

Использование диоксида кремния для очистки рекомбинантных белков

Е.М.Мазурина, П.Х.Копылов, С.В.Дентовская

ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора, Оболенск, Московская область, Российская Федерация

Сконструировали и очистили Ni-хелатной хроматографией модельные белки mCherry-L2-His₆ и EGFP-L2-His₆ содержащие Si-метки как инструмент работы с различными видами частиц диоксида кремния, отличающимися удельными поверхностями, размерами и физико-химической природой. Изучили особенности специфического взаимодействия частиц диоксида кремния «Silica», «Силохром», «CPG-10» с модельными белками. Провели выделение модельных белков порционной хроматографией на основе полученных результатов.

Ключевые слова: рекомбинантные белки mCherry-L2-His₆ и EGFP-L2-His₆, конструирование, аффинная хроматография, диоксид кремния, рибосомальный белок L2, порционная хроматография

Для цитирования: Мазурина Е.М., Копылов П.Х., Дентовская С.В. Использование диоксида кремния для очистки рекомбинантных белков. Бактериология. 2023; 8(1): 43–50. DOI: 10.20953/2500-1027-2023-1-43-50

Affinity tags for recombinant protein purification

E.M.Mazurina, P.Kh.Kopylov, S.V.Dentovskaya

State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзор, Obolensk, Moscow Region, Russian Federation

Model proteins mCherry-L2-His₆ and EGFP-L2-His₆ containing Si-tags were constructed and purified by Ni-chelate chromatography as a tool for working with various types of silica particles differing in specific surface area, particle size, and physicochemical nature. We studied the features of the specific interaction of particles of silicon dioxide «Silica», «Silochrome», «CPG-10» with model proteins. The model proteins were isolated by batch chromatography based on the results obtained.

Key words: recombinant proteins mCherry-L2-His₆ and EGFP-L2-His₆, construction, affinity chromatography, silicon dioxide, ribosomal protein L2, batch chromatography

For citation: Mazurina E.M., Kopylov P.Kh., Dentovskaya S.V. Affinity tags for recombinant protein purification. Bacteriology. 2023; 8(1): 43–50. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2023-1-43-50

Аффинные метки являются высокоэффективными инструментами для очистки рекомбинантных белков, позволяющими выделить практически любой из них, точно следуя инструкциям производителя. Различные белки, домены и пептиды используются в качестве аффинных меток для реализации специфического белок-доменного сродства, реализуемого в окружении обилия посторонних компонентов клеточных лизатов [1–4].

Популярность гексагистидиновой метки (His₆-tag) обусловлена ее специфическим сродством к иммобилизованным ионам переходных металлов (например, Ni²⁺, Zn²⁺, Mn²⁺, Fe²⁺, Co²⁺ и Cu²⁺) за счет образования координационных связей [5, 6]. В качестве специфического конкурента этого

сродства выступает имидазол, который в относительно высоких концентрациях (50–600 мМ) вытесняет His₆-метку. Важным преимуществом этого метода является то, что координационные связи устойчивы в растворах солей с высокой ионной силой (2 М NaCl), а также в денатурирующих условиях (8 М мочевины). Например, глутатион-S-трансфераза и белок, связывающий мальтозу, также являются аффинными метками, но не могут использоваться в денатурирующих условиях [7, 8]. К недостаткам металлохелатного метода относится его умеренное сродство ко всем низкоаффинным гистидин-содержащим белкам клеточных лизатов, связывающимся с хелатирующей смолой. Поэтому рекомбинантные белки с низким уровнем экспрессии конкурируют с ними за

Для корреспонденции:

Мазурина Елизавета Михайловна, младший научный сотрудник лаборатории микробиологии чумы отдела особо опасных инфекций ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Адрес: 142279, Московская область, г.о. Серпухов, р.п. Оболенск, Территория «Квартал А», 24
Телефон: (4967) 36-0117

Статья поступила 14.02.2023, принята к печати 28.04.2023

For correspondence:

Elizaveta M. Mazurina, Junior Researcher of Laboratory for Plague Microbiology, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзор

Address: 24 "Quarter A" Territory, 142279, Obolensk, City District Serpukhov, Moscow Region, Russian Federation
Phone: (4967) 36-0117

The article was received 14.02.2023, accepted for publication 28.04.2023

центры связывания и выделяются сильно контаминированные примесями. Практическое применение хелатирующих хроматографических носителей ограничивается не только высокой стоимостью и законодательными ограничениями их поставок, но и высокими требованиями к чистоте полученных протеинов, которые не должны нести His₆-метку [9–11]. Удаление метки и последующие этапы очистки могут существенно увеличить себестоимость конечного продукта.

Вышесказанное побуждает к постоянному поиску простых и технологичных решений. Так, недавно было показано, что белок L2 большой субъединицы рибосомы *Escherichia coli* способен прочно связываться с диоксидом кремния и его производными, несущими силанольные группы, не требуя химической модификации, предварительной обработки или каких-либо особых условий. Белки, слитые с L2, связываются с поверхностью кремнезема даже в присутствии высоких концентраций соли и детергентов. Данный тип метки, использующий рибосомальный белок L2 для иммобилизации слитых функциональных белков на поверхности кремнезема, обозначили как «Si-метка» [12]. Si-метка может быть функционально слита с любым концом целевого белка. Si-метка может являться полезной слитой меткой для ориентированной иммобилизации функциональных белков, которая обеспечивает хорошую стерическую доступность их активных центров для молекул-мишеней в растворе и усиливает взаимодействие между иммобилизованными белками и молекулами-мишенями [13]. При этом актуальными становятся вопросы, связанные с изучением взаимодействия Si-метки в составе определенных рекомбинантных белков с некоторыми доступными формами диоксида кремния.

Настоящее исследование опиралось на результаты предшествующих работ [14], демонстрирующих сильное сродство Si-метки модельных белков, содержащих в составе L2 (L2 (1–60, 203–273) и L2 (203–273)), к кремнезему, позволяющее использовать одноэтапный метод очистки.

Авторы использовали немодифицированные частицы чистого кремнезема в качестве специфического адсорбента, раствор MgCl₂ высокой концентрации в качестве элюирующего буфера и слитый белок, состоящий из Si-метки и иммуноглобулин-связывающего стафилококкового белка А, что обеспечило его быструю и экономичную очистку [11, 14].

