

ДИНАМИКА НЕОБРАТИМОГО ИСПАРЕНИЯ ВОДНО-БЕЛКОВОЙ КАПЛИ И ПРОБЛЕМА СТРУКТУРНО-ДИНАМИЧЕСКИХ ЭКСПЕРИМЕНТОВ С ЕДИНИЧНЫМИ МОЛЕКУЛАМИ

© 2016 г. К.В. Шайтан, Г.А. Армеев, А.К. Шайтан

Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, 119991, Москва, Ленинские горы, 1/12

E-mail: shaytan49@yandex.ru

Поступила в редакцию 03.12.15 г.

Обсуждается влияние изотермического и адиабатического испарения воды на состояние водно-белковой капли. Рассматриваемая проблема возникает в связи с разработкой различных подходов для структурно-динамических экспериментов с единичными молекулами с использованием рентгеновских лазеров, в которых доставка объекта в область рентгеновского пучка происходит с использованием инжектора микрокапель с временем подлета, лежащем в микросекундном диапазоне. В статье развит вариант метода молекулярной динамики для полного атомного моделирования процесса необратимого изотермического испарения. В экспериментах *in silico* определены параметры изотермического испарения водно-белковой капли, содержащей ионы натрия и хлора в концентрации порядка 0,3 М при различных температурах. Определенная из численных экспериментов энергия необратимого испарения на начальных стадиях процесса практически совпадает с удельной теплотой испарения воды. Для кинетики необратимого адиабатического испарения получено точное аналитическое решение задачи в пределе высокой теплопроводности капли (или до размера капли $\sim 100 \text{ \AA}$). Это решение содержит параметры, которые определяются из экспериментов *in silico* по изотермическому испарению капли. Показано, что кинетика адиабатического испарения и охлаждения капли масштабируется по размеру капли. Проведенные оценки скорости заморозки водно-белковой структуры при адиабатическом испарении в вакуумной камере показывают, что для исследования конформационных перестроек в единичных молекулах требуется использование дополнительных приемов по стабилизации температуры в ядре капли, содержащей белок. Использование изотермических или квазиизотермических условий более подходит для изучения структурных перестроек при функционировании объекта. Однако в этом случае необходимо принимать во внимание эффекты дегидратации и резкого увеличения ионной силы водной микросреды, окружающей белок.

Ключевые слова: молекулярная динамика, испарение капли, водно-белковые системы, эксперименты с единичными молекулами, рентгеновские лазеры на свободных электронах (XFEL).

В настоящее время активно развиваются новые методы изучения структуры биологических объектов, связанные с использованием рентгеновских лазеров на свободных электронах [1–4]. Перспективы этого метода широко обсуждаются в плане принципиальной возможности проведения структурных экспериментов с единичными белковыми объектами без кристаллизации с временным разрешением до 10 фс. Это весьма непростая задача как с точки зрения приготовления образцов, проведения самого эксперимента, так и обработки полученной картины рассеяния рентгеновского излучения для получения структурной информации [5–7]. Ниже обсуждается только вопрос, связанный с особенностями доставки макромолекулярного объекта в область рентгеновского пучка, а именно возможные эффекты испарения воды

из микрокапель, содержащих белковый объект, которые попадают в измерительную камеру из сопла специального инжектора [3,5]. Микрокапли образца выбрасываются из инжектора со скоростью порядка 5–50 м/с. Расстояние до области пучка составляет порядка 150 мкм. То есть время подлета составляет порядка 3–30 мкс. Это достаточно большой промежуток времени с точки зрения динамики изменения состояния микрокапли. Особенно это касается экспериментов с единичными молекулами, в которых размеры микрокапель должны быть существенно меньше, чем в случае экспериментов с нанокристаллами. Ниже проводится расчет и моделирование возможных изменений состояния микрокапли в зависимости от условий инъекции и обсуждаются возможные эффекты,

которые могут привести к модификации схемы эксперимента.

Проблема испарения капли обсуждается более 100 лет. Эта проблема имеет множество термодинамических, кинетических, гидродинамических и др. аспектов [8–12]. С точки зрения кинетики испарения, вода (как и другие ассоциированные жидкости) имеет ряд особенностей, которые продолжают активно обсуждаться [11,12]. В зависимости от достаточно тонких деталей экспериментов по испарению воды наблюдаемые удельные скорости испарения могут различаться до тысячи раз [12]. В настоящей работе мы развиваем методы полноатомной молекулярной динамики для определения кинетических параметров прямого необратимого изотермического испарения воды из водно-белковой капли при ее впрыске в измерительную камеру, не содержащую паров воды. Для этого разрабатывается специальная схема численного эксперимента, включающая сферическую ловушку для испарившихся молекул воды. Отметим, что применение методов молекулярной динамики непосредственно к условиям адиабатического испарения требует достаточно серьезной модификации алгоритмов, которые обычно используются для микроканонических NVE или NPE-ансамблей. Это отдельная проблема, и мы для случая адиабатического испарения развиваем другой подход. В статье формулируются и точно решаются уравнения для кинетики необратимого адиабатического испарения капли при условии быстрого выравнивания градиента температуры в капле. Оценки, основанные на уравнении теплопроводности, показывают, что в случае капель воды последнее справедливо для капель с размером до 100 Å. Точное решение уравнения для адиабатического испарения содержит параметры, которые могут быть получены из расчета динамики изотермического испарения при различных температурах. Эти параметры определяются в численных экспериментах по изотермическому испарению водно-белковой капли с начальным средним радиусом около 35 Å. Полученное решение допускает масштабирование параметров кинетики испарения по размеру капли. Оценки, проведенные с использованием предлагаемых моделей, показывают, что доставка единичных молекул белка (или иного биополимера, комплекса и т.п.) в область рентгеновского пучка с использованием инжектора водного раствора для структурных и динамических экспериментов на рентгеновских лазерах на свободных электронах (XFEL) требует в каждом конкретном случае проведения расчета температурных, гидратационных и солевых эффектов воздействия

