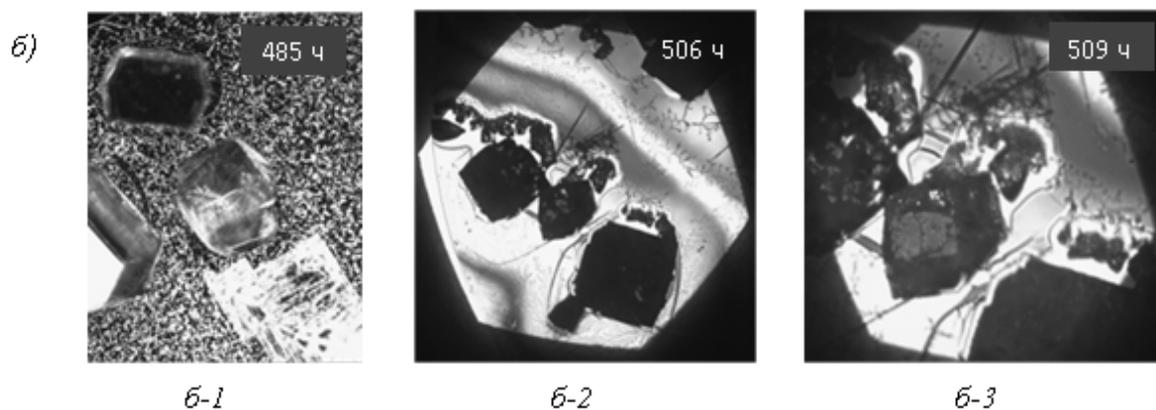
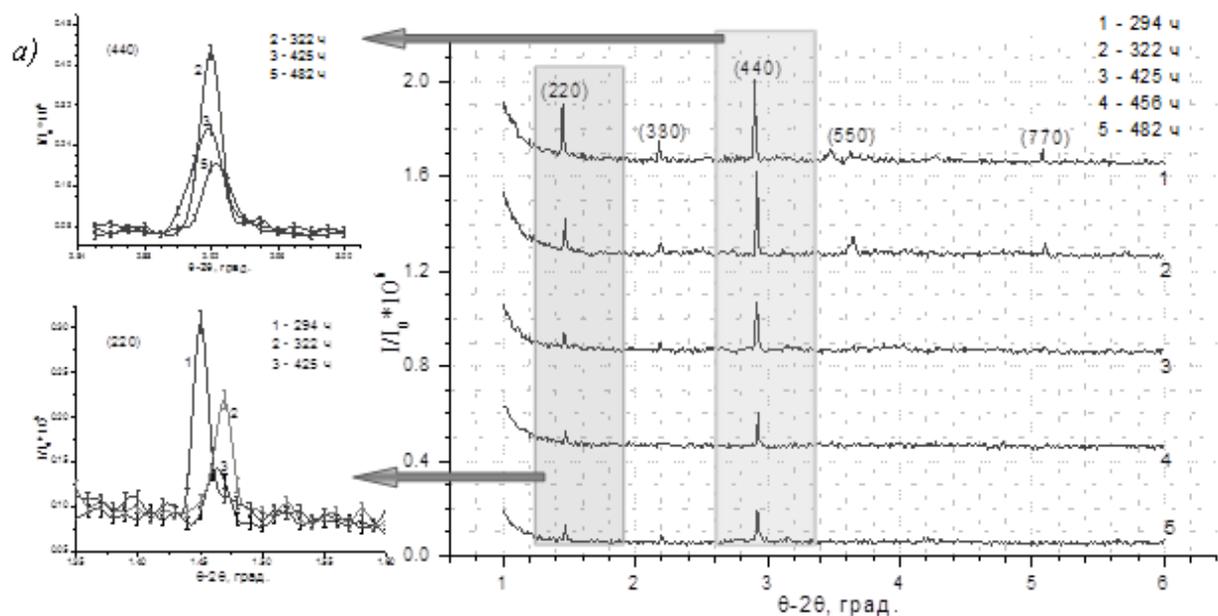


Рис. 4.4. Эволюция серии дифракционных пиков, кривых θ - 2θ -сканирования (1–5), соответствующих семейству отражений (110) кристаллов тетрагонального лизоцима после испарения осадителя в процессе их разрушения – стадия деградации кристаллов. На вставке – изменения КДО (440) и (220). На графиках для каждой кривой 1–5 указано время (в часах), прошедшее после загрузки кристаллизационной ячейки (а). Изображения, полученные на оптическом микроскопе на стадии деградации и разрушения кристаллов (б). Фото б-3 получено после вскрытия кристаллизационной ячейки.

Дифрактограммы θ - 2θ -сканирования регистрировались с интервалом не менее 24 ч (время указано на графиках рис. 4.4а). В ходе эксперимента интенсивности дифракционных отражений падают, а полуширины увеличиваются. По-видимому, это связано с дефектами кристаллической структуры, которые соответствуют

деформациям кристаллической решетки порядка $\Delta d/d \sim 10^{-3}$. Отметим, что необходимы дополнительные детальные исследования данного факта.

Деградация кристаллов лизоцима обусловлена постепенным изменением равновесного состояния среды вследствие испарения осадителя, а также регулярным воздействием рентгеновского излучения. По фотографиям (рис. 4.4б) видно, что изменение формы происходит неоднородно, следовательно, характер разрушения требует отдельного изучения.

Кристаллы лизоцима в ячейке были стабильны, в течение примерно 170 и еще 180 ч могли быть исследованы в условиях медленной деградации. Аналогичные измерения были проведены для кристалла лизоцима тетрагональной сингонии на стеклянной подложке с проводящим подслоем оксида индия-олова (ИТО) (рис. 4.5).

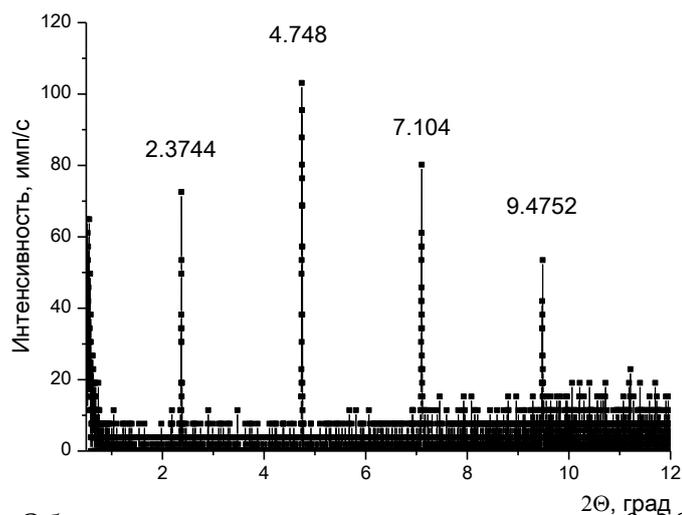


Рис. 4.5. Обзорная экспериментальная кривая θ - 2θ -сканирования. Представлена серия дифракционных пиков кристаллов тетрагонального лизоцима; отмечены брэгговские углы 2θ , соответствующие регистрируемым порядкам отражения 101.

Были проведены расчеты с использованием данных [129] (пр. гр. $P4_32_12$, параметры решетки $a = b = 79.535$, $c = 38.118$ Å). В таблице приведены значения углов Брэгга, полученные из эксперимента и в результате указанных расчетов, также приведены соответствующие им индексы отражений.

Таблица 4.2. Величины углов Брэгга кристалла лизоцима, полученные в эксперименте ($2\theta_{\text{эксп}}$) и в результате расчетов ($2\theta_{\text{расч}}$), соответствующие им индексы hkl отражений.

hkl	$d(hkl)$, Å	$2\theta_{\text{расч}}$, град	$2\theta_{\text{эксп}}$, град
(101)	34.322	1.1841	-
(202)	17.161	2.3684	2.3744
(303)	11.441	3.5529	-
(404)	8.5804	4.7378	4.748
(505)	6.8643	5.9233	-
(606)	5.7203	7.1093	7.104
(707)	4.9031	8.2961	-
(808)	4.2902	9.4838	9.4752

4.5. Заключение

Разработан кристаллизатор с замкнутой атмосферой, позволяющий методом «сидячей капли» выращивать кристаллы белка на кристаллической подложке, обеспечивающий возможность оптических и рентгенодифракционных исследований в широком диапазоне углов падения, что позволяет изучать *in situ* зарождение, рост и деградацию кристаллов белков.

На примере исследования кристаллов лизоцима тетрагональной сингонии показано, что можно получить важные сведения о стадиях зарождения, роста и деградации белкового кристалла на кристаллической подложке кремния.

Качество получаемых кристаллов (полуширина кривой дифракционного отражения (КДО) (220) составила 28.8 угл. с) соответствует качеству кристаллов, выращенных в условиях земной гравитации [130,131] (полуширина КДО 24–45 угл. с), но уступает кристаллам, выращенным в условиях невесомости [131] (полуширина КДО 10–17 угл. с).

