

МЕТОД ТРИТИЕВОГО ЗОНДА В ИССЛЕДОВАНИИ АДСОРБЦИОННЫХ СЛОЕВ ЛИЗОЦИМА НА ПОВЕРХНОСТИ ДЕТОНАЦИОННЫХ НАНОАЛМАЗОВ

© 2021 г. М. Г. Чернышева^{а,*}, Г. А. Бадун^а, А. В. Синолиц^а, А. В. Егоров^а, Т. Б. Егорова^а,
А. Г. Попов^а, А. Л. Ксенофонтов^б

^а Химический факультет Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова,
119991, Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 3

^б Институт физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского Московского государственного университета
им. М.В. Ломоносова, 119234, Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 40

*e-mail: chernysheva@radio.chem.msu.ru

Получена 10.10.2019, после доработки 06.11.2019, принята к публикации 13.11.2019

С помощью меченного тритием лизоцима определена его адсорбция на поверхности наноалмазов детонационного синтеза. Обнаружено, что количество адсорбированного белка зависит от заряда поверхности наноалмазов. На исходных положительно заряженных наноалмазах образуется монослойное покрытие, а на отрицательно заряженных наноалмазах, полученных из исходных в результате отжига на воздухе, адсорбция возрастала в 4–5 раз. По данным ИК спектроскопии, в результате адсорбции лизоцима уменьшается количество петель и поворотов в структуре белка при адсорбции на двух типах наноалмазов. С помощью тритиевого зонда не обнаружено существенной разницы в структуре молекулы белка при адсорбции на наноалмазах с разным функциональным составом поверхности, и ориентация молекул в поверхностном слое оказалась одинаковой: участки белка, содержащие аминокислотные остатки фенилаланина, контактируют с сорбентом, а аминокислотные остатки пролина, входящие в состав петель, находятся на поверхности адсорбционного слоя.

Ключевые слова: тритиевый зонд, лизоцим, наноалмазы, адсорбция.

DOI: 10.31857/S0033831121020118

ВВЕДЕНИЕ

Обработка атомарным тритием органических мишеней сложного состава с последующим анализом распределения трития по компонентам мишени является информативным методом для определения структуры белковой оболочки вирусов [1, 2], структурной организации молекул в адсорбционных слоях на границе раздела водный раствор–воздух [3, 4]. В данной работе такой подход впервые применен для анализа структуры белка в адсорбционном слое, образовавшемся на межфазной границе водный раствор–твердое тело.

В качестве твердой подложки использовали наноалмазы детонационного синтеза (ДНА). Отметим, что в настоящее время ДНА активно используются в научных исследованиях, поскольку их уникальные свойства, такие как наличие алмазного ядра размером 4–6 нм и высокая удельная поверхность с большим количеством различных функциональных групп, открывают перспективы использования этого материала в различных сферах, включая косметологию и медицину [5–9]. Поэтому изучение взаимодействия белков с наноалмазами и строения образующихся адсорбционных слоев является актуальной научной задачей. Обра-

зование белковой «короны» на поверхности ДНА определяется рядом факторов, такими как набор функциональных групп на поверхности, размер частиц ДНА в суспензии, их поверхностный заряд, заряд белковой глобулы, а также рН и ионная сила среды. В ряде работ показано, что образование адсорбционных комплексов между белком и поверхностью ДНА в случаях одноименно заряженных сорбента и сорбата, а также для случая нейтрально заряженного ДНА происходит преимущественно за счет гидрофобных взаимодействий [10, 11]. Наряду с этим существуют работы, в которых сказано об электростатическом механизме образования адсорбционного комплекса белок–наноалмаз [12, 13].

Таким образом, несмотря на интерес к ДНА и, в частности, к его биологическому применению, ряд вопросов, касающихся взаимодействия ДНА с белками, до сих пор неясен. В работе использовали лизоцим куриного яйца, поскольку данный белок мало подвержен денатурации при адсорбции [13, 14] и хорошо изучен, в том числе с помощью тритиевого зонда, в составе адсорбционных слоев, образованных на границе раздела фаз водный раствор–воздух [3, 4, 15]. Белок в водных растворах при нейтральных значениях рН имеет положительный заряд. Целью настоящего исследования было выявить влияние поверхностного заряда алмазных наночастиц на адсорбцию лизоцима и специфику организации получаемых адсорбционных слоев.

