

Обратите внимание!

Статья отозвана (ретрагирована)

Статья

Мосин О. В., Игнатов Игнат Синтез фотохромного трансмембранного белка бактериородопсина галобактерией *Halobacterium halobium* // Интернет-журнал «НАУКОВЕДЕНИЕ» №2 (2014), <http://naukovedenie.ru/PDF/13TVN214.pdf> (доступ свободный). Загл. с экрана. Яз. рус., англ.

отозвана (ретрагирована) редакцией журнала в соответствии с правилами отзыва (ретракции) Интернет-журнала «Науковедение»

<http://naukovedenie.ru/retraction.php>

**В ходе дополнительной проверки выяснилось,
что статья уже была опубликована ранее:**

Мосин О. В., Игнатов Игнат Природный фотопреобразующий фотохромный мембранный белок бактериородопсин из пурпурных мембран галобактерии *Halobacterium halobium* // *Nanotechnology Research and Practice* Vol. 1, No. 1, pp. 43-56, 2014, http://ejournal13.com/journals_n/1402294281.pdf

Редакция приносит извинения читателям за доставленные неудобства

УДК 577.37 + 537.86
03.00.00 Биологические науки,
03.00.02 Биофизика

Мосин Олег Викторович

ФГОУ ВПО «Московский государственный университет прикладной биотехнологии»
Россия, Москва
Научный сотрудник, кандидат химических наук
E-mail: mosin-oleg@yandex.ru

Игнатов Игнат

Научно-исследовательский Центр медицинской биофизики (НИЦМБ)
Болгария, София¹
Профессор, доктор наук
E-mail: mbioph@dir.bg

Синтез фотохромного трансмембранного белка бактериородопсина галобактерией *Halobacterium halobium*

Аннотация: В данной статье сообщается о микропрепаративном микробиологическом синтезе природного фотопреобразующего белка бактериородопсина (выход 8–10 мг) фотоорганотрофной галобактерией *Halobacterium halobium*, способного преобразовывать световую энергию в электрохимическую энергию генерируемых протонов H⁺ и АТФ, что важно для nanoиндустрии новых современных отечественных фотопреобразующих наноматериалов и биомолекулярной электроники. Рассмотрены основные технологические стадии выделения и очистки бактериородопсина. Белок выделен из пурпурных мембран обработкой бактериальной биомассы ультразвуком при 22 кГц, спиртовой экстракцией низко- и высокомолекулярных примесей, клеточной РНК, каротиноидов и липидов с последующей солюбилизацией конечного продукта 0,5%-ном додецилсульфате натрия (ДДС-Na) и фракционированием метанолом. Гомогенность синтезируемого бактериородопсина исследована комбинацией методов разделения и анализа белка, включая электрофорез в 12,5%-ном полиакриламидном (ПААГ) геле с 0,1%-ным ДДС-Na, гель-проникающую хроматографию на сефадексе G-200.

Ключевые слова: *Halobacterium halobium*; пурпурные мембраны; бактериородопсин; биомолекулярная электроника.

Идентификационный номер статьи в журнале 13TVN214

¹ 1111, Болгария, София, ул. Николая Коперника, д. 32

Введение

Бактериородопсин был впервые выделен из клеточной мембраны экстремальной аэробной фотоорганотрофной палочковидной галобактерии *Halobacterium halobium* в 1971 году В. Стохениусом (США) и Д. Остерхельтом (ФРГ) [1]. Он представляет собой хромопротеид с молекулярной массой 26,7 кДа, связанный альдиминной связью с остатком лизина-216, который содержит в качестве хромоформной группы эквимолекулярную смесь 13-*цис*- и полностью 13-*транс*-ретинольного C₂₀-каротиноида – аналога витамина А, определяющего пурпурно-красный цвет галобактерий. Наряду с бактериородопсином в клеточной мембране галофилов содержатся другие сопутствующие каротиноидные пигменты, основной из которых бактериоруберин, обуславливающий окраску галобактерий от розового до красного и красно-оранжевого цветов, что имеет для галофилов важное значение как средство защиты против избыточной радиации и солнечного излучения, так как для мест их обитания характерна высокая освещенность.

Несмотря на изученность структуры и функций бактериородопсина он остается в центре внимания био- и нанотехнологии прежде всего благодаря своей высокой светочувствительности и разрешающей способности, и используется в молекулярной биоэлектронике как природный фотохромный материал для управляемых светом или электрическими импульсами модулей компьютерных и оптических систем [2]. Кроме того, бактериородопсин очень привлекателен как модельный объект для исследований, связанных с изучением функциональной активности и структурных свойств фотопреобразующих белков в составе искусственных нативных энерго- и фотопреобразующих мембран [3].

Природные фотопреобразующие наноматериалы также представляют большую ценность для коммерческой нано- и биотехнологии, микроэлектроники, биофотоники, а также биофизических исследований [4]. Например, бактериородопсин-содержащие нанопленки, полученные с использованием пурпурных мембран галобактерий, используются в качестве компонента в биомолекулярной электронике, использующей биоматериалы и принципы переработки информации биологическими объектами в вычислительной технике для создания электронных устройств. Впервые в мире такие пленки на основе молекул бактериородопсина были получены и исследованы в нашей стране в рамках проекта “Родопсин”, в ходе которого была продемонстрирована эффективность и перспективы использования наноматериалов “Биохром” в качестве фотохромных материалов для голографической записи и микроэлектронных устройств [5]. Эти наноматериалы обратимо изменяют свою структуру в ответ на физические воздействия и генерируют два дискретных состояния, подающихся измерению спектральными методами. Это определяет их дальнейшее использование в качестве логических вычислительных систем в биомолекулярной электронике. Так, на основе бактериородопсина был сконструирован фоторецептор с микроэлектродом из SnO₂, состоящий из 64 ячеек (пикселей), размером 2,5×2,5 мм и напряжением 0,3–0,7 В. Для преобразования сигналов в данном фоторецепторе, слабый ток элементов (3–10 нА) увеличивается до достижения значения напряжения) от 1 до 10 В и затем подается на светоизлучающие диоды. Данная конструкция свидетельствует о возможности эффективной интеграции бактериородопсина в современные микроэлектронные системы.

