

УДК 577.332.23: 539.199

## **Наноалмазы в биотехнологии: применение для выделения белков и создания индикаторных тест-систем**

**Н.О. Ронжин<sup>а\*</sup>, К.А. Харин<sup>а</sup>,  
А.П. Пузырь<sup>б</sup>, В.С. Бондарь<sup>а,б</sup>**

<sup>а</sup> *Сибирский федеральный университет,  
Институт фундаментальной биологии и биотехнологии,  
Россия 660041, Красноярск, пр. Свободный, 79*

<sup>б</sup> *Институт биофизики СО РАН,  
Россия 660036, Красноярск, Академгородок, 50, стр.50<sup>1</sup>*

Received 3.12.2010, received in revised form 10.12.2010, accepted 17.12.2010

*Обсуждаются перспективы применения наноалмазов в биотехнологии. На примере очистки рекомбинантной бактериальной люциферазы из экстрактов клеток-продуцентов *E. coli* показана возможность эффективного выделения белков из сложных белковых смесей с помощью наноалмазов: процесс проводится при минимуме оборудования и затрат времени; позволяет за один технологический цикл получать целевой продукт в препаративных количествах, высокого качества (по данным SDS-электрофореза) и выходом до 40-45 %. Демонстрируется возможность использования наноалмазов в создании систем индикации на примере конструирования биoluminesцентной тест-системы на основе комплекса наноалмаз-люцифераза и инертной полимерной матрицы.*

*Ключевые слова: модифицированные детонационные наноалмазы, рекомбинантная бактериальная люцифераза, выделение белка, биотехнология, биoluminesценция, тест-система.*

### **Введение**

Стремительное развитие нанотехнологии объясняется существенным увеличением возможностей более эффективного решения широкого спектра задач, возникающих в различных сферах деятельности человека и не всегда эффективно решаемых с помощью известных методов. Внедрение наноматериалов и нанотехнологий в такие области, как биология, биотехнология, медицина, фармакология, экологи-

гия, будет способствовать их выходу на новый качественный уровень. В этом направлении в мире активно проводятся исследования с наночастицами различной физико-химической природы, а список конкретных объектов и решаемых задач чрезвычайно широк (Ascencio et al., 2005; Webster, Ahn, 2007; Marshall et al., 2007; Ai et al., 2009; Tavera-Davila et al., 2009; Nikitin et al., 2010; Purtov et al., 2010; Wang et al., 2010; Lopez-Moreno et al., 2010).

\* Corresponding author E-mail address: roniol@mail.ru

<sup>1</sup> © Siberian Federal University. All rights reserved

Для специалистов, работающих в данной области, несомненный интерес могут представлять наноалмазы (НА), получаемые методом детонационного синтеза (Ставер и др., 1984). В настоящее время производство НА взрывным синтезом осуществляется в России и ряде зарубежных стран (например, Китае, Украине, Болгарии), однако приоритет разработки этого метода принадлежит российским ученым (Даниленко, 2004). На протяжении многих лет НА применяли исключительно для решения технических задач. Между тем, физико-химические свойства НА, прежде всего выраженный химический полиморфизм поверхности наночастиц (Чиганова, 1994; Kruenger, 2008; Schrand et al., 2009), позволяют прогнозировать перспективность их применения в биотехнологии в качестве нового адсорбента для разработки эффективных методов сепарации и очистки биополимеров и конструирования систем индикации и адресной доставки веществ (Бондарь, Пузырь, 2005; Puzyg et al., 2007; Purtov et al., 2010).

Однако следует заметить, что детонационные НА, имея несомненные достоинства, обладают рядом недостатков для биотехнологического применения, обусловленных низкой коллоидной устойчивостью наночастиц в дисперсионных средах. Следствием этого являются: невозможность получения устойчивых гидрозолей наночастиц без обработки ультразвуком; трудности в получении строго определённых концентраций НА в гидрозолях. Влиять на физико-химические свойства НА посредством модификации алмазного ядра невозможно. Поэтому изменить свойства НА можно, только модифицируя поверхность наночастиц.

Авторами статьи разработаны технологии, позволяющие получать из наноалмазов, производимых в России, модифицированные наноалмазы (МНА), которые обладают повы-

шенной коллоидной устойчивостью в дисперсионных средах и не имеют мировых аналогов (Бондарь, Пузырь, 2004; Пузырь, Бондарь, 2005; Puzyg et al., 2005; Пузырь и др., 2007).

В предыдущих модельных исследованиях было показано, что МНА могут применяться как полифункциональный адсорбент для экспресс-выделения и очистки целевых белков из рекомбинантных источников и природных объектов (Бондарь, Пузырь, 2000; Бондарь и др., 2004) и дополнительной очистки белковых препаратов, поставляемых коммерческими фирмами (Бондарь, Пузырь, 2005; Puzyg et al., 2007). Не менее перспективным направлением применения МНА в биотехнологии является разработка на их основе новых средств индикации и диагностики (тест-системы, биочипы). Ранее было установлено, что ферменты, адсорбированные на наноалмазах, сохраняют свою каталитическую функцию (Пуртов и др., 2001; Пузырь и др., 2004). Это явилось предпосылкой для применения МНА в конструировании индикаторных систем (включая многокомпонентные), в которых сенсорным элементом является комплекс наночастицы – маркерный белок (белки) (Puzyg et al., 2007; Бондарь и др., 2008). В частности, такими белками-маркерами могут являться светоизлучающие белки (фотопротеины и люциферазы), способные в процессе своего функционирования генерировать кванты света в видимом диапазоне спектра.

В предлагаемой работе изучалась возможность препаративного выделения белков из сложных белковых смесей с помощью МНА на примере очистки рекомбинантной люциферазы из экстрактов клеток-продуцентов *E. coli* в объеме и конструирования светоизлучающей индикаторной системы многоцветного действия с использованием комплекса МНА-люцифераза и полимерной матрицы.

## Материалы и методы

Исследования выполнены с использованием МНА, обладающих высокой коллоидной устойчивостью в дисперсионных средах и имеющих размеры кластеров 30 – 125 нм. Методические особенности получения МНА и их физико-химические свойства изложены нами в предыдущих работах (Бондарь, Пузырь, 2004; Пузырь, Бондарь, 2005; Puzug et al., 2005; Пузырь и др., 2007). Для экспериментов использовали гидрозоль с концентрацией МНА 10,0 г/л, который готовили добавлением деионизованной воды к навеске порошка наночастиц. Деионизованную воду получали с помощью Milli-Q system (Millipore, США).

