

на правах рукописи

Бойкова Анастасия Сергеевна

**ФОРМИРОВАНИЕ ТОНКОПЛЕНОЧНЫХ  
УПОРЯДОЧЕННЫХ БЕЛКОВЫХ СТРУКТУР ИЗ  
ПОЛИДИСПЕРСНЫХ КРИСТАЛЛИЗАЦИОННЫХ  
РАСТВОРОВ ЛИЗОЦИМА**

Специальность 01.04.07 – «Физика конденсированного  
состояния»

Автореферат  
диссертации на соискание ученой степени  
кандидата физико-математических наук

Москва 2019

Работа выполнена в лаборатории рентгеновских методов анализа и синхротронного излучения Института кристаллографии им. А.В. Шубникова Федерального государственного учреждения «Федеральный научно-исследовательский центр «Кристаллография и фотоника» Российской академии наук.

**Научный руководитель:** **Ковальчук Михаил Валентинович**  
доктор физико-математических наук, профессор, член-корреспондент РАН, президент НИЦ «Курчатовский институт».

**Официальные оппоненты:** **Суворов Эрнест Витальевич**  
доктор физико-математических наук, профессор, главный научный сотрудник лаборатории структурных исследований Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института физики твердого тела РАН.

**Кириченко Марина Николаевна**  
кандидат физико-математических наук, высококвалифицированный научный сотрудник лаборатории «Когерентная оптика» Федерального государственного бюджетного учреждения науки Физического института им. П.Н. Лебедева Российской академии наук.

**Ведущая организация:** Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Национальный исследовательский технологический университет «МИСиС».

Защита диссертации состоится «\_\_» \_\_\_\_\_ 2020 г. в \_\_ ч. \_\_ мин. на заседании диссертационного совета Д 002.114.01 при ФНИЦ «Кристаллография и фотоника» РАН по адресу 119333, г. Москва, Ленинский пр., 59, конференц-зал.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте ФНИЦ «Кристаллография и фотоника» РАН <http://www.kif.ras.ru/>.

Автореферат разослан «\_\_» \_\_\_\_\_ 2019 г.

Ученый секретарь  
диссертационного совета, к.ф.-м.н.

К.В. Фролов

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### Актуальность темы.

Важность экспериментального изучения физических состояний конденсированных веществ различной природы (как неорганических, так и органических соединений) и переходов между этими состояниями определяется их применением в различных областях науки и техники. Особенно могут быть подвержены таким переходам вещества биологического происхождения, в частности, белки, физическое поведение которых определяется сложностью их молекулярного строения. Изучение поведения таких сложномолекулярных объектов, состоящих из множества белковых молекул, и переходов между физическими состояниями остается малоизученной областью в современной физике конденсированного состояния. Изучение экспериментального состояния биоорганических систем позволит разработать методики, позволяющие внедрить сложные молекулярные объекты в технологические приложения.

Благодаря технологической революции, приведшей к развитию твердотельной микроэлектроники, и появлению методов, позволяющих изучать биологические объекты на молекулярном уровне, стало возможным соединение технологической базы неорганической микроэлектроники с молекулами белков. Такое совмещение дает возможность конструировать материалы нового типа – гибридные системы, основанные на сочетании неорганической и органической частей. В настоящее время создание таких гибридных структур и материалов на их основе является одной из ключевых задач во многих отраслях, связанных с безопасностью человека и экосистем, фармацевтикой и медицинской диагностикой.

К настоящему времени успешно спроектированы и реализованы в виде устройств системы, где белки используются в качестве функциональных единиц в биосенсорах, в которых молекулы белков организованы в виде слоевого ансамбля на подложке. Однако физическое поведение подобного молекулярного ансамбля, в котором функционируют одновременно множество отдельных белковых молекул, может быть чрезвычайно неустойчивым и зависящим от множества внешних факторов. В большей части подобных устройств молекулы белка организуются в

молекулярный слой на подложке из жидкой неупорядоченной среды - белкового раствора, в котором они пребывают в виде отдельных молекул. Экспериментальное состояние молекул белка в растворе таким образом будет определять и структуру получаемой пленки, в связи с чем в такой пленке, как и в растворе, также будет отсутствовать упорядоченность. Здесь ключевую роль играет раздел физики конденсированного состояния, исследующий природу преобразования вещества в процессе перехода от жидкой фазы к образованию упорядоченных пленочных структур. При этом наименее изученным остаются переходные состояния конденсированной среды.

Ранее на примере низкомолекулярных органических соединений было показано, что использование упорядоченных полимерных пленок для создания ряда фотовольтаических материалов по сравнению с неупорядоченными способно значительно повысить их эффективность. Это позволяет предположить, что эффективность биосенсорных устройств также можно повысить, применяя для их создания упорядоченные белковые пленки. По этой причине развитие новых подходов для получения упорядоченных белковых пленок является актуальной задачей на сегодняшний момент и в целом будет важным этапом на пути создания биоорганических гибридных систем.

Для получения слоистых систем на основе органических молекул в настоящий момент широко используется ленгмюровская технология. Однако формирование упорядоченных белковых слоев представляет из себя более трудоемкую задачу по сравнению с получением пленок из простых соединений ввиду того, что структура белковых молекул чрезвычайно чувствительна к изменениям внешних условий. При этом для формирования белковой пленки с помощью ленгмюровской технологии так же используют монодисперсный белковый раствор.

Ранее было обнаружено, что в растворе белка лизоцима при добавлении осадителя хлорида натрия (NaCl) в условиях роста кристалла лизоцима тетрагональной сингонии образуются олигомерные частицы лизоцима, которые могут быть элементарными единицами роста будущего кристалла. Было предположено, что эти олигомеры, образующиеся в растворе, можно использовать для получения ленгмюровских монослоев и

пленок, и они будут оказывать непосредственное влияние на структуру белковой пленки, полученной из раствора белка с добавлением осадителя.

В настоящей работе был предложен и применен ранее **не использованный** подход к получению белковых пленок на основе ленгмюровской технологии, основанный на формировании пленок белков из полидисперсного раствора, одним из компонентов которого является предкристаллизационный кластер – белковый олигомер. Изучение особенностей такого перехода молекулярной белковой системы из неупорядоченного раствора (3D системы) в упорядоченную пленку (2D система) является важной задачей фундаментального исследования переходов между физическими состояниями веществ различной природы (в том числе и органических) в современной физике конденсированного состояния.