Основной задачей при изготовлении бактериородопсин-содержащих нанопленок является ориентация пурпурных мембран, между гидрофобными и гидрофильными средами, например, между водой и воздухом, как это распространено в природе. Как правило, для улучшения характеристик бактериородопсин-содержащих пленок, используется несколько слоев пурпурных мембран, которые наносятся на поверхность полимерного носителя – подложки и высушиваются в определенных условиях с сохранением своей природной структуры. Подложка, на которой сформирован препарат, может быть изготовлена из

натуральных и синтетических полимеров, гидрогелей, стекла, керамики, металлов и быть электропроводящей, многослойной, нести на себе функциональные подслои и т.д. Наилучшие показатели достигаются при изготовлении нанопленок на основе желатина. Это позволяет добиться высокой концентрации бактериородопсина (до 50 масс.%) в нанопленках, избежать агрегации фрагментов пурпурных мембран, а также разрушения бактериородопсина в процессе изготовления. Встроенные в желатиновую подложку фрагменты пурпурных мембран с бактериородопсином долговечны (время жизни $\sim 10^4$ часов) и устойчивы к воздействию многих факторов, как при изготовлении, так и в процессе эксплуатации (колебания температуры, интенсивное воздействие светом с помощью лазера и др.). При высыхании пурпурные мембраны укладываются друг на друга, ориентируясь в плоскости подложки. Слой высохших мембран толщиной 1 мкм содержит около 200 монослоев. При освещении в таких сухих пленках регистрируется фотопотенциал 100–200 мВ, что совпадает с величиной мембранного потенциала живой клетки.

Большой научно-практический интерес к получению препаратов бактериородопсина для реконструкции нанопленок, определил цель настоящей работы, связанной с разработкой условий выращивания галобактерий *Halobacterium halobium* и оптимизаций условий выделения чистого бактериородопсина в микропрепаративных количествах.

Структура и механизм функционирования бактериородопсина

По своей структуре и расположению в мембране клетки бактериородопсин относится к интегральным трансмембранным белкам (рис. 1), пронизывающим всю толщу клеточной мембраны, которая подразделяется на три фракции: желтую, красную и пурпурную. Содержащая бактериородопсин пурпурная фракция образует естественные двумерные кристаллы, которые можно исследовать с помощью электронной микроскопии и дифракционных методов анализа – рассеивания рентгеновского излучения, электронов и нейтронов на поверхности кристаллов пурпурных мембран. Этими методами было доказано существование в молекуле бактериородопсина семи спиральных белковых сегментов, в середине которых симметрично расположена хромофорная часть молекулы в виде остатка ретиналя.

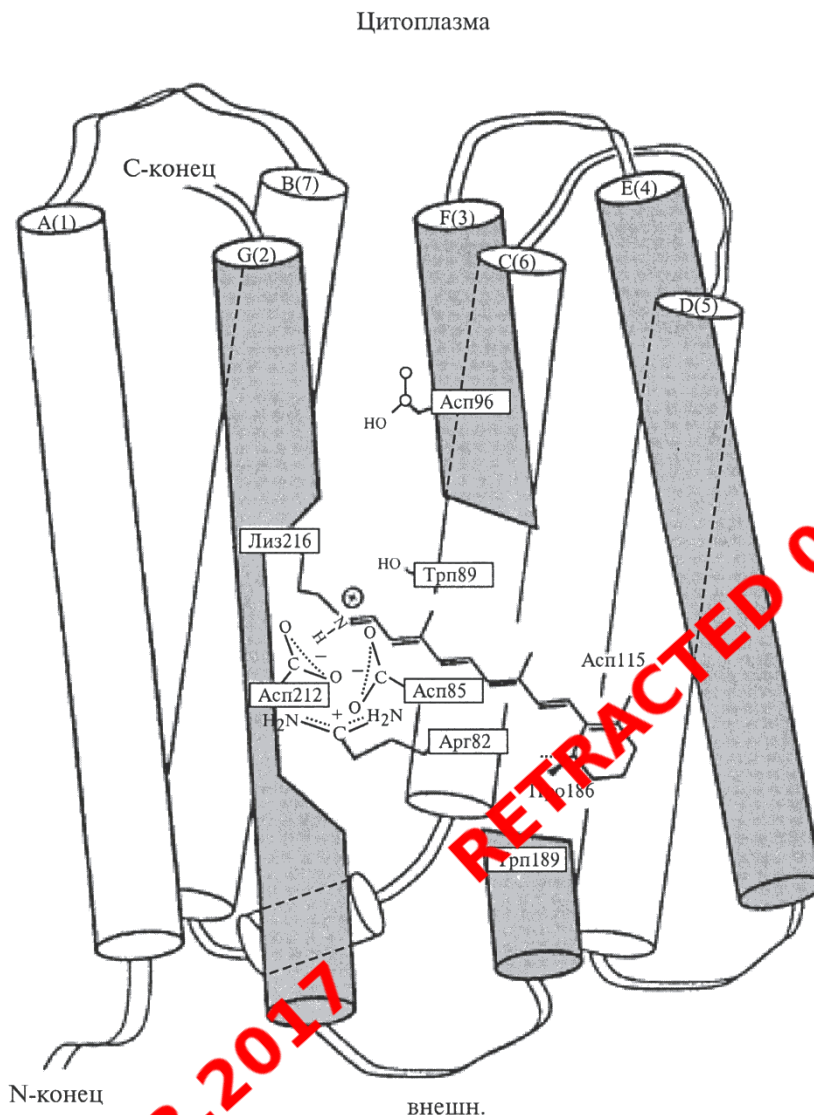


Рис. 1. Расположение белковой части молекулы бактериородопсина и остатка ретиналя в клеточной мембране галобактерии *Halobacterium halobium* по данным компьютерного моделирования:

белковые фрагменты молекулы бактериородопсина в виде 7 пронизывающих клеточную мембрану α -спиральных сегментов обозначены латинскими буквами;

темным цветом обозначены сегменты, ответственные за связывание остатка ретиналя в молекуле бактериородопсина с белковой частью молекулы

Полипептидная цепь бактериородопсина состоит из 248 аминокислотных остатков, 67% которых являются гидрофобными [6], а 33% – гидрофильными остатками из аспарагиновой и глутаминовой кислотами, аргинина и лизина. Эти остатки играют важную структурно-функциональную роль в пространственной ориентации α -спиральных сегментов молекулы бактериородопсина, которая организована в пурпурной мембране упорядоченно в виде тримеров со средним диаметром около 0,5 мкм и толщиной 5–6 нм; каждый тример окружен шестью другими так, что образуется правильная гексагональная кристаллическая решетка. Отдельная молекула бактериородопсина состоит из семи находящихся в конформации α -спирали сегментов, расположенных в направлении, перпендикулярном

