

## Применение наноалмазов для разделения и очистки белков

© В.С. Бондарь, И.О. Позднякова, А.П. Пузырь

Институт биофизики Сибирского отделения Российской академии наук,  
660036 Красноярск, Россия

E-mail: bondvs@mail.ru

Сообщается об использовании детонационных наноалмазов для выделения рекомбинантного апообелина и рекомбинантной люциферазы из бактериальных клеток *E. coli*. Применение наноалмазов упрощает процедуры очистки белков, сокращает время их выделения до 30–40 минут, исключает из процесса специализированное хроматографическое оборудование, позволяет получить высокоочищенные препараты апообелина и люциферазы с выходом белков 35–45 и 45–60% соответственно. Рассматриваются возможные механизмы взаимодействия белковых молекул с частицами наноалмазов.

Детонационные наноалмазы (НА) [1] представля- ют несомненный интерес для специалистов, работаю- щих в области биохимии. Это обусловлено физико- химическими свойствами НА: высокоразвитой поверх- ностью частиц (270–280 м<sup>2</sup>/г), большим количеством поверхностных ионогенных групп (карбокисильные, кар- бонильные, гидроксильные, эфирные), углеводородных фрагментов и микропримесей металлов [2,3], позволяю- щими рассматривать НА как новый сорбент, пригодный для разделения и очистки белков.

Настоящая работа посвящена использованию НА для выделения рекомбинантного Са<sup>2+</sup>-активируемого фото- протеина апообелина и рекомбинантной люциферазы из бактериальных клеток *Escherichia coli*.

### 1. Объекты исследований

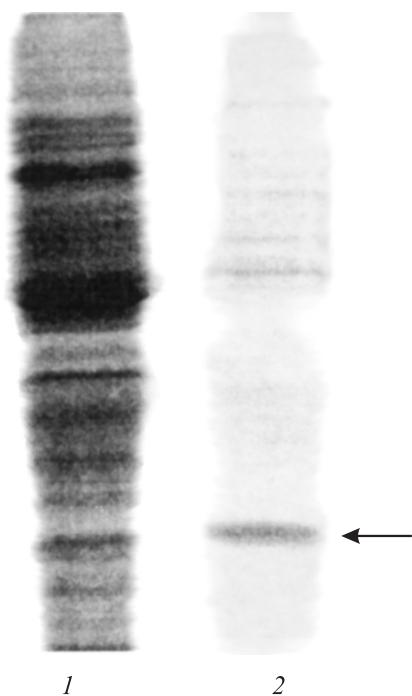
Использованы НА, синтезированные в Отделе физики высокодисперсных материалов Красноярского научного центра [3].

Выбор белков определялся тем, что они принадлежат к разным видам люминесцентных систем, имеют значи- тельные различия в структурно-функциональной орга- низации молекул, общепринятые методы их выделения содержат существенные отличия. Са<sup>2+</sup>-активируемые фотопротеины — светоизлучающие EF-белки, которые присутствуют в морских кишечнорастных организмах и генерируют кванты видимого света при взаимодей- ствии с ионами кальция [4]. Они представляют собой стабильные фермент-субстратные комплексы, состоящие из небольшой односубъединичной молекулы апобелка (около 20 kDa), субстрата (целентеразин) и кислорода. Люциферазы — светоизлучающие белки, присутствую- щие в морских светящихся бактериях. Эти белки явля- ются гетеродимерами (состоят из  $\alpha$ - и  $\beta$ -субъединиц), имеют молекулярную массу около 80 kDa, содержат в своей структуре флавины в качестве кофактора [5]. Гены апообелина и люциферазы были клонированы и экспрес- сированы в клетках *E. coli*, что позволило получить штаммы-продуценты этих белков [6,7]. Фотопротеины и люциферазы активно используют как светоизлучающие индикаторы в биoluminesцентном анализе [5,8].