Мы, в свою очередь сконструировали модельные белки mCherry-L2-His₆ и EGFP-L2-His₆, содержащие Si-метки как

инструмент работы с различными видами частиц диоксида кремния. В нашем исследовании использовали различные формы частиц диоксида кремния, отличающиеся как удельными поверхностями, так и размерами частиц, и их физико-химической природой. Кроме того, одна из форм частиц диоксида кремния, «CPG-10», представляла собой аморфное состояние вещества, «Silica» и «Силохром» – кристаллическое. Поэтому перед нами стояла задача изучения особенностей специфического взаимодействия частиц «Silica», «Силохром», «CPG-10» с этими белками, что расширит наше понимание этих процессов.

Целью исследования – создание молекулярно-генетических конструкций и получение рекомбинантных белков, несущих в своей структуре silica-связывающий домен, как инструмент работы с различными видами частиц диоксида кремния.

Материалы и методы

Материалы

Использовали частицы диоксида кремния препаратов «Silica» («Хеликон», Россия), «Силохром» («ХромЛаб», Россия) и «CPG-10» (SERVA, Германия).

Штаммы микроорганизмов и условия культивирования

Штаммы бактерий и плазмиды, использованные в работе, представлены в табл. 1.

Штаммы *E. coli* выращивали в жидкой или на агаризованной среде LB (Luria Bertani broth medium – триптон 10 г/л, дрожжевой экстракт 5 г/л, NaCl 10 г/л), pH 7,2 [15], добавляя при необходимости ампициллин до концентрации 100 мкг/мл. Синтез белков индуцировали путем добавления изопропил-β-D-1-тиогаляктопиранозида (ИПТГ) до конечной концентрации 0,5 мМ при достижении культурами ОП₅₉₀ 6,3 ед (ОП₅₉₀ – оптическая плотность при длине волны 590 нм), культивирование после добавления ИПТГ продолжали еще 4 ч.

Праймеры, использованные в работе, представлены в табл. 2. Расчет праймеров для конструирования плазмид и анализ свойств белков проводили с использованием программы Vector NTI 10.0.1 (Invitrogen, США).

Таблица 1. Характеристика использованных в работе штаммов микроорганизмов и плазмид

Штамм или плазида	Генотип или соответствующая характеристика	Источник
<i>E. coli</i> DH5α	F ⁻ , gyrA96(Nal ^r), recA1, relA1, endA1, thi1, hsdR17(rk ⁻ , mk ⁺), glnV44, deoR, Δ(lacZYA-argF)U169, [φ80dΔ(lacZ)M15], supE44	Invitrogen
<i>E. coli</i> BL21(DE3)	F–ompT hsd SB (rB– mB–) gal dcm (DE3)	Novagene, Madison, WI
pEGFP-N1	Источник гена egfp	
pET-MBP-mCherry-LIC	Источник гена mcherry	New England Biolabs
pET32b (+)	Производное pBR322, f1, содержит T7 промотор, T7 терминатор, полилинкер, lacI, bla, Trx-Tag, His-таг и Si-таг домены. Экспрессирующий вектор	Novagene, Madison, WI
pET32b-L2(201-273)-Xho	Производное pET32b (+)	НИ
pET32b-EGFP-L2(201-273)-Xho	Производное pET32b (+)	НИ
pET32b-mCherry-L2(201-273)-Xho	Производное pET32b (+)	НИ

*НИ – настоящее исследование.

Конструирование плазмид

Для получения плазмиды pET32b-L2(201-273)-Xho фрагмент гена белка L2 большой субъединицы рибосомы *E. coli* (аминокислотные остатки 201-273) амплифицировали с использованием праймеров L2-Xho201/L2-Sal273-N и хромосомной ДНК штамма *E. coli* DH5 α в качестве матрицы, обрабатывали рестриктазами XhoI/SalI и лигировали с плазмидой pET32b (+)/XhoI-FastAP в течение ночи при температуре +11°C. Лигатом трансформировали клетки *E. coli* DH5 α . Наличие вставки L2(201-273) в нужной ориентации в трансформантах, отобранных на LB агаре с ампициллином, анализировали в полимеразной цепной реакции (ПЦР) с парой праймеров L2-Xho201/pEY-6.

Гены зеленого и красного флуоресцентных белков EGFP и mCherry амплифицировали с использованием праймеров EGFP-NdeI/EGFP-N-Sal или Nde-Cher/Cher-N-Sal на матрицах плазмид pEGFP-N1 или pET-MBP-mCherry-LIC соответственно. Полученные ампликоны обрабатывали рестриктазами NdeI/SalI и лигировали с плазмидой pET32b-L2(201-273)-Xho/NdeI-SalI-FastAP. Лигатом трансформировали клетки *E. coli* DH5 α . Клоны анализировали на наличие вставки в ПЦР с парами праймеров EGFP-NdeI/EGFP-N-Sal и Nde-Cher/Cher-N-Sal для EGFP и mCherry соответственно. На всех этапах правильность сборки плазмид подтверждали в рестрикционном анализе и путем секвенирования вставок с использованием праймеров T7dir и T7rev.

Полученные штаммы *E. coli* BL21(DE3)/pET32b-EGFP-L2(201-273)-Xho и BL21(DE3)/pET32b-mCherry-L2(201-273)-Xho использовали для продукции белков EGFP-L2(201-273)-His₆ и mCherry-L2(201-273)-His₆ соответственно.

Экспрессия рекомбинантных белков

После определения клонов с предполагаемой индукцией биосинтеза белков выращенную биомассу из 5 л культуры микробных клеток *E. coli* BL21(DE3)/pET32b-mCherry-L2 и *E. coli* BL21(DE3)/pET32b-EGFP-L2 отделяли центрифугированием, осадки замораживали и хранили при -20°C. Клеточную локализацию целевых белков анализировали электрофорезом проб, приготовленных из аликвот биомассы с 5×10^8 КОЕ/мл. Материал для колоночной хроматографии готовили разрушением ультразвуком и центрифугированием клеточных лизатов, содержащих белки mCherry-L2-His₆ и EGFP-L2-His₆.