ГЛАВА 5. *IN SITU* ИССЛЕДОВАНИЯ СОСТОЯНИЯ МОЛЕКУЛ ЛИЗОЦИМА НА СТАДИИ НАЧАЛА ПРОЦЕССА КРИСТАЛЛИЗАЦИИ МЕТОДОМ МАЛОУГЛОВОГО РАССЕЙНИЯ РЕНТГЕНОВСКИХ ЛУЧЕЙ

Экспериментальная проверка предположения, что кластер структуры кристалла (упорядоченный олигомер) может служить элементом, обеспечивающим его рост, была проведена исследованием олигомеров в растворе, обеспечивающем рост кристаллов лизоцима тетрагональной сингонии. Согласно публикации Хейна и др. [132], существует несколько форм выращиваемых структур кристалла лизоцима: тетрагональная, моноклинная, орторомбическая и триклинная. Нами была выбрана тетрагональная форма ввиду того, что она формируется в широком диапазоне условий и является наиболее стабильной.

Измерения проводились методами ДРС и МУРР на лабораторном дифрактометре и с использованием высокоинтенсивного синхротронного излучения на станции ДИКСИ (в НИЦ «Курчатовский институт») при различных состояниях белковых молекул в кристаллизационном растворе.

В данной работе был сделан акцент на сопоставление структуры белкового раствора при условиях, исключающих кристаллизацию, со структурой при оптимальных условиях для получения высококачественных кристаллов лизоцима тетрагональной сингонии. Насыщение раствора можно контролировать путем изменения концентрации белка, буферного ионного раствора и температуры. Мы исследовали процесс роста кристалла как функцию температуры при постоянной концентрации белка и осадителя. Сильная температурная зависимость степени растворимости лизоцима позволила провести измерения концентрации олигомеров в насыщенном и ненасыщенном растворах [108]. **Молекулярное моделирование, основанное на анализе структуры тетрагональной формы лизоцима**

Для построения молекулярных моделей возможных элементов роста кристаллов лизоцима тетрагональной сингонии была использована кристаллическая структура из Базы Данных Белков (PDB ID: 4WLD), определенная

с разрешением 1.54 Å. Кристалл принадлежит к пространственной группе $P4_32_12$ с параметрами элементарной ячейки $a = b = 79.20$ Å, $c = 37.90$ Å, $\alpha = \beta = \gamma = 90.00^\circ$. Содержание растворителя в кристалле составляет 40.68%, в асимметричной ячейке – одна молекула Лиз. Для выбранной пространственной структуры молекулы с помощью программы *Coot* [133] были применены по очереди операторы симметрии, позволившие получить фрагмент соответствующей кристаллической решетки $P4_32_12$ ($-X, -Y, 1/2+Z$; $1/2-Y, 1/2+X, 3/4+Z$; $1/2+Y, 1/2-X, 1/4+Z$; $1/2-X, 1/2+Y, 3/4-Z$; $1/2+X, 1/2-Y, 1/4-Z$; $Y, X, -Z$; $-Y, -X, 1/2-Z$).

Выделение строительных элементов на основе анализа структуры кристалла лизоцима тетрагональной сингонии

На рис. 5.1 (центр) показана проекция структуры кристалла лизоцима тетрагональной сингонии, перпендикулярная оси 4 порядка.

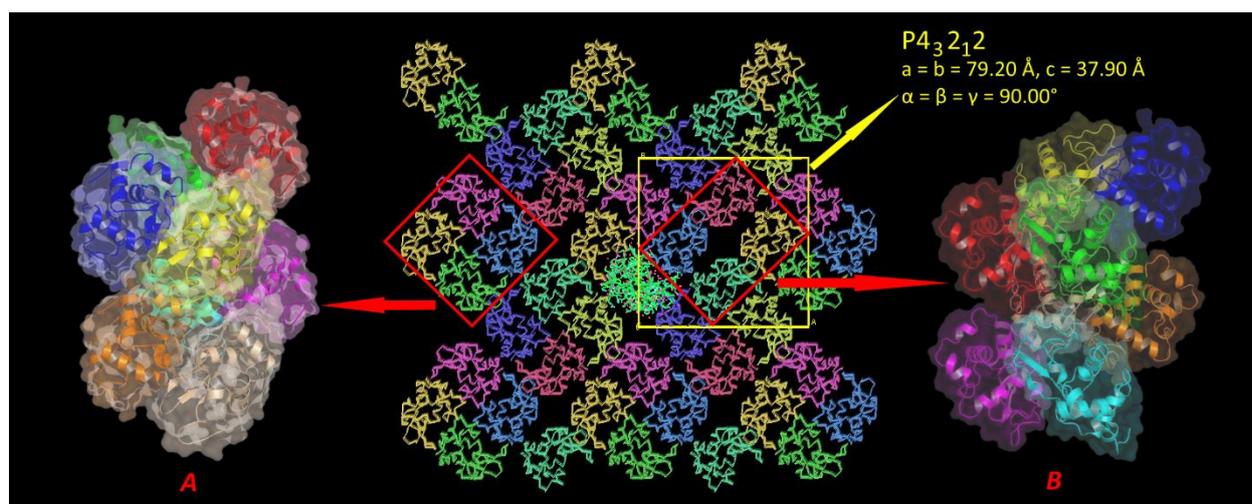


Рис. 5.1. Проекция структуры кристалла лизоцима тетрагональной сингонии (PDB ID: 4WLD), перпендикулярная центру оси вращения 4 порядка. Два типа октамеров (A и B) предлагаются в качестве возможных «строительных блоков» для роста кристалла. Для наглядности молекулы лизоцима помечены различными цветами. Объемы октамеров типов A и B равны, соответственно, 117 нм³ и 140 нм³.

Анализ молекулярной упаковки кристалла лизоцима показывает, что данная структура повторяется, она может быть получена методом трансляции полной структуры кристалла октамера и определяется тремя различными способами. С

помощью программ Coot [133] и PyMOL [134] были получены координаты двух октамеров. Кластеры (элементарные единицы роста), как видно из рис. 5.1 (А – левый и В – правый), отличаются по конфигурации и объему (размеру). Один из них формируется путем вращения асимметричного элемента вокруг оси 4 порядка, а другой – путем комбинации двух тетрамеров воспроизведением асимметричного элемента и вращением вокруг оси 2 порядка.

Кристаллическая структура гексамеров, тетрамеров и димеров была получена из структуры октамеров путем удаления мономеров лизоцима. Каждый из полученных кластеров был сохранен в файл, содержащий координаты атомных плоскостей. Модели двух выбранных октамеров и других олигомеров были использованы при обработке экспериментальных кривых МУРР.

5.2. Экспериментальная секция

5.2.1. Исследование растворов лизоцима методом динамического рассеяния света

Для раствора лизоцима (40 мг/мл) было показано, что максимум распределения частиц по радиусам приходится на 2.1 нм (рис. 5.2), что примерно соответствует гидродинамическому радиусу молекулы лизоцима (1.9 нм).

При добавлении осадителя наблюдали тенденцию к укрупнению частиц в растворе, так же как в работе [54]. Было показано, что максимум распределения смещается на 4.0 нм, что может соответствовать образованию агрегатов из 8 молекул. Однако существующий на сегодняшний день математический аппарат обработки данных для данного метода не позволяет определить ни тип образующихся частиц, ни их концентрацию.

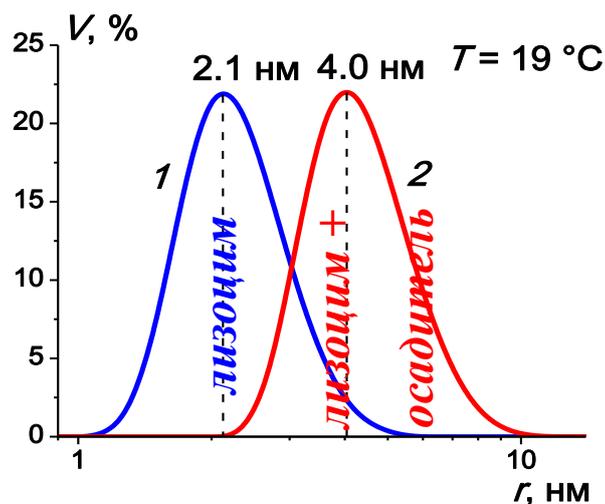


Рис. 5.2. Распределение частиц по радиусам для растворов: синим – лизоцима (40 мг/мл), красным – лизоцима с осадителем (40 мг/мл и 25 мг/мл соответственно).

5.2.2. Исследование растворов лизоцима методом малоуглового рассеяния рентгеновских лучей на дифрактометре АМУР-К

Были исследованы пересыщенный раствор белка (40 мг/мл) в смеси с осадителем (25 мг/мл), раствор чистого белка в том же буфере и при той же концентрации, раствор осадителя (25 мг/мл) и буферный раствор. Рассеяние от последнего вычитали из данных после приведения измерений к нулевому поглощению. Исследования состояния молекул лизоцима в смеси с осадителем проводили при комнатной температуре.

Для анализа экспериментальных данных малоуглового рассеяния на основании известной трехмерной структуры лизоцима (PDB ID: 4WLD) с использованием программ COOT [133] и Rmol [134] были построены модели различных олигомеров – димер, тетрамер, октамер. При этом предполагалось, что молекулы относительно друг друга в олигомере строятся также как в кристаллической решетке кристалла лизоцима тетрагональной сингонии.

Первичную обработку полученных экспериментальных данных малоуглового рассеяния и расчеты интенсивности МУРР от смесей макромолекул и смоделированных олигомеров проводили с помощью программ AGBN,

SASPLOT, CRY SOL, MIXTURE, OLIGOMER [135] и ряда других, с использованием методики, описанной в [136].

