МНОВОВОЛНОВОЕ АНАЛИТИЧЕСКОЕ УЛЬТРАЦЕНТРИФУГИРОВАНИЕ: ИДЕНТИФИКАЦИЯ СЫВОРОТОЧНОГО АЛЬБУМИНА ЧЕЛОВЕКА В КОМПЛЕКСЕ С ПОРФИРИНОМ

УДК 54.07
БАК 02.00.02

**Джонсон К.Н. (Johnson C.N.), Рамсовер Х. (Ramsower H.),
Урквиди Дж. (Urquidi J.), Бранкалеон Л. (Brancaleon L.),
Демелер Б. (Demeler B.),** Университет Техаса, Сан-Антонио, США
Перевод: ООО "Бекмен Культер", отдел научно-прикладного оборудования,
lsr-russia@beckman.com

Метод аналитического ультрацентрифугирования (AUC) широко используют для характеристики коллоидных систем в физиологических условиях. Недавно компанией Beckman Coulter был разработан многоволновой (MWL) детектор для аналитической ультрацентрифуги Optima AUC, который позволяет одновременно проводить гидродинамическое разделение коллоидных смесей и спектральную деконволюцию взаимодействующих и не взаимодействующих растворенных компонентов смеси. В данном обзоре мы демонстрируем возможность использования полосы Соре в спектре поглощения комплексов порфиринов с различными катионами для спектральной деконволюции молекул с отличающимися оптическими свойствами.

Было установлено, что сывороточный альбумин человека (HSA) содержит несколько сайтов, которые способны напрямую связывать ионы металлов и металлоорганические соединения. Этот факт вызвал большой интерес к физиологической роли HSA как металлсвязывающего белка, а также к возможности использования его в качестве носителя в синтетической биологии (например, для приготовления синтетической крови и для преобразования солнечной энергии). Одним из самых интересных и потенциально полезных свойств HSA является его способность связывать гем и другие металлопорфирины. В настоящей работе мы показываем, как аналитическое ультрацентрифугирование на Optima AUC с MWL-детектором помогает достоверно отличить комплекс HSA с протопорфирином IX (HSA-PPIX) от свободного HSA, несмотря на минимальные различия гидродинамических форм и размеров этих компонентов.

МЕТОДЫ

Получение и очистка комплекса HSA-PPIX

Материалы: сывороточный альбумин человека (HSA); диметилсульфоксид (ДМСО) (Sigma-Aldrich, США); Sn(IV) протопорфирин IX дихлорид (Sn(IV)PPIX) (Frontier Scientific Inc., США).

Сухой Sn(IV)PPIX растворяли в ДМСО, а затем добавляли водой до конечной концентрации ДМСО <1%.

К полученному водному раствору добавили HSA, провели диализ и центрифугирование и получили свободный от агрегатов раствор [1].

УФ-спектроскопия

Спектры поглощения свободного HSA и HSA в комплексе с порфирином в УФ- и видимой области определяли с помощью настольного спектрофотометра. Максимум поглощения порфиринов лежит в полосе Соре в диапазоне 370–420 нм. Длина волны максимума поглощения HSA составляет 278 нм (рис.1) [1]. Эти значения были использованы для определения концентрации HSA и мономеризованных порфиринов в каждом образце.

Значения длин волн выбирали таким образом, чтобы сделать упор на области спектра, в которых наблюдается максимальное изменение поглощения.

Аналитическое ультрацентрифугирование

Скоростную седиментацию проводили при 45 000 об/мин и 20°C. Образцы вносили в ячейки с сердечником из эпоксидной смолы ерон (торговая марка, принадлежащая Shell Chemical Corp.) и кварцевыми стеклами. Дополнительные образцы исследовали в 10 mM фосфатном буфере. Аналитическое ультрацентрифугирование выполняли в новой аналитической ультрацентрифуге Optima AUC компании Beckman

Coulter с MWL-детектором, оборудованным спектрофотометрами для регистрации поглощения, и интерференционной оптикой Рэлея. Измерения проводили при 42 значениях длин волн в режиме интенсивности. Длины волн выбирали таким образом, чтобы среднеквадратическое отклонение между линейной интерполяцией и измеренным спектром имело наименьшее значение. Такой подход позволяет выделить те области спектра, в которых оптическая плотность меняется быстрее всего. Всего за 10,5 ч было получено по 45 сканов для каждой длины волны (рис.2).