#### **Цель и задачи работы:**

Целью диссертационной работы является разработка метода формирования тонкопленочных упорядоченных белковых структур на основе ленгмюровской технологии из полидисперсных растворов лизоцима и изучение структурных особенностей полученных пленок.

В соответствии с поставленными целями в работе решались следующие задачи:

1. Получение и исследование структурных характеристик пленок лизоцима на твердой подложке, сформированных как из монодисперсного раствора («классический» метод), так и из полидисперсного раствора белка с добавлением осадителя NaCl («модифицированный» метод);

2. Исследование структуры растворов лизоцима с добавлением осадителя KCl (в условиях роста кристаллов тетрагональной сингонии) методом малоуглового рентгеновского рассеяния;

3. Получение и исследование структурных характеристик монослоев лизоцима на поверхности жидкости, сформированных из полидисперсных растворов с добавлением осадителя KCl;

4. Апробация разработанного метода получения пленок на примере полидисперсных растворов лизоцима в условиях кристаллизации моноклинной сингонии (с осадителем KI).

#### **Научная новизна:**

1. Разработана модификация метода получения ленгмюровских белковых слоев с использованием полидисперсных растворов, содержащих белковые кластеры-олигомеры;

2. Методами рентгеновской рефлектометрии и стоячих рентгеновских волн в области полного внешнего отражения обнаружено специфическое экспериментальное состояние конденсированного вещества на основе кристаллизационного раствора белка лизоцима на поверхности жидкости в ленгмюровской ванне в виде многослойной структуры из слоев белковых молекул и слоев ионов осадителя;

3. Изучена структура пленок типа «белок-осадитель» методами рентгеновской рефлектометрии и стоячих рентгеновских волн в области полного внешнего отражения. Определено, что ионы хлора образуют слой  $\sim 1.0$  нм, который тесно примыкает к пленке на границе раздела жидкость/пленка;

4. Сформирована многослойная структура на основе белка лизоцима и ионов осадителя на твердой подложке из полидисперсных растворов; показано, что ионы осадителя образуют слои на границе раздела воздух/пленка;

5. Установлено, что толщина сформированной белковой пленки на поверхности жидкости и на твердой подложке соответствует диаметру наибольшего олигомера из полидисперсного раствора.

#### **Практическая значимость:**

1. Тонкопленочные структуры нового типа на основе комбинации молекул белков и кремниевой подложки могут быть применены для конструирования гибридных органо-неорганических систем ввиду однородной структуры белковой пленки высокого качества;

2. Изучение особенностей взаимодействия белковой пленки с пленкой ионов осадителя может дать новую информацию о взаимодействии между молекулами белков и осадителем в растворе (в т.ч. о функционировании белков).

#### **На защиту выносятся следующие основные результаты и положения:**

1. Модификация ленгмюровской технологии получения белковых пленок за счет использования предварительно сформированного полидисперсного раствора;

2. Данные об образовании специфического экспериментального состояния конденсированного вещества на основе кристаллизационного раствора белка лизоцима на поверхности жидкости в ленгмюровской ванне в виде многослойной структуры из слоев белковых молекул толщиной, соответствующей диаметру октамера лизоцима 6.5 нм и плотностью 0.8 ед. относительно кремниевой подложки, и слоев ионов осадителя толщиной 1.0 нм;

3. Данные о структуре пленки, сформированной из монодисперсного раствора лизоцима, с толщиной 4 нм, соответствующей диаметру мономера лизоцима, и плотностью 0.2 ед. относительно кремниевой подложки;

4. Данные о структуре пленки, сформированной на основе полидисперсного раствора лизоцима (с параметрами для роста кристаллов моноклинной сингонии), на твердой подложке с толщиной 4 нм и плотностью 0.8 ед. относительно кремниевой подложки.

#### **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 и белковые пленки на твердых подложках. Автор непосредственно принимала участие в проведении рентгеновских экспериментов в лабораторных условиях и на источниках синхротронного излучения. Обсуждение результатов и их интерпретация проводились совместно с научным руководителем и с соавторами публикаций.

#### **Достоверность полученных результатов:**

Достоверность представленных в работе результатов подтверждается использованием современных методов расчета и современного программного обеспечения, а также наличием публикаций в рецензируемых научных изданиях и докладами на различных национальных и международных конференциях.

#### **Апробация результатов работы:**

Материалы, вошедшие в диссертационную работу, докладывались на международных и всероссийских конференциях (см. [5-12] в списке основных работ). Работа поддержана

Российским фондом фундаментальных исследований (грант № 18-32-00381 мол\_а).

### **Публикации:**

В диссертацию включены результаты, опубликованные в 12 публикациях, из которых 3 статьи в рецензируемых научных изданиях из списка ВАК, и подан один патент.

### **Структура и объем диссертации:**

Диссертация состоит из введения, 5 глав, выводов и списка цитируемой литературы. Объем диссертации составляет 137 страниц, включая 48 рисунков, 2 таблицы и список литературы из 180 наименований.

## **СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ**

Во **введении** содержится обоснование актуальности проводимых исследований и излагаются цели диссертационной работы. Отмечены новизна и практическая значимость работы, представлены сведения об апробации результатов работы и публикациях.

В **главе 1** содержится литературный обзор, посвященный методам получения белковых пленок и методам структурных исследований слоевых органических ансамблей и приповерхностных слоев. Приводится описание ранее проведенных исследований растворов модельного белка лизоцима с помощью методов малоуглового рассеяния рентгеновского излучения и нейтронов, а также структурные исследования пленок лизоцима с помощью рентгеновского и синхротронного излучения.

В **главе 2** приводится описание способа получения белковых пленок на твердых подложках и на поверхности жидкости, а также структурных методов исследования, примененных в данной работе.

Полидисперсные растворы белка лизоцима были приготовлены в условиях (концентрации белка и осадителя, тип буферной системы, значение pH) роста кристаллов лизоцима тетрагональной и моноклинной сингонии. Для подбора оптимальных условий проводился скрининг широкого набора параметров, из которого выбирались наиболее подходящие условия.

Получение ленгмюровских монослоев лизоцима из монодисперсных и полидисперсных растворов проводилось в ленгмюровской ванне, в качестве субфазы использовалась ультрачистая вода Millipore (сопротивление воды 18 МОм\*см).



Контроль поверхностного давления осуществлялся с помощью весов Вильгельми с точностью до 0.01 мН/м.