испарения воды из микрокапли и построения соответствующей схемы эксперимента. Это особенно важно для проведения экспериментов по изучению конформационной динамики, которая, как известно, весьма чувствительная к этим параметрам [13].

Рассмотрим простую модель водно-белковой капли в виде белковой сердцевинки радиуса r_p и внешнего радиуса водной оболочки R . Природа белковой сердцевинки не очень важна для дальнейшего рассмотрения при условии сохранения достаточно толстой водной оболочки, что выполняется в проведенных ниже численных экспериментах. Уравнение для необратимого испарения воды с поверхности капли в среду с нулевым давлением пара в среде имеет очевидный вид:

$$\frac{dN}{dt} = -k(T,N)S(N), \quad (1)$$

где N – число молекул воды в капле, S – площадь поверхности капли при заданном числе молекул воды, $k(T,N)$ – скорость испарения с единицы поверхности, которая по закону Аррениуса зависит от температуры T :

$$k(T,N) = k_0 \exp[-h_w(N,T)/k_B T]. \quad (2)$$

Величина h_w – обычно совпадает с энтальпией испарения, которая в принципе зависит от радиуса капли. При большом радиусе эта величина совпадает просто с теплотой испарения. При малых размерах капли эта величина должна уменьшаться в силу избытка поверхностной энергии в соответствии с формулой Томсона (Кельвина) [14]:

$$\delta h_w \sim \frac{2\sigma v}{R}, \quad (3)$$

где σ – поверхностное натяжение (для воды ~ 75 дин/см [14]) или, для малых капель, поверхностная энергия [15], v – молекулярный объем (для воды $\sim 30 \text{ \AA}^3$). Подставляя в формулу (3) параметры, получаем оценку $\delta h_w \sim 6,5/R$ ккал/моль, где R выражено в ангстремах. При радиусе капли $\sim 30 \text{ \AA}$ уменьшение энергии активации должно составить порядка 0,2 ккал/моль. В пределе минимально возможного радиуса водного кластера порядка диаметра молекулы воды формальная оценка дает уменьшение энергии испарения на величину порядка 2 ккал/моль, хотя применение формулы (3) в этом случае вряд ли возможно и это оценка эффекта снизу. Предельное значение теплоты испарения составляет порядка энергии водородной связи в воде ~ 5 ккал/моль при

размерах водного кластера, допускающих такое понятие. В рассматриваемом варианте изменением энергии испарения при вариации размера капли в пределах нескольких слоев молекул воды и изменением теплоты испарения от числа молекул воды в капле мы будем пренебрегать и полагать $h_w \sim 10,8$ ккал/моль [14]. Это согласуется и с результатами молекулярного моделирования (см. ниже). Вдали от критической точки теплота испарения слабо зависит от температуры [14]. При переходе к фазе льда энергия сублимации молекул воды возрастает примерно на величину удельной теплоты плавления льда ($\sim 1,4$ ккал/моль) и составляет порядка 12,15 ккал/моль. Этими эффектами мы также будем пренебрегать при проведении оценок и считать теплоту испарения в формуле (2) постоянной и равной $h_w \sim 10,8$ ккал/моль.

Предэкспоненциальный множитель в формуле (2) слабо зависит от температуры. Согласно теории активированного комплекса [16], он составляет примерно

$$k_0 \sim \frac{k_B T}{h s_w} e^{\delta S/k_B} \sim 0,065 \cdot 10^{13} e^{\delta S/k_B} \text{ с}^{-1} \text{ \AA}^{-2}, \quad (4)$$

где δS – увеличение энтропии молекулы воды в состоянии, готовом к испарению. Оценки показывают, что эта величина примерно в три-четыре раза меньше, чем энтропия перехода молекулы воды из жидкости в пар при нормальной температуре. Численное значение в уравнение (4) дано для $T = 310$ К и площади на молекулу воды $s_w \sim 10 \text{ \AA}^2$. Формулы (3) и (4) не несут особой смысловой нагрузки для дальнейшего изложения, но полезны для понимания общей физической картины явления (см. ниже рис. 2).