Таблица 1. Характеристики наноалмазов

Наноалмаз	Удельная поверхность по БЭТ, м ² /г	Основные полосы в ИК спектре	Отнесение ИК полос, по данным работы [19]	ζ-Потенциал в воде, мВ
Aldrich	280	Широкая полоса 3400 2800–2900 1730 1630 1100	ОН-группы воды СН ₂ - и СН ₃ -группы С=О карбонил Вода С–О–С	37 ± 5
PlasmaChem	250	Широкая полоса 3400 2800–2900 1795 слабый сигнал 1723 1631 1452 1319 1117 1063	ОН-группы воды СН ₂ - и СН ₃ -группы С=О лактон С=О карбонил Вода СН _x асимметрические С=О депротонированный карбоксил С–О–С С–О гидроксил	21 ± 3
AdamasNano	270	Широкая полоса 3400 2800–2900 1723 1631 1319 1117	ОН-группы воды СН ₂ - и СН ₃ -группы С=О карбонил Вода С=О депротонированный карбоксил С–О–С	27 ± 3
Aldrich подвергнутые отжигу на воздухе	280	Широкая полоса 3400 2800–2900 1790 1630 слабый сигнал 1269 1112	ОН-группы воды СН ₂ - и СН ₃ -группы С=О лактон Вода С–О эфир, эпоксигруппа С–О–С	–46 ± 4

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали лизоцим куриного яйца (MP Biomedicals). Тритиевую метку в лизоцим для исследования его адсорбции на наноалмазах вводили с помощью метода термической активации трития [16]. Для удаления трития из лабильных положений молекулы использовали диализ через мембраны с диаметром пор 12 кДа против фосфатного буферного раствора (0.018 М, рН 7.3 ± 0.1). [³H]Лизоцим выделяли методом эксклюзионной хроматографии с использованием ВЭЖХ системы Waters (Breeze) на колонке Suerdex200 Increase 10/300 GL (GE Healthcare), в качестве подвижной фазы использовали фосфатно-солевой буфер (рН 7.3 ± 0.1). Детектирование проводили по УФ поглощению при длине волны 280 нм, радиоактивность элюата измеряли с помощью жидкостного сцинтилляционного спектрометра RackBeta 1215. Очищенный [³H]лизоцим обладал удельной радиоактивностью 1 Ки/г.

Порошки наноалмазов производства компаний Aldrich, PlasmaChem (Германия), AdamasNano (США) использовали как без дополнительной обработки, так и после отжига на воздухе при 450°C в течение 1 ч [17]. Наноалмазы характеризовали с помощью просвечивающей электронной микроскопии и ИК спектроскопии, удельную поверхность определяли методом низкотемпературной адсорбции азота. Методики характеристики наноалмазов были описаны ранее [17, 18]. Основные характеристики использованных наноалмазов приведены в табл. 1.

Порошки ДНА суспензировали в воде по разработанной ранее методике [18]. Суспензии характе-

ризовали с помощью метода динамического светорассеяния и определяли распределение частиц по размеру и распределение электрокинетического потенциала.

Адсорбция лизоцима на наноалмазах. К суспензии ДНА, содержащей 1 мг твердой фазы, добавляли раствор меченного тритием лизоцима до конечной удельной радиоактивности 1.5 мКи/л и концентрации от 0.4 до 4 г/л раствора. Суспензии инкубировали в течение 48 ч, затем осаждали центрифугированием и измеряли активность надосадочного раствора. Осадок декантировали, промывали водой, суспендировали в сцинтилляционной жидкости Ultima Gold (Perkin Elmer) и измеряли активность [17, 18]. Значения равновесной концентрации лизоцима и его количество на ДНА рассчитывали по уравнениям (1) и (2) соответственно:

$$c = \frac{I_1}{\varepsilon \cdot V \cdot a_{уд}}, \quad (1)$$

$$\Gamma = \frac{I_2 - I_{фон}}{\varepsilon \cdot a_{уд} \cdot m_{ДНА}}, \quad (2)$$

где I_1 и I_2 – скорость счета надосадочного раствора и осадка ДНА соответственно, V – объем аликвоты надосадочного раствора, ε – эффективность регистрации β -излучения трития, $a_{уд}$ – молярная радиоактивность лизоцима, $m_{ДНА}$ – масса наноалмаза.