На *рис. 2.3а*. представлены кривые зависимости интенсивности МУРР (I) от модуля вектора рассеяния (s), измеренные от капилляра с: раствором лизоцима (40 мг/мл) в буфере без осадителя (кривая 1); раствором лизоцима (40 мг/мл), смешанным с осадителем (25 мг/мл) через 1 час после смешивания растворов (кривая 2). Зависимости, аналогичные кривой 2, были получены при исследовании раствора белка с осадителем, помещенного в кристаллизационную ячейку, как показано на схеме 1 (б), через 1-12 часов после загрузки растворов в капилляр.

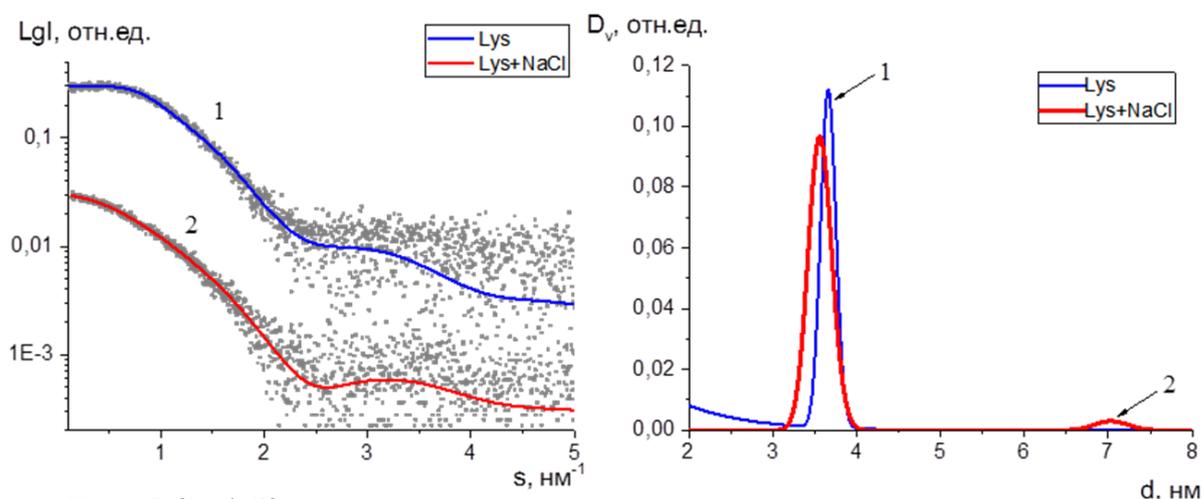


Рис. 5.3. а) Кривые интенсивности малоуглового рентгеновского рассеяния: экспериментальные данные – точки, расчет – линия. Кривые смещены по вертикали для лучшей визуализации; 1 – рассеяние от раствора лизоцима с концентрацией; 2 – рассеяние от раствора лизоцима с осадителем; б) Сравнение объемных распределений по радиусам сферических частиц от раствора лизоцима – 1 и от раствора лизоцима с осадителем – 2.

Сравнение экспериментальной зависимости интенсивности МУРР для образца раствора лизоцима (40 мг/мл) и теоретической кривой интенсивности от полидисперсной модели, рассчитанной путем суперпозиции теоретических кривых МУРР от кристаллической структуры лизоцима (PDB ID: 4WLD) и построенных из нее олигомеров с различным содержанием мономеров, показало, что в растворе агрегаты отсутствуют, а рассеяние происходит на мономерных частицах.

По форме кривой 1 (от раствора белка без осадителя) видно, что при концентрации 40 мг/мл наблюдается влияние межчастичной интерференции, приводящей к относительному уменьшению интенсивности рассеяния в начальных углах. При этом при добавлении к раствору белка осадителя концентрация отдельных частиц, на которых происходит рассеяние, уменьшается до такой степени, что межчастичная интерференция практически не проявляется, что видно по кривой 2 на *рис. 5.3а*, несмотря на то, что концентрация белковых молекул в образце остается той же (40 мг/мл). Это можно объяснить тем, что уже на самой начальной стадии кристаллизации (первый час) происходит сборка отдельных молекул белка – мономеров в более крупные частицы, концентрация мономеров при этом уменьшается в несколько раз по сравнению с исходным раствором. Во-первых, происходит образование олигомеров, во-вторых, формируются частицы, размер которых превышает, как минимум, сто нанометров. Рассеяния от таких крупных образований мы не наблюдаем: углы рассеяния находятся за пределами чувствительности прибора (слишком малые углы).

По полученным кривым интенсивности малоуглового рассеяния с помощью программы POLYMIX были рассчитаны распределения по размерам частиц, наблюдаемых в растворах, в сферическом приближении их формы. На *рис. 5.3б* представлены полученные распределения по размерам частиц для чистого раствора белка (кривая 1), и от растворов белка с осадителем через 1 часа после смешивания (кривая 2). Из полученных распределений видно, что в присутствии осадителя в растворе появились частицы с удвоенным радиусом, что может соответствовать октамерным образованиям.

Тем не менее, не исключено, что система содержит также другие олигомеры, поэтому для более подробной и достоверной обработки экспериментальных данных были смоделированы возможные олигомеры – димер, тетрамер и октамер. Полученные модели олигомеров представлены на *рис. 5.4*.

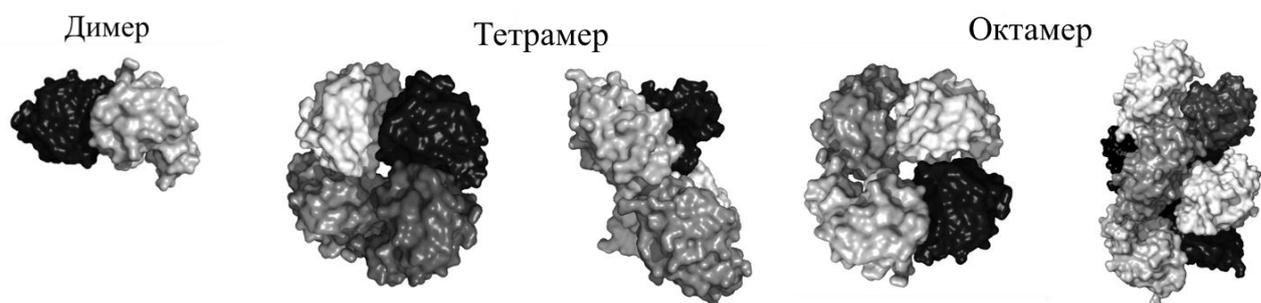


Рис. 5.4. Модели димера, тетрамера и октамера, построенные из структуры кристалла лизоцима тетрагональной сингонии (PDB ID: 4WLD) для обработки экспериментальных данных МУРР.

На основе данных о координатах атомов в смоделированных олигомерах с помощью программы CRY SOL [137] были рассчитаны угловые зависимости рентгеновского рассеяния, а с помощью программы OLIGOMER путем подгонки теоретических кривых МУРР от смеси олигомеров к экспериментальной кривой был определен состав кристаллизационного раствора.

На *рис. 5.5* показана обработка экспериментальных данных и ошибка. Обработка экспериментальных данных показала, что в растворе лизоцима в условиях кристаллизации тетрагональной формы содержится: 96.0% мономеров, 1.9% димеров, 2.1% октамеров. Наличие тетрамеров в растворе не подтвердилось. При этом параметр невязки χ^2 получился равным $\chi^2=1.2$. Значение параметра невязки, большее единицы может быть обусловлено как недостаточно адекватной оценкой экспериментальных шумов, так и также наличием в растворе частиц с размерами более сотни нанометров, являющихся зародышами кристаллов. Можно предположить, что димеры и октамеры, находясь в растворе в равновесном состоянии, являются строительными блоками кристалла, также димеры могут собираться в октамеры.

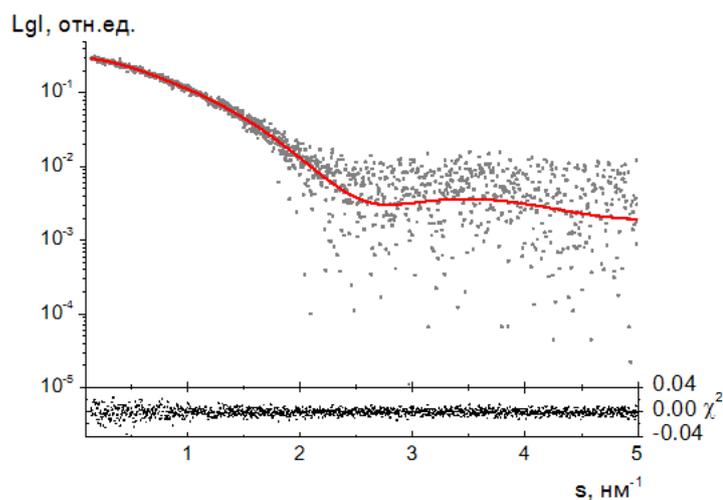


Рис. 5.5. Кривые интенсивности малоуглового рентгеновского рассеяния от раствора лизоцима (40 мг/мл) с осадителем: экспериментальные данные – точки, расчет – линия. Вставка – параметр невязки χ^2 .

