



УДК 577.112.088.52+548.737

МОДИФИКАЦИИ МИКРОДИАЛИЗНОГО МЕТОДА
КРИСТАЛЛИЗАЦИИ БЕЛКОВ

Граханов С. Д.

*Институт кристаллографии им. А. В. Шубникова
Академии наук СССР, Москва*

Разработаны конструкции микродиализных ячеек для выращивания кристаллов биологических макромолекул с целью их рентгеноструктурного исследования. Ячейки просты в изготовлении, материалы для их монтажа доступны в любой биохимической лаборатории. При их использовании получено в кристаллическом состоянии свыше 10 белков, для 6 из которых выращены крупные кристаллы и определены пространственная группа и параметры элементарной ячейки.

Метод диализа является одним из первых, предложенных для кристаллизации белков [1]. К его преимуществам относится постепенное и мягкое приближение к состоянию пересыщения белкового раствора (необходимое условие для роста крупных кристаллов). В отличие от других методов кристаллизации макромолекул (диффузии через газообразное состояние [2] или насаивания [3]) этот метод позволяет стандартизовать состав низкомолекулярных компонентов белковой пробы, сколь бы малой она ни была, за счет точного его контроля в окружающем растворе.

К постоянному времени диализный метод претерпел существенные изменения в связи с переходом на микроуровень в отношении количества исследуемых веществ. Разработаны конструкции микродиализных ячеек, дающие возможность работать с такими объемами белковых растворов (вплоть до нескольких микролитров), которые немислимы при использовании диализных мешков. Конструкции этих ячеек описаны в обзорах по кристаллизации белков [4—7] и в оригинальных статьях [8—14], а некоторые из моделей выпускаются западными фирмами.

При работе по кристаллизации белков мы разработали несколько удобных в изготовлении и простых вариантов микродиализных ячеек. Основная их черта — использование двух коаксиальных полиэтиленовых шлангов, плотно входящих один в другой, между которыми монтируется диализная мембрана (рис. 1). Особенность предлагаемых ячеек заключается в том, что контакт полиэтилен — полиэтилен в отличие от контакта стекло — силиконовая резина или стекло — тигон практически исключает разрыв диализной мембраны при монтаже микродиализной ячейки. Благодаря уплотнительному кольцу из силиконового шланга создается герметичность ячейки противораствора, что очень важно при работе с летучими органическими растворителями и/или при длительных временах диализа.

Объем белковых растворов при постановке их на кристаллизацию в ячейках, изображенных на рис. 1а, составляет 40—80 мкл. При необходимости увеличить его в несколько раз мы использовали шланг А как внутренний, подобрав наружный полиэтиленовый шланг так, чтобы шланг А плотно входил в него, зажимая мембрану.

Для уменьшения объема кристаллизуемого белкового раствора до нескольких микролитров Заппезауэр предложил использовать рентгеновские капилляры и слой полиакриламидного геля вместо диализной мембраны [9], а Вебер и Гудкин применяли толстостенный стеклянный капилляр со сглаженным наружным краем и фиксировали диализную мембрану с помощью кольца из тигона или силиконовой резины [10]. Для уменьшения объема белковой пробы до 10—20 мкл мы разработали вариант диализной ячейки, изображенной на рис. 2. Принцип конструкции тот же, что и для