Пленки лизоцима на кремниевых подложках получали методом Ленгмюра-Шеффера (ЛШ), заключающегося в переносе ленгмюровского слоя путем горизонтального соприкосновения подложки с монослоем на поверхности жидкости с помощью автоматизированной установки KSV5000 LB (KSV Instruments). После переноса образцы помещались в герметичную ячейку, используемую для дальнейших измерений.

Исследование структуры пленок лизоцима на твердых подложках было проведено с помощью метода рентгеновской рефлектометрии (РР). Данный метод основан на регистрации интенсивности зеркальной компоненты рентгеновского отражения в зависимости от угла падения. Метод РР широко используется для исследования органических и неорганических тонких пленок и приповерхностных слоев и позволяет получать данные о толщине слоев и плотности слоев в исследуемой системе, а также данные о шероховатости границ раздела. Эксперименты были проведены на дифрактометре SmartLab Rigaku, оснащенный источником излучения с вращающимся молибденовым анодом мощностью 9 кВт (спектральная линия  $MoK_{\alpha 1}$ , энергия 17.5 кэВ).

Так как исследуемая в работе система (раствор белка и сформированная на его основе белковая пленка) содержит в своем составе такие элементы как сера (S), которая присутствует в составе ряда аминокислотных остатков белка, а также компоненты осадителей (*ионы неорганических солей*  $K^+$ ,  $Cl^-$ ,  $\Gamma^-$ ), то это позволяет провести структурные исследования белковой пленки методом стоячих рентгеновских волн в области полного внешнего отражения (СРВ в области ПВО).

Метод СВР в области ПВО основан на одновременной регистрации зеркальной компоненты рентгеновского отражения и угловой зависимости выхода рентгеновской флуоресценции. Форма угловой зависимости рентгеновского отражения дает информацию о распределении общей электронной плотности по нормали к поверхности, которая определяет распределение СРВ. Угловая зависимость выхода рентгеновской флуоресценции атомов определенного сорта определяется как профилем распределения данного элемента по глубине, так и распределением интенсивности

СРВ. Применение данного метода позволило получить информацию не только о толщине и электронной плотности исследуемых белковых слоев, но и определить положение ионов осадителя относительно белковой пленки. Измерения методом СРВ в области ПВО проводились на станциях «Ленгмюр» (энергия 13 кэВ) и «РКФМ» (энергия 12 кэВ) («КИСИ-Курчатов», НИЦ «Курчатовский институт») и на дифрактометре SmartLab (Rigaku), дополнительно оснащенный детектором флуоресцентного излучения Amptek X-123.

Также полученные пленки лизоцима на кремниевых подложках были исследованы с помощью метода атомно-силовой микроскопии (АСМ) в полуконтактном режиме на приборе NTEGRA Prima, NT-MDT. Принцип работы атомно-силового микроскопа основан на регистрации силового взаимодействия между поверхностью исследуемого образца и зондом, называемым кантилевером. Изменение рельефа поверхности приводит к изменению силы, действующей на кантилевер, что проявляется в изменении величины его изгиба. Полуконтактный режим, в котором зонд в нижней точке своих колебаний касается образца, является наиболее универсальным из методов АСМ, в том числе и для исследования органических образцов.

Предварительное исследование полидисперсного и монодисперсного растворов лизоцима с целью получения данных об их структуре до формирования пленок было проведено методом малоуглового рассеяния рентгеновского излучения (МУРР) на станции BM29 «BioSAXS» (Европейский источник синхротронного излучения). Метод МУРР позволяет исследовать вещества самой разнообразной структуры, содержащие неоднородности размерами в диапазоне 1–10<sup>3</sup> нм, что делает растворы белков подходящими объектами для изучения.

**Глава 3** посвящена получению и исследованию пленок белка лизоцима на твердых подложках, полученных с помощью модифицированного метода ЛШ из монодисперсного и полидисперсного раствора белка с добавлением осадителя NaCl. Результаты работы, описанные в главе, отражены в публикациях [A3] и [A4] в списке основных авторских публикаций по теме диссертации.

Пленки белка лизоцима были сформированы на кремниевых подложках (Si) из растворов чистого белка и раствора белка с добавлением осадителя. В качестве осадителя был использован хлорид натрия (NaCl), при этом параметры раствора (концентрации белка и осадителя, тип буферной системы и ее pH и др.) соответствовали условиям роста кристаллов лизоцима тетрагональной сингонии. Для предотвращения преждевременного высыхания сразу после переноса на твердую подложку пленки были помещены в специализированную герметичную ячейку, с помощью которой проводились рентгеновские измерения.

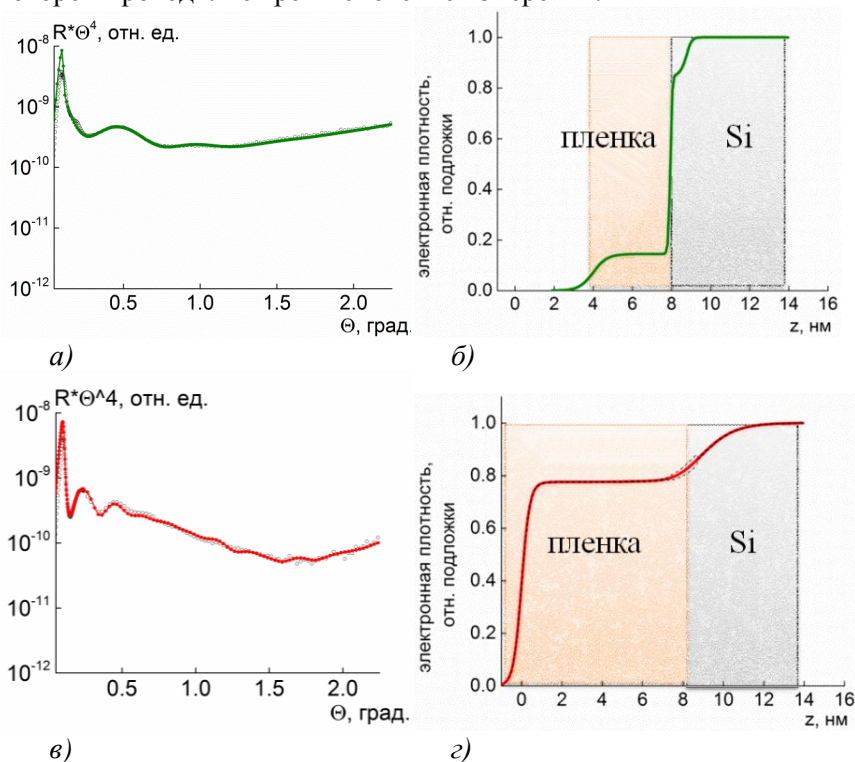


Рис. 1. Экспериментальные кривые РР (черные линии), соответствующие им расчетные кривые (цветные линии) и рассчитанные профили электронной плотности (нормированные на электронную плотность подложки), полученные для: пленки лизоцима, сформированной из монодисперсного раствора ((а, б),

зеленые кривые); пленки лизоцима, полученной из полидисперсного раствора с добавлением осадителя NaCl ((в, г), красные кривые).

