

УДК548.735:577.11

МЕТОД ИССЛЕДОВАНИЯ СТРУКТУРЫ МОДЕЛЬНЫХ И БИОЛОГИЧЕСКИХ МЕМБРАН НА НЕЙТРОННОМ ДИФРАКТОМЕТРЕ

А.М.Балагуров, В.И.Горделий

1. Введение

Специфической особенностью нейтронографии является способность использовать эффекты изотопного замещения для локализации воды и отдельных молекулярных групп в периодических структурах. В ламеллярных слоях, содержащих водную компоненту, возможна замена H_2O на D_2O путем обычной диффузии, кроме того, отдельные компоненты мембранного бислоя могут быть помечены дейтерием. Практически идеальный изоморфизм получаемых при изотопном замещении структур позволяет определить фазы дифракционных структурных факторов и по разностным фурье-синтезам выявить области замещения. Именно таким образом был решен принципиальный вопрос о распределении воды в модельных мембранах ^{1,2/} и локализована молекула холестерина в лецитин-холестериновом бислое ^{2/}.

Эксперименты по дифракции нейтронов на биологических и модельных мембранах и мембранных компонентах в настоящее время широко ставятся на высокопоточных стационарных реакторах ^{3,4/}. Эти эксперименты проводятся по стандартной двухосевой схеме на обычных или малоугловых дифрактометрах. Первичный пучок нейтронов монохроматизируется тем или иным способом, при этом изучается зависимость сечения рассеяния от угла поворота образца.

С вводом в строй в ОИЯИ мощного импульсного реактора ИБР-2^{5/} появилась возможность исследования мембран и их компонент на нейтронном дифрактометре по времени пролета. Постановка эксперимента в этом случае существенно отличается от обычной методики и по целому ряду пунктов оказывается более предпочтительной. Нами проведена серия экспериментов на модельной мультиламеллярной структуре из дипальмитоиллецитина, предварительные результаты которых, а также способ приготовления образца приводятся в данной работе.

2. Приготовление мультиламеллярной липидной структуры

Дипальмитоиллецитин (DPL) является существенной компонентой биологических мембран. Ранее мультиламеллярные DPL-слои

исследовались нейтронографически ^{/1,3/}. Полученное разрешение (6Å) оказалось достаточным для сравнения с детальной молекулярной моделью бислоя. Хорошее совпадение экспериментальных и вычисленных фурье-профилей DPL, а также наличие интенсивных пиков в дифракционном спектре делают эту структуру подходящим объектом для модельных экспериментов.

В литературе описаны два способа приготовления хорошо ориентированных мультислоев DPL-слоев для дифракционных нейтронных исследований. Первый способ: смесь липида и воды после воздействия ультразвуком размазывается по стеклянной подложке, затем вода медленно /в течение нескольких часов/ испаряется из раствора ^{/1/}. Второй способ: лецитин растворяется в этаноле, после чего при температуре выше точки перехода "гель-жидкий кристалл" /точки Крафта/ растворитель медленно испаряется ^{/3/}.

Для наших исследований образец готовился следующим образом. 15 мг дипальмитоиллецитина растворяли в 0,2 мл перегнанного этилового спирта при 75°C. Полученный раствор наносился на поверхность покровного стекла размером 2,5x2,5 см, подогретого до температуры 65°C; через 2-4 мин стекло переносилось в эксикатор /объем 2 л/, нагретый до 80°C. В эксикатор добавляли 2-4 мл перегнанного спирта и помещали химический стакан с 70-100 г P₂O₅. Стекло закреплялось в горизонтальном положении. Эксикатор помещался в термостат с температурой 80 ÷ 85°C. Растворитель из нанесенного на покровное стекло раствора испарялся через несколько минут после помещения образца в эксикатор. Другой характерной особенностью данного метода является то, что далее образец выдерживался при такой температуре в течение 3-4 ч, затем температура медленно /в течение 2-3 ч/ понижалась до 20°C. Практически все приготовленные образцы имели хорошо упорядоченную структуру.