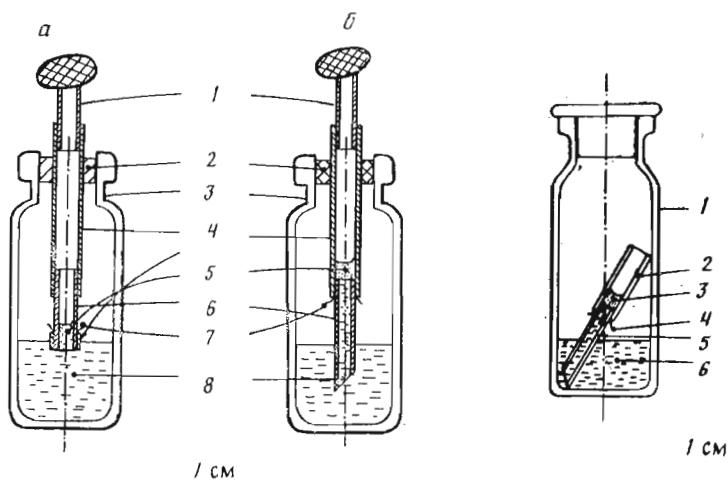


Рис. 1

Рис. 2

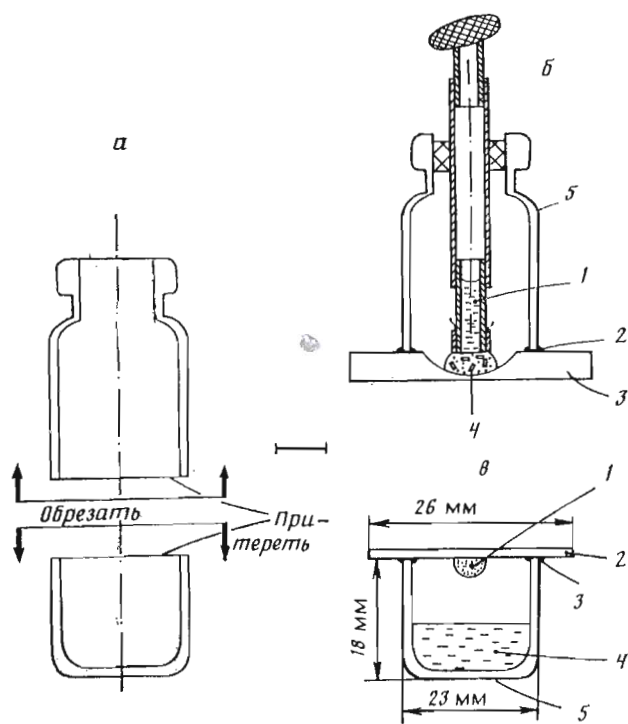


Рис. 3

Рис. 1. Микродализные ячейки для кристаллизации белков: *а* — стандартный вариант на объем пробы 40–80 мкл; *б* — конструкция, предусматривающая замедление процесса кристаллизации за счет увеличения длины трубки Б: 1 — пробки, сделанные из полиэтиленовой трубки Б, 2 — прокладки из силиконового шланга, 3 — ячейка противораствора, 4 — полиэтиленовая трубка А, 5 — белковый раствор, 6 — полиэтиленовая трубка Б, 7 — диализная мембрана, 8 — раствор осадителя (противораствор)

Рис. 2. Микродализная ячейка на объем пробы 10–20 мкл: 1 — пузырек из-под реактивов, 2 — полиэтиленовая трубка, 3 — раствор белка (10–20 мкл), 4 — диализная мембрана, 5 — полипропиленовая трубка, 6 — противораствор

Рис. 3. Схема изготовления из пенициллинового пузырька (*а*) микродализной ячейки для работы по поиску изоморфных кристаллических производных (*б*) и ячейки для кристаллизации макромолекул методом «висящей капли» (*в*). *б*: 1 — раствор тяжелоатомного соединения, 2 — вакуумная смазка, 3 — стекло с лункой, 4 — белковые кристаллы в маточном растворе, 5 — верхняя часть пенициллинового пузырька. *в*: 1 — раствор рибосом (5–15 мкл), 2 — покровное стеклышко, 3 — вакуумная смазка, 4 — противораствор, 5 — нижняя часть пенициллинового пузырька

Кристаллографические параметры белков

Белок	Актиноксантин	Лейцинспецифичный белок	Гистидинсвязывающий белок	D,D-Карбоксисукцинатаза	Нейротоксин I
Источник	<i>Actinomyces globisporus</i>	Периплазматическое пространство			Яд кобры
		<i>Escherichia coli</i> K 12			
Молекулярная масса	10 300	37 500	25 000	23 000	7800
Пространственная группа	$P2_12_12_1$	$P2_12_12_1$	$I4_122$	$P2_1$	$P2_12_12_1$
Параметры элементарной ячейки, Å					
<i>a</i>	30,90	68,8	119,1	40,7	25,17
<i>b</i>	48,75	69,4	119,1	42,0	75,38
<i>c</i>	64,06	74,2	151,8	66,8	35,70
β, град	—	—	—	117,7	—
<i>V</i> , Å ³	96 400	353 300	2,15 · 10 ⁶	101 200	67 700
Число молекул на элементарную ячейку (<i>Z</i>)	4	4	32	2	4
Параметр заполнения ячейки <i>V_m</i> , Å ³ /Да	2,34	2,36	2,7	2,20	2,17
Объемное содержание растворителя в кристалле	0,50	0,49	0,55	0,44	0,43

первых двух вариантов. В качестве внутренней трубки в ячейке используется полипропиленовая трубка, поскольку шланг из полиэтилена с тем же наружным диаметром (2,5—3 мм) не обладает достаточной жесткостью при сборке ячеек. Источником полипропиленовых трубок служили использованные стержни для шариковых ручек. Для удаления остатков пасты стержни промывали уксусом при помощи водоструйного насоса.

