

УДК 519.6

МАТЕМАТИЧЕСКОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ ПРОЦЕССА ВЫРАЩИВАНИЯ БИОКРИСТАЛЛОВ МЕТОДОМ СВОБОДНОЙ ДИФФУЗИИ

В. П. Гинкин, О. М. Гинкина, С. М. Ганина
(ГНЦ РФ-ФЭИ, г. Обнинск)

Дается описание математической модели процесса выращивания биокристаллов методом свободной диффузии. Приводятся результаты модельных расчетов, позволившие выявить основные механизмы зарождения и роста биокристаллов и наметить пути улучшения качества и увеличения размеров выращиваемых кристаллов под управляющим воздействием температурного поля.

Ключевые слова: кристаллизация протеинов, осадитель, температура, пересыщение, тепломассоперенос, образование кристаллов, математическая модель роста кристаллов, лизоцим, метод свободной диффузии.

Введение

Кристаллы белка (лизоцима) используются для определения пространственной структуры жизненно важных молекул этого вещества методом рентгеноструктурного анализа. Данные о пространственной структуре необходимы для разработки эффективных лекарственных средств нового поколения и изучения механизмов развития заболеваний. Несмотря на значительные успехи, достигнутые в последнее время в методах получения пригодных для рентгеноструктурного анализа белковых кристаллов, именно стадия кристаллизации до сих пор остается наименее предсказуемой и именно она часто определяет время, затрачиваемое на исследование пространственной структуры белка.

Для того чтобы вызвать осаждение молекул лизоцима из раствора, необходимо создать их концентрацию ρ_1 , существенно превышающую равновесную растворимость S . Отношение ρ_1/S называется относительным пересыщением, или просто пересыщением, и обозначается σ . Обычно полагают, что, когда σ достигает некоторого предельного значения η , с большой вероятностью образуется зародыш кристалла. Для чистого раствора лизоцима это предельное пересыщение приблизительно равно 3. Реально оно может быть и меньше, и больше: его изменения происходят до тех пор, пока не появится центр кристаллизации. Тогда возникает зародыш, ко-

торый спонтанно с высокой скоростью вырастает до тех размеров, которые необходимы, чтобы на границе кристалла пересыщение стало равным единице. Далее процесс роста (или растворения) кристалла идет автоматически и определяется значением равновесной концентрации лизоцима на границе раздела фаз, равным значению его равновесной растворимости S .

Таким образом, основной зависимостью, определяющей кинетику роста биокристаллов, является зависимость растворимости лизоцима S от концентрации осадителя ρ_2 и температуры раствора T . Для лизоцима эта зависимость была получена в работе [1] и приведена на рис. 1.

После того, как кристалл образовался, значение σ на границе кристалла равно 1, а вокруг него образуется обедненный слой раствора лизоцима. Если в результате диффузионно-конвективного переноса молекул лизоцима и осадителя концентрация молекул лизоцима ρ_1 на границе кристалла возрастет и превысит значение растворимости S , эти молекулы перейдут из раствора в твердое состояние, что приведет к росту кристалла. Если же концентрация ρ_1 станет меньше значения растворимости S , то часть кристалла растворится.

Растворимость лизоцима может сильно зависеть от температуры, значения pH и концентрации осадителя. Поэтому кристаллы белка обычно выращиваются из растворов, которые в до-

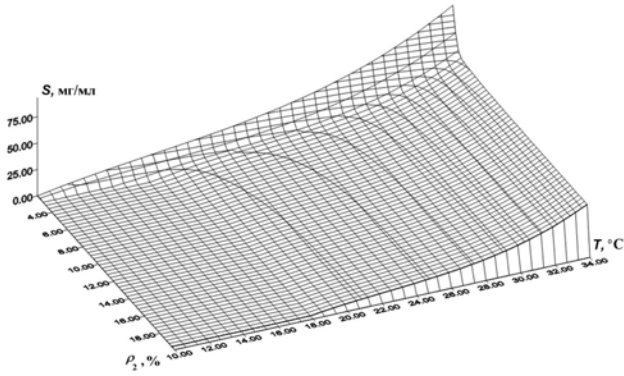


Рис. 1. Двумерное распределение растворимости лизоцима в зависимости от температуры и концентрации осадителя NaCl

полнение к растворителю и лизоциму содержат буфер и осадитель определенной объемной концентрации. Взаимодействия между этими веществами в растворе изучены недостаточно.

