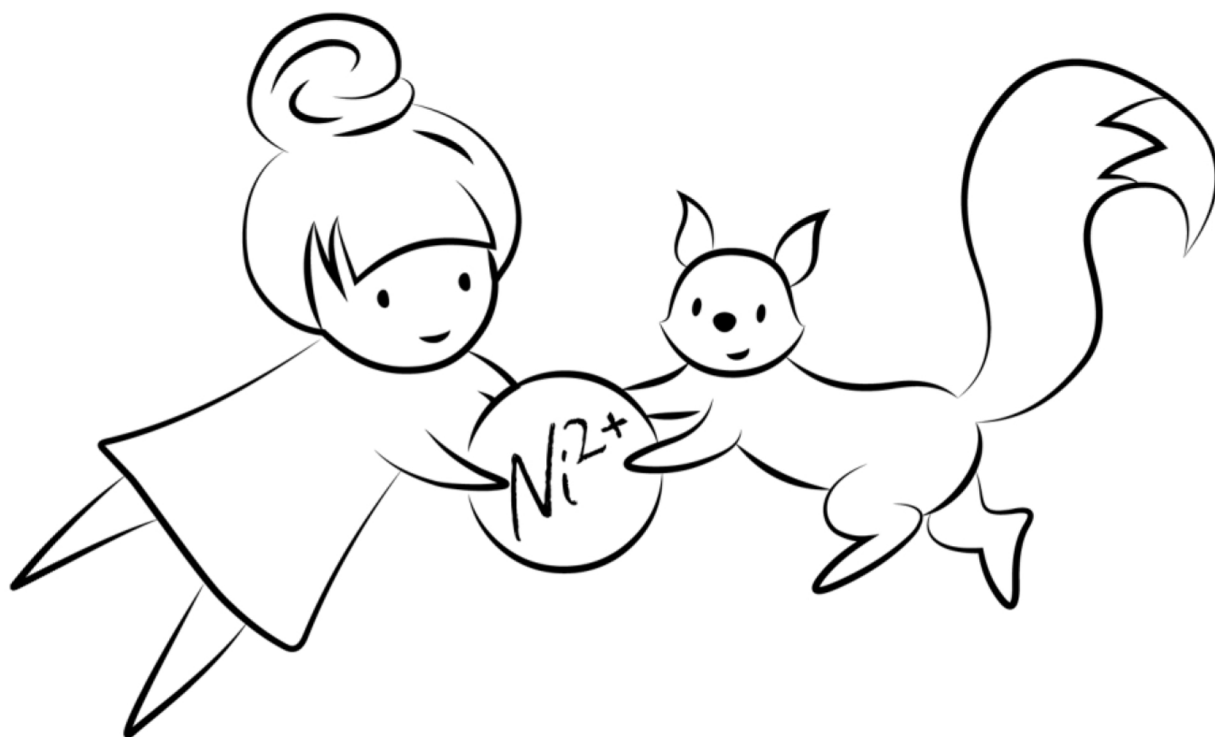


Р.Ф. ХАЙРУЛЛИН
Р.Р. МИФТАХОВА
Ю.В. ФИЛИНА

Металлохелатная аффинная хроматография



КАЗАНСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
Институт фундаментальной медицины и биологии
Кафедра биохимии, биотехнологии и фармакологии

Р.Ф. ХАЙРУЛЛИН
Р.Р. МИФТАХОВА
Ю.В. ФИЛИНА

Металлохелатная аффинная хроматография

Учебное пособие



КАЗАНЬ

2021

УДК 577.112.083

ББК 28.072

X15

*Печатается по рекомендации кафедры биохимии, биотехнологии
и фармакологии Института фундаментальной медицины и биологии КФУ
(Протокол заседания кафедры № 8 от 15 апреля 2021 г..)*

Рецензенты:

кандидат химических наук **А.Г. Андрианова;**

кандидат биологических наук **Ш.З. Валидов**

Хайруллин Р.Ф., Мифтахова Р.Р., Филина Ю.В.

X15 Металлохелатная аффинная хроматография: учебное пособие / Р.Ф. Хайруллин, – Казань: Изд-во Казан. ун-та, 2021. – 102 с.

ISBN 978-5-00130-027-4

Учебное пособие составлено в соответствии с современной структурой изучения учебных биологических дисциплин и является дополнением к практическому курсу «Экспрессия, выделение и очистка рекомбинантных белков». В учебном пособии рассмотрены теоретические основы метода металлохелатной хроматографии, описаны современные подходы к разработке процедуры рекомбинантных белков меченых полигистидиновым тэгом. Даны вопросы для самоконтроля по предмету. Учебное пособие предназначено для студентов вузов, аспирантов и преподавателей.

УДК 577.112.083

ББК 28.072

ISBN 978-5-00130-027-4

© Хайруллин Р.Ф., Мифтахова Р.Р., Филина Ю.В., 2021

© Издательство Казанского университета, 2021

ОГЛАВЛЕНИЕ

Введение	7
Глава 1. Метод металлохелатной аффинной хроматографии	9
1.1. История развития метода.....	9
1.2. Принцип метода	12
1.3. Преимущества и недостатки МХАХ.....	15
1.4. Применение МХАХ	18
1.4.1. Очистка природных белков.....	19
1.4.2. Фракционирование белков протеома	21
1.4.3. Детекция His ₆ -меченых белков	21
1.4.4. Селективная иммобилизация белков.....	22
1.4.5. Матрица-опосредованный рефолдинг	22
1.4.6. Хроматографическая очистка His ₆ -меченых белков	23
1.5. Вопросы для самоконтроля	23
1.6. Рекомендованная литература	24
Глава 2. Свойства сорбентов для МХАХ	25
2.1. Выбор иона металла	25
2.2. Хелатирующие лиганды	27
2.3. Вопросы для самоконтроля	34
2.4. Рекомендованная литература	35
Глава 3. Тэги для МХАХ	36
3.1. Виды и особенности тэгов для МХАХ	36
3.2. Отщепление полигистидинового тэга.....	39
3.3. Вопросы для самоконтроля	45
3.4. Рекомендованная литература	46
Глава 4. Проведение МХАХ His₆-меченых рекомбинантных белков	47
4.1. Планирование эксперимента	47
4.1.1. Свойства рекомбинантного белка.....	47
4.1.2. Структура рекомбинантного белка и доступность полигистидинового тэга	48
4.1.3. Состав и свойства раствора, концентрация белка	50
4.1.4. Формат проведения МХАХ.....	53
4.2. Условия сорбции в МХАХ	55
4.3. Условия элюирования в МХАХ	60

4.4. Контаминирующие белки и предотвращение неспецифичной сорбции	62
4.5. Регенерация сорбента	65
4.6. Вопросы для самоконтроля	68
4.7. Рекомендованная литература	69
Глава 5. Практическая работа	70
5.1. Введение	70
5.2. Разрушение клеток и получение бесклеточного экстракта	70
5.3. Хроматографическая очистка зеленого флуоресцентного белка.....	73
5.3.1. Рабочие растворы.....	74
5.3.2. Оборудование и материалы.....	74
5.3.3. Буферные растворы для очистки белка	75
5.3.4. Ход работы	77
5.4. Электрофоретический анализ белковых фракций	78
5.4.1. Рабочие растворы и материалы.....	78
5.4.2. Оборудование.....	78
5.4.3. Приготовление геля	78
5.4.4. Сборка камеры и проведение электрофореза.....	80
5.4.5. Визуализация и документирование белковых полос в геле.....	81
5.5. Окраска His ₆ -меченых белков диазореактивом Паули	81
5.5.1. Оборудование и материалы	82
5.5.2. Рабочие растворы.....	83
5.5.3. Ход работы	83
Приложение 1	
Приготовление основных рабочих растворов и реагентов	85
Растворы для регенерации сорбента	85
Растворы для выделения и очистки белков	85
Растворы для электрофоретического анализа белков	86
Приложение 2	
Подготовка колонки для металлохелатной аффинной хроматографии	89
Загрузка колонки	90
Очистка сорбента после проведения хроматографии	92

Регенерация сорбента	92
Приложение 3	
Справочная информация	94
Сорбенты для МХАХ	94
Пустые стеклянные и полипропиленовые колонки для аффинной хроматографии.....	95
Литература.....	97

Список основных сокращений

8-HQ	8-гидроксихинолин (англ. 8-hydroxyquinoline)
BV	Объем колонки (англ. Bead volume)
CM-Asp	Карбоксиметиласпартат (англ. Carboxymethyl aspartate)
DTT	Дитиотреитол (англ. Dithiothreitol)
GFP	Зеленый флуоресцентный белок (англ. Green fluorescent protein)
IDA	Иминодиуксусная кислота (англ. Iminodiacetic acid)
LB	Питательная среда (англ. Lysogeny broth – литическая среда)
NTA	Нитрилотриуксусная кислота (англ. Nitrilotriacetic acid)
OPS	Орто-фосфосерин (англ. <i>o</i> -phosphoserine)
PMSF	Фенилметилсульфонил фторид (англ. Phenylmethylsulfonyl fluoride)
SDS	Додecilсульфат натрия (англ. Sodium dodecyl sulfate)
TCEP	Трис(2-карбоксиэтил)фосфин (англ. Tris(2-carboxyethyl)phosphine)
TED	Трис(карбоксиметил)этилендиамин (англ. Tris-carboxymethyl ethylene diamine)
MXAH	Металлохелатная аффинная хроматография (англ. IMAC – Immobilized metal affinity chromatography)
ТЕМЕД	Тетраметилэтилендиамин
ЭДТА	Этилендиаминтетрауксусная кислота

Введение

С развитием молекулярной биологии и биотехнологии существенно возросла потребность в высокоочищенных рекомбинантных белках. Они применяются для энзимологических, биофизических и структурных исследований, для терапии и диагностики, для производства вакцин и создания новых материалов. Развитие технологии рекомбинантных ДНК позволили не только подбирать хроматографический метод исходя из свойств белка (заряд, гидрофобность, размер, биологические свойства), но и совершенствовать процесс очистки с противоположной стороны – изменять сам белок, придавать ему особые свойства для использования определенного вида хроматографической очистки. Эффективность очистки белка значительно повышается при использовании аффинных методов, основанных на сродстве между иммобилизованным лигандом и выделяемым рекомбинантным белком. Инженерия структуры белка с введением меток, придающих белку сродство к закрепленному лиганду, позволяет придать белку сродство к определенному сорбенту. Среди множества методов аффинной хроматографии особое место занимает металлохелатная аффинная хроматография (МХАХ). Этот метод основан на взаимодействии иммобилизованного иона металла с белками, имеющими сродство к ионам металлов. Благодаря простоте и эффективности процедуры очистки, высокой емкости и доступности сорбентов МХАХ широко применяется для очистки рекомбинантных белков как в научных лабораториях, так и в промышленности. Металлохелатная хроматография — это не только способ очистки белков, полученных методами генной инженерии. В современных лабораториях принципы, лежащие в основе этого метода, применяются во многих областях, где необходимо селективно иммобилизовать белки: в протеомике, изучении иммуногенности, детекции белков и т.д. Если же оглянуться назад, к истокам развития метода, можно увидеть, что этот метод успешно применялся для очистки природных белков не обладающих полигистидиновым «хвостом».

Данное пособие является дополнением к практическому курсу «Экспрессия, выделение и очистка рекомбинантных белков» и предназначено для ознакомления учащихся с основами метода металлохелатной аффинной хроматографии. Знание теоретических основ МХАХ, особенностей компонентов металлохелатных сорбентов (хелатирующего лиганда, типа иона металла), условий проведения хроматографии, особенностей структуры белков, влияющих на сродство к ионам металлов, позволяют обойти многие подводные камни этого метода и повысить эффективность не только хроматографической очистки рекомбинантных белков, но и пополнить арсенал методов фракционирования природных белков. В пособии кратко рассматриваются ионы металлов, применяемые для очистки белков, механизм лигандного обмена, лежащий в основе МХАХ, структура хелатирующих лигандов, используемых для иммобилизации ионов металла, структура аффинного тэга. Также затронуты практические аспекты проведения МХАХ, рассмотрены условия сорбции, элюирования белков, меченых полигистидиновым тэгом, процедуры очистки и регенерации сорбента. В разделе «Практическая работа» приведены базовые протоколы очистки модельного рекомбинантного белка в рамках практических лабораторных занятий. Для проверки понимания пройденного материала каждая глава содержит вопросы для самоконтроля. Для углубленного изучения отдельных тем приведены ссылки на актуальную научную литературу. Авторы надеются, что данное учебное пособие поможет читателю в освоении одного из самых важных методов очистки рекомбинантных белков – металлохелатной аффинной хроматографии.

ГЛАВА 1

Метод металлохелатной аффинной хроматографии

1.1. История развития метода

Развитие методов аффинной хроматографии в значительной степени связано с успехами в выделении целого ряда гомогенных белков: ферментов, гормонов, антител и др. Это одна из старейших форм жидкостной хроматографии: впервые аффинную хроматографию применил Emil Starkenstein в 1910 году для изучения связывания фермента альфа-амилазы с нерастворимыми гранулами крахмала [1], и это случилось всего через семь лет после изобретения метода хроматографии Михаилом Цветом. Примечательно, что это первый описанный случай использования жидкостной хроматографии белков. Ввиду удобства и перспективности метода аффинной хроматографии для разделения биомолекул эта область получила широкое развитие, были исследовано множество аффинных лигандов, влияние аминокислотного состава белков на сродство к сорбенту, разработаны новые хроматографические носители, изучены механизмы биоспецифического взаимодействия молекул.

Метод разделения веществ, связывающихся с ионами металлов с образованием хелатного комплекса, был впервые предложен 60 лет назад. В 1961 году в работе Hellferich для разделения аминов был применен метод лигандного обмена, впоследствии ставший основой для лигандообменной хроматографии (англ. LEC – ligand exchange chromatography) [2]. Применение этого метода для очистки белков началось с революционной работы Porath и соавторов в 1975 году [3]: были синтезированы хроматографические сорбенты на основе агарозы с хелатными группами иминодиуксусной кислоты (IDA), заряженные ионами переходных металлов Cu^{2+} и Zn^{2+} . Метод лигандообменной хроматографии в области биохимии назвали «Металлохелатная аффинная хроматография» (МХАХ, англ. MCAC – metal chelate affinity chromatography). В англоязычной научной литературе утвердился термин «Аффинная хроматография с иммобилизованным металлом» (англ. IMAC – Immobilized metal affinity chromatography).

Исходно МХАХ использовалась для группового фракционирования белков природного происхождения, образующих устойчивые комплексы с иммобилизованными ионами металлов. Этот метод успешно применялся для очистки лактоферрина, интерферона, нуклеозиддифосфатазы, альфа-1-антитрипсина, супероксиддисмутазы, кислой протеазы, сериновой карбоксипептидазы, гликогенфосфоорилазы, лактатдегидрогеназы и множества других белков [4].

В 1989 году появилось теоретическое обобщение влияния аминокислотного состава белков на связывание с иммобилизованными ионами металлов. В работе Sulkowski были описаны требования для связывания белков с иммобилизованными ионами переходных металлов [5]. Он постулировал, что сорбент с иммобилизованными ионами Cu^{2+} будет связывать белки с одним экспонированным гистидином, а для связывания с иммобилизованными Ni^{2+} и Zn^{2+} необходимо наличие двух экспонированных вицинальных (смежных) гистидинов. Иммобилизованные ионы Ni^{2+} также могут связываться с белками с двумя экспонированными на поверхности гистидинами, расположенными невицинально, но такая связь значительно слабее. Также он предположил, что связывание с закрепленными ионами Co^{2+} требует наличия хотя бы двух близкорасположенных гистидинов на поверхности белка. К концу 80х гг. также накопились данные о взаимодействии фосфорилированных белков с иммобилизованными ионами металлов и значении карбоксильных аминокислот и тирозина. Эти знания привнесли существенный вклад в понимание аффинного взаимодействия с ионами металлов и позволили открыть новые направления МХАХ [4].

Качественный скачок в применении МХАХ произошел после пионерской работы Nochuli в 1988 году, в которой впервые были объединены химические и генетические подходы в очистке белков и описано применение искусственно внедренного в структуру рекомбинантного белка гексагистидинового тэга (His_6) для очистки на синтезированном металлохелатном сорбенте, Ni-NTA-сефарозе [6, 7]. Возможность искусственного внедрения последовательностей для аффинной очистки в структуру рекомбинантных белков с помощью методов

рекомбинантных ДНК открыла новую веху в биотехнологии. Этот подход стал широко использоваться, и на сегодняшний день более 50 % рекомбинантных белков, экспрессируемых в прокариотических клетках, очищается с помощью МХАХ. После разработки Noshuli были предложены другие варианты аффинных последовательностей для селективного связывания с иммобилизованными металлами, включая и природные пептиды, обнаруженные с помощью метода фагового дисплея [8]. Для преодоления возможного влияния гексагистидинового тэга на структуру белка были разработаны подходы к созданию на поверхности областей связывания ионов металла, не влияющие на функции и активность белка [9]. Область применения металлохелатной аффинной хроматографии сейчас не ограничивается препаративным выделением белков. Метод широко используется, к примеру, для фракционирования и обогащения металлсвязывающих полипептидов при пробоподготовке в протеомных исследованиях [10].

1.2. Принцип метода

Метод металлохелатной аффинной хроматографии основан на формировании иммобилизованных комплексов между ионами металлов и хелатирующими лигандами, прикрепленными к хроматографическому носителю (например, сефарозе). Разделение белков возможно за счет наличия участков связывания металлов в молекуле белка: это боковые цепи аминокислот на поверхности белка или специально разработанные тэги, в основном, полигистидиновые. Селективность МХАХ зависит от выбора иона металла и хелатирующего лиганда, условий связывания и элюирования, а также модификации целевого белка.

Координационная связь – это химическая связь в комплексных соединениях, в которых один или несколько атомов образуют большее число связей, чем допускается высшей формальной валентностью этих атомов. При координационной связи электронная пара связи поставляется одним из взаимодействующих центров, в отличие от обычной ковалентной связи, которая образуется валентными электронами обоих взаимодействующих центров. Ионы переходных металлов образуют координационные связи с имидазольной группой гистидина (в непротонированной форме) и сульфгидрильной группой цистеина. Это взаимодействие происходит в области нейтральных рН (6,0–8,0) и при понижении рН существенно ослабляется. Сродство к ионам переходных металлов также могут проявлять триптофан, фенилаланин и тирозин благодаря ароматическим заместителям в структуре, гидроксильная группа серина, аминогруппа (табл. 1). Для ионов металлов, относящихся к жестким кислотам Льюиса, таким как Fe^{2+} и Mg^{2+} , основными мишенями для образования координационных связей служат карбоксильная и фосфатная группы.

Хроматографический сорбент, используемый в МХАХ, состоит из хроматографического матрикса, к которому ковалентно присоединена хелатирующая группа лиганда с иммобилизованным ионом металла. Ионы металлов в хелатирующем соединении при

металлохелатной аффинной хроматографии действуют как акцепторы электронов (гистидина и других аминокислот). В свободном металлохелатном комплексе у иона металла остается некоторое количество свободных координационных сайтов, которые связаны с водой или молекулами буфера. При добавлении соединения, обладающего большим сродством к иону металла (белок), молекулы воды или буфера вытесняются из координационных сайтов, и образуется комплекс сорбент-белок (рис. 1).

Таблица 1

Вклад отдельных аминокислот во взаимодействие белка с металлохелатным комплексом [11]

Функциональная группа	Сила удерживания
Гистидин	++++
Цистеин*	++++
Аспарагиновая и глутаминовая кислоты	-
Лизин, аргинин	+
Триптофан, тирозин, фенилаланин	+
N-концевая аминогруппа	++

*Цистеин – в восстановленной форме

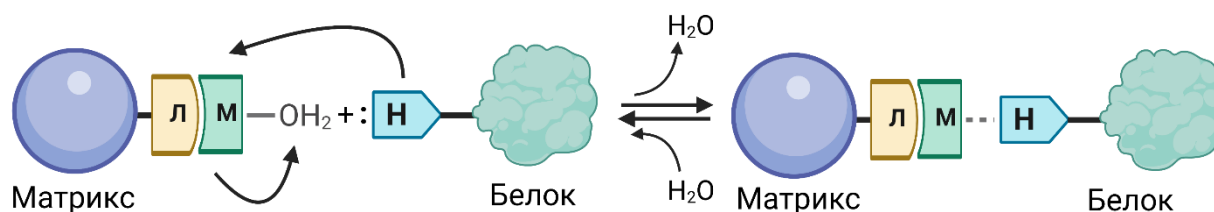


Рис. 1. Схема металлохелатной аффинной хроматографии белков (Л – лиганд, М – металл, Н – остаток гистидина в белке)

В аффинной хроматографии для выражения степени сродства молекул друг к другу используют константу диссоциации (K_d). Константа диссоциации – это константа равновесия, которая характеризует склонность комплекса белок-аффинный лиганд обратимо диссоциировать на составляющие молекулы. Среди пар биомолекул,

образующих нековалентные устойчивые комплексы, абсолютными лидерами по силе связи являются пары стрептавидин-биотин ($K_d = 1 \times 10^{-15} \text{ M}$) и барназа-барстар ($K_d = 1 \times 10^{-14} \text{ M}$) (рис. 2).

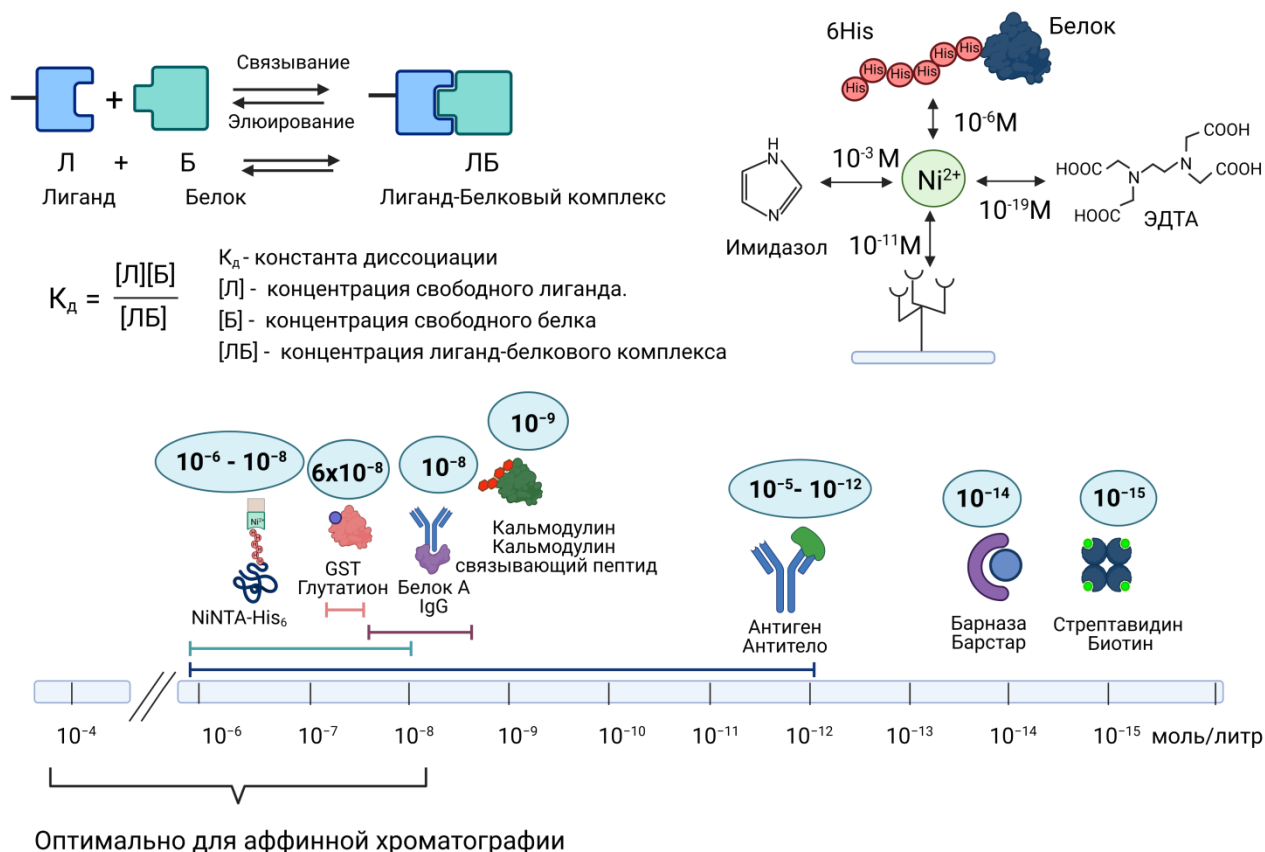


Рис. 2. Константы диссоциаций аффинных тэгов с лигандами

Однако низкие константы диссоциации и высокая прочность связи неприменимы при очистке белков, так как разрушение таких комплексов требует экстремальных условий, которые могут быть фатальными для очищаемых белков. При аффинной хроматографии, помимо прочности связи, немаловажным фактором является и обратимость диссоциации. Чем меньше значение K_d , тем крепче связь, и наоборот, поэтому в аффинной хроматографии чаще всего применяют связки лиганд-белок с умеренно низкими значениями констант диссоциации (в интервале $K_d = 1 \times 10^{-4} \text{ M} - 1 \times 10^{-8} \text{ M}$). Взаимодействия, включающие константы диссоциации, превышающие 10^{-4} M , например, реакция связывания между ферментом и слабым ингибитором будут слишком непрочными для успешной аффинной хроматогра-

фии. И наоборот, если константа диссоциации ниже, чем 10^{-8} М, например, сродство между гормоном и его рецептором, элюирование связанного вещества без инактивации будет затруднено [12].