3. Эксперимент

Эксперимент проводился на нейтронном дифрактометре ДН-2 ^{/6/} на импульсном реакторе ИБР-2 в ОИЯИ при следующих основных параметрах: мощность реактора - 1 МВт, частота импульсов - 5 Гц, полный поток тепловых нейтронов на образце - 10⁷ н/см²/с, пролетное расстояние реактор-образец-детектор - 24,8 м. Метод времени пролета и позиционно-чувствительная детекторная система позволили регистрировать двумерные нейтронограммы с разверткой по длине волны λ и углу рассеяния 2θ ^{/7/}. Период DPL-бислоя не превышал 60 Å. При среднем угле рассеяния 20° в доступном для ДН-2 интервале длин волн 2 ÷ 20 Å одновременно наблюдались десять порядков отражения. Это обстоятельство, а также то, что позиционный детектор регистрирует рассеянные нейтроны в большом телесном угле / ~12°/, значительно сократило время накопления информации.

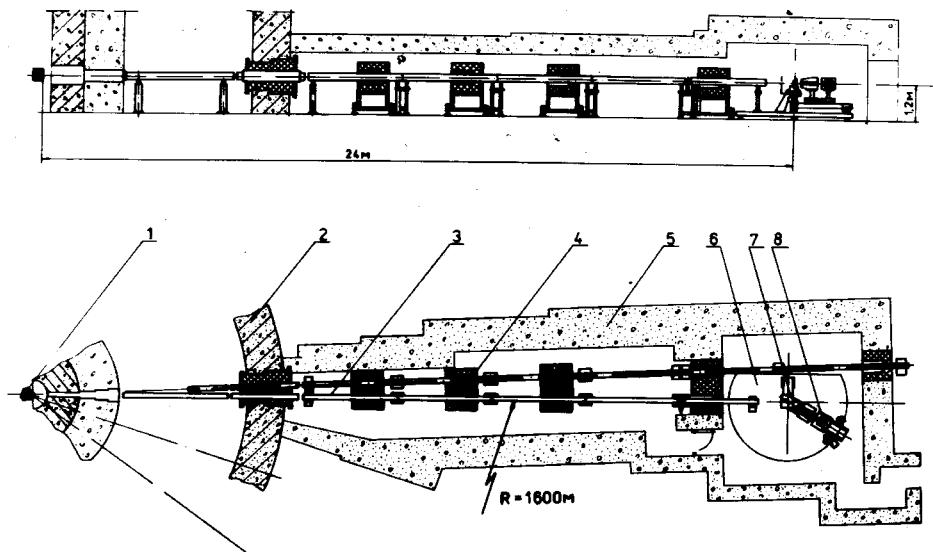


Рис.1. Схема нейтронного дифрактометра. 1 - замедлитель; 2,4,5 - биологическая защита; 3 - зеркальный нейтронотвод; 6 - платформа с поворотным плечом; 7 - гониометр и исследуемый образец; 8 - детекторная система.

Схема эксперимента показана на рис.1. Пучок нейтронов на ДН-2 формируется с помощью зеркального изогнутого нейтронотода. Это обеспечило как значительную интенсивность длинноволновых нейтронов, так и низкий уровень фона в месте расположения детектора. Для стабилизации условий образец помещался в герметичную камеру из ванадия, в которой поддерживалась постоянная температура /20 °С /, а относительная влажность задавалась с помощью насыщенных растворов солей, помещенных внутрь камеры. Были измерены дифракционные спектры от DPL/H₂O- и DPL/D₂O -мультислоев при 6 значениях относительной влажности от 0% до 95%. Установление равновесия по влажности, а также по замещению H₂O на D₂O контролировалось непосредственно в ходе эксперимента по изменению интенсивности дифракционных пиков. Для этого потребовалось около часа, что соответствует данным, полученным с помощью ИК-спектроскопии /2/. На рис.2 и 3 приведены спектры от образца, находящегося соответственно в парах H₂O и D₂O при относительной влажности 60%. На рис.4 - спектр при нулевой относительной влажности. При сравнении можно видеть сильное влияние H₂O или D₂O и их количеств в образце на величину структурных факторов DPL. Заметно меняется также период бислоя - с 57,5 Å до 60,0 Å. Время измерения спектров, представленных на этих рисунках, составляет 3 ч, однако для получения статистической

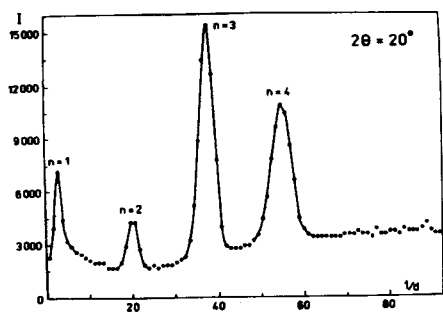


Рис.2. Дифракционный спектр от DPL в парах H_2O при относительной влажности 60%. I – количество нейтронов, $1/d$ – величина, пропорциональная волновому вектору нейтронов.