В ряде случаев для увеличения размера белковых кристаллов необходимо замедлять скорость диффузии осадителя через диализную мембрану. Для этой цели хорошо подходят ячейки, показанные на рис. 1б и 2. Увеличивая высоту внутренней трубки и/или заполняя ее раствором осадителя с концентрацией меньшей, чем в противорастворе, можно подобрать оптимальные условия роста больших кристаллов.

Пузырьки из-под пенициллина удобны для изготовления других приспособлений (рис. 3), хорошо зарекомендовавших себя при работе с белковыми кристаллами. Получение изоморфных производных путем добавления солей тяжелых атомов к раствору, в котором хранятся выбранные для этой цели кристаллы, часто приводит к разрушению белковых кристаллов, появлению на них трещин, сколов, сильно уменьшает их механическую стабильность. Постепенное введение тяжелоатомной соли путем диффузии ее через диализную мембрану мягче действует на кристаллы. Этот метод реализован в конструкции, представленной на рис. 3б. Верхняя обрезанная часть пузырька из-под пенициллина опирается шлифованным краем на поверхность стекла, в центре которого в лунке помещены кристаллы. Место контакта герметизируется с помощью вакуумной смазки. Внутренняя полиэтиленовая часть конструкции аналогична изображенной на рис. 1а.

Следует отметить, что «обратное» по сравнению с рис. 1 и 2 положение кристаллов по отношению к диализной мембране (т. е. диффузия идет из верхнего раствора в нижний) продиктовано особенностями введения тяжелоатомных ионов в маточный раствор. Зачастую добавление тяжелоатомных солей ведет к выпадению осадка либо низкомолекулярной, либо белковой природы, что может замедлять или прекращать диффузию через мембрану при использовании «прямого» метода диализа.

Нижняя часть обрезанного пенициллинового пузырька используется для кристаллизации макромолекул методом «висящей капли» [1] (рис. 3в). Стеклышки, на которые помещается белковая проба, изготовлены из предметных стекол для микроскопии, разрезанных поперек на три равные ча-