Очистка белков с помощью Ni-хелатной аффинной хроматографии

Целевые белки выделяли как из осветленных центрифугированием лизатов клеток *E. coli*, так и из растворенных в 8 М мочевины телец включения на колонке XK-26 (Cytiva, ЕС), упакованной 25 мл Ni²⁺-TSK AF-Chelate Toyopearl 650 M (Tosoh, Япония), предварительно уравновешенной основным буферным раствором (10 мМ трис, pH 8,0, 5 мМ имидазола и 500 мМ NaCl). Состав буферных растворов и параметры хроматографии определяли с учетом рекомендаций производителя для денатурированных мочевиной белков. Состав элюированных фракций анализировали при помощи ДСН-ПААГ, после чего выбранные фракции объединяли и диализовали против буферного раствора (5 мМ трис, pH 6,8, 500 мМ NaCl) и центрифугировали в течение 15 мин при

Таблица 2. Праймеры, использованные для конструирования плазмид

Праймер	Последовательность (5'-3')
EGFP-NdeI	ATCATA [*] CATATGGTGAGCAAGGGCGAGG
EGFP-N-Sal	CCTGTCGACCTTTGTACAGCTCGTCCATGC
Nde-Cher	CACCTACATATGAGCAAGGGCGAGGAGGATAAC
Cher-N-Sal	TTTGTGCGACCTTTGTACAGCTCGTCCATGC
L2-Xho201	CCTCTCGAGCTGCGCGTTCTGGGTTAAAGC
L2-Sal273-N	CCTGTCGACTTTGCTACGGCGACGTACGATG
pEY-6	TCAGTGGTGGTGGTGGTGGTG
T7dir	TAATACGACTCACTATAGGG
T7rev	ATGCTAGTTATTGCTCAG

* сайты связывания эндонуклеаз рестрикции подчеркнуты.

16 000 g и при температуре 12°C. Надосадочные фракции стерильно фильтровали через полиэфирсульфоновую мембрану (Whatman, США) с диаметром пор 0,2 мкм и хранили при температуре 4°C в течение опытов по изучению свойств частиц диоксида кремния. Буферы для работы с белком EGFP-L2-His₆, дополняли включением 0,4% N-лауроилсаркозина для сохранения его растворимости.

Адсорбция белков на частицах диоксида кремния

Насыщающие концентрации белков mCherry-L2-His₆ и EGFP-L2-His₆ в отношении различных частиц диоксида кремния определяли в течение их двухчасовой инкубации при комнатной температуре. Для подавления неспецифического связывания в связывающие буферные растворы добавляли детергенты – 0,4% N-лауроилсаркозин или твин-20. Оптимальные значения pH для связывания белков и диоксида кремния определяли по времени инкубации в буферной системе, представленной 50 мМ цитрат-фосфатным буфером в широком интервале pH: 5,0, 6,0 и 7,0, а также 50 мМ трис-буфером, pH 6,8. Отбор проб объемом 0,18 мл из общего реактора содержащего 1,8 мл реакционной смеси, производили в интервале времени от 50 с, в момент введения белка в реакционную смесь, до 120 мин. В течение реакции суспензию постоянно перемешивали. Отобранные пробы немедленно центрифугировали при 14 000 об./мин в течение 20 с и готовили пробы для электрофореза из 0,03 мл осветленного центрифугата.

Освобождение белков с частиц диоксида кремния

Препараты суспензий частиц диоксида кремния, насыщенные сорбированными белками mCherry-L2-His₆ и EGFP-L2-His₆, объемом по 0,18 мл инкубировали отдельно с 0,1 мл 2 М растворов CaCl₂, MgCl₂, MnCl₂ или 0,5 М аргинина при периодическом перемешивании в течение 2 ч при комнатной температуре. Частицы отделяли центрифугированием и отбирали для обессоливания пробы по 0,05 мл из каждой надосадочной фракции. Обессоливание проводили на микроколонках BioToolomics (ЕС) либо микродиализом с последующим осаждением анализируемых белков ТХУ (ТХУ – трихлоруксусная кислота). Осадки растворяли в 0,1 мл буфера Laemmli и использовали для электрофоретического анализа.

Таблица 3. Расчетные характеристики рекомбинантных белков

Характеристика	EGFP-L2(201-273)-His ₆	mCherry-L2(201-273)-His ₆
Длина	328 а.о.	324 а.о.
Молекулярная масса	36895,44	36576,85
1 мг	27,104 пМоль	27,340 пМоль
Молярный коэффициент экстинкции	31390	43810
1 OE A[280] соответствует	1,18 мг/мл	0,83 мг/мл
A[280] 1 мг/мл	0,85 AU	1,20 AU
Изоэлектрическая точка	9,04	9,26
Заряд при pH 7,0	7,35	9,12

Порционная хроматография белков на частицах диоксида кремния

Суспензии сорбентов «Silica», «Силохром» и «CPG-10» объемом 2 мл суспендировали в центрифужных стаканах в 10-кратном избытке буферов, содержащих 10 мМ трис (pH 6,8), 500 мМ NaCl, 0,2% твина-20, и отмывали центрифугированием в течение 5 мин при 8000 g и температуре 20°C три раза. Буферный раствор для выделения белка EGFP-L2-His6 дополняли 6 М мочевиной. Влажные осадки суспендировали с осветленными клеточными лизатами и инкубировали в течение 30 мин при комнатной температуре. Несвязавшиеся белки отмывали, а влажные осадки частиц диоксида кремния суспендировали в 2 мл буфера Laemmli и прогревали при температуре 95°C в течение 5 мин. Элюаты анализировали ДСН-ПААГ.

Результаты и обсуждение

Конструирование плазмид

Плазмиду pET32b-L2(201-273)-Xho сконструировали в результате клонирования гена l2(201-273) в сайт XhoI плазмиды pET32b (+) (рис. 1).

В результате клонирования генов egfp и mcherry по сайтам рестрикции NdeI и Sall в плазмиде pET32b-L2(201-273)-Xho получили плазмиды pET32b-EGFP-L2(201-273)-Xho и pET32b-mCherry-L2(201-273)-Xho (рис. 2).