5.2.3. Исследование растворов лизоцима методом малоуглового рассеяния рентгеновских лучей на синхротронной станции ДИКСИ

Пересыщенный раствор белка (40 мг/мл) в смеси с осадителем (25 мг/мл), раствор чистого белка в том же буфере и при той же концентрации, раствор осадителя (25 мг/мл) и буферный раствор были измерены с помощью высокоинтенсивного синхротронного излучения. Исследования состояния молекул лизоцима в смеси с осадителем проводили при температурах в диапазоне 10-40 °С.

Для анализа кривых рассеяния от растворов в качестве исходных данных были взяты атомные модели олигомеров, построенные на основе кристаллической структуры кристалла лизоцима тетрагональной сингонии (см. п. 5.1, рис. 5.1). Рассчитанные кривые рассеяния от олигомеров (в том числе мономеров) использовались для аппроксимации экспериментальных данных линейной комбинацией отдельных компонентов в программе OLIGOMER [135]. Качество аппроксимации выражается значением коэффициента χ^2 :

$$\chi^2 = \frac{1}{N-1} \sum_{j=1}^N \left[\frac{I_{\text{mod}}(s_j) - I_{\text{exp}}(s_j)}{\sigma(s_j)} \right]^2, \quad (5.1)$$

где $s = 4\pi\sin(\theta) / \lambda$ – вектор рассеяния, 2θ – угол рассеяния, λ – длина волны, $\sigma(s_j)$ – стандартное отклонение, N – число экспериментальных точек, $I_{\text{exp}}(s)$ – экспериментальная зависимость интенсивности рентгеновского рассеяния от вектора s , $I_{\text{mod}}(s)$ – теоретическая кривая, рассчитанная для комбинации моделей олигомеров.

Моделирование интенсивности рассеяния проводили с помощью программы CRY SOL [137]. Для проверки присутствия больших агрегатов кривые рассеяния обрабатывались программой MIXTURE [138] в предположении сферической формы макромолекул и их производных, так как достоверно известно, что молекулярные комплексы в данном случае имеют приблизительно сферическую форму.

Лизоцим без осадителя. Были получены кривые рентгеновского рассеяния для раствора белка с концентрацией 40 мг/мл, при температурах 10, 25 и 35 °С (рис. 5.6) Как видно на рис. 5.6а, кривые рассеяния от раствора белка без осадителя практически не отличаются друг от друга при разных температурах. По формам кривых заметно влияние межчастичного взаимодействия, которое вызывает некоторое снижение интенсивности рассеяния в области малых углов.

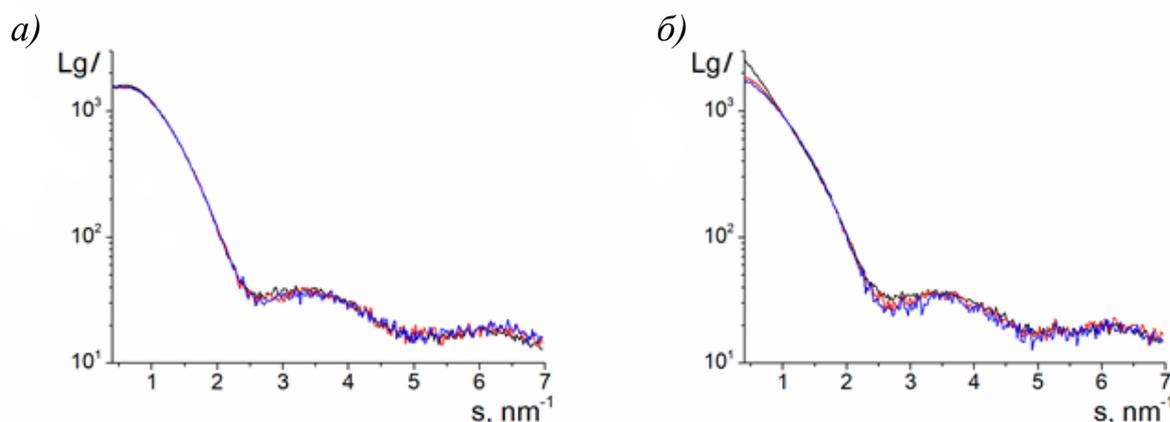


Рис. 5.6. Кривые малоуглового рассеяния, полученные при различных температурах. 10 °С (черным), 25 °С (красным), 35 °С (синим). Данные получены для образцов: а) раствор лизоцима 40 мг/мл; б) раствор лизоцима (40 мг/мл) с осадителем (25 мг/мл).

Лизоцим с осадителем. На *рис. 5.6б* приведены результаты исследования МУРР в диапазоне температур от 10 до 35 °С для растворов лизоцима (40 мг/мл) с осадителем (25 мг/мл).

Добавление осадителя вызывает изменение характера взаимодействия между молекулами [62]. В растворе белка, в который добавлен осадитель при концентрации, достаточной для начала кристаллизации, кривые рассеяния заметно отличались друг от друга при изменении температуры. Данное обстоятельство дает возможность сделать вывод о том, что распределение молекул в растворе олигомеров различно при различных температурах. Это различие было также заметно при увеличении температуры в кристаллизационных условиях, что свидетельствует о меньшей степени агрегации макромолекул.

На *рис. 5.7* показано сравнение формы кривых МУРР от растворов лизоцима без (черный) и с осадителем (25 мг/мл) (красный) при температуре 10 °С. Добавление осадителя привело к уменьшению межчастичной интерференции из-за изменения состояния молекул белка в пересыщенном растворе. Данный эффект объясняется формированием олигомеров.

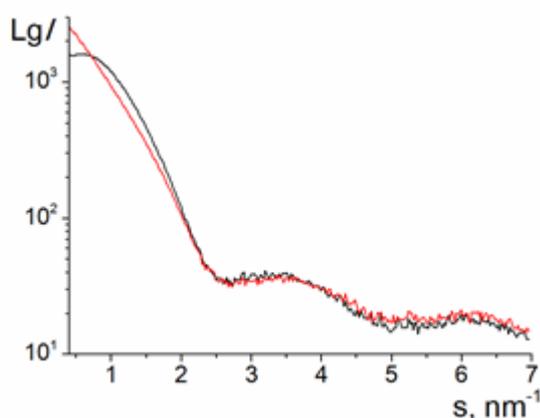


Рис. 5.7. Сравнение формы кривых МУРР от растворов лизоцима без (черный) и с осадителем (25 мг/мл) (красный) при температуре 10 °С.

Распределение объемных долей сферических частиц с подобранной с учетом их размеров моделью рассеяния показано на *рис. 5.8*. Представленные результаты получены в программе MIXTURE. Наиболее интенсивный максимум

распределения соответствует мономеру. Полуширина определяется отклонением формы молекулы от сферической. Второй, менее интенсивный пик, соответствует частицам со средним диаметром 6.07 нм и объемом 117 нм³, равному объему октамера А (117 нм³). Однако, с учетом погрешностей, нельзя полностью исключить присутствие также октамеров В (140 нм³).

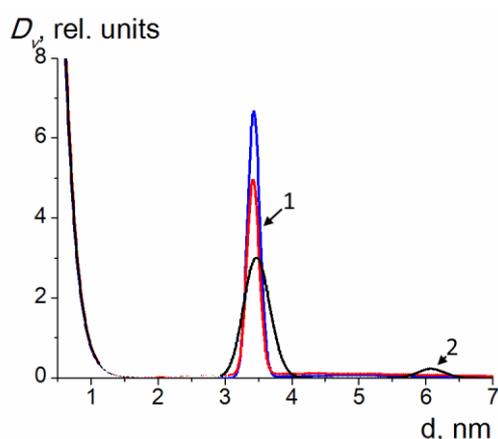


Рис. 5.8. Распределение объемных долей частиц в предположении сферической формы: 10°C (черным), 25°C (красным), 35°C (синим). Максимум 1 соответствует мономеру, максимум 2 – октамеру А.

В этой связи, для выяснения состава смеси раствора белка и осадителя (при условиях кристаллизации лизоцима тетрагональной сингонии), нами была использована модель октамера А, а также соответствующих моделей димера, тетрамера и гексамера, для аппроксимации экспериментальных данных. Модельные кривые МУРР для каждого компонента, рассчитанные в программе CRY SOL, показаны на *рис. 5.9а*. Данные были интерполированы методом наименьших квадратов в программе OLIGOMER как суммы интенсивностей модельных компонентов, т.е. атомных структур мономеров, димеров, тетрамеров и октамеров лизоцима (*рис. 5.9б*). Расчетные кривые МУРР, полученные для предложенных моделей олигомеров, совпали в пределах ошибки.