Определение структуры лизоцима на поверхности наноалмаза. По описанной выше методике получали адсорбционные комплексы ДНА–лизоцим, которые затем суспензировали в воде, наносили на стенки реакционного сосуда, замораживали жидким азотом и высушивали с помощью лиофилизации. Сосуд с готовой мишенью присоединяли к системе для работы с газообразным тритием,

Таблица 2. Значения параметров адсорбции в уравнении, аналогичном уравнению Ленгмюра, для необратимой адсорбции лизоцима на наноалмазах

Наноалмаз	Максимальная адсорбция (Γ_{max}), мг/г	Константа адсорбции в уравнении Ленгмюра (A), л/г	R^2
Aldrich	452 ± 54	1.0 ± 0.4	0.934
PlasmaChem	321 ± 26	0.4 ± 0.1	0.981
AdamasNano	364 ± 32	0.4 ± 0.1	0.974
Aldrich, подвергнутые отжигу на воздухе	2060 ± 109	0.8 ± 0.1	0.992

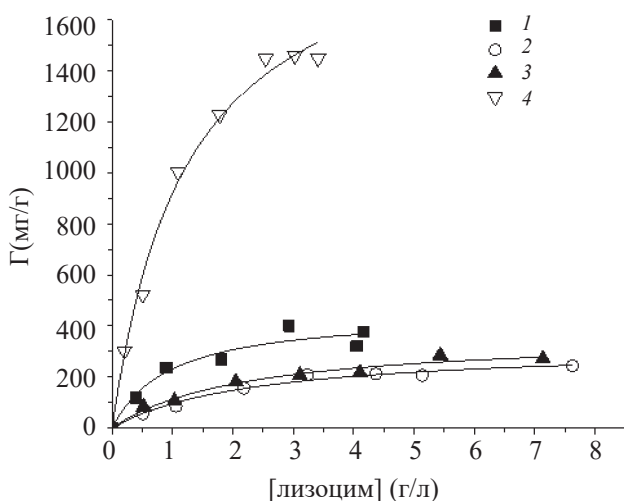


Рис. 1. Зависимость удельного содержания лизоцима в комплексе с ДНК от его равновесной концентрации в водном растворе. Нанодиазмы Aldrich (1), PlasmaChem (2), AdamasNano (3) и Aldrich, подвергнутое отжигу на воздухе (4).

вакуумировали и обрабатывали атомами трития в следующих условиях: температура стенок реактора 25°C, температура атомизатора 1850 К, время обработки 10 с, давление трития 1 Па [16, 20]. После реакции мишень суспендировали в воде, выдерживали несколько часов и воду отгоняли на роторном испарителе для удаления обменного трития. Затем твердую фазу суспендировали в гидролизной смеси, состоящей из смеси соляной и трифторуксусной кислот в объемном соотношении 2 : 1 и содержащей 0.001% β-меркаптоэтанола. Полученную смесь переносили в стеклянную ампулу, запаивали и нагревали до 155°C в течение 1 ч. Отделяли раствор от осадка, дважды лиофилизывали, а лиофилизат растворяли в 0.1 н. HCl. Аминокислотный анализ проводили на анализаторе Amino Acid Analyzer Hitachi L-8800 с определением количества аминокислот [21] и их активности с помощью проточного счетчика Radiomatic 150TR Flow Scintillation Analyzer (Packard Instrument Co., США).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Меченный тритием лизоцим использовали для получения изотерм адсорбции белка на поверхности нанодиазмов. Отметим, что адсорбция лизоцима на ДНК, не подвергнутого окислению, мало изменяла концентрацию белка в растворе, и ее определение с приемлемой точностью по изменению активности

раствора или с помощью спектрофотометрии оказалось невозможным. Поэтому в работе определяли только связывание лизоцима с ДНК, который не удаляется при промывке осадка водой в течение 1–2 ч. Данные представлены на рис. 1.

Зависимости удельного содержания лизоцима в комплексе с ДНК от его объемной концентрации были описаны уравнением, аналогичным уравнению Ленгмюра:

$$\Gamma = \Gamma_{\max} \frac{cA}{1 + cA}$$

Здесь c – концентрация вещества в растворе, Γ и Γ_{\max} – адсорбция при концентрации c и максимальная адсорбция соответственно, A – константа.

Рассчитанные параметры приведены в табл. 2, а результат аппроксимации показан сплошной линией на рис. 1.