Гены l2(201-273), egfp и mcherry были амплифицированы без стоп-кодонов, что позволило получить слитые генетические конструкции egfp-l2(201-273) и mcherry-l2(201-273), кодирующие белки EGFP-L2(201-273)-His6 и mCherry-L2(201-273)-His6. Гексагистидиновая последовательность на С-конце

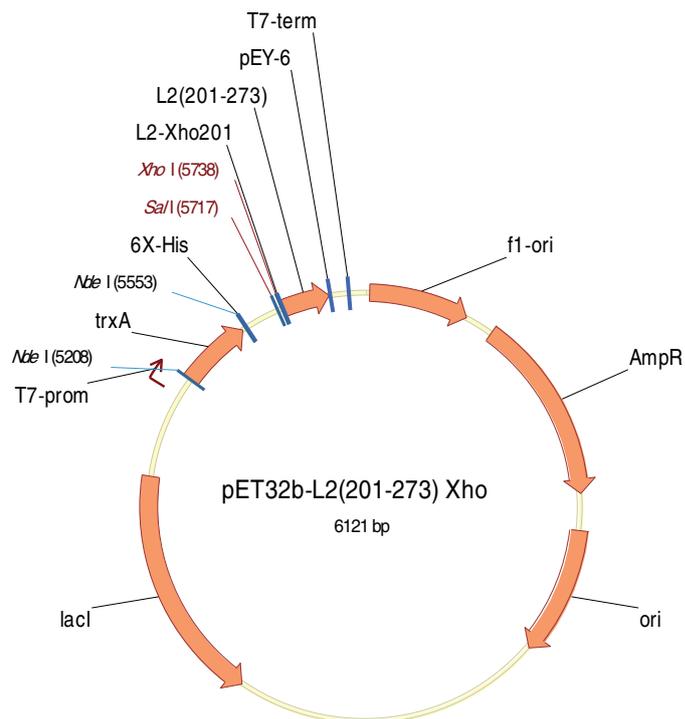


Рис. 1. Карта плазмиды pET32b-L2(201-273)-Xho.

белков, кодируемая плазмидой pET32b (+), позволяет использовать металло-хелатную хроматографию для выделения и изучения их свойств.

Свойства белков EGFP-L2(201-273)-His6 и mCherry-L2(201-273)-His6, рассчитанные с использованием программы Vector NTI 10.0.1 (Invitrogen, США), представлены в табл. 3.

Экспрессия рекомбинантных белков

Культивирование штаммов E. coli BL21(DE3)/pET32b-mCherry-L2 Xho #1.1 и E. coli BL21(DE3)/pET32b-EGFP-L2 Xho #4.1 проводили в шести качалочных колбах, содержащих по 300 мл среды. К моменту внесения индуктора ОП продуцента белка mCherry-L2-His6 достигла 6,9 ед, а продуцента белка EGFP-L2-His6 – 6,3 ед, через 4 ч индукции ОП культур изменились до 8,0 ед и до 5,8 ед. соответственно, а вес осадков оказался примерно равным, по 15 г.

Анализ клонов и фракций лизированной биомассы продемонстрировал посредственный уровень экспрессии целевых белков, подтвержденный отсутствием выраженных полос новосинтезированных белков на электрофореграммах (рис. 3, линии 1, 2, 4, 12), поэтому для Ni-хелатной хро-

Таблица 4. Основные характеристики препаратов диоксида кремния и их связывающие способности в отношении белков mCherry-L2-His6 и EGFP-L2-His6

Показатель	«Silica» Helicon	«Силохром» С-120	«CPG-10» SERVA
Внешний вид	Порошок белого цвета с кремовым оттенком	Порошок белого цвета, зерна нерегулярной формы	Порошок белого цвета, сыпучий
Грануляция, мм	0,0005–0,01	0,315–0,500	0,178–0,125
Средний диаметр пор, нм	2–5	20–30	8,4
Удельная поверхность, м²/г	464	100–140	215
Сорбция альбумина (БСА), мкг/мг	0,000	0,000	0,000
Сорбция белка mCherry-L2-His6, мкг/мг	0,037	0,017	0,014
Сорбция белка EGFP-L2-His6, мкг/мг	0,006	0,006	0,005

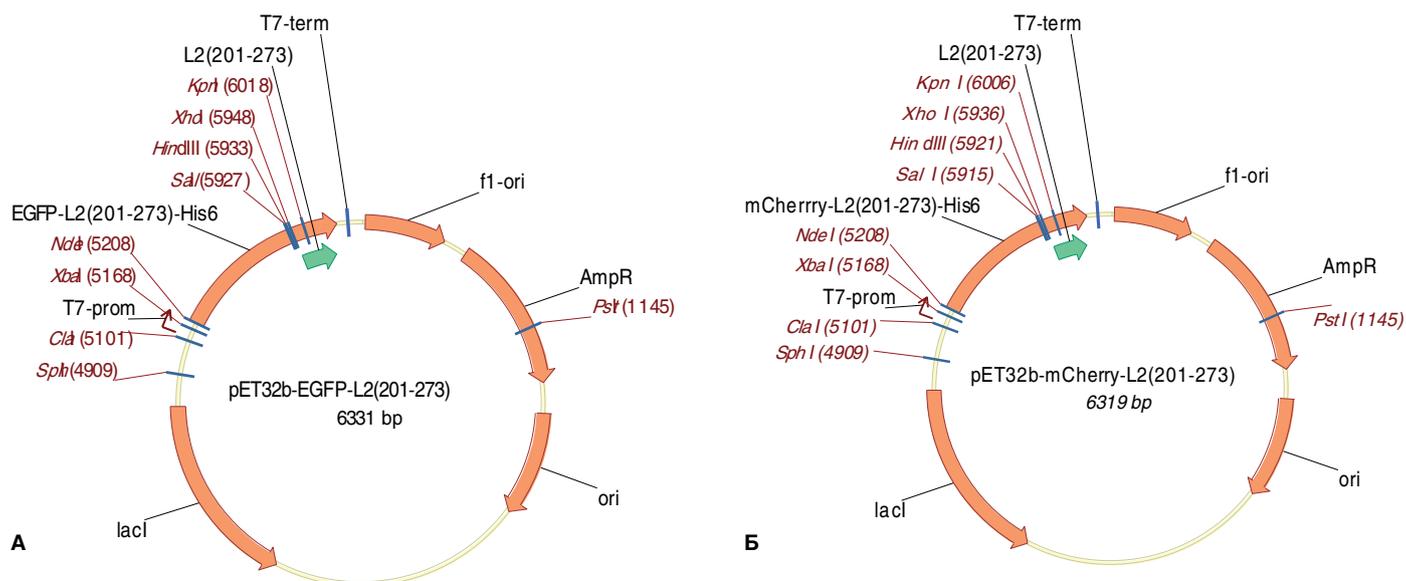


Рис. 2. Карты плазмиды pET32b-EGFP-L2(201-273)-Xho (А) и pET32b-mCherry-L2(201-273)-Xho (Б).

матогамии использовали как надосадочные части лизатов микробных клеток, так и фракции осадков, растворенных в 8 М мочеvine.