плоскости цитоплазматической мембраны. Гидрофобные домены представляют собой трансмембранные сегменты, а гидрофильные домены выступают из мембраны и соединяют отдельные внутримембранные α -спиральные сегменты белковой части молекулы бактериородопсина. Наряду с бактериородопсином пурпурные мембраны содержат липиды, каротиноиды и воду [7]. Пурпурные мембраны устойчивы к солнечному свету, воздействию кислорода, температуре более чем 80 °С (в воде) и до 140 °С (на воздухе), рН от 1–12, высокой концентрации NaCl (15–20 масс.%), действию большинства ферментов-протеаз, чувствительны к смесям полярных органических растворителей с водой, но устойчивы к неполярным растворителям типа гексана. Эти факторы имеют большое практическое значение для встраивания пурпурных мембран в полимерные наноматрицы с сохранением фотохимических свойств.

Бактериородопсин выполняет в клетке галофилов функции светозависимого протонного насоса, перекачивающего протоны через мембрану клетки и создающего электрохимический градиент протонов H^+ на поверхности клеточной мембраны, энергия которого используется клеткой для синтеза АТФ в анаэробном фотосинтетическом фосфорилировании. Этот механизм синтеза АТФ получил название “бесхлорофильный фотосинтез” в отличие от реализуемого растениями фотосинтеза с участием хлорофилла. В этом механизме при каждом поглощении молекулой кванта света бактериородопсин обесцвечивается, вступая в цикл фотохимических превращений, в результате происходит высвобождение протона на внешней стороне мембраны и поглощение протона из внутриклеточного пространства. Вследствие этого между внутренней и внешней сторонами цитоплазматической мембраны устанавливается градиент концентрации протонов H^+ [8]. Механизм последующего переноса H^+ через мембрану клетки включает цепь водородных связей, образованных боковыми радикалами гидрофильных аминокислот и простирающихся через всю толщу белка. Протонная проводимость обеспечивается в том случае, если белок состоит из двух участков и содержит функциональную фотохромную группу, способную под воздействием кванта света изменять свое микроокружение и тем самым последовательно соединять и разъединять участки связывания и переноса H^+ через клеточную мембрану. Роль такого переносчика между двумя секторными проводниками H^+ , один из которых сообщается с внешней, а другой – с цитоплазматической поверхностью мембраны клетки, играет ретиналь, связанный альдиминной связью (как в зрительных пигментах животных [9]) с остатком лизина-216 белкового фрагмента молекулы бактериородопсина. Ретиналь имеет 13-транс-конформацию и располагается в мембранном туннеле между белковыми α -сегментами, блокируя поток протонов. При поглощении кванта света происходит обратимая световая фотоизомеризация 13-Z-БР ($\lambda_{\text{макс}} = 548$ нм) в all-E-БР ($\lambda_{\text{макс}} = 568$ нм) [10], инициирующая каскад быстрых фотохимических реакций продолжительностью от 3 миллисекунд до 1 пикосекунды, с образованием промежуточных интермедиантов J₆₂₅, K₅₉₀, L₅₅₀, M₄₁₂, N₅₆₀, и O₆₄₀ с последующим отрывом H^+ от ретинального остатка бактериородопсина и его присоединением со стороны цитоплазмы (рис. 2). В этом процессе молекула ретиналя изменяет свою конфигурацию в мембранном туннеле, формируя канал трансмембранного переноса протонов из цитоплазмы во внешнюю среду, и переносит протон H^+ с внутренней цитоплазматической мембраны на внешнюю мембрану клетки. При этом протон из ретинального остатка переносится на остаток Асп-85, после чего образовавшаяся вакансия заполняется протоном, перешедшим с Асп-96. В результате между внутренней и внешней поверхностью мембраны образуется градиент концентрации H^+ , приводящий к тому, что при освещении светом клетки начинают синтезировать АТФ, т.е. преобразуют энергию света в химическую энергию связей. Этот процесс обратим, и в темноте протекает в обратном направлении, когда бактериородопсин самопроизвольно возвращается в исходную форму [10]. Таким образом, молекула бактериородопсина ведет себя как фотохромный переносчик с малым временем релаксации – переходом из возбужденного состояния в основное.

Оптические и динамические характеристики бактериородопсина изменяются в зависимости от условий получения пурпурных мембран и составом полимерной матрицы.

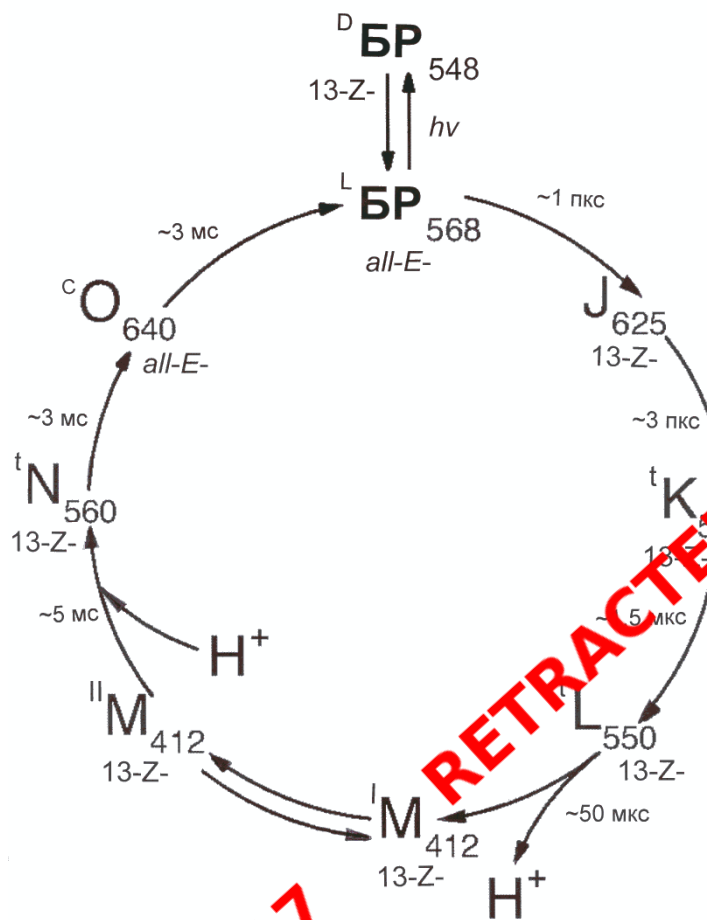


Рис. 2. Схема фотохимического цикла молекулы бактериородопсина (водная суспензия, pH 7,2, 20 °C).