Для всех исходных нанодиазмов адсорбция лизоцима была близка, однако после отжига на воздухе у ДНК Aldrich изменялся электрокинетический потенциал в воде с положительного на отрицательный (табл. 1), что увеличивало адсорбцию лизоцима в 4.5 раза.

Для оценки величины удельного покрытия частиц нанодиаза белком надо принимать во внимание структуру агрегатов, существующих в водном растворе [22]. По данным метода динамического светорассеяния, в водном растворе средний диаметр наночастиц составляет 150 ± 30 нм, и они состоят из алмазных зерен диаметром 5 нм. По данным БЭТ, средний диаметр пор исходного нанодиаза Aldrich составляет 10 нм, а отожженного – 11 нм, так как отжиг приводит к деагломерации нанодиазмов [23]. Для двух типов нанодиаза основная часть пор имеет диаметр более 20 нм и доступна для адсорбции лизоцима, размер глобулы которого $3 \times 3 \times 4.5$ нм. Известно, что при плотной упаковке и вертикальной ориентации молекул (большая ось молекулы перпендикулярна поверхности) лизоцим занимает на поверхности 9.0 нм^2 , а при горизонтальной ориентации – 13.5 нм^2 [24]. Тогда удельное покрытие поверхности при максимальной адсорбции на исходном нанодиазе 450 мг/г составит 1.5 мг/м^2 , и на одну молекулу будет приходиться 16 нм^2 . Можно предположить, что при адсорбции лизоцима на исходных ДНК образуется адсорбционный слой с плотной упаковкой и ориентацией молекул параллельно поверхности.