Очистка рекомбинантных белков аффинной Ni-хелатной хроматографией

Оба рекомбинантных полипептида, несущие в своей структуре Si-связывающий домен и His₆ последовательность получали в очищенном виде на колонках с Ni-хелатным носителем. При хроматографии растворимого материала практически весь белок mCherry-L2-His₆ элюировали 60 мМ имидазолом, увеличение концентрации имидазола до 600 мМ приносило фракции содержащие следовые количества белка с заметными примесями протеолитических фрагментов с молекулярной массой около 14 кДа (рис. 3, линии 6, 7). Полученные в таких же условиях растворимые фракции EGFP-L2-His₆ целевого белка не содержали (рис. 3, линии 14, 15). Аффинная хроматография белков, растворенных из осадков 8 М мочеvine, показала значительное наличие очищенного полипептида mCherry-L2-His₆ во фракциях элюированных 20 мМ и 300 мМ имидазолом в присутствии 6 М мочеvine (рис. 3, линии 10, 11). Белок EGFP-L2-His₆ элюировали только буфером, содержащим 300 мМ имидазол и 6 М мочеvine, его содержание в этих фракциях превышало 95 % (рис. 3, линии 19, 20). Диализ хроматографических фракций с EGFP-L2-His₆, содержащих 6 М мочеvine против ФСБ (ФСБ – фосфатно-солевой буфер) приводил к полному осаждению белка. В последующих экспериментах ФСБ дополняли детергентами различной природы: NP-40, додецилсульфатом натрия, сульфобетаином и N-лауроилсаркозином, определили, что белок EGFP-L2-His₆ сохранял растворимость в 0,2% растворе N-лауроилсаркозина.

Связывание белков mCherry-L2-His₆ и EGFP-L2-His₆ с частицами препаратов диоксида кремния

Использовали коммерческие препараты диоксида кремния с близкими значениями удельной поверхности, основные характеристики которых предоставлены производителями (табл. 4). Оценку неспецифической адсорбции пред-

варительно проводили с бычьим сывороточным альбумином в качестве модельного белка, не несущего Si-связывающих доменов. По аналогии с иммуноферментным анализом (ИФА) все буферные растворы содержали 0,2% твин-20 или 0,4% N-лауроилсаркозин. Было показано, что детергенты блокировали неспецифическое связывание БСА (бычий сывороточный альбумин) с частицами диоксида кремния, поэтому их включали в состав рабочих буферных растворов в опытах с очищенными клонированными белками и частицами.

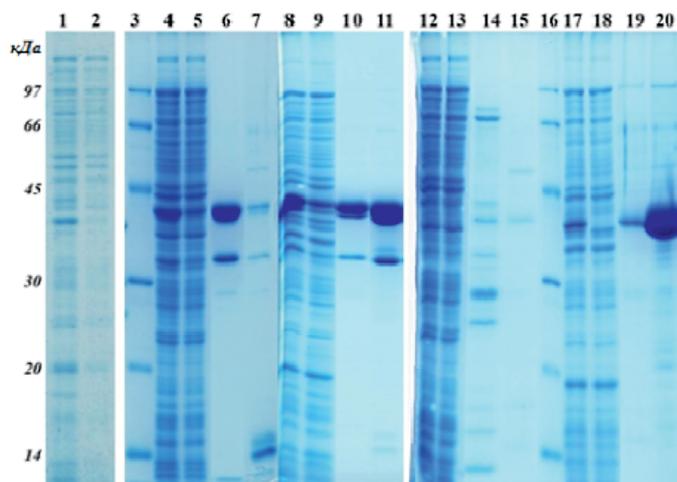


Рис. 3. Выделение белков mCherry-L2-His₆ и EGFP-L2-His₆ аффинной Ni-хелатной хроматографией из надосадочных фракций и растворенных осадков лизированных биомасс.

Линии: 1, 2 – цельноклеточные лизаты клонов; 4, 5, 6, 7, 12, 13, 14, 15 – надосадочные фракции биомасс; 8, 9, 10, 11, 17, 18, 19, 20 – осадки биомасс, растворенные в 8 М мочеvine; 4, 8, 12, 17 – фракции, нагруженные на колонку; 5, 9, 13, 18 – фракции белков, не связавшиеся с хелатирующим носителем колонки; 6, 14 – белки элюированные 60 мМ имидазолом; 7, 15 – белки, элюированные 600 мМ имидазолом; 10, 19 – белки, элюированные 20 мМ имидазолом в присутствии 6 М мочеvine; 11, 20 – белки, элюированные 300 мМ имидазолом в присутствии 6 М мочеvine; 3, 16 – маркеры молекулярных масс «LMW» Cytiva обозначены числами слева от геля; 1, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 – штамм *E. coli* BL21(DE3)/pET32b-mCherry-L2 Xho #1.1; 2, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 – штамм *E. coli* BL21(DE3)/pET32b-EGFP-L2 Xho #4.1.

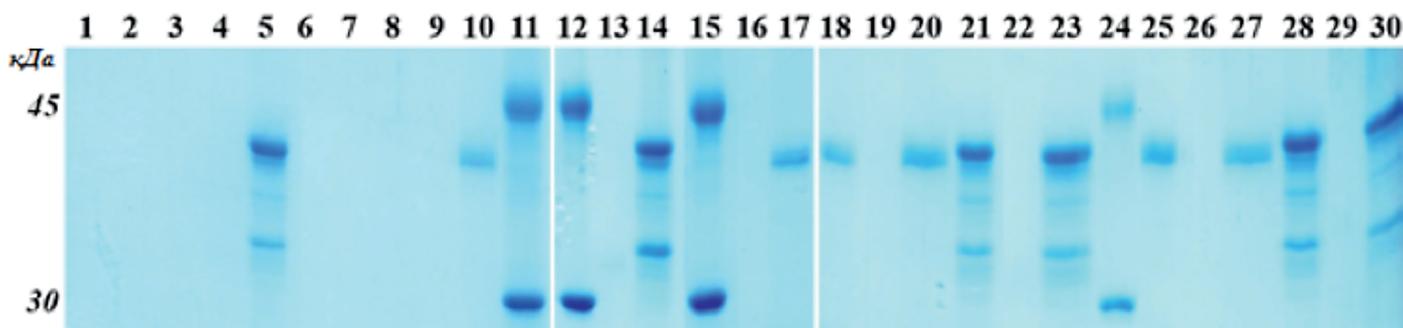


Рис. 4. Освобождение белков mCherry-L2-His₆ и EGFP-L2-His₆ с различных частиц диоксида кремния двухвалентными ионами, денатурирующими агентами и детергентами.