Воспользовавшись моделью концентрических сфер и обозначая через v объем, приходящийся на одну молекулу воды, получаем

$$N = \frac{4\pi}{3v}(R^3 - r_p^3); \quad S = 4\pi R^2. \quad (5)$$

Следовательно, для уменьшения радиуса капли вследствие испарения имеем уравнение

$$\frac{dR}{dt} = -k(T)v. \quad (6)$$

Рассмотрим, во-первых, вариант изотермического испарения, когда инъекция капель происходит в сухую газовую фазу с заданной температурой и давлением, достаточным для эффективного энергообмена с каплей. Как уже обсуждалось, при радиусе капли существенно большем размера молекулы воды и постоянной

температуре константа скорости испарения k практически не зависит от радиуса капли и решение имеет простой вид

$$R = R_0 - kvt,$$

где R_0 – начальный радиус. Это решение для изотермического испарения легко пересчитывается в число молекул с помощью уравнения (5). Скорость уменьшения радиуса капли при $T = 310$ К и теплоте испарения 10,8 ккал/моль составляет

$$kv \sim 5,3 \cdot 10^5 e^{\delta S/k_B} \text{ \AA/с}. \quad (7)$$

Величина энтропии активации испарения может быть определена путем сравнения (8) и скорости испарения, полученной в численном эксперименте.

Для уточнения модели моделировалась молекулярная динамика процесса испарения водно-белковой капли. Рассматривалась водная капля с ядром в виде молекулы лизоцима (длина 125 а.к.о., код PDB 1JUG, мол. масса 13,992 КДа), содержащая 6259 молекул воды. В водную фазу были добавлены ионы натрия (30) и хлора (36). Эффективная концентрация соли в водной фазе составляла 0,29 М. Начальный радиус капли составлял примерно 35 \AA. Для проведения моделирования применялся программный пакет NAMD 2.9 [17], расчет производили на вычислительном кластере с одновременным использованием до 64 процессоров. Создание системы и анализ траекторий осуществлялся при помощи программного пакета VMD 1.9.2 [18]. Анализ данных и построение графиков производился при помощи оригинальных скриптов на языке Python с библиотеками Scipy и Matplotlib [19]. Система была параметризована в силовом поле CHARMM36 [20]. Парные невалентные взаимодействия вычисляли с применением сглаженных потенциалов с радиусом 20 \AA. Вычисления производили с использованием алгоритмов динамики Ланжевена (сохраняется равнораспределение энергии по всем степеням свободы и максвелловское распределение скоростей атомов при заданной температуре) с шагом интегрирования 1 фс. Длина траекторий, полученных при различных температурах, достигала 250 нс, траектории записывали с частотой 1 кадр в 10 пс. Для моделирования динамики испарения капли применяли специально разработанный протокол. Для устранения смещения капли как целого C_α -атом лейцина 56 был фиксирован мягким гармоническим потенциалом. Выбор атома для фиксации не влияет на процесс испарения, выбор был произведен из соображений близости

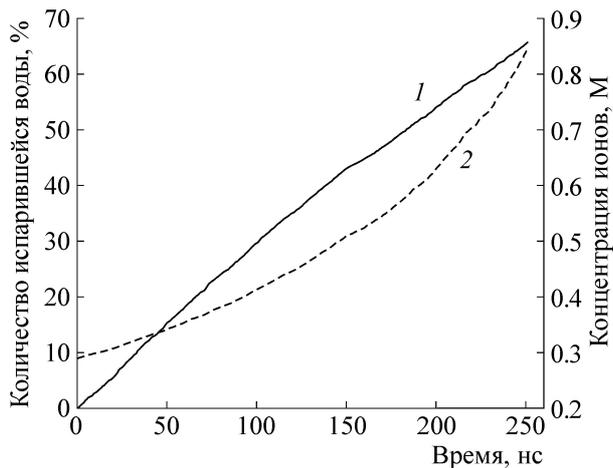


Рис. 1. Зависимости доли испарившихся молекул воды (1) и концентрации ионов соли (2) в водно-белковой капле со средним радиусом 35 Å от времени при изотермическом испарении при $T = 310$ К.

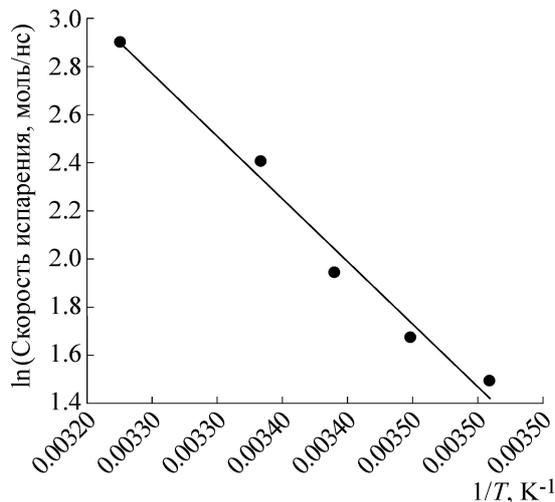


Рис. 3. Температурная зависимость начальных скоростей испарения воды для водно-белковой капли средним радиусом 35 Å. Спрямление зависимости в аррениусовских координатах дает значение энергии активации (удельной теплоты испарения) 10,76 ккал/моль.