Экспериментальные кривые РР, полученные для пленок лизоцима, представлены на *рис. 1* (а, в). Кривые приведены для двух типов пленок, сформированных из монодисперсного раствора (зеленая кривая) и полидисперсного раствора с добавлением NaCl (красная кривая). Профили распределения электронной плотности, соответствующие угловым зависимостям РР, представлены на *рис. 1* (б, г). Профили нормированы на электронную плотность Si подложки. Полученные профили распределения электронной плотности указывают на образование более плотной пленки лизоцима, сформированной из полидисперсного раствора. Толщина сформированной пленки составляет приблизительно 73 Å, что почти в два раза превышает значение толщины пленки, сформированной из раствора чистого белка (40 Å). Толщина пленки лизоцима, сформированной на Si подложке из монодисперсного раствора лизоцима, соответствует усредненному значению диаметра мономера лизоцима.

Плотность пленки, полученной из раствора белка с добавлением осадителя, почти в четыре раза превышает аналогичную величину для белковой пленки без осадителя, из чего можно предположить, что пленка лизоцима, сформированная из полидисперсного раствора, является более однородной и плотноупакованной по сравнению с пленкой лизоцима, сформированной из белкового раствора без добавления NaCl. Пониженное значение плотности такой пленки указывает на то, что такая пленка имеет «островковую» неоднородную структуру. Также возможно присутствие слоя H<sub>2</sub>O между подложкой и пленкой белка.

Полученные данные также подтверждены методом атомно-силовой микроскопии (АСМ). На *рис. 2* представлены морфологии двух типов пленок и профили их поверхности. Толщина пленки лизоцима без осадителя составляет 3.5 нм, а сама пленка имеет островковую структуру. Пленка лизоцима с осадителем имеет более однородную структуру и толщину 7.5 нм. Такое значение соответствует размеру октамеров, образующихся в растворе белка при добавлении осадителя в условиях кристаллизации, диаметр

которых, согласно данным МУРР в приближении сферической формы, составляет 6.02 нм плюс толщина тонких слоев буфера между пленкой и подложкой и на поверхности пленки. Измеренные значения толщины для этих двух типов пленок соответствуют значениям, полученным из данных РР.

Однако неясным оставался вопрос о наличии или отсутствии ионов осадителя в структуре пленки лизоцима. Для получения данных о положении ионов осадителя NaCl полученные пленки были исследованы методом СРВ в области ПВО.

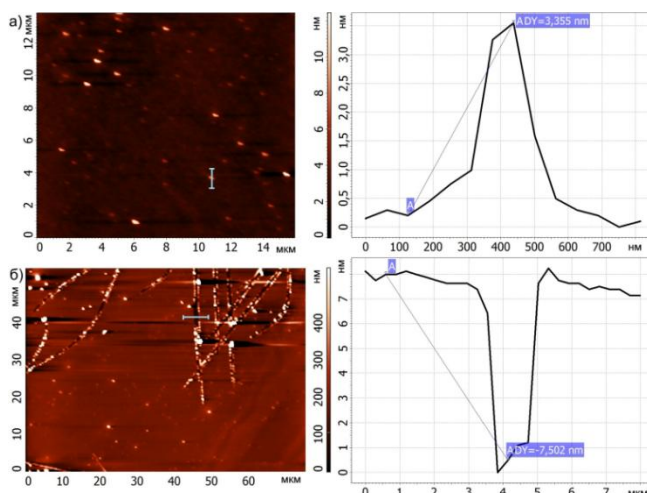


Рис. 2. Изображения АСМ (слева) и профиль изменения высоты (справа) пленок, перенесенных на Si подложки методом ЛШ: а - чистого лизоцима; б - лизоцима с осадителем.

На рис. 3. (а) представлены угловые зависимости выхода флуоресценции для элементов S (сера присутствует в аминокислотном остатке цистеине, содержащемся в белке) и Cl, а на рис. 3. (б) – соответствующие им профили распределения этих элементов по толщине пленки (профили распределения элементов S и Cl приведены к единице). В данных условиях определение положения катионов осадителя Na<sup>+</sup> затруднено в виду того, что ионы натрия также присутствуют в составе буфера, на основе которого были приготовлены все белковые растворы.

Кривая распределения атомов Cl (рис. 3. (б)) по толщине пленки показывает, что ионы Cl преимущественно располагаются вблизи поверхности пленки лизоцима, образуя тонкий слой толщиной порядка 0.7 нм. Однако, на угловой зависимости флуоресценции хлора (рис. 3. (а)) в области малых углов наблюдается расхождение между расчетными и экспериментальными данными. Данное расхождение может быть обусловлено присутствием над поверхностью пленки разреженного слоя с плотностью порядка нескольких процентов от плотности слоя ионов Cl.