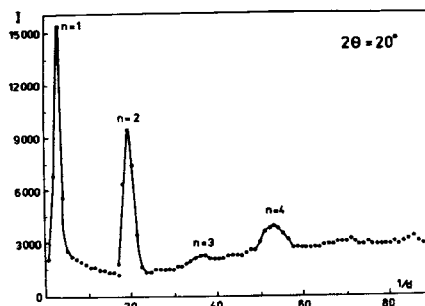
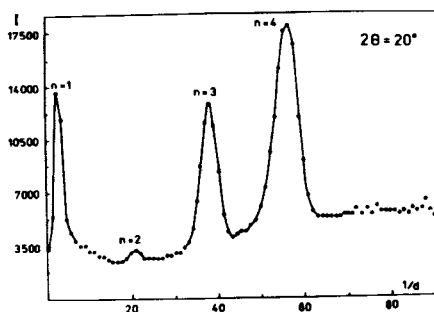


Рис.3. Дифракционный спектр от DPL в парах D_2O при относительной влажности 60%.

Рис.4. Дифракционный спектр от DPL при нулевой относительной влажности.



точности по первым четырем порядкам отражения на уровне $1 \div 3\%$ достаточно 2 ч.

4. Заключение

Полученные дифракционные данные позволяют независимо от моделей рассчитать структурные факторы и построить профиль плотности перпендикулярно поверхности бислоя. Измеренные интенсивности дифракционных пиков качественно согласуются с опубликованными величинами структурных факторов DPL. Процедура количественной обработки экспериментальной информации, полученной на дифрактометре по времени пролета, включает, как необходимый этап, учет зависимости интенсивности первичного пучка нейтронов от длины волны. Это существенно усложняет обработку данных по сравнению с исследованиями на обычном дифрактометре. В то же время сравнительно большие углы рассеяния и неизменная геометрия эксперимента делают более простым и точным учет поглощения и экстинкции нейтронов в образце.

Приготовленные нами образцы оказались достаточно хорошо упорядоченными и пригодными для дифракционных экспериментов. Степень разориентации /мозаичность образца/ равнялась $\sim 4^\circ$ /ширина распределения на половине высоты максимума/. Время накопления экспериментальной информации на образце массой 15 мг не превышает двух часов, что примерно в 10 раз меньше, чем в аналогичных измерениях, выполненных на реакторе HFBR /BNL, США/ /1/.

Применение двухкоординатного детектора нейтронов /8/ и повышение мощности реактора ИБР-2 до номинальной /4 МВт/ сократят время эксперимента еще в 10 раз. Это откроет возможности для исследования структурных перестроек в ходе внешнего воздействия на образец.

Авторы выражают признательность В.Г.Ивкову и Г.Н.Берестовскому за интерес к работе.

ЛИТЕРАТУРА

1. Zaccai Gr., Blasie Y.K., Schoenborn B.P. 1975, Proc. Nat. Acad.Sci., USA, 1975, 72, p. 376-380.
2. Worcester D.L., Franks N.P. J.Mol.Biol., 1976, 100, p.359-378.
3. Worcester D.L. In Biological Membranes, vol.3, p. 1-48 ed. D.Chapman, D.F.H.Wallach, Academic Press, London, 1975.
4. Fuess H. In Modern Physics in Chemistry, vol. 2, p. 1-193, ed. E.Fluck, V.I.Goldanskii, Academic Press, London, 1979.
5. Франк И.М., Шабалин Е.П. В сб.: IV Международная школа по нейтронной физике. ОИЯИ, ДЗ,4-82-704, Дубна, 1982,с.272-276.
6. Архипов В.А. и др. В сб.: IV Международная школа по нейтронной физике. ОИЯИ, ДЗ,4-82-704, Дубна, 1982, с. 277-291.
7. Balagurov A.M. et al: Nuclear Instruments and Methods, 1982, 193, p. 617-621.
8. Ананьев Б.Н. и др. ОИЯИ, P13-81-857, Дубна, 1981.