При экспрессии некоторых генов в клетках *E. coli* синтезируемые ими рекомбинантные белки накаплива- ются в виде нерастворимых агрегатов, так называемых „телец включения“ [9]. На данном свойстве основано выделение этих белков, в том числе апофотопротеи- нов [10,11]. Общепринятая схема очистки состоит из выделения фракции телец включения после разрушения клеток (например, ультразвуком или френч-прессом), экстракции из нее рекомбинантного белка высокими концентрациями денатурирующего хаотропного агента (мочевина, гуанидин-HCl), хроматографической очистки и рефолдинга белка после удаления хаотропного агента. Очистка рекомбинантного апообелина по такой схеме занимает не менее двух суток [6,11]. В то же время многие рекомбинантные белки, например, люциферазы могут накапливаться в цитозольной фракции синтези- рующих клеток без образования телец включения [7]. Люциферазы имеют более сложную структурную ор- ганизацию, чем фотопротеины, и более чувствительны к различным повреждающим факторам, например, хао- тропным агентам и ионам тяжелых металлов, поэтому в методах их выделения учитываются эти особенности. Очистку люциферазы проводят без денатурирующих агентов по схеме, включающей несколько хроматогра- фических стадий [5] и занимающей не менее двух-трех суток.

### 2. Результаты и обсуждение

Выделение апообелина с помощью НА выполнялось по следующей схеме. Клеточные белки экстрагировались из биомассы в течение 1 часа хаотропным агентом (6М мочевина), а клеточный дебрис удалялся центрифугированием. В супернатанте ресуспендировались частицы НА, которые собирались с помощью центрифугирования. Осадок частиц с адсорбированными белками, в том числе апообелином, дважды промывался буфером для удаления несорбированных балластных белков. Апо- обелин десорбировался с поверхности частиц буфером, содержащим SH-реагент (дитиотреитол) в концентрации 10 mM. Полученный по данной технологии препарат



**Рис. 1.** Электрофореграмма образцов рекомбинантного апообелина на этапах его выделения из бактериальных клеток *E. coli* с применением частиц НА. На треках: 1 — исходный экстракт, 2 — конечный препарат. Стрелкой показано положение апообелина.

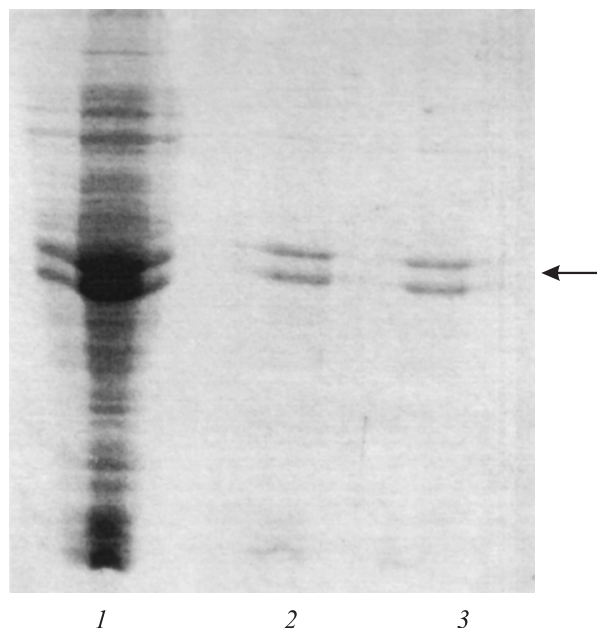
апообелина имеет высокую степень чистоты (рис. 1), выход апобелка составляет не менее 35–45%.

Схема очистки люциферазы включала следующие стадии. Биомасса разрушалась в воде ультразвуком, клеточный дебрис удалялся центрифугированием. В супернатант добавлялись НА и после перемешивания частицы собирались центрифугированием. Осадок дважды промывался для удаления неадсорбированных балластных белков. Люцифераза десорбировалась с поверхности частиц 20 мМ десорбирующим буфером. Конечный препарат белка по данным электрофореза (рис. 2) имеет высокую степень чистоты, а его выход составляет 45–60%.

Необходимо отметить высокую экспрессность технологии очистки белков с помощью НА. После получения исходных экстрактов вся процедура выделения занимает не более 30–40 минут. Вероятно, данную технологию правильнее расценивать, как адсорбционно-десорбционную хроматографию в объеме. Тем не менее она позволяет значительно упростить процедуру выделения белков, сократить временные затраты и исключить из схемы очистки специализированное хроматографическое оборудование. Преимуществом применения НА является то, что одновременно с эффективным выделением белка можно осуществить его концентрирование, поскольку десорбция белка может проводиться очень малыми объемами элюента. Например, из клеток с очень низкой продукцией апообелина (30–300  $\mu\text{g}$  в 1 г

биомассы) за 30–40 минут удается получить концентрированный практически гомогенный препарат этого белка с выходом 40–50%. В условиях колоночной хроматографии такой прием невозможен, поскольку вещества из колонки вымываются объемом элюента, определяемым параметрами удерживания колонки и массопереносом веществ. Следует также отметить, что применение НА позволяет полностью отделить люциферазу от эндогенной бактериальной НАДН:ФМН-оксидоредуктазы. Это весьма существенно, так как загрязнение оксидоредуктазой, участвующей в работе люминесцентной биферментной системы [5], снижает качество препарата люциферазы при его аналитических применениях.