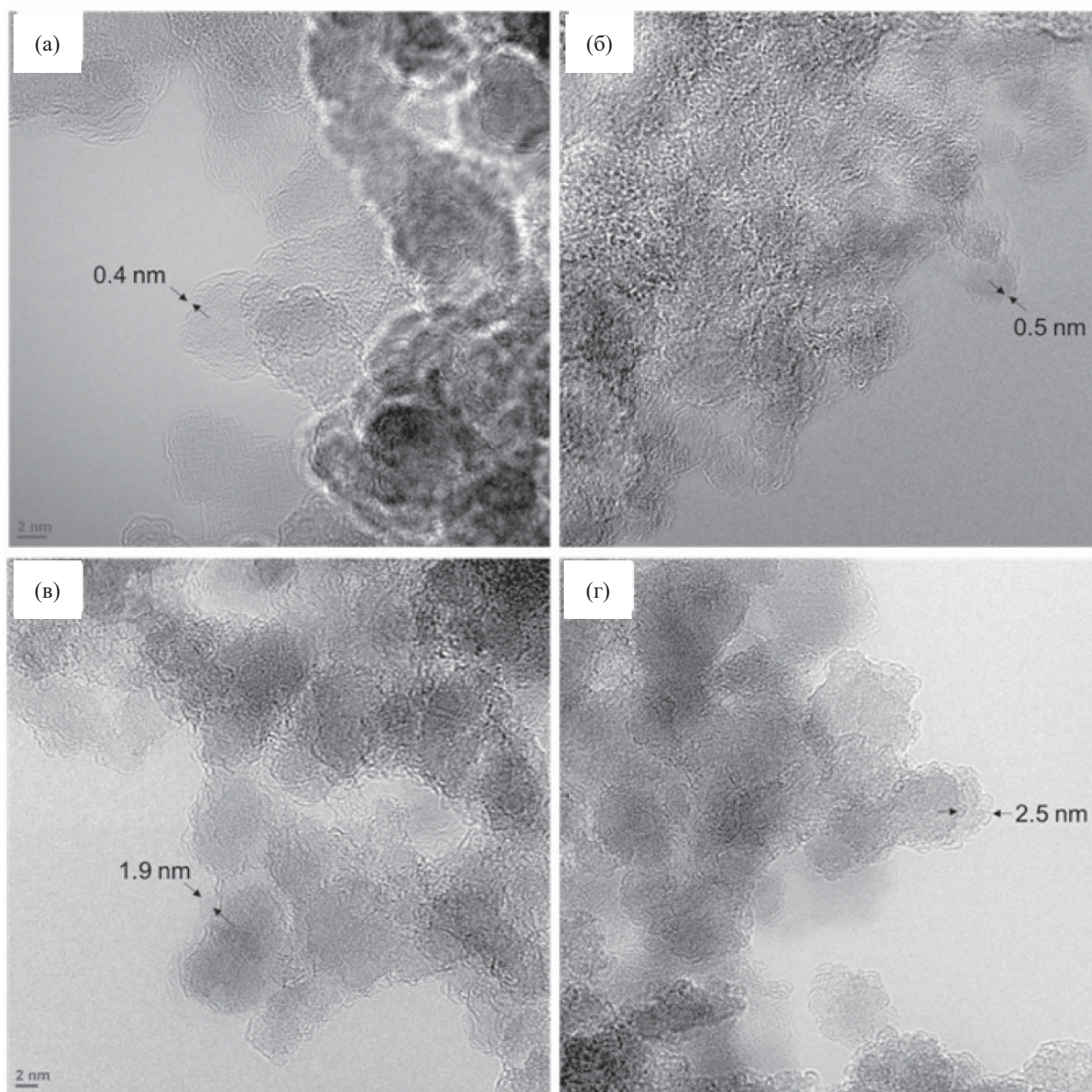


Рис. 2. ПЭМ изображения наноалмазов и комплексов наноалмаз-лизоцим. (а) наноалмаз (Aldrich); (б) наноалмаз (Aldrich) подвергнутый отжигу; (в) ДНА-лизоцим; (г) ДНА (отожженный)-лизоцим.

На отожженном наноалмазе Aldrich при максимальной адсорбции 2060 мг/г удельное покрытие достигает 7.1 мг/м², что соответствует образованию полислоев. Действительно, «корона» белка на отожженном на воздухе наноалмазе обнаружена с помощью просвечивающей электронной микроскопии (рис. 2).

Изменения структуры лизоцима при его адсорбции на поверхности наноамазов можно оценить из ИК спектра (рис. 3).

Полосы в ИК спектрах при 1662 и 1527 см⁻¹ соответствуют колебаниям связей амид I и амид II соответственно [25–27]. Полоса при 1662 см⁻¹ чувствительна к изменениям вторичной структуры,