Не понятно также, как конвекция влияет на эти взаимодействия. Вообще, конвекция увеличивает скорость перемешивания раствора, приводя к относительно быстрому увеличению концентрации лизоцима в обедненных слоях вблизи границы растущего кристалла, и это должно приводить к увеличению скорости его роста. Но при этом ухудшается структурное качество кристалла. Поэтому конвекция относится к отрицательным факторам, препятствующим выращиванию кристаллов совершенной структуры.

Уменьшить влияние конвекции на рост кристалла можно, если исключить силу земной гравитации и вырастить кристалл в космосе на борту космического аппарата. Такие эксперименты выполнялись в прошлом многократно и показали, что в большинстве случаев кристаллы, выращенные в космосе, действительно превосходят земные как по размерам, так и по структурному качеству.

Существуют способы исключения влияния конвекции на рост кристалла и в земных условиях. Это, например, выращивание кристаллов в капилляре методом свободной диффузии. В данном методе капилляр, заполненный раствором белка и запаянный с одного из торцов, закрывают проницаемой как для лизоцима, так и для осадителя пробкой и опускают в сосуд с гелем, содержащим осадитель. Лизоцим и осадитель диффундируют навстречу друг другу, и в капилляре повышается пересыщение, что приводит в итоге к образованию в объеме капилляра

зародышей кристаллов белка и их росту. При этом диаметр капилляра выбирается достаточно малым, чтобы не допустить развития внутри него конвективных течений. Этот способ выгоден еще и тем, что расходуется малое количество белка, являющегося, как правило, очень дорогостоящим материалом.

В данной работе построена математическая модель для выращивания кристаллов белков методом свободной диффузии и представлены результаты численных исследований с учетом управляющего точечного воздействия температурного поля на процесс образования и роста биокристаллов.

Уравнения конвективного теплопереноса

Нестационарный перенос массы, момента импульса и энергии в растворе описывается следующими уравнениями (в безразмерной форме в приближении Буссинеска):

$$\begin{aligned} \nabla \vec{V} &= 0; \\ \frac{\partial \vec{V}}{\partial t} + (\vec{V} \nabla) \vec{V} &= -\nabla p + \frac{1}{\text{Re}} \nabla^2 \vec{V} + \\ &+ \left(\frac{\text{Ra}_1}{\text{Sc}_1} \rho_1 + \frac{\text{Ra}_2}{\text{Sc}_2} \rho_2 \right) \frac{\vec{g}}{g_0} + \frac{\text{Gr}}{\text{Re}^2} T \frac{\vec{g}}{g_0}; \\ \frac{\partial \bar{\rho}_1}{\partial t} + (\vec{V} \nabla) \bar{\rho}_1 &= \frac{1}{\text{Sc}_1} \nabla^2 \bar{\rho}_1 + J; \\ \frac{\partial \bar{\rho}_2}{\partial t} + (\vec{V} \nabla) \bar{\rho}_2 &= \frac{1}{\text{Sc}_2} \nabla^2 \bar{\rho}_2; \\ \frac{\partial T}{\partial t} + (\vec{V} \nabla) T &= \frac{1}{\text{Pe}} \nabla^2 T, \end{aligned}$$

где используются следующие обозначения: индекс 1 соответствует лизоциму, индекс 2 — осадителю (NaCl);

\vec{V} — скорость конвекции;

p — давление;

\vec{g} — ускорение свободного падения на Земле;

g_0 — модуль ускорения свободного падения на Земле;

$\bar{\rho}_j = (\rho_j - \rho_j^0) / \rho_j^0$ — безразмерная концентрация;