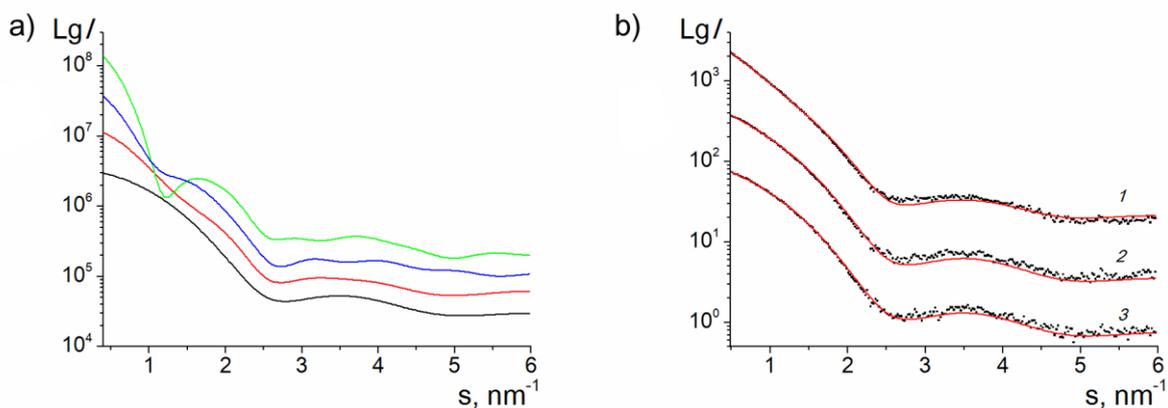


Рис. 5.9. а) Модельные кривые МУРР от структур лизоцима – мономер (черным), димер (красным), тетрамер (синим) и октамер (зеленым) – рассчитанные в программе CRY SOL; б) Экспериментальные кривые рассеяния (черные точки) и модельные кривые (красные линии), рассчитанные на основе комбинации мономеров, димеров и октамеров, показанной в табл.1, в программе OLIGOMER: 10°C (1), 25°C (2), 35°C (3). Кривые смещены по вертикальной оси для лучшего представления.

В таблице представлены результаты расчета распределений различных типов олигомеров в растворе белка с осадителем для температур 10, 25, 35°C. При этих температурах меняется растворимость лизоцима в присутствии хлорида натрия [108] так, что состояние белка и раствора осадителя соответствует трем различным областям на фазовой диаграмме кристаллизации [132]. Первая точка (Т = 10°C) соответствует оптимальному росту, вторая точка (Т = 25°C) соответствует области, где рост подавляется, и третья (Т = 35°C) – области, где рост не происходит вовсе.

Поскольку растворы исследовались при высоких концентрациях, соответствующим условиям кристаллизации, на форму кривых рассеяния должен влиять эффект межчастичной интерференции. Исходя из этого, доля агрегатов, рассчитанная с помощью моделирования, должна отличаться в абсолютных значениях от их реальных величин. Однако, в данной работе было проведено сравнение измерений при различных температурах и изучение тенденций в изменениях в растворах, как альтернатива исследованию конечного состояния раствора.

Таблица 5.1. Относительные концентрации одиночных молекул лизоцима и их олигомеров (тип А), полученные из кривых МУРР при различных температурах: лизоцима (40 мг/мл) с осадителем (25 мг/мл).

Тип кластера	Концентрация, %		
	$T = 10^{\circ}\text{C}$	$T = 25^{\circ}\text{C}$	$T = 35^{\circ}\text{C}$
Мономер	83±4	95±4	97.9±0.6
Димер	8±4	1±4	0±0
Тетрамер	0±0	0±0	0±0
Гексамер	0±0	0±0	0±0
Октамер	8.8±1.0	3.8±1.0	2.1±0.3
χ^2	3.2	2.2	1.6

Эффект межчастичной интерференции, который может усложнять процесс обработки экспериментальных данных, также наблюдался в кривых рассеяния, полученных от растворов лизоцима без осадителя при всех температурах (рис. 5.6). Тем не менее, при данной концентрации среднее расстояние между молекулами (~ 17 нм) было приблизительно в 6 раз больше линейного размера самих молекул (~ 3 нм). Вдобавок, при добавлении осадителя молярная доля отдельных частиц (мономеров, димеров и октамеров) была приблизительно в 2 раза меньше, чем в растворе белка без осадителя. Данное обстоятельство позволяет предположить, что изменения в характере межчастичного взаимодействия находятся в пределах погрешности.

Исследование серии растворов разной концентрации с целью приведения к ее нулевому значению интенсивности МУРР не имеет смысла ввиду того, что использование более низких концентраций в данном случае не позволит реализовать условия кристаллизации и приведет к изменению состава смеси.

Значение коэффициента χ^2 для кривых МУРР выбранных моделей варьировалось от 1.6 до 3.2 (см. табл. 1). Большие значения χ^2 можно объяснить преимущественно концентрационными эффектами и расхождениями в области

больших углов. При условиях кристаллизации число частиц уменьшалось из-за их агрегации, что дало ослабление концентрационного эффекта (рис. 5.7). Влияние взаимно противоположных факторов присутствия агрегатов и структурного фактора привело к появлению осцилляций в области Гинье на кривых рассеяния. Данный феномен не рассматривался в нашем исследовании, для простоты было сделано допущение об уменьшении влияния структурного фактора. Однако этот эффект также вносит свой вклад в увеличение значения χ^2 при моделировании смеси растворов различных типов агрегатов.

В нашем случае, из-за неопределенности структурных факторов, систематические ошибки могут привести к общей погрешности определения относительной доли агрегатов порядка 20-30%. Однако главной целью являлось сравнительное изучение образцов, а не определение абсолютной концентрации агрегатов, и поэтому установление абсолютных погрешностей не требовалось.

5.3. Заключение

Предложен подход к изучению начальной стадии кристаллизации белков, основанный на анализе структуры белкового кристалла, выделении его элементарных строительных блоков и исследовании растворов в условиях кристаллизации методом МУРР, который может быть полезен для поиска и корректировки оптимальных условий кристаллизации белков.

На основе анализа структуры упаковки молекул в кристалле лизоцима тетрагональной сингонии был выделен октамер, из которого можно полностью построить кристалл. В структуре такие октамеры можно выбрать различными способами. Выбранные олигомеры отличаются по размерам, плотности и упаковке молекул лизоцима в них. Октамер наименьшего объема (117 нм³) имеет винтовую ось симметрии 4₃, наибольшего (140 нм³) – ось симметрии 2 порядка.

Анализ экспериментальных данных МУРР, основанный на использовании двух различных моделей октамеров, показал присутствие димеров и октамеров в растворе в предкристаллизационном состоянии, помимо мономеров. Вне

зависимости от выбранной модели олигомеров, не было выявлено наличия тетрамеров и гексамеров в растворе, отмеченных в работах [54,67,69]. По мере увеличения температуры и смещения раствора белка из области кристаллизации по фазовой диаграмме количество олигомеров в растворе уменьшалось и становилось сравнимым с погрешностями.

Полученные результаты указывают на высокую вероятность правильности предложенной модели кристаллизации, когда элементарным кластером, образующим кристалл, является структурный блок, состоящий из восьми молекул лизоцима.

ВЫВОДЫ И ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ РАБОТЫ

1. Предложен новый способ определения структуры поверхностного слоя на основе разработанного модифицированного метода СРВ без регистрации вторичных процессов в условиях многоволнового взаимодействия различных порядков дифракционного отражения от одного семейства атомных плоскостей. Метод был апробирован на многослойной пленке стеарата свинца. Показано, что структура верхнего слоя значительно отличается от структуры остального объема образца: гидрофобные хвосты последнего слоя стеарата свинца наклонены по отношению к нормали к поверхности под углом 40° ;

2. Проведена отработка условий формирования ленгмюровских монослоев и получены пленки ЦитС, липидов, входящих в состав митохондриальной мембраны (БКЛ, ТОКЛ) и белково-липидные пленки на их основе. Исследована кинетика адсорбции ЦитС на липидных монослоях. Основываясь на экспериментальных результатах в совокупности с литературными данными, определено, что белок меняет свою конформацию во время его адсорбции на границе раздела вода-воздух или при встраивании в монослой КЛ на поверхности жидкости: одна половина глобулы белка становится преимущественно гидрофобной, а другая – гидрофильной («стратифицированный» ЦитС);

3. В разработанной специализированной ячейке проведены оптические и рентгеновские исследования *in situ* процессов роста и деградации кристалла лизоцима тетрагональной сингонии на неорганических подложках, в том числе, на проводящей. Благодаря контролю роста удалось вырастить кристаллы (полуширина КДО отражения (220) составила 28.8 угл. с), которые по качеству соответствуют лучшим кристаллам, выращенным в условиях земной гравитации (полуширина КДО 24–45 угл. с). На примере выращенного кристалла лизоцима тетрагональной сингонии на проводящем подслое ИТО показано, что данный подслой не оказывает влияния на структуру получаемого кристалла;