Константа диссоциации Ni-NTA с полигистидиновым тэгом около 10^{-6} М, что выше, чем у многих других широко используемых пар аффинный тэг/лиганд, таких как GST/глутатион (6×10^{-8} М), белок A/IgG (1×10^{-8} М), кальмодулин/кальмодулин-связывающий пептид (10^{-9} М) [13]. На стабильность комплекса белок-металлохелатный сорбент оказывает влияние доступность тэга и общее количество остатков аминокислот, обладающих сродством к лиганду, на поверхности белка. Если тэг хорошо доступен для металлохелатного лиганда, то МХАХ можно проводить в относительно жестких условиях при высокой ионной силе, высоких концентрациях мочевины, гуанидин-хлорида и т.д., что эффективно уменьшает неспецифическую сорбцию балластных белков и повышает чистоту целевого белка.

1.3. Преимущества и недостатки МХАХ

Самая важная особенность метода металлохелатной хроматографии в сочетании с применением His-тэгов заключается в высокой селективности связывания с иммобилизованным ионом металла и относительно низком влиянии других компонентов буферных растворов на процесс очистки.

МХАХ обладает уникальными характеристиками, объясняющими широкое распространение этого метода для очистки белков:

- 1) МХАХ во многих случаях позволяет получать высокоочищенные белки в одну стадию;
- 2) По сравнению с сорбентами, применяемыми в других методах аффинной хроматографии, сорбенты для МХАХ имеют более высокую емкость;
- 3) Один ион металла может быть легко заменен на другой, что позволяет изменять и оптимизировать специфичность сорбента;
- 4) Метод очень удобен для концентрирования белков;
- 5) Метод совместим с буферными растворами с высокой

ионной силой и с хаотропными соединениями;

6) Так как для взаимодействия с сорбентом третичная структура His₆-тэга не важна, можно применять МХАХ для очистки как нативных, так и денатурированных белков;

7) Тэги, применяемые в МХАХ, небольшие, редко обладают антигенной активностью, не заряжены при физиологических значениях рН и обычно не нарушают структуру белка.

Основные недостатки метода связаны с ионами металлов, применяемых для селективного связывания гистидин-богатых природных и меченых тэгами рекомбинантных белков. Среди основных недостатков можно выделить:

- 1) Явление переноса иона металла;
- 2) Загрязнение препарата белка ионами металла;
- 3) Повреждение белков;
- 4) Необходимость удаления тэга.

При хроматографии некоторые белки могут захватывать ионы металлов из хелатного комплекса. Это явление получило название «перенос иона металла» (англ. metal ion transfer). Это приводит к снижению сорбции белка на колонке и недостаточной очистке. Другой проблемой, связанной с переносом иона металла, является включение иона металла в структуру белка, что может привести к снижению активности фермента или даже его инактивации. Для предотвращения переноса иона металла рекомендуется применение сорбентов с тетра- или пентадентатными хелаторами.

Во время МХАХ ионы металла могут вымываться из сорбента и загрязнять препарат белка. Такие ионы, как Ni²⁺ и Co²⁺, широко применяемые в МХАХ, обладают канцерогенным эффектом, хотя их действие гораздо менее выражено, чем, например, у шестивалентного хрома. Ионы металла в препарате белка могут провоцировать образование перекисных соединений, вызывать окисление белков и приводить к снижению их стабильности. Удаление остаточных или адсорбированных ионов металлов может быть достигнуто повторной хроматографией на незаряженных

сорбентах для МХАХ или добавлением в пробирки для сбора элюатов хелатирующих агентов, таких как ЭДТА. Поскольку МХАХ чаще всего применяется как первый этап очистки белков, ионы металлов могут удаляться на последующих этапах очистки.

Ионы металла в сорбенте могут вызывать окислительно-восстановительные реакции во время проведения хроматографической очистки белка. Некоторые аминокислоты, особенно гистидин, лизин, цистеин, пролин, аргинин и метионин, восприимчивы к катализируемым металлами реакциям окисления (особенно в случае сорбентов заряженных Cu^{2+}), в результате которых образуются высокореактивные радикальные промежуточные соединения, повреждающие белки. В таких случаях замена Cu^{2+} с высокой окислительно-восстановительной активностью на менее активный ион металла, например, Zn^{2+} , может предотвратить или, по крайней мере, минимизировать повреждение белка [14]. Другим способом минимизации возможных металл-опосредованных повреждений является уменьшение времени контакта белка с сорбентом и применение «быстрых» сорбентов с большим размером частиц (90 мкм и более) позволяющих проводить хроматографию при более высокой скорости потока.

Несмотря на малый размер, His-тэг рекомбинантного белка в некоторых случаях может влиять на структуру и функциональную активность белка, что приводит к необходимости отщепления и удаления тэга и введения дополнительных стадий очистки.

1.4. Применение МХАХ

Изначально метод металлохелатной аффинной хроматографии был разработан для разделения природных белков со средством к ионам металлов. С помощью этого метода хроматографии успешно проводили очистку множества белков из природных источников: тканей животных и человека, растений, микроорганизмов, грибов и т.д. МХАХ обладает важными преимуществами над биоспецифическими методами аффинной хроматографии, основанными, например, на взаимодействии фермента и ингибитора или антигена и антитела. Небольшие хелатные лиганды, удерживающие ионы металла, стабильны в широком диапазоне растворителей и температур, поэтому они могут быть регенерированы и повторно использованы множество раз без существенного ухудшения свойств. Хелатные лиганды могут быть иммобилизованы на сорбенте с высокой плотностью, за счет этого они характеризуются высокой емкостью связывания белков. Важным преимуществом МХАХ являются и мягкие условия элюирования без применения экстремально низких значений рН, которые часто используются в биоспецифической аффинной хроматографии. Стоимость металлохелатных сорбентов, по сравнению с традиционными аффинными сорбентами, значительно ниже.

Благодаря революционным успехам технологии рекомбинантных ДНК метод МХАХ сейчас применяется в биотехнологии, молекулярной биологии и биохимии для выделения и очистки широкого спектра белков: от металлопротеинов до антител, фосфорилированных белков и рекомбинантных His-меченых белков. Принципы МХАХ лежат в основе современных методов селективной иммобилизации белков для изучения белок-белковых взаимодействий, связывания с низкомолекулярными лигандами, фракционирования протеома, детекции меченых гексагистиридиновой меткой белков, изучения топологии белковых молекул (рис. 3). Для этого хелатирующие лиганды иммобилизуют на самых разнообразных поверхностях: на частицах сорбентов, лунках

полистирольных микропланшетов, поверхности чипов для определения взаимодействия белков, кантилеверах атомно-силовых микроскопов, полистирольных микросферах.

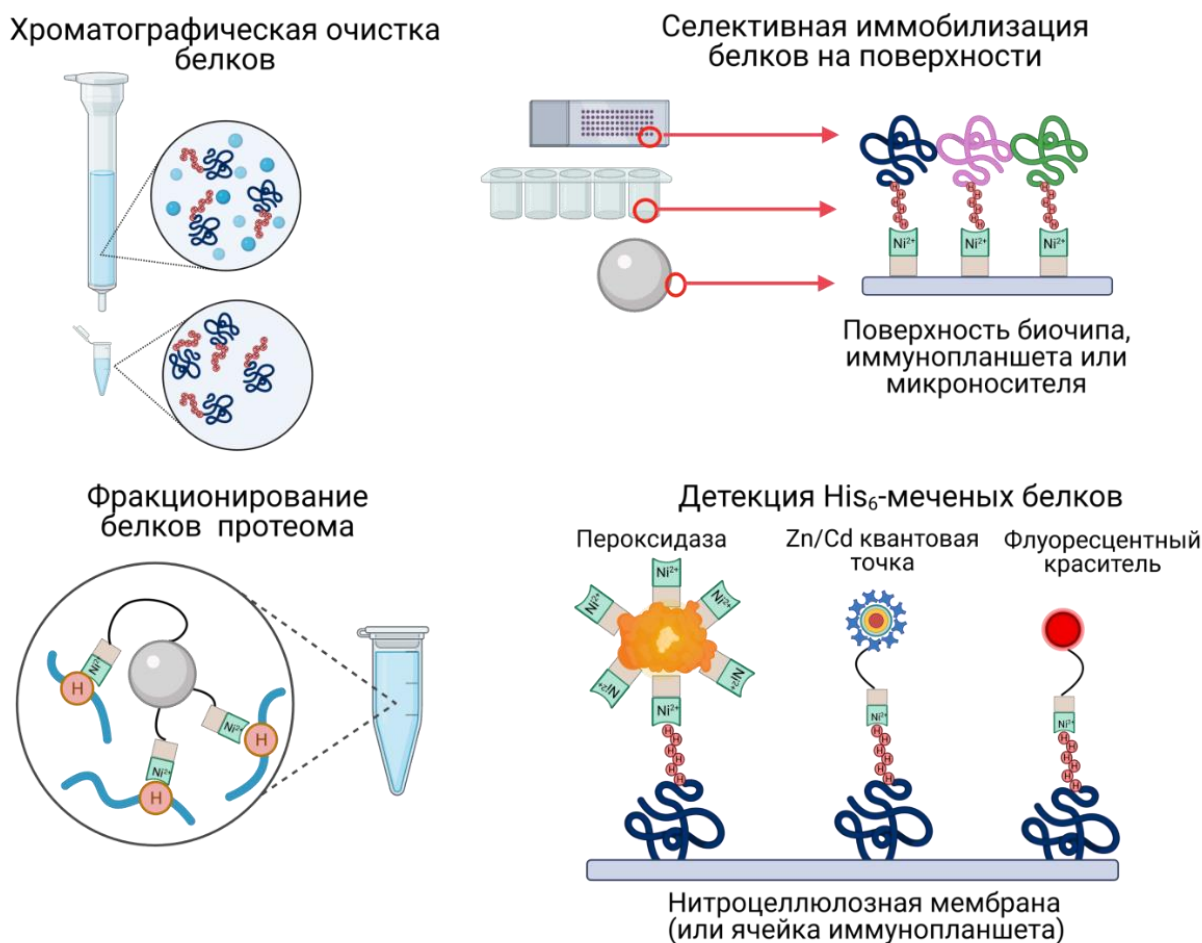


Рис. 3. Основные области применения МХАХ

1.4.1. Очистка природных белков

В природных глобулярных белках содержание гистидина невелико и составляет около 2 %, из них только 50 % экспонировано на поверхности глобулы [15]. Таким образом, средний белок, состоящий из 100 аминокислотных остатков, будет содержать только один остаток гистидина, экспонированный на поверхности. Поэтому лишь небольшое число природных белков проявляет сродство к ионам металлов и может быть очищено с применением метода металлохелатной хроматографии. Исходно МХАХ использовалась для группового разделения природных белков с низкой разрешающей способностью, но со временем

развитие этого метода привело к разработке подходов высокоспецифичного разделения схожих белков [15].

Метод металлохелатной хроматографии может применяться для очистки белков, значимых для медицины, например, иммуноглобулинов. Молекулярной основой очистки антител с помощью МХАХ является наличие эндогенного участка связывания металлов в тяжелой цепи иммуноглобулинов [16] и расположение остатков гистидина на стыке второго и третьего константных доменов тяжелой цепи антитела [17].

Очистка поликлональных IgG человека и их протеолитических фрагментов (Fc и F(ab)₂ фрагменты) на ИА-сефарозе с иммобилизованными Ni²⁺, Zn²⁺, Cu²⁺ и Co²⁺ показала, что Fc фрагмент и целая молекула IgG имеют более высокое сродство к ионам переходных металлов, чем F(ab)₂ фрагмент, и они могут быть эффективно разделены за один этап МХАХ. Преимуществом МХАХ перед традиционно применяемыми для очистки IgG аффинными сорбентами с иммобилизованными белками А и G являются мягкие условия элюирования, низкая стоимость и устойчивость металлохелатных сорбентов [18]. Было показано, что метакрилатный монолитный ИА-сорбент, заряженный ионами Cu²⁺, может связывать до 14–16 мг/мл поликлональных или моноклональных антител [19] (что, конечно, ниже емкости сорбентов на основе белка А стафилококка или белка G стрептококка – около 20 мг/мл).

Ограничением применения МХАХ для очистки природных белков является то, что не все белки обладают сродством к ионам металлов. Следует отметить, что этот недостаток может обернуться и преимуществом. Существует подход для очистки белков с использованием «отрицательной сорбции», когда препарат белка, который не обладает сродством к ионам металлов, частично очищают от контаминирующих белков, пропуская через металлохелатный сорбент. Целевой белок при этом оказывается в проскоке, а балластные белки, которые обладают таким сродством, остаются на сорбенте. Также следует учитывать, что некоторые компоненты

буферных растворов (ЭДТА, соли аммония) могут вызывать десорбцию ионов металла с сорбента. К недостаткам и проблемам, связанным с применением МХАХ, относятся также влияние окислительно-восстановительных условий внутри сорбента на стабильность металл-лигандного комплекса и возможность индуцированного металлами расщепление полипептидной цепи во время процесса очистки белка.

1.4.2. Фракционирование белков протеома

МХАХ используется в протеомных методах, где фракции клеточных белков обогащаются и анализируются дифференцированно (фосфопротеом, металлопротеом) с помощью масс-спектрометрических методов. Форматы использования МХАХ могут быть основаны на микрогранулярных носителях (в случае хроматографических сорбентов), или же хелатирующие лиганды могут быть иммобилизованы на функционализированных поверхностях, таких как чипы SELDI (лазерная десорбция/ионизация с улучшенной поверхностью, англ. surface-enhanced laser desorption/ionization).

1.4.3. Детекция His₆-меченых белков

Принципы аффинного взаимодействия между белками и ионами металлов успешно применяются для детекции белков и анализа их взаимодействий. Так, иммунологические планшеты, функционализированные хелатирующими лигандами, используются для иммобилизации His₆-меченых рекомбинатных антигенов. Это позволяет достичь ориентированного расположения антигенов и повысить чувствительность ИФА: при обычной сорбции антигенов белковые молекулы располагаются случайным образом, и часть антигенных детерминант может оказаться недоступной для иммунного связывания. Кроме того, ИФА-планшеты с иммобилизованными хелатирующими лигандами могут применяться для селективного обогащения белков, меченных гексагистиридиновым

тэгом, из раствора для последующего определения их концентрации. Также функционализация поверхности хелатирующими лигандами применяется в методе поверхностного плазмонного резонанса и позволяет иммобилизовать His₆-меченые белки для количественных функциональных и кинетических исследований.

1.4.4. Селективная иммобилизация белков

Хелатирующие лиганды, применяемые для МХАХ, успешно используются в иммунологических методах вместо антител для детекции His-меченых белков, например, в вестерн-блоте, дот-блоте или ИФА. В этом случае применяют остатки нитрилотриуксусной кислоты (NTA), конъюгированные с репортерными ферментами (пероксидазой хрена, щелочной фосфатазой) для хромогенной или хемилюминесцентной детекции [20] или с квантовыми точками для флуоресцентной визуализации меченых полигистидиновым тэгом рекомбинантных белков [21].

1.4.5. Матрица-опосредованный рефолдинг

При экспрессии рекомбинантных белков в клетках *E.coli* сворачивание экспрессируемого белка может нарушаться, и белки образуют нерастворимые агрегаты – тельца включения (англ. inclusion bodies). При этом происходит потеря нативной конформации и биологической активности. В некоторых случаях третичная структура таких белков может быть восстановлена путем ресольюбилизации агрегатов и рефолдинга – процесса повторной укладки полипептидной цепочки в трехмерную структуру. Обычно такая процедура проводится методом растворения осадка в концентрированных растворах хаотропных агентов (8 М мочевины или 6 М гуанидинхлорида) с последующим медленным снижением концентрации хаотропных агентов в буфере путем ступенчатого диализа против серии растворов с понижающей концентрацией хаотропных агентов. Однако эффективность такой процедуры невысока, и выход активного белка редко превышает 30 %.

Перспективным выглядит способ возвращения нативной трехмерной структуры белка путем иммобилизации рекомбинантного белка через His-тэг на металлохелатном сорбенте и проведения всех этапов сольюбилизации и ренатурации на колонке. Рефолдинг происходит путем подачи на колонку нисходящего градиента концентрации хаотропных агентов. По окончании процедуры ренатурации белок элюируется раствором с повышенной концентрацией имидазола.

1.4.6. Хроматографическая очистка His₆-меченых белков

Наиболее важным аспектом применения МХАХ является очистка рекомбинантных белков, экспрессирующихся в виде белка, слитого с аффинной меткой из 6 или более остатков гистидина – His-тэга. Благодаря высокой аффинности и специфичности His-тэга, одна стадия очистки с применением МХАХ в большинстве случаев приводит к получению препарата целевого белка довольно высокой чистоты. Особо ценным свойством МХАХ является возможность ее применения для очистки как нативных, так и денатурированных белков. Это позволяет фракционировать нерастворимые в водных буферах белки из телец включения, мембранные белки и др. Сочетание достижений технологии рекомбинантных ДНК и химических технологий позволяет подбирать различные варианты расположения и виды тэгов, сорбентов и способов проведения МХАХ. Эти возможности дают исследователям мощный инструмент для решения задач современной биотехнологии, молекулярной биологии и медицины.

1.5. Вопросы для самоконтроля

- 1) Назовите принцип, лежащий в основе металлохелатной аффинной хроматографии.
- 2) Какие существуют приложения метода металлохелатной хроматографии?
- 3) Какие преимущества дает селективная иммобилизация рекомбинантных белков на поверхности иммунологических планшетов?

- 4) Какими преимуществами обладает МХАХ, по сравнению с методами биоспецифической аффинной хроматографии?
- 5) Какой диапазон констант диссоциации лиганда и очищаемого белка является оптимальным для аффинной хроматографии?
- 6) С какими аминокислотами сильнее всего связываются металлохелатные сорбенты?
- 7) Какие есть недостатки у МХАХ, как их можно преодолеть?

1.6. Рекомендованная литература

- 1) Chaga, G.S. Twenty-five years of immobilized metal ion affinity chromatography: past, present and future / G.S. Chaga // *J. Biochem. Biophys. Methods.* – 2001. – V. 49. – P. 313–334.
- 2) Sulkowski, E. The saga of IMAC and MIT / E. Sulkowski // *Bioessays.* – 1989. – V. 10 – № 5. – P. 170-175.
- 3) Block, H. Immobilized-metal affinity chromatography (IMAC): a review / H. Block, B. Maertens, A. Spriestersbach и др. // *Methods in enzymology.* – 2009. – V. 463. – P. 439–473.
- 4) Sun, X. Application of immobilized metal affinity chromatography in proteomics / X. Sun, J.-F. Chiu, Q.-Y. He // *Expert review of proteomics.* – 2005. – V. 2 – № 5. – P. 649–657.
- 5) Ueda, E. Current and prospective applications of metal ion–protein binding / E. Ueda, P. Gout, L. Morganti // *Journal of chromatography A.* – 2003. – V. 988 – № 1. – P. 1–23.
- 6) *Affinity chromatography: principles and methods.* – Uppsala: GE Healthcare Bio-Sciences AB, 2007. – 159 P.
- 7) Gaberc-Porekar, V. Perspectives of immobilized-metal affinity chromatography / V. Gaberc-Porekar, V. Menart // *Journal of biochemical and biophysical methods.* – 2001. – V. 49 – № 1–3. – P. 335–360.
- 8) Лопатин, С. Лигандообменная хроматография белков и ферментов / С. Лопатин, В. Варламов, В. Даванков // *Биоорганическая химия.* – 1990. – Т. 16 – № 6. – С. 26.

ГЛАВА 2

Свойства сорбентов для МХАХ

2.1. Выбор иона металла

Основными свойствами МХАХ являются обратимость процессов комплексообразования и высокая скорость обмена лигандами. Координационные связи между разделяемыми лигандами и комплексообразующим ионом металла должны легко формироваться и разрушаться, таким образом, необходима кинетическая лабильность комплекса. Этому требованию удовлетворяют комплексы ионов переходных металлов; по прочности образуемых комплексов с ИА двухвалентные ионы располагаются в ряд: $\text{Cu}^{2+} > \text{Ni}^{2+} > \text{Zn}^{2+} > \text{Co}^{2+} > \text{Hg}^{2+} > \text{Cd}^{2+} > \text{Fe}^{2+} > \text{Mn}^{2+}$. Эта закономерность сохраняется и для иммобилизованных ионов металлов в случае МХАХ белков. Прочность комплексов меди настолько велика, что белок может связываться за счет единственного остатка гистидина. Сродство к другим ионам металлов характерно для белков, имеющих в структуре сближенные остатки гистидина. Белки с расположенными рядом остатками гистидина одинаково хорошо сорбируются на ИА-сорбентах в Ni^{2+} - и Zn^{2+} -формах и проявляют сродство к Co^{2+} -, Fe^{2+} -, и Cd^{2+} -ИА сорбентам [8, 22]. Если белок связывается с ИА-сорбентом, заряженным ионами какого-то металла, то он будет сорбироваться и на сорбенте с иммобилизованными металлами, стоящими левее в ряду прочности образования комплексов. Если белок способен связываться с ионами нескольких металлов, следует для очистки выбирать сорбент, заряженный тем металлом, который стоит правее в ряду прочности образуемых комплексов. Таким образом, будет использоваться сорбент с максимальной селективностью по отношению к целевому белку (емкость для контаминирующих белков будет меньше), и это позволит проводить элюирование в наиболее мягких условиях [8] (рис. 4).

Различие в аффинности белков к ионам металлов может быть частично объяснено принципом жестких кислот и оснований Пирсона [11, 14]. Эта теория утверждает, что, когда два атома образуют связь, один атом действует как кислота Льюиса, а другой как основание

Льюиса. Прочность связи определяется характеристиками «жесткости» или «мягкости» задействованных атомов. Теория Пирсона постулирует, что наиболее прочными являются связи между атомами со схожими свойствами, то есть между жестким основанием и жесткой кислотой, мягким основанием и мягкой кислотой.

Согласно этому принципу, такие ионы как K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} и Fe^{3+} рассматриваются как жесткие кислоты Льюиса, а одновалентные ионы металлов Ag^+ и Cu^+ – как мягкие кислоты Льюиса. Ионы переходных металлов Co^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} и Ni^{2+} рассматриваются как промежуточные кислоты и чаще всего используются в МХАХ. Особенно часто применяются ионы Ni^{2+} , так как двухвалентные ионы никеля обладают координационным числом 6, электрохимически стабильны при хроматографии, имеют промежуточный уровень поляризуемости и редокс-стабильности [11].

Лиганды также могут быть классифицированы согласно принципу Пирсона. Лиганды, содержащие кислород (карбоксильные группы), алифатический азот (аспарагин и глутамин) и фосфор (фосфорилированные аминокислоты), определяются как жесткие основания Льюиса. Лиганды, содержащие серу (цистеин), классифицируются как мягкие основания, содержащие ароматический азот (гистидин и триптофан) – как промежуточные основания. Промежуточные кислоты Co^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} и Ni^{2+} предпочитают координировать соединения с ароматическим азотом, которые являются промежуточными основаниями, и серосодержащие соединения (мягкие кислоты). При выборе иона металла для МХАХ следует также учитывать, что ионы цинка и никеля (Ni^{2+} и Zn^{2+}) электрохимически стабильны в условиях, используемых в МХАХ, а ионы меди и кобальта (Cu^{2+} и Co^{2+}) могут быть легко восстановлены или окислены.