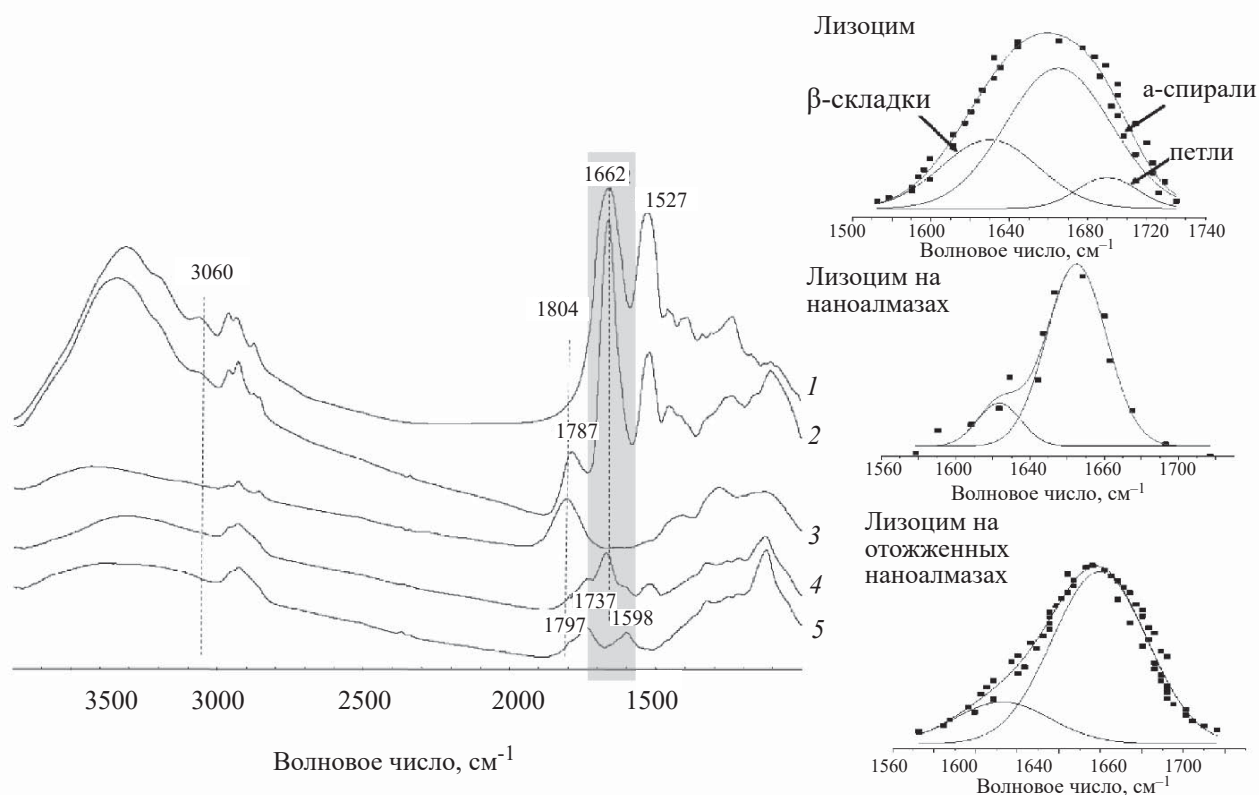


Рис. 3. ИК-спектры лизоцима (1) и его адсорбционных комплексов с нанодиамазами: (2) лизоцим – отожженный нанодиамаз, (3) отожженный нанодиамаз, (4) лизоцим – нанодиамаз, (5) нанодиамаз. Справа приведено разложение полосы при 1662 см^{-1} на компоненты, отвечающие определенным структурным элементам белка.

поэтому этот сигнал можно разложить на компоненты, отвечающие тем или иным структурным элементам белка [26, 28]. Наши результаты свидетельствуют об изменениях в структуре белка, когда он адсорбируется как на положительных, так и на отрицательных ДНА: адсорбция на обоих типах поверхностей приводит к изменению конформации петель. Кроме того, сдвиг полосы при 1804 см^{-1} отожженных ДНА до 1787 см^{-1} после адсорбции лизоцима указывает на взаимодействие поверхностных карбоксильных групп с положительно заряженными сайтами белка.

Для определения ориентации белка на поверхности нанодиамазов адсорбционные комплексы лизоцим–нанодиамаз и лизоцим–отожженный нанодиамаз подвергли обработке атомами трития и провели анализ распределения трития по аминокислотам после тотального гидролиза белка (рис. 4).

Распределение трития по типам аминокислотных остатков для исходного и отожженного нано-

алмаза оказалось сходным, что позволяет предположить отсутствие принципиальной разницы в структурной организации адсорбционных слоев. Информацию об ориентации молекулы относительно поверхности можно получить, анализируя отношение молярных активностей фенилаланина и пролина, которые располагаются на разных участках глобулы [рис. 4, (б)] [15]. Для поверхностей обоих типов удельная активность фенилаланина была пренебрежимо мала по сравнению с активностью пролина. Аминокислотные остатки пролина входят в состав петель, структура которых из данных, полученных методом ИК спектроскопии, меняется при адсорбции на алмазной поверхности (рис. 4). Можно предположить, что молекулы белка взаимодействуют с нанодиамазами участками, содержащими фенилаланин, а аминокислотные остатки пролина, входящие в состав петель, остаются на поверхности адсорбционного слоя.