В экспериментах использовали реагенты: Трис (трис-(гидрокси)метил)-аминометан), Бис-трис-пропан, ФМН (Sigma Chemical Co., США), полимерную матрицу Sepharose 4B (Pharmacia Fine Chemicals, США); CaCl<sub>2</sub> (Serva, Германия), D-глюкозу (Реахим, Россия) квалификации «чда».

Для выделения люциферазы применяли бактериальные клетки *Escherichia coli* рекомбинантного штамма-производителя Z905 из коллекции ИБФ СО РАН, содержащие плазмиду pPHL7 с генами бактериальной люминесцентной системы *Photobacterium leiognathi* (Илларионов, Протопопова, 1987; Илларионов, Тюлькова, 1997). Исходный белковый экстракт, содержащий ферменты люминесцентной системы (включая люциферазу), получали следующим образом. Биомассу бактериальных клеток ресуспендировали в 5 мМ Трис-НСl буфере (рН 7,0) в соотношении 1:10 (масса:объем). Клетки разрушали ультразвуковой обработкой полученной суспензии на ледяной бане, используя ультразвуковой дезинтегратор UD-20 (Techpan, Швеция) (режим обработки: 22 кГц, 5 раз по 20 с с интервалами 1 мин), после чего клеточный дебрис уда-

ляли центрифугированием с помощью центрифуги Avanti® J-E (Beckman Coulter, США) (рабочая программа: ротор JA14, температура 4 °С, максимальное ускорение 31000 g, время 14 мин, ускорение и торможение медленное).

Для измерения биолюминесцентной активности люциферазы использовали люминометр (модель БЛМ 8801) производства СКТБ «Наука» (Красноярск, Россия), калиброванный по радиоактивному стандарту Гастингса-Вебера. Одна люминесцентная единица составляла 10<sup>8</sup> фотонов в 1 с. Люминесцентные сигналы регистрировали с помощью самописца (модель 2210) фирмы «LKB» (Швеция).

Активность люциферазы тестировали с помощью фотовосстановленного ФМН (Бондарь и др., 1988). Реакционная смесь включала: 450 мкл 20 мМ фосфатного буфера (рН 7,0); 50 мкл 4.7·10<sup>-6</sup> М тетрадеканалю; 1–5 мкл исследуемого препарата (белковые растворы, содержащие люциферазу; суспензии, содержащие комплексы наноалмазы-люцифераза) или люминесцентную тест-систему, полученную на основе комплекса наноалмаз-люцифераза и полимерной матрицы. Реакцию запускали впрыскиванием в кювету 500 мкл 7.8·10<sup>-5</sup> М фотовосстановленного ФМН. Для оценки влияния состава буферной системы на активность и стабильность маркерного белка (растворенный фермент и фермент, входящий в состав комплексов наночастицы-люцифераза) при измерении биолюминесценции использовали буферы с нейтральным значением рН: Трис-НСl, Бис-трис-пропановый (БТП), Na-ацетатный (NaAc), аммоний-ацетатный (АммAc).

Наличие в белковых образцах НАД(Ф)Н:ФМН-оксидоредуктазы оценивали двумя способами: по биолюминесцентной реакции биферментной системы оксидоредуктаза-люцифераза (Петушков и др., 1984), приме-

няя люминометр БЛМ 8801, и стандартным спектрофотометрическим методом измерения НАД(Ф)(Н)-зависимых ферментов (Кочетов, 1981) при  $\lambda = 340$  нм с помощью UV/VIS спектрофотометра UVIKON 943 (Kontron Instruments, Италия). В первом случае реакционная смесь включала: 450 мкл 20 мМ фосфатного буфера (рН 7.0), 10 мкл  $4.7 \cdot 10^{-6}$  М тетрадеканала, 10 мкл  $7.8 \cdot 10^{-5}$  М ФМН, 5-50 мкл исследуемого образца. Запуск реакции инициировали добавлением 5 мкл  $10^{-2}$  М НАД(Ф)Н. При спектрофотометрическом измерении активности оксидоредуктазы реакционная смесь (общий объем 1 мл) содержала: 20 мМ фосфатный буфер (рН 7.0), 10 мкл  $10^{-2}$  М НАДН (или НАДФН), 10–100 мкл исследуемого образца. Реакцию инициировали добавлением 10 мкл  $10^{-2}$  М ФМН.

Термостабильность маркерного белка в растворе и в составе индикаторных комплексов оценивали при инкубации образцов в термостате (ТВ-85 Thermo Batch, Shimadzu, Япония) при температуре 36 °С.

Комплекс МНА-люцифераза получали при выделении фермента из экстрактов бактериальных клеток *E. coli* с помощью наноалмазов в объеме в присутствии 5 %-й D-глюкозы. При этом в процессе выделения осадок, содержащий комплекс МНА-люцифераза, после каждого этапа промывки и элюции ресуспендировали в 5 %-м растворе D-глюкозы.

Комплекс МНА-брушит(Са-фосфат)-люцифераза получали следующим способом. К гидрозоль МНА при постоянном перемешивании одновременно добавляли равные объемы растворов хлористого кальция и фосфатного буфера в эквимольных соотношениях для образования комплекса МНА-брушит, в котором частицы наноалмаза использовали в качестве зародышевых центров. После этого частицы полученного комплекса МНА-брушит собирали центрифугировани-

ем и дважды отмывали водой, каждый раз ресуспендируя их и собирая центрифугированием. К отмытому ресуспендированному комплексу МНА-брушит добавляли раствор белкового экстракта. Частицы с адсорбированным белком собирали центрифугированием, полученный осадок промывали для удаления примесей неадсорбированного белка и переводили комплекс в состояние гидрозоль, ресуспендируя частицы в растворе 5 %-й D-глюкозы.

Конструирование индикаторной тест-системы проводили по следующей схеме. На стеклянную подложку (запаянный капилляр с наружным диаметром 1,5 мм) наносили расплавленный жидкий гель полимерной матрицы, предварительно промытый в 5 %-м растворе D-глюкозы. Для более быстрого и качественного высушивания геля на подложке ее помещали в ацетон, который «экстрагировал» часть воды из геля. Для последующего полного высушивания геля подложку оставляли на воздухе при комнатной температуре в течение 2-3 сут. На завершающей стадии подложку, содержащую фиксированную матрицу, помещали на 15 мин в 5 %-й раствор D-глюкозы с ресуспендированным индикаторным комплексом (МНА-люцифераза, МНА-брушит-люцифераза).