Выбор иона металла зависит и от приложения МХАХ. Ионы трехвалентных металлов, Al^{3+} , Ga^{3+} и Fe^{3+} и четырехвалентного иона циркония (Zr^{4+}) применяют для связывания фосфопротеинов и фосфопептидов. Ионы двухвалентных металлов Ni^{2+} , Zn^{2+} , Co^{2+} , Cu^{2+}

используют для очистки рекомбинантных белков, меченых His-тэгом, и природных белков, богатых гистидином.

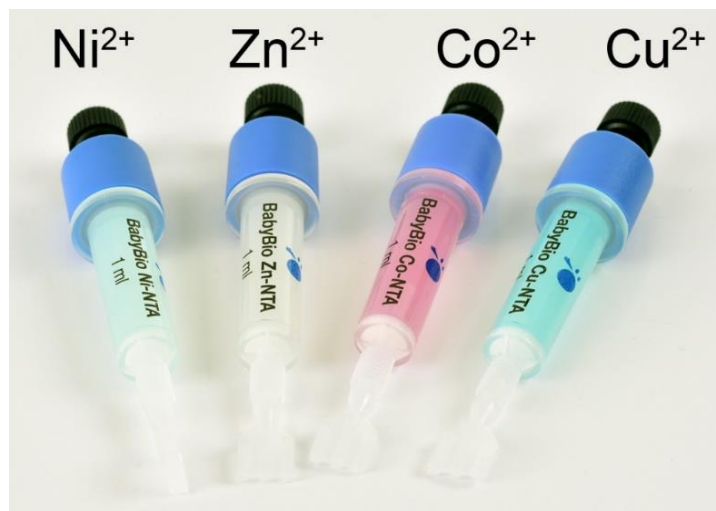


Рис. 4. Колонки с металлохелатным NTA сорбентом, заряженные разными ионами металлов (печатается с разрешения правообладателя, BioWorks, Швеция)

Наиболее предпочтительным для получения высокоочищенных белковых препаратов с высоким выходом является применение тетрадентатного лиганда NTA, который обеспечивает сильное связывание иона металла с двумя свободными координационными сайтами (Ni^{2+} , Co^{2+}) для связывания белков [23].

2.2. Хелатирующие лиганды

Термин «хелаты» (греч. chelate – клешня) обозначает внутрикомплексные соединения, которые образуются при взаимодействии ионов металлов с полидентатными (то есть имеющими несколько донорных центров) лигандами. Такие полидентатные соединения называют хелаторами, к ним относится, например, этилендиаминтетрауксусная кислота (ЭДТА), широко применяемая в научных исследованиях, медицине и промышленности. Хелатор, с одной стороны, обеспечивает иммобилизацию иона металла на матриксе сорбента, и с другой стороны, модулирует специфичность и силу взаимодействия иона металла с целевым белком.

Для того, чтобы максимально крепко удерживать ион металла, не допуская переноса на другую молекулу, хелатор должен быть мультидентатным, и количество нуклеофильных атомов должно превышать количество координационных сайтов иона металла. Однако это значительно уменьшает сродство иона металла к очищаемым пептидам или белкам, и такой хелатор невозможно использовать для очистки белка. Хелатор с противоположным свойством, то есть предоставляющий максимальное количество свободных координационных сайтов для белков и связанный с ионом металла только по одному координационным сайту (монодентатный хелатор), не будет надежно удерживать ион металла на носителе. Таким образом, при выборе хелатора приходится находить баланс между этими противоположными требованиями, и чаще всего хелаторы, применяемые в МХАХ, обладают промежуточными свойствами: средним и сильным удерживанием иона металла и сильным или средним связыванием целевого белка. Варьируя тип хелатора и ион металла, можно добиться разного сочетания специфичности и емкости сорбента (рис. 5).

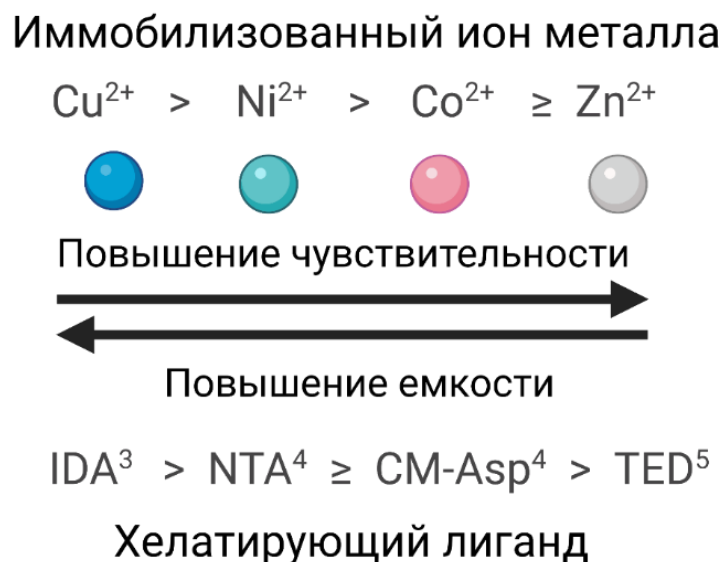


Рис. 5. Связь иммобилизованного иона и хелатирующего лиганда со специфичностью и емкостью сорбента

Большинство хелаторов, используемых в МХАХ, являются мультидентатными соединениями, обеспечивающими сильную связь

с ионом металла для предотвращения его потери во время хроматографического процесса. В то же время эти хелаторы обеспечивают наличие свободных сайтов координируемых металлов. Донорами электронов в самых распространенных хелатирующих лигандах служат карбоксильные ($-\text{COOH}$) и третичные аминогруппы.

Типичными хелаторами, применяемыми в современных сорбентах для МХАХ, служат NTA, нитрилотриуксусная кислота (англ. Nitrilotriacetic acid), и IDA, имидиндиуксусная кислота (англ. Iminodiacetic acid). Применяют и другие хелаторы: TED – трис(карбоксиметил)этилендиамин (англ. Tris(carboxymethyl) ethylenediamin), CM-Asp – карбоксиметиласпартат (англ. Carboxymethyl aspartate). Помимо вышеперечисленных лигандов, для иммобилизации иона металла для МХАХ было синтезировано множество сорбентов на основе других хелаторов, в том числе ЭДТА.

При хелатировании ионов металлов донорами электронов, помимо карбоксильной и аминогрупп, могут выступать и другие соединения, отличающиеся по химической структуре от карбоксиметилированных аминосоединений (IDA, NTA, CM-Asp и TED) [11]. К таким соединениям относятся, например, бидентатный лиганд 8-гидроксихинолин (8-HQ) [24], тридентатные лиганды *o*-фосфосерин (OPS) и активный азокраситель «желтый светопроочный 2КТ» [25]. Для улучшения доступности для целевого белка хелаторы чаще всего присоединяются к частицам сорбента через линкерную последовательность или спейсер. Формулы некоторых соединений, применяемых в качестве хелатирующих лигандов в металлохелатной аффинной хроматографии, представлены на рисунке 6 (формула 8-гидроксихинолина приведена в виде производного с ароматическим спейсером для иммобилизации на сорбенте).

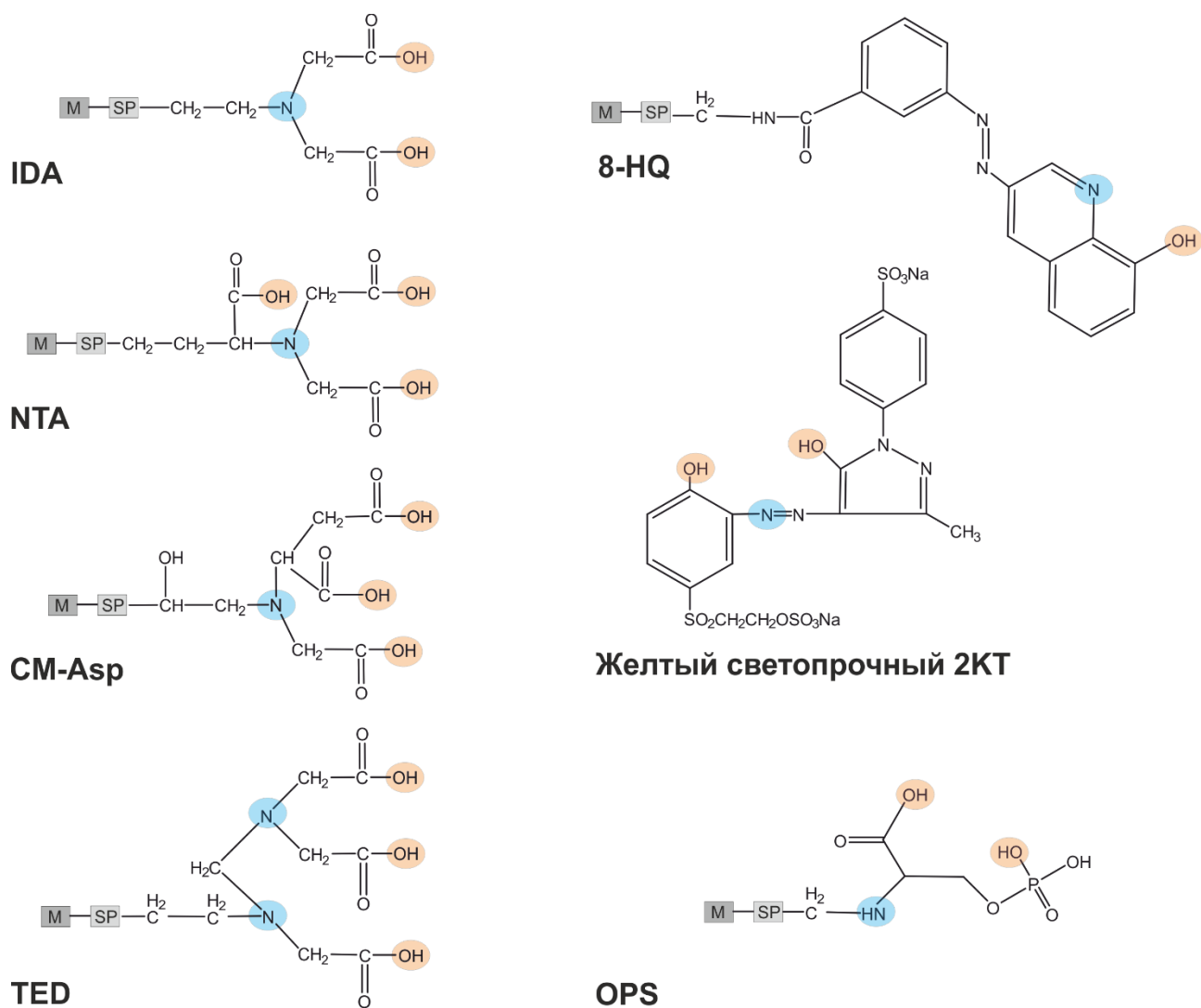


Рис. 6. Химические структуры некоторых типичных (IDA, NTA, CM-Asp и TED) и альтернативных хелаторов (8-HQ, Желтый светопрочный 2 КТ, OPS); группы, участвующие в образовании координационной связи, обозначены цветной заливкой

Лиганды NTA и CM-Asp координируют ион Ni^{2+} с четырьмя валентностями (тетраденатная координация, координационное число 4), и две валентности доступны для взаимодействия с имидазольными кольцами остатков гистидина. Лиганд TED координирует Ni^{2+} с пятью валентностями (пентаденатная координация, координационное число 5), и для взаимодействия с имидазольными кольцами остатков гистидина остается только одна валентность (рис. 7).

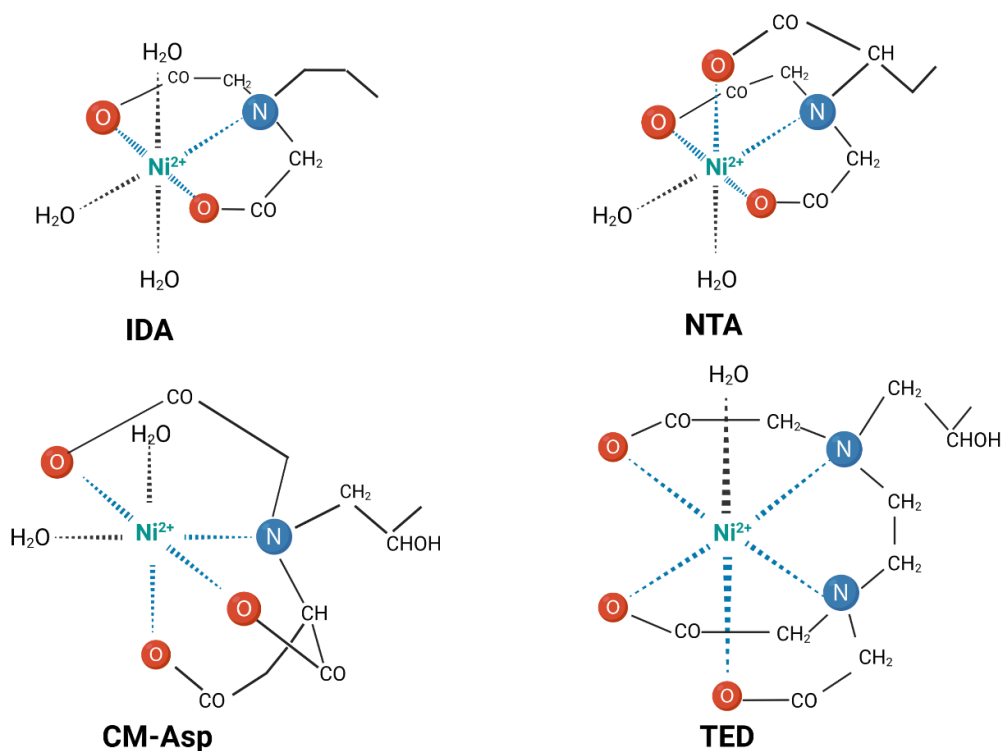


Рис. 7. Предполагаемые структуры некоторых типичных хелаторов в комплексе с ионом Ni^{2+} ; группы, участвующие в образовании координационной связи, обозначены цветной заливкой

Координационное число хелатора, по-видимому, играет важную роль в качестве очищенного белкового препарата. В то время как выход белка обычно не отличается для сорбентов на основе IDA и NTA, в целом, наблюдается более высокое вымывание ионов металла из лигандов IDA, по сравнению с NTA, особенно в восстанавливающих условиях. опыты показали, что содержание сошедшего с сорбента на основе NTA и IDA иона металла в элюатах примерно одинаковое, но с IDA сорбента вымывается значительно больше ионов металла на стадиях промывания и уравнивания. Помимо большей потери ионов металла, белковые препараты, очищенные на IDA-сорбентах, обычно менее чистые, по сравнению с очищенными на Ni-NTA [23]. Возможно, причина большего содержания контаминирующих белков при применении IDA-сорбентов кроется в вымывании ионов металла. При этом

координирующие карбоксильные группы хелатора начинают функционировать как слабые катионообменники и связывать балластные белки с положительно заряженными участками. Меньше всего потеря ионов металла наблюдается при использовании пентадентаного лиганда TED, но его применение сопряжено также и с понижением емкости сорбента из-за того, что для связи с белком остается только одна координационная валентность.

Предполагается, что взаимодействие между ионом металла с остатками гистидина происходит через один остаток, то есть по модели « n и n_{+2} » (рис. 8). Но так как His-тэги обычно не структурированы и, следовательно, гибки, могут быть и другие паттерны взаимодействия, такие как « n и n_{+3} », « n и n_{+4} » и т.д. Это подтверждается тем, что металлохелатный сорбент способен связывать белки, в которых гистидин чередуется с другими аминокислотными остатками, например, в таких тэгах, как HQ-тэг (HQHQHQ), HN-тэг (HNHNHNHNHNHN) или NAT-тэг (KDHLINNVNKEENANANK).

Тип используемого хелатора может оказать большое влияние на процесс очистки. Ввиду существования феномена переноса иона металла некоторые белки и компоненты буферных растворов могут разрушать связь между ионом металла и хелатором, при этом очищаемый белок не может удерживаться на аффинном сорбенте и сходит с колонки. В таких случаях необходимо либо уменьшить концентрации этих компонентов до безопасного уровня (например, разбавлением, диафильтрацией или гель-фильтрацией), либо использовать сорбенты с хелаторами, обеспечивающими очень сильное связывание иона металла. Примерами таких сорбентов могут служить сорбенты Ni Sepharose Excel (Cytiva, США) и WorkBeads NiMAC (Bio-Works, Швеция) с пентадентатными хелаторами. Данные сорбенты, заряженные ионами никеля, позволяют проводить очистку в присутствии 10 мМ ЭДТА и до 5-10 мМ ДТТ и характеризуются чрезвычайно крепкой связью между ионом металла и хелатирующим лигандом.

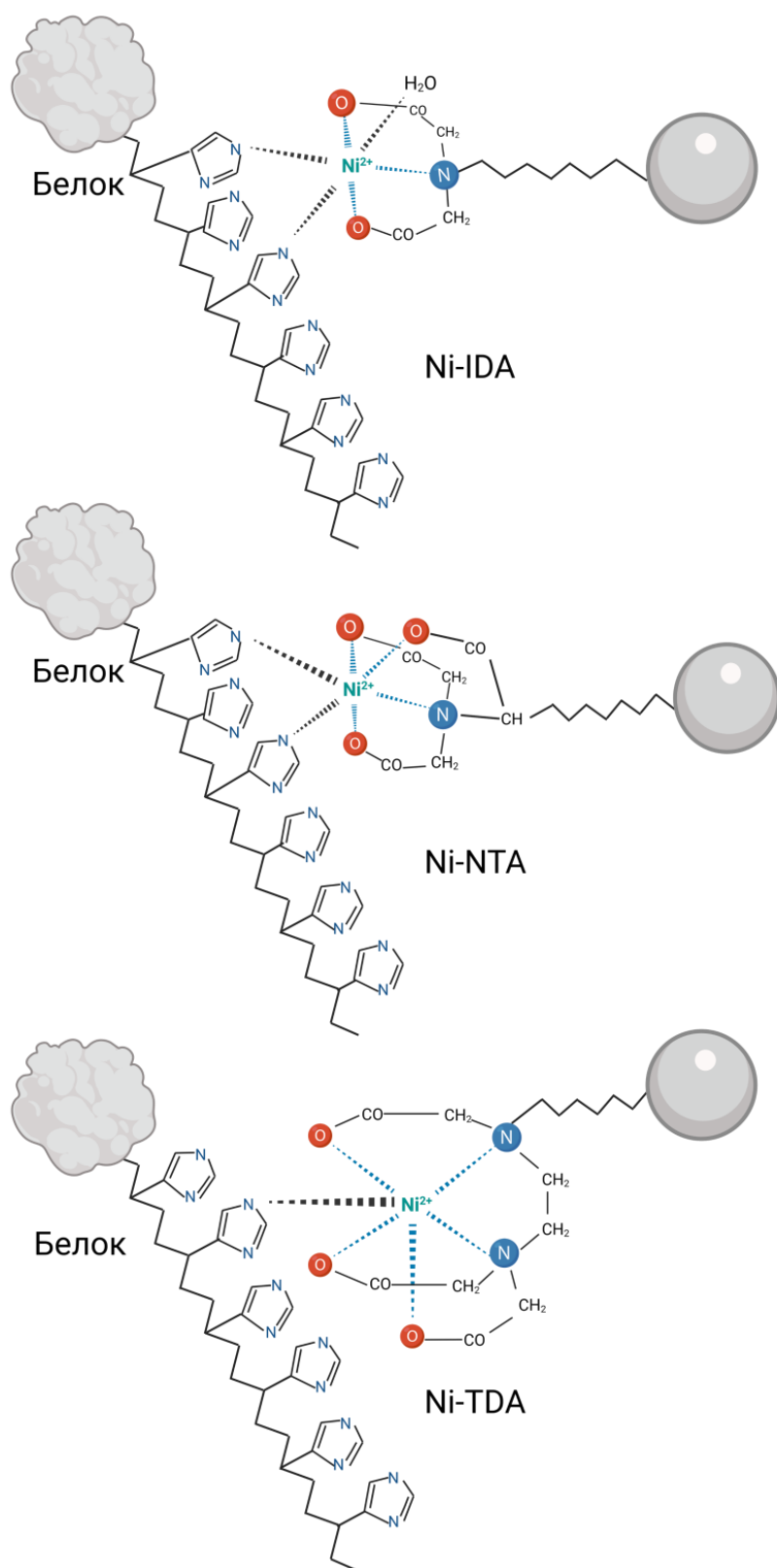


Рис. 8. Модель взаимодействия между остатками гистидина His-тэга и ионами металлов в три- (IDA), тетра- (NTA) и пентадентатном (TED) лигандах

2.3. Вопросы для самоконтроля

- 1) Приведите примеры хелатных соединений;
- 2) Ион какого переходного металла проявляет максимальное сродство к гистидину?
- 3) Ионы каких металлов применяют для связывания фосфопротеинов?
- 4) Приведите примеры тетрадентатных хелатирующих лигандов для металлохелатной аффинной хроматографии;
- 5) Какие группы служат донорами электронов в таких распространенных хелатирующих лигандах, как NTA, IDA и TED?
- 6) Приведите примеры хелаторов, по химической структуре не являющихся карбоксиметилированными аминосоединениями;
- 7) Как связано координационное число хелатора, прочность связывания металла и емкость сорбента?
- 8) Как происходит взаимодействие иона металла с остатками гистидина в тэге?
- 9) Как располагаются ионы переходных металлов (цинк, никель, кобаль и медь) в ряду прочности комплексов с IDA?
- 10) Какой хелатирующий лиганд прочнее связывает ион металла: TED, NTA или IDA?
- 11) Какая взаимосвязь между дентатностью хелатора и емкостью сорбента на его основе?

2.4. Рекомендованная литература

- 1) Block, H. Immobilized-metal affinity chromatography (IMAC): a review / H. Block, B. Maertens, A. Spriestersbach и др. // *Methods in enzymology*. – 2009. – V. 463. – P. 439–473.
- 2) Ueda, E. Current and prospective applications of metal ion–protein binding / E. Ueda, P. Gout, L. Morganti // *Journal of chromatography A*. – 2003. – V. 988 – № 1. – P. 1–23.
- 3) Лопатин, С. Лигандообменная хроматография белков и ферментов / С. Лопатин, В. Варламов, В. Даванков // *Биоорганическая химия*. – 1990. – Т. 16 – № 6. – С. 26.
- 4) Hochuli, E. New metal chelate adsorbent selective for proteins and peptides containing neighbouring histidine residues / E. Hochuli, H. Döbeli, A. Schacher // *Journal of Chromatography A*. – 1987. – V. 411. – P.177–184.
- 5) Kagedal, L. Immobilized Metal Ion Affinity Chromatography / L. Kagedal // *Protein Purification. Principles, High Resolution Methods, and Applications*; Janson J. C. (ed.). – John Wiley & Sons: 2012. – 532 P.

ГЛАВА 3

Тэги для МХАХ

3.1. Виды и особенности тэгов для МХАХ

Структура тэга, то есть его положение, последовательность и длина, может влиять на получение рекомбинантного белка на нескольких уровнях: скорости экспрессии, доступности для связывания с хелатирующим лигандом сорбента, трехмерной структуры белка, кристаллизации белка и, хотя и в незначительной степени, растворимости и активности [23]. Было показано, что двух остатков гистидина достаточно для связывания с сорбентом Ni-NTA-сефароза [26].

На заре развития металлохелатной хроматографии рекомбинантных белков исследователи разработали многочисленные гистидиновые метки, начиная с очень коротких, например, His-Trp, используемый для выделения проинсулина [27], до полипептидного (Ala-His-Gly-His-Arg-Pro)₈ для очистки различных модельных белков [28]. Исходно тэги для МХАХ разрабатывались на основе последовательности природных белков, например, октапептид, полученный из ангиотензина I, был слит с N-концом TEM-бета-лактамазы и экспрессировался в *E. coli* в форме телец включения [14]. Были разработаны тэги, содержащие несколько остатков гистидина в вариантах (His-X)_n и (His-X₃-His)_n, где X – любая аминокислота, а также показана их эффективность для очистки белков методом металлохелатной хроматографии. Но после революционных работ Nochuli с соавторами [6, 7], предложивших метку из 6 остатков гистидинов, такой тэг стал применяться повсеместно и стал самым используемым.

Таким образом, наиболее распространенная форма His-метки состоит из шести последовательных остатков гистидина (His₆) и обеспечивает достаточно высокое количество металлсвязывающих сайтов, что в большинстве случаев приводит к стабильному связыванию. Небольшой по размеру His₆ (0,84 кДа) при pH 8,0 не заряжен и обычно не влияет на секрецию, компартиментализацию или укладку слитого белка внутри клетки.