ρ_j^0 — начальная концентрация компонента j в однородном растворе;

J — источник (сток) из-за растворения (кристаллизации) твердого лизоцима;

$\text{Re} = Uw/\nu$ — число Рейнольдса;

U — характерная скорость;
 w — характерная длина;
 $\nu = \mu/\rho^S$ — кинематическая вязкость;
 w^2/ν — безразмерное время;
 ρ^S — плотность раствора;
 $Ra_j = w^3 g_0 \beta_j \rho_j^0 / (D_j \nu)$ — число Рэлея для компонента j ;
 β_j — коэффициенты концентрационного расширения;
 D_j — коэффициенты диффузии лизоцима и растворителя;
 $Sc_j = \nu/D_j$ — число Шмидта для компонента j ;
 $Gr = g_0 \beta_T w^3 \Delta T / \nu^2$ — число Грасгофа;
 β_T — коэффициент теплового расширения;
 ΔT — перепад температур;
 $Pe = Re \cdot Pr$ — число Пекле;
 $Pr = \nu/a$ — число Прандтля;
 a — коэффициент температуропроводности.

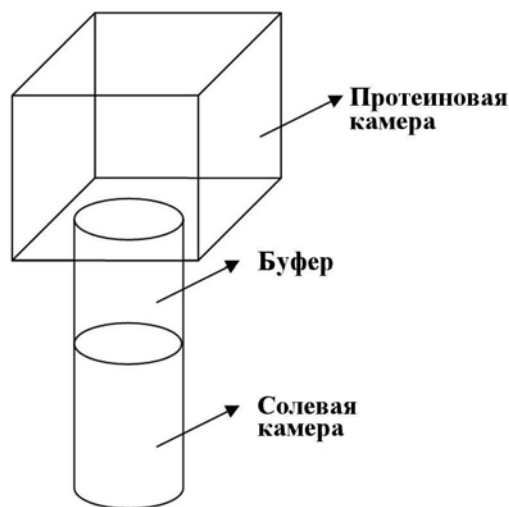


Рис. 2. Схема ростовой установки

Начальные и граничные условия зависят от конкретной геометрии и материалов моделируемой установки. На твердых границах области с раствором ставится условие прилипания и отсутствие притока (стока) массы:

$$\vec{V} = 0;$$

$$\nabla \rho_j \cdot \vec{n}_w = 0,$$

где \vec{n}_w — единичный вектор нормали к стенке.

На границе раздела фаз справедливо соотношение баланса масс:

$$\vec{V} \cdot \vec{n}_w = \frac{\rho^c}{\rho^S} V^f.$$

где ρ^c — плотность твердой фазы, V^f — скорость движения фронта кристаллизации по нормали к границе фазового перехода.

По температуре на границах задаются условия 1-го, 2-го или 3-го рода.

Расчет пересыщений

Описание установки для расчетных исследований. На рис. 2 приведена схема установки, в которой выращивались кристаллы лизоцима в космосе.

Рассчитывался один из пяти экспериментов, представленных в работе [2], — эксперимент 1L1 в установке FID450(114A). Длина солевой камеры — 15 мм, длина буфера — 12 мм, длина протеиновой камеры — 6,5 мм. Солевая камера и

буфер имеют цилиндрическое сечение, протеиновая камера — прямоугольное сечение. Диаметр солевой камеры и буфера — 5 мм. Размеры поперечного сечения протеиновой камеры — 6,2 мм × 9,4 мм. В демонстрационном расчете одномерной задачи поперечные размеры камер не учитывались, учитывались только их длины. Коэффициент диффузии для лизоцима равен $1,16 \cdot 10^{-6}$ см²/с, для NaCl — $1,6 \times 10^{-5}$ см²/с. Начальная концентрация NaCl в протеиновой камере составляла 5,85 мг/мл, в буфере — 96,525 мг/мл, в солевой камере — 164,97 мг/мл. Начальная концентрация лизоцима в протеиновой камере была равна 10 мг/мл.