Данные, полученные при очистке апообелина и люциферазы с помощью НА, позволили развить представления о возможных механизмах взаимодействия белковых молекул с поверхностью частиц. Элюция апообелина под действием SH-реакта, а также исследования с применением обработки поверхности наночастиц избирательным блокатором SH-групп (ДТНБ) и хелатором двухвалентных ионов (ЭДТА) показали, что белковые молекулы могут взаимодействовать с НА как посредством образования S-S-мостиков (около 10% молекул), так и образования координационных связей (около 40% молекул). Оставшиеся 50% молекул белка, вероятно, связываются с частицами НА по иным механизмам. Например, вполне вероятен механизм многоточечного взаимодействия белковых молекул с разными функци-



**Рис. 2.** Электрофореграмма образцов рекомбинантной люциферазы на этапах ее очистки из биомассы бактериальных клеток *E. coli* с применением частиц НА. На треках: 1 — исходный экстракт, 2, 3 — финальные препараты люциферазы, полученные при последовательной десорбции фермента с поверхности наночастиц элюирующим буфером. Стрелкой отмечено положение  $\alpha$ - и  $\beta$ -субъединиц люциферазы.

ональными группами поверхности частиц. Возможны, очевидно, ионные, гидрофобные, ковалентные (исключая S–S-связи) взаимодействия или их возможные комбинации. В пользу этого обстоятельства свидетельствует то, что повторная обработка или повышение концентрации SH-реагента не вызывает увеличения выхода апообелина на стадии элюции, а десорбция люциферазы эффективно осуществляется простым повышением молярности буфера. Наличие разных механизмов взаимодействия белков с частицами, очевидно, следует расценивать, скорее, как преимущество, позволяющее рассматривать НА как сорбент с универсальными свойствами, на котором можно проводить разные типы хроматографий.

В приведенных выше примерах очистка белков с помощью НА осуществлялась в объеме. В то же время не менее перспективным представляется применение НА в качестве нового материала для колоночной хроматографии. В результате проведенных исследований на основе НА был создан сорбент, позволяющий проводить колоночную хроматографию обычного давления. Его пригодность для адсорбции-десорбции белковых молекул была показана на примере цитохрома С.

## Список литературы

- [1] А.М. Ставер, Н.В. Губарева, А.И. Лямкин, Е.А. Петров. Физика горения и взрыва **20**, 3, 100 (1984).
- [2] Г.А. Чиганова. Коллоид. журн. **56**, 2, 266 (1994).
- [3] Г.А. Чиганова, С.А. Чиганов. Неорган. материалы **35**, 5, 581 (1999).
- [4] J.R. Blinks, F.G. Prendergast, D.G. Allen. Pharmacol. Rev. **28**, 1 (1976).
- [5] И.И. Гительзон, Э.К. Родичева, С.И. Медведева, Г.А. Примакова, С.И. Барцев, Г.А. Кратасюк, В.Н. Петушков, В.В. Межевикин, Е.С. Высоцкий, В.В. Заворуев, В.А. Кратасюк. Светящиеся бактерии. Наука, Новосибирск (1984), 278 с.
- [6] B.A. Illarionov, L.A. Frank, V.A. Illarionova, V.S. Bondar, E.S. Vysotski, J.R. Blinks. Meth. Enzymol. **305**, 223 (2000).
- [7] Б.А. Илларионов, Н.А. Тюлькова. Патент РФ № 2073714, C12N1/21 (1997).
- [8] J.R. Blinks, W.G. Wier, P. Hess, F.G. Prendergast. Prog. Biophys. Molec. Boil. **40**, 1 (1982).
- [9] R.C. Hockney. Trends in Biotechnology **12**, 456 (1994).
- [10] N.L. Stults, N.F. Stocks, H. Rivera, J. Gray, R.O. McCann, D. O’Kane, R.D. Cummings, M.J. Cormier, D.F. Smith. Biochemistry **31**, 1433 (1992).
- [11] V.S. Bondar, A.G. Sergeev, B.A. Illarionov, J. Vervoort, W.R. Hagen. Biochim. Biophys. Acta **1231**, 29 (1995).