В некоторых случаях применение более длинных полигистидиновых тэгов, таких как His₈ или His₁₀, позволяет достичь более высокой чистоты рекомбинантного белка за счет более сильной связи с сорбентом и возможности более жестких условий отмывки. Однако увеличение длины тэга сопряжено с повышением вероятности влияния тэга на структуру белка, его олигомерное состояние, растворимость. Протяженные тэги из-за подвижности могут препятствовать биологическим функциям белка, экранируя важные области. Также такие тэги могут в некоторых случаях отрицательно влиять на уровень экспрессии белка. Главное положительное качество протяженных тэгов – повышение сродства к иммобилизованному металлу – может обернуться и отрицательным, так как для элюирования целевого белка, связанного на колонке, потребуется большее количество имидазола. Например, было показано, что при очистке рекомбинантного белка AqpZ, слитого с меткой His₁₀ на Co²⁺-НТА, для элюирования меченного His₁₀ белка AqpZ требовалось 500 мМ имидазола вместо 100 мМ имидазола, которого было достаточно для элюции версии с тэгом His₆ [29]. Воздействие высокой концентрации имидазола нежелательно для некоторых белков ввиду их особой чувствительности к имидазолу, то есть они могут стать нестабильными в растворе, содержащем большое количество имидазола [30]. Таким образом, для большинства случаев тэг из 6 гистидинов является оптимальным.

Предполагается, что взаимодействие между ионом металла с остатками гистидина происходит через один остаток, то есть по модели «n и n₊₂» (рис. 6). Ввиду неструктурированности и подвижности полигистидинового тэга возможны и другие варианты связывания: n:n₊₁, n:n₊₃, n:n₊₄ и т.д. Интересно отметить, что для специфического связывания необязательно последовательное расположение гистидиновых остатков в тэге: между остатками гистидина могут располагаться другие аминокислотные остатки без значительной потери аффинности. Хотя гистидин проявляет наибольшую степень сродства к ионам металлов, другие аминокислоты, например, триптофан и цистеин, тоже могут эффективно взаимодействовать с сор-

бентом для металлохелатной аффинной хроматографии. Поэтому возможно применение тэгов с остатками гистидина, чередующимися с другими аминокислотами, или даже на основе тэгов, не содержащих гистидин (табл. 2).

Таблица 2

**Примеры последовательностей тэгов для МХАХ
(из [23] с изменениями)**

Тэг		Ссылка/Экспрессионная система
НННННН	H ₆	Hochuli с соавт. (1988) [6]
НННННННН	H ₈	pQE-TriSystem, pTriEx
НННННННННН	H ₁₀	pQE-TriSystem-5, -6
НННННННННННННН	H ₁₄	Pedersen с соавт. (1999) [31]
HQHQNQHQNQHQNQ	(HQ) ₆	Pedersen с соавт. (1999) [31]
HNHNHNHNHNHNHN	(HN) ₆	Патент США №7176298
HGHGHGHGHGHGHQ	(HG/Q) ₆	Pedersen с соавт. (1999) [31]
HNQHNANHG	(HNH) ₃	Pedersen с соавт. (1999) [31]
KDHLIHNVNKENANANNK	HAT	Imai с соавт. (2001) [32] Патент США №7176298
(HX*) ₃₋₆	(HX*) _n	Патент США №5594115
HX ₁ HRHX ₂ H ^{**}	(HXH) ₂ R	Заявка на патент США №2004/0029781
HNRYGCGCC		Enzelberger с соавт. (2000) [33]

* – X может быть D, E, P, A, G, V, S, L, I, или T

** – X₁ может быть A, R, N, D, Q, E, I, L, F, P, S, T, W, V; X₂ может быть A, R, N, D, C, Q, E, G, I, L, K, M, P, S, T, Y, V.

Несмотря на большое разнообразие разработанных тэгов, обладающих сродством к ионам металлов, His₆ остается наиболее широко применяемым тэгом для МХАХ. Ввиду небольшого размера, нуклеотидная последовательность тэга может быть легко введена в последовательность гена, кодирующего рекомбинантный белок, методом ПЦР в составе праймеров. Также существует большое число плазмидных векторов с включенными участками, кодирующими His-тэги.

В зависимости от цели получения рекомбинантного белка, структурных особенностей, методов, выбранных для удаления тэга, His₆-тэг может располагаться на *N*- или *C*-концевом участке или даже в петлевой области внутри полипептидной цепочки белка. Часто His-тэг сочетают с другими тэгами — SET-тэгами (англ. SET – solubility-enhancement tags), способствующими растворимости рекомбинантного белка, или с другими аффинными тэгами, располагая их в противоположных концах последовательности белка. Если после очистки требуется удалить тэг, следует иметь в виду, что большинство доступных протеаз могут эффективно удалять His₆-тэг только с *N*-конца. Размещение гистидинового тэга на карбоксильном *C*-конце гарантирует, что только полноразмерный белок будет связываться с металлохелатным сорбентом. На *C*-концевом участке тэг располагают и в случае получения секретлируемых белков, так как для секреции на *N*-концевом участке необходимо наличие лидерного пептида, который удаляется при транслокации белка через мембрану. Благодаря небольшому размеру His₆-тэг может быть использован в сочетании с белками-партнерами, усиливающими растворимость, или с другими аффинными тэгами.

3.2. Отщепление полигистидинового тэга

При необходимости полигистидиновый тэг может быть отщеплен путем протеолитического или химического гидролиза. Для этого в состав генетической конструкции включают последовательность, кодирующую линкерный участок, распознаваемый высокоспецифическими протеазами, либо сайты для гидролиза химическими реагентами (такими как бромциан, гидроксилламин). Наиболее популярные современные линкеры – участки расщепления вирусными эндопротеазами (TEV-протеазой и 3С-протеазой), также применяют сайты расщепления тромбином, энтеропептидазой (энтерокиназой) и экзопептидазами, последовательно удаляющими аминокислотные остатки с *C*- или *N*-конца полипептидной цепи белка (рис. 9, табл. 3).

Эндопротеазы



Экзопротеазы

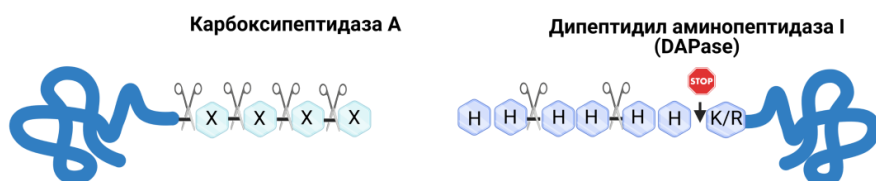


Рис. 9. Основные протеолитические ферменты, применяемые для отщепления полигистидинового тэга

Таблица 3

Протеазы, применяемые для отщепления тэгов

Протеазы	Источник (производитель)	М, кДа	Сайт гидролиза (расположение)
<i>Эндопротеазы</i>			
TEV	Вирус гравировки табака (<i>E. coli</i>)	27	ENLYFQ↓G P1' может быть разным P2' ≠ Pro (N- и C-конец)
3C	Риновирус человека (<i>E. coli</i>)	27	LEVLFQ↓GP (N-конец)
Энтерокиназа	Двенадцатиперстная кишка млекопитающих (<i>E. coli</i> , <i>S. cerevisiae</i>)	110 + 35	DDDDK↓ P1' ≠ Pro, Trp. (N- и C-конец)
Тромбин	Плазма крови (клетки CHO)	32 + 4,5	LVPR↓GS (N- и C-конец)
Фактор Ха	Плазма крови (клетки HEK293)	42 + 17	I↓EGR или I↓DGR Специфичность недостаточно высокая (N- и C-конец)

Протеазы	Источник (производитель)	М, кДа	Сайт гидролиза (расположение)
<i>Экзопротеазы</i>			
Карбоксипептидаза А	Поджелудочная железа (<i>E. coli</i> , <i>S. cerevisiae</i> , <i>S. frugiperda</i>)	33	С-концевые аминокислоты, кроме Pro, Lys и Arg (С-конец)
Карбоксипептидаза В	Поджелудочная железа (<i>E. coli</i> , <i>P. pastoris</i>)	35	С-концевые Lys и Arg (С-конец)
Дипептидиламино- пептидаза I (DAPase)	Почки человека (<i>S. frugiperda</i>)	23 + 16 + 6	N-концевые дипептиды P2 ≠ Pro, Lys, Arg P1 ≠ Pro (N-конец)

На выбор протеазы для отщепления тэга от целевого белка могут повлиять следующие факторы:

- 1) Необходимость сохранения аутентичного N- и С-конца полипептидной цепи целевого белка;
- 2) Наличие неспецифической активности протеазы;
- 3) Доступность протеазы и возможность получения рекомбинантной протеазы с аффинным тэгом;
- 4) Совместимость условий реакции гидролиза с условиями, обеспечивающими стабильность целевого белка.

Благодаря высокой специфичности, активности в присутствии детергентов и других соединений, доступности самой популярной на сегодняшний день является вирусная TEV-протеаза. Этот фермент не ингибируется PMSF, AEBSF, пепстатином А, апротинином (до 0,3 мг/мл), леупептином (до 100 мкМ), способен гидролизовать белки в присутствии 2,5 % сахарозы, 0,5 М мочевины, в присутствии хелатора ЭДТА и восстановителя ДТТ. Чаще всего TEV-протеаза используется в форме меченого полигистидиновым тэгом фермента. Это позволяет удалять фермент по окончании реакции гидролиза путем пропускания через металлохелатный сорбент. Экспрессионные плазмиды,

кодирующие TEV-протеазу, могут быть получены через сайт некоммерческого депозитария плазмид Addgene (www.addgene.org). Например, широкое распространение получила плазида pRK793 (Addgene, 8827). Данная His₆-меченая мутантная форма фермента с заменой S219V экспрессируется в виде слитого белка с N-концевым MBP-тэгом (который отщепляется во время созревания белка) и положительно заряженным C-концевым полиаргининовым тэгом.

Другой популярной вирусной протеазой является 3С (PreScission Protease, Cytiva). Протеаза 3С, в целом, проявляет такую же совместимость с компонентами буферных растворов, как и TEV-протеаза, однако более активна при 4 °С [34].

После гидролиза связи между тэгом и целевым белком протеазами TEV, 3С и тромбином на N-конце белка остаются дополнительные аминокислотные остатки. Для многих белков наличие этих небольших аминокислотных остатков не влияет на их структуру и функционирование. У большинства эндопептидаз, применяемых для отщепления тэга, специфичность определяется последовательностью аминокислотных остатков в N-концевой части гидролизуемой связи. В связи с этим при расположении тэга с C-конца целевого белка после отщепления тэга остается гораздо больше ненативных аминокислотных остатков. Так, в случае TEV- и 3С-протеазы это 6 аминокислотных остатков, поэтому для их удаления могут применяться экзопептидазы, такие как карбоксипептидазы А и В. Карбоксипептидазы типа А предпочтительно удаляют C-концевые аминокислотные остатки, имеющие ароматические или разветвленные алифатические боковые цепи, тогда как карбоксипептидазы типа В проявляют сильное предпочтение в отношении основных аминокислот. Ввиду сложной структуры карбоксипептидаз А и В получение этих ферментов в виде рекомбинантных белков затруднительно, и до сих пор практически все коммерческие препараты карбоксипептидаз получают из природных источников.

В отличие от карбоксипептидаз, экзопептидазы, гидролизующие пептидные связи с N-конца (аминопептидазы), для удаления тэгов применяются редко [34]. Единственным исключением служит дипеп-

тидиламинопептидаза I (сокращенно DAPase). Этот фермент отщепляет с *N*-концевого участка белка дипептиды до тех пор, пока не доходит до остатка аргинина (R) или лизина (K), эти аминокислоты вызывают остановку гидролиза. На основе дипептидиламинопептидазы I разработана интересная коммерческая система TAGZyme (Qiagen, Германия), принцип ее работы показан на рисунке 10.

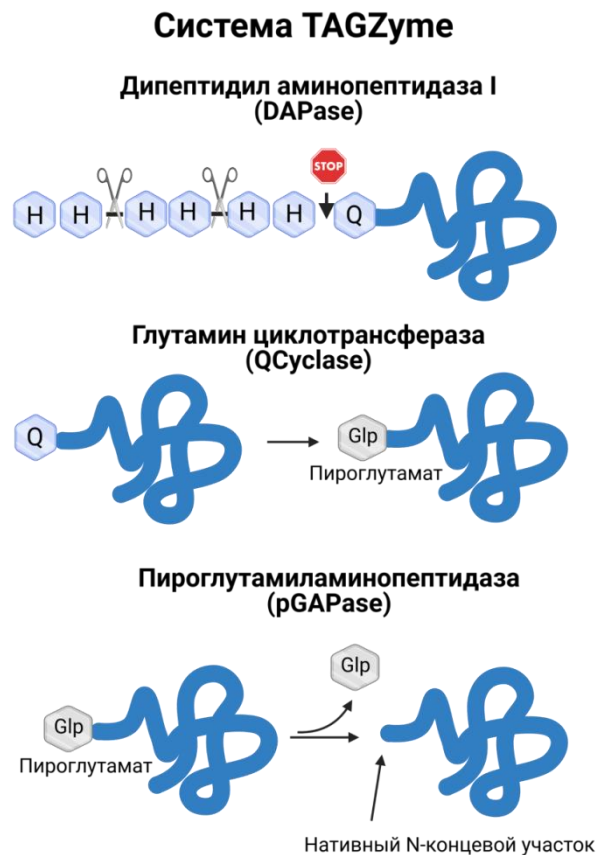


Рис. 10. Система TAGZyme для отщепления полигистидинового тэга

Система TAGZyme предназначена для удаления *N*-концевых тэгов и особенно удобна для полигистидиновых тэгов. Данная система состоит из трех ферментов: дипептидиламинопептидазы I (DAPase), глутаминциклотрансферазы (Qcyclase) и пироглутамиламинопептидазы (pGAPase). Ключевым ферментом, дипептидиламинопептидаза I, катализирует отщепление дипептидов с *N*-концевого участка белка. Естественным стоп-сигналом для этого фермента служат присутствие в цепи аминокислот аргинина или лизина. Таким образом, данный фер-

мент хорошо совместим с полигистидиновым тэгом. Для остановки гидролиза в *N*-концевой участок белка могут быть введены стоп-аминокислоты, после отщепления на *N*-концевом участке белка остается положительно заряженная аминокислота. Если необходимо получить рекомбинантный белок с нативным *N*-концевым участком, это может быть достигнуто введением в структуру белка остатка глутамин-а сразу после полигистидинового тэга и использованием еще двух ферментов, Qcyclase и pGAPase.

Когда глутамин экспонирован на *N*-конце полипептидной цепи, он может быть превращен в пироглутамат под действием глутамин-циклотрансферазы, что делает его устойчивым к аминопептидазной активности дипептидиламинопептидазы I. Затем пироглутаминовый остаток удаляется с помощью pGAPase для получения продукта с нативным *N*-концом. Эти ферменты мечены полигистидиновым тэгом и могут быть удалены из реакционной среды с помощью металлохелатной хроматографии.

Для получения белков с неизменным *N*-концевым участком можно использовать эндопротеазы, такие как энтеропептидаза (устаревшее название – энтерокиназа) или фактор Ха, они распознают специфическую аминокислотную последовательность до гидролизуемой связи и, в целом, не требуют специфических аминокислотных остатков в P1' положении (после гидролизуемой связи).

При конструировании рекомбинантного белка с сайтом протеолитического отщепления тэга следует иметь в виду, что сайт гидролиза должен быть стерически доступен для применяемых протеаз. В некоторых случаях добавление линкера из нескольких дополнительных аминокислот между целевым белком и сайтом узнавания протеазы значительно повышает эффективность расщепления. Обычно в качестве такого линкера применяют последовательность из чередующихся небольших аминокислот серина и глицина, например, линкер GSGSGSG.

3.3. Вопросы для самоконтроля

- 1) Какие аминокислоты, помимо гистидина, могут применяться в аффинных тэгах для повышения сродства рекомбинантного белка к металлохелатному сорбенту?
- 2) Какие преимущества у полигистидинового тэга перед другими аффинными метками?
- 3) Как может повлиять повышение длины полигистидинового тэга на свойства рекомбинантного белка?
- 4) В каких случаях предпочтительнее С-концевое расположение тэга?
- 5) Какой самый распространенный полигистидиновый тэг?
- 6) При каком расположении тэга, N- или С-концевом, после гидролиза эндопептидазами остается больше ненативных аминокислот?
- 7) Какие ферменты могут быть использованы для отщепления полигистидинового тэга с сохранением нативного N-концевого участка?
- 8) Какое расположение тэга, С- или N-концевое, предпочтительнее для его протеолитического отщепления?
- 9) Какие преимущества есть у вирусных протеолитических ферментов, TEV-протеазы и 3С-протеазы?
- 10) Какие аминокислоты чаще всего используются при конструировании линкерного участка между последовательностью белка и полигистидиновым тэгом?

3.4. Рекомендованная литература

- 1) Kimple, M.E. Overview of affinity tags for protein purification / M.E. Kimple, A.L. Brill, R.L. Pasker // Current protocols in protein science. – 2013. – V. 73. – P. 9.9.1–9.9.23.
- 2) Waugh, D.S. An overview of enzymatic reagents for the removal of affinity tags / D.S. Waugh // Protein expression and purification. – 2011. – V. 80 – № 2. – P. 283–293.
- 3) Pedersen, J. Removal of N-terminal polyhistidine tags from recombinant proteins using engineered aminopeptidases / J. Pedersen, C. Lauritzen, M.T. Madsen, S.W. Dahl // Protein expression and purification. – 1999. – V. 15 – № 3. – P. 389–400.
- 4) Knecht, S. Oligohis-tags: mechanisms of binding to Ni²⁺-NTA surfaces / S. Knecht, D. Ricklin, A.N. Eberle, B. Ernst // Journal of Molecular Recognition. – 2009. – V. 22 – № 4. – P. 270–279.
- 5) Block, H. Immobilized-metal affinity chromatography (IMAC): a review / H. Block, B. Maertens, A. Spriestersbach et al. // Methods in enzymology. – 2009. – V. 463. – P. 439–473.

ГЛАВА 4

Проведение МХАХ His₆-меченых рекомбинантных белков

4.1. Планирование эксперимента

Перед проведением хроматографической очистки белка необходимо определить следующие параметры:

- 1) Свойства рекомбинантного белка, его стабильность и методы детекции;
- 2) Доступность полигистидинового тэга;
- 3) Состав и свойства раствора, в котором находится целевой белок, концентрация белка;
- 4) Формат проведения МХАХ (хроматография в объеме, колоночная хроматография).

4.1.1. Свойства рекомбинантного белка

Если известна аминокислотная последовательность His₆-меченого целевого белка, с помощью биоинформатических методов можно предсказать его физико-химические свойства. Среди свойств белка, которые могут оказаться полезными при планировании экспериментов по очистке, можно выделить следующие: молекулярная масса, изоэлектрическая точка, молярный коэффициент экстинкции, содержание цистеиновых остатков, стабильность белка. Знание указанных свойств поможет проанализировать наличие и концентрацию целевого белка.

Перед очисткой белка любым методом нужно заранее определиться с методом детекции белка, без этого очистка белка любым методом подобна поиску иголки в стоге сена с закрытыми глазами. Большим подспорьем в очистке His₆-меченых белков является наличие самой метки, которая может быть использована для детекции целевого белка. Наличие His₆-тэга может быть определено при помощи антител или специального детектирующего реагента, представляющего собой модифицированную Ni-NTA-лигандами пероксидазу хрена. Интересным способом специфической детекции полигистидинового тэга является применение цветной реакции азосоче-

тания с диазотированной сульфаниловой кислотой. Информация о молекулярной массе белка может быть использована для идентификации белка электрофоретическим методом, а также при последующих этапах очистки. Ферментативные свойства позволяют детектировать целевой белок по его активности в присутствии других белков. При наличии особых хромофорных групп белок может быть определен спектрофотометрически по поглощению в определенной области спектра: например, гем-содержащие белки поглощают при 403–410 нм (так называемая линия Соре), зеленый флуоресцентный белок поглощает свет при 397 нм.

Методами биоинформатики можно также предсказать стабильность белка и планировать условия эксперимента, например, проводить очистку белка при комнатной температуре или с охлаждением.

4.1.2. Структура рекомбинантного белка и доступность полигистидинового тэга

При МХАХ, помимо наличия полигистидинового тэга, важным параметром является его доступность для сорбента. В некоторых случаях тэг оказывается «заперт» в белковой глобуле или экранирован другими участками белка. В таком случае сорбция на сорбенте будет невозможна, и белок не может быть эффективно очищен МХАХ.

Для проверки доступности тэга можно провести тестовую хроматографию с использованием небольшого количества сорбента (10–20 мкл) и белка и после промывки сорбента и элюирования определить наличие целевого белка любым доступным способом (легче всего электрофоретически). В случае если сорбция не происходит, это может быть вызвано как условиями проведения МХАХ, так и недоступностью тэга. Для проверки доступности тэга следует провести МХАХ в денатурирующих условиях (рис. 11). Для этого в пробу белка добавляют хаотропные агенты (8 М мочевины или 6 М гуанидин-хлорид), это вызывает потерю третичной структуры белка и устраняет стерическую недоступность, затем проводят МХАХ в присутствии хаотропных агентов и определяют наличие белка в элюатах. Если бе-

лок не связывается с сорбентом в нативных условиях и связывается при денатурирующих, значит проблема в недоступном тэге. В таком случае следует либо проводить очистку в денатурирующих условиях с последующим рефолдингом, либо заменить генетический конструкт, изменив положение тэга (например, поместив его на противоположный конец полипептидной цепочки).

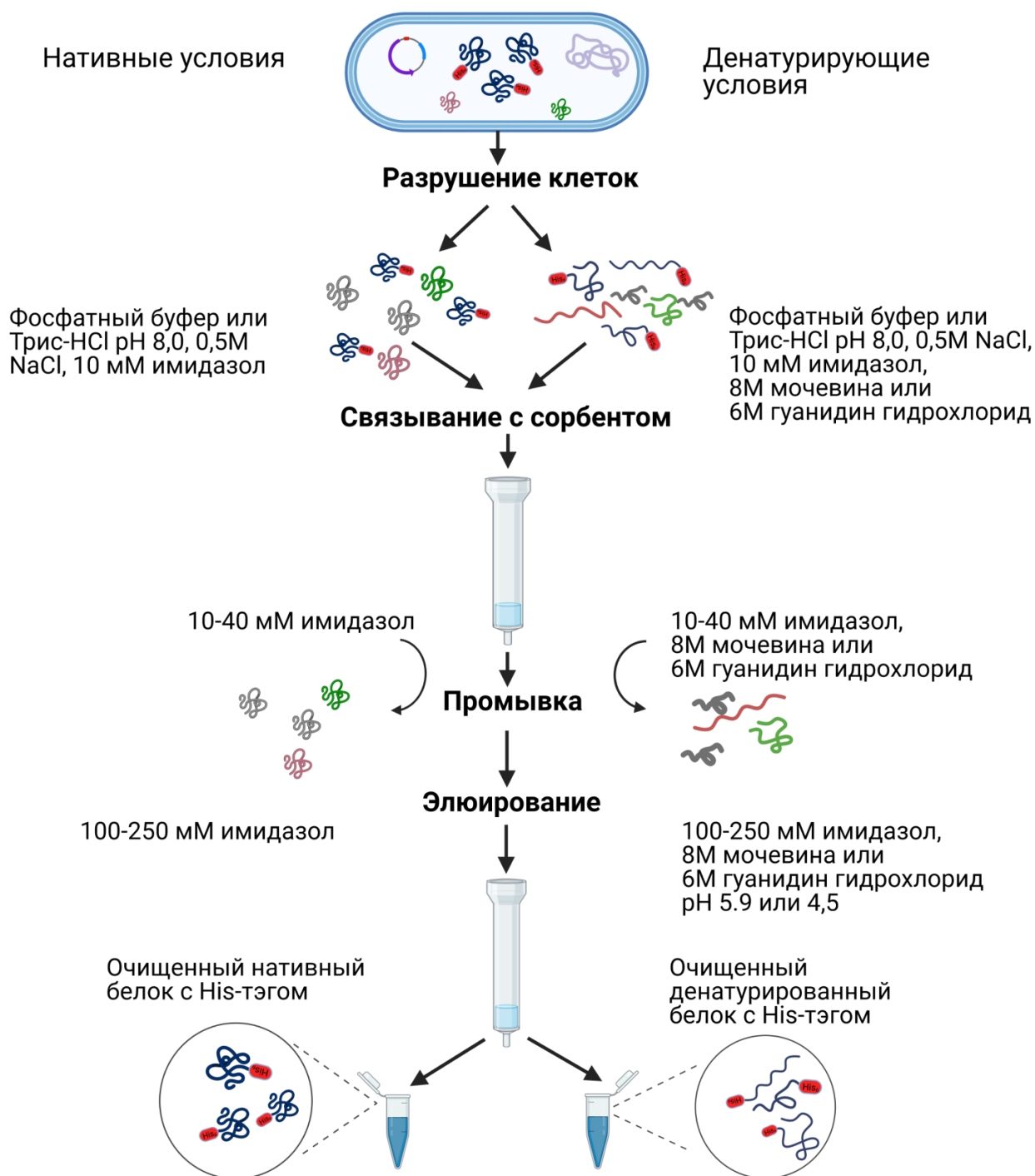


Рис. 11. Очистка рекомбинантных His₆-меченых белков в нативных и денатурирующих условиях

4.1.3. Состав и свойства раствора, концентрация белка

Рекомбинантный белок может быть получен при помощи различных экспрессионных систем: прокариотической, бакуловирусной, дрожжевой, экспрессии в клетках млекопитающих и др. Способ экспрессии и нахождение целевого белка (внутриклеточный, периплазматический, секретруемый) может оказывать большое влияние на этап связывания белка с сорбентом и диктует требования к способу проведения хроматографического процесса.