## Результаты и обсуждение

### *1. Препаративное выделение люциферазы в объеме с помощью МНА*

Схема очистки целевого фермента, разработанная и оптимизированная в ходе исследований, включала следующие стадии. К исходному белковому экстракту из биомассы бактериальных клеток добавляли гидрозоль МНА в соотношении 1:1 (объем:объем) и после перемешивания суспензии в течение 5 мин наночастицы с адсорбированным белком

Таблица 1. Распределение активности люциферазы на стадиях выделения фермента в объеме с помощью МНА

Стадия	Объем образца (мл)	Удельная активность фермента (отн.ед./мл)	Общая активность фермента (отн.ед.)	Выход целевого продукта (%)
Исходный экстракт	100	$66,0 \times 10^5$	$66,0 \times 10^7$	100
Супернатант после обработки экстракта частицами МНА	200	$2,0 \times 10^3$	$4,0 \times 10^5$	0,06
Суммарная промывка осадка МНА с адсорбированным белком	400	$8,0 \times 10^3$	$32,0 \times 10^5$	0,48
Суммарный элюат фермента	1100	$25,3 \times 10^4$	$27,8 \times 10^7$	42,06
Суспензия МНА с прочно связанным ферментом	200	$51,0 \times 10^4$	$10,2 \times 10^7$	15,45

собирали центрифугированием. Для более полного осаждения МНА в суспензию перед центрифугированием добавляли хлорид натрия до концентрации 100–120 мМ. Полученный осадок дважды отмывали раствором 5 мМ ЭДТА – наночастицы каждый раз ресуспендировали в свежей порции промывочного раствора и, после добавления NaCl в указанной выше концентрации, собирали центрифугированием. Завершающим этапом выделения искомого белка являлась последовательная элюция (десорбция) люциферазы с поверхности наночастиц 50 мМ фосфатным буфером (рН 7,0), содержащим 5 мМ ЭДТА.

Для препаративного выделения целевого фермента было использовано 100 мл исходного экстракта, содержащего 530 мг люциферазы (оценка содержания люциферазы проведена из калибровочной зависимости интенсивности люминесценции от количества чистого фермента). Как показали исследования (табл. 1), при оптимизированных условиях (соотношение объемов экстракта и гидрозоля, используемая буферная система) обработка экстракта частицами МНА сопровождается практически полной адсорбцией люциферазы – остаточная активность фермента в супернатанте составляет не более 0,06 %

исходной. Последующая двукратная отмывка осадка раствором 5 мМ ЭДТА с добавлением 100–120 мМ NaCl (по 200 мл каждый раз) не приводит к десорбции фермента – активность в суммарном объеме отмывки составляет не более 0,5 % исходной. Применение на завершающей стадии очистки многократной обработки осадка 50 мМ фосфатным буфером (по 100–200 мл) позволяет элюировать с поверхности наночастиц более 40 % искомого фермента (табл. 1). Расчеты, произведенные из данных табл. 1, показывают, что количество люциферазы, полученной при ее выделении с помощью МНА, составляет 223 мг. По данным SDS-электрофореза (рис. 1), выделенный целевой белок имеет высокую степень чистоты.

Полученные данные (табл. 1) позволили высказать предположение о наличии трех возможных механизмов взаимодействия молекул люциферазы с поверхностью МНА: а) лабильное связывание фермента с сохранением его активности и возможностью последующей десорбции (около 40 % молекул); б) прочное, вероятно многоточечное, связывание с утратой активности (около 40–45 % молекул); в) прочное связывание фермента с сохранением его каталитической функции (около 15 % мо-

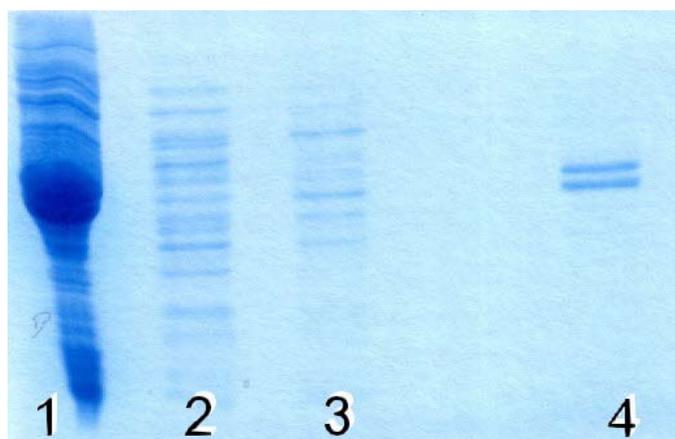


Рис. 1. Электрофореграмма образцов люциферазы при препаративном ее выделении в объеме с помощью МНА. На треках: 1 – исходный экстракт; 2 – супернатант после обработки экстракта наноалмазами; 3 – промывка осадка наночастиц с адсорбированными белками; 4 – конечный препарат фермента (элюат)

лекул). В пользу последнего варианта взаимодействия свидетельствует тот факт, что даже после многократной элюции часть люциферазы остается прочно связанной с поверхностью МНА и при этом фермент сохраняет свою активность – при добавлении образца суспензии наночастиц в фосфатный буфер, находящийся в измерительной кювете, и запуске реакции наблюдается развитие биолюминесцентного сигнала. Из этого следует, что параллельно с выделением целевого продукта возможно получение устойчивого комплекса наноалмаз-люцифераза, который может использоваться для создания индикаторных тест-систем.

Необходимо отметить, что в полученном конечном препарате люциферазы не зарегистрировано активности НАД(Ф)Н:ФМН-оксидоредуктазы при тестировании биферментной биолюминесцентной реакцией и спектрофотометрическим методом, что свидетельствует об отсутствии примесей данного фермента в целевом продукте. Дополнительными исследованиями было установлено, что в условиях оптимального регламента, используемого при выделении люциферазы (состав, молярность и рН буферной системы), оксидоредуктаза не адсорбиру-

ется на поверхности МНА и удаляется вместе с балластными белковыми примесями на стадиях обработки наночастицами исходного экстракта и последующей промывки осадка МНА с адсорбированными белками. Как видно из представленных данных (рис. 2), после осаждения наночастиц центрифугированием практически вся активность фермента регистрируется в супернатанте. Незначительное количество оксидоредуктазы выявляется в растворе 5 мМ ЭДТА, применяемом для промывки осадка наночастиц (рис. 2). Было показано также, что увеличение на треть количества наноматериала, добавляемого к грубому белковому экстракту (соотношение объемов экстракта и гидрозоля МНА – 1:1.5), и повторная добавка МНА в экстракт, уже обработанный наночастицами, не приводит к адсорбции оксидоредуктазы. Исходя из этого можно сделать вывод о том, что схема очистки, основанная на применении МНА, позволяет полностью разделить два фермента (люциферазу и НАД(Ф)Н:ФМН-оксидоредуктазу), входящих в состав биферментной люминесцентной системы (Гительзон и др., 1984; Петушков и др., 1984). В свою очередь, это имеет важное практическое значение, поскольку наличие в