Латинские цифры L, M, N, O обозначают спектральные интермедианты бактериородопсина. M и II M обозначают спектральные интермедианты мета-бактериородопсина с протонированной и депротонированной альдиминной связью. Верхние индексы "c" и "t" относятся к циклам 13-цис- и 13-транс-производных бактериородопсина (БР), "L" и "D" обозначают световую и темновую формы бактериородопсина. Нижние индексы соответствуют положению максимума поглощения интермедиаторов фотоцикла (в нм). Символами 13-Z и all-E показаны изомеры бактериородопсина. $h\nu$ – квант света. Продолжительности реакций измерены в мс (миллисекундах), мкс (микросекундах) и пкс (пикосекундах)

Биосинтез бактериородопсина

Технология получения бактериородопсина заключается в культивировании галобактерий на жидких синтетических средах (с 15–20 масс.% NaCl), содержащих аминокислоты, или на природных средах с пептонами – смесями полипептидов и аминокислот, получаемыми из продуктов неполного гидролиза сухого молока или мяса животных под действием протеолитических ферментов (пепсин, трипсин), или на белково-витаминном концентрате (БВК) дрожжей, с последующим выделением бактериородопсина из пурпурных мембран клеток комбинацией методов физико-химического разделения.

Для биосинтеза бактериородопсина использовали мутантный каротиноидсодержащий штамм экстремальных фотоорганотрофных галобактерий *Halobacterium halobium* ET 1001, полученный из коллекции культур МГУ. Штамм модифицирован селекцией отдельных бактериородопсин-синтезирующих колоний пурпурно-красного цвета на твердой (2 %-ный агар) пептоновой среде с 4,3 М NaCl. Полученный селекцией штамм галобактерий культивировали в жидкой комплексной синтетической среде (количества компонентов приведены в г/л), содержащей:

- 18 аминокислот: *D,L*-аланин — 0,43; *L*-аргинин — 0,4; *D,L*-аспарагиновая кислота — 0,45; *L*-цистеин — 0,05; *L*-глутаминовая кислота — 1,3; *L*-глицин — 0,06; *D,L*-гистидин — 0,3; *DL*-изолейцин — 0,44; *L*-лейцин — 0,8; *L*-лизин — 0,85; *D,L*-метионин — 0,37; *D,L*-фенилаланин — 0,26; *L*-пролин — 0,05; *D,L*-серин — 0,61; *D,L*-треонин — 0,5; *L*-тирозин — 0,2; *D,L*-триптофан — 0,5; *D,L*-валин — 1,0 г/л;
- нуклеотиды: аденозин-5-монофосфат — 0,1; уридин-5-монофосфат — 0,1 г/л;
- соли: NaCl — 250; MgSO₄·7H₂O — 20; KCl — 2,0; NH₄Cl — 0,5; KNO₃ — 0,1; KH₂PO₄ — 0,05; K₂HPO₄ — 0,05; Na⁺-цитрат — 0,5; MnSO₄·2H₂O — 3·10⁻⁴; CaCl₂·6H₂O — 0,065; ZnSO₄·7H₂O — 4·10⁻⁵; FeSO₄·7H₂O — 5·10⁻⁴; CuSO₄·5H₂O — 5·10⁻⁵ г/л;
- глицерин — 1,0 г/л;
- ростовые факторы: биотин — 1·10⁻⁴; фолиевая кислота — 1,5·10⁻⁴; витамин B₁₂ — 2·10⁻⁵ г/л.

Выращивание бактерий проводили в колбах Эрленмейера вместимостью 500 мл (объем реакционной смеси — 100 мл) 3–4 сут. при 35–37 °С в условиях интенсивной аэрации (расход воздуха — 0,5–2 л/мин на 1 л среды) в орбитальном шейкере 380-S (“Biorad”, Венгрия) и освещении монохромными люминисцентными лампами ЛДС-40-2 (40 Вт) (ООО “Альфа-Электро”, Россия) (3 лампы освещенностью 1,5 лк). Бактериальный рост изучали по оптической плотности бактериальной суспензии, измеренной при длине волны $\lambda = 620$ нм на спектрофотометре Beckman DU-6 (“Beckman Coulter”, США). Процедура выделения бактериородопсина из пурпурных мембран галобактерий и все последующие стадии выделения и очистки белка производились с использованием светозащитной лампы, снабженной оранжевым светофильтром ОРЖ-1Х (75×50 см) (“Marbel”, Германия).

В оптимальных условиях выращивания галобактерий, показанных на рис. 3, б, относительно контроля (рис. 3, а) на пептоновой среде в клетке синтезировался каротиноидсодержащий фиолетовый пигмент, по спектральному соотношению белкового и хромофилного фрагментов молекулы $D_{280}/D_{568} = 1,5 : 1$ полностью идентичный природному бактериородопсину. Как показали результаты исследования, рост галобактерий *Halobacterium halobium* на комплексной синтетической среде (рис. 3, б) ингибировался незначительно по сравнению с контролем (рис. 3, а) на пептоновой среде. Это существенно упрощает и удешевляет оптимизацию условий биосинтеза бактериородопсина, которые заключаются в культивировании галобактерий в синтетической среде при освещении монохромным светом с длиной волны $\lambda = 560$ нм в течение 4–5 сут при 35 °С. Существенным преимуществом является то, что в отличие от пептоновой среды, синтетическая среда не содержит в своем составе загрязняющих белковых продуктов, которые могут усложнить последующее выделение и очистку бактериородопсина.