Анализ данных многоволнового AUC

Анализ проводили с использованием программного обеспечения UltraScan-III, версия 2352 [2]. Результаты скоростной седиментации редактировали, определяя мениск, диапазон данных и плато для каждой длины волны. Данные для мениска приводили в соответствие с результатами двумерного спектрального анализа (2DSA) [3], вычитая величину шума, постоянного во времени и инвариантного в радиальном направлении. В конце выполняли итеративный 2DSA-шаг. Используя конечную 2DSA-модель для каждой длины волны, вычисляли синхронизированную по времени конечноэлементную модель, формирующую многоволновую поверхность. Полученную симуляцию раскладывали на базовые спектральные векторы, чтобы получить новый набор данных для каждой уникальной компоненты спектра, т.е. на 2 базисных вектора, представляющих собой спектры собственного поглощения HSA и HSA-PPIX-Sn [4]:

$$C_{MWL} = X_a \begin{bmatrix} \epsilon_{a1} \\ \epsilon_{a2} \\ \dots \\ \epsilon_{ai} \end{bmatrix}_{r,t} + X_b \begin{bmatrix} \epsilon_{b1} \\ \epsilon_{b2} \\ \dots \\ \epsilon_{bi} \end{bmatrix}_{r,t}.$$

HSA HSA-PPIX

РЕЗУЛЬТАТЫ

Целью исследования было установление того, можно ли с помощью многоволнового AUC [5] достоверно различить очищенный HSA-PPIX и свободный HSA. Результаты анализа разделенных методом Монте-Карло наборов гидродинамических данных представлены на рис.3. Видно, что разделение всей совокупности сигналов на два множества позволяет определять концентрацию и гидродинамические характеристики компонентов в растворе, каждый из которых имеет уникальный спектр. Также мы выяснили, что коэффициент седиментации комплекса HSA-PPIX немного выше, чем этот же показатель для свободного HSA.

Рис.1. Спектры поглощения HSA, HSA+PPIX-Sn и HSA+PPIX-Zn

Рис.2. Длины волн, использованные для измерений в AUC (синие кружки).

Рис.3. Зависимость гидродинамических свойств от длины волны как отражение спектральных свойств

Рис.4. Результаты одноволнового (278 нм) эксперимента (слева) и многоволнового эксперимента (справа).

Различие в спектрах поглощения свободного HSA и HSA, связанного с PPIX, можно использовать для разделения совокупности гидродинамических данных на два множества, каждое из которых соответствует индивидуальному компоненту. Как видно из рис.4, такой метод позволяет полностью разделить спектры разных типов молекул, даже если их гидродинамические свойства очень похожи. Результаты одноволнового эксперимента при 278 нм (максимум поглощения свободного HSA) представляют собой два пика, но выяснить, какой из них соответствует HSA, а какой – HSA-PPIX-Sn, не представляется возможным. Многоволновой эксперимент позволяет выделить каждый из компонентов и отнести наблюдаемые пики либо к свободному HSA (красные), либо к комплексу HSA-PPIX-Sn (синие). При этом разрешающая способность многоволнового AUC выше разрешающей способности, продемонстрированной в любом из ранее выполненных AUC-экспериментов. Кроме того, если компоненты смеси с различными спектрами поглощения хорошо гидродинамически разделимы, можно определить собственные спектры каждого компонента. Однако в нашем случае два компонента смеси были гидродинамически очень похожими, и определение их собственных спектров оказалось непростой задачей (см. рис.3).

Очевидно, что предлагаемое усовершенствование метода, заключающееся в применении многоволнового детектора, окажет огромное влияние на последующие

AUC-эксперименты, особенно при изучении взаимодействующих систем, компоненты которых обладают уникальными спектральными свойствами.

ЛИТЕРАТУРА

1. **Hu J., Demeler B., Brancalion L.** Experimental and Computational Study of the Binding of Metalloporphyrins to the Metal Binding Sites of Human Serum Albumin. 2017. Неопубликованные результаты.
2. **Demeler B.** Methods for the Design and Analysis of Sedimentation Velocity and Sedimentation Equilibrium Experiments with Proteins // *Cur. Protoc. Prot. Sci.* 2010. Chapter 7: Unit 7.13.
3. **Brookes E., Cao W., Demeler B.** A two-dimensional spectrum analysis for sedimentation velocity experiments of mixtures with heterogeneity in molecular weight and shape // *Eur Biophys J.* 2010. Vol. 39. P. 405–14.
4. **Gorbet G.E., Pearson J.Z., Demeler A.K., Colfen H., Demeler B.** Next-Generation AUC: Analysis of Multiwavelength Analytical Ultracentrifugation Data // *Methods in Enzymology.* 2015. Vol. 562. p. 27–47. doi:10.1016/bs.mie.2015.04.013
5. **Zhang J., Pearson J.Z., Gorbet G.E., Colfen H., Germann M.W., Brinton M.A., Demeler B.** Spectral and Hydrodynamic Analysis of West Nile Virus RNA-Protein Interactions by Multiwavelength Sedimentation Velocity in the Analytical Ultracentrifuge // *Anal Chem.* 2017. Vol. 89. p. 862–870.