к геометрическому центру белка и так, чтобы вращение всей водно-белковой системы вокруг центра минимальным образом возмущала симметрию капли, которая близка к сферической. Отметим, что обычно используемые программы молекулярной динамики не позволяют молекулам удаляться друг от друга на большие расстояния. Однако при испарении капли воды в вакууме молекулы разлетаются на значительные расстояния. Для того чтобы сделать такое моделирование возможным, в систему был введен дополнительный ограничивающий потенциал,

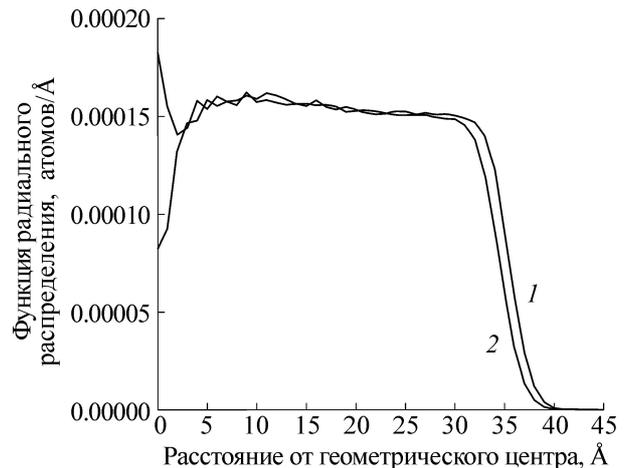


Рис. 2. Радиальная функция распределения плотности в водно-белковой капле относительно ее геометрического центра при временах 0 нс (1) и 30 нс (2) от начала испарения. Флуктуации плотности в районе центральной части капли связаны с движениями (поворотами) капли и вкладом в плотность от молекулы лизоцима.

улавливающий молекулы воды во сферическом слое шириной 5 Å на удалении не менее 100 Å от капли. Такого рода ограничения не позволяют молекулам воды превысить допустимые значения координат и не позволяют им вернуться назад в каплю. В силу того, что улавливающий потенциал начинает действовать на расстояниях больших, чем радиус обрезания парных взаимодействий, он не вносил изменений в поведение системы.

На рис. 1 приведен график испарения воды из водно-белковой капли. Начальная скорость испарения составила 18,7 молекул/нс. Начальный эффективный радиус капли флуктуирует в пределах 33–37 Å. Прокатка усредненной несферической поверхности капли сферой радиусом 3 Å дает значение эффективной площади поверхности порядка 24340 Å². Сопоставление этих величин дает значение скорости испарения:

$$kv \sim 230 \cdot 10^5 \text{ А/с}, \quad (9)$$

что соответствует энтропии активации $\Delta S \sim 7,54$ кал/(К·моль). (Отметим, что полная энтропия испарения воды составляет порядка 27 кал/(К·моль).) Из данных моделирования видно, что у поверхности капли имеется переходная зона толщиной порядка 5 Å или чуть больше размера молекулы воды (рис. 2), в которой плотность уменьшается от объемных значений до нуля. Эта рыхлая область, по-видимому, и дает вклад в энтропию активации.

Моделирование испарения капли при различных температурах (рис. 3) приводит к зна-

чениям энергии активации испарения $\sim 10,76$ ккал/моль, практически той же, что и для макрообъема [14].

При такой скорости испарения за 1,5 мкс радиус теоретически может уменьшиться до нуля, что делает само существование капли проблематичным. Использование капель большого радиуса может привести к дополнительным сложностям при расшифровке картины рассеяния от единичных молекул белка ввиду увеличения рассеивающих центров. С другой стороны, при обсуждаемых условиях за время порядка 30 мкс может полностью испариться капля радиусом 70 нм. Обращает на себя внимание также следующее обстоятельство. На рис. 1 приведена зависимость увеличения концентрации соли в водной фазе вокруг молекулы белка. Моделирование динамики показывает, что при испарении не происходит захвата ионов молекулами воды. Начиная с некоторого момента, увеличение концентрации соли существенно увеличит теплоту испарения вследствие связывания ионами воды в сольватных оболочках. Поэтому, варьируя концентрацию соли в растворе, можно в принципе добиться сохранения водной фазы в микрокаплях. Препятствием для использования такого приема будет являться резкое воздействие большой ионной силы на структуру и динамику белка. Альтернативой может служить инъекция капель в газовую фазу с достаточным парциальным давлением водяного пара, но здесь возможны дополнительные проблемы. Отметим работу [21], в которой изучалась молекулярная динамика воздействия водно-солевой среды на лизоцим.