Рассчитывался нестационарный процесс встречной диффузии лизоцима и NaCl в течение 625 000 с. Расчет диффузии производился по неявной схеме на сетке с количеством узлов 1 000 и временным шагом 5 с.

Результаты расчетов для изотермического случая. Температура T задавалась одинаковой по длине и равной 18 °С и не изменялась в течение всего эксперимента.

На рис. 3 приведены распределения относительного пересыщения по длине протеиновой камеры в шесть моментов времени (таких же, как в работе [2]). Из сравнения результатов изотермического расчета с результатами, приведенными в работе [2], можно сделать вывод об их хорошем согласии. Максимальное различие в количественных значениях относительных пересыщений составляет примерно 4 %.

На рис. 4 приведены зависимости относительного пересыщения от времени на входе и выходе

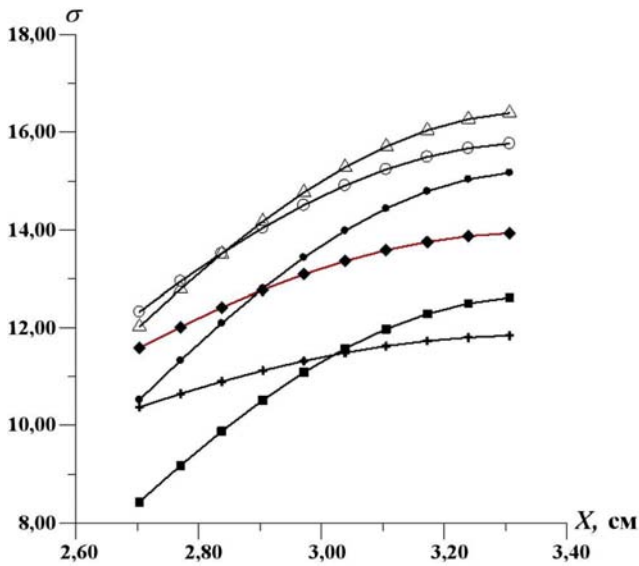


Рис. 3. Распределения относительного пересыщения по длине протеиновой камеры в различные моменты времени: ■ — $t = 90\,954\text{ с}$; ● — $t = 133\,164\text{ с}$; Δ — $t = 194\,964\text{ с}$; ○ — $t = 285\,450\text{ с}$; ◆ — $t = 417\,924\text{ с}$; + — $t = 611\,880\text{ с}$

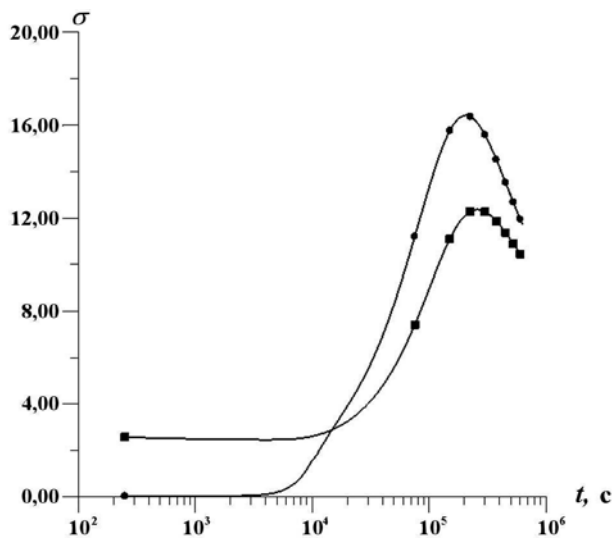


Рис. 4. Зависимости относительного пересыщения от времени на входе (■) и выходе (●) протеиновой камеры

протеиновой камеры. Видно, что максимальное значение относительного пересыщения достигается примерно через 200 000 с от начала процесса диффузии, что хорошо согласуется с результатом работы [2].