Важно учитывать, находится ли белок в растворимой форме. Иногда при экспрессии в бактериальных клетках рекомбинантные белки синтезируются в форме нерастворимых агрегатов, образуя так называемые тельца включения. В таком случае необходима их ресольюбилизация и проведение МХАХ в денатурирующих условиях (рис. 11) с последующим рефолдингом. При очистке рекомбинантных мембранных белков также возникает проблема с растворимостью в буферных растворах, применяемых в МХАХ, и необходима сольюбилизация с использованием детергентов. Если рекомбинантный белок экспрессируется в растворимой форме, последующая очистка упрощается, и выход белка обычно выше.

В зависимости от концентрации белка в растворе и объема наносимого раствора МХАХ может применяться в колоночном формате (когда сорбент находится в колонке) либо в формате батч-хроматографии (англ. Batch – хроматографии в объеме). Когда рекомбинантные белки секретруются в культуральную среду, обычно их содержание невелико, и для очистки приходится использовать большие объемы среды. В таком случае гораздо быстрее проводить этап связывания в формате батч-хроматографии, когда сорбент добавляется в раствор и связывание происходит в объеме (рис. 12). При внутриклеточной экспрессии белков содержание контаминирующих белков в пробе многократно выше содержания в культуральной среде, и очистку белков чаще проводят методом колоночной хроматографии, так как разрешающая способность такого формата выше.

Независимо от того, находится ли белок в культуральной среде или синтезируется внутриклеточно, перед нанесением на сорбент значение рН наносимого раствора должно находиться в нейтральной области, предпочтительно около 7,5–8,0. Значение рКа имидазольного кольца гистидина составляет примерно 6,5–6,7, следовательно, при рН ниже 6,5 гистидин будет находиться в протонированной форме, и белки с His₆-тэгом не будут связываться с металлохелатным сорбентом (рис. 12). Проблемы с рН среды могут возникнуть, например, при экспрессии в *Pichia pastoris*. Во время ферментации метилотрофных дрожжей *Pichia pastoris* рН культуральной среды значительно падает (до 4,0–5,0), поэтому при очистке белков из такой культуральной среды необходимо довести рН до нейтральных значений.

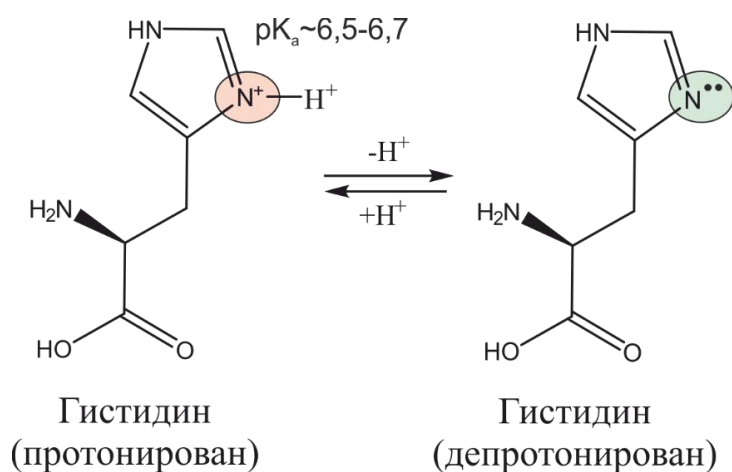


Рис. 12. Протонирование гистидина

Очистка рекомбинантных белков, экспрессированных в культуре клеток эукариот методом МХАХ, имеет свои особенности. При работе с эукариотическими системами, такими как клетки млекопитающих или насекомых, из которых белок секретируется непосредственно в питательную среду, иногда может наблюдаться низкий выход белка после МХАХ. Низкий выход белка часто связан с несовместимостью между сорбентом и культуральной средой. Питательная среда может содержать ЭДТА и другие компоненты, которые смывают иммобилизованные ионы металлов с сорбента во время этапа связывания образца. Ситуация может еще больше осложняться низкой

концентрацией целевого белка. Для получения достаточного количества чистого белка потребуются большие объемы образца, что приводит к еще большему смыванию ионов металлов.

Одно из решений этой проблемы – подготовка образца перед загрузкой в колонку. Подготовка образца может включать осветление и концентрирование в сочетании с этапом замены буфера, например, методом тангенциальной ультрафильтрации. Однако эта предварительная обработка занимает много времени и может негативно повлиять на чувствительные белки. В таких случаях можно заранее запланировать очистку на устойчивых к действию хелаторов и восстановителей пентадентатных металлохелатных сорбентах.

Непосредственно перед нанесением белкового препарата на хроматографический сорбент крайне желательно осветлить препарат – удалить взвешенные частицы путем центрифугирования или фильтрования. Это позволит продлить жизнь хроматографическому сорбенту. Выбор размера пор фильтра зависит от размер частиц сорбента (табл. 4), но чаще всего достаточно фильтрования через фильтр с размером пор 0,45 мкм.

Таблица 4

Выбор фильтра [35]

Размер пор фильтра	Размер частиц сорбента
1 мкм	90 мкм и больше
0,45 мкм	30–34 мкм
0,22 мкм	3, 10, 15 мкм или для стерилизации образца

Взвешенные частицы могут забивать поры частиц сорбента и препятствовать току жидкости. При выделении рекомбинантных белков из разрушенных клеток также бывает необходимо удалить ДНК, которая повышает вязкость раствора. Это можно сделать при помощи ферментативного расщепления нуклеазами (ДНКаза I, бактериальные нуклеазы), осаждения полиэтиленмином или стрептомицином.

4.1.4. Формат проведения МХАХ

Формат проведения МХАХ будет влиять как на емкость, так и на селективность адсорбента. Когда сорбент упаковывается в колонку, которая может выдерживать повышенную скорость потока и давление, можно получить лучшую воспроизводимость, селективность и более высокий выход (рис. 13). Однако такой вариант не обязателен на начальных этапах очистки, где основным требованием является скорость связывания целевого белка.



Рис. 13. Схема проведения хроматографии в колоночном формате

Использование МХАХ в качестве первого шага захвата в настоящее время упрощено благодаря производству хелатирующих сорбентов с крупными гранулами (90-160 мкм). Это делает возможным использование хроматографии в объеме (батч-хроматографии) для неочищенных препаратов клеточных экстрактов за очень короткое время (рис. 14). При батч-хроматографии связывание с целевым белком проводится путем перемешивания гранул сорбента с раствором белка. Например, в случае секретлируемых белков, уравновешен-

ная в буфере навеска сорбента помещается в культуральную среду, в которой находится белок, и сорбция происходит при перемешивании сорбента со средой. Далее сорбент со связанным белком может быть собран при помощи либо центрифугирования ($\sim 500-700 \times g$), либо фильтрованием. Промывка и элюирование могут быть проведены путем ресуспендирования осадка сорбента, повторного сбора сорбента и отделения супернатанта, либо путем упаковки в колонку и проведения промывки и элюирования в колоночном формате.

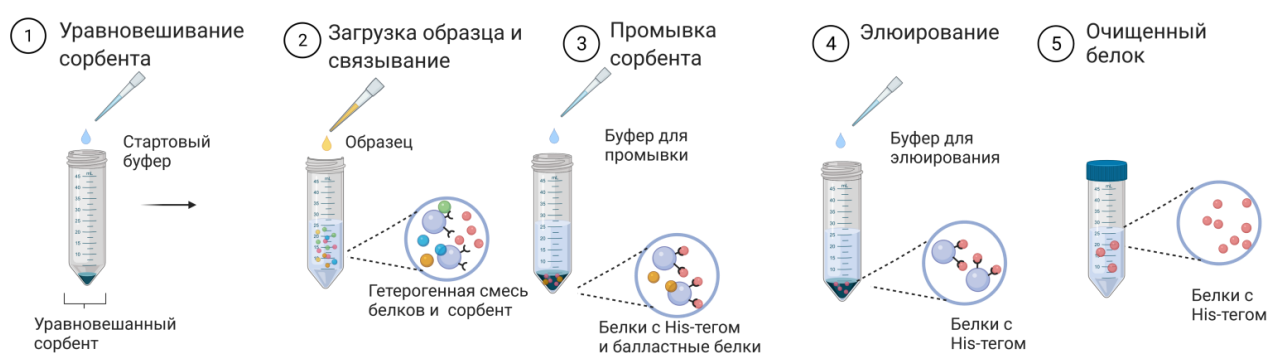


Рис. 14. Схема проведения хроматографии в объеме (батч-хроматография)

Для проведения хроматографии в колоночном формате существует большое разнообразие хроматографических колонок разных размеров и формата. Простейшая колонка может быть изготовлена из шприца с фильтровальной бумагой или стеклянной ватой на дне для предотвращения вытекания сорбента. Простейшая миниколонка может быть изготовлена из наконечника для автоматического дозатора со стеклянной ватой на дне. На сегодняшний день существует большой ассортимент коммерчески доступных сорбентов и пустых колонок (см. Приложение 3). При выборе колонки необходимо учитывать предполагаемый объем сорбента, а также объем осветленного экстракта клеток. При большом объеме экстракта (50–100 мл) или культуральной среды следует отдать предпочтение колонке с большим диаметром (например, с диаметром 2,5 см и высотой 10 см), это позволит значительно ускорить хроматографическую очистку рекомбинантного белка, но элюирование белка в колонке с большим диамет-

ром приведет к разбавлению раствора белка. Поэтому в некоторых случаях удобно проводить операции связывания и промывки на большой и широкой колонке, а элюирование проводить в узкой колонке диаметром не более 1,5 см.

Существуют также упакованные колонки с металлохелатными сорбентами для проведения хроматографии с применением хроматографических систем. Очень удобными являются относительно недорогие пластиковые колонки, совместимые с хроматографическими системами, они доступны в каталогах ведущих производителей. Одним из самых распространенных форматов являются заряженные ионами никеля колонки-картриджи. Также существуют незаряженные картриджи с упакованным IDA-сорбентом, который может быть заряжен пользователем самостоятельно. Некоторые производители предлагают наборы картриджей, уже заряженные разными ионами металлов, например, набор BabyBio His-tag Screening kits (BioWorks, Швеция) с колонками с ионами Ni^{2+} , Zn^{2+} , Co^{2+} , Cu^{2+} для выбора оптимального иона металла для проведения МХАХ.

4.2. Условия сорбции в МХАХ

Связывание белков с металлохелатными сорбентами происходит путем образования координационных связей. Поэтому наличие в буфере ионов, способных к координации с ионами металлов, будет препятствовать связыванию белков. Для связывания с сорбентом важно также поддерживать нейтральный pH.

Гистидиновый тэг связывается с Ni-NTA-сорбентом посредством имидазольных колец остатков гистидина. При $\text{pH} \geq 7,0$ боковая цепь имидазола депротонируется с получением суммарного отрицательного заряда. При $\text{pH} 5,97$ (рК имидазольной боковой цепи гистидина) протонировано 50 % гистидинов; а при $\text{pH} \leq 4,5$ почти все гистидины протонированы и не взаимодействуют с Ni-NTA [35]. Для поддержания нейтрального pH (7,0–8,0), используемого для очистки белков методом металлохелатной хроматографии, подходят фосфатные, ацетатные, боратные и трисовые буферы. Чаще всего при

очистке применяются фосфатные и трисовые буферы с концентрацией 20–100 мМ. Но надо иметь в виду, что трис обладает слабыми хелатирующими свойствами, поэтому высокие концентрации буфера использовать нежелательно.

Металлохелатные сорбенты по своей природе проявляют и ионообменные свойства. Зарядка сорбента ионами металлов резко изменяет его адсорбционные свойства, хотя при низкой ионной силе он все еще функционирует как ионообменник, но с измененными характеристиками. Увеличение концентрации соли до 0,1 М или выше снижает адсорбцию белка за счет ионного обмена. С увеличением молярной концентрации сульфат- или хлорид-ионов для сорбентов, заряженных Co^{2+} , Ni^{2+} , Cu^{2+} и Zn^{2+} , величина металлохелатной адсорбции проходит через минимум и затем снова возрастает.

Для того, чтобы меченые His₆-тэгом рекомбинантные белки связывались преимущественно по координационному механизму, и для предотвращения неспецифического связывания других белков, рекомендуется связывание белков проводить в присутствии >0,5 М NaCl.

Соединения, способные координировать ионы металлов (хлорид аммония, глицин, хелаторы ЭДТА, ЭГТА), могут оказывать негативное влияние на сорбцию. Также металлохелатные соединения чувствительны к восстановителям: бета-меркаптоэтанолу (свыше 20 мМ), ДТТ (свыше 10 мМ).

Металлохелатные сорбенты совместимы с множеством соединений, применяемых при очистке белков, таких, как неионные детергенты, мочевины, гуанидинхлорид в широком диапазоне концентраций (табл. 5). Перед применением лучше проверить совместимость по инструкции производителя.

Таблица 5

**Совместимость металлохелатного сорбента Ni-NTA с некоторыми соединениями
(из [23] с изменениями)**

Реагент	Эффект	Примечание, допустимые концентрации
<i>Буферы</i>		
Трис, HEPES, MOPS	Буферы на основе вторичных или третичных аминов могут восстанавливать ионы Ni ²⁺	До 100 мМ Рекомендуются фосфатные буферы
Цитратные буферы		До 60 мМ
<i>Хелаторы</i>		
ЭДТА, ЭГТА	Удаляет ионы никеля с сорбента	До 1 мМ
<i>Восстановители</i>		
Бета-меркаптоэтанол (В-МЕ)	При высоких концентрациях восстанавливают ионы никеля	До 20 мМ
ДТТ	При высоких концентрациях восстанавливают ионы никеля	До 10 мМ Предпочтительно использование В-МЕ (до 5 мМ для сорбентов Ni-NTA Sepharose фирмы Cytiva)
ТСЕР		До 20 мМ (до 5 мМ для сорбентов Ni-NTA Sepharose фирмы Cytiva)

Реагент	Эффект	Примечание, допустимые концентрации
<i>Детергенты</i>		
Неионные детергенты (тригон, твин, NP-40)	Удаляют балластные белки и нуклеиновые кислоты	До 2 %
Катионные детергенты (CHAPS)		До 1 %
Анионные детергенты (SDS, саркозил)		Не рекомендуется использовать, но в некоторых случаях допустимо до 0,3 %
<i>Хромотропные реагенты</i>		
Гуанидинхлорид	Солюбилизация белков	До 6 М
Мочевина		До 8 М
<i>Органические растворители</i>		
Этанол		До 20 %
Изопропанол	Для удаления эндотоксинов	До 60 % Указанная концентрация не предполагает повторного использования сорбента
<i>Аминокислоты</i>		
Глицин, глутаминовая кислота, аргинин, аспарагиновая кислота, цистеин	Могут приводить к потере иона металла	Не рекомендуется использовать

Продолжение таблицы 5

Реагент	Эффект	Примечание, допустимые концентрации
Гистидин	Связывается с Ni-NTA и конкурирует с гистидинами His ₆ -тэга	Может применяться в низких концентрациях (20 мМ) для предотвращения неспецифического связывания, при высоких концентрациях (>100 мМ) используется для элюирования белка
<i>Соли</i>		
NaCl	Предотвращает ионные взаимодействия	До 2 М Рекомендуется добавление минимум 300 мМ
MgCl ₂		До 4 М
CaCl ₂		До 5 мМ Несовместимо с фосфатными буферами (выпадет осадок)
NaHCO ₃		Не рекомендуется использовать
Соли аммония (сульфат аммония, хлорид аммония)		Не рекомендуется использовать
<i>Другие компоненты</i>		
Глицерин	Предотвращает гидрофобные взаимодействия между белками, повышает стабильность белков	До 50 %
Имидазол	Связывается с Ni-NTA и конкурирует с гистидинами His ₆ -тэга	Может применяться в низких концентрациях (20 мМ) для предотвращения неспецифического связывания, при высоких концентрациях (>100 мМ) используется для элюирования

4.3. Условия элюирования в МХАХ

Элюирование His₆-меченых белков можно проводить различными способами: понижением рН, лигандным обменом, добавлением хелатора. При понижении рН до 4,5–5,3 (для Ni-NTA) или 6,0 (для Co-СМ-Asp) происходит протонирование азота имидазольного кольца гистидина (рКа ~ 6.5), при этом разрушается связь белка с ионом металла [36]. Это самый простой способ элюирования, но подходит не для всех белков, так как кислая среда может вызвать необратимую денатурацию целевого белка.

Десорбция понижением рН может осуществляться как в виде ступенчатой, так и в виде градиентной элюции. Градиентное элюирование понижением рН при МХАХ лучше всего проходит в диапазоне рН 9,0–3,5 [41]. В целом, ацетатные буферы обладают большей элюирующей силой, чем фосфатные. Фосфатные буферы при элюировании белков градиентом рН лучше всего применять в диапазоне рН 7,0–4,0. Буферы на основе HEPES могут применяться как при элюировании методом градиентного снижения рН, так и при элюировании при помощи имидазола. Считается, что HEPES меньше, чем фосфатный буфер, вымывает ионы металла с сорбента. Ступенчатое элюирование лучше применять для хорошо охарактеризованных белков, так как этот метод технически проще и дает более концентрированные белковые препараты [41]. Следует иметь в виду, что для Ni-NTA сорбентов понижение рН ниже 4,0 вызывает вымывание иона никеля [42]. Элюирование снижением рН самый простой способ десорбции связанного с металлохелатным сорбентом белка, но подходит не для всех случаев, так как кислая среда может вызвать необратимую денатурацию белка.

Самым распространенным и мягким способом десорбции рекомбинантного белка с металлохелатного сорбента является элюирование веществом, которое способно координироваться с ионом металла и конкурировать с целевым белком за центры связывания. При этом происходит лигандный обмен, то есть добавляемое вещество вытесняет рекомбинантный белок с комплекса иона металла с хела-

тором. Чаще всего для этого применяют структурный аналог аминокислоты гистидина – имидазол (0,1–0,5 М) (рис.15). Можно также применять сам гистидин (75 мМ для элюирования природного белка с Zn-IDA [37]) или другие соединения, не являющиеся структурными аналогами гистидина, но способные создавать координационные связи с иммобилизованным ионом металла, например, аминокислоту глицин (следует иметь ввиду, что на некоторых сорбентах глицин также вызывает и удаление иона металла с сорбента), хлорид аммония (0,15–0,20 М). Такой способ элюирования позволяет десорбировать соединения при помощи градиента концентрации, что позволяет получать более чистые препараты.

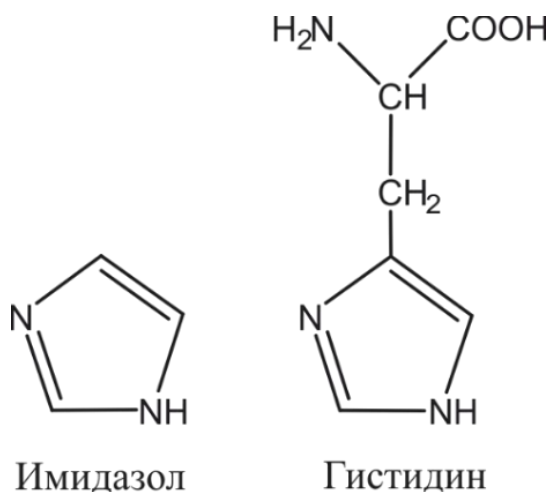


Рис. 15. Структуры имидазола и гистидина

Для десорбции белка путем разрушения связи хелатор-ион металла можно использовать более сильный хелатор, например, ЭДТА в концентрации 50-100 мМ. Константа диссоциации с ионом никеля для ЭДТА составляет 10^{-19} , что значительно превышает константу диссоциации для НТА ($K_d = 10^{-11}$) [43]. При этом происходит десорбция белка в результате удаления иона металла. Недостатком такого способа является загрязнение препарата белка ионами металла.

В некоторых случаях лучшие результаты получаются при сочетании нескольких видов элюции, например, восходящий градиент рН (от 6,8 до 7,8) и концентрации хлорида аммония (от 0 до 380 мМ)

[44]. При выборе метода элюции следует учитывать природу хелатора и иона металла. Например, для CM-Asp хелатора заряженного ионом кобальта (коммерческое название сорбента TALON) производитель указывает на ограничения концентрации имидазола – не более 250 мМ. Концентрация имидазола выше рекомендованной вызывает десорбцию ионов кобальта с сорбента. Элюирование гистидином не рекомендовано из-за сильного сродства кобальта к этой аминокислоте, это также вызывает десорбцию ионов металла.

4.4. Контаминирующие белки и предотвращение неспецифичной сорбции

Природные белки также могут взаимодействовать с ионами металла, иммобилизованными на сорбенте. На поверхности ряда бактериальных белков содержатся гистидиновые кластеры, эти белки связываются с сорбентом по тому же механизму, что и рекомбинантный белок с His-тэгом. Среди белков *E. coli* можно выделить несколько типов белков, склонных к образованию координационных связей с ионами металлов. Эти белки были классифицированы в прекрасном обзоре Volanos-Garcia и Davies [38] в соответствии с концентрацией имидазола, необходимой для их элюирования с Ni-NTA-сефарозы: класс I (>80 мМ), класс II (55–80 мМ) и класс III (30–50 мМ). Среди белков класса I авторы отметили регуляторный рибосомальный белок S15 (10 кДа), РНК-связывающий белок *E. coli* Hfq (11 кДа), белок-регулятор поглощения железа Fur (17 кДа), Cu/Zn супероксиддисмутазу (17 кДа), пептидоилпролин-цис-транс-изомеразу YodA (22 кДа), цАМФ-регулирующий белок CRP (24 кДа), SlyD (21 кДа) и ацетилорнитиназу ArgE (42 кДа). По механизму связывания белки *E. coli*, которые совместно очищаются с His-мечеными белками, можно разделить на четыре группы: (1) белки с природными металлсвязывающими мотивами, (2) белки с гистидиновыми кластерами на своей поверхности, (3) белки, которые связываются с гетерологически экспрессируемыми His-мечеными белками, например, по шаперонному механизму, и (4) белки со сродством к носителям на основе агарозы [38].

В клетках млекопитающих больше природных белков, содержащих последовательные остатки гистидина, которые приводят к неспецифическому связыванию с металлохелатным сорбентом [23]. Например, при исследовании ядерных экстрактов недифференцированных клеток HeLa было обнаружено, что фактор транскрипции Oct6 может быть легко очищен на колонке с Ni-NTA-сорбентом благодаря последовательности из 6 гистидинов в C-концевой области белка, а также другим богатым гистидином участкам. Еще одним примером является α -субъединица транскрипционного фактора TFIIA с 7 последовательными остатками гистидина, экспонированными на поверхности, за счет которых она может быть очищена с помощью МХАХ из природных источников в нативных условиях.

Не стоит забывать, что контаминирующие белки также могут неспецифично связываться с матриксом сорбента и с рекомбинантным белком, связанным с ионами никеля на сорбенте. Примерами загрязняющих белков, которые часто связываются с рекомбинантным белком, служат белки теплового шока: шапероны GroEL (68 кДа) и DnaK (70 кДа). Присутствие шаперона GroEL, элюируемого вместе с рекомбинантным белком, указывает на то, что в использованном буфере белок экспонирует гидрофобные участки, к которым присоединяется шаперон, то есть условия очистки не оптимальны для сохранения структуры белка.