Рассмотрим далее наиболее вероятный с точки зрения эксперимента адиабатический вариант испарения воды из микрокапель при инъекции в вакуум. В этом случае будет происходить охлаждение микрокапель вследствие испарения воды.

Оценим, во-первых, возможные эффекты неоднородности температуры в микрокапле. Коэффициент теплопроводности капли (воды) составляет порядка $\lambda \sim 1,5 \cdot 10^{-3}$ кал/(см·с·К) [14]. Принимая линейный размер капли $L \sim 70$ Å, получаем из уравнения теплопроводности оценку для характерного времени выравнивая в капле градиента температуры при испарении молекулы воды $\tau \sim 0,34 \cdot 10^{-9}$ с:

$$\tau \sim \frac{L^2}{\lambda} \rho C_w, \quad (10)$$

где $\rho \sim 1$ – плотность капли, $C_w \sim 1$ кал/(г·К) – удельная теплоемкость воды [14]. Таким образом, если скорость охлаждения капли dT/dt окажется существенно меньше, чем $\delta T/\tau \sim 10$ К/нс

(где δT – приемлемое изменение температуры, порядка 3 К, которое не сказывается сильно на структуре и динамике капли), то можно считать, что в капле успевает установиться подобие теплового равновесия, и мы для проведения оценки эффектов замерзания капли при адиабатическом испарении воды можем пользоваться термодинамическими оценками.

Соответствующее уравнение для связи скорости охлаждения и скорости испарения можно получить из следующих соображений. Изменение энтальпии микрокапли δH за счет испарения δN молекул воды ($\delta N \ll N$) должно быть практически равно уменьшению энтальпии за счет охлаждения на величину δT ($\delta T \ll T$):

$$\delta H(N, T) \approx h_w(N, T) \delta N / N_A = C_p(N, T) \delta T, \quad (11)$$

где $h_w(N, T)$ – теплота испарения моля жидкости в капле при числе молекул воды N и температуре T , N_A – число Авогадро. Ниже мы будем считать удельную теплоту испарения, не зависящей от температуры (вдали от критической точки) и от числа молекул воды (от радиуса капли). Теплоемкость капли складывается из теплоемкости молекулы белка и теплоемкости водной оболочки:

$$C_p(N, T) = \frac{C_{pr}(T) M_{pr}}{N_A} + N \frac{18 C_w(T)}{N_A}, \quad (12)$$

$C_p(N, T) \sim N C_w$ – теплоемкость водно-белковой капли. C_w при переходе через точку замерзания уменьшаются примерно в два раза и далее плавно уменьшается с уменьшением T примерно в 1,5 раза при уменьшении T до -100°C , $C_{pr} \sim 0,37/300$ кал/(г·К) – удельная теплоемкость белка (при температурах вплоть до 50 К) [22], M_{pr} – молекулярная масса белка (в случае лизоцима ~ 14000 Да). Изменение состояния водно-белковой капли происходит за счет испарения воды и понижения температуры. Ниже, при проведении оценок для кинетики адиабатического испарения в относительно узком интервале температур (от 310 до 200 К), мы будем полагать теплоемкость капли не зависящей от T . Мы также будем пренебрегать вкладом в теплоемкость капли, от молекулы белка и считать в формуле (5) эффективный радиус белка много меньше радиуса капли.

Уравнение (11) при вышеперечисленных условиях приводит к двум полезным соотношениям для дальнейшего анализа

$$\frac{d \ln N}{dT} = \frac{1}{T_w} \quad (13)$$

и

$$\frac{d \ln N}{dt} = \frac{1}{T_w} \frac{dT}{dt}, \quad (14)$$

где

$$T_w = \frac{h_w}{18C_w} \approx 600 \text{ К} \quad (15)$$

– отношение удельной теплоты испарения к удельной теплоемкости – параметр размерности температуры, характеризующий состав капли.

Из уравнения (13) следует принципиально важный вывод, что при адиабатическом испарении изменение числа молекул в капле не может быть более некоторого определенного предела:

$$\frac{N}{N_0} \geq \exp\left(-\frac{T_0}{T_w}\right); \quad \frac{R}{R_0} \geq \exp\left(-\frac{T_0}{3T_w}\right). \quad (16)$$

Так как $N \sim R^3$, то уравнения (13) и (14) легко переписываются в терминах радиуса капли. Это, например, означает, что если для водной капли при адиабатическом испарении за бесконечный промежуток времени произойдет охлаждение до абсолютного нуля от начальной температуры 300 К, то доля оставшихся молекул воды составит $e^{-1/2} \sim 0,6$. Изменение радиуса капли при этом составит всего около 15%.