4. Предложен и экспериментально подтвержден новый подход к исследованию начальной стадии процесса кристаллизации белков, основанный на выделении основных мотивов в структуре белковых кристаллов, определяющих образование комплексов в растворе. На основе анализа структуры упаковки молекул в кристалле лизоцима тетрагональной сингонии были выделены октамеры, из которых можно полностью построить кристалл. Объем таких октамеров составляет $\sim 120 \text{ нм}^3$. Анализ экспериментальных данных МУРР, основанный на использовании двух различных моделей октамеров, показал присутствие димеров и октамеров в растворе в предкристаллизационном состоянии, помимо мономеров. Вне зависимости от выбранной модели олигомеров, не было выявлено наличия тетрамеров и гексамеров в растворе. По мере увеличения температуры и, соответственно, большего отклонения условий кристаллизации от оптимальных, количество олигомеров в растворе уменьшалось вплоть до полного их исчезновения (в пределах погрешности). Полученные результаты указывают на высокую вероятность правильности предложенной модели кристаллизации, когда элементарным кластером, образующим кристалл, является структурный блок, состоящий из восьми молекул лизоцима. Таким образом, обнаружение олигомеров в растворе может явиться критерием поиска оптимальных условий кристаллизации белков.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Functional Hybrid Materials / ed. Gómez-Romero P., Sanchez C. Weinheim, FRG: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2003.
2. Organic Nanomaterials / ed. Torres T., Bottari G. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., 2013.
3. Sanchez C. et al. Applications of advanced hybrid organic–inorganic nanomaterials: from laboratory to market // Chem. Soc. Rev. 2011. Vol. 40, № 2. P. 696.
4. Petty M.C. Molecular Electronics. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd, 2007. 544 p.
5. Tang C.W., VanSlyke S.A. Organic electroluminescent diodes // Appl. Phys. Lett. 1987. Vol. 51, № 12. P. 913.
6. Li F. et al. Blue polymer light-emitting diodes with organic/inorganic hybrid composite as hole transporting layer // Org. Electron. 2005. Vol. 6, № 5-6. P. 237–241.
7. Rieß W. et al. Organic–inorganic multilayer structures: a novel route to highly efficient organic light-emitting diodes // Synth. Met. 1999. Vol. 99, № 3. P. 213–218.
8. Xiao-hui Y. et al. Organic Light Emitting Diode Using Inorganic Material as Electron Transport Layer // Chinese Phys. Lett. 1997. Vol. 14, № 12. P. 946–948.
9. Liu R. Hybrid Organic/Inorganic Nanocomposites for Photovoltaic Cells // Materials (Basel). 2014. Vol. 7, № 4. P. 2747–2771.
10. Mohana Reddy A.L. et al. Hybrid nanostructures for energy storage applications. // Adv. Mater. 2012. Vol. 24, № 37. P. 5045–5064.
11. Budyka M.F. et al. Hybrid system based on styrylquinoline ligand and CdS quantum dots // Nanotechnologies Russ. 2014. Vol. 9, № 3-4. P. 116–125.
12. Budyka M.F., Chaschikhin O. V., Nikulin P.A. Effect of coordinating ligand on spectral-luminescent properties of CdS quantum dots in microwave synthesis // Nanotechnologies Russ. 2015. Vol. 10, № 1-2. P. 13–17.
13. Ivanovskii A.L. Hybrid nanomaterials: structure and properties of carbon peapods and related nanosystems // ISJAEE. 2004. Vol. 7, № 15. P. 28–40.

14. Maniruzzaman M., Jang S.-D., Kim J. Titanium dioxide–cellulose hybrid nanocomposite and its glucose biosensor application // *Mater. Sci. Eng. B*. 2012. Vol. 177, № 11. P. 844–848.
15. <http://large.stanford.edu/courses/2007/ph210/hellstrom1/>.
16. Hickey A.J. et al. Biliary elimination of bromsulphthalein, phenolphthalein, and doxorubicin released from microspheres following intravenous administration // *Biopharm. Drug Dispos.* 1993. Vol. 14, № 2. P. 181–186.
17. Beck L.R. et al. A new long-acting injectable microcapsule system for the administration of progesterone. // *Fertil. Steril.* 1979. Vol. 31, № 5. P. 545–551.
18. Wang Y. et al. Manufacturing Techniques and Surface Engineering of Polymer Based Nanoparticles for Targeted Drug Delivery to Cancer // *Nanomaterials*. 2016. Vol. 6, № 2. P. 26.
19. Burgués-Ceballos I. et al. Towards industrialization of polymer solar cells: material processing for upscaling // *J. Mater. Chem. A*. 2014. Vol. 2, № 42. P. 17711–17722.
20. <http://www.uakron.edu/npic/wci/equipment/hybrid-solution-casting-line.dot>.
21. <http://www.particlesciences.com/news/technical-briefs/2010/dissolving-films.html>.
22. http://www.dip-coater.com/english/about_dip_coating.html.
23. Sandberg H.G.O. et al. Ultrathin Regioregular Poly(3-hexyl thiophene) Field-Effect Transistors // *Langmuir*. 2002. Vol. 18, № 26. P. 10176–10182.
24. Blodgett K.B., Langmuir I. Built-Up Films of Barium Stearate and Their Optical Properties // *Phys. Rev.* 1937. Vol. 51, № 11. P. 964–982.
25. Blinov L.M. Langmuir films // *Uspekhi Fiz. Nauk*. 1988. Vol. 155, № 7. P. 443.
26. Roberts G. Langmuir-Blodgett films / ed. Roberts G. New York: Plenum Press, 1990. 425 p.
27. Masuda Y. Self-assembly and Patterning of Nanocrystals // *Nanocrystal. InTech*, 2011.

28. Xiang Y., Lu S., Jiang S.P. Layer-by-layer self-assembly in the development of electrochemical energy conversion and storage devices from fuel cells to supercapacitors // *Chem. Soc. Rev.* 2012. Vol. 41, № 21. P. 7291.
29. Boyko K.M., Popov V.O., Kovalchuk M. V. Promising approaches to crystallization of macromolecules suppressing the convective mass transport to the growing crystal // *Russ. Chem. Rev.* 2015. Vol. 84, № 8. P. 853–859.
30. Russo Krauss I. et al. An Overview of Biological Macromolecule Crystallization // *Int. J. Mol. Sci.* 2013. Vol. 14, № 6. P. 11643–11691.
31. Skulachev V.P. How proapoptotic proteins can escape from mitochondria? // *Free Radic. Biol. Med.* 2000. Vol. 29, № 10. P. 1056–1059.
32. Rytömaa M., Mustonen P., Kinnunen P.K. Reversible, nonionic, and pH-dependent association of cytochrome c with cardiolipin-phosphatidylcholine liposomes. // *J. Biol. Chem.* 1992. Vol. 267, № 31. P. 22243–22248.
33. Vladimirov Y.A. et al. Lipid peroxidation in mitochondrial membrane // *Adv. Lipid Res.* 1980. Vol. 17. P. 173–249.
34. Petrosillo G. et al. Reactive oxygen species generated from the mitochondrial electron transport chain induce cytochrome c dissociation from beef-heart submitochondrial particles via cardiolipin peroxidation. Possible role in the apoptosis // *FEBS Lett.* 2001. Vol. 509, № 3. P. 435–438.
35. Petrosillo G., Ruggiero F.M., Paradies G. Role of reactive oxygen species and cardiolipin in the release of cytochrome c from mitochondria. // *FASEB J.* 2003. Vol. 17, № 15. P. 2202–2208.
36. Kagan V.E. et al. Cytochrome c acts as a cardiolipin oxygenase required for release of proapoptotic factors // *Nat. Chem. Biol.* 2005. Vol. 1, № 4. P. 223–232.
37. Quinn P.J., Dawson R.M. Interactions of cytochrome c and [14C]. // *Biochem. J.* 1969. Vol. 115, № 1. P. 65–75.
38. Quinn P.J., Dawson R.M. The interaction of cytochrome c with monolayers of phosphatidylethanolamine. // *Biochem. J.* 1969. Vol. 113, № 5. P. 791–803.

39. Quinn P.J., Dawson R.M. An analysis of the interaction of protein with lipid monolayers at the air-water interface. // *Biochem. J.* 1970. Vol. 116, № 4. P. 671–680.
40. Razumas V., Nylander T., MacRitchie F. Surface Pressure Study of Hemin, Microperoxidase-8, -11, and Cytochrome c Adsorption at the Air–Water Interface // *J. Colloid Interface Sci.* 1996. Vol. 178, № 1. P. 303–308.
41. Saint-Pierre-Chazalet M., Billoudet F., Pileni M.P. Cytochrome c monolayer and mixed surfactant-cytochrome c monolayer // *Colloid Polym. Sci.* 1989. Vol. 79. P. 76–80.
42. Saint-Pierre-Chazalet M. et al. Phospholipid-protein interactions at the air-water interface: a monolayer study // *Thin Solid Films.* 1992. Vol. 210-211. P. 743–746.
43. Lamarche F. et al. Surface pressure, surface potential and ellipsometric study of cytochrome c binding to dioleoylphosphatidylcholine monolayer at the air-water interface // *Colloids and Surfaces.* 1987. Vol. 30, № 1. P. 209–222.
44. Chayen N.E., Saridakis E. Protein crystallization: from purified protein to diffraction-quality crystal // *Nat. Methods.* 2008. Vol. 5, № 2. P. 147–153.
45. Pechkova E. et al. In Situ μ GISAXS: I. Experimental Setup for Submicron Study of Protein Nucleation and Growth // *Biophys. J. Biophysical Society*, 2010. Vol. 99, № 4. P. 1256–1261.
46. McPherson A., Cudney B. Optimization of crystallization conditions for biological macromolecules // *Acta Crystallogr. Sect. F Struct. Biol. Commun.* 2014. Vol. 70, № 11. P. 1445–1467.
47. Castagnolo D. et al. Analysis of the influence of coupled diffusion on transport in protein crystal growth for different gravity levels // *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* 2002. Vol. 58, № 10. P. 1633–1637.
48. Day J., McPherson A. Macromolecular crystal growth experiments on international microgravity laboratory - 1 // *Protein Sci.* 1992. Vol. 1, № 10. P. 1254–1268.
49. Poodt P.W.G. et al. Simple Geometry for Diffusion Limited Protein Crystal Growth: Harnessing Gravity to Suppress Convection // *Cryst. Growth Des.* 2009. Vol. 9,

№ 2. P. 885–888.