Из рис. 4 видно, что примерно через 10 000 с после начала эксперимента относительное пересыщение по всей длине протеиновой камеры

больше единицы, а уже через 20 000 с превышает предельное значение $\eta = 3$ по всей длине камеры. Это приводит к множественному зарождению и росту кристаллов белка по всему объему камеры. При этом размеры выросших кристаллов будут относительно малы, а их качество будет различным, так как было различным пересыщение в местах зарождения и роста этих кристаллов. Из опыта известно, что наиболее совершенные кристаллы получаются в том случае, если они выросли при небольших превышениях пересыщения относительно единицы.

Результаты расчетов для неизотермического случая. Целью этого расчета было выяснение влияния неоднородности температуры по длине ростовой установки на относительное пересыщение. В этом расчете температура нижнего торца ростовой установки T_1 задавалась равной 18°C , а температура верхнего торца T_2 — равной 25°C .

В начальный момент времени температура T задавалась одинаковой по длине ростовой установки и равной T_1 . Затем на верхнем торце установки температура изменялась скачком до значения T_2 и далее не менялась в течение всего эксперимента.

На рис. 5 приведено распределение относительного пересыщения по длине протеиновой ка-

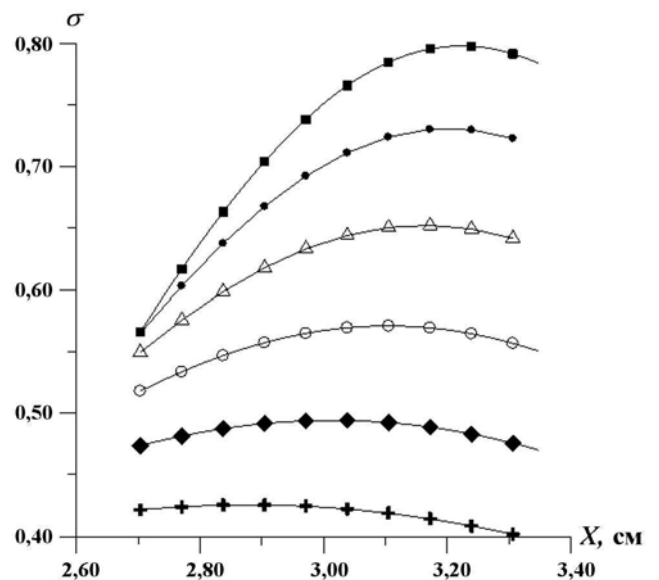


Рис. 5. Распределения относительного пересыщения по длине протеиновой камеры в различные моменты времени ($T_1 = 18^\circ\text{C}$, $T_2 = 25^\circ\text{C}$): ■ — $t = 90\,954\text{ с}$; ● — $t = 133\,164\text{ с}$; Δ — $t = 194\,964\text{ с}$; ○ — $t = 285\,450\text{ с}$; ◆ — $t = 417\,924\text{ с}$; + — $t = 611\,880\text{ с}$

меры в те же моменты времени, что и на рис. 3. На рис. 6 приведены зависимости относительного пересыщения от времени на входе и выходе протеиновой камеры.

Из сравнения результатов изотермического и неизотермического расчетов видно, что распределение относительного пересыщения по длине камеры сильно зависит от температуры T_2 . Повышение температуры верхнего торца установки приводит к уменьшению относительных пересыщений. Если $T_2 = 25^\circ\text{C}$, то пересыщение вообще нигде не достигает значения 1, что означает невозможность зарождения кристаллов.

Отсюда возникла идея управления процессом зарождения и роста кристаллов путем воздействия на него точечным понижением температуры в каком-либо месте протеиновой камеры, например на входе в камеру.