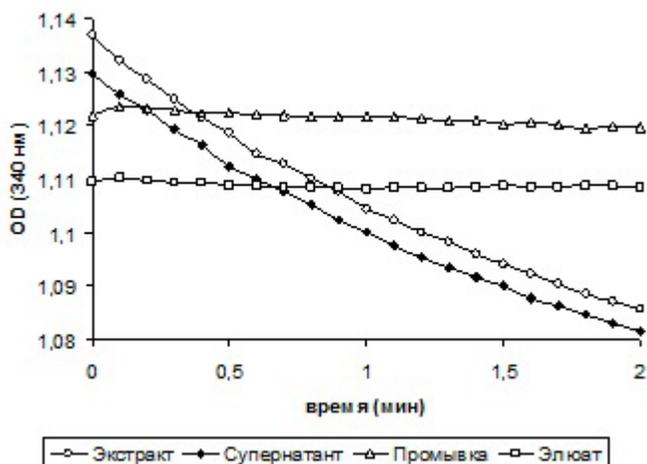


Рис. 2. Динамика оптической плотности ( $\lambda = 340$ ), регистрируемая при измерении активности НАД(Ф) Н:ФМН-оксидоредуктазы в образцах на этапах выделения люциферазы с помощью МНА

препаратах люциферазы примесей НАД(Ф) Н:ФМН-оксидоредуктазы будет снижать их качество для аналитических применений и вносить сложности при биолюминесцентном тестировании ферментов класса оксидоредуктаз.

Таким образом, в этом разделе исследований на примере очистки люциферазы продемонстрирована возможность практического применения МНА в качестве адсорбента для эффективного выделения искомым белков методом в объеме из грубых белковых смесей и получения целевых продуктов высокой степени чистоты в препаративных количествах. Показано, что процесс очистки фермента с помощью МНА достаточно прост, включает несложные однотипные операции и осуществляется с использованием минимума оборудования.

## 2. Использование МНА в создании биолюминесцентной индикаторной тест-системы

Методология создания сенсорного элемента (комплекс МНА-люцифераза) для его последующего использования при конструировании индикаторной тест-системы осно-

вывалась на известных фактах сохранения каталитической функции ферментов, адсорбированных на поверхности МНА (Пуртов и др., 2001; Пузырь и др., 2004; Puzug et al., 2007), и результатах, полученных в данной работе. При этом совершенно очевидно, что оценка потенциальной возможности использования любого маркерного белка (например, фермента) в конструировании и создании систем индикации сопряжена с необходимостью исследования свойств маркера до и после его связывания с носителем (например, наночастицей). Исходя из этого предварительно был проведен сравнительный анализ активности люциферазы в растворе (экстракт) и после ее адсорбции на поверхности наноалмазов (комплекс МНА-люцифераза).

Поскольку выше было показано, что в процессе выделения люциферазы из экстрактов клеток *E. coli* с помощью МНА часть фермента может прочно связываться с наночастицами и сохранять при этом свою каталитическую функцию, комплекс МНА-люцифераза для его применения в конструировании люминесцентной тест-системы получали по оптимизированной вышеизложенной схеме очистки фермента. Однако в этом случае все стадии

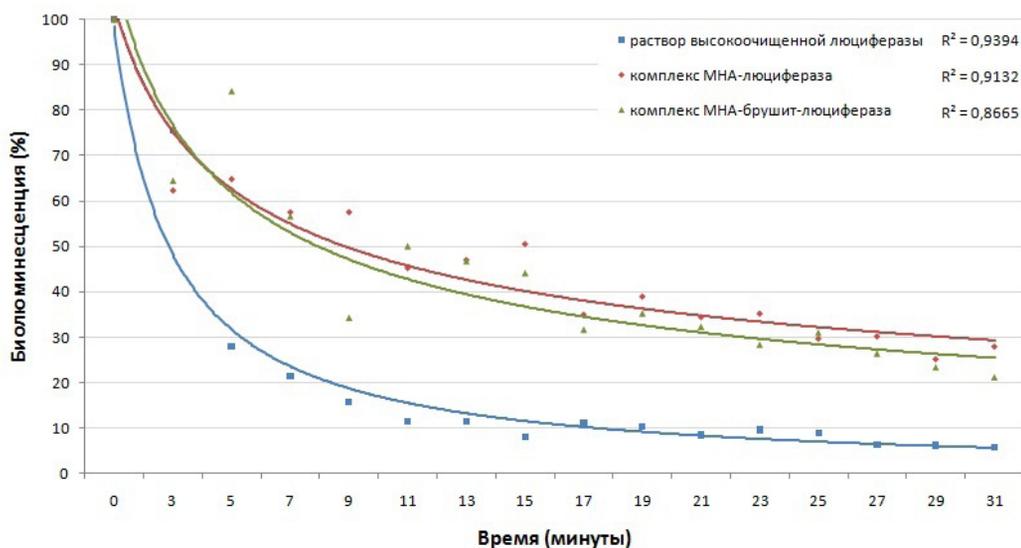


Рис. 3. Активность люциферазы в растворе и в составе индикаторных комплексов в зависимости от времени инкубации при температуре 36 °C

выделения белка осуществляли в 5 %-м растворе D-глюкозы. Применение D-глюкозы представлялось целесообразным, поскольку известно, что углеводы могут оказывать защитное действие на белки, например, при их хранении, замораживании и лиофильном высушивании (Клилэнд, Джоунс, 2000; Франк, 2009). Осадок МНА, полученный на завершающей стадии очистки люциферазы (после многократной элюции белка) и содержащий наночастицы с прочно связанным ферментом (устойчивый комплекс МНА-люцифераза), ресуспендировали в 5 %-м растворе D-глюкозы и использовали в работе. Дополнительно изучали возможность получения сенсорного элемента на основе комбинированных наночастиц (МНА-брушит) и люциферазы. Проверка такого варианта представлялась вполне оправданной, поскольку известно, что частицы фосфата кальция (брушит) применяли в качестве адсорбента для выделения бактериальной люциферазы (Бондарь и др., 1988).

Очевидно, что при многократном использовании тест-системы белок, входящий в ее состав, может длительное время нахо-

диться в условиях комнатной температуры и дополнительно многократно подвергаться воздействию повышенной температуры реакционной среды. В нашем случае это может происходить при инициации люминесцентной реакции впрыскиванием в реакционную смесь фотовосстановленного ФМН, восстановление которого осуществляется при облучении раствора лампой накаливания. Поэтому важно знать, каким образом температурный фактор влияет на активность люциферазы. Для выяснения этого вопроса были проведены сравнительные исследования термостабильности фермента, находящегося в растворе и в составе индикаторных комплексов (МНА-люцифераза и МНА-брушит-люцифераза). С этой целью образцы растворенной люциферазы (или индикаторных комплексов) инкубировали в термостате при температуре 36 °C, через равные интервалы времени из них отбирали равные по объему аликвоты и проводили измерение активности фермента.

Из полученных данных следует (рис. 3), что люцифераза, адсорбированная на поверхности наночастиц, обладает существенно

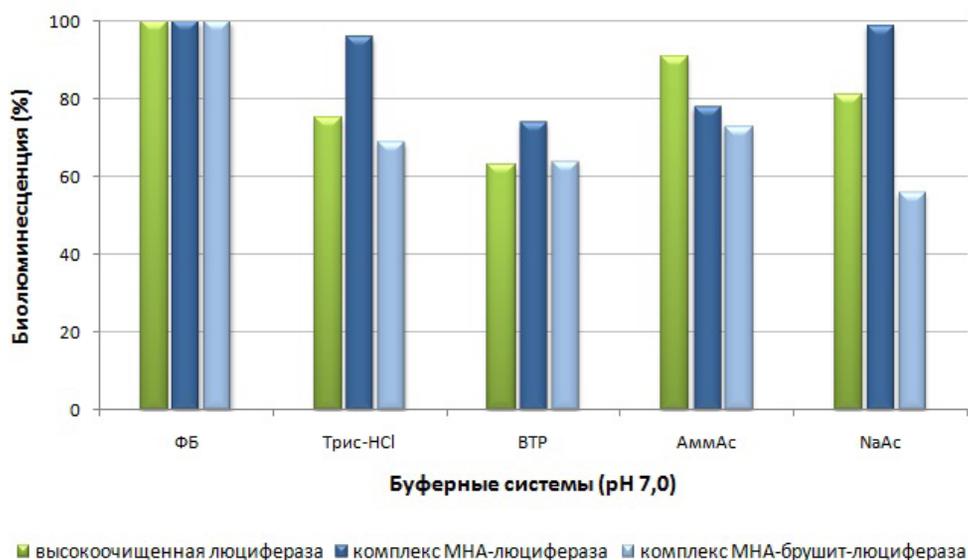


Рис. 4. Активность люциферазы в растворе и в составе индикаторных комплексов при использовании для измерения различных буферных систем с нейтральным значением рН

большей термоустойчивостью, по сравнению с ферментом, находящимся в растворе. С одной стороны, эти результаты хорошо согласуются с общеизвестными представлениями о том, что белки, адсорбированные на поверхности носителя, более резистентны к воздействию различных повреждающих факторов (протеолитические ферменты, температура, состав и рН среды, и т.д.). С другой – позволяют сделать вывод о том, что для создания люминесцентной тест-системы многократного действия с использованием люциферазы целесообразна предварительная адсорбция фермента на частицы МНА.

Поскольку состав буферной системы может оказывать влияние на активность фермента, представлялась целесообразной сравнительная оценка активности люциферазы в растворе и после ее адсорбции на поверхности наночастиц (комплексы МНА-люцифераза и МНА-брушит-люцифераза) при использовании разных буферных систем. Для этого эксперимента применяли буферные системы с нейтральным значением рН: Трис-HCl, ВТФ,

АмМас и NaAc, а также фосфатный буфер, который являлся контрольным.

Как видно из представленных данных (рис. 4), во всех случаях замена фосфатного буфера на другие буферные системы приводит к снижению активности люциферазы. Однако фермент, адсорбированный на частицах МНА, практически во всех случаях обладает большей активностью в использованных буферных системах, по сравнению с ферментом в растворе. В то же время фермент, адсорбированный на частицы комбинированного наноматериала (МНА-брушит), оказался менее стабилен по сравнению как с растворенным ферментом, так и входящим в состав комплекса МНА-люцифераза (рис. 4).

Для конструирования индикаторной тест-системы в качестве полимерной матрицы была использована Sepharose 4В. Полимерные гранулы этого сорбента легко плавятся, образуя равномерный по консистенции жидкий гель, который при застывании обладает хорошей адгезией к стеклянной подложке и после высушивания прочно удерживается на ее по-

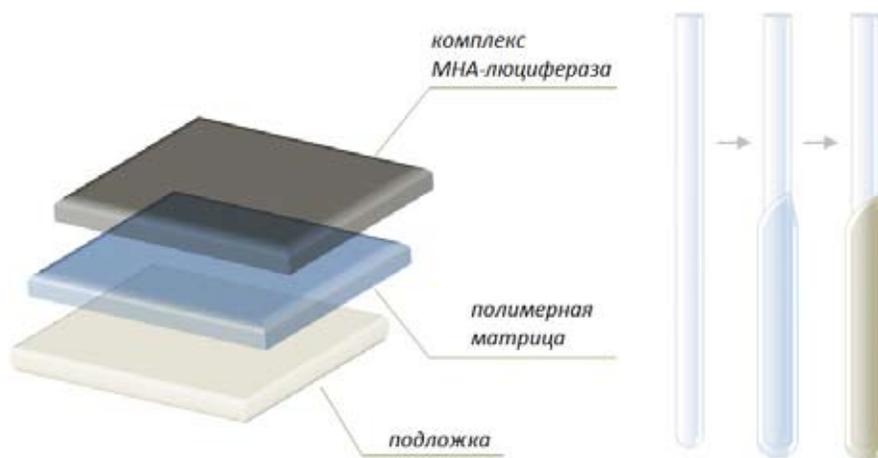


Рис. 5. Общая схема конструирования индикаторной тест-системы на основе комплекса МНА-люцифераза и полимерной матрицы

верхности. Основное внимание в экспериментах фокусировалось на оптимизации условий иммобилизации индикаторного комплекса в полимерной матрице, изучении активности и стабильности фермента в полученных тест-системах.

В экспериментах было установлено, что конструкция тест-системы в виде стеклянного стержня (диаметр 1,5 мм) является наиболее удачной для последующего тестирования, учитывая технические особенности кюветного люминометра БЛМ 8801. Последовательность стадий конструирования такой тест-системы и ее вид представлены на схеме (рис. 5). Для тестирования интенсивности люминесцентных сигналов тест-систему помещают в кювету люминометра, содержащую измерительный буфер, и добавкой необходимых ингредиентов запускают реакцию светоизлучения. После регистрации светового сигнала тест-систему извлекают из кюветы, промывают струей воды для удаления продуктов реакции и снова используют для измерения.

Оптимизация условий адсорбции маркерного белка на наночастицы и введение полученного комплекса МНА-люцифераза в полимерную матрицу позволили создать

биолюминесцентную индикаторную тест-систему, дающую возможность многократно (до 40 и более раз) использовать ее в люминесцентном микроанализе (рис. 6). Как следует из величины люминесцентных сигналов, регистрируемых при многократном использовании сконструированной тест-системы, люцифераза вполне удовлетворительно сохраняет в ней свою ферментативную активность. Из приведенных данных видно, что при первых шести измерениях интенсивность люминесценции в среднем составляет величину около 9 отн. ед., после чего она снижается и выходит на стабильный постоянный уровень (в среднем около 4 отн. ед.) при последующих 30 измерениях.

Тот факт, что интенсивность сигналов не сразу приобретает постоянный уровень, а выходит на плато с понижением их интенсивности, может свидетельствовать как о десорбции части белка из тест-системы, так и его частичной инактивации под действием повышения температуры реакционной среды после многократного впрыскивания фотовосстановленного ФМН. Полученные результаты (рис. 6) позволили сделать два предположения, объясняющих наблюдаемый эффект.

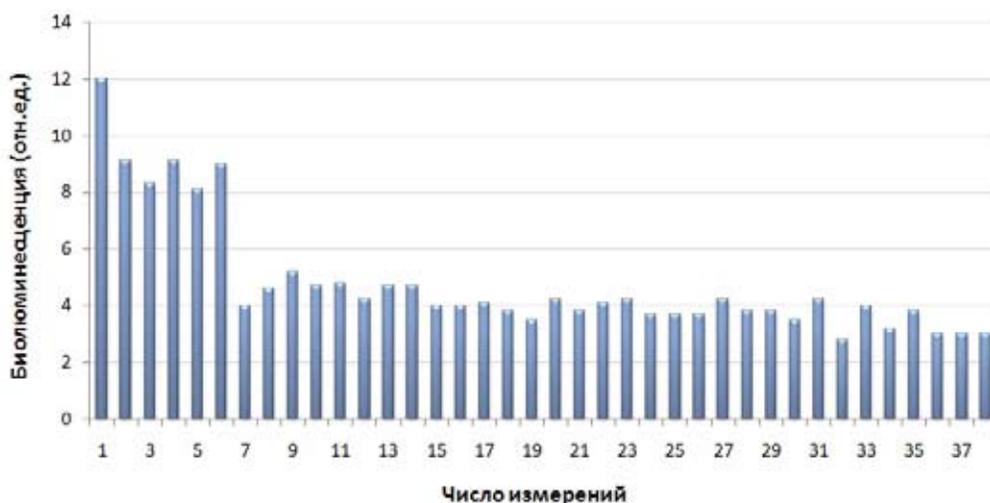


Рис. 6. Динамика интенсивности люминесцентных сигналов при многократном использовании тест-системы, созданной с применением комплекса МНА-люцифераза и полимерной матрицы

Во-первых, можно допустить возможность существования двух типов молекул рекомбинантной люциферазы: термолабильные, быстро утрачивающие ферментативную активность под действием высокой температуры; термостабильные – более устойчивые к высоким температурам и длительное время сохраняющие свою каталитическую функцию. Во-вторых, нельзя исключить, что под действием температурного фактора могут происходить конформационные изменения молекул люциферазы, например переход из менее устойчивого (термолабильного) состояния в более устойчивое – термостабильное.

Проверку высказанной версии проводили с помощью предварительной термообработки полученной тест-системы с целью инактивации термолабильных молекул фермента. Последовательность процедур была такой. Тест-систему сначала помещали в кювету люминометра и проводили однократное измерение интенсивности люминесценции для определения начальной активности маркерного белка. Затем тест-систему извлекали из кюветы и после отмывки водой от продуктов реакции помещали на 15 с в кювету с водой,

нагретой до 45 °С, после чего ее охлаждали струей холодной воды и вновь использовали для измерений активности. В результате проведенных исследований было показано, что после предварительной термообработки тест-системы (рис. 7) интенсивность ее люминесцентных сигналов приобретает стабильный постоянный уровень (в среднем около 4 отн. ед.), что может свидетельствовать в пользу предположения о наличии двух типов молекул (или двух конформационных состояний) рекомбинантной люциферазы.

Следует заметить, что аналогичные результаты были получены и при работе с тест-системой, которая была сконструирована с использованием комбинированных наночастиц МНА-брушит. Как видно из полученных данных (рис. 8), величина люминесцентных сигналов, регистрируемых после предварительной термообработки тест-системы с сенсорным элементом МНА-брушит-люцифераза, как и в случае использования предыдущей тест-системы (см. выше), имеет относительно постоянный уровень с некоторой тенденцией к их снижению. При этом видно, что при использовании данной тест-системы величина

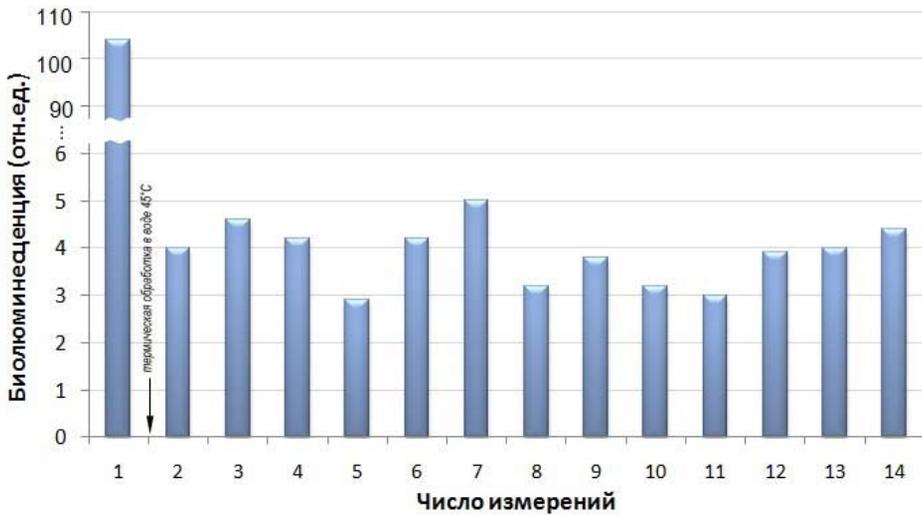


Рис. 7. Интенсивность сигналов тест-системы до (первое измерение) и после термообработки при 45 °С (измерения 2 – 14)