Существует несколько вариантов удаления этих контаминирующих белков или предотвращения их адсорбции на ранней стадии. Эти варианты включают дополнительные стадии очистки; корректировку соотношения His-меченного белка к сорбенту; использование сконструированного штамма-хозяина, который не экспрессирует определенные белки; использование альтернативного носителя; отщепление тэга с последующей обратной хроматографией.

Многие белковые примеси имеют размер менее 25 кДа, поэтому разумно провести гель-фильтрацию для повышения чистоты целевых белков размером 40 кДа и более. Для удаления белков теплового шока рекомендуется промывка АТФ/MgCl₂-содержащим буфером. АТФ сти-

мулирует высвобождение субстрата, то есть нарушает связь с рекомбинантным белком [39]. Другой интересный способ предотвращения загрязнения белками теплового шока – предварительная инкубация клеточного экстракта с денатурированными бактериальными белками [40].

Для уменьшения неспецифического связывания природных белков можно использовать прием с перегрузкой сорбента рекомбинантным белком. При превышении емкости с сорбентом преимущественно будут связываться рекомбинантные белки с полигистидиновым тэгом, так как природным белкам с гистидиновыми кластерами будет труднее конкурировать за центры связывания на сорбенте. Таким образом, варьируя отношение His₆-меченых белков и объема сорбента, можно добиться значительного повышения чистоты белкового препарата после очистки.

Знание механизмов связывания с сорбентом или с комплексом сорбент/рекомбинантный белок позволяет снизить уровень загрязнения контаминирующими белками. Прежде всего, высокая специфичность и сила взаимодействия полигистидинового тэга с сорбентом позволяет использовать добавки, которые препятствуют неспецифическому взаимодействию. Например, повышение ионной силы раствора добавлением NaCl до концентрации 0,5–0,6 М снижает электростатические взаимодействия, а добавление небольшого количества неионных детергентов (Тритон X-100 и Твин-20) позволяет снизить взаимодействие с гидрофобными белками. Для ослабления взаимодействия сорбента с контаминирующими белками, которые обладают сродством к металлам, добавляют имидазол в небольшой концентрации, 10-50 мМ. Молекулы имидазола также обладают способностью координировать ионы металлов и конкурируют с металлсвязывающими белками. Сила взаимодействия полигистидинового тэга и никеля такова, что присутствие 10-50 мМ имидазола не влияет на нее.

Другим способом ослабления взаимодействия с металлсвязывающими белками является небольшое понижение pH буфера. При этом доля протонированных гистидинов растет, и, если в молекуле белка содержится только 1–2 гистидина, сила связи контаминирующего бел-

ка с сорбентом падает, тогда как для рекомбинантного белка с тэгом из 6 остатков гистидина степень аффинности падает незначительно.

Варьируя материал матрицы, к которой прикреплена хелатирующая группа, также можно добиться удаления части контаминирующих белков. На сегодняшний день существует большой ряд различных носителей: на основе неорганических, полисахаридных, полиакриламидных, полиметакрилатных носителей, сополимеров дивинилбензола и стирола и др. Обычно для предотвращения электростатического взаимодействия с матрицей сорбента МХАХ проводят в присутствии 0,5–0,6 М NaCl.

Для удаления контаминирующих белков может быть использован элегантный метод отщепления тэга His₆-меченой протеазой с последующей обратной (негативной) хроматографией. После протеолитического гидролиза полигистидинового тэга белок повторно пропускается через колонку с металлохелатным сорбентом, при этом контаминирующие белки в силу природного сродства вновь связываются с сорбентом, протеаза задерживается благодаря His₆-тэгу, а целевой белок уходит в проскок.

4.5. Регенерация сорбента

Металлохелатный сорбент на основе IDA, заряженный ионами Cu²⁺ и Ni²⁺, можно использовать для очистки белков до 20 раз без потерь емкости [45]. Однако со временем в результате загрязнения компонентами клеток продуцента (липидами, липопротеинами, агрегированными белками) и из-за вымывания ионов никеля падает емкость сорбента, в таком случае необходимо провести процедуру очистки и регенерации сорбента. Очистка сорбента – удаление неспецифически связанных загрязнителей различной природы. Регенерация подразумевает перезарядку сорбента, то есть удаление хелатированных ионов металла с последующей зарядкой для восполнения емкости сорбента. Регенерация необходима, если сорбент будет применяться для очистки разных белков.

В зависимости от природы загрязнителя применяются различные способы обработки сорбентов, например, рекомендованные методы очистки для сорбента Ni-NTA Sepharose FF (Cytiva, США) перечислены в таблице 6. При проведении очистки важна как концентрация средства для деконтаминации, так и продолжительность воздействия. При очистке необходимо по инструкции производителя проверить устойчивость сорбента в применяемых условиях. Перед проведением очистки металлохелатных сорбентов, заряженных ионами Co^{2+} , нужно освободить их от ионов иммобилизованного металла, так как при обработке щелочными растворами они могут выпадать в осадок в виде гидроксидов. Это создает дополнительные трудности, связанные с необходимостью удаления таких осадков.

Таблица 6

Способы удаления распространенных загрязнителей с сорбента

Загрязнитель	Способ удаления
Белки, связанные по ионному механизму	Промыть несколькими BV* 1,5 М NaCl. Затем промыть колонки несколькими объемами дистиллированной воды.
Преципитированные белки и белки, связанные в результате гидрофобного взаимодействия, липопротеины	Пропустить через колонку 1 М NaOH, закрыть и инкубировать 1–2 часа (12 часов или более для удаления эндотоксинов). Затем промыть примерно 10 BV связывающего буфера, а затем 10 BV дистиллированной водой.
Белки, связанные в результате гидрофобного взаимодействия, липопротеины, липиды	Промыть 5–10 BV 30 % изопропанолом в течение примерно 15–20 минут. Затем промыть примерно 10 BV дистиллированной воды. В качестве альтернативы промыть 2 BV детергента в щелочном или кислотном растворе. Например, 0,5 % раствор неионного детергента в 0,1 М уксусной кислоте, время контакта 1–2 часа. После обработки тщательно удалить остатки детергента, промывая их 5–10 BV 70 % этанола, а затем промыть примерно 10BV дистиллированной воды.

*BV – объем сорбента (англ. Bead volume)

Очистку сорбента, упакованного в колонку, разумно проводить в реверсном режиме – прокачивая жидкости в обратном направлении. Часто слой загрязнителей концентрируется в верхнем слое сорбента, и обратный ток жидкости позволяет избежать распространения загрязнителя по нижележащим слоям. В случае сорбентов, которые упаковываются в колонки низкого давления, удобно промывать сорбент на воронке Шотта (рис. 16) под вакуумом (стеклянные фильтры не следует подвергать долгому воздействию щелочи!).

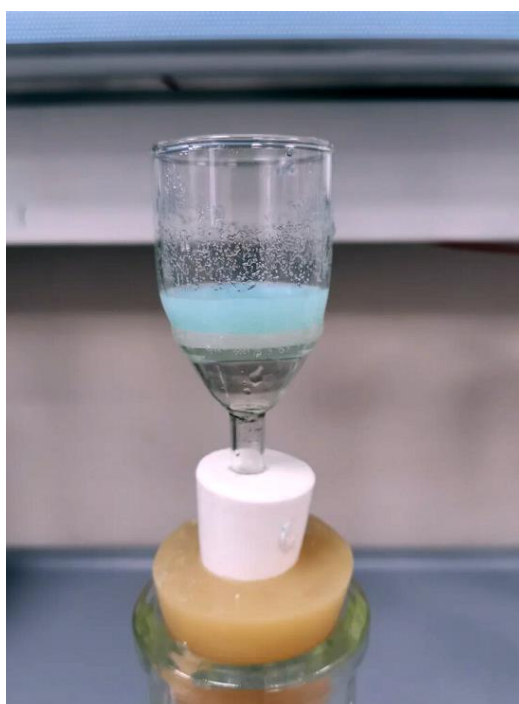


Рис. 16. Промывка сорбента на воронке Шотта

После отмывки сорбента от загрязнителей его необходимо повторно зарядить ионами металлов. Для этого используют 0,1 М водорастворимые соли (сульфаты, хлориды). Хелатирующий сорбент лучше заряжать ионами Cu^{2+} , Zn^{2+} , Ni^{2+} , Co^{2+} и Ca^{2+} в виде нейтральных или слабокислых растворов, чтобы избежать образования гидроксидных осадков. Растворы ионов Zn^{2+} должны иметь рН около 5,5 или ниже, чтобы избежать проблем с растворимостью, которые возникают в более щелочных условиях. Ионы Fe^{3+} следует иммобилизовать при низком рН (приблизительно рН 3,0), чтобы избежать образования нерастворимых соединений трехвалентного железа.

Для Cu^{2+} , Ni^{2+} и Co^{2+} насыщение сорбента можно отследить по изменению цвета (сорбент приобретает синий, зеленовато-синий и розовый цвет, соответственно). Когда колонка заряжается Zn^{2+} , образование осадка при добавлении Na_2CO_3 к элюенту указывает на насыщение колонки. При проведении МХАХ происходит некоторая потеря ионов металлов из колонки. Во многих случаях это не имеет значения, но при необходимости утечку можно подавить путем промывки залитой колонки конечным элюентом перед уравниванием с начальным буфером, в котором будет находиться образец. В качестве альтернативы колонка может быть заряжена ионами металла только до 70–90 % от максимальной емкости; это приведет к захвату мигрирующих ионов металлов хелатирующими группами в нижней части колонки. Такой подход эквивалентен наличию небольшой ненагруженной колонки, последовательно соединенной с разделительной колонкой, и извлечению ионов металлов из элюата с помощью небольшого количества хелатирующего геля после хроматографической очистки.

Удаление и перезарядка необходимы после каждого элюирования, когда ионы со слабой комплексообразующей силой, такие как Zn^{2+} , Co^{2+} , используются в хроматографии с нисходящим градиентом pH. При очистке одного белка сорбенты, заряженные Cu^{2+} и Ni^{2+} , могут применяться многократно без необходимости перезарядки. В тех случаях, когда сорбент применяется для очистки разных белков, рекомендуется очищать колонки от ионов металлов с использованием хелатирующих агентов, таких как ЭДТА, и заряжать ионами металлов перед следующим экспериментом.

Для предотвращения бактериального роста сорбенты обычно хранят в 20 % растворе этилового спирта.

4.6. Вопросы для самоконтроля

1) Назовите вещества, несовместимые с МХАХ, объясните, как проявляется их отрицательное воздействие на процесс хроматографии.

- 2) Какими способами можно элюировать белок с металлохелатного сорбента, преимущества и недостатки каждого метода?
- 3) Какими способами можно снизить уровень контаминации очищенного МХАХ белкового препарата?
- 4) Как можно удалить белки теплового шока из белкового препарата до нанесения на сорбент?
- 5) Какой метод десорбции белка с сорбента является наиболее мягким и не вызывает денатурации белка?
- 6) Каков механизм влияния рН на связывание белка, меченного полигистидиновым тэгом?
- 7) Как можно подавить неспецифическое связывание балластных белков с металлохелатным сорбентом?
- 8) Какие достоинства и недостатки есть у батч-хроматографии?
- 9) Какими способами при очистке белка можно удалить ДНК из белкового препарата?
- 10) Как можно проверить доступность полигистидинового тэга рекомбинантного белка для сорбента?

4.7. Рекомендованная литература

- 1) Kimple, M.E. Overview of affinity tags for protein purification / M.E. Kimple, A.L. Brill, R.L. Pasker // Current protocols in protein science. – 2013. – V. 73. – P. 9.9.1–9.9.23.
- 2) Porath, J. Immobilized metal ion affinity chromatography / J. Porath // Protein expression and purification. – 1992. – V. 3 – № 4. – P. 263-281.
- 3) Block, H. Immobilized-metal affinity chromatography (IMAC): a review / H. Block, B. Maertens, A. Spriestersbach et al. // Methods in enzymology. – 2009. – V. 463. – P. 439–473.
- 4) Affinity Chromatography Handbook, Vol. 2: Tagged Proteins. – Uppsala: GE Healthcare Bio-Sciences AB, 2016. – 249 P.
- 5) The QIAexpressionist. A handbook for high-level expression and purification of 6xHis-tagged proteins. 5th edition. – Hilden: QIAGEN GmbH, 2003. – 128 P.

ГЛАВА 5

Практическая работа

5.1. Введение

Принципы, лежащие в основе метода металлохелатной хроматографии, предоставляют исследователям широкие экспериментальные возможности в очистке, фракционировании, селективной иммобилизации, детекции белков, обладающих сродством к ионам металлов. В практическом разделе данного учебного пособия авторы решили сфокусировать внимание на очистке рекомбинантных белков, меченных His₆-тэгом и экспрессированных в бактериальных клетках. Составы буферных растворов приведены для очистки зеленого флуоресцентного белка (GFP), меченного His₆-тэгом. Данный белок удобен для использования в качестве модельного белка в учебном практикуме: он отличается стабильностью в широком диапазоне pH, устойчив к протеазам, хорошо хранится, ярко окрашен (удобно отслеживать содержание во фракциях во время очистки). Приведенные составы буферных растворов могут быть использованы как базовые для очистки других рекомбинантных His₆-меченых белков и при разработке методики очистки. Однако, в зависимости от экспрессируемого белка и вида продуцента могут потребоваться дополнительные добавки и этапы выделения и очистки. Например, при очистке рекомбинантных белков из клеток дрожжей разрушение клеток должно проводиться при более жестких условиях (френч-пресс, шаровая мельница и т.д.). При гетерологической экспрессии некоторых белков в *E. coli* в элюатах наблюдается повышенное содержание примесей белков теплового шока (DnaK, GroEl), в таком случае необходимо включить в процедуру промывку АТФ-содержащим буфером и т.д.

5.2. Разрушение клеток и получение бесклеточного экстракта

Для очистки рекомбинантных белков, экспрессированных в цитоплазме бактериальных клеток, необходимо сначала разрушить клеточную стенку. В условиях учебного практикума разрушение проще всего проводить с использованием сочетания ферментативного (обра-

ботка лизоцимом) и физического (замораживание и оттаивание, ультразвук) методов разрушения бактериальных клеток. Приведенный протокол рассчитан на разрушение бактериальных клеток, выращенных в 50 мл среды LB. При необходимости объемы добавляемых реагентов можно пропорционально увеличить или уменьшить.

Ход работы:

- 1) Поместить пробирку с клеточным осадком в стакан с холодной водой до полного размораживания содержимого (5–10 мин);
- 2) Ресуспендировать осадок в пятикратном объеме (5 мл) охлажденного лизирующего буфера;

Внимание! Все дальнейшие манипуляции только на льду!

- 3) Добавить 50 мкл 100X раствора лизоцима, инкубировать на льду в течение 10–30 минут;

Лизоцим добавляется для расщепления клеточных стенок E. coli, применение лизоцима усиливает эффект ультразвуковой гомогенизации клеток. Молекулярная масса лизоцима ~15 кДа, поэтому при индукции белков схожего размера необходимо это учитывать. Рекомендуется на стадии разрушения применять гипотонический буфер с содержанием NaCl 0,1 М, перед нанесением на сорбент повысить концентрацию NaCl до 0,5 М.

- 4) Быстро заморозить пробирку со взвесью клеток в жидком азоте и оставить для оттаивания в стакане с холодной водой;

Этот этап можно пропустить, если нет доступа к жидкому азоту, но замораживание и оттаивание значительно улучшает разрушение клеток. В качестве альтернативы можно заморозить клетки до начала выделения в морозильнике.

- 5) Соблюдая осторожность, добавить в пробирку 50 мкл ингибитора протеаз (100 мМ PMSF);

- 6) Добавить 50 мкл 1 М MgCl₂ (конечная концентрация 10 мМ), 50 мкл раствора ДНКазы I (конечная концентрация 10 мкг/мл);

В процессе разрушения бактериальных клеток происходит высвобождение большого количества ДНК, что приводит к значительному повышению вязкости раствора. ДНКазы расщепляет ДНК и понижает вязкость бактериального лизата. Частично нити ДНК также фрагментируются при ультразвуковой обработке, однако эффективность обработки ДНКазой I выше. ДНКазы I является магний-зависимым

ферментом, поэтому необходимо добавление солей магния. При отсутствии или нежелательности добавления ДНКазы можно фрагментировать ДНК, многократно пропуская раствор через шприц с иглой малого диаметра (18 калибр). Другим способом удаления ДНК является осаждение полиэтиленимином или стрептомицином.

7) Провести разрушение клеточных стенок штамма-продуцента с применением ультразвукового гомогенизатора;

При ультразвуковом разрушении клеток происходит нагрев суспензии. Для предотвращения тепловой денатурации белков во время обработки необходимо держать пробирку на льду и выдерживать некоторое время между циклами обработки. Лучше всего проводить обработку в стеклянной посуде. Стекло обладает лучшей теплопроводностью, чем пластик и меньше поглощает высокочастотную энергию ультразвука.

8) Отделить центрифугированием нерастворимый клеточный осадок при $12\ 000 \times g$ в течение 20 мин при $4\ ^\circ\text{C}$;

9) Отобрать 20 мкл бесклеточного экстракта клеток в 1,5 мл центрифужную микропробирку, подписать пробирку «SN» (англ. **Supernatant** – супернатант) и поместить в морозильник на $-20\ ^\circ\text{C}$ для последующего электрофоретического анализа. Осторожно перенести супернатант в чистую микропробирку и подписать ее. Белковые препараты могут быть использованы сразу или храниться до последующей очистки.

Для хранения раствора белка перед следующим этапом рекомендуется замораживать его в жидком азоте и хранить в низкотемпературном морозильнике при $-80\ ^\circ\text{C}$. Однако все зависит от свойств белка, растворы зеленого флуоресцентного белка (GFP) стабильны и хорошо хранятся как при $-20\ ^\circ\text{C}$ долгое время, так и при $+4\ ^\circ\text{C}$ в течение недели.

10) В пробирку с нерастворимым осадком добавить 500 мкл воды, затем удалить ее (отмывка от остатков супернатанта). Добавить 1 мл лизирующего буфера А, энергично ресуспендировать осадок и отобрать 20 мкл взвеси в 1,5 мл микропробирку, подписать пробирку «P» (англ. **Pellet** – осадок) и поместить в морозильник на $-20\ ^\circ\text{C}$

5.3. Хроматографическая очистка зеленого флуоресцентного белка

Хроматографическая очистка целевого рекомбинантного белка, меченного гексагистидиновым тэгом, осуществляется с применением 250–400 мкл аффинного сорбента (Ni-NTA сефарозы). При пропускании через сорбент His₆-меченного белка в количестве, превышающем емкость сорбента, природные гистидин-богатые белки не могут эффективно конкурировать с рекомбинантным белком за центры связывания. Конечно, часть целевого белка при этом уходит в проскок и теряется (при необходимости проскок можно рехроматографировать), но такой подход с применением относительно небольшого количества металлохелатного сорбента позволяет получить чистый (95 % и более) препарат белка в одну хроматографическую стадию, что облегчает дальнейшую очистку.

Для проведения хроматографии в рамках учебного практикума используются колонки с рабочим объемом 2–5 мл. Процедура подготовки колонки для металлохелатной аффинной хроматографии для очистки в большом объеме описана в Приложении 2. Для нанесения образца бесклеточного экстракта и промывки от балластных белков колонки удобно закреплять в штативе. Образцы модельного зеленого флуоресцентного белка (GFP), меченного His₆-тэгом, применяемые в учебном практикуме, стабильны, и при очистке охлаждение не требуется. Для других белков удобно использовать простую охлаждающую рубашку или работать в условиях холодной комнаты (см. прил. 2). Сбор фракций проскока и элюатов осуществляется в микропробирки, объемом 1,5 мл. Обычно фракции промывок колонки собирать необходимости нет, и для этого используют емкости достаточного объема (колбы, стаканы и т.д.). Однако до окончательного подтверждения наличия целевого белка в элюатах не рекомендуется выливать фракции. Удобство применения флуоресцентных белков для образовательных целей заключается в том, что наличие белка во фракции можно легко определить визуально. После хроматографической очистки проводится электрофоретический анализ полученных фракций.

Образцы для электрофоретического анализа

Маркировка	Содержимое
SN (супернатант)	Растворимые белки
P (осадок)	Нерастворимые белки (тельца включения), клеточный дебрис
FT (проскок)	Белки, не связавшиеся с сорбентом. Целевой белок может быть в проскоке из-за насыщения сорбента или если His-тэг заблокирован ввиду структурных причин
E (элюат)	Рекомбинантный белок, специфически элюируемый с сорбента

5.3.1. Рабочие растворы

- 1) металлохелатный аффинный сорбент, заряженный ионами никеля, например, Ni-NTA Sepharose или аналогичный по свойствам;
- 2) 100 мМ PMSF в метаноле (100X раствор, -20 °С);
- 3) 25 мг/мл лизоцим (100X раствор, -20 °С);
- 4) 1 мг/мл ДНКаза I (100X раствор, -20 °С);
- 5) 10 % тритон X100 (100X раствор);
- 6) 1 М Трис-НСl рН 8,0;
- 7) 1 М MgCl₂ (100X раствор);
- 8) 5 М NaCl;
- 9) 2,5 М имидазол, рН 8,0;
- 10) этанол 20 %.

5.3.2. Оборудование и материалы

- 1) хроматографическая колонка, объемом 2 мл, с 10 мл резервуаром (см. прил. 2);
- 2) контейнер со льдом;
- 3) мерная посуда, центрифужные пробирки на 15 мл, микро-пробирки на 1,5 и 2 мл;
- 4) автоматические дозаторы и наконечники.

5.3.3. Буферные растворы для очистки белка

Все указанные буферные растворы для тестовой очистки экспрессированного рекомбинантного белка, меченного His-тэгом, готовятся на основе базового буфера (буфер А) с добавлением дополнительных компонентов из концентрированных растворов. Базовый буфер, в свою очередь, готовится из стоковых концентрированных растворов исходных компонентов. Данный подход позволяет быстро получать необходимые объемы рабочих буферных растворов разного состава без применения рН-метра. Недостатком является некоторое изменение концентраций составляющих базового буфера при добавлении отдельных компонентов. Однако для применения указанных буферных растворов при очистке рекомбинантных белков на Ni-NTA-сефарозе эти изменения представляются незначительными. Приведенные объемы рассчитаны для очистки модельного белка на 10 колонках.

После приготовления необходимо держать буферные растворы на льду, ингибитор протеаз добавляется в буфер непосредственно перед применением ввиду его невысокой стабильности в воде (PMSF в водном растворе при рН 7,5 и 25 °С стабилен в течение 1 часа).

Таблица 8

Приготовление лизирующего буфера

Стоковые растворы	На 50 мл	Конечная концентрация компонентов
1 М Трис-НСl рН 8,0	1,25 мл	25 мМ
5 М NaCl	1,0 мл	100 мМ
2,5 М имидазол	0,2 мл	10 мМ
50 % глицерин	5,0 мл	5 %
дН ₂ О	42,5 мл	

Таблица 9

Состав буферных растворов для хроматографии

Буфер	Состав
Буфер А	25 мМ Трис-НСl, рН 8,0, 0,5 М NaCl, 10 мМ имидазол, 5 % глицерин, 1 мМ В-МЕ ¹ , 1 мМ PMSF ²
Буфер В	Буфер А с 0,1 % тритона X-100
Буфер С	Буфер А с 1 М NaCl
Буфер Е	Буфер А с 250 мМ имидазола

¹ – бета-меркаптоэтанол добавляется при необходимости, для GFP допускается очистка без добавления В-МЕ

² – PMSF добавляется непосредственно перед применением.

Таблица 10

Приготовление буфера А

Стоковые растворы	На 100 мл	Конечная концентрация компонентов
1 М Трис-НСl рН 8,0	2,5 мл	25 мМ Трис-НСl рН 8,0
5 М NaCl	10 мл	0,5 М NaCl
2,5 М имидазол	0,4 мл	10 мМ имидазол
50 % глицерин	10,0 мл	5 % глицерин
дН ₂ О	77,1 мл	

Таблица 11

Приготовление буферов В, С, Е

	Буфер А	Добавляемый компонент
Буфер В (50 мл)	49,5 мл буфера А	+ 0,5 мл 10 % тритон X100
Буфер С (50 мл)	45,0 мл буфера А	+ 5,0 мл 5 М NaCl
Буфер Е (10 мл)	9 мл	+ 1 мл 2,5 М имидазола

5.3.4. Ход работы

1) Закрепить пустую колонку в штативе;
2) Пропустить через колонку 0,5 мл воды, для удаления воздуха из фильтра и кончика колонки.