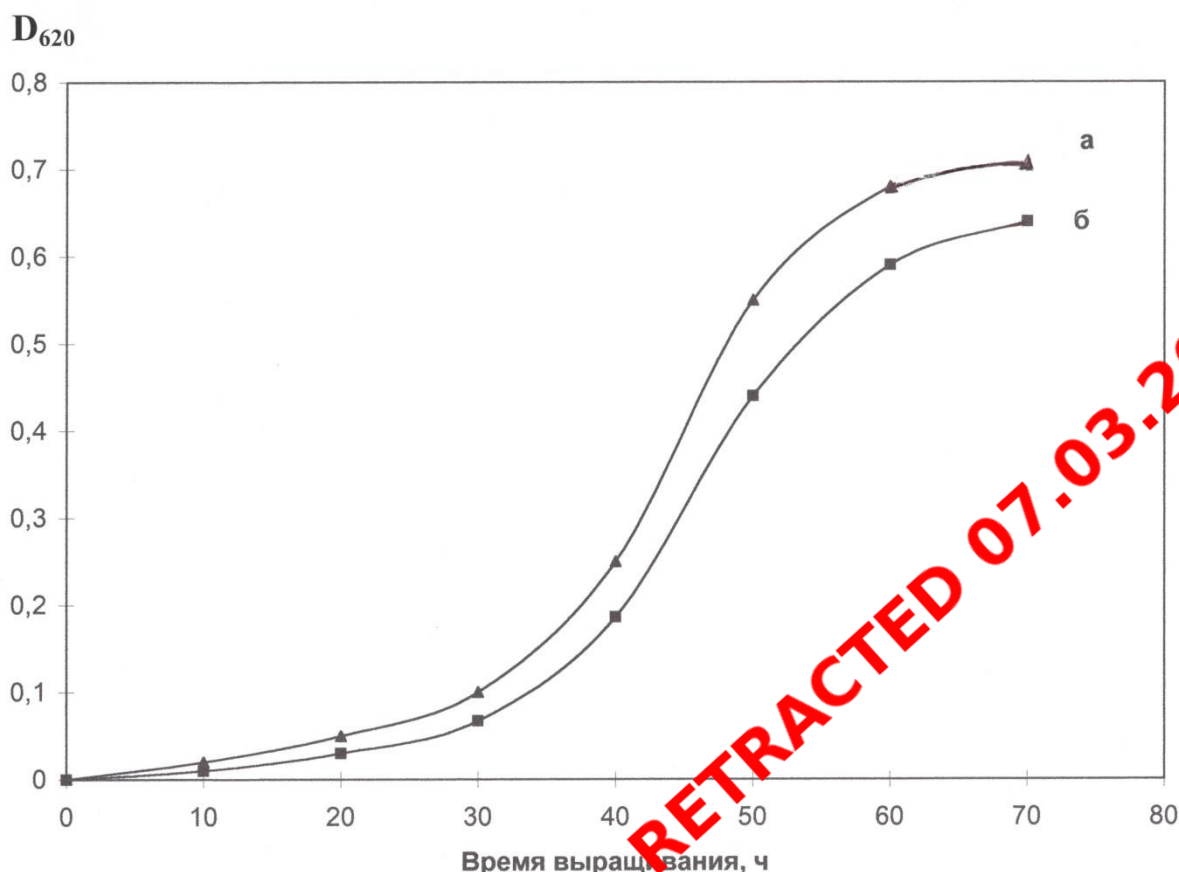


Рис. 3. Динамика роста галобактерии *Halobacterium halobium*, измеренная по оптической плотности клеточной суспензии при $\lambda = 620$ нм на спектрофотометре Beckman DU-6 (“Beckman Coulter”, США) в различных экспериментальных условиях: пептоновая среда (а), комплексная синтетическая среда (б). Условия выращивания: период инкубации 4–5 сут при 35°C , облучение монохромным светом с длиной волны $\lambda = 560$ нм. Контроль – пептоновая среда

Выделение и очистка бактериородопсина

Основными этапами получения бактериородопсина являлись:

- выращивание галобактерий *Halobacterium halobium* на синтетической среде;
- дезинтеграция клеток и лизис клеточных стенок;
- выделение фракции пурпурных мембран;
- очистка пурпурных мембран от низко- и высокомолекулярных примесей, клеточной РНК, каротиноидов и липидов;
- растворение пурпурных мембран в 0,5%-ном растворе ионного детергента – додецилсульфата натрия (ДДС-Na) с образованием микроэмульсии;
- Осаждение бактериородопсина из микроэмульсии метанолом;
- гель-проникающая хроматография (ГПХ) на сефадексе G-200;

- электрофорез в 12,5%-ном полиакриламидном (ПААГ) геле с 0,1%-ным ДДС-Na.

Поскольку выделяемый белок локализуется в пурпурных мембранах, освобождения от низкомолекулярных примесей и внутриклеточного содержимого достигали осмотическим шоком клеток дистиллированной водой на холоде после удаления 4,3 М NaCl и последующим разрушением клеточной оболочки ультразвуком с частотой 22 кГц. Последующую обработку клеточного гомогената ферментом РНК-азой I (2–3 ед. акт.) проводили для разрушения клеточной РНК. В результате получают фрагменты пурпурных мембран, содержащих бактериородопсин [11]. Поскольку фракция пурпурных мембран наряду с выделяемым белком в комплексе с липидами и полисахаридами содержала примесь связанных каротиноидов и посторонних белков, применялись специальные методы фракционирования белка без повреждения его нативной структуры и диссоциации ретинального остатка. Это существенно усложняло задачу выделения индивидуального бактериородопсина с применением методов декаротинизации и делипидизации (удаление каротиноидов и липидов), а также очистки и колоночной ГПХ на сефадексе. Декаротинизация, заключающаяся в многократной обработке суспензии пурпурных мембран 50%-ным этанолом при 4 °С, являлась рутинным, но обязательным этапом, несмотря на значительные потери хромопротеина. Использовалось не менее пяти обработок 50%-ным этанолом, чтобы получить спектр поглощения суспензии очищенных от каротиноидов (4) и (5) пурпурных мембран (степень хроматографической чистоты 80–85 %), показанного на рис. 4 на различных стадиях обработки (б) и (в) относительно природного бактериородопсина (а). Образование 13-ретинальпротеинового комплекса в молекуле бактериородопсина приводит к батохромному сдвигу в спектре поглощения пурпурных мембран (рис. 4, в). Основная полоса (1) при максимуме поглощения $\lambda = 568$ нм, вызванная световой изомеризацией хромофора по $C_{13}=C_{14}$ -кратной связи определяется наличием 13-*транс*-ретинального остатка в основной спектральной форме БР₅₆₈, а дополнительная малоинтенсивная полоса (2) при $\lambda=412$ нм характеризует незначительную примесь образующейся на свету спектральной формы метабактериородопсина М₄₁₂ с депротонированной альдиминной связью между остатком 13-*транс*-ретиналя и белком (рис. 4, а–в). Общая полоса (3) при $\lambda=280$ нм определяется поглощением ароматических аминокислот (фенилаланин, тирозин, триптофан) в полипептидной цепи белка (для чистого бактериородопсина соотношение поглощений D_{280}/D_{568} равно 1,5 : 1). Данный метод биосинтеза бактериородопсина позволяет для лучшего результата контролировать содержание ароматических аминокислот – фенилаланина, тирозина и триптофана в ростовой среде штамма-продуцента, добавляемых в количествах 0,26, 0,2 и 0,5 г/л.