Линии: 1–17 – частицы препарата «Silica»; 18–23 – «Силохром» С-120; 25–30 – «СРG-10»; 1, 2, 3, 4, 13, 14, 25, 26, 27, 28, 29, 30 – белок mCherry-L2-His₆; 6, 7, 8, 9, 10, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 – белок EGFP-L2-His₆; 1, 6, 19, 22, 26, 29 – 2М CaCl₂; 2, 7 – 0,5М аргинин; 3, 8 – 8 М мочевины; 4, 9 – 7 М гуанидин хлорид; 14, 17, 20, 23, 27, 30 – 0,1% ДСН; 5, 10, 18, 21, 25, 28 – пробы, не содержащие частиц препаратов; 11, 12, 15, 24 – маркеры молекулярных масс «LMW» Cytiva обозначены курсивом справа от геля.

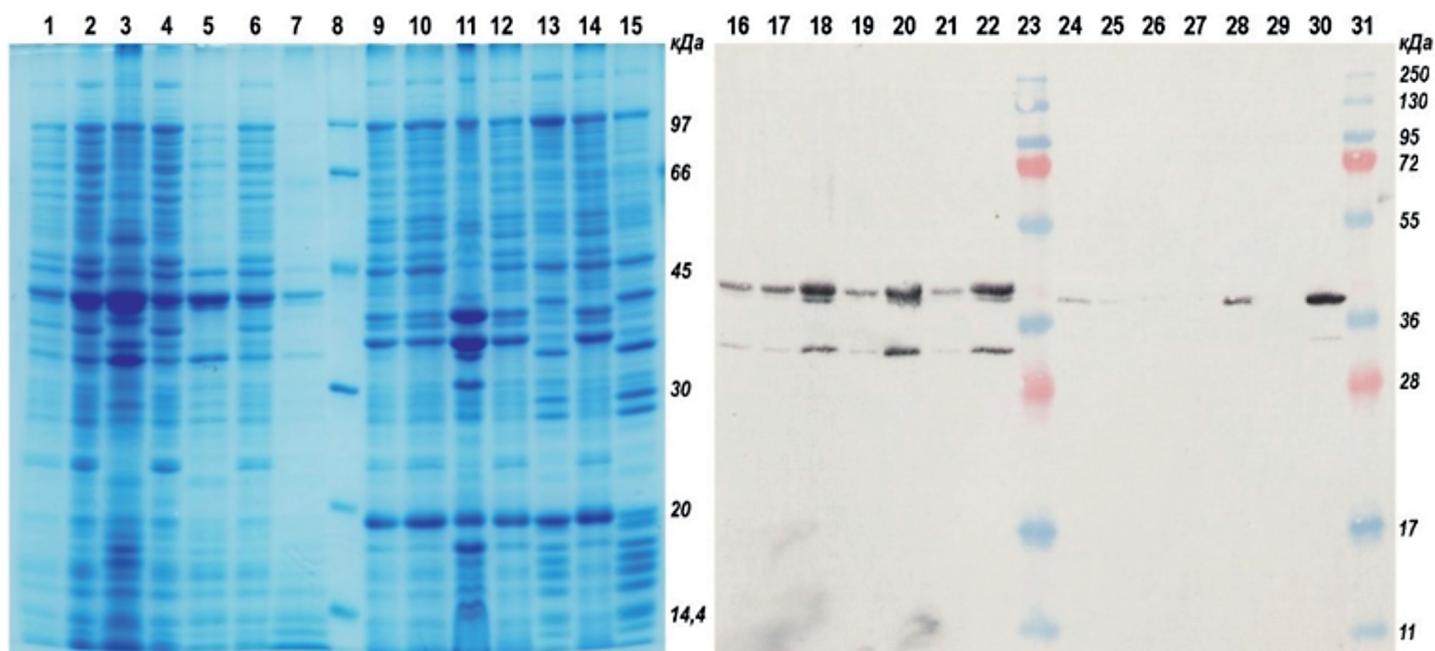


Рис. 5. Электрофорез и вестерн-блот белков mCherry-L2-His₆ и EGFP-L2-His₆, выделенных порционной хроматографией.

Линии: 1–7, 16–22 – белок mCherry-L2-His₆; 9–15, 24–30 – белок EGFP-L2-His₆; 8 – маркеры молекулярных масс LMW; 23, 31 – маркеры молекулярных масс Sm1811; 2, 3, 10, 11, 17, 18, 25, 26 – «Silica»; 4, 5, 12, 13, 19, 20, 27, 28 – «Силохром» С-120; 6, 7, 14, 15, 21, 22, 29, 30 – «СРG-10»; 1, 16 – исходный клеточный лизат mCherry-L2-His₆; 9, 24 – осадок белка EGFP-L2-His₆, растворенный в 6 М мочевины; 2, 4, 6, 10, 12, 14 – просоки; 3, 5, 7, 11, 13, 15 – элюаты.

В экспериментах оперировали объемами суспензий диоксида кремния, в 0,1 мл которых содержалось 8,6 мг «Silica», 6,0 мг «Силохрома» или 10,8 мг «СРG-10». Результаты всех экспериментов приводили к сухому весу частиц. Эксперименты проводили таким образом, чтобы временные и концентрационные соотношения компонентов реакционной смеси не ограничивали полное связывание белков [11, 14, 16]. Диапазон рН при изучении связывания рекомбинантных белков имел ограничения, связанные с растворимостью диоксида кремния в щелочной области рН, но существенных различий адсорбционных свойств в диапазоне рН от 5,0 до 7,0 обнаружено не было. Отмечали высокую скорость связывания обоих белков, которые полностью поглощались суспензиями различных форм диоксида кремния менее чем за 1 мин. Связывание белков оценивали по уменьшению их количества в пробах надосадочной части реакционных сме-

сей методом ДСН-ПААГ. Экспериментами было установлено, что наибольшую связывающую способность в отношении белка mCherry-L2-His₆ проявил препарат «Silica», обладающий самой развитой величиной удельной поверхности. Кристаллы «Силохрома» С-120 и «СРG-10» сорбировали вдвое меньше mCherry-L2-His₆, что пропорционально значениям их удельной поверхности в условиях полного насыщения белком (табл. 4). Белок EGFP-L2-His₆ сорбировался различными формами диоксида кремния в одинаковой степени, несмотря на различия их удельных поверхностей. Было показано, что даже при существенном избытке кристаллов около 5% белка с ними не связывалось и оставалось в растворе. То есть, часть молекул белка EGFP-L2-His₆ получала структуру, препятствующую проявлению свойств Si-связывающего домена, возникшую в результате ренатурации при диализе, хотя и оставалась в растворимой форме

за счет N-лауроилсаркозина. По сравнению с гомоморфными молекулами альбумина и белка mCherry-L2-His₆ возникшие множественные ренатурированные формы белка EGFP-L2-His₆ обладали различным сродством к диоксиду кремния, что, вероятно, и привело к усреднению показателя адсорбции (табл. 4).