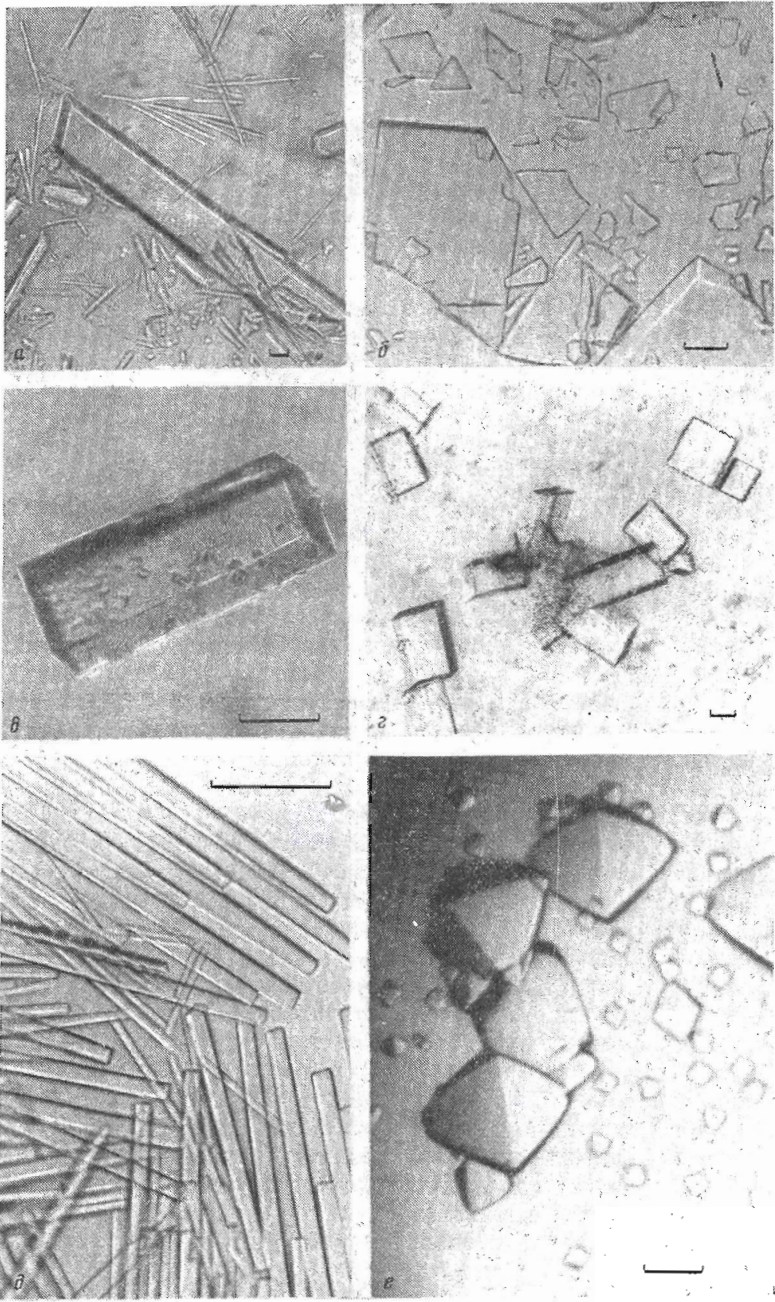


Рис. 4. Микрофотографии кристаллов белков и рибосомных частиц, выращенных методом микродиализа: актинородина из *Actinomyces globisporus* (а); нейротоксина I из яда среднеазиатской кобры *Naja naja oxiana* (б); лейцинспецифичного белка из *Escherichia coli* (в); *D,D*-карбоксипептидазы из периплазмы *E. coli* (г); малой (30S) рибосомной субчастицы из *Thermus thermophilus* (д); рибосом из *T. thermophilus* (е).
 Черта на микрофотографиях соответствует 0,1 мкм

сти. Высота ячейки составляет 15–20 мм, объем противораствора 1–2 мл при объеме белковой пробы 5–15 мкл.

Используя микродиализные ячейки, описанные в статье, мы получили кристаллы ряда белков (рис. 4), пять из которых по размерам и качеству кристаллов подходят для рентгеноструктурного анализа. Их кристаллографические параметры приведены в таблице. Рентгеноструктурное исследование актиноксантина из *Actinomyces globisporus* завершилось установлением его пространственной структуры с разрешением 2 Å [15]. Трехмерная структура лейциноспецифичного белка из *Escherichia coli* определена с разрешением 2,4 Å [16]. В процессе расшифровки находится пространственная структура *D,D*-карбоксинептидазы *E. coli* [17]. Набор экспериментальных данных снят при разрешении 2,5 Å с нативных кристаллов и при разрешении 3–3,5 Å с нескольких изоморфных производных, что дает основание в ближайшее время ожидать проведения хода полипептидной цепи молекулы фермента.

Особый интерес вызывает исследование пространственной кристаллической структуры рибосом [18] и малых рибосомных субчастиц [18, 19] из экстремально термофильного микроорганизма *Thermus thermophilus*. В настоящее время показано, что кристаллы рибосом (рис. 4е) вполне подходят для систематической рентгеноструктурной работы, и начат набор экспериментальных данных с использованием высокоинтенсивного синхротронного излучения.

Экспериментальная часть

В работе использовали диализную пленку Visking Dialysis Tubing 8/32 (Serva, ФРГ) толщиной 50 мкм. Для удаления следов двухвалентных металлов пленку промывали 10 мин при кипячении в растворе, содержащем 0,05% додецилсульфата натрия и 0,1% EDTA. Отмывку от додецилсульфата натрия и EDTA проводили 5–6 раз в дистиллированной воде при кипячении.

Для кристаллизации нейротоксина I (*M* 7800 Да) применяли диализные мембраны Spectra/Por 3 фирмы Spectrum Medical Industries (США), по рекомендации которой мембраны перед использованием тщательно промывали дистиллированной водой.

С целью регистрации образовавшихся кристаллов белковые пробы анализировали под микроскопом Technival (Karl Zeiss, Jena, ГДР) или МПС-1 непосредственно в диализных ячейках (для вариантов 1а и 1б, см. рис. 1) без извлечения их содержимого.