50. Littke W., John C. Materials: Protein Single Crystal Growth Under Microgravity // *Science* (80-). 1984. Vol. 225, № 4658. P. 203–204.

51. Fazio V.J., Peat T.S., Newman J. A drunken search in crystallization space // *Acta Crystallogr. Sect. F Struct. Biol. Commun.* 2014. Vol. 70, № 10. P. 1303–1311.

52. Chattopadhyay S. et al. SAXS Study of the Nucleation of Glycine Crystals from a Supersaturated Solution // *Cryst. Growth Des.* 2005. Vol. 5, № 2. P. 523–527.

53. Vorontsova M.A., Maes D., Vekilov P.G. Recent advances in the understanding of two-step nucleation of protein crystals // *Faraday Discuss.* 2015. Vol. 179, № 8. P. 27–40.

54. Cui H.L. et al. Study of Growth Mechanism of Lysozyme Crystal by Batch Crystallization Method // *Chinese Chem. Lett.* 2006. Vol. 17, № 1. P. 101–104.

55. Bonneté F. et al. Protein crystallization: Contribution of small angle X-ray scattering (SAXS) // *J. Phys. IV.* 2004. Vol. 118. P. 3–13.

56. Vivarès D., Bonneté F. X-ray scattering studies of *Aspergillus flavus* urate oxidase: towards a better understanding of PEG effects on the crystallization of large proteins // *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* 2002. Vol. 58, № 3. P. 472–479.

57. Zhang F. et al. Protein interactions studied by SAXS: effect of ionic strength and protein concentration for BSA in aqueous solutions. // *J. Phys. Chem. B.* 2007. Vol. 111, № 1. P. 251–259.

58. Mikol V., Hirsch E., Giege R. Monitoring protein crystallization by dynamic light scattering // *Physics* (College. Park. Md). 1989. Vol. 258, № 1. P. 63–66.

59. Ataka M., Asai M. Systematic studies on the crystallization of lysozyme. Determination and use of phase diagrams // *J. Cryst. Growth.* 1988. Vol. 90, № 1-3. P. 86–93.

60. Mikol V., Hirsch E., Giegé R. Diagnostic of precipitant for biomacromolecule crystallization by quasi-elastic light-scattering // *J. Mol. Biol.* 1990. Vol. 213, № 1. P. 187–195.

61. Boué F. et al. Small angle neutron scattering study of lysozyme solutions // *J. Cryst. Growth*. 1993. Vol. 133, № 3-4. P. 246–254.
62. Ducruix A. et al. Protein interactions as seen by solution X-ray scattering prior to crystallogenesis // *J. Cryst. Growth*. 1996. Vol. 168, № 1-4. P. 28–39.
63. Bonneté F., Finet S., Tardieu A. Second virial coefficient: variations with lysozyme crystallization conditions // *J. Cryst. Growth*. 1999. Vol. 196, № 2-4. P. 403–414.
64. Pusey M.L., Naumann R. Growth kinetics of tetragonal lysozyme crystals // *J. Cryst. Growth*. 1986. Vol. 76, № 3. P. 593–599.
65. Pusey M.L., Snyder R.S., Naumann R. Protein crystal growth. Growth kinetics for tetragonal lysozyme crystals. // *J. Biol. Chem*. 1986. Vol. 261, № 14. P. 6524–6529.
66. Nadarajah A., Forsythe E.L., Pusey M.L. The averaged face growth rates of lysozyme crystals: the effect of temperature // *J. Cryst. Growth*. 1995. Vol. 151, № 1-2. P. 163–172.
67. Nadarajah A., Li M., Pusey M.L. Growth mechanism of the (110) face of tetragonal lysozyme crystals // *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr*. 1997. Vol. 53. P. 524–534.
68. Li M., Nadarajah A., Pusey M.L. Growth of (101) faces of tetragonal lysozyme crystals: Determination of the growth mechanism // *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr*. 1999. Vol. 55. P. 1012–1022.
69. Li H., Nadarajah A., Pusey M.L. Determining the molecular-growth mechanisms of protein crystal faces by atomic force microscopy // *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr*. 1999. Vol. 55, № 5. P. 1036–1045.
70. Nadarajah A., Pusey M.L. Growth Mechanism and Morphology of Tetragonal Lysozyme Crystals // *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr*. 1996. Vol. 52, № 5. P. 983–996.
71. Strom C.S., Bennema P. Combinatorial compatibility as habit-controlling factor in lysozyme crystallization I. Monomeric and tetrameric F faces derived graph-

theoretically // *J. Cryst. Growth*. 1997. Vol. 173, № 1-2. P. 150–158.

72. Strom C.S., Bennema P. Combinatorial compatibility as habit-controlling factor in lysozyme crystallization II. Morphological evidence for tetrameric growth units // *J. Cryst. Growth*. 1997. Vol. 173, № 1-2. P. 159–166.

73. Durbin S.D., Feher G. Studies of crystal growth mechanisms of proteins by electron microscopy // *J. Mol. Biol.* 1990. Vol. 212, № 4. P. 763–774.

74. Li H. et al. Determining the molecular-packing arrangements on protein crystal faces by atomic force microscopy // *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* 1999. Vol. 55, № 5. P. 1023–1035.

75. Wiechmann M. et al. Analysis of protein crystal growth at molecular resolution by atomic force microscopy // *Ultramicroscopy*. 2001. Vol. 86, № 1-2. P. 159–166.

76. Yaminsky I. V. et al. Atomic force microscopy study of lysozyme crystallization // *Crystallogr. Reports*. 2002. Vol. 47, № S1. P. S149–S158.

77. Givargizov E.I. *Oriented Crystallization on Amorphous Substrates*. Boston, MA: Springer US, 1991.

78. Givargizov E.I. et al. Growth of biocrystalline films of PVC catalase in space using artificial epitaxy (graphoepitaxy) // *J. Cryst. Growth*. 2008. Vol. 310, № 4. P. 847–852.

79. Задорожная Л.А., М.В. Ковальчук М.В., Ю.Н. Шилин Ю.Н. и др. Патент на изобретение (RU 2307204).

80. Schneck E. et al. Quantitative determination of ion distributions in bacterial lipopolysaccharide membranes by grazing-incidence X-ray fluorescence. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2010. Vol. 107, № 20. P. 9147–9151.

81. Nguyen L.-T.T. et al. Annealing-induced changes in double-brush Langmuir-Blodgett films of alpha-helical diblock copolypeptides. // *Langmuir*. 2010. Vol. 26, № 17. P. 14073–14080.

82. Cristofolini L. Synchrotron X-ray techniques for the investigation of structures and dynamics in interfacial systems // *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* Elsevier Ltd,

2014. Vol. 19, № 3. P. 228–241.

83. Лидер В.В. Фазочувствительные рентгеновские методы характеристики конденсированных сред: учебное пособие. Москва, 2009. 90 с.

84. Ковальчук М.В., Новикова Н.Н., Якунин С.Н. Рентгеновские методы - нанотехнологиям // Природа. 2013. Т. 11. С. 45–52.

85. Ковальчук М.В., Новикова Н.Н., Якунин С.Н. Стоячие рентгеновские волны и биологическое материаловедение // Природа. 2012. Т. 12. С. 3–14.

86. Kohn V.G. X-ray standing waves under the conditions of multiple diffraction // Phys. Status Solidi. 1988. Vol. 106, № 1. P. 31–39.

87. Kohn V.G. A theory of multiple Bragg diffraction of x rays in multilayer crystal systems // J. Moscow Phys. Soc. 1991. Vol. 1, № 4. P. 425–434.

88. Kohn V.G., Samoiloва L. V. On the Possibility of Layer-by-Layer Analysis of Near-Surface Crystal Structure by the Method of Three-Beam X-Ray Diffraction // Phys. Status Solidi. 1992. Vol. 133, № 1. P. 9–16.

89. Kazimirov A.Y., Kovalchuk M. V., Kohn V.G. Study of Multiple Diffraction of X-rays in Perfect Crystals with the Use of Synchrotron Radiation // Crystallogr. Reports. 1994. Vol. 39, № 2. P. 216–226.

90. Marchenkova M.A. et al. Thermal stability of organic layered systems based on lead stearate // J. Surf. Investig. X-ray, Synchrotron Neutron Tech. 2013. Vol. 7, № 6. P. 1028–1033.

91. Pietsch U., Holý V., Baumbach T. High-Resolution X-Ray Scattering. New York, NY: Springer New York, 2004. 408 p.

92. Kovalchuk M. V. et al. Phase-sensitive multiple-diffraction studies of single crystals // Phys. B Condens. Matter. 1996. Vol. 221, № 1-4. P. 445–449.

93. Kazimirov A.Y. et al. Instrumentation for high-precision x-ray optics at the synchrotron radiation source “Zelenograd” // Rev. Sci. Instrum. 1992. Vol. 63, № 1. P. 1027.

94. Афанасьев А.М., Кон В.Г. Внешний фотоэффект при дифракции

рентгеновских лучей в кристалле с нарушенным поверхностным слоем // ЖЭТФ. 1978. Т. 74, № 1. С. 300–313.