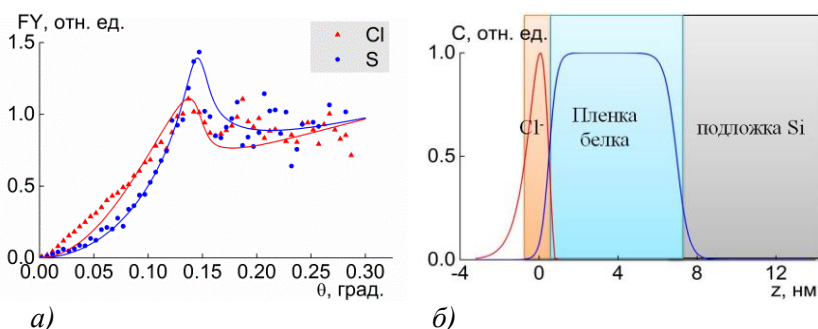


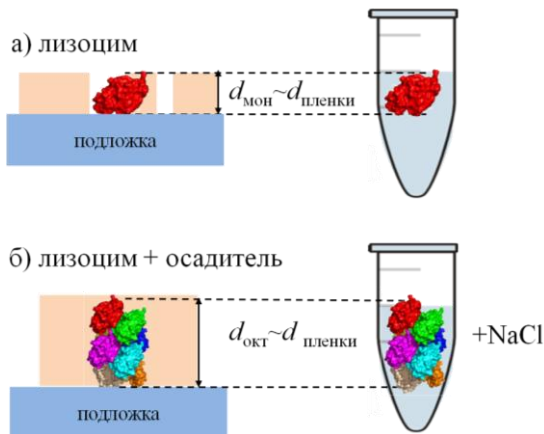
Рис. 3. Результаты исследования пленки белка лизоцима, перенесенной на кремниевую подложку модифицированным методом ЛШ: а – угловые зависимости выхода флуоресценции FУ для Cl (красные треугольники), S (синие кружки); б – профили распределения Cl (красная линия) и S (синяя линия) по толщине пленки  $z$ .

Таким образом, в результате проведенных исследований показано, что пленка белка лизоцима, полученная из раствора с добавлением осадителя в кристаллизационных условиях, обладает более высокой электронной плотностью и является более однородной по сравнению с пленкой лизоцима, полученной из раствора чистого белка, содержащего только мономерные частицы.

Данные исследования указывают на непосредственное участие олигомеров лизоцима в образовании пленки лизоцима на твердой подложке (рис. 4).

В результате проведенных исследований был предложен способ получения белковых пленок, основанный на модификации метода

ЛШ, заключающийся в использовании для формирования монослоев предварительно подготовленного белкового раствора, параметры которого (концентрации белка и осадителя, тип буфера и его рН) соответствуют кристаллизационным условиям белка. Данный метод был апробирован на примере белка лизоцима в условиях роста кристаллов тетрагональной сингонии.



*Рис. 4. Предполагаемые модели пленок лизоцима в зависимости от структуры исходного белкового раствора: а – раствор мономеров лизоцима приводит к формированию островковой пленки толщиной 4 нм; б – раствор с октамерами (которые образуются в условиях кристаллизации лизоцима тетрагональной сингонии – при использовании хлорида натрия в качестве осадителя) приводит к формированию однородной пленки толщиной 6 нм.*

Полученные результаты, однако, не дают полного понимания механизма образования пленок из олигомеров белка на твердой подложке: образуется ли пленка непосредственно на подложке при испарении захваченного с поверхности ленгмюровской ванны раствора осадителя или же процесс формирования монослоя из олигомеров белка происходит непосредственно на границе раздела воздух/жидкость в ленгмюровской ванне. Изучению этого вопроса посвящена **Глава 4**, в которой описано получение и исследование структурных особенностей ленгмюровских монослоев лизоцима на поверхности жидкости, сформированных из двух типов растворов: без добавления осадителя (монодисперсный раствор белка) и с

добавлением осадителя в условиях кристаллизации лизоцима тетрагональной сингонии (полидисперсный раствор); также приведены данные МУРР об олигомерном составе монодисперсного и полидисперсного раствора лизоцима с осадителем KCl.

По той причине, что ранее использованный осадитель NaCl имеет в своем составе тот же катион, который содержится и в используемом для приготовления растворов буфере, различить положение ионов  $\text{Na}^+$ , содержащихся в составе осадителя, соединенных с белковой пленкой, от ионов буфера методом СРВ не представляется возможным. В связи с этим для определения положения катионов осадителя была использована соль хлорида калия (KCl). Добавление этого осадителя к белку при соблюдении определенных условий также способствует росту кристаллов лизоцима тетрагональной сингонии.

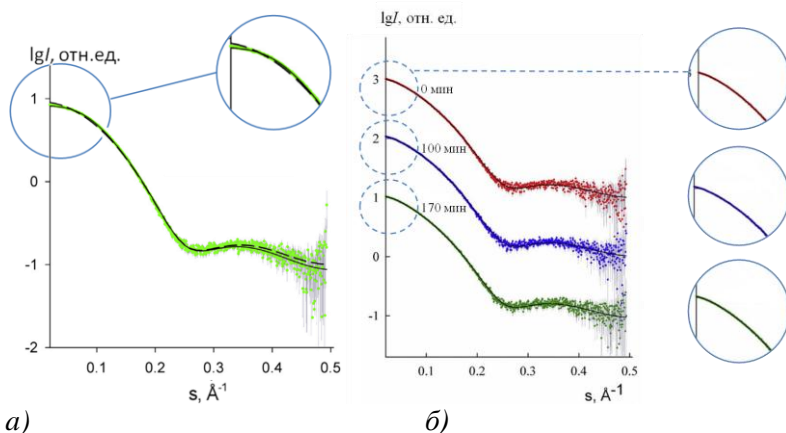
Для изучения олигомерного состава и временной стабильности олигомеров полидисперсный раствор лизоцима с добавлением KCl был исследован методом МУРР.

На *рис. 5а* приведены экспериментальная кривая МУРР от раствора лизоцима без добавления осадителя KCl и кривые от кристаллографической структуры (PDB ID: 4WLD) мономера лизоцима, рассчитанные программой CRY SOL для системы идеальных невзаимодействующих мономеров и программой MIXTURE для системы отталкивающихся мономеров в приближении Перкуса-Йовика. При моделировании теоретической кривой для системы, в которой мономерные частицы лизоцима рассматриваются как частицы с отталкивающим взаимодействием, величина невязки  $\chi^2$  может иметь высокое значение ( $\chi^2$  превышает 5.0) (рис. 4.1, вставка). При рассмотрении отталкивающих взаимодействий в приближении Перкуса-Йовика для потенциала взаимодействия, отвечающего модели жестких сфер, величину невязки удалось минимизировать до значения 1.48.

На *Рис. 5б* показаны экспериментальные кривые МУРР для раствора лизоцима с добавлением KCl, измеренные по истечении времени 0, 100 и 170 минут после смешивания. Анализ данных показал, что в растворе белка с добавлением KCl, помимо мономеров, также обнаружены олигомеры лизоцима – димеры и октамеры (*Таблица 1*). Объемная доля октамеров в исследованных



интервалах времени оставалась относительно постоянной и составила 2.3 %.