3) Добавить сорбент для аффинной хроматографии. Для этого перенести 500 мкл 50 % суспензии сорбента (Ni-NTA сефарозы) в полипропиленовую колонку.

Внимание! Для предотвращения разрушения матрикса сорбента необходимо использовать наконечники с отрезанным кончиком

4) Перед первым использованием промыть сорбент 4 мл H₂O для удаления консервирующего раствора, затем уравновесить 4 мл буфера А, аккуратно добавляя растворы по стенке колонки;

5) Осторожно нанести по стенке колонки осветленный бесклеточный экстракт;

6) Собрать проскок (1), закрыть колонку и нанести проскок на колонку еще раз;

7) 20 мкл проскока (2) отобрать в пробирку с маркировкой «FT» (англ. **Flow-through** – проскок) и поместить в морозильник на -20 °С для последующего электрофоретического анализа;

8) Промыть сорбент последовательно 4 мл буферов А, В, С;

9) Элюировать сорбированный белок, добавляя по 250 мкл элюирующего буфера (буфер Е) и собирая фракции по 250 мкл в отдельные пробирки (обычно достаточно 4–5 фракций);

Количество отобранных фракций может быть увеличено.

10) Отобрать 20 мкл из каждой фракции, подписать пробирки «Е» (англ. **Elate** – элюат), пронумеровать и поместить в морозильник на -20 °С;

11) После отбора последней фракции закрыть колонку и провести очистку и консервацию сорбента: последовательно промыть колонку 2 мл 0,25 М имидазола; 2 мл 1 М NaCl; 4 мл H₂O; 1 мл раствором 20 % этанола;

При сильном загрязнении сорбента может потребоваться регенерация сорбента (см. приложение 2)

- 12) Закрыть колонку и поместить в холодильник;
- 13) Пробирки с фракциями элюатов после аффинного сорбента заморозить в жидком азоте и поместить на хранение в низкотемпературный морозильник на $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

5.4. Электрофоретический анализ белковых фракций

5.4.1. Рабочие растворы и материалы

- 1) 10 % персульфат аммония (ПСА) ($-20\text{ }^{\circ}\text{C}$);
- 2) ТЕМЕД ($4\text{ }^{\circ}\text{C}$);
- 3) 40 % акриламид/бис-акриламид 29:1 ($4\text{ }^{\circ}\text{C}$);
- 4) 4X буфер для разделяющего геля ($4\text{ }^{\circ}\text{C}$);
- 5) 4X буфер для концентрирующего геля ($4\text{ }^{\circ}\text{C}$);
- 6) 10 % SDS, 1 % SDS;
- 7) 4X буфер для внесения образцов с меркаптоэтанолом;
- 8) электродный буфер;
- 9) стандарт молекулярных масс белков ($-20\text{ }^{\circ}\text{C}$);
- 10) концентрат раствора красителя для геля;
- 11) раствор для фиксации гелей;

5.4.2. Оборудование

- 1) комплект оборудования для проведения электрофореза Mini Protean Tetra (Bio-Rad, США) или аналог;
- 2) микроволновая печь;
- 3) лабораторный шейкер;
- 4) гель-документирующая система с программным обеспечением.

Внимание! Работу с растворами акриламида следует проводить в перчатках! Акриламид – нейротоксичный яд!

5.4.3. Приготовление геля

- 1) Подготовить стеклянные пластинки со спейсерами, установить их в заливочный столик;
- 2) Для приготовления разделяющего геля смешать компонен-

ты (за исключением ТЕМЕД и ПСА) в соответствии с таблицей 12. Полученную смесь тщательно перемешать;

Таблица 12

Приготовление геля

Объем, мл	10 % гель (разделяющий) 10 мл	5 % гель (концентрирующий) 5 мл
40 % акриламид/бис-акриламид	2,5	0,63
4X буфер	2,5 ¹	1,25 ²
10 % SDS	0,1	0,05
дН ₂ О	4,9	3,0

¹ – 4X буфер для разделяющего геля: 1,5 М Трис-НСl, рН 8,8

² – 4X буфер для концентрирующего геля: 0,5 М Трис-НСl, рН 6,8

Удобно приготовить растворы для заливки гелей (без ПСА и ТЕМЕД), хранить их в холодильнике и использовать требуемые объемы по мере необходимости.

3) Добавить последовательно 5 мкл ТЕМЕД и 50 мкл 10 % ПСА к 10 мл раствора разделяющего геля и тщательно перемешать полученный раствор без вспенивания, так как кислород препятствует процессу полимеризации;

4) Полученный раствор разделяющего геля осторожно залить между стеклянными пластинами, так чтобы уровень не превышал 1,5 см от верхнего края короткой пластины;

5) Осторожно наслоить на раствор разделяющего геля тонкий слой 1 % раствора SDS и оставить гель застывать (до 20 мин).

Покрытие слоем жидкости поверхности полимеризующегося геля призвано ограничить доступ кислорода, который ингибирует полимеризацию. Также можно использовать воду, изоамиловый спирт, этанол, бутанол.

6) Приготовить раствор концентрирующего геля, как указано в таблице 12, добавить последовательно 5 мкл ТЕМЕД и 25 мкл 10 % ПСА к 2,5 мл раствора 5 % геля и тщательно перемешать полученный раствор;

7) Удалить слой раствора с поверхности застывшего разделяющего геля;

8) Наслоить на поверхность застывшего разделяющего геля раствор концентрирующего геля и немедленно вставить гребенку между стеклянными пластинами;

9) Оставить гель застывать в течение ~20 мин;

Для рутинных форезов залитые гели можно хранить в пакете в холодильнике при 4 °С, обернутыми во влажные бумажные салфетки (для предотвращения высыхания), в течение 1 недели без значительной потери свойств.

5.4.4. Сборка камеры и проведение электрофореза

1) Поставить электрофорезную камеру на ровную горизонтальную поверхность;

2) Перенести пластины с гелем с заливочного столика и закрепить их в электрофорезной камере;

3) Добавить электродный буфер в нижнюю и верхнюю часть электрофорезной камеры, так чтобы уровень электродного буфера на 0,5 см был выше уровня геля;

4) Осторожно удалить гребенку и промыть лунки электродным буфером с помощью шприца или автоматической пипетки;

5) Подготовить образцы растворов белков: смешать их с 4X буфером для образцов в соотношении 1:3;

6) Нагреть полученные образцы на водяной бане или в твердотельном термостате при 95–100 °С 5 мин;

7) Охладить образцы до комнатной температуры, после чего кратковременно центрифугировать пробирки для сброса конденсата с крышки и стенок;

8) Внести в лунки по 5 мкл образцов;

9) Подключить электрофорезную камеру к источнику тока. Электрофорез в мини-формате проводится при постоянном напряжении 100 В, пока фронт красителя не достигнет разделяющего геля, затем 180 В в течение 40–50 мин;

10) По достижении красителем нижнего края геля отключить ток, удалить пластинки с гелем из электрофорезной камеры, осторожно отделить гель от стеклянных пластинок и перенести в фиксирующий раствор и 5 мин инкубировать при покачивании.

5.4.5. Визуализация и документирование белковых полос в геле

1) Заменить фиксирующий раствор, затем добавить 1 мл концентрированного раствора кумасси G250/кумасси R250 на 20–25 мл и перемешать;

2) Нагреть раствор в ванночке в микроволновой печи, не допуская сильного кипения (20–30 сек при мощности 800 Вт), инкубировать 15 мин при покачивании на шейкере;

3) Слить раствор красителя, промыть водопроводной водой и добавить фиксирующий раствор, нагреть в микроволновой печи;

4) Отмыть гель, покачивая на шейкере до обесцвечивания фона (20–30 мин). Для ускорения отмывки рекомендуется поместить в ванночку бумажную салфетку;

5) Снять изображение геля в гель-документирующей системе, с помощью программ для анализа гелей определить молекулярную массу целевого белка, чистоту препарата;

5.5. Окраска His₆-меченых белков диазореактивом Паули

Для селективной детекции рекомбинантных белков с His₆-тэгом чаще всего применяется метод вестерн-блоттинга с использованием конъюгата антител с пероксидазой хрена либо нитрилтриуксусной кислоты с Ni²⁺ с пероксидазой хрена (HisProbeHRP, Thermo Disher Scientific, США). Процесс вестерн-блоттинга довольно дорогой и долгий (более 3 часов), для более быстрой и дешевой детекции белков, богатых гистидином, можно использовать диазореактив Паули [46].

В 1904 году немецкий химик Паули обнаружил, что диазотированная сульфаниловая кислота при взаимодействии с аминокислотами тирозином и гистидином в щелочных условиях (рис. 17) дает окрашенные продукты ярко красного цвета.

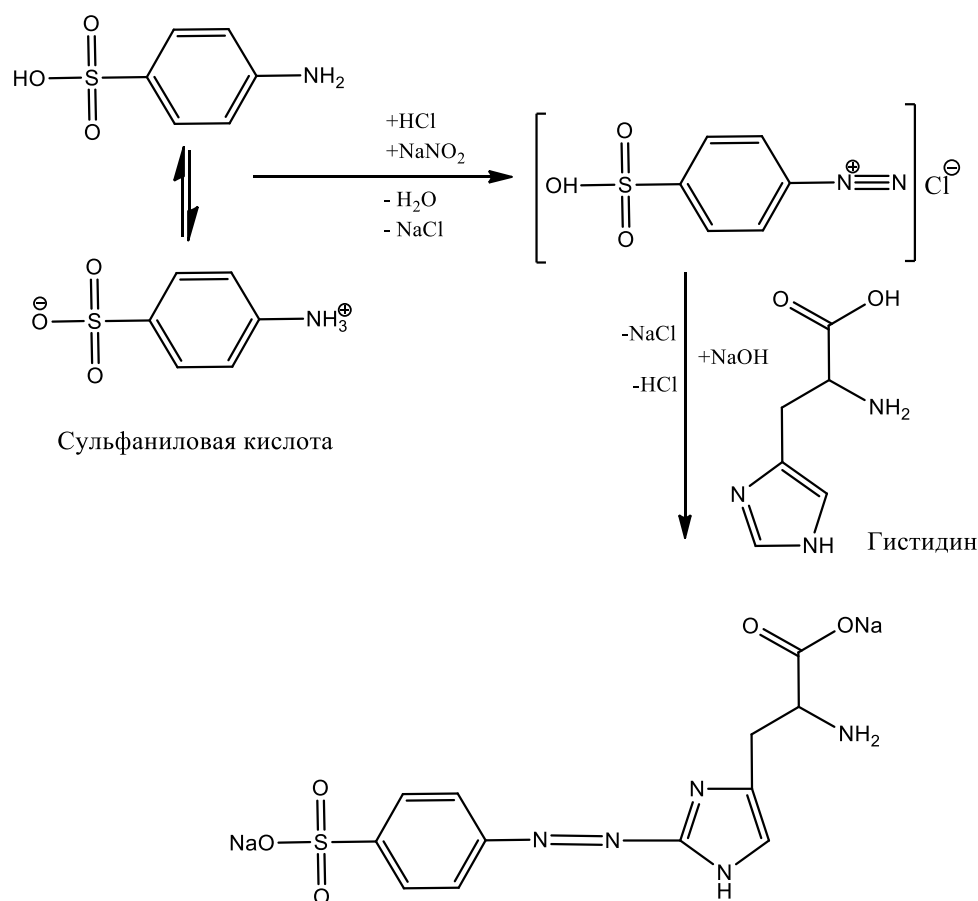


Рис. 17. Реакция азосочетания диазотированной сульфаниловой кислоты и гистидина

Реакция обусловлена тем, что аминокислоты гистидин и тирозин имеют подвижные атомы в ароматической части радикала, за счет которых они и вступают в реакцию азосочетания с диазотированной сульфаниловой кислотой (дiazoreactive Паули).

В работе Sahal с соавт. (2002) было предложено применение диазореактива Паули для селективного окрашивания гистидин-богатых белков на полиакриламидных гелях [46]. В данном учебном пособии приведен протокол из статьи Sahal и соавт. с небольшими изменениями.

5.5.1. Оборудование и материалы

- 1) лабораторный шейкер;
- 2) мерная посуда, лабораторные стаканы, ванночка для гелей.
- 3) Реактивы:
- 4) сульфаниловая кислота (чда);

- 5) нитрит натрия (хч);
- 6) соляная кислота, концентрированная (хч);
- 7) карбонат натрия (хч);
- 8) гидроксид натрия (ч).

5.5.2. Рабочие растворы

- 1) Реагент А: 5 % нитрит натрия в воде (готовить непосредственно перед экспериментом);
- 2) Реагент Б: 0,2 г сульфаниловой кислоты растворить в 2 мл концентрированной HCl, добавить 20 мл воды (при хранении в темноте при 4 °С стабилен несколько месяцев).
- 3) 10 % карбонат натрия;
- 4) 10 % NaOH.

5.5.3. Ход работы

- 1) После проведения электрофореза гель фиксировать 10 мин в фиксирующем растворе (10 % изопропанола, 10 % уксусной кислоты) с покачиванием;
- 2) Тщательно промыть гель 3 раза по 5 мин в дистиллированной воде;
- 3) Смешать 20 мл реагента А с 20 мл реагента Б, залить гель полученным раствором и инкубировать 5 мин с покачиванием;
- 4) Добавить 40 мл 10 % карбоната натрия, перемешать;
После добавления 10 % карбоната натрия происходит реакция азосочетания и белки, богатые гистидином, начинают проявляться на геле в виде желтых полосок.
- 5) После появления окрашенных полос для усиления цвета можно добавить 20 мл 10 % NaOH. После начала изменения цвета желтых полос белков на красновато-коричневый, раствор необходимо быстро слить и гель промыть дистиллированной водой (рис. 18).

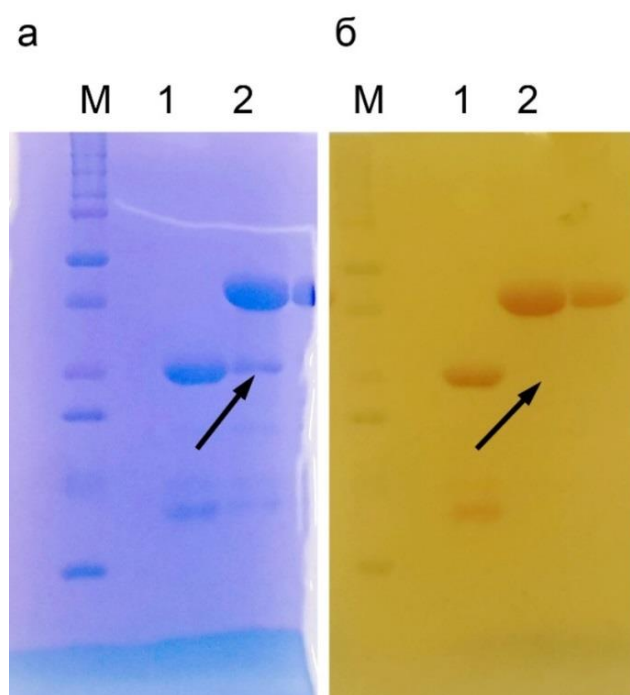


Рис. 18. Электрофореграмма фракций His₆-белков, окрашенных раствором Кумасси R250 (а) и диазореактивом Паули (б). Стрелками отмечено положение полоски фрагмента белка без His₆-тэга

Данный метод позволяет проводить быструю детекцию гистидин-богатых белков. Так как содержание гистидина в природных белках невелико (около 2 %), то окрашиваются преимущественно рекомбинантные белки, несущие 6 гистидинов. Недостатком метода является то, что некоторые природные гистидин-богатые белки также окрашиваются, хотя и не так интенсивно. Реагент Паули можно также применять для экспресс-детекции белков во фракциях элюатов. Для этого 5–10 мкл белкового раствора наносится на нитроцеллюлозную мембрану. Далее мембрана отмывается от имидазола в воде (2–3 раза) и окрашивается реагентом Паули. Фракции, содержащие рекомбинантные белки с полигистидиновым тэгом, проявляются в виде красных пятен.

Приложение 1

Приготовление основных рабочих растворов и реагентов

Растворы для регенерации сорбента

0,1 М NiSO₄: растворить 0,26 г NiSO₄·6H₂O (мол. масса 262,9 г/моль) или 0,28 г NiSO₄·7H₂O (мол. масса 280,9 г/моль) в 8 мл H₂O, довести объем до 10 мл.

Внимание! Соли никеля считаются аллергенными и потенциально канцерогенными, следует обращаться с осторожностью!

0,1 М CoSO₄: растворить 0,17 г CoSO₄·H₂O (мол. масса 173,0 г/моль) или 0,26 г CoSO₄·6H₂O (мол. масса 263,1 г/моль) или 0,28 г CoSO₄·7H₂O (мол. масса 281,1 г/моль) в 8 мл H₂O, довести дH₂O объем до 10 мл.

0,5 М NaOH: растворить 2 г NaOH (мол. масса 40,0 г/моль) в 80 мл H₂O, довести объем до 100 мл.

*Внимание! Едкое вещество, следует обращаться с осторожностью!
Хранить в полипропиленовой посуде.*

0,1 М ЭДТА: растворить 2,92 г ЭДТА (мол. масса 292,24 г/моль) в 70 мл H₂O, довести рН до 8 раствором NaOH, довести объем до 100 мл.

Растворы для выделения и очистки белков

25 мг/мл лизоцим

Растворить 0,25 г лизоцима в 10 мл дH₂O, сделать аликвоты и хранить при -20 °С.

При -20 °С сохраняет активность до 4 лет.

1 мг/мл ДНКазы I

Растворить навеску ДНКазы I до конечной концентрации 1 мг/мл в 50 % глицерине, 1мМ CaCl₂. Хранить при -20 °С.

Раствор стабилен до 1 года.

1 М Трис-НСl, рН 8,0: растворить 12,1 г Трис в 70 мл Н₂О, довести рН до 8,0 раствором НСl. Довести объем до 100 мл, профильтровать через 0,45 мкм фильтр. Хранить при 4 °С.

100 мМ PMSF: Для приготовления 100 мМ раствора растворить 17,4 мг PMSF в 1 мл безводного метанола. Хранить при -20 °С.

*Внимание! PMSF токсичен, следует обращаться с осторожностью!
PMSF хорошо растворим в этаноле, изопропаноле или метаноле. Удобнее использовать раствор в метаноле, так как при хранении при -20 °С PMSF в метаноле не выпадает в осадок. В безводном растворителе при -20 °С стабилен до 9 месяцев.*

50 % глицерин (по объему): взвесить 62,5 г глицерина, довести объем до 100 мл. Стерилизовать автоклавированием в течение 15 мин при 121 °С.

10 % тритон X-100

Взвесить 1 г тритона X-100, растворить дН₂О в 8 мл. Перемешать до полного растворения и довести объем до 10 мл.

| *Хранить при комнатной температуре в защищенном от света месте.*

2,5 М Имидазол

Растворить 17,0 г имидазола в 80 мл воды, довести рН до 8,0 при помощи НСl. Довести объем до 100 мл.

| *Хранить при комнатной температуре.*

Растворы для электрофоретического анализа белков

40 % акриламид/бис-акриламид

29:1 (3,3 % бис-акриламида)

Растворить 38,67 г акриламида и 1,33 г бис-акриламида в 60 мл воды, при необходимости подогреть до 50–60 °С до полного растворения. Довести объем до 100 мл, профильтровать через 0,45 мкм фильтр.

| *Хранить при 4 °С.*

37,5:1 (2,6 % бис-акриламида)

Растворить 38,96 г акриламида и 1,04 бис-акриламида в 60 мл воды, при необходимости подогреть до 50–60 °С до полного растворения. Довести объем до 100 мл, профильтровать через 0,45 мкм фильтр.

| Хранить при 4 °С.

10 % персульфат аммония

Растворить 0,5 г персульфата аммония в 5 мл дН₂О, сделать аликвоты по 0,5 мл и хранить при -20 °С.

| *В некоторых источниках отмечается необходимость применения свежеприготовленного раствора, однако опыт показывает, что в замороженном состоянии раствор ПСА может храниться несколько месяцев без ощутимой потери свойств.*

4X буфер разделяющего геля (1,5 М Трис-НСl, рН 8,8)

Растворить 18,2 г Трис в 70 мл Н₂О, довести рН до 8,8 раствором НСl. Довести объем до 100 мл, профильтровать через 0,45 мкм фильтр.

| Хранить при 4 °С (стабилен до 1 месяца).

4X буфер для внесения образцов

Для приготовления 10 мл 4X буфера для внесения образцов смешать в 15 мл центрифужной пробирке 5,0 г 100 % глицерина; 0,44 г SDS; 2,8 мл 1 М Трис-НСl рН 6,8; 0,2 мл 1 % бромфенолового синего. Довести объем дН₂О до 9 мл, инкубировать при 50–60 °С до полного растворения. Хранить при комнатной температуре. Перед применением смешать 900 мкл раствора и 100 мкл В-МЕ или к 950 мкл раствора добавить 50 мкл 1 М DTT.

| *После добавления восстанавливающих агентов буфер для внесения образцов может храниться при -20 °С, однако для важных образцов предпочтительно применение свежеприготовленного буфера. Состав соответствует 4X буферу для внесения фирмы BioRad (США) с небольшими изменениями (40 % глицерина вместо 44,4 % в буфере BioRad). При работе с разбавленными растворами белка можно использовать 6-кратный буфер.*

4X буфер концентрирующего геля (0,5 М Трис-НСl, рН 6,8)

Растворить 6,05 г Трис в 70 мл Н₂О, довести рН до 6,8 раствором НСl. Довести объем до 100 мл, профильтровать через 0,45 мкм фильтр.

| *Хранить при 4 °С (стабилен до 1 месяца).*

10X электродный буфер

Для приготовления 1 л 10-кратного электродного буфера растворить 30 г трис, 144 г глицина и 10 г SDS в небольшом объеме воды, затем довести объем до 1 л.

| *Не доводить рН НСl!*

25X концентрат раствора красителя для полиакриламидного геля

Растворить 0,25 г кумасси G250 и 0,25 г кумасси R250 в 100 мл раствора 40 % этанола с 10 % уксусной кислоты.

Раствор для отмывки гелей

Вариант 1: 10 % изопропанола, 10 % уксусной кислоты в воде.

Вариант 2: 5 % этанола, 5 % уксусной кислоты в воде.

| *Хранить в плотно закрытой бутылки при комнатной температуре*

Подготовка колонки для металлохелатной аффинной хроматографии

Для проведения аффинной хроматографии с применением Ni-NTA-сефарозы в колоночном формате подходят полипропиленовые или стеклянные колонки с фильтром в нижней части. В качестве колонок можно использовать и пустые полые цилиндры шприцов, но в таком случае для предотвращения потери сорбента необходимо покрыть дно цилиндра шприца стеклянной ватой или бумажным фильтром.

На сегодняшний день существует большой ассортимент коммерчески доступных сорбентов и пустых колонок (см. приложение 3). При выборе колонки необходимо учитывать предполагаемый объем сорбента, а также объем осветленного лизата клеток. При большом объеме лизата клеток (50–100 мл) следует отдать предпочтение колонке с большим диаметром (например, с диаметром 2,5 см и высотой 10 см), это позволит значительно ускорить хроматографическую очистку рекомбинантного белка. Однако следует иметь в виду, что элюирование белка в колонке с большим диаметром приведет к разбавлению раствора белка. В связи с этим в некоторых случаях удобно проводить операции связывания и промывки на большой и широкой колонке, а элюирование проводить в узкой колонке диаметром не более 1,5 см. Другой вариант сорбции рекомбинантного белка из раствора большого объема – использование хроматографии в объеме (батч-хроматографии). Для этого уравновешенный сорбент добавляется в подготовленный (осветленный, с доведенным рН) раствор, содержащий целевой белок. После перемешивания сорбент собирается центрифугированием или фильтрованием.

При выборе хроматографического сорбента для металлохелатной хроматографии следует обратить внимание на природу матрикса и на метод иммобилизации ионов никеля на матриксе. Сорбенты основных производителей обладают схожими свойствами и в большинстве случаев взаимозаменяемы. В коммерческих сорбентах в качестве матрикса часто используют производные агарозы, такие как химически

кросс-сшитые сефарозы с различным размером частиц. Существуют также сорбенты на основе полиакриламидных и полистирол-дивинилбензольных полимеров.