Отметим, что уравнение (6) для кинетики испарения справедливо и в случае, когда температура капли меняется во времени, но нужно учитывать, что T теперь является функцией времени и решение более не имеет простого вида (7). Однако и в этом случае можно получить решение для кинетики испарения в квадратурах. Для этого обратим внимание на то, что согласно (13) радиус капли и температура связаны соотношением

$$T = T_0 - 3T_w \ln R_0/R \quad (17)$$

или

$$R(t) = R_0 \exp[(T(t) - T_0)/3T_w]. \quad (17a)$$

Подставляя (17) в (6) и разделяя переменные, получаем

$$\int_{R_0}^R \frac{dR}{k[T(R)]v} = t. \quad (18)$$

Пренебрегая для $k(T)$ слабой температурной зависимостью предэкспоненциального множителя, получим

$$t = \frac{R_0 e^{-a_0}}{b_0 k(T_0) v_0} \int \exp\left(-\frac{\lambda}{b_0} + \frac{a_0}{1-\lambda}\right) d\lambda, \quad (19)$$

где введены безразмерные параметры

$$\lambda = b_0 \ln R_0/R, \quad a_0 = h_w/k_B T_0, \quad (20)$$

$$b_0 = 3T_w/T_0.$$

Интеграл (19) дает точное решение задачи об адиабатическом испарении капли при сделанных выше предположениях. Значение температуры капли при заданном значении времени (или радиуса) определяется очевидной формулой с учетом (17):

$$T = T_0(1 - \lambda). \quad (21)$$

Подставляя значение верхнего предела интеграла (19), полученное из соотношения (21), получаем зависимость температуры капли от времени.

При $T \sim T_0$ ($\lambda \ll 1$) в показателе экспоненты (19) второе слагаемое можно разложить в ряд по степеням λ и, удержав только линейные члены, получим

$$T = T_0 - \frac{3T_w}{a_0 b_0 - 1} \ln[1 + (a_0 b_0 - 1)t/\tau_1]. \quad (22)$$

Сравнивая с (17), получаем для радиуса капли:

$$R = R_0 [1 + (a_0 b_0 - 1)t/\tau_1]^{-1/(a_0 b_0 - 1)}, \quad (23)$$

где мы ввели в соответствии с (7) время изотермического испарения капли при начальной температуре:

$$\tau_1 = \frac{R_0}{k(T_0)v}. \quad (24)$$

При заданных значениях параметров капли (начальный радиус 35 Å и стартовая температура 310 К) имеем для параметров (20): $a_0 \sim 17,42$ и $b_0 \sim 5,8$. Время изотермического испарения (24) согласно (9) составляет около 1522 нс и линейно зависит от начального радиуса капли.

Кинетика изменения температуры рассматриваемой капли определяется интегралом (t выражено в нс):

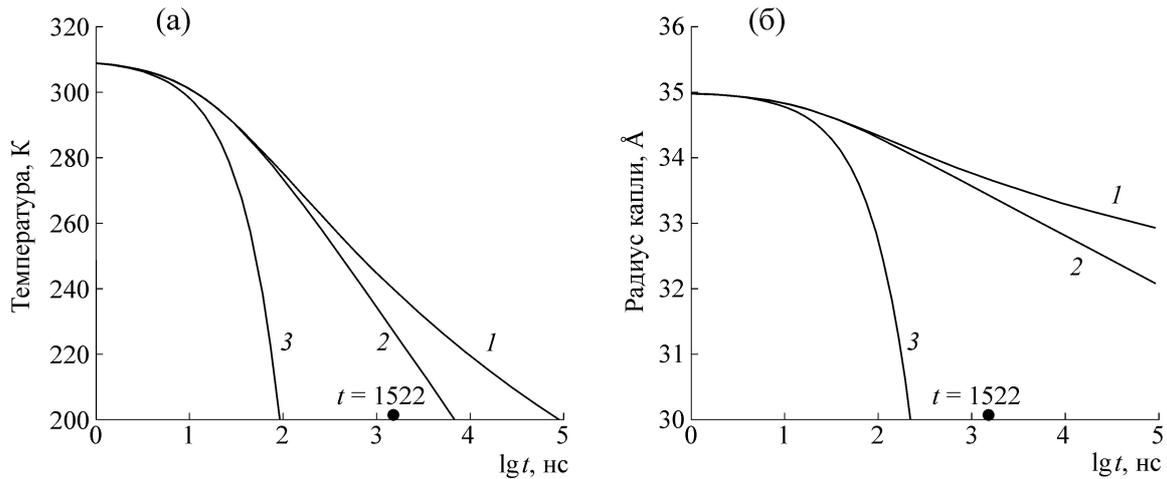


Рис. 4. Зависимости температуры (а) и радиуса рассматриваемой капли (б) от времени при адиабатическом испарении: 1 – точное решение (25), 2 – асимптотики (26) и (27), 3 – линейные аппроксимации асимптотик. Зависимость 3 для $R(t)$ также соответствует линейному изменению радиуса капли при изотермическом испарении. На оси времени отмечено 1522 нс, соответствующее времени полного испарения рассматриваемой капли при изотермических условиях в абсолютно сухой среде.