а) Рис. 5. а – экспериментальная кривая МУРР от раствора лизоцима без осадителя (зеленая линия) и теоретические кривые от кристаллографической структуры (PDB ID: 4WLD) мономера лизоцима (черные линии), рассчитанные программой CRY SOL для системы идеальных не взаимодействующих мономеров (пунктирная кривая) и программой MIXTURE для системы отталкивающихся мономеров в приближении Перкуса-Йовика; б – экспериментальные кривые МУРР от раствора лизоцима с добавлением осадителя KCl (цветные линии) и теоретические кривые, рассчитанные в программе OLIGOMER (черные линии), в зависимости от времени. Кривые смещены по вертикали для лучшей визуализации.

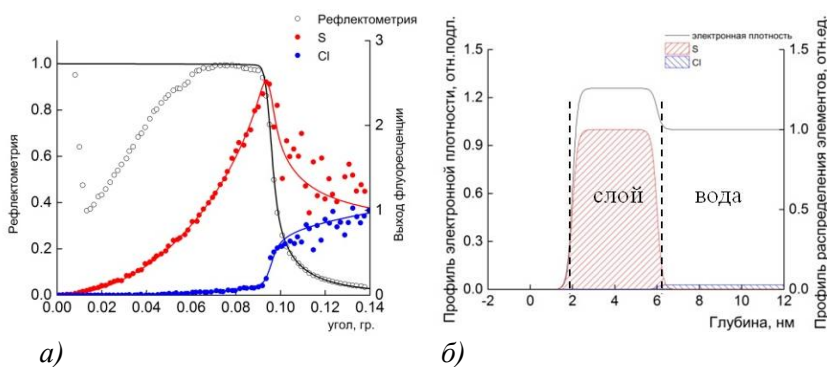
Таблица 1. Объемные доли мономеров и олигомеров (димеров, тетрамеров, гексамеров и октамеров) лизоцима в полидисперсном растворе с добавлением осадителя KCl при температуре 20 °C, полученные из кривых малоуглового рассеяния.

Время, мин.	Мон., %	Дим., %	Тетр., %	Гекс., %	Окт., %	$\chi^2$
0	88.2±0.4	9.4±0.4	0	0	2.3±0.1	0.92
100	87.9±0.4	10.0±0.4	0	0	2.2±0.1	0.92
170	87.9±0.4	9.7±0.4	0	0	2.3±0.1	0.90

Монослои лизоцима на поверхности чистой воды, сформированные из раствора чистого белка и раствора белка с добавлением осадителя KCl, были изучены с помощью метода СРВ в области ПВО.

На *рис. 6* представлены угловые зависимости зеркальной компоненты рентгеновского отражения и угловые зависимости выхода флуоресценции (*а, в*), а также профили распределения электронной плотности элементов (*б, г*), присутствующих в исследуемой системе: S, K и Cl. Показано, что ленгмюровский монослой лизоцима, сформированный из раствора чистого белка, образует на поверхности воды слой толщиной приблизительно 3 нм. Это значение близко к размеру мономера лизоцима. Наличие незначительного количества ионов Cl<sup>-</sup> можно объяснить их изначальным присутствием в водной субфазе, так как они достаточно равномерно распределены по глубине. В общем случае экспериментальные данные указывают, что молекулы лизоцима не проникают вглубь субфазы, в основном концентрируясь на границе раздела воздух/вода.

Значение толщины ленгмюровского монослоя лизоцима, полученного из раствора с добавлением KCl, близко к 6 нм, что в два раза превышает толщину пленки, полученную из чистого раствора белка. Такое значение толщины можно объяснить тем, что в формировании слоя участвуют олигомерные частицы белка, образующиеся в растворе на начальной стадии кристаллизации. Можно предположить, что олигомеры лизоцима при переносе их из раствора на поверхность водной субфазы не разрушаются.



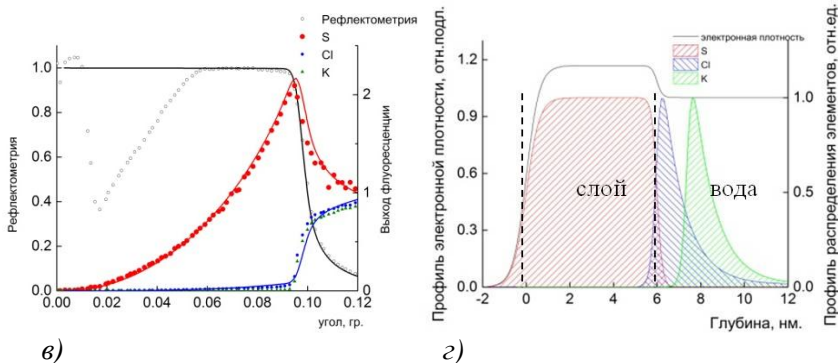


Рис. 6. а, в – угловые зависимости выхода флуоресценции FУ для Cl (синие треугольники), K (зеленые кружки) и S (красные кружки); б, г – профили распределения хлора (синяя область), калия (зеленая область) и серы (красная область) по толщине z ленгмюровских монослоев лизоцима, сформированных из раствора с добавлением осадителя KCl и без на поверхности водной субфазы.

Также можно видеть, что ионы Cl<sup>-</sup> и K<sup>+</sup> образуют тонкие слои вблизи границы раздела субфаза/пленка, причем слой ионов хлора располагается ближе к белковой пленке, чем ионы калия. Толщина слоя ионов хлора  $0.5 \pm 0.3$  нм, а толщина слоя ионов калия  $0.7 \pm 0.4$  нм. Данный результат можно объяснить преимущественно положительным поверхностным зарядом молекул белка в пленке со стороны, обращенной к субфазе.

Таким образом, показано, что олигомеры лизоцима, образованные в растворе при добавлении осадителя к белковому раствору, при переносе их на границу раздела вода-воздух (воздух-жидкость) не разрушаются, а формируют на поверхности субфазы монослой, который затем переносится на подложку, сохраняя свою структуру. Основные результаты работы, описанные в главе, отражены в публикации [A1] в списке основных авторских публикаций по теме диссертации.

**Глава 5** посвящена получению и изучению структурных особенностей пленок белка лизоцима, полученных с помощью модифицированного метода ЛШ на кремниевых подложках из раствора с параметрами, соответствующими условиям кристаллизации лизоцима моноклинной сингонии.