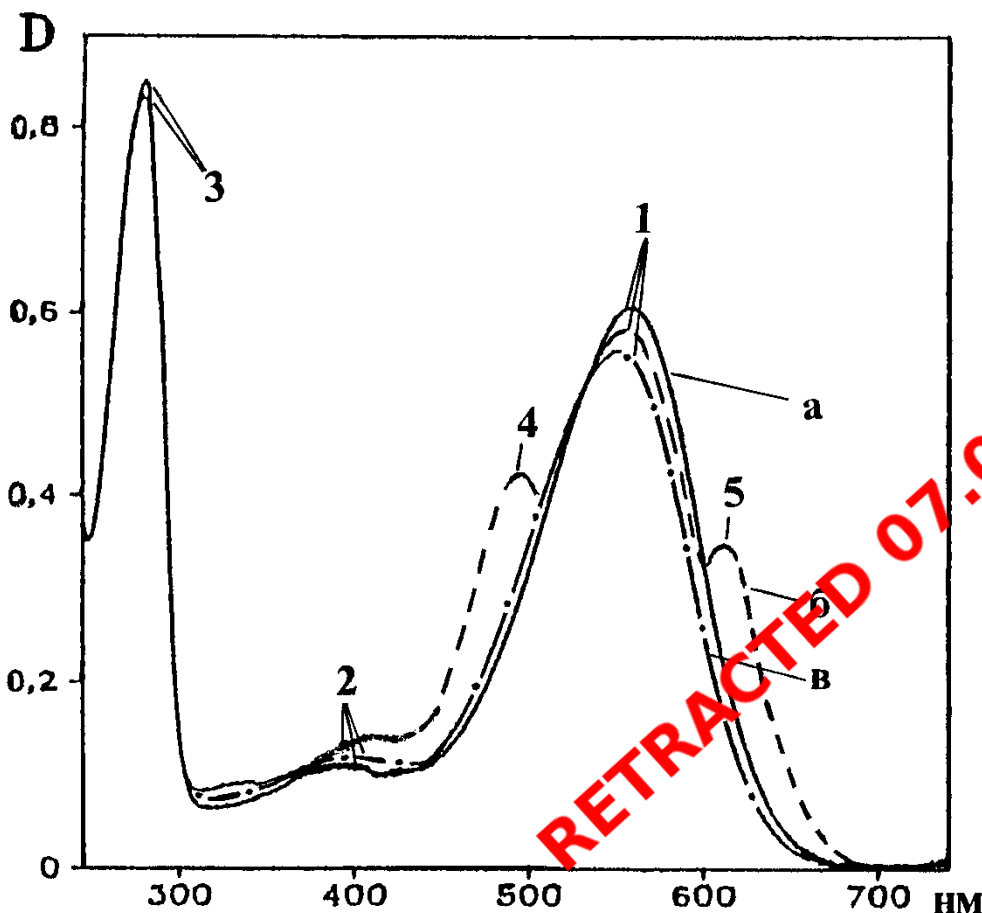


Рис. 4. Спектры поглощения суспензии пурпурных мембран (в 50%-м растворе этанола (в H_2O)) на различных стадиях очистки: природный бактериородопсин (а); пурпурные мембраны после промежуточной обработки (б); очищенные от посторонних каротиноидов пурпурные мембраны (в). Полоса (1) – основная спектральная форма бактериородопсина BR_{568} , (2) – примесь спектральной формы мета-бактериородопсина M_{412} , (3) – общая полоса поглощения ароматических аминокислот, (4) и (5) – посторонние каротиноиды. Контроль – природный бактериородопсин. Вертикальная ось (D) означает поглощение (отн. ед.), горизонтальная ось – диапазон длин волн (нм) при сканировании спектрофотометром

Фракционирование и тщательная хроматографическая очистка белка являлись следующим необходимым этапом. Поскольку бактериородопсин, будучи трансмембранным белком, пронизывает билипидный слой в виде семи α -сегментов, применение сульфата аммония и других традиционных высаливающих агентов не дает положительного результата при выделении белка. Решение проблемы заключалось в переводе белка в растворимую форму за счет коллоидного растворения (солюбилизацией) полученной фракции пурпурных мембран в 0,5%-ном растворе ДДС-На с последующим низкотемпературным осаждением из них белка метанолом. Использование в качестве ионного детергента ДДС-На диктовалось необходимостью максимальной солюбилизации белка с комбинированием стадии делипидизации и осаждения в нативном (с сохранением природной конфигурации) виде, поскольку солюбилизированный бактериородопсин сохраняет спиральную α -конфигурацию [12]. Поэтому отпала необходимость использования органических растворителей — ацетона, метанола и хлороформа для очистки от липидов, а делипидизация и осаждение белка совмещались в одну единственную стадию, существенно упрощающую фракционирование

белка и уменьшающую его потери при выделении. Значительным преимуществом метода является, что целевой белок в комплексе с молекулами липидов и детергента распределяется в надосадочной жидкости, а другие высокомолекулярные примеси и остатки клеточных мембран — в непрореагировавшем осадке, легко отделяемом центрифугированием. Фракционирование солюбилизированного в 0,5%-ном ДДС-Na белка с его последующим выделением в кристаллическом виде проводилось в три стадии дробным осаждением метанолом при 0 °С, уменьшая концентрацию детергента от 0,5 до 0,2 и 0,1% соответственно. Кристаллический белок (8–10 мг) промывали холодной дистиллированной водой (2 раза × 1 мл) и осаждали центрифугированием (1200 g, 15 мин).