Элюция белков mCherry-L2-His₆ и EGFP-L2-His₆ с частиц препаратов диоксида кремния

Условия, при которых происходит элюция модельных белков с диоксида кремния, определяются тем, что в водных растворах поверхность оксида кремния представлена в гидратированной форме силанольными группами (-SiOH). При нейтральных значениях pH они диссоциируют и образуют общую отрицательно заряженную поверхность, которая действует как катионообменник [17]. Белки mCherry-L2-His₆ и EGFP-L2-His₆, обладая изоэлектрическими точками соответственно 9,26 и 9,04, электростатически притягиваются к силанольным поверхностям и могут освободиться, например, двувалентными катионами в высоких концентрациях. Однако использованные нами 2 М растворы солей двувалентных металлов Ca²⁺, Mg²⁺ и аминокислота аргинин (0,5 М) принесли отрицательные результаты. Перед электрофоретическим анализом элюаты были обессолены при помощи микроколонок или микродиализом с последующим концентрированием 80%-м раствором ТХУ. Обнаружить белки mCherry-L2-His₆ и EGFP-L2-His₆ в этих образцах не удалось. Использование денатурирующих и хаотропных агентов (8 М мочевины и 7 М хлористого гуанидина) также не принесло результатов. Однако при более жесткой обработке 0,1%-м раствором ДСН (ДСН – додецилсульфат натрия) в течение 5 мин и 95°C наблюдали практически полное освобождение белков mCherry-L2-His₆ и EGFP-L2-His₆ от частиц «Silica» (рис. 4). Расчеты показали, что метод кипячения суспензий двуокиси кремния с раствором 0,1% ДСН освобождал (92 ± 5)% сорбированных белков mCherry-L2-His₆ и EGFP-L2-His₆.

Порционная хроматография белков mCherry-L2-His₆ и EGFP-L2-His₆ на частицах диоксида кремния

Препараты двуокиси кремния «Силохром» С-120, «CPG-10» и «Silica», использованные в настоящем исследовании, обладали различными характеристиками (табл. 4), вследствие гетерогенности размеров часть частиц не удерживалась колоночными фильтрами, поэтому выделение проводили порционным методом (рис. 5).

Жесткие условия элюции белков mCherry-L2-His₆ и EGFP-L2-His₆ с частицами «Silica», «Силохрома» и «CPG-10» вызвали освобождение значительного количества сорбированных клеточных белков *E. coli*, которые значительно загрязняли элюаты (рис. 5, линии 1–15). В целом эта картина говорит о том, что сильное удержание белков обусловлено, скорее всего, неспецифическими гидрофобными взаимодействиями, так как высокие концентрации ионов не освобождали контаминантные белки [14, 18].

Сравнивая результаты электрофореза и блота (рис. 5), можно отметить, что использование «CPG-10» как аффинного хроматографического носителя, специфического в отношении L2 домена клонированных белков mCherry-L2-His₆

и EGFP-L2-His₆, показало наилучшие результаты в отношении чистоты целевого продукта. Кроме того, происходило обогащение элюированных фракций как белком mCherry-L2-His₆, так и белком EGFP-L2-His₆ (рис. 5, линии 7, 15, 22, 30). Результаты хроматографии белка EGFP-L2-His₆ отличались от mCherry-L2-His₆, так, в элюате с частицами «Silica» методом иммуноблота обнаружили минимальное количество белка EGFP-L2-His₆, большие количества белка элюировали с «Силохром» и «CPG-10». Вероятно, это объяснялось присутствием 6 М мочевины в хроматографических буферах и тем, что связывание белка с носителями происходило в его денатурированной форме.

Заключение

В настоящее время хорошо исследованы условия использования различных аффинных меток, предложены многочисленные методики и промышленные технологии их применения. Полученные нами результаты лежат в русле представлений о механизмах связывания Si-метки с поверхностями диоксида кремния [14, 19]. Авторы указанных работ отмечали сильное связывание исследуемых белковых объектов: так, бактериальный 50S рибосомальный белок L2 прочно связывался с поверхностями кремнезема даже в присутствии высоких концентраций солей, детергентов и денатурирующих агентов, таких как 8 М мочевина. В основе этого явления лежит тот факт, что определенные области белка L2, богатые положительно заряженными остатками, не имеют четко определенной трехмерной структуры в физиологических условиях. Из-за присущей белку гибкости Si-метка может охватывать большую межмолекулярную область и оптимизировать свою структуру для поверхностных взаимодействий за счет конформационной адаптации на месте связывания. Благодаря этой конформационной адаптации Si-метки может оптимизировать взаимодействие между его положительно заряженными боковыми цепями и ионизированными поверхностными силанольными группами, а также между неполярными боковыми цепями белка и гидрофобными участками диоксида кремния. Совокупный вклад этих контактов усиливал связывание Si-метки и приводил к практически необратимому связыванию. Наше исследование на моделях белков mCherry-L2-His₆ и EGFP-L2-His₆ подтвердило большой потенциал для соединения биомолекул с неорганическими материалами.

Полученные гибридные конструкции белков не обеспечивали эффективного выделения и очистки целевых продуктов на диоксиде кремния. Проблему отщепления необратимо связанных гибридных белков решают введением специфических сайтов самоотщепления эндо- либо экзопротеазами, что позволяет оставить на дешевом носителе необратимо связанную часть гибридного белка и отщепить нужный нам белок в чистом виде. Это открывает дорогу для дальнейших исследований и практического использования полученных знаний.

Благодарность

Авторы выражают благодарность ведущему научному сотруднику ФБУН ГНЦГМБ, канд. биол. наук Платонову М.Е. за конструирование плазмид pET32b-L2(201-273)-Xho,

pET32b-mCherry-L2(201-273)-Xho и *pET32b-EGFP-L2(201-273)-Xho*.