В предыдущих главах были рассмотрены лентгюровские монослои на поверхности водной субфазы и пленки лизоцима на кремниевых подложках, полученные из растворов чистого белка и растворов белка с добавлением осадителей NaCl и KCl в условиях роста кристаллов лизоцима тетрагональной сингонии. Было показано, что олигомеры лизоцима, образующиеся в растворе, принимают участие в формировании монослоев на поверхности жидкости, а затем и на твердых подложках. Данный подход получения упорядоченной белковой пленки был апробирован с использованием раствора лизоцима в условиях роста кристаллов моноклинной сингонии.

Пленки лизоцима, сформированные из раствора белка с добавлением осадителя йодида калия (KI) с параметрами для кристаллизации лизоцима моноклинной сингонии, были получены на кремниевой подложке модифицированным методом ЛШ. Структурные особенности пленок были изучены с помощью методов РР и СРВ в области ПВО.

На рис. 7 представлены экспериментальные кривые РР и соответствующие им профили распределения электронной плотности для двух типов пленок белка.

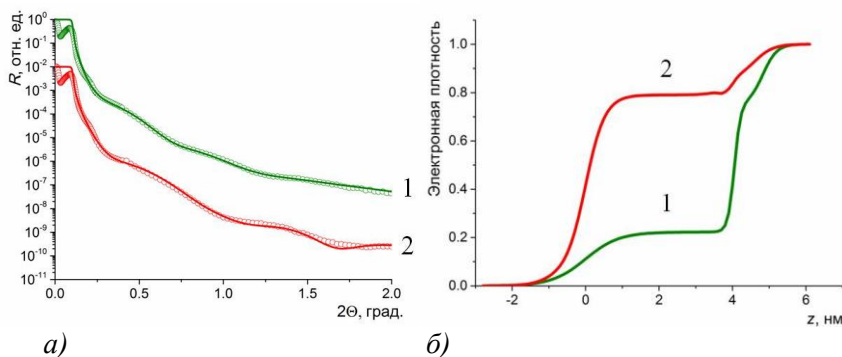


Рис. 7. а – угловые зависимости зеркальной компоненты рентгеновского отражения (точки – эксперимент, сплошные линии – расчет); б – рассчитанные профили электронной плотности, нормированные на электронную плотность подложки, от пленки лизоцима, сформированной из монодисперсного раствора (1), и от пленки лизоцима, сформированной из раствора с добавлением осадителя KI (2).

Толщины пленок имеют приблизительно одинаковое значение 4 нм, однако плотность белковой пленки, сформированной из раствора с добавлением KI, практически в 4 раза выше, чем плотность пленки из чистого раствора белка. Это может указывать на то, что в структуре пленки могут присутствовать олигомеры лизоцима, образующиеся в растворе моноклинного лизоцима на начальной стадии кристаллизации.

Для определения присутствия ионов осадителя KI и их положения относительно белка пленки были исследованы методом СРВ в области ПВО. Результаты представлены на рис. 8.

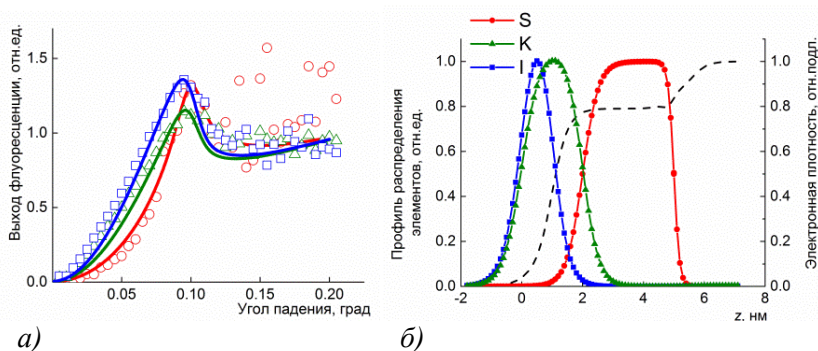


Рис. 8. а – угловые зависимости выхода флуоресценции для атомов S (кружки), K (треугольники) и I (квадраты); б – профили распределения атомов S, K и I по толщине z пленки лизоцима с добавлением осадителя KI, перенесенной на кремниевую подложку модифицированную методом ЛШ.

Анализ данных показывает, что толщина пленки, формируемой атомами серы, согласуется с данными о толщине пленки, полученной в результате измерений РР. При этом толщина слоя, формируемого ионами калия, составляет 2 нм, тогда как толщина слоя ионов йода составляет 1 нм. Слои калия и йода располагаются вблизи поверхности пленки лизоцима. Распределения калия и йода сильно перекрываются, однако к пленке белка сильнее смещен центр распределения ионов калия, а не ионов йода. В случае предкристаллизационного состояния моноклинной фазы часть пленки, обращенной к субфазе, имеет, по всей видимости, слабый отрицательный заряд, в противоположность пленки, сформированной из олигомеров в предкристаллизационном

состоянии тетрагональной фазы. Результаты работы, описанные в главе, отражены в публикации [A2] в списке основных авторских публикаций по теме диссертации.

### **Выводы и основные результаты работы:**

1. Предложен метод получения белковых пленок на твердых подложках, основанный на ленгмюровской технологии, который заключается в использовании предварительно приготовленного раствора белка с образованием олигомеров. Предложенный подход был апробирован на примере белка лизоцима;

2. С помощью метода МУРР показано, что объемная доля наибольших олигомеров лизоцима – октамеров, образующихся в растворе на начальной стадии кристаллизации при добавлении осадителя хлорида калия, составляет приблизительно 2.3 % и мало изменяется в течение периода времени от 0 до 170 минут. Также показано, что в растворе белка без добавления осадителя присутствуют только мономеры лизоцима;

3. Установлена структура пленки лизоцима на кремниевой подложке, сформированной из полидисперсного раствора с добавлением осадителя хлорида натрия, условия которого соответствуют кристаллизации лизоцима тетрагональной сингонии. С помощью метода РР показано, что толщина белковой пленки равна 6.5 нм, а плотность практически в 4 раза превышает значение плотности пленки, сформированной из монодисперсного раствора. Исследования методом АСМ показали, что пленка имеет существенно более однородную структуру по сравнению с пленкой белка без осадителя. С помощью метода СРВ в области ПВО показано, что ионы хлора образует на границе раздела пленка/воздух тонкий слой толщиной 0.7 нм;

4. Получена многослойная структура из ленгмюровского монослоя лизоцима на поверхности водной субфазы и слоев ионов осадителя в субфазе вблизи пленки белка. С помощью метода СРВ в области ПВО показано, что толщина белкового монослоя равна 6.5 нм и соответствуют диаметру наибольшего олигомера, образующегося в растворе на начальной стадии кристаллизации. Также показано, что ионы осадителя хлорида калия образуют тонкие слои на границе раздела пленка/жидкость, причем слой ионов хлора плотно примыкает к монослою и имеет толщину 0.5