МЕЖДУНАРОДНЫЙ ФОРУМ

БИОТЕХНОЛОГИЯ: СОСТОЯНИЕ И ПЕРСПЕКТИВЫ РАЗВИТИЯ. НАУКИ О ЖИЗНИ

МЕЖДУНАРОДНАЯ СПЕЦИАЛИЗИРОВАННАЯ ВЫСТАВКА

МИР БИОТЕХНОЛОГИИ 2018. НАУКИ О ЖИЗНИ

23-25

МАЯ 2018

МОСКВА | ГОСТИНЫЙ ДВОР
ИЛЬИНКА, 4

ОСНОВНЫЕ ПОТОКИ ФОРУМА

- Геномное редактирование в биомедицине.
- Постгеномная медицина.
- Генная и вирусная терапия: успехи и проблемы.
- Геномное редактирование в агротехнологиях.
- Умные материалы для диагностики и терапии: возможности синтетической биологии.
- Современная иммунология.
- Регенеративная и клеточная медицина.
- Метагеномика и персонализированная медицина.
- Тканевая инженерия и биопринтинг: оборудование, методики и области применения. От клеточных культур к органам. Матрицы для биопринтинга.
- Биоматериалы в биотехнологиях и медицине.
- Биотехнология и проблемы активного долголетия.
- Омиксные технологии в клинической онкологии и болезнях мозга. Лечение с позиций биоинформатики, молекулярной/ клеточной биологии и клинической медицины.
- Моноклональные антитела: наука, бизнес, государство.
- Терапия онкозаболеваний человека с помощью вирусов
- Инновационные технологии и оборудование в биофармацевтике.

СЕКЦИЯ БИЗНЕС

- Перспективы выхода на рынок новых лекарственных средств, в том числе, на основе моноклональных антител.
- “Умные” продукты питания.
- Современные технологические решения для биофармацевтических производств.

РАЗДЕЛЫ ВЫСТАВКИ

БИОФарма

Фармацевтические и биофармацевтические компании.
Лекарственные препараты для онкологии, иммунологии, офтальмологии, кардиологии, неврологии и других сфер применения.
Изделия медицинского назначения и вакцины.
Фитопрепараты и витаминные комплексы.
Субстанции и ингредиенты для ГЛС.

Функциональные продукты питания

БИОпродукты пищевой промышленности и агропромышленного комплекса.
БИО-питание и органические продукты.
Биологически активные добавки и геропротекторы.
Здоровое и детское питание.
БИО-спорт. Спортивное питание.

БИОЛаб

Лабораторно-аналитическое оборудование и биоаналитические комплексы.
“Умные” (smart) лаборатории.
Биологические и генетические тесты.
Процессы и аппараты для биотехнологических производств и лабораторных исследований (биореакторы и измерительное оборудование).
Реактивы и наборы.
Питательные среды.
Расходные материалы.

БИОСофт

Программные продукты для биотехнологий.
Большие массивы данных - Big Data.
Облачные технологии и сервисы.
Банки данных в биотехнологии.
IT- решения для биологических задач.

БИОМед

Персонализированная диагностика и лечение.
Продукция и услуги биотехнологических компаний для конечного пользователя.
Мобильные технологии и индивидуальное диагностическое оборудование.
Медицинские продукты питания.
Биофармацевтика и фармацевтические компании.
Биочипы и биосенсоры.
Генетическая инженерия и биосовместимые материалы.
Биомедицинские и роботические технологии.
Биопрепараты для медицины и косметологии, а также готовые продукты на их основе.

БИОАгро

Весь спектр биопродуктов для агропромышленного комплекса.
Технологии производства.
Продукция и услуги биотехнологических компаний для конечного пользователя.
Биологические средства защиты растений, агрохимикаты, фунгициды, препараты для рекультивации почв.
Ферментные препараты для кормовой, хлебопекарной, химической, спиртовой и др. видов промышленности.
Биопрепараты, вакцины, пробиотики
Кормовые добавки и ингредиенты

БИОвенчур, Стартапы, Кластеры, Технопарки

Венчурные фонды и программы поддержки новых компаний в биотехнологической сфере.

Промышленная биотехнология

Биопрепараты и технологии для ликвидации загрязнений почвы, грунта и водоемов.
Оборудование и технологии для организации биотехнологического производства.
Чистые линии: водо- и воздухоснабжение, проектирование и строительство, хранение и перевозка биотехнологической продукции.
Весь спектр биопродуктов для пищевой промышленности, биогеологии, промышленных производств, а также биоагенты для охраны и восстановления окружающей среды.
Альтернативные источники энергии, в т.ч. из возобновляемого сырья.
Биобезопасность.

CleanBiotech

Очистка воздуха, почвы, воды.
Регенерация.
Биоотходы.

Бионика

Разработка и создание бионических систем, биопротезирование, экзоскелеты.

БИОФранчайзинг

Зона франчайзинговых предложений, связанных с биотехнологиями, лабораториями, системами анализов.

+7 (495) 780-41-09
+7 (495) 722-20-74

119071 Москва, ул. Стасовой, 4
БЦ «Донской Посад», офис С506

www.biomos.ru
info@biomos.ru