95. Kovalchuk M. V. et al. X-ray standing waves—a new method of studying the structure of crystals // *Uspekhi Fiz. Nauk.* 1986. Vol. 149, № 5. P. 69.

96. Savage D.E. et al. Determination of roughness correlations in multilayer films for x-ray mirrors // *J. Appl. Phys.* 1991. Vol. 69, № 3. P. 1411.

97. Nitz V. et al. Correlations in the interface structure of Langmuir-Blodgett films observed by x-ray scattering // *Phys. Rev. B.* 1996. Vol. 54, № 7. P. 5038–5050.

98. Kaganer V.M., Stepanov S.A., Köhler R. Bragg diffraction peaks in x-ray diffuse scattering from multilayers with rough interfaces // *Phys. Rev. B.* 1995. Vol. 52, № 23. P. 16369–16372.

99. Klechkovskaya V. V., Feigin L.A. Structure of Langmuir-Blodgett films of fatty acid salts from electron, X-ray, and neutron diffraction data // *Crystallogr. Reports.* 1998. Vol. 43, № 6. P. 917–924.

100. Peng J.B., Barnes G.T., Gentle I.R. The structures of Langmuir-Blodgett films of fatty acids and their salts. // *Adv. Colloid Interface Sci.* 2001. Vol. 91, № 2. P. 163–219.

101. Kohn V.G. Program for calculating the scattering parameters used in the X-ray standing wave method // *Crystallogr. Reports.* 2006. Vol. 51, № 6. P. 936–940.

102. McPherson A. Introduction to protein crystallization. // *Methods.* 2004. Vol. 34, № 3. P. 254–265.

103. SmartLab Automatic X-Ray Diffractometer // *Rigaku J.* 2006. Vol. 23. P. 52.

104. Bowen D.K., Tanner B.K. High Resolution X-Ray Diffractometry And Topography. Bristol, PA: Taylor & Francis, 1998.

105. Kim H.-A. et al. Nanometrology and its perspectives in environmental research // *Environ. Health Toxicol.* 2014. Vol. 29. P. e2014016.

106. Feigin L.A., Svergun D.I. Structure Analysis by Small-Angle X-Ray and Neutron Scattering. New York: Plenum Press, 1987. 176 p.

107. Могилевский Л.Ю. и др. Малоугловой рентгеновский дифрактометр с однокоординатным детектором // Кристаллография. 1984. Т. 29, № 3. С. 587–591.
108. Guilloteau J.-P., Riès-Kautt M.M., Ducruix A.F. Variation of lysozyme solubility as a function of temperature in the presence of organic and inorganic salts // J. Cryst. Growth. 1992. Vol. 122, № 1-4. P. 223–230.
109. Forsythe E.L., Judge R.A., Pusey M.L. Tetragonal Chicken Egg White Lysozyme Solubility in Sodium Chloride Solutions // J. Chem. Eng. Data. 1999. Vol. 44, № 3. P. 637–640.
110. Korneev V.N. et al. X-ray stations based on cylindrical zoom lenses for nanostructural investigations using synchrotron radiation // J. Surf. Investig. X-ray, Synchrotron Neutron Tech. 2012. Vol. 6, № 5. P. 849–864.
111. Huang T.C. et al. X-ray powder diffraction analysis of silver behenate, a possible low-angle diffraction standard // J. Appl. Crystallogr. 1993. Vol. 26, № 2. P. 180–184.
112. Hammersley A.P. FIT2D: An Introduction and Overview // ESRF Internal Report, ESRF97HA02T. 1997.
113. Konarev P. V. et al. PRIMUS : a Windows PC-based system for small-angle scattering data analysis // J. Appl. Crystallogr. 2003. Vol. 36, № 5. P. 1277–1282.
114. Islam M.A., Khan M.M.R., Mozumder M.S.I. Adsorption Equilibrium and Adsorption Kinetics: A Unified Approach // Chem. Eng. Technol. 2004. Vol. 27, № 10. P. 1095–1098.
115. Boussaad S. et al. Electron-Transfer Properties of Cytochrome c Langmuir–Blodgett Films and Interactions of Cytochrome c with Lipids // Langmuir. 1998. Vol. 14, № 21. P. 6215–6219.
116. Nichols-Smith S., Teh S.-Y., Kuhl T.L. Thermodynamic and mechanical properties of model mitochondrial membranes. // Biochim. Biophys. Acta. 2004. Vol. 1663, № 1-2. P. 82–88.
117. Vladimirov Y.A., Nol' Y.T., Volkov V. V. Protein-lipid nanoparticles that

determine whether cells will live or die // *Crystallogr. Reports*. 2011. Vol. 56, № 4. P. 553–559.

118. Vladimirov Y.A., Proskurnina E. V., Alekseev A. V. Molecular mechanisms of apoptosis. Structure of cytochrome c-cardiolipin complex // *Biochem*. 2013. Vol. 78, № 10. P. 1086–1097.

119. Pechkova E., Nicolini C. Accelerated protein crystal growth by protein thin film template // *J. Cryst. Growth*. 2001. Vol. 231. P. 599–602.

120. Kovalchuk M. V. et al. In situ study of the growth and degradation processes in tetragonal lysozyme crystals on a silicon substrate by high-resolution X-ray diffractometry // *Crystallogr. Reports*. 2014. Vol. 59, № 5. P. 679–684.

121. Kurta R.P. et al. X-ray cross-correlation analysis of liquid crystal membranes in the vicinity of the hexatic-smectic phase transition // *Phys. Rev. E*. 2013. Vol. 88, № 4. P. 044501.

122. de Jeu W.H., Fera A., Ostrovskii B.I. Thickening of a smectic membrane in an evanescent X-ray beam // *Eur. Phys. J. E*. 2004. Vol. 15, № 1. P. 61–64.

123. Kozhevnikov I. V. Physical analysis of the inverse problem of X-ray reflectometry // *Nucl. Instruments Methods Phys. Res. Sect. A Accel. Spectrometers, Detect. Assoc. Equip.* 2003. Vol. 508, № 3. P. 519–541.

124. Domènech O. et al. Specific adsorption of cytochrome C on cardiolipin-glycerophospholipid monolayers and bilayers. // *Langmuir*. 2007. Vol. 23, № 10. P. 5651–5656.

125. Cavalcanti L.P., Konovalov O. V., Torriani I.L. Lipid model membranes for drug interaction study // *Eur. Biophys. J*. 2006. Vol. 35, № 5. P. 431–438.

126. Chen Y., Sun R., Wang B. Monolayer behavior of binary systems of betulinic acid and cardiolipin: thermodynamic analyses of Langmuir monolayers and AFM study of Langmuir-Blodgett monolayers. // *J. Colloid Interface Sci. Elsevier Inc.*, 2011. Vol. 353, № 1. P. 294–300.

127. Iwase H. et al. Monoepoxide production from linoleic acid by cytochrome c in

the presence of cardiolipin // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1996. Vol. 222, № 1. P. 83–89.

128. Владимиров Ю.А., Проскурина Е.В., Алексеев А.В. Молекулярные механизмы апоптоза. Структура комплекса цитохрома С с кардиолипином // *Биохимия.* 2013. Т. 78, № 10. С. 1391–1404.

129. Svanidze A. V., Lushnikov S.G., Shuvalov L.A. Deuterated hen egg-white lysozyme crystals: Optimization of the growth conditions and morphology // *Crystallogr. Reports.* 2005. Vol. 50, № 5. P. 789–795.

130. Volz H.M., Matyi R.J. Triple-axis X-ray diffraction analyses of lysozyme crystals // *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* 2000. Vol. 56, № 7. P. 881–889.

131. Snell E.H. et al. Improvements in lysozyme protein crystal perfection through microgravity growth // *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* 1995. Vol. 51, № 6. P. 1099–1102.

132. Heijna M.C.R., van Enckevort W.J.P., Vlieg E. Growth Inhibition of Protein Crystals: A Study of Lysozyme Polymorphs // *Cryst. Growth Des.* 2008. Vol. 8, № 1. P. 270–274.

133. Emsley P. et al. Features and development of Coot // *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* International Union of Crystallography, 2010. Vol. 66, № 4. P. 486–501.

134. Schrodinger LLC. The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.8. 2015.

135. Konarev P. V. et al. ATSAS 2.1, a program package for small-angle scattering data analysis // *J. Appl. Crystallogr.* 2006. Vol. 39, № 2. P. 277–286.

136. ГОСТ Р 8.698 – 2010. Государственная система обеспечения единства измерений. Размерные параметры наночастиц и тонких пленок. Методика выполнения измерений с помощью малоуглового рентгеновского дифрактометра. Москва: Стандартинформ, 2010. 41 с.

137. Svergun D.I., Barberato C., Koch M.H.J. CRY SOL - A program to evaluate X-

ray solution scattering of biological macromolecules from atomic coordinates // J. Appl. Crystallogr. 1995. Vol. 28, № 6. P. 768–773.

138. Svergun D.I. et al. Small angle x-ray scattering study of the droplet-cylinder transition in oil-rich sodium bis(2-ethylhexyl) sulfosuccinate microemulsions // J. Chem. Phys. 2000. Vol. 113, № 4. P. 1651–1665.