Gratitude

The authors are grateful to leading researcher of SRCAMB, Dr. M.E. Platonov for the construction of plasmids *pET32b-L2(201-273)-Xho*, *pET32b-mCherry-L2(201-273)-Xho* and *pET32b-EGFP-L2(201-273)-Xho*.

Информация о финансировании

Работа выполнена в рамках отраслевой программы Роспотребнадзора.

Funding information

The work was carried out within the framework of the industry program of Rosпотребнадзор.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье.

Conflict of interest

Authors declare no conflict of interest requiring disclosure in this article.

Литература / References

1. Arnau J, Lauritzen C, Petersen GE, Pedersen J. Current strategies for the use of affinity tags and tag removal for the purification of recombinant proteins. *Protein Expr Purif.* 2006 Jul;48(1):1-13. DOI: 10.1016/j.pep.2005.12.002
2. Hearn MT, Acosta D. Applications of novel affinity cassette methods: use of peptide fusion handles for the purification of recombinant proteins. *J Mol Recognit.* 2001 Nov-Dec;14(6):323-69. DOI: 10.1002/jmr.555
3. Nilsson J, Ståhl S, Lundberg J, Uhlén M, Nygren PA. Affinity fusion strategies for detection, purification, and immobilization of recombinant proteins. *Protein Expr Purif.* 1997 Oct;11(1):1-16. DOI: 10.1006/prep.1997.0767
4. Terpe K. Overview of tag protein fusions: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2003 Jan;60(5):523-33. DOI: 10.1007/s00253-002-1158-6
5. Hochuli E, Döbeli H, Schacher A. New metal chelate adsorbent selective for proteins and peptides containing neighbouring histidine residues. *J Chromatogr.* 1987 Dec 18;411:177-84. DOI: 10.1016/s0021-9673(00)93969-4
6. Horchani H, Fendri A, Louati H, Sayari A, Gargouri Y, Verger R. Purification, biochemical and kinetic properties of recombinant *Staphylococcus aureus* lipase. *Methods Mol Biol.* 2012;861:267-82. DOI: 10.1007/978-1-61779-600-5_16
7. di Guan C, Li P, Riggs PD, Inouye H. Vectors that facilitate the expression and purification of foreign peptides in *Escherichia coli* by fusion to maltose-binding protein. *Gene.* 1988 Jul 15;67(1):21-30. DOI: 10.1016/0378-1119(88)90004-2
8. Smith DB, Johnson KS. Single-step purification of polypeptides expressed in *Escherichia coli* as fusions with glutathione S-transferase. *Gene.* 1988 Jul 15;67(1):31-40. DOI: 10.1016/0378-1119(88)90005-4

9. Coolbaugh MJ, Wood DW. Purification of *E. coli* proteins using a self-cleaving chitin-binding affinity tag. *Methods Mol Biol.* 2014;1177:47-58. DOI: 10.1007/978-1-4939-1034-2_4
10. Guillén D, Moreno-Mendieta S, Aguilera P, Sánchez S, Farres A, Rodríguez-Sanoja R. The starch-binding domain as a tool for recombinant protein purification. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2013 May;97(9):4141-8. DOI: 10.1007/s00253-013-4778-0. Epub 2013 Mar 16. Erratum in: *Appl Microbiol Biotechnol.* 2021 Oct;105(19):7551-7552.
11. Li J, Zhang Y, Yang Y. Characterization of the diatomite binding domain in the ribosomal protein L2 from *E. coli* and functions as an affinity tag. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2013 Mar;97(6):2541-9. DOI: 10.1007/s00253-012-4367-7
12. Taniguchi K, Nomura K, Hata Y, Nishimura T, Asami Y, Kuroda A. The Si-tag for immobilizing proteins on a silica surface. *Biotechnol Bioeng.* 2007 Apr 15;96(6):1023-9. DOI: 10.1002/bit.21208
13. Ikeda T, Hata Y, Ninomiya K, Ikura Y, Takeguchi K, Aoyagi S, Hirota R, Kuroda A. Oriented immobilization of antibodies on a silicon wafer using Si-tagged protein A. *Anal Biochem.* 2009 Feb 1;385(1):132-7. DOI: 10.1016/j.ab.2008.11.001
14. Ikeda T, Ninomiya K, Hirota R, Kuroda A. Single-step affinity purification of recombinant proteins using the silica-binding Si-tag as a fusion partner. *Protein Expr Purif.* 2010 May;71(1):91-5. DOI: 10.1016/j.pep.2009.12.009
15. Maniatis T, Fritsch EF, Sambrook J. *Molecular cloning: a laboratory manual.* Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1982, 480 p.
16. Li J, Dong Y, Zhang Y, Yang Y. Purification of recombinant EGFP by fusion with L2 (252-273) from ribosomal protein L2 using magnetic particles. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2013 Feb 15;917-918:30-5. DOI: 10.1016/j.jchromb.2013.01.002
17. Nawrocki J. The silanol group and its role in liquid chromatography. *Journal of Chromatography A.* 1997;779(1-2):29-71.
18. Periasamy A, Shadiac N, Amalraj A, Garajová S, Nagarajan Y, Waters S, et al. Cell-free protein synthesis of membrane (1,3)- β -d-glucan (curdlan) synthase: co-translational insertion in liposomes and reconstitution in nanodiscs. *Biochim Biophys Acta.* 2013 Feb;1828(2):743-57. DOI: 10.1016/j.bbamem.2012.10.003
19. Ikeda T, Kuroda A. Why does the silica-binding protein "Si-tag" bind strongly to silica surfaces? Implications of conformational adaptation of the intrinsically disordered polypeptide to solid surfaces. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 2011 Sep 1;86(2):359-63. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2011.04.020

Информация о соавторах:

Копылов Павел Христофорович, ведущий научный сотрудник лаборатории микробиологии чумы отдела особо опасных инфекций ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Дентовская Светлана Владимировна, доктор медицинских наук, главный научный сотрудник лаборатории микробиологии чумы отдела особо опасных инфекций ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Information about co-authors:

Pavel Kh. Kopylov, Leading Researcher of Laboratory for Plague Microbiology, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзор

Svetlana V. Dentovskaya, MD, PhD, DSc, Chief Researcher of Laboratory for Plague Microbiology, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзор