

СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЙ АНАЛИЗ БИОПОЛИМЕРОВ И ИХ КОМПЛЕКСОВ

УДК 577.2.08

СИКВЕНС-СПЕЦИФИЧНОСТЬ БЕЛОК-ОЛИГОНУКЛЕОТИДНЫХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ И ВЫДЕЛЕНИЕ БЕЛКОВ НА СОРБЕНТАХ, СОДЕРЖАЩИХ ИММОБИЛИЗОВАННЫЕ БЕЛОК-СПЕЦИФИЧНЫЕ ОЛИГОНУКЛЕОТИДЫ

© 2012 г. А. Ю. Рубина, М. В. Цыбульская, О. А. Заседателева, С. Б. Поплетаева,
М. А. Филиппова, В. И. Бутвиловская, С. А. Суржигов, А. А. Стомахин, А. С. Заседателев

Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук, Москва, 119991

Поступила в редакцию 02.11.2011 г.

Принята к печати 22.12.2011 г.

На примере взаимодействия фермента биназы с олигодезоксирибонуклеотидами, иммобилизованными в гелевых ячейках биочипа, изучена сиквенс-специфичность белок-олигонуклеотидных взаимодействий. Определены константы преимущественного связывания с выбранными нуклеотидными последовательностями. Олигодезоксирибонуклеотиды GAGAGAG и GAGAGAGAG, специфически связывающиеся с биназой, использовали в качестве молекулярных зондов для создания аффинных сорбентов, предназначенных для выделения и концентрирования биназы из разбавленных водных растворов. Измерена рабочая емкость аффинных сорбентов с иммобилизованными олигодезоксирибонуклеотидами, составившая 2.6 и 2.3 мг биназы на 1 мл сорбента для GAGAGAG и GAGAGAGAG, соответственно. Показано, что олигонуклеотид-специфичность биназы после проведения аффинной хроматографии и элюирования с сорбента совпадает со специфичностью исходного препарата.

Ключевые слова: биочип, гидрогелевый микрочип, белок-олигодезоксирибонуклеотидные комплексы, константы связывания, биназа, олигодезоксирибонуклеотиды, аффинная хроматография, концентрирование белков, ДНК-белковые взаимодействия.

SEQUENCE-SPECIFICITY OF PROTEIN-OLIGONUCLEOTIDE INTERACTIONS AND DEVELOPMENT FOR PROTEIN ISOLATION USING SORPTIVE MEDIUM WITH IMMOBILIZED PROTEIN-SPECIFIC OLIGONUCLEOTIDES, by A. Yu. Rubina*, M. V. Tsybul'skaya, O. A. Zasedateleva, S. B. Popletaeva, M. A. Filippova, V. I. Butvilovskaya, S. A. Surzhikov, A. S. Zasedatelev (Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119991 Russia; *e-mail: arubina@biochip.ru). Sequence-specificity of binding of ribonuclease binase to oligodeoxyribonucleotides immobilized in biochip gel pads was studied. Binding constants for the complexes between binase and selected oligonucleotides were measured. Oligodeoxyribonucleotides GAGAGAG and GAGAGAGAG were found to be high-specific in interaction with binase. These oligonucleotides were used as molecular probes for immobilization in a sorptive medium for subsequent isolation and concentrating of binase from diluted water solutions. Volume capacity of the developed sorptive mediums containing immobilized oligodeoxyribonucleotides GAGAGAG and GAGAGAGAG was found to be 2.6 and 2.3 mg of binase per 1 mL of sorbate correspondingly. After the procedure of affinity chromatography and elution of binase from sorptive medium the protein showed the same affinity of binding to oligonucleotides as the initial sample.

Keywords: biochip, hydrogel microarray, protein-oligodeoxyribonucleotide complexes, binding constants, binase, oligodeoxyribonucleotides, affinity chromatography, protein concentrating, DNA-protein interactions.

ВВЕДЕНИЕ

В представленной работе изучена сиквенс-специфичность взаимодействия рибонуклеазы биназы с определенным набором олигодезокси-

рибонуклеотидов, иммобилизованных в гелевых ячейках биочипа, и разработан метод выделения и концентрирования белка из разбавленных водных растворов. Для выделения и очистки белков часто используется аффинная хроматография с ковалентно иммобилизованными лигандами, как правило, антителами, специфично узнающими

* Эл. почта: arubina@biochip.ru

нужный белок, в качестве аффинных реагентов. Антитела давно применяют в аффинной хроматографии белков. Особенно хорошо зарекомендовали себя моноклональные антитела, получаемые с помощью гибридомной технологии. Однако применение антител для изготовления аффинных сорбентов имеет ряд ограничений. Антитела подвержены необратимой денатурации при нагревании, что существенно затрудняет их транспортировку и хранение. Процесс получения антител достаточно сложный и дорогой, поскольку включает иммунизацию животных, использование конъюгатов низкомолекулярных мишеней с белками-носителями и трудоемкую очистку антител.

Альтернативу антителам в качестве аффинных лигандов представляют олигодезоксирибонуклеотиды, специфически связывающиеся с белками [1–3]. По сравнению с технологией получения моноклональных антител химический синтез олигонуклеотидов – более быстрый и экономически доступный метод, он обладает высокой точностью и воспроизводимостью. Олигонуклеотиды имеют высокую химическую стабильность, более длительный срок хранения и обратимую температурную денатурацию. Величины констант связывания комплексов белок-олигонуклеотид и белок (антиген)-антитело сопоставимы и составляют 10^6 – 10^9 M^{-1} [1, 4].

В качестве модели для разработки метода выделения и концентрирования низкокопийных белков мы выбрали рибонуклеазу биназу (внеклеточная рибонуклеозид-3'-трансфераза из *Bacillus intermedius*) – небольшой белок с высококонсервативной первичной структурой. Биназа состоит из 109 аминокислотных остатков, имеет молекулярную массу 12.3 кДа и изоэлектрическую точку $pI \sim 9.5$ [5].

Сиквенс-специфичность взаимодействия биназы с олигодезоксирибонуклеотидами биочипа, содержащего полный перебор всех возможных одноцепочечных последовательностей длиной 6 н., изучали ранее методом измерения температур диссоциации ДНК-белковых комплексов [6]. Показано, что последовательности 5'-NNG(A/T/C)GNN-3' (GAG>GTG>GCG) специфически связываются с биназой, а сродство биназы к олигонуклеотидам TTG(A/T/C)GTT, измеренное на биочипе по температуре диссоциации ДНК-белковых комплексов и в растворе методом анизотропии флуоресценции, значительно превосходит сродство этого белка к олигонуклеотиду TTTTТТТ. Константа связывания комплекса биназы с олигонуклеотидом TTGAGTT составила $(5.4 \pm 0.8) \times 10^4 M^{-1}$.

В настоящей работе константы связывания олигодезоксирибонуклеотидов, иммобилизованных на биочипе, с биназой определяли методом, в котором не требуется введения флуоресцентного красителя в белок, поскольку для регистрации

взаимодействия используется собственная флуоресценция флуорофор-содержащих аминокислотных остатков [7]. Специфичность связывания оценивали также по взаимодействию биназы, меченной флуоресцентным красителем, с олигодезоксирибонуклеотидами, иммобилизованными на биочипе. Были подобраны условия проведения аффинной хроматографии и выделения биназы из разбавленных растворов на сорбентах, содержащих иммобилизованные олигонуклеотиды GAGAGAG и GAGAGAGAG. Эти олигонуклеотиды были выбраны исходя из определенных на биочипах констант связывания и результатов титрования низких концентраций флуоресцентно меченной биназы. Показано, что аффинная хроматография проводится в условиях, при которых биназа сохраняет специфичность связывания с различными олигонуклеотидами.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Синтез олигодезоксирибонуклеотидов. Олигодезоксирибонуклеотиды GAGAGAG, GAGAGAGAG, TTGAGTT, TTTTТТТ с амиолинкером на 3'-конце синтезированы в количестве 1 мкмоль на синтезаторе Applied Biosystems 394 DNA/RNA synthesizer (“Applied Biosystems”). Дезоксирибофосфорамидиты (dA-CE Phosphoramidite, dmfdG-CE Phosphoramidite, dT-CE Phosphoramidite, Ac-dC-CE Phosphoramidite), 3'-C(7) амиолинкер и 2 M триэтиламмонийацетат (TEAA) закуплены в “Glen Research”.

Концентрацию олигодезоксирибонуклеотидов определяли по спектрам поглощения, измеренным на спектрофотометре Jasco 550 (“Jasco”, Япония); при расчете экстинкций олигодезоксирибонуклеотидов использовали алгоритм “взаимодействия ближайших соседей” между основаниями в последовательности [8].

Изготовление биочипов. Гидрогелевые биочипы, содержащие иммобилизованные олигодезоксирибонуклеотиды, готовили по технологии полимеризационной иммобилизации, разработанной в ИМБ РАН [9–11] (Россия, www.biochip.ru). Полимеризационную смесь, содержащую гелеобразующие мономеры на основе метакриламида, а также олигодезоксирибонуклеотиды, подлежащие иммобилизации, наносили с помощью робота QArray (“Genetix”, Великобритания) в виде микрокапель объемом 0.1 нл на поверхность активированной подложки. Полимеризацию гелевых ячеек проводили под лампой ультрафиолетового света с максимумом излучения 350 нм (Sylvania GTE lamp, F15T8/350BI, Великобритания), удаленной от ячеек на расстояние 8 см, в течение 50 мин при 20°C в токе азота. Биочипы после завершения полимеризации отмывали в течение 40 мин в PBST, затем ополаскивали дистиллиро-

ванной водой. После этих процедур биочип закрывали инкубационной камерой и считали его полностью подготовленным к проведению анализа.

В работе использовали стеклянные подложки (Corning 2947 Micro Slides, “Corning”, США), либо стеклянные подложки, покрытые слоем алюминия с зеркальной поверхностью [12]. Для изготовления биочипов подложки обрабатывали раствором 1%-го Bind Silane в этиловом спирте, отмывали в этиловом спирте, воде и высушивали. Олигонуклеотиды были иммобилизованы в концентрации 4×10^{-4} М. Диаметр гелевых ячеек биочипа составлял 120 ± 8 мкм, расстояние между центрами соседних ячеек – 300 ± 11 мкм.

Взаимодействие биназы с олигонуклеотидами биочипа. Рибонуклеаза биназа любезно предоставлена Лабораторией конформационной стабильности белков и физических методов анализа ИМБ РАН.

Для регистрации взаимодействия биназы с олигодезоксирибонуклеотидами, иммобилизованными в ячейках биочипа, под камеру биочипа (50 мкл) помещали раствор биназы в концентрации от 0 до 1×10^{-4} М в буфере А (10 мМ Na-фосфат, pH 7.0). Биочипы инкубировали при 20°C в течение 30 мин. Регистрировали интенсивность флуоресценции флуорофор-содержащих аминокислотных остатков биназы (три остатка триптофана, семь – тирозина и четыре остатка фенилаланина) в УФ-диапазоне ($\lambda_{\text{возб}} = 280$ нм, $\lambda_{\text{эмис}} = 360$ нм) с помощью анализатора изображений биочипа, представляющего собой флуоресцентный микроскоп (ИМБ РАН, Россия), оснащенный термостолком Пельтье с термоконтроллером (“Melcor”, США), и компьютером [7]. Концентрацию биназы в растворе определяли по спектрам поглощения, измеренным на спектрофотометре Jasco 550 (“Jasco”).

Величину флуоресцентного сигнала в ячейке биочипа, F , определяли по формуле:

$$F = (F_{\text{in}} - F_{\text{out}}) - (F_{\text{in}} - F_{\text{out}})_{\text{ref}} \quad (1)$$

где F_{in} – средняя интенсивность флуоресценции по площади изображения гелевой ячейки биочипа; F_{out} – средняя интенсивность флуоресценции буферного раствора рядом с гелевой ячейкой биочипа; разность сигналов, обозначенная нижним индексом “ref”, соответствует “пустой” гелевой ячейке, не содержащей иммобилизованных биомолекул.

Полученные зависимости интенсивности флуоресценции, F , от концентрации белка в растворе камеры, покрывающей биочип, аппроксимировали следующим уравнением [13]:

$$F = \alpha K_{\text{ass}} C_{\text{imm}} C_p / (1 + K_{\text{ass}} C_p), \quad (2)$$

где F – интенсивность флуоресценции ячейки, α – фактор пропорциональности, K_{ass} – константа связывания, C_{imm} – концентрация иммобилизованных олигонуклеотидов, C_p – концентрация белка в растворе камеры, покрывающей биочип. Аппроксимацию выполняли в программе Origin 6.1 (“OriginLab Corp.”, США).

Окрашивание биназы флуоресцентным красителем. Конъюгат биназы с флуоресцентным красителем Cy5 получали согласно методике производителя (“Amersham Pharmacia Biosci.”), очищали гель-фильтрацией на сефадексе G-25 (“Sigma”), уравновешенном буфером А, в колонке Micro Bio-Spin (“Bio-Rad”). Степень модификации белка, оцененная по масс-спектру, полученному на MALDI-TOF-масс-спектрометре REFLEX IV (“Bruker”, Великобритания), составляла от одной до трех молекул красителя на одну молекулу биназы (рис. 1).

Взаимодействие флуоресцентно меченной биназы с олигонуклеотидами биочипа. Для регистрации взаимодействия биназы, меченной флуоресцентным красителем Cy5, с иммобилизованными в ячейках биочипа олигодезоксирибонуклеотидами под камеру биочипа (60 мкл) помещали раствор биназы-Cy5 в концентрации от 4×10^{-9} до 1.6×10^{-7} М (0.05–2.0 мкг/мл) в буфере А. Биочип инкубировали при 20°C в течение 18 ч, затем ополаскивали дистиллированной водой и отмывали в течение 4 мин в буфере А, дополнительно содержащем 0.1% Tween-20, вновь ополаскивали дистиллированной водой и сушили в потоке воздуха.

Флуоресцентные сигналы биочипа измеряли с использованием портативного флуоресцентного анализатора биочипов с возбуждением при помощи лазера (ИМБ, Москва) ($\lambda_{\text{возб}} = 650$, $\lambda_{\text{эмис}} = 670$ нм) [14].

Интенсивность флуоресцентного сигнала от каждой ячейки биочипа рассчитывали с помощью специального программного обеспечения ImaGelResearch (ИМБ, Москва) [6]. Зависимости интенсивности флуоресценции от концентрации белка аппроксимировали линейным уравнением.

Иммобилизация олигонуклеотидов на сорбенте. Аффинные сорбенты с иммобилизованными олигонуклеотидами GAGAGAG, GAGAGAGAG и TTTTTTTT получали методом ковалентной иммобилизации на CNBr-активированной сефарозе CL-4B (“Sigma-Aldrich”). Условия иммобилизации олигонуклеотидов: инкубация – 60 мин в натрий-карбонатном буфере, pH 9.5, при комнатной температуре. Концентрация олигонуклеотидов в растворе при иммобилизации составила $(1.3 \pm 0.3) \times 10^{-4}$ М. По завершении процесса иммобилизации избыточные активные группы на носителе инактивировали обработкой сорбента раствором 1 М глицина, pH 7.0, в течение 1 ч при

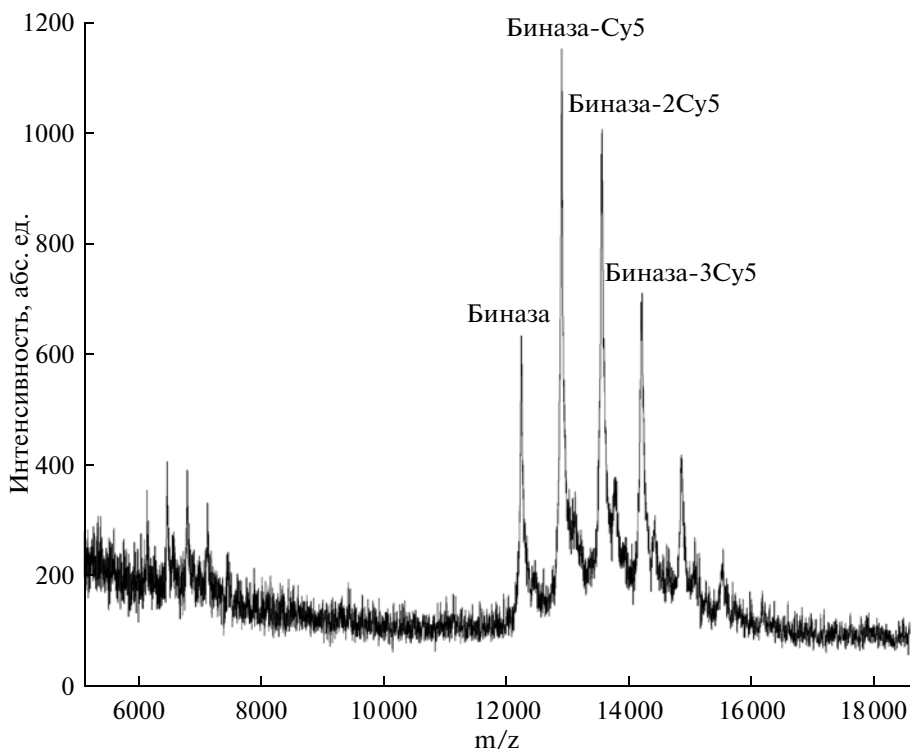


Рис. 1. Масс-спектр рибонуклеазы биназы, меченной флуоресцентным красителем Су5.

комнатной температуре. Сорбент отмывали буфером А, содержащим 150 мМ NaCl, и элюирующим буфером А, содержащим 800 мМ NaCl. Концентрацию иммобилизованных олигонуклеотидов на сорбентах рассчитывали по формуле:

$$C_{\text{имм}} = (C_{\text{исх}} V_{\text{исх}} - C_{\text{нп}} V_{\text{нп}} - C_{\text{пв}} V_{\text{пв}}) / V_{\text{сорб}}, \quad (3)$$

где $C_{\text{имм}}$ – концентрация олигонуклеотида, иммобилизованного на сорбенте, $C_{\text{исх}}$ – концентрация взятого в реакцию олигонуклеотида, $V_{\text{исх}}$ – объем взятого в реакцию олигонуклеотида, $C_{\text{нп}}$ – концентрация непрореагировавшего олигонуклеотида, $V_{\text{нп}}$ – объем непрореагировавшего олигонуклеотида, $C_{\text{пв}}$ – концентрация олигонуклеотида в промывном буфере, $V_{\text{пв}}$ – объем олигонуклеотида в промывном буфере, $V_{\text{сорб}}$ – объем полученного сорбента (влажного носителя). Концентрацию олигонуклеотидов в водных растворах определяли по величине оптической плотности при длине волны 260 нм на спектрофотометре DU 730 (“Beckman Coulter Inc.”). При расчете коэффициентов молярной экстинкции олигодезоксирибонуклеотидов использовали алгоритм “взаимодействия ближайших соседей” между основаниями в последовательности [8]. Рассчитаны значения коэффициента молярной экстинкции олигонуклеотидов, составившие: для GAGAGAGAG – 107840 М⁻¹ см⁻¹, для GAGAGAG – 83920 М⁻¹ см⁻¹,

для TTGAGTT – 68640 М⁻¹ см⁻¹, для TTTTТТТТ – 59820 М⁻¹ см⁻¹.

Аффинную хроматографию биназы на сорбенте с иммобилизованным олигонуклеотидом проводили в хроматографической колонке Micro Bio-Spin Lab. (“Bio-Rad”). Раствор биназы в диапазоне концентраций 0.65–6.5 × 10⁻⁵ М (0.08–0.8 мг/мл) в буфере А наносили в избытке на сорбент с иммобилизованным олигонуклеотидом объемом 0.1 мл. Сорбент промывали 15-кратным объемом буфера А. Биназу элюировали тем же буфером, содержащим NaCl в концентрации 30, 150, 300, 500 или 800 мМ. Перед нанесением на биочип растворы элюатов биназы переводили в буфер А диализом (соотношение объемов 1 : 200, три смены буфера по 2 ч при комнатной температуре).

Концентрацию биназы в водных растворах определяли по величине оптической плотности при длине волны 280 нм на спектрофотометре DU 730 (“Beckman Coulter Inc.”), используя коэффициент молярной экстинкции 27411 М⁻¹ см⁻¹.

Концентрирование биназы из разбавленных водных растворов. Разбавленный раствор биназы наносили с помощью перистальтического насоса на колонку с сорбентом (0.1 мл) с иммобилизованным олигонуклеотидом GAGAGAG или GAGAGAGAG при комнатной температуре. Варьировали следующие параметры: концентрацию биназы в диапазоне 4.1 × 10⁻⁸–1.64 × 10⁻⁷ М (0.5–2.0 мкг/мл),

способ пропускания (однократное или рециклинг), скорость протока (10 и 30 см/ч), степень насыщения сорбента (соотношение количества наносимой биназы и количества биназы, которое способен связать сорбент). Затем сорбент отмывали буфером А и элюировали связавшуюся биназу буфером А, содержащим 800 мМ NaCl. Определяли концентрацию биназы в элюате. Степень концентрирования биназы на аффинном сорбенте рассчитывали как отношение ее концентрации в пиковой фракции элюата к концентрации наносимого на сорбент раствора фермента.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Анализ сиквенс-специфичности взаимодействия биназы с олигодезоксирибонуклеотидами, иммобилизованными в гелевых ячейках биочипа

В качестве молекулярных зондов для иммобилизации на биочипе и последующего анализа взаимодействия с рибонуклеазой биназой согласно результатам работы [6] были выбраны олигонуклеотиды GAGAGAGAG, GAGAGAG, TTGAGTT, содержащие специфичные мотивы GAG – четыре, три и один, соответственно, а также олигонуклеотид TTTTTTTT в качестве отрицательного контроля. Связывание анализировали по флуоресценции флуорофор-содержащих аминокислотных остатков биназы в УФ-диапазоне ($\lambda_{\text{ex}} = 280$ нм, $\lambda_{\text{em}} = 360$ нм) [7].

На рис. 2а представлено изображение биочипа, находящегося под 50 мкл раствора биназы в концентрации 2×10^{-5} М в буфере А. Из рис. 2а видно, что наибольший флуоресцентный сигнал дают ячейки, содержащие олигонуклеотиды GAGAGAG и GAGAGAGAG.

Получены графики зависимости сигналов флуоресценции гелевых элементов биочипа, содержащих иммобилизованные олигонуклеотиды GAGAGAGAG, GAGAGAG, TTGAGTT, TTTTTTTT, от концентрации биназы в растворе камеры биочипа (от 0 до 1×10^{-4} М (1.2 мг/мл)). На рис. 2б представлены равновесные кривые титрования. Определены константы связывания, K_{ass} , олигонуклеотидов биочипа, GAGAGAGAG, GAGAGAG,

TTGAGTT, TTTTTTTT, которые составили, соответственно, $(1.0 \pm 0.3) \times 10^5$, $(8.0 \pm 1.5) \times 10^4$, $(5.0 \pm 1.0) \times 10^4$ и $(8.0 \pm 5.0) \times 10^3$ М⁻¹ (см. также табл. 1). Для сравнения, константа связывания биназы с последовательностью TTGAGTT, измеренная ранее в растворе методом анизотропии флуоресценции, в буфере с более высокой ионной силой (0.1 М NaCl, 50 мМ Трис-НСl, рН 6.5, 1 мМ EDTA) составила $(5.4 \pm 0.8) \times 10^4$ М⁻¹ [6].

Таким образом, показано, что сродство биназы к олигонуклеотидам GAGAGAGAG, GAGAGAG и TTGAGTT в 12, 10 и 6 раз больше, чем к TTTTTTTT, соответственно.

Связывание биназы с олигонуклеотидами биочипа анализировали также с использованием биназы, ковалентно меченной флуоресцентным красителем Cy5. На рис. 3а представлено полученное в видимой области спектра ($\lambda_{\text{возб}} = 650$ нм, $\lambda_{\text{флуор}} = 670$ нм) изображение биочипа после инкубирования с раствором биназы-Cy5 в концентрации 1.64×10^{-7} М, отмывки и высушивания. Из рис. 3а видно, что, как и в случае с немодифицированной биназой, наибольший сигнал флуоресценции дают ячейки, содержащие олигонуклеотиды GAGAGAG и GAGAGAGAG.

Метод определения специфичности связывания флуоресцентно меченного белка к иммобилизованным олигонуклеотидам, при котором производится кратковременная отмывка биочипа перед регистрацией флуоресцентных сигналов (см. “Экспериментальную часть”), не позволяет определить константы связывания белка с иммобилизованными олигонуклеотидами, поскольку при этом нарушаются условия равновесия. Однако этот метод позволяет оценить сродство к олигонуклеотидам различной последовательности при достаточно низких концентрациях белка. На рис. 3б представлены кривые титрования на биочипе флуоресцентно меченной биназы в диапазоне концентраций от 4.1×10^{-9} до 1.64×10^{-7} М (0.05–2.0 мкг/мл). Как видно из приведенных данных, наилучшее связывание с биназой обеспечивают GAGAGAGAG и GAGAGAG, олигонуклеотид TTGAGTT обладает менее выраженным сродством к биназе, а TTTTTTTT практически не проявляет сродства.

Таблица 1. Константы связывания нативной биназы с олигонуклеотидами биочипа*

Иммобилизованный олигонуклеотид	Биназа, М ⁻¹	Биназа после концентрирования на сорбенте с иммобилизованным олигонуклеотидом, М ⁻¹
GAGAGAGAG	$(1.0 \pm 0.3) \times 10^5$	$(1.5 \pm 0.5) \times 10^5$
GAGAGAG	$(8.0 \pm 1.5) \times 10^4$	$(9.0 \pm 2.0) \times 10^4$
TTGAGTT	$(5.0 \pm 1.0) \times 10^4$	$(5.0 \pm 1.0) \times 10^4$
TTTTTTTT	$(8.0 \pm 5.0) \times 10^3$	$(1.5 \pm 0.2) \times 10^4$

* Константы связывания рассчитывали по формуле 2 (см. “Экспериментальную часть”).

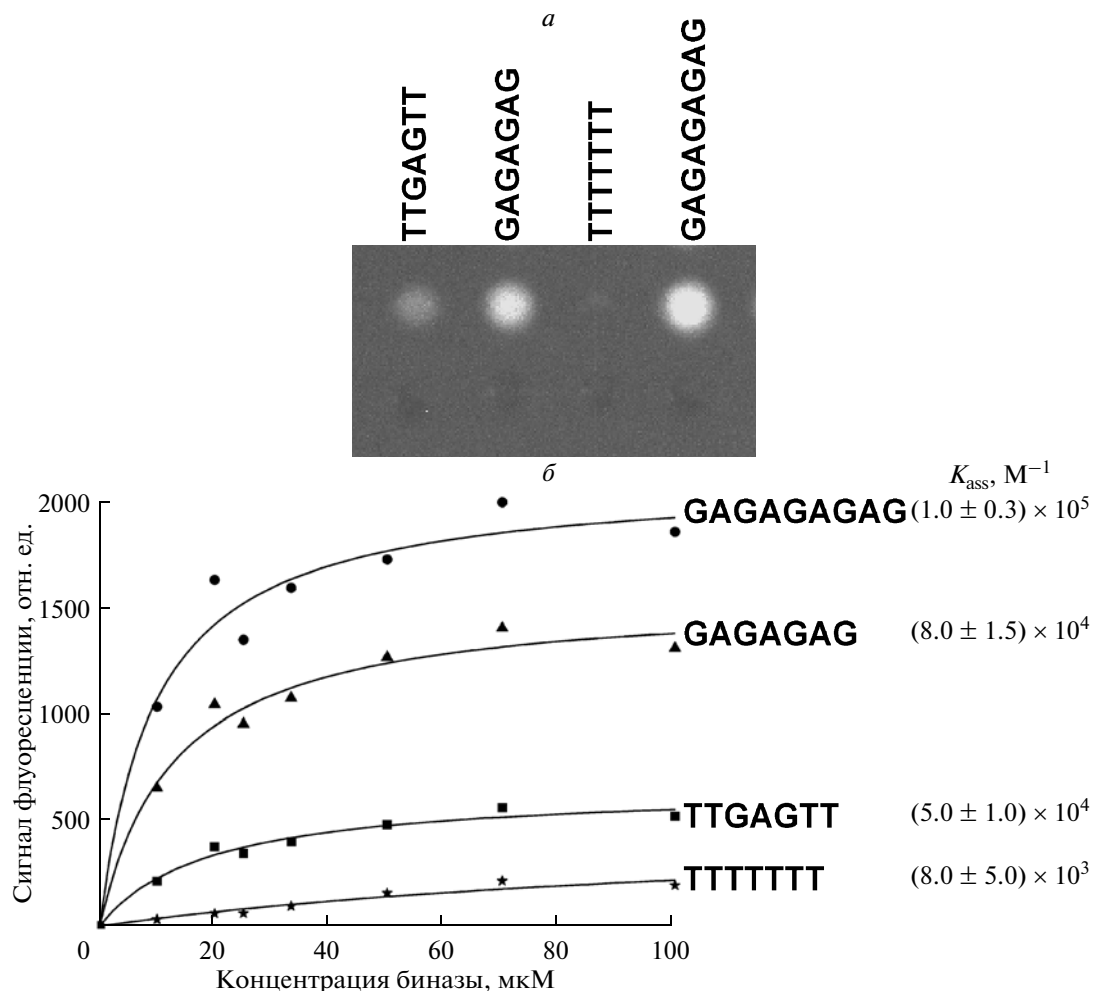


Рис. 2. Взаимодействие рибонуклеазы биназы с олигонуклеотидами биочипа. *a* – Изображение биочипа после инкубации с раствором биназы (2×10^{-5} М) в течение 30 мин при 20°C. Верхний ряд гелевых ячеек биочипа содержит иммобилизованные олигонуклеотиды, нижний ряд не содержит иммобилизованных биомолекул. Последовательности иммобилизованных олигонуклеотидов указаны над изображением биочипа. *б* – Равновесные кривые титрования олигонуклеотидов биочипа раствором биназы в концентрации от 0 до 100 мкМ при температуре 20°C. Константы связывания олигонуклеотидов указаны справа.

Для дальнейших опытов по иммобилизации молекулярных зондов на сорбенте в качестве молекулярных зондов, специфически связывающих биназу, выбраны GAGAGAGAG и GAGAGAG, а в качестве отрицательного контроля – олигонуклеотид TTTTTTT.

Проведение аффинной хроматографии и определение сиквенса-специфичности биназы к олигодезоксирибонуклеотидам, иммобилизованным на сорбентах

Нами изготовлены три аффинных сорбента, представляющие собой сефарозу CL-4B с ковалентно иммобилизованными олигодезоксирибонуклеотидами. Концентрация иммобилизованных олигонуклеотидов на сорбентах составила 2.5×10^{-4} М (0.6 мг/мл) для GAGAGAG, $2.2 \times$

$\times 10^{-4}$ М (0.7 мг/мл) для GAGAGAGAG и 1.3×10^{-4} М (0.3 мг/мл) для TTTTTTT. На этих сорбентах проведена серия циклов аффинной хроматографии рибонуклеазы биназы.

На рис. 4 представлены профили аффинной хроматографии биназы на сорбентах с иммобилизованными олигонуклеотидами GAGAGAG (*a*) и TTTTTTT (*б*). Как можно видеть (рис. 4*a*), при нанесении на сорбент раствора биназы в буфере А биназа связывается с иммобилизованным на сорбенте олигонуклеотидом до насыщения емкости сорбента. Дальнейшее нанесение биназы приводит к ее появлению во фракции “проскока”. При дальнейшей промывке сорбента буфером А удастся достичь почти полного отсутствия биназы в выходящем с колонки буфере. При добавлении в буфер А NaCl (от 300 до 800 мМ) происходит элюция биназы с сорбента (рис. 4*a*), при этом концен-

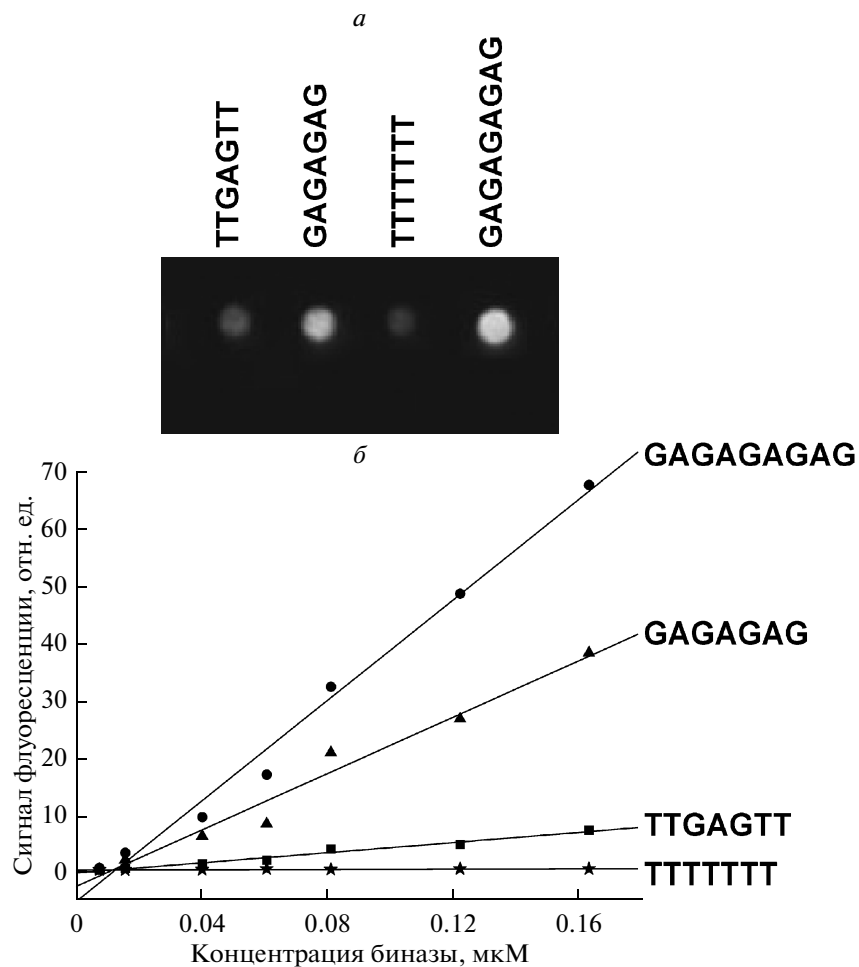


Рис. 3. Взаимодействие рибонуклеазы биназы, меченной флуоресцентным красителем Су5, с олигонуклеотидами биочипа в буфере А. *а* – Изображение биочипа после инкубирования с раствором флуоресцентно меченной биназы с концентрацией 1.64×10^{-7} М в течение 18 ч при 20°C. *б* – Кривые титрования олигонуклеотидов биочипа раствором флуоресцентно меченной биназы в концентрации от 0.004 до 0.164 мкМ.

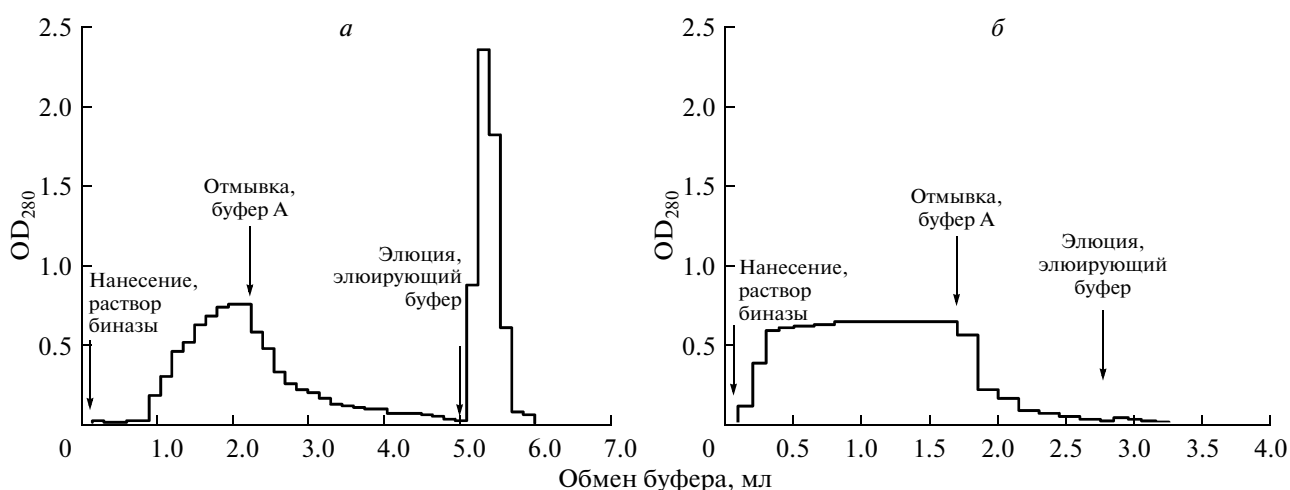


Рис. 4. Профили аффинной хроматографии биназы на сорбентах с иммобилизованными олигонуклеотидами GAGAGAG (*а*) и TTTTTTT (*б*). По оси абсцисс отложен объем раствора, пропускаемого через колонку с сорбентом, по оси ординат – оптическая плотность раствора, прошедшего через сорбент. Исходная концентрация биназы – 0.28 мг/мл в буфере А (10 мМ Na-фосфат, pH 7.0). Отмывающий буфер тот же. Элюирующий буфер – 800 мМ NaCl, 10 мМ Na-фосфат, pH 7.0.

Таблица 2. Концентрирование биназы на сорбентах с иммобилизованными олигонуклеотидами GAGAGAG или GAGAGAGAG

Иммобилизованный олигонуклеотид	Биназа, моль/л		Концентрирование биназы, разы
	в наносимом растворе	в пиковой фракции элюата	
GAGAGAGAG	4.1×10^{-8}	1.2×10^{-5}	290
GAGAGAGAG	1.6×10^{-7}	2.6×10^{-5}	147
GAGAGAG	4.1×10^{-8}	0.9×10^{-5}	209
GAGAGAG	1.6×10^{-7}	1.6×10^{-5}	99

трация биназы в элюате и ширина пика зависят от концентрации NaCl в элюирующем буфере.

В результате были подобраны условия проведения аффинной хроматографии биназы на сорбенте с иммобилизованным олигонуклеотидом GAGAGAG: связывание осуществляется в буфере А, для элюирования оптимальным является буфер А, содержащий 800 мМ NaCl.

Определена рабочая емкость сорбентов с иммобилизованными олигонуклеотидами GAGAGAG и GAGAGAGAG в режиме насыщения. Она составила $(2.1 \pm 0.2) \times 10^{-4}$ М (2.6 ± 0.2 мг/мл) и $(1.9 \pm 0.2) \times 10^{-4}$ М (2.3 ± 0.2 мг/мл). Разница полученных значений находится в пределах ошибки измерения. В выбранных условиях проведена процедура аффинной хроматографии биназы на сорбенте с иммобилизованным олигонуклеотидом TTTTTT. Из данных, представленных на рис. 4б, видно, что биназа практически не связывается с иммобилизованным TTTTTT: емкость данного сорбента для биназы не превышает 3.3×10^{-6} М (0.04 мг/мл). Эти данные свидетельствуют

в пользу того, что связывание биназы с иммобилизованными олигонуклеотидами GAGAGAG и GAGAGAGAG носит специфичный характер.

Концентрирование биназы из разбавленных водных растворов

Концентрирование биназы из разбавленных буферных растворов проводили методом аффинной хроматографии на сорбентах с иммобилизованными олигонуклеотидами GAGAGAG и GAGAGAGAG в следующих условиях: объем сорбента с иммобилизованными олигонуклеотидами – 0.1 мл, объем наносимого на сорбент раствора биназы – 200 мл, скорость потока – 10 см/ч. Полученные результаты представлены в табл. 2.

Показано, что для выделения биназы из разбавленного водного раствора наиболее эффективен иммобилизованный олигонуклеотид GAGAGAGAG, что соответствует нашим данным по сиквенс-специфичности этого белка.

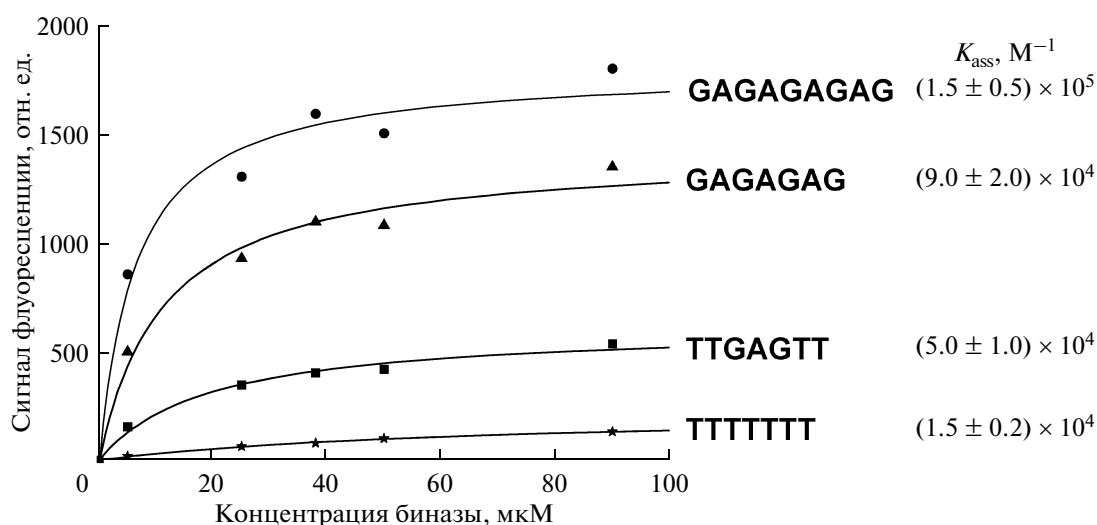


Рис. 5. Равновесные кривые титрования олигонуклеотидов биочипа раствором биназы, элюированной с сорбента после проведения аффинной хроматографии. Условия титрования, как на рис. 2б. Константы связывания олигонуклеотидов указаны справа.

**Подтверждение сиквенс-специфичности
взаимодействия биназы
с олигодезоксирибонуклеотидами
после процедуры аффинной хроматографии**

После проведения аффинной хроматографии биназы на сорбенте с иммобилизованным олигонуклеотидом GAGAGAG элюат переводили диализом в буфер А и тестировали на биочипе. На рис. 5 представлены равновесные кривые титрования. Константы связывания элюата биназы с иммобилизованными в гелевых ячейках биочипа олигонуклеотидами GAGAGAGAG, GAGAGAG, TTGAGTT, TTTTTTTT составили $(1.5 \pm 0.5) \times 10^5$, $(9.0 \pm 2.0) \times 10^4$, $(5.0 \pm 1.0) \times 10^4$ и $(1.5 \pm 0.2) \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ соответственно (см. также табл. 1). Таким образом, величины констант связывания биназы с олигонуклеотидами биочипа до и после проведения аффинной хроматографии совпали в пределах ошибок измерения. Следовательно, в ходе аффинной хроматографии фермент сохранил специфичность связывания с различными олигонуклеотидами.

На модели фермента биназы и набора олигодезоксирибонуклеотидов с использованием разработанного нами ранее метода определения констант связывания на биочипе показана возможность выбора оптимального олигонуклеотида, обладающего максимальным сродством к исследуемому белку. Показана возможность использования иммобилизованного олигодезоксирибонуклеотида в качестве молекулярного зонда для создания аффинного сорбента для концентрирования целевого белка из разбавленных растворов. Разработанные подходы могут использоваться для изучения сиквенс-специфичности белков, а также их выделения из различных биологических сред.

Работа проводилась при финансовой поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации (Государственный контракт № 16.512.11.2230 от 12 июля 2011 г.).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Кульбачинский А.В. 2006. Методы отбора аптамеров к белковым мишеням. *Успехи биол. химии*. **46**, 193–224.
2. Копылов А.М., Спиридонова В.А. 2000. Комбинаторная химия нуклеиновых кислот: SELEX. *Молекуляр. биология*. **34**, 1097–1113.
3. Jayasena S.D. 1999. Aptamers: an emerging class of molecules that rival antibodies in diagnostics. *Clin. Chem.* **45**(9), 1628–1650.
4. Kim B.B., Dikova E.B., Sheller U., Dikov M.M., Gavrilova E.M., Egorov A.M. 1990. Evaluation of dissociation constants of antigen-antibody complexes by ELISA. *J. Immunol. Methods*. **131**(2), 213–222.
5. Zelenikhin P.V., Cherepnev G.V., Kern F., Ilinskaya O.N. 2006. Binase does not induce polyclonal T-cell response. *Doklady Biological Sciences*. **407**(1), 195–197.
6. Zasedateleva O.A., Mikheikin A.L., Turygin A.Y., Prokopenko D.V., Chudinov A.V., Belobritskaya E.E., Chechetkin V.R., Zasedatelev A.S. 2008. Gel-based oligonucleotide microarray approach to analyze protein-DNA binding specificity. *Nucl. Acids Res.* **36**(10), e61.
7. Барский В.Е., Заседателева О.А., Василисков В.А., Крейдлин Э.Я., Заседателев А.С. Способ анализа взаимодействий биологических молекул на биологическом микрочипе на основе флуоресценции флуорофор-содержащих аминокислотных остатков. Патентная заявка № 2010149948 от 07.12.2010
8. Puglisi J.D., Tinoco I.Jr. 1989. Absorbance melting curves of RNA. *Methods Enzymol.* **180**, 304–325.
9. Мирзабеков А.Д., Рубина А.Ю., Паньков С.В. 2003. Способ полимеризационной иммобилизации биологических макромолекул и композиция для его осуществления, Патент РФ № 2216547. *Бюлл. изобр.* № 32.
10. Rubina A.Yu., Dementieva E.I., Stomakhin A.A., Darii E.L., Pan'kov S.V., Barsky V.E., Ivanov S.M., Konovalova E.V., Mirzabekov A.D. 2003. Hydrogel-based protein microchips: manufacturing, properties, and applications. *BioTechniques*. **34**, 1008–1022.
11. Rubina A.Yu., Pan'kov S.V., Dementieva E.I., Pen'kov D.N., Butygin A.V., Vasiliskov V.A., Chudinov A.V., Mikheikin A.L., Mikhailovich V.M., Mirzabekov A.D. 2004. Hydrogel drop microchips with immobilized DNA: properties and methods for large-scale production. *Anal. Biochemistry*. **325**, 92–106.
12. Zubtsova Zh.I., Zubtsov D.A., Savvateeva E.N., Stomakhin A.A., Chechetkin V.R., Zasedatelev A.S., Rubina A.Y. 2009. Hydrogel-based protein and oligonucleotide microchips on metal-coated surfaces: enhancement of fluorescence and optimization of immunoassay. *J. Biotechnol.* **144**, 151–159.
13. Rubina A.Yu., Dyukova V.I., Dementieva E.I., Stomakhin A.A., Nesmeyanov V.A., Grishin E.V., Zasedatelev A.S. 2005. Quantitative immunoassay of biotoxins on hydrogel-based protein microchips. *Anal. Biochemistry*. **340**, 317–329.
14. Barsky V., Perov A., Tokalov S., Chudinov A., Kreindlin E., Sharonov A., Kotova E., Mirzabekov A. 2002. Fluorescence data analysis on gel-based biochips. *J. Biomol. Screening*. **7**, 247–257.