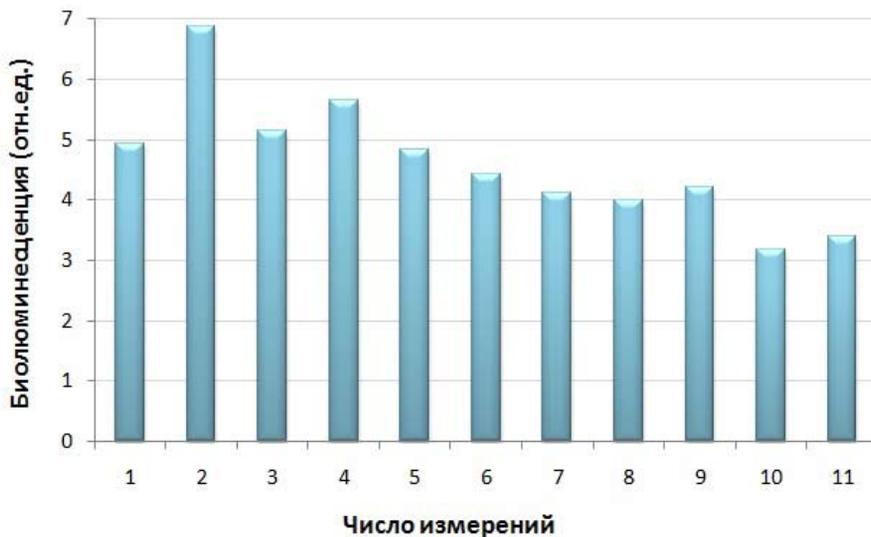


Рис. 8. Динамика интенсивности люминесцентных сигналов, регистрируемых при многократном использовании тест-системы с индикаторным элементом МНА-брушит-люцифераза после ее термообработки при 45 °С

регистрируемых люминесцентных сигналов составляет в среднем около 4.5 отн. ед. и имеет такой же порядок, как и при использовании тест-системы с индикаторным элементом МНА-люцифераза (рис. 7).

Очевидно, что выяснение вопроса о существовании двух типов молекул реком-

бинантной люциферазы (или возможных конформационных изменениях молекул фермента под действием температуры) требует дополнительного исследования.

В целом, результаты экспериментов, изложенные выше, не только расширяют представления о свойствах ферментов класса

бактериальных люцифераз, но и могут учитываться при создании индикаторных тест-систем на основе этих ферментов.

Заключительный этап работы включал дополнительные исследования возможности получения тест-системы на основе комплекса МНА-люцифераза и полимерной матрицы в сухом виде. С этой целью проверялся вариант получения сухой индикаторной системы путем удаления из нее воды проводкой через ацетон с последующим испарением остатков ацетона высушиванием на воздухе. Из данных предварительных экспериментов следует, что такая обработка не вызывает полной и необратимой инактивации маркерного белка, входящего в состав системы. Получены предварительные результаты, свидетельствующие в пользу того, что высушенная индикаторная система может храниться при 4 °С и позволяет регистрировать люминесцентные сигналы при многократной инициации реакции фотовосстановленным ФМН.

### Заключение

Таким образом, на примере очистки рекомбинантной бактериальной люциферазы продемонстрирована возможность применения частиц МНА в качестве адсорбента для

эффективного выделения искомым белков методом в объеме из грубых белковых смесей и получения целевых продуктов высокой степени чистоты в препаративных количествах. Показано, что процесс очистки фермента с помощью МНА достаточно прост, проводится с использованием минимума оборудования и позволяет за один технологический цикл осуществить полное разделение ферментов, входящих в состав светоизлучающего биферментного комплекса люцифераза – НАД(Ф)Н:ФМН-оксидоредуктаза. Установление факта прочного связывания люциферазы с поверхностью МНА при сохранении активности фермента открыло возможность дальнейшего исследования комплекса наноалмаз-маркерный белок и его применения в конструировании индикаторных тест-систем. Оптимизация условий адсорбции фермента на частицы МНА и введение полученного комплекса в полимерную матрицу позволили создать стабильную светоизлучающую систему, которую можно многократно (до 40 и более раз) использовать в биолюминесцентном микроанализе. В целом результаты проведенных исследований показывают перспективы возможного применения МНА как наноматериала биотехнологического назначения.

### Список литературы

Бондарь В.С., Высоцкий Е.С., Заворуев В.В., Межевикин В.В., Райбекас А.А. (1988) Получение препарата бактериальной люциферазы для биолюминесцентного анализа. Прикладная биохимия и микробиология. 24: 745-753.

Бондарь В.С., Позднякова И.О., Пузырь А.П. (2004) Применение наноалмазов для разделения и очистки белков. Физика твердого тела. 46 (4): 737-739.

Бондарь В.С., Пузырь А.П. (2004) Наноалмазы для биологических исследований. Физика твердого тела. 46 (4): 698-701.

Бондарь В.С., Пузырь А.П. (2005) Возможность и перспективы создания новых нанотехнологий на основе частиц детонационных наноалмазов: медико-биологический и технический аспекты. Конструкции из композиционных материалов. 4: 80-94.

Бондарь В.С., Пуртов К.В., Пузырь А.П., Могильная О.А., Дегерменджи А.Г., Гительзон И.И. (2008) Наноалмазы с оригинальными свойствами: применение в биологии и медици-

не. В: Сборник тезисов докладов научно-технологических секций Международного форума по нанотехнологиям. 2. М., с.90-92.

Гительзон И.И., Родичева Э.К., Медведева С.Е. и др. (1984) Светящиеся бактерии (Кондратьева Е.Н., ред.). Новосибирск: Наука, 277 с..

Даниленко В.В. (2004) Из истории открытия синтеза наноалмазов. Физика твердого тела. 46 (4): 581-584.

Илларионов Б.А., Протопопова М.В. (1987) Клонирование и экспрессия генов люминесцентной системы *Photobacterium leiognathi*. Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. 8: 41-46.

Илларионов Б.А., Тюлькова Н.А. (1997) Штамм бактерий *Escherichia coli* – продуцент бактериальной люциферазы. Патент РФ №2073714, Оpubл. 02.20.1997..