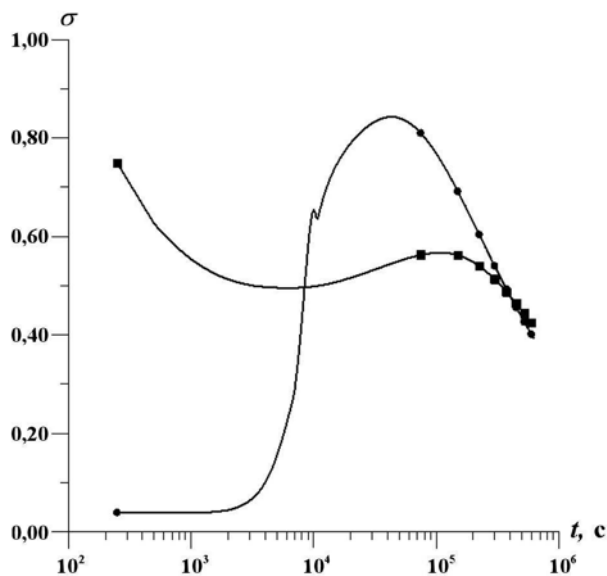


Рис. 6. Зависимость относительного пересыщения от времени на входе (■) и выходе (●) протеиновой камеры ($T_1 = 18^\circ\text{C}$, $T_2 = 25^\circ\text{C}$)

Расчет процесса зарождения и роста кристалла

Расчет процесса зарождения и роста кристалла был выполнен при следующих условиях.

Предполагалось, что вся ростовая установка представляет собой капилляр диаметром 0,1 см, который находится в термостате с температурой $T = 20^\circ\text{C}$. Длины солевой камеры, буфера и протеиновой камеры выбирались равными 1,5, 1,2

и 1,3 см соответственно. В начальный момент времени в небольшой области длиной 0,25 мм на входе протеиновой камеры создавалась область с пониженной температурой $T_0 = 18^\circ\text{C}$. Конвекция в расчете не учитывалась.

Таким образом, были созданы условия для зарождения и роста одного кристалла лизоцима в заданном месте ростовой камеры. Так как зародыш кристалла всего один, то размер его должен быть значительно больше, чем в случае множественного зарождения кристаллов. Варьируя температуру, можно добиться необходимого пересыщения раствора для того, чтобы вырастить кристалл с идеальной структурой. Для этого можно сначала в области пониженной температуры задать такую температуру (около 6°C), чтобы быстро образовался зародыш кристалла, а затем, сразу после того, как он образуется, повысить температуру в данной области до такого уровня (примерно $18\text{--}20^\circ\text{C}$), чтобы пересыщение стало немного больше единицы. Это обеспечит наилучшие условия для выращивания кристалла с высоким структурным качеством.

Для расчета процесса зарождения и роста кристалла лизоцима методом свободной диффузии при управляющем точечном воздействии температурного поля была использована методика, предложенная в работах [1, 3]. Расчеты проводились в двумерной (x, y)-геометрии. Сетка задавалась равномерной, с числом узлов по оси X , равным 800, по оси Y — 20.

Начальное распределение концентраций задавалось таким же, как в предыдущих примерах. На рис. 7 приведены начальные распределения

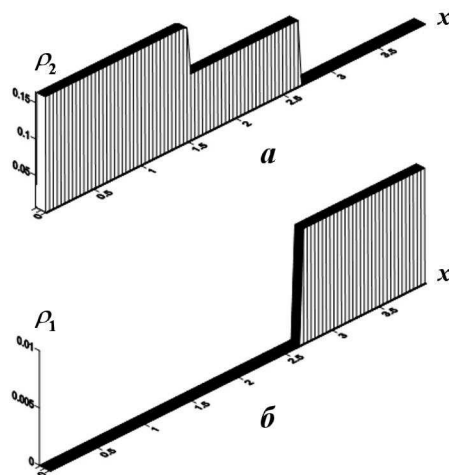


Рис. 7. Начальные распределения концентраций осадителя NaCl (а) и лизоцима (б) по длине капилляра

концентраций осадителя NaCl и лизоцима по длине капилляра.

После начала эксперимента осадитель диффундирует из буфера в протеиновую камеру гораздо быстрее, чем лизоцим в буфер, так как коэффициент диффузии соли больше коэффициента диффузии белка. Это приводит к возрастанию относительного пересыщения на входе в протеиновую камеру, причем в области пониженной температуры относительное пересыщение возрастает быстрее, чем в остальной части камеры (рис. 8).