При наличии перистальтического насоса или хроматографической системы возможно применение готовых упакованных картриджей с аффинным сорбентом. Однако зачастую проведение хроматографической очистки самотеком с использованием самостоятельно набитой колонки позволяет проводить очистку гораздо быстрее, особенно если параллельно очищаются несколько белков.

Загрузка колонки

1) Закрепить колонку в штативе либо установить колонку в охлаждающую рубашку, как показано на рис. 19.

Для большинства белков предпочтительно проведение хроматографической очистки при охлаждении (4 °С) для понижения активности протеолитических ферментов и увеличения стабильности выделяемого белка. Но не всегда есть возможность проведения процедуры очистки в холодной комнате или в специальном холодильнике. В таких случаях удобно в качестве источника охлаждения использовать емкость с отверстием на дне, где через силиконовую трубку закрепляется колонка. Эта емкость заполняется льдом, что обеспечивает охлаждение колонки и сорбента во время процедуры хроматографии.

2) В подготовленную пустую колонку налить H₂O и позволить вытечь так, чтобы вода покрывала дно на 1 см от фильтра колонки. Закрывать колонку.

Для закрывания колонки можно использовать пробки, которые идут в комплекте с колонкой. В случае отсутствия таковых можно использовать короткий отрезок силиконовой трубочки подходящего диаметра. В свою очередь, силиконовая трубочка может пережиматься зажимом либо закрываться пластиковой/стеклянной палочкой.

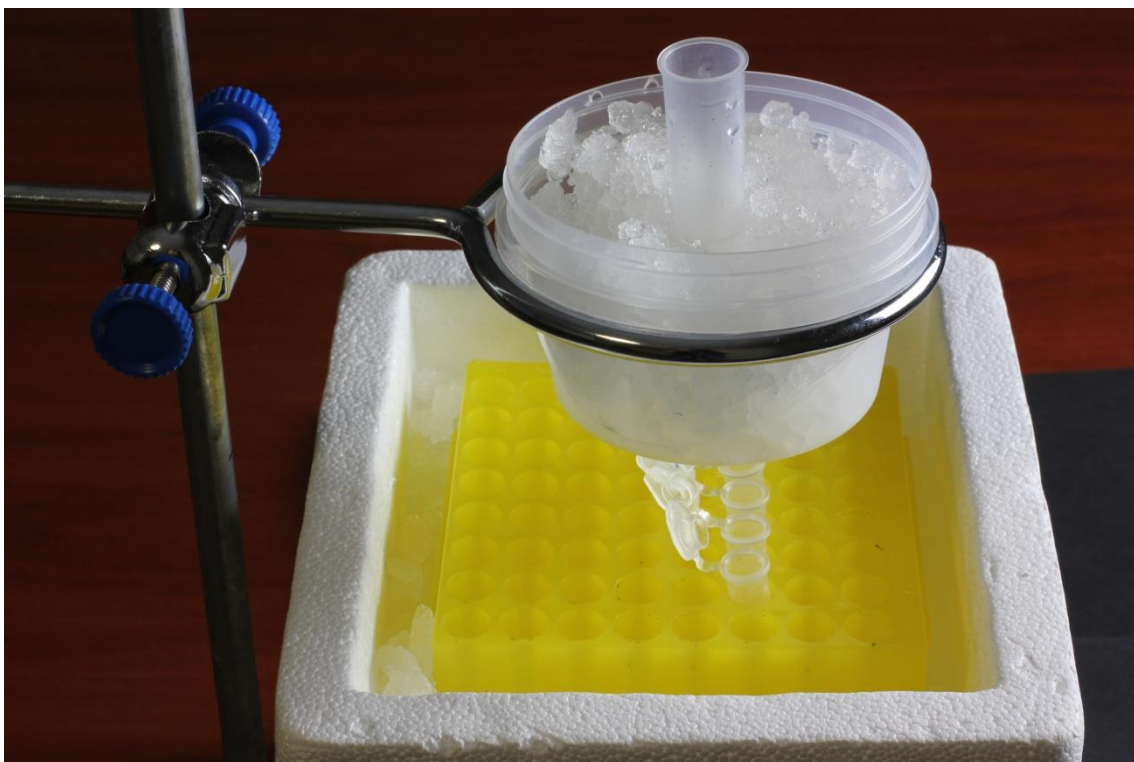


Рис. 19. Установка колонки в охлаждающую рубашку

3) Отрезать кончик наконечника автоматической пипетки на 1 мл так, чтобы диаметр отверстия получился около 4–5 мм. Установить этот наконечник в дозатор, набрать необходимый объем 50 % суспензии сорбента и аккуратно перенести в колонку.

Сорбент представляет собой модифицированные нитрилотриуксусной кислотой химически кросс-сшитые агарозные гранулы сферической формы. В целях предотвращения повреждения гранул сорбента для переноса сорбента нежелательно применять наконечники с узким отверстием.

4) Промыть сорбент 5BV H_2O , затем уравновесить таким же объемом рабочего буфера.

Для предотвращения бактериального роста сорбенты зачастую хранятся в 20 % этаноле. Перед уравниванием в рабочем буфере необходимо удалить спирт, так как в противном случае часть солей может выпасть в осадок. Особенно это опасно в готовых колонках/картриджах для очистки белков с применением хроматографической системы. Поверхность сорбента должна быть покрыта буфером на 1–2 мм, не допускайте высыхания сорбента.

Очистка сорбента после проведения хроматографии

После проведения хроматографии сорбент должен быть очищен от белков и других неспецифично связанных соединений. Если сорбент применяется для очистки одного и того же белка, то процедуру очистки можно проводить следующим образом:

- 1) промыть 3 BV 0,5 М имидазола;
- 2) промыть 5 BV H₂O;
- 3) промыть 2 BV 0,5 М NaOH.

Если сорбент сильно загрязнен (ухудшилась скорость потока, наблюдаются агрегаты), тогда следует инкубировать в 0,5М NaOH до 30 мин. Обработка раствором NaOH позволяет очистить частицы сорбента от загрязнителей гидрофобной природы.

- 1) обильно промыть H₂O, 10–20 BV;
- 2) промыть 5 BV 2М NaCl;
- 3) промыть 5 BV H₂O;
- 4) промыть 5 BV 20 % этанола, закрыть колонку.

Сорбент хранить в холодильнике при 4 °С в 20 % растворе этанола для предотвращения микробного роста.

Сорбент, заряженный Co²⁺, перед промывкой NaOH рекомендуется промыть 100 мМ ЭДТА для удаления ионов кобальта.

Регенерация сорбента

Сорбент можно использовать для очистки белков до 20 раз без потерь емкости. Со временем из-за вымывания ионов никеля емкость сорбента падает, в таком случае необходимо провести процедуру регенерации сорбента. Регенерация также необходима, если сорбент будет применяться для очистки разных белков. Однако в случаях, когда сорбент был серьезно поврежден или если связывающая способность со временем снизилась, например, из-за повторной загрузки богатых липидами или хелатирующих компонентов образцов, никель можно легко удалить и повторно зарядить никелем или другим металлом. Удобно объединять загрязненные сорбенты и проводить процедуру регенерации одновременно в одной широкой колонке или на воронке Шотта.

- 1) Промыть очищенный (см. выше) сорбент 10 BV деионизированной H₂O;
- 2) Удалить ионы металлов, пропуская 5 BV 100 мМ EDTA, pH 8,0, через слой сорбента;
- 3) Промыть сорбент 10 BV дH₂O;
- 4) Пропустить 2 BV 100 мМ водного раствора иона металла (например, NiSO₄ или NiCl₂) через сорбент.

Ионы металлов, которые могут быть успешно и стабильно иммобилизованы на NTA, включают медь (CuCl₂, CuSO₄), цинк (ZnCl₂, ZnSO₄), кобальт (CoCl₂, CoSO₄) и железо (FeCl₃, Fe₂(SO₄)₃). При зарядке солями железа и цинка использовать кислые растворы, pH = 3 для железа и pH = 5.5 для цинка, для того чтобы избежать проблем с растворимостью.

- 5) Промыть сорбент 10 BV дH₂O, чтобы удалить все несвязанные ионы металлов;
- 6) Добавить буфер для хранения или уравновесить колонку не менее 5 BV начального буфера для немедленного использования;

Важно тщательно отмыть от несвязавшихся ионов никеля. При наличии свободных ионов никеля в сорбенте при добавлении буфера с редуцирующими агентами Ni²⁺ восстанавливается, и сорбент приобретает буровато-коричневый цвет. В таких случаях рекомендуется промыть 1 % раствором перекиси водорода, смыть ионы металла ЭДТА и загрузить ион металла заново. Для длительного хранения промыть сорбент 5 BV 20 % этанола и хранить в нем же в холодильнике при 4 °С.

Справочная информация

Таблица 13

Сорбенты для МХАХ

Наименование (Производитель, каталожный номер)	Лиганд/ ион	Емкость колонок ¹	Матрикс, средний размер частиц
Матриксы на основе сшитой агарозы			
Ni-NTA agarose (Qiagen, 30210)	NTA/Ni ²⁺	до 50 мг/мл	Sepharose 6CL, 90 мкм
Ni Sepharose High Performance (Cytiva, 17-5268-01)	нд ² /Ni ²⁺	до 40 мг/мл	Sepharose 6CL, 90 мкм
Ni Sepharose Excel ³ (Cytiva, 17371201)	нд/Ni ²⁺	до 10 мг/мл	Sepharose 6CL, 90 мкм
TALON (Clontech, 635501)	CM- Asp/Co ²⁺	до 60 мг	Sepharose 6CL, 90 мкм
Матриксы на основе акриламида			
Profinity IMAC Resin (BioRad, 1560133)	IDA/Ni ²⁺	не менее 15 мг/мл	Profinity/UNOsphere beads, 60 мкм
Nuvia IMAC Resin (BioRad, 7800800)	NTA/Ni ²⁺	не менее 40мг/мл	Nuvia/UNOsphere beads, 38–53 мкм
Матриксы на основе сшитой агарозы			
WorkBeads 40 NTA (BioWorks, 40 651 001)	NTA/Ni ²⁺	до 60 мг/мл	WorkBeads, 45 мкм
WorkBeads NiMAC ³ (BioWorks, 40 653 001)	нд/Ni ²⁺	до 40 мг/мл	WorkBeads, 45 мкм

¹ – по информации производителей; ² – нет данных; ³ – устойчив к действию ДТТ и ЭДТА

**Пустые стеклянные и полипропиленовые
колонки для аффинной хроматографии**

Наименование (Производитель, каталожный номер)	Размеры, диаметр × длина без резервуара (общая), см	Емкость, мл	Примечание
Универсальные колонки			
Econo-Pac (BioRad, 7321010)	1,5 × 12 (14)	20	Удобная колонка, при использовании адаптера может быть применена с перистальтическим насосом (и ограничено с хроматографической системой)
PD10 (Cytiva, 17043501)	1,5 × 10	13	Возможно использование в качестве спин-колонки (с адаптером и в 50 мл пробирках)
Pierce Centrifuge Columns, 10 mL (Thermo, 89898)	1,5 × 6,6 (11,2)	10	Может быть использована как для хроматографии самотеком (gravity-flow) или как спин-колонка (вкладывается в 50 мл пробирку без необходимости использования адаптера)
Колонки большого объем			
Econo-Column (BioRad, 7372512)	2,5 × 10	49	Удобная колонка при работе с большими объемами. При использовании адаптера может быть применена с перистальтическим насосом и с хроматографической системой

Продолжение таблицы 14

Наименование (Производитель, каталожный номер)	Размеры, диаметр × длина без резервуара (общая), см	Емкость, мл	Примечание
Econo-Column (BioRad, 7372522)	2,5 × 20	98	Увеличенный вариант колонки Econo
Маленькие и спин-колонки			
Poly-Prep Chroma- tography Columns (BioRad, 7311550)	0,8 × 4 (9)	2	Колонка для небольших объемов сорбента, емкость – 4 мл для сорбента и 10 мл резервуар для буфера
Pierce Centrifuge Columns (Thermo, 89896)	0,75 × 5,4 (10)	2	Удобная колонка для небольших объемов сорбента, с резервуаром, можно использовать как спин-колонку в 15 мл пробирках типа фалькон
Micro Bio-Spin (BioRad, 7326204)	0,8 × 2 (3)	0,8	Колонка для параллельной скрининг-очистки белков или очистки небольшого количества белкового препарата. Возможно использование в качестве спин-колонки
Mobicol classic (Mobitec, M1002S)	0,8 × 1,8 (3)	0,8	Колонки для очистки небольшого количества белкового препарата. Комплекуются адаптером с креплением «Луер» для соединения со шприцом или перистальтическим насосом
Pierce Spin Columns (Thermo, 69705)	0,8 × 1,8 (3)	0,8	

Литература

1. Starckenstein, E. Ferment action and the influence upon it of neutral salts / E. Starckenstein // *Biochem Z.* – 1910. – V.24. – P. 210–218.
2. Helfferich, F. ‘Ligand Exchange’: a Novel Separation Technique / F. Helfferich // *Nature.* – 1961. – V. 189 – 4769 – P. 1001–1002.
3. Porath, J. Metal chelate affinity chromatography, a new approach to protein fractionation / J. Porath, J. Carlsson, I. Olsson, G. Belfrage // *Nature.* – 1975. – V.258 – P. 598–599.
4. Chaga, G.S. Twenty-five years of immobilized metal ion affinity chromatography: past, present and future / G.S. Chaga // *J. Biochem. Biophys. Methods.* – 2001. – V. 49. – P. 313–334.
5. Sulkowski, E. The saga of IMAC and MIT / E. Sulkowski // *Bioessays.* – 1989. – V. 10, № 5. – P. 170-175.
6. Hochuli, E. Genetic approach to facilitate purification of recombinant proteins with a novel metal chelate adsorbent / E. Hochuli, W. Bannwarth, H. Döbeli, R. Gentz, D. Stüber // *Biotechnology.* – 1988. – V. 6 – № 11. – P. 1321–1325.
7. Hochuli, E. New metal chelate adsorbent selective for proteins and peptides containing neighbouring histidine residues / E. Hochuli, H. Döbeli, A. Schacher // *Journal of Chromatography A.* – 1987. – V. 411. – P. 177–184.
8. Chaga, G. poly-histidine affinity tag for purification of recombinant proteins on cobalt (II)-carboxymethylaspartate crosslinked agarose / G. Chaga, D.E. Bochkariov, G.G. Jokhadze, J. Hopp, P. Nelson // *Journal of Chromatography A.* – 1999. – V. 864 – № 2. – P. 247–256.
9. Chaga, G. Engineering of a metal coordinating site into human glutathione transferase M1-1 based on immobilized metal ion affinity chromatography of homologous rat enzymes / G. Chaga, M. Widersten, L. Andersson et al. // *Protein Engineering, Design and Selection.* – 1994. – V. 7 – № 9. – P. 1115–1119.
10. Sun, X. Application of immobilized metal affinity chromatography in proteomics / X. Sun, J.-F. Chiu, Q.-Y. He // *Expert review of proteomics.* – 2005. – V. 2 – № 5. – P. 649–657.

11. Ueda, E. Current and prospective applications of metal ion–protein binding / E. Ueda, P. Gout, L. Morganti // *Journal of chromatography A*. – 2003. – V. 988 – № 1. – P. 1–23.
12. *Affinity chromatography: principles and methods*. – Uppsala: GE Healthcare Bio-Sciences AB, 2007. – 159 P.
13. Kimple, M.E. Overview of affinity tags for protein purification / M.E. Kimple, A.L. Brill, R.L. Pasker // *Current protocols in protein science*. – 2013. – V. 73. – P. 9.9.1–9.9.23.
14. Gaberc-Porekar, V. Perspectives of immobilized-metal affinity chromatography / V. Gaberc-Porekar, V. Menart // *Journal of biochemical and biophysical methods*. – 2001. – V. 49 – № 1–3. – P. 335–360.
15. Arnold, F.H. Metal-Affinity Separations: A New Dimension in Protein Processing / F.H. Arnold // *Bio/Technology*. – 1991. – V. 9 – № 2. – P. 151–156.
16. Hale, J.E. Purification of humanized murine and murine monoclonal antibodies using immobilized metal-affinity chromatography / J.E. Hale, D.E. Beidler // *Analytical biochemistry*. – 1994. – V. 222 – № 1. – P. 29–33.
17. Todorova-Balvay, D. Immobilized metal-ion affinity chromatography of human antibodies and their proteolytic fragments / D. Todorova-Balvay, O. Pitiot, M. Bourhim, T. Srikrishnan, M. Vijayalakshmi // *Journal of chromatography B*. – 2004. – V. 808 – № 1. – P. 57–62.
18. Serpa, G. Evaluation of immobilized metal membrane affinity chromatography for purification of an immunoglobulin G1 monoclonal antibody / G. Serpa, E.F.P. Augusto, W. Tamashiro et al. // *Journal of Chromatography B*. – 2005. – V. 816 – № 1-2. – P. 259–268.
19. Prasanna, R.R. Characterization of metal chelate methacrylate monolithic disk for purification of polyclonal and monoclonal immunoglobulin G / R.R. Prasanna, M.A. Vijayalakshmi // *Journal of Chromatography A*. – 2010. – V. 1217 – № 23. – P. 3660–3667.
20. Jin, L. Use of α -N, N-bis [carboxymethyl] lysine-modified peroxidase in immunoassays / L. Jin, X. Wei, J. Gomez et al. // *Analytical biochemistry*. – 1995. – V. 229 – № 1. – P. 54–60.

21. Kim, M.J. Western blot analysis using metal–nitrilotriacetate conjugated CdSe/ZnS quantum dots / M.J. Kim, H.-Y. Park, J. Kim et al. // *Analytical biochemistry*. – 2008. – V. 379 – № 1. – P. 124–126.
22. Лопатин, С. Лигандообменная хроматография белков и ферментов / С. Лопатин, В. Варламов, В. Даванков // *Биоорганическая химия*. – 1990. – Т. 16 – № 6. – С. 26.
23. Block, H. Immobilized-metal affinity chromatography (IMAC): a review / H. Block, B. Maertens, A. Spriestersbach et al. // *Methods in enzymology*. – 2009. – V. 463. – P. 439–473.
24. Zachariou, M. Adsorption and selectivity characteristics of several human serum proteins with immobilised hard Lewis metal ion–chelate adsorbents / M. Zachariou, M.T. Hearn // *Journal of Chromatography A*. – 2000. – V. 890 – № 1. – P. 95–116.
25. Флаксайте, С.С. Роль ионов металлов в специфическом связывании алкогольдегидрогеназы дрожжей активными красителями и сорбентами на их основе / С.С. Флаксайте, О.Ф. Суджювене, И.-Г.И. Песлякас, А.А. Глемжа // *Биоорганическая химия*. – 1984. – Т. 10 – № 1. – С. 25-31.
26. Hemdan E.S. Surface topography of histidine residues: a facile probe by immobilized metal ion affinity chromatography / E.S. Hemdan, Y.-J. Zhao, E. Sulkowski, J. Porath // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 1989. – V. 86 – № 6. – P. 1811–1815.
27. Smith, M.C. Chelating peptide-immobilized metal ion affinity chromatography. A new concept in affinity chromatography for recombinant proteins / M.C. Smith, T. Furman, T. Ingolia, P. Pidgeon // *Journal of Biological Chemistry*. – 1988. – V. 263 – № 15. – P. 7211–7215.
28. Ljungquist, C. Immobilization and affinity purification of recombinant proteins using histidine peptide fusions / C. Ljungquist, A. Breitholtz, H. Brink-Nilsson et al. // *European journal of biochemistry*. – 1989. – V. 186 – № 3. – P. 563–569.
29. Mohanty, A.K. Membrane protein expression and production: effects of polyhistidine tag length and position / A.K. Mohanty, M.P. Wiener // *Protein expression and purification*. – 2004. – V. 33 – № 2. – P. 311–325.

30. Reinhard, L.. Optimization of protein buffer cocktails using Thermofluor / L. Reinhard, H. Mayerhofer, A. Geerlof, J. Mueller-Dieckmann, M.S. Weiss // *Acta Crystallographica Section F: Structural Biology and Crystallization Communications*. – 2013. – V. 69 – № 2. – P. 209–214.
31. Pedersen, J. Removal of N-terminal polyhistidine tags from recombinant proteins using engineered aminopeptidases / J. Pedersen, C. Lauritzen, M.T. Madsen, S.W. Dahl // *Protein expression and purification*. – 1999. – V. 15 – № 3. – P. 389–400.
32. Imai, T. The neural RNA-binding protein Musashi1 translationally regulates mammalian numb gene expression by interacting with its mRNA / T. Imai, A. Tokunaga, T. Yoshida et al. // *Molecular and cellular biology*. – 2001. – V. 21 – № 12. – P. 3888–3900.
33. Enzelberger, M.M. Designing new metal affinity peptides by random mutagenesis of a natural metal-binding site / M.M. Enzelberger, S. Minning, R.D. Schmid // *Journal of Chromatography A*. – 2000. – V. 898 – № 1. – P. 83–94.
34. Waugh, D.S. An overview of enzymatic reagents for the removal of affinity tags / D.S. Waugh // *Protein expression and purification*. – 2011. – V. 80 – № 2. – P. 283–293.
35. Petty, K.J. Metal-Chelate Affinity Chromatography / K.J Petty // *Current protocols in protein science*, 1996. – P. 9.4.1–9.4.16.
36. Bornhorst, J.A. Purification of proteins using polyhistidine affinity tags / J.A. Bornhorst, J.J. Falke // *Methods Enzymol*. – 2000. – V. 326. – P. 245–54.
37. Gort, S. Purification of a hexahistidine-tagged protein using L-histidine as the eluent / S. Gort, S. Maloy // *Technical Tips Online*. – 1998. – V. 3 – № 1. – P. 54–55.
38. Bolanos-Garcia, V.M. Structural analysis and classification of native proteins from *E. coli* commonly co-purified by immobilised metal affinity chromatography / V.M. Bolanos-Garcia, O.R. Davies // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*. – 2006. – V. 1760 – № 9. – P. 1304–1313.
39. Rial, D.V. Removal of DnaK contamination during fusion protein purifications / D.V. Rial, E.A. Ceccarelli // *Protein expression and purification*. – 2002. – V. 25 – № 3. – P. 503–507.

40. Rohman, M. Separation of copurifying GroEL from glutathione-S-transferase fusion proteins / M. Rohman, K.J. Harrison-Lavoie // Protein expression and purification. – 2000. – V. 20 – № 1. – P. 45–47.

41. Yip, T.-T. Immobilized Metal Ion Affinity Chromatography / T.-T. Yip, T.W. Hutchens // Practical Protein Chromatography / Kenney A., Fowell S (eds). – Totowa, NJ: Humana Press, 1992. – P. 17–31.

42. Affinity Chromatography Handbook, Vol. 2: Tagged Proteins. – Uppsala: GE Healthcare Bio-Sciences AB, 2016. – 249 P.

43. Knecht, S. Oligohis-tags: mechanisms of binding to Ni²⁺-NTA surfaces / S. Knecht, D. Ricklin, A.N. Eberle, B. Ernst // Journal of Molecular Recognition. – 2009. – V. 22 – № 4. – P. 270–279.

44. Michalski, W.P. Resolution of three forms of superoxide dismutase by immobilised metal affinity chromatography / W.P. Michalski // Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications. – 1992. – V. 576 – № 2. – P. 340–345.

45. Kagedal, L. Immobilized Metal Ion Affinity Chromatography / L. Kagedal // Protein Purification. Principles, High Resolution Methods, and Applications; Janson J. C. (ed.). – John Wiley & Sons: 2012. – 532 P.

46. Sahal, D. Specific and instantaneous one-step chemodetection of histidine-rich proteins by Pauly's stain / D. Sahal, R. Kannan, A. Sinha et al. // Analytical biochemistry. – 2002. – V. 308 – № 2. – P. 405–408.

Учебное издание

**Хайруллин Рафиль Фидаилевич
Мифтахова Регина Рифкатовна
Филина Юлия Викторовна**

Металлохелатная аффинная хроматография

Учебное пособие

При оформлении иллюстраций применялся веб-сервер
Biorender.com

При оформлении обложки использовалась иллюстрация
Д. Беловой

Подписано в печать 17.05.2021.

Бумага офсетная. Печать цифровая.

Формат 60x84 1/16. Гарнитура «Times New Roman». Усл. печ. л. 5,93

Уч.-изд. л. 3,61. Тираж 100 экз. Заказ 355/4.

Отпечатано в типографии
Издательства Казанского университета

420008, г. Казань, ул. Профессора Нужина, 1/37
тел. (843) 233-73-59, 233-73-28

ISBN 978-5-00130-027-4



9 785001 300274 >