$$t = 7 \cdot 10^{-6} \int_0^{1-T/310} \exp\left(-0,172\lambda + \frac{17,42}{1-\lambda}\right) d\lambda. \quad (25)$$

Если T не сильно отличается от начальной температуры, то можно использовать асимптотику (22):

$$T(t) \sim 310 - 17,97 \ln(1 + 0,0657t) \sim 310 - 1,18t, \text{ К} \quad (26)$$

Напомним, что время выражается в наносекундах. На начальном участке испарения ($0,0657t \ll 1$) скорость охлаждения капли, содержащей 6249 молекул воды, составляет около 1,2 К/нс и согласно проведенной выше оценке в капле успевает установиться подобие теплового равновесия. Согласно (23) получаем для R :

$$R(t) \sim 35(1 + 0,0657t)^{-0,01} \sim 35(1 - 0,657 \cdot 10^{-3}t), \text{ \AA} \quad (27)$$

Из формул видно также, что скорость охлаждения капли при адиабатическом испарении уменьшится в два раза через 15 нс, в три раза через 30 нс и т.д. Необходимо напомнить, что при больших временах эти аппроксимации не работают в силу ограничений (16) и $T > 0$.

На рис. 4 приведены графики решения для температуры, радиуса и аппроксимаций (26) и (27).

В переходной области, интересной с точки зрения проведения экспериментов на рентгеновском лазере, $t \sim 10^3 - 10^4$ нс, и для температуры капли получаем оценки в диапазоне 250–230 К. Радиус капли при этом уменьшится всего на ~5%. (Заметим, что охлаждение до 100 К

согласно (25) займет время порядка 30 млрд лет, что больше времени жизни Вселенной. Размер капли при этом уменьшится практически до значения, близкого к предельному, определяемого формулой (16), т.е. на ~15%. Отметим также, что на таких временных масштабах необходимо учитывать квантовые поправки.)

Из уравнения (23) видно также, что есть два режима охлаждения капли при адиабатическом испарении. На начальном этапе, на временах нескольких десятков нс, идет охлаждение капли практически с начальной скоростью порядка 1,2 К/нс, определенной выше. Далее, в районе 300–280 К (10–100 нс) скорость испарения начинает замедляться так же, как и температура охлаждения капли, и кинетика имеет логарифмический характер. На временах свыше 1000 нс расхождение между точной формулой (25) и асимптотикой становится более 5 К (рис. 4).

Особо отметим, что единственным параметром, зависящим от начального размера капли в формуле (22), является параметр времени изотермического испарения (24). Так, увеличение размера капли в 10 раз приведет к растяжению процесса охлаждения во времени также в 10 раз. Аналогично и для относительного изменения радиуса капли согласно формуле (23). Однако при этом характерное время установления теплового равновесия (10) возрастет в 100 раз. Поэтому для крупных капель с радиусом более 10 нм следует ожидать более сложной кинетики испарения (охлаждения), которая будет связана с опережающей заморозкой поверхностных слоев. Решение этой задачи потребует

сопряжения уравнений испарения и уравнения теплопроводности. Качественно этот эффект приведет к тому, что параметр времени (24) будет все более плавно зависеть от размера при увеличении радиуса капли. С точки зрения стабилизации температуры белкового ядра капли можно было бы рассмотреть также гипотетический вариант резкого увеличения толщины гидратной оболочки (примерно в 1000 раз). Глубина проникновения температурных изменений за счет теплопроводности, согласно выражению (10), за время подлета 30 мкс составит порядка 2 мкм. Сложность заключается в приготовлении капель микронных размеров, но содержащих одну молекулу белка.

Таким образом, при инъекции микрокапель комнатной температуры в вакуумную измерительную камеру следует ожидать, что основным эффектом является охлаждение капли. На масштабе времен порядка 10 мкс (времен подлета к зоне измерений) охлаждение капли происходит на величины порядка 50–100 К. Испарившаяся доля воды составит порядка 5%. Это приведет также к некоторому увеличению ионной силы окружающего белок раствора в той же пропорции. Температурные эффекты могут существенно сказаться на параметрах конформационной динамики белка и, возможно, на структуре макромолекулярных комплексов. Рассматриваемые эффекты необходимо учитывать при планировании экспериментов по изучению структуры и динамики единичных молекулярных объектов с использованием рентгеновских лазеров на свободных электронах и тщательно просчитывать изменения термодинамических характеристик капель в ходе эксперимента. Для стабилизации этих характеристик, возможно, необходимо разрабатывать специальные инструменты и методы. Использование изотермических условий делает ситуацию более прогнозируемой, но здесь могут возникнуть дополнительные сложности, связанные с организацией эффективного теплообмена и более быстрым испарением капли с сопутствующим резким увеличением ионной силы среды. Альтернативой является использование камер с насыщающим давлением паров воды. Использование нанокapпель с размером до 10 нм делает расчет температурных эффектов вполне предсказуемым. Использование капель микронных и субмикронных размеров при адиабатическом испарении приводит, по-видимому, к нестационарному полю градиента температур в области нахождения макромолекулы и к пока малоизу-