Примерно через 100 000 с после начала эксперимента пересыщение в области пониженной температуры становится больше предельного пересыщения $\eta = 3$ и зарождается кристалл (рис. 9). Так как часть лизоцима из раствора перейдет в твердую фазу, то в растворе образуется зона с пониженной концентрацией белка и в нее начнет диффундировать лизоцим из других областей с повышенной концентрацией белка. В результате будет происходить рост кристалла, до тех пор, пока концентрация лизоцима в растворе не перестанет меняться.

На рис. 10 представлена зависимость массы кристалла (в относительных единицах) от времени в процессе роста. На рис. 11 приведены результаты моделирования роста кристалла в моменты времени $t = 150\ 000\ \text{с}$, $t = 400\ 000\ \text{с}$ и $t = 900\ 000\ \text{с}$.

Из рис. 10, 11 видно, что рост кристалла прекратился к моменту времени $t = 10^6\ \text{с}$. Однако

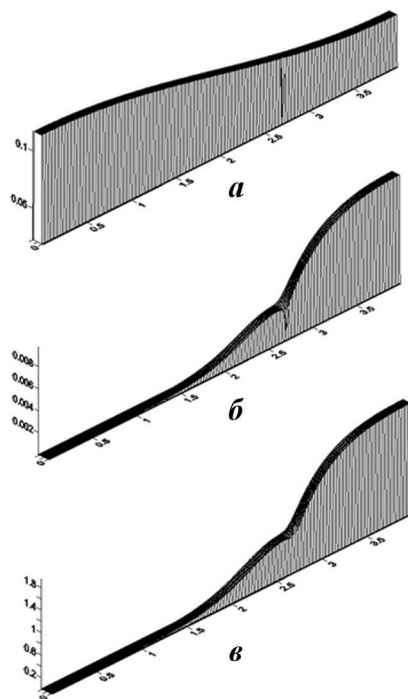


Рис. 9. Распределения концентраций осадителя NaCl (а) и лизоцима (б), а также пересыщения (в) по длине капилляра, $t = 130\ 000\ \text{с}$

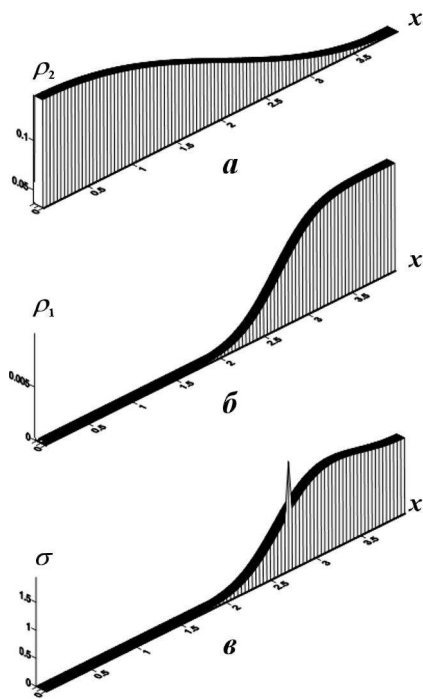


Рис. 8. Распределения концентраций осадителя NaCl (а) и лизоцима (б), а также пересыщения (в) по длине капилляра, $t = 90\ 000\ \text{с}$

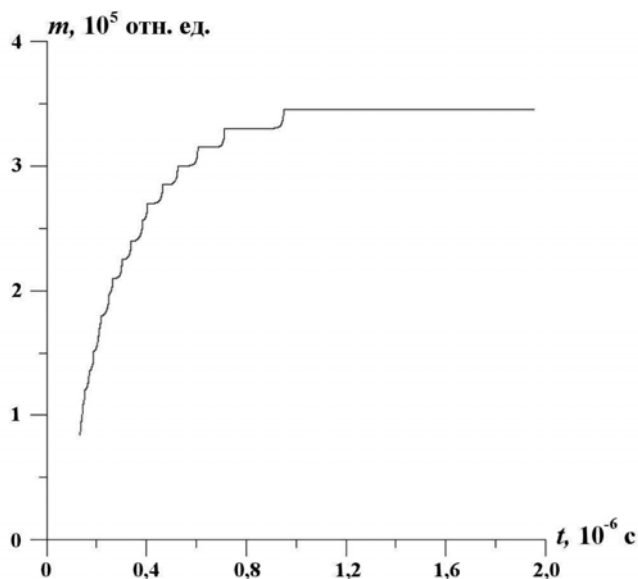


Рис. 10. Зависимость массы кристалла от времени

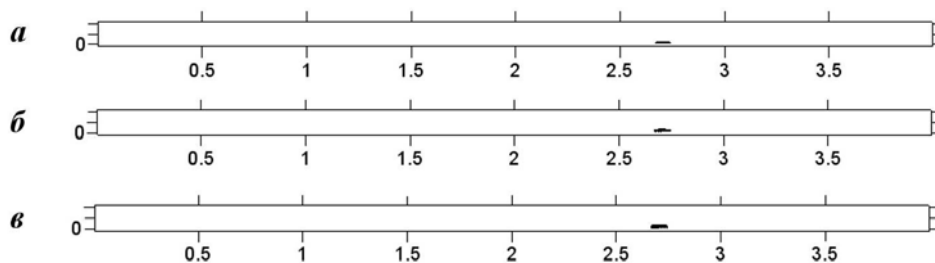


Рис. 11. Размеры кристалла в различные моменты времени: $a - t = 150\,000\text{ с}$; $б - t = 400\,000\text{ с}$; $в - t = 900\,000\text{ с}$

ясно, что при увеличении длины протеиновой камеры рост кристалла продолжился бы и дальше, пока в протеиновой камере не установится концентрационное равновесие. Таким образом, можно вырастить кристалл любого требуемого размера.

Заключение

Предложенная в работе модель позволяет в принципе решить основные задачи математического моделирования процесса роста биокристаллов при выращивании их в земных и космических условиях методом свободной диффузии с учетом управляющего воздействия температуры на рост кристаллов.

Результаты расчетов динамики одномерного распределения пересыщения раствора белка в ростовой камере в процессе свободной диффузии молекул лизоцима и осадителя при выращивании кристаллов в космосе в изотермических условиях показали в целом хорошее согласие с результатами, опубликованными в работе [2].

Приведенные результаты расчетов этого же процесса в неизотермических условиях показали сильное влияние неоднородности температуры на распределение и абсолютные значения относительных пересыщений по объему ростовой камеры. Эти расчеты наглядно продемонстрировали принципиальную возможность организации управляемого роста кристаллов белка при использовании метода свободной диффузии под точечным воздействием температуры с целью получения кристаллов большого размера и высокого структурного качества.

Предложенный способ точечного воздействия пониженной температуры на входе в протеино-

вую камеру на процесс роста показал принципиальную возможность выращивания одного большого кристалла высокого структурного качества в капилляре при использовании метода свободной диффузии.

Работа поддержана грантом РФФИ № 09-02-97519.

Список литературы

1. Гинкин В. П., Ганина С. М., Стрелов В. И. и др. Математическая модель роста биокристаллов под воздействием управляющего теплового поля // Поверхность. Рентгеновские, синхротронные и нейтронные исследования. 2009. № 2. С. 17–24.
2. Otalora F., Garcia-Ruiz J. M. Crystal growth studies in microgravity with the APCF. I. Computer simulation of transport dynamics // J. Crystal Growth. 1997. Vol. 182. P. 141–154.
3. Гинкин В. П., Ганина С. М., Гинкина О. М. Математическая модель кристаллизации растворов под управляющим воздействием температурного поля на примере выращивания биокристаллов // Вопросы атомной науки и техники. Сер. Математическое моделирование физических процессов. 2010. Вып. 2. С. 64–74.

Статья поступила в редакцию 18.10.10.