Окончательная стадия очистки бактериородопсина заключалась в отделении белка от низкомолекулярных примесей методом ГПХ, для чего бактериородопсин-содержащие фракции дважды пропускали через колонку (150×10 мм) с декстрановым сефадексом G-200 (“Pharmacia”, США) (размер гранул — 40–120 мкм). Колонку уравнивали биферным раствором, содержащим 0,1%-й ДДС-Na и 2,5 мМ раствор этилендиаминтетрауксусной кислоты (ЭТДА). Пробу белка растворяли в 100 мкл буферного раствора и элюировали 0,09 М Трис-боратным буфером, содержащим 0,5 М NaCl, pH = 8,35 (ионная сила растворителя $I = 0,075$ моль/л) со скоростью 10 мл/см²·ч. Содержание белка в отобранных пробах определяли спектрофотометрически по соотношению поглощений D_{280}/D_{568} (молярные коэффициенты светопоглощения при длинах волн $\lambda = 280$ и 568 нм: $\epsilon_{280} = 1,1 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ и $\epsilon_{568} = 6,3 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$). Объединенные белковые фракции подвергали вакуумной сублимационной сушке, запаивали в стеклянные ампулы (10×50 мм) и хранили в криостатной камере холодильника при -15 °С.

Идентификацию бактериородопсина проводили электрофорезом в 12,5%-ном ПААГ с 0,1%-ным ДДС-Na в соответствии с протоколом фирмы LKB (Швеция). Количественное определение содержания белка выполняли сканированием покрашенного в растворе индикатора “кумасси-голубой R-250” электрофоретического геля на лазерном денситометре Beckman CDS-200 (“Beckman Coulter”, США).

Конечную идентификацию бактериородопсина проводили регенерацией свободных от ретиналя апомембран с 13-*транс*-ретиналем. Для получения апомембран суспензию пурпурных мембран (50 мг) в 50 мл 1 М NH₂OH (pH = 6,0) выдерживали 10 ч при перемешивании на ледяной бане (4 °С) при освещении реакционной смеси ксеноновой лампой ДКСТВ-6000 (ОАО “МЭЛЗ”, Россия). Осадок отделяли центрифугированием (1000 g, 10 мин), дважды промывали дистиллированной водой и центрифугировали. Фракцию апомембран суспендировали в 2 мл 5 мМ 2-(N-морфолино)-этансульфониламида в 100 мМ NaCl. Для регенерации апомембран с 13-*транс*-ретиналем, к 2 мл суспензии апомембран ($2 \cdot 10^{-5}$ М) в кварцевой кювете (10×10 мм) добавляли при перемешивании 0,1 мл 2 мМ раствора 13-*транс*-ретиналя в метаноле и выдерживали 6–8 ч в темноте при 40 °С. Степень регенерации определяли спектрофотометрически по соотношению $D_{\text{нат.280}}D_{\text{нат.568}}/D_{\text{рег.280}}D_{\text{рег.568}}$, где D_{280} и D_{568} — поглощение суспензии нативных и регенерированных апомембран при длинах волн $\lambda = 280$ и $\lambda = 568$ нм соответственно.

Выводы

Разработанный метод биосинтеза бактериородопсина свидетельствует о достаточно высоких выходах синтезируемого продукта. В результате получено 8–10 мг чистого бактериородопсина из 1 г бактериальной биомассы галобактерий, гомогенность, степень очистки и структура которого удовлетворяет требованиям, предъявляемым для конструкции нанопленок и искусственных мембран на основе бактериородопсина. Для обеспечения более высоких выходов бактериородопсина необходимо наработать большее количество сырьевой биомассы, что можно легко достичь в лабораторных условиях. Главным достоинством метода является то, что выделенный данным способом бактериородопсин сохраняет природную конфигурацию в комплексе с 13-*транс*-ретиналом и способность к фотохимическим превращениям *in vitro*, что важно для дальнейшего использования полученных образцов бактериородопсина для конструирования бактериородопсин-содержащих фотопреобразующих пленок. Метод также применим к получению других аналогичных БР трансмембранных белков галофильных бактерий – сенсородопсина и галородопсина. Уникальные свойства природных бактериородопсинов обеспечивают широкий диапазон био- и нано-технологических приложений, в которых могут найти применение препараты очищенных биологически активных белков.

Благодарности

Работа осуществлялась при финансовой поддержке Научно-исследовательского центра медицинской биофизики (Болгария), грант № 012.

ОТЗВАНА 07.03.2017

RETRACTED 07.03.2017

ЛИТЕРАТУРА

1. Oesterhelt D., Stoerkenius W. Rhodopsin – like protein from the purple membrane of *Halobacterium halobium* // Nature. 1971. V. 233. № 89. P. 149–160.
2. Hampp N., Oesterhelt D. Bacteriorhodopsin and its Potential in Technical Applications. In: Nanobiotechnology (Ch. Niemeyer and C. Mirkin, eds.), Wiley-VCH-Verlag, Weinheim. 2004. P. 146–167.
3. Мосин О. В., Складнев Д. А., Швец В. И. Включение дейтерированных ароматических аминокислот в молекулу бактериородопсина *Halobacterium halobium* // Прикладная биохимия и микробиология. 1999. Т. 35. № 1. С. 34–42.
4. Vought B. W., Birge R. R. (eds.) Molecular electronics and hybrid computer // in: Wiley Encyclopedia of Electrical and Electronics Engineering, New-York: Wiley-Interscience, 1999. P. 477–490.
5. Lanyi J. K. Understanding structure and function in the light-driven proton pump bacteriorhodopsin // Journal of Structural Biology. 1998. V. 124. P. 164–178.
6. Мосин О. В., Швец В. И., Складнев Д. А., Игнатов И. Синтез [²H]бактериородопсина, меченного дейтерием по остаткам ароматических аминокислот // Химическая технология, издательство “Наука и технология”, Москва. 2012. № 9. С. 553–564.
7. Grigorieff N. Electron-crystallographic refinement of the structure of bacteriorhodopsin // Journal of Molecular Biology. 1996. V. 259. P. 393–421.
8. Oesterhelt D. Bacteriorhodopsin as an Example of a Light-Driven Proton Pump. Angew. Chemie, Intern. / Ed. Engl. 1976. P. 16–24.
9. Ignatov I., Mosin O.V. Photoreceptors in visual perception and additive color mixing. Bacteriorhodopsin in nano- and biotechnologies // Advances in Physics Theories and Applications, 2014. V. 27. P. 20–37.
10. Haupts U., Tittor J., Bamberg E., Oesterhelt D. General Concept for Ion Translocation by Halobacterial Retinal Proteins: The Isomerization/Switch/Transfer Model // Biochemistry. 1997. V. 36. № 2–7. P. 78–85.
11. Мосин О. В., Швец В. И., Складнев Д. А., Игнатов И. Биосинтез трансмембранного фотопреобразующего белка [²H]бактериородопсина, меченного дейтерием по остаткам ароматических аминокислот [2,3,4,5,6-²H₅]Phe, [3,5-²H₂]Tyr и [2,4,5,6,7-²H₅]Trp // Проблемы биологической, медицинской и фармацевтической химии. 2013. № 8. С. 29–39.
12. Mosin O.V., Ignatov I. Biosynthesis of photochrome transmembrane protein bacteriorhodopsin of *Halobacterium halobium* labeled with deuterium at aromatic amino acids residues of [2,3,4,5,6-²H₅]Phe, [3,5-²H₂]Tyr and [2,4,5,6,7-²H₅]Trp // Chemistry and material research. 2014. V. 6. № 3. P. 1-15.