ченным структурным и динамическим эффектам.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки РФ (молекулярное моделирование, соглашение № 14.616.21.0003) и Российского фонда фундаментальных исследований (аналитические решения, грант № 15-29-04856).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. M. M. Waldrop, *Nature* **505**, 605 (2014).
2. J. Hajdu, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **10**, 569 (2000).
3. H. N. Chapman, P. Fromme, A. Barty, et al., *Nature* **470**, 73 (2011).
4. К. В. Шайтан, М. П. Кирпичников, В. С. Ламзин, и др., *Вестн. РФФИ*, № 4 (80), 38 (2013).
5. U. Weierstall, J. C. H. Spence, and R. B. Doak, *Rev. Sci. Instr.* **83**, 035108 (2012).
6. R. Fung, V. Shneerson, D. K. Saldin, et al., *Nature Physics* **5**, 64 (2009).
7. A. Barty, J. Kupper, and H. N. Chapman, *Ann. Rev. Phys. Chem.* **64**, 415 (2013).
8. О. Кнаке и И. Н. Странский, *Успехи физ. наук* **68** (2), 261 (1959).
9. А. В. Козырев и А. Г. Ситников, *Успехи физ. наук* **171** (7), 765 (2001).
10. Н. А. Фукс, *Испарение и рост капель в газообразной среде* (Изд-во АН СССР, М., 1958).
11. I. W. Eames, N. J. Marr, and H. Sabir, *Int. J. Heat and Mass Transfer.* **40**, 2963 (1997).
12. R. Marek and J. Straub, *Int. J. Heat and Mass Transfer.* **44**, 39 (2001).
13. А. Б. Рубин, *Биофизика. Т. 1: Теоретическая биофизика* (Институт компьютерных исследований, М. – Ижевск, 2013).
14. Н. Б. Варгафтик, *Справочник по теплофизическим свойствам газов и жидкостей* (Наука, М., 1972).
15. Я. И. Френкель, *Кинетическая теория жидкостей* (Наука, Ленинград, 1975).
16. С. Глестон, К. Лейдлер и Г. Эйринг, *Теория абсолютных скоростей реакций* (Гос. изд-во иностр. литературы, М., 1948).
17. J. C. Phillips, G. Zheng, S. Kumar, and L.V. Kale, in: *ACM/IEEE 2002 Conference*, (2002) p. 36.
18. W. Humphrey, A. Dalke, and K. Schulten. *J. Mol. Graph.* **14**, 33 (1996).
19. J. D. Hunter, *Comput. Sci. Eng.* **9**, 90 (2007).
20. J. Huang and A. D. MacKerell, Jr., *J. Comp. Chem.* **34**, 2135 (2013).
21. I. L. Kanev, N. K. Balabaev, A. V. Glyakina, et al., *J. Phys. Chem. B.* **116**, 5872 (2012).
22. Г. М. Мревлишвили, *Успехи физ. наук* **128** (2), 273 (1979).

Dynamics of Irreversible Evaporation of a Water-Protein Droplet and a Problem of Structural and Dynamical Experiments with Single Molecules

K.V. Shaitan, G.A. Armeev, and A.K. Shaytan

Lomonosov Moscow State University, Leninskie Gory 1/12, Moscow, 119991 Russia

We discuss the effect of isothermal and adiabatic evaporation of water on the state of a water-protein droplet. The discussed problem is of current importance due to development of techniques to perform single molecule experiments using free electron lasers. In such structure-dynamic experiments the delivery of a sample into the X-ray beam is performed using the microdroplet injector. The time between the injection and delivery is in the order of microseconds. In this paper we developed a specialized variant of all-atom molecular dynamics simulations for the study of irreversible isothermal evaporation of the droplet. Using *in silico* experiments we determined the parameters of isothermal evaporation of the water-protein droplet with the sodium and chloride ions in the concentration range of 0.3 M at different temperatures. The energy of irreversible evaporation determined from *in silico* experiments at the initial stages of evaporation virtually coincides with the specific heat of evaporation for water. For the kinetics of irreversible adiabatic evaporation an exact analytical solution was obtained in the limit of high thermal conductivity of the droplet (or up to the droplet size of ~ 100 Å). This analytical solution incorporates parameters that are determined using *in silico* experiments on isothermal droplet evaporation. We show that the kinetics of adiabatic evaporation and cooling of the droplet scales with the droplet size. Our estimates of the water-protein droplet freezing rate in the adiabatic regime in a vacuum chamber show that additional techniques for stabilizing the temperature inside the droplet should be used in order to study the conformational transitions of the protein in single molecules. Isothermal and quasi-isothermal conditions are most suitable for studying the conformational transitions upon object functioning. However, in this case it is necessary to take into account the effects of dehydration and rapid increase of ionic strength in an aqueous microenvironment surrounding the protein.

Key words: molecular dynamics, droplet evaporation, water-protein systems, single molecule experiments, X-ray free electron lasers