Клилэнд Д.Л., Джоунс Э.Д.С. (2000) Способ стабилизации полипептида, способы получения композиций полипептида и композиции. Патент РФ №2143889, Оpubл. 10.01.2000..

Кочетов Г.А. (1981) Практическое руководство по энзимологии. М.: Высшая школа, 272 с..

Петушков В.Н., Кратасюк Г.А., Родионова Н.С., Фиш А.М., Белобров П.И. (1984) Биферментная система NADH:FMN-оксидоредуктаза – люцифераза из светящихся бактерий. Биохимия. 49 (4): 699-709.

Пузырь А.П., Позднякова И.О., Бондарь В.С. (2004) Создание люминесцентного биочипа с использованием наноалмазов и бактериальной люциферазы. Физика твердого тела. 46 (4): 740-742.

Пузырь А.П., Бондарь В.С. (2005) Способ получения наноалмазов взрывного синтеза с повышенной коллоидной устойчивостью. Патент РФ №2252192, Оpubл. 20.05.2005 Бюл. № 14..

Пузырь А.П., Воробьев В.Б., Бондарь В.С., Попитченко Л.К. (2007) Синтетические алмазосодержащие вещества и способ их выделения. Патент РФ №2306258, Оpubл. 20.09.2007 Бюл. №26.

Пуртов К.В., Бондарь В.С., Пузырь А.П. (2001) Создание надмолекулярной структуры из частиц наноалмаза и обелина на двумерной подложке. Доклады РАН. 380 (3): 411-414.

Ставер А.М., Губарева Н.В., Лямкин А.И., Петров Е.А. (1984) Ультрадисперсные алмазные порошки, полученные с использованием энергии взрыва. Физика горения и взрыва. 20: 100-104.

Франк Л.А. (2009) Биолюминесцентный молекулярный микроанализ на основе  $\text{Ca}^{2+}$ -регулируемого фотопротейна обелина. Автореф. дисс. докт. биол. наук, РАН, Сиб. отд-е, Ин-т биофизики. Красноярск: Ин-т физики СО РАН, 41с..

Чиганова Г.А. (1994) Исследование поверхностных свойств ультрадисперсных алмазов. Коллоидный журнал. 56: 266-268.

Ai K., Liu Y., Lu L. (2009) Hydrogen-bonding recognition-induced color change of gold nanoparticles for visual detection of melamine in raw milk and infant formula. J. Am. Chem. Soc. 131: 9496-9497.

Ascencio J.A., Rincon A.C., Canizal G. (2005) Synthesis and theoretical analysis of samarium nanoparticles: perspectives in nuclear medicine. J. Phys. Chem. B. 109: 8806-8812.

Krueger A. (2008) The structure and reactivity of nanoscale diamond. J. Mater. Chem. 18: 1485-1492.

Lopez-Moreno M.L., de la Rosa G., Hernandez-Viezcas J.A., Peralta-Videa J.R., Gardea-Torresdey J.L. (2010) X-ray absorption spectroscopy (XAS) corroboration of the uptake and storage of CeO(2) nanoparticles and assessment of their differential toxicity in four edible plant species. *J. Agr. Food Chem.* 58: 3689-3693.

Marshall A.T., Haverkamp R.G., Davies C.E., Parsons J.G., Gardea-Torresdey J.L., van Agterveld D. (2007) Accumulation of gold nanoparticles in *Brassic juncea*. *Int. J. Phytoremediation.* 9: 197-206.

Nikitin M.P., Zdobnova T.A., Lukash S.V., Stremovskiy O.A., Deyev S.M. (2010) Protein-assisted self-assembly of multifunctional nanoparticles. *PNAS.* 107: 5827–5832.

Purtov K.V., Petunin A.I., Burov A.E., Puzyr A.P., Bondar V.S. (2010) Nanodiamonds as carriers for address delivery of biologically active substances. *Nanoscale Res. Lett.* 5: 631-636.

Puzyr A.P., Bondar V.S., Bukayemsky A.A., Selyutin G.E., Kargin V.F. (2005) Physical and chemical properties of modified nanodiamonds. *NATO Science Series. II. Mathematics, Physics and Chemistry.* 192: 261-270.

Puzyr A.P., Baron A.V., Purtov K.V., Bortnikov E.V., Skobelev N.N., Mogilnaya O.A., Bondar V.S. (2007) Nanodiamonds with novel properties: a biological study. *Diamond and Related Materials.* 16: 2124-2128.

Schrand A., Hens S. A. C., Shenderova O. A. (2009) Nanodiamond Particles: Properties and Perspectives for Bioapplications. *Solid State Mater.* 34: 18-74.

Tavera-Davila L., Liu H.B., Herrera-Becerra R., Canizal G., Balcazar M., Ascencio J.A. (2009) Analysis of Ag nanoparticles synthesized by bioreduction. *J. Nanosci. Nanotechnol.* 9: 1785-1791.

Wang Z., Lee Y.H., Wu B., Horst A., Kang Y., Tang Y.J., Chen D.R. (2010) Anti-microbial activities of aerosolized transition metal oxide nanoparticles. *Chemosphere.* 80: 525-529.

Webster T.J., Ahn E.S. (2007) Nanostructured biomaterials for tissue engineering bone. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 103: 275-308.

## **Nanodiamonds in Biotechnology: Application for Purification of Proteins and Test-Systems of Indication**

**Nikita O. Ronzhin<sup>a\*</sup>, Konstantin A. Kharin<sup>a</sup>,  
Alexey P. Puzyr<sup>b</sup>, Vladimir S. Bondar<sup>a,b</sup>**

<sup>a</sup> *Siberian Federal University,*

*79 Svobodny, Krasnoyarsk, 660041 Russia*

<sup>b</sup> *Institute of Biophysics SB RAS,*

*50/50 Akademgorodok, Krasnoyarsk, 660036 Russia*

---

*This paper discusses the perspectives of applications of the detonation nanodiamonds in biotechnology. An effective separation of proteins from complex protein mixtures by using of nanodiamonds is shown on the example of purification of recombinant luciferase from the extracts of E. coli bacterial cells: the process requires minimum equipment and time; one technological cycle yields 40-45 % of desired*

*product with high-quality (according to the SDS-PAGE). The application of nanodiamonds for design of indicating systems is demonstrated on the example of a biosensor system based on the nanodiamond-luciferase complex and inert polymeric matrix.*

*Keywords: modified detonation nanodiamonds, recombinant luciferase, protein purification, biotechnology, bioluminescence, test-system.*

---