нм, а пик распределения ионов калия смещен в глубь субфазы, и слой имеет толщину 0.7 нм;

5. Установлена структура пленки лизоцима на кремниевой подложке, сформированной из полидисперсного раствора в условиях кристаллизации лизоцима моноклинной сингонии. С помощью метода РР показано, что толщина белковой пленки равна 4 нм. С помощью метода СРВ в области ПВО показано, что ионы осадителя йодида калия образуют на поверхности пленки тонкие слои, причем толщина слоя ионов йода составляет 1 нм, а толщина слоя ионов калия составляет 2 нм;

6. С помощью методов РР и СРВ в области ПВО показано, что пленка лизоцима, сформированная из монодисперсного раствора белка, в котором содержатся только мономеры лизоцима, имеет толщину 4 нм, что соответствует диаметру мономера. Исследование методом АСМ показало, что пленка имеет «островковую» структуру, что соответствует значению пониженной плотности пленки по данным РР по сравнению с пленкой, сформированной из раствора белка с добавлением осадителя.

#### **Список основных авторских публикаций по теме диссертации:**

**A1.** М.В. Kovalchuk, **A.S. Boikova**, Yu.A. Dyakova, K.B. Ilina, P.V. Konarev, M.A. Marchenkova, Yu.V. Pisarevskiy, P.A. Prosekov, A.V. Rogachev, A.Yu. Seregin. *Thin Solid Films*. 2019. V. 677. P. 13–21.

**A2.** **A.C. Бойкова**, Ю.А. Дьякова, К.Б. Ильина, М.А. Марченкова, А.Ю. Серегин, П.А. Просеков, Ю.А. Волковский, Ю.В. Писаревский, М.В. Ковальчук. *Кристаллография*. 2018. Том 63. № 5. С. 703–707.

**A3.** М.В. Ковальчук, **A.C. Бойкова**, Ю.А. Дьякова, М.А. Марченкова, А.М. Ополченцев, Ю.В. Писаревский, П.А. Просеков, А.Ю. Серегин. *Кристаллография*. 2017. Том 62. № 4. С. 650–656.

**A4.** Патент на изобретение № 2672410 (дата государственной регистрации 14.11.2018). М.В. Ковальчук, Ю.В. Писаревский, Ю.А. Дьякова, М.А. Марченкова, П.А. Просеков, А.Ю. Серегин, **A.C. Бойкова**, «Способ получения упорядоченных пленок лизоцима на твердых подложках в ленгмюровской ванне».

5. **A.C. Бойкова**, К.Б. Ильина, М.А. Марченкова, А.Ю. Серегин, А.В. Рогачев, Ю.А. Дьякова, Ю.В. Писаревский, М.В. Ковальчук «Структурные особенности ленгмюровского слоя белка лизоцима,

сформированного из полидисперсного раствора на поверхности жидкости»/В сборнике: VIII Международная конференция по фотонике и информационной оптике. Сборник научных трудов. 2019. С. 109-110.

6. **A.S. Boikova**, M.A. Marchenkova, Yu.A. Dyakova, K.B. Ilina, A.Yu. Seregin, Yu.V. Pisarevsky, A.V. Rogachev, M.V. Kovalchuk «The advantages of the GI-XSW technique for investigation of protein langmuir monolayers formed from the polydisperse solutions» / International conference and satellite school «Biomembranes 2018» (Dolgoprudny, Russia, 1 – 5 October 2018). P. 179.

7. M.A. Marchenkova, **A.S. Boikova**, Yu.A. Dyakova, K.B. Ilina, P.V. Konarev, A.E. Kryukova, Yu.V. Pisarevskiy, P.A. Prosekov, A.V. Rogachev, A.Yu. Seregin and M. V. Kovalchuk «Structural characteristics of lysozyme langmuir layers grown from an oligomeric mixture formed in the early stages of lysozyme crystallization» / 14<sup>th</sup> Biennial Conference of High Resolution X-ray Diffraction and Imaging XTOP 2018 (Bari, Italy, 3 – 7 September 2018). P. 214.

8. **А.С. Бойкова**, Ю.А. Дьякова, М.А. Марченкова, К.Б. Ильина, А.Ю. Серегин, П.А. Просеков, Ю.В. Писаревский, М.В. Ковальчук «Модификация метода Ленгмюра–Шеффера для получения упорядоченных белковых пленок» / VII Международная молодежная научная школа-конференция «Современные проблемы физики и технологий» (16 – 21 апреля 2018 года, г. Москва). Сборник тезисов. Ч. 1. С. 54.

9. **A.S. Boikova**, K.B. Ilina, Y.A. Dyakova, M.A. Marchenkova, P.A. Prosekov, A. Yu. Seregin, A.E. Blagov, Yu.V. Pisarevsky, M.V.Kovalchuk «New Approach To Ordered Protein Films Formation». RACIRI 2017 / Summer School (Ronneby, Sweden, 19 – 26 August 2017) Participant's Abstracts, P. 7

10. M.A. Marchenkova, **A.S. Boikova**, Yu.A. Dyakova, A.M. Opolchentsev, P.A. Prosekov, Yu.V. Pisarevsky, A.Yu. Seregin, M.V. Kovalchuk «A New Approach to Ordered Protein Films Formation» / ECS4 - 4th European Crystallography School (Warsaw, Poland, 2 – 7 July 2017). P. 65.

11. А.Е. Благов, **А.С. Бойкова**, Ю.А. Волковский, Ю.А. Дьякова, К.Б. Ильина, М.А. Марченкова, Ю.В. Писаревский, П.А. Просеков, М.В. Ковальчук «Методика in situ исследования образования упорядоченных белковых структур». Сборник тезисов Первого Российского кристаллографического конгресса (Москва, Россия, 21 – 26 ноября 2016). С.230.

12. **A.S. Boikova**, K.B. Ilina, Y.A. Dyakova, M.A. Marchenkova, P.A. Prosekov, A. Yu. Seregin, A.E. Blagov, Yu.V. Pisarevsky, M.V.Kovalchuk «In Situ investigation technique of protein ordered structures formation». RACIRI Summer School 2016 (Repino, Russia, 21 – 28 August 2016). Participant's Talks. P. 10.