Для сборки диализных ячеек диализную пленку нарезают квадратиками 8×8 мм, наружное кольцо из полиэтиленовой трубки Б (рис. 1а) помещали на гладкую поверхность и сверху пинцетом накладывали квадратик диализной мембраны. Кусок полиэтиленовой трубки А с нажимом вставляли в наружное полиэтиленовое кольцо до упора так, чтобы мембрана оказалась фиксированной между трубками А и Б. Изготовленные диализные ячейки хранили в 20% этаноле при 4° С до использования.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. McPherson A. Preparation and analysis of protein crystals. N. Y.: John Wiley and Sons, 1982. P. 371.
2. Davies D. R., Segal D. M. // Meth. Enzymol. 1971. V. 22. P. 266–269.
3. Salemme F. R. // Arch. Biochem. and Biophys. 1972. V. 151. № 2. P. 533–539.
4. Мелик-Адамян В. Р., Жиляева Т. И. // Молекулярн. биология. Т. 2. М.: Изд-во ВНИИТ АН СССР. 1973. С. 7–54.
5. McPherson A. // Meth. Biochem. Analysis. 1976. V. 23. P. 249–345.
6. Бланделл Т., Джонсон Л. Кристаллография белка. М.: Мир, 1979. С. 69–121.
7. Гарбер М. Б. // Успехи соврем. биол. 1978. Т. 86. Вып. 6. С. 432–446.
8. Zeppezauer M., Eklund H., Zeppezauer E. S. // Arch. Biochem. and Biophys. 1968. V. 126. № 2. P. 564–573.
9. Zeppezauer M. // Meth. Enzymol. 1971. V. 22. P. 253–269.
10. Weber B. H., Goodkin P. E. // Arch. Biochem. and Biophys. 1970. V. 141. № 3. P. 489–498.
11. Lagerkvist U., Rymo L., Linquist O., Anderson E. // J. Biol. Chem. 1972. V. 247. № 12. P. 3897–3899.
12. Chotia C., Lenzinger W. // J. Mol. Biol. 1975. V. 97. № 1. P. 55–60.

13. Dattagupta J. K., Fujiwara T., Grishin E. V., Lindner K., Manor P. C., Pieniazek N. J., Saenger W., Suck D. // *J. Mol. Biol.* 1975. V. 97. № 2. P. 267–271.
14. Pronk S. E., Hofstra H., Groendijk H., Kingma J., Swarte M. B. A., Dorner F., Drenth J., Hol W. G. J., Witholt B. // *J. Biol. Chem.* 1985. V. 260. № 25. P. 13580–13584.
15. Kuzin A. P., Trakhanov S. D., Pletnev V. Z. // *Chemistry of Peptides and Proteins*. V. 2./Eds Voelter W., Bayer E., Ovchinnikov Y. A., Wunsch E. Berlin – N. Y.: Walter de Gruyter and Co., 1984. P. 209–213.
16. Sack J. S., Trakhanov S. D., Tsigannik I. N., Quioco F. A. // *J. Mol. Biol.* 1989. In Press.
17. Траханов С. Д., Юркова Е. В. // *Кристаллография*. 1988. Т. 33. № 4. С. 854–856.
18. Trakhanov S. D., Yusupov M. M., Agalarov S. S., Garber M. B., Ryazantsev S. N., Tischenko S. V., Shirokov V. A. // *FEBS Lett.* 1987. V. 220. № 2. P. 319–322.
19. Юсупов М. М., Траханов С. Д., Барынин В. В., Боровягин В. Л., Гарбер М. Б., Седельникова С. Э., Селиванова О. М., Тищенко С. В., Широков В. А., Единцов Ю. Н. // *Докл. АН СССР*. 1987. Т. 292. № 5. С. 1271–1274.

Поступила в редакцию
26.X.1988

MODIFICATIONS OF THE MICRODIALYSIS METHOD FOR CRYSTALLIZATION OF PROTEINS

TRAKHANOV S. D.

*Institute of Crystallography, Academy of Sciences of the USSR,
Moscow*

Several variants of microdialysis cells have been developed for growing protein crystals suitable for X-ray analysis. The cells have simple construction and are made of easily available materials. Using these cells, over ten proteins have been crystallized, six of them in the form suitable for 3D-structure determination.