Рецензент: доктор, канд. хим. наук Г. Тыминский, председатель Европейского научного общества (ЕНО), 30659, Hannover, Sutestr. 50A, Deutschland.

Oleg Mosin

Moscow State University of Applied Biotechnology
Russia, Moscow
Scientist employer, Cand. Sc. (Ph D Chemistry)
E-mail: mosin-oleg@yandex.ru

Ignat Ignatov

Scientific-Research Centre of Medical Biophysics (SRCMB)
Sofia, Bulgaria
E-mail: mbioph@dir.bg

Synthesis of photo-chrome trans-membraine protein bacteriorhodopsin by halobacterium *Halobacterium halobium*

Abstract: In present paper it is informed about the micro-preparative microbiological synthesis of natural phototransforming protein bacteriorhodopsin (output 8–10 mg) by photo-organotrophic halobacterium *Halobacterium halobium*, which is capable to transform light energy to electro-chemical energy of generated protons H^+ and ATF that is important for nano-industry of new modern domestic photo-transforming nanomaterials and molecular bioelectronics. The basic technological stages for preparation and isolation of bacteriorhodopsin are considered. The protein was allocated from purple membranes by processing of bacterial biomass by ultrasound at 22 kHz, alcohol extraction of low and high-weight molecular impurities, cellular RNA, carotenoids and lipids with the subsequent solubilization of final product with 0,5% sodium dodecyl sulphate (SDS-Na) and fractionation by methanol. The homogeneity of the synthesized product was proved by combination of preparative and analytical protein methods including electrophoresis in 12,5% polyacrylamide gel (PAAG) with 0,1% SDS-Na, gel filtration chromatography on Sephadex G-200.

Keywords: *Halobacterium halobium*; purple membranes; bacteriorhodopsin; molecular bioelectronics.

Identification number of article 13TVN214

REFERENCES

1. Oesterhelt D., Stoerkenius W. Rhodopsin – like protein from the purple membrane of *Halobacterium halobium* // Nature. 1971. V. 233. № 89. P. 149–160.
2. Hampp N., Oesterhelt D. Bacteriorhodopsin and its Potential in Technical Applications. In: Nanobiotechnology (Ch. Niemeyer and C. Mirkin, eds.), Wiley-VCH-Verlag, Weinheim. 2004. P. 146–167.
3. Mosin O. V., Skladnev D. A., Shvets V. I. Inclusion of deuterated aromatic amino acids in the molecule of bacteriorhodopsin *Halobacterium halobium* // Applied Biochemistry and Microbiology. 1999. V. 35. № 1. P. 34–42.
4. Vought B. W., Birge R. R. (eds.) Molecular electronics and hybrid computers // in: Wiley Encyclopedia of Electrical and Electronics Engineering, New-York: Wiley-Interscience, 1999. P. 477–490.
5. Lanyi J. K. Understanding structure and function in the light-driven proton pump bacteriorhodopsin // Journal of Structural Biology. 1998. V. 124. P. 164–178.
6. Mosin O. V., Shvets V. I., Skladnev D. A., Ignatov I. Synthesis of [²H]bacteriorhodopsin labeled by deuterium on residues of aromatic amino acids // Khimicheskaya Tekhnologiya (Chemical Engineering). Publishing House “Nauka & Technology” Moscow. 2012. № 9. P. 553–564.
7. Grigorieff N. Electron-crystallographic refinement of the structure of bacteriorhodopsin // Journal of Molecular Biology. 1996. V. 259. P. 393–421.
8. Oesterhelt D. Bacteriorhodopsin as an Example of a Light-Driven Proton Pump. Angew. Chemie, Intern. / Ed. Engl. 1976. P. 16–24.
9. Ignatov I., Mosin O.V. Photoreceptors in visual perception and additive color mixing. Bacteriorhodopsin in nano- and biotechnologies // Advances in Physics Theories and Applications, 2014. V. 27. P. 20–37.
10. Haupts U., Tittor J., Bamberg E., Oesterhelt D. General Concept for Ion Translocation by Halobacterial Retinal Proteins: The Isomerization/Switch/Transfer Model // Biochemistry. 1997. V. 36. № 2–7. P. 78–85.
11. Mosin O. V., Shvets V.I., Skladnev D.A., Ignatov I. Biosynthesis of trans-membrain photo-transforming protein [²H]bacteriorhodopsin, labeled with deuterium on residues of aromatic amino acids [2,3,4,5,6-²H₅]Phe, [3,5-²H₂]Tyr and [2,4,5,6,7-²H₅]Trp // Problems of Biological, Medical and Pharmaceutical Chemistry. 2013. № 8. P. 29–39.
12. Mosin O.V., Ignatov I. Biosynthesis of photochrome transmembrane protein bacteriorhodopsin of *Halobacterium halobium* labeled with deuterium at aromatic amino acids residues of [2,3,4,5,6-²H₅]Phe, [3,5-²H₂]Tyr and [2,4,5,6,7-²H₅]Trp // Chemistry and material research. 2014. V. 6. № 3. P. 1-15.