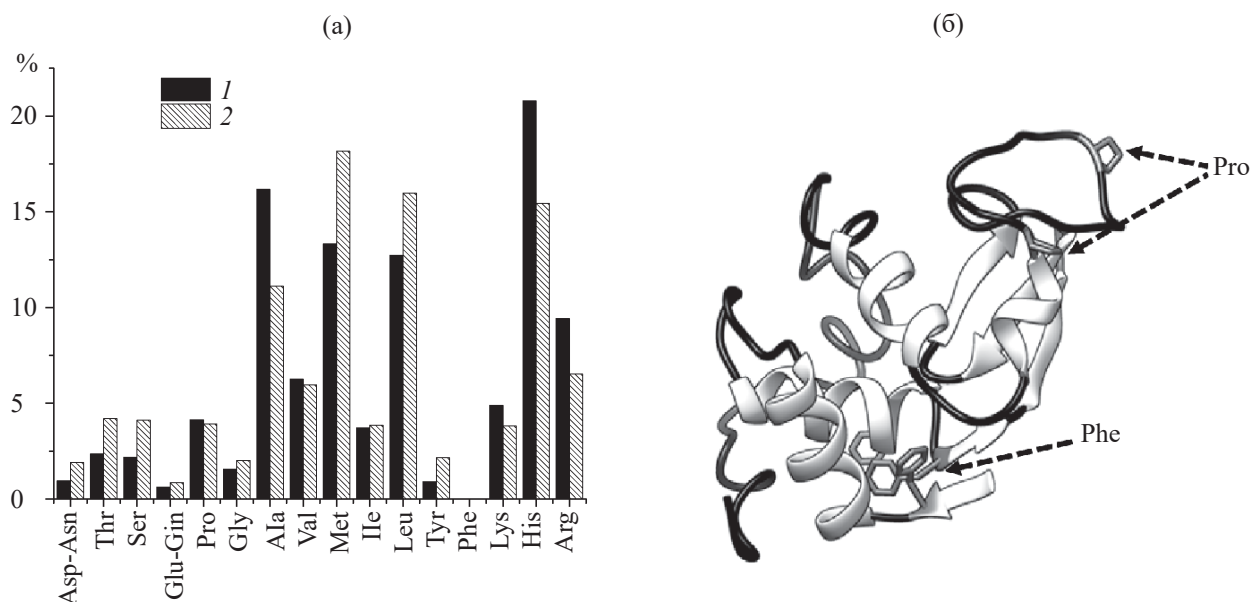


Рис. 4. Распределение радиоактивности трития, нормированное на радиоактивность белка, в аминокислотных остатках лизоцима при реакции с адсорбционными комплексами лизоцима на исходном (1) и отожженном (2) наноалмазах (а). Структура лизоцима (PDB 6LYZ), в которой выделены аминокислотные остатки фенилаланина (Phe) и пролина (Pro), а также черным цветом отмечены петли (б).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Исследование с применением меченных тритием соединений как радиоактивных индикаторов с целью определения состава комплекса лизоцим–ДНА и с обработкой атомным тритием комплексов с целью получения информации об их структурной организации показало, что устойчивый комплекс лизоцим–ДНА образуется даже на положительно заряженных частицах ДНА. При этом происходит образование плотного адсорбционного слоя, заполняющего как внешнюю поверхность, так и внутренние поры частиц. При использовании отожженных на воздухе частиц ДНА связывание лизоцима увеличивалось до образования полислоев белка на поверхности частиц. Вместе с тем расположение молекул лизоцима в слое не зависело от заряда частиц с преимущественной ориентацией каталитическим центром фермента наружу. Полученный результат стимулирует изучение ферментативной активности лизоцима в составе рассматриваемого комплекса, что поможет выявить некоторые особенности поведения наночастиц в живых орга-

низмах и откроет новые перспективы их применения в медицине.

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 17-03-00985-а, 18-33-20147-мол-а-вед).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Nemykh M.A. et al. // *Virology*. 2008. Vol. 373, N 1. P. 61–71.
2. Ksenofontov A.L. et al. // *PLoS One* 2019. Vol. 14, N 5. P. e0216905.
3. Chernysheva M.G. et al. // *Colloids Surf. A: Physicochem. Eng. Asp.* 2018. Vol. 537. P. 351–360.
4. Lukashina E.V., Badun G.A., Chulichkov A.L. // *Biomol. Eng.* 2007. Vol. 24, N 1 Spec. issue. P. 125–129.
5. Schrand A.M. et al. // *J. Phys. Chem. B*. 2007. Vol. 111, N 1. P. 2–7.

6. Wehling J. *et al.* // ACS Nano. 2014. Vol. 8, N 6. P. 6475–6483.
7. Schrand A.M., Hens S.A.C.C., Shenderova O.A. // Crit. Rev. Solid State Mater. Sci. 2009. Vol. 34, N 1–2. P. 18–74.
8. Долматов В.Ю. и др. // ФТТ. 2004. Т. 46, № 4. С. 596–600.
9. Яковлев Р.Ю. и др. // Рос. хим. журн. 2012. Т. 56, № 3–4. С. 114–125.
10. Wang H.D. *et al.* // Nanotechnology. 2011. Vol. 22, N 14. P. 145703.
11. Eldawud R. *et al.* // Nanotechnology. 2016. Vol. 27, N 8. P. 085107.
12. Huang L.-C.L.C.L., Chang H.-C.C. // Langmuir. 2004. Vol. 20, N 14. P. 5879–5884.
13. Aramesh M. *et al.* // Nanoscale. 2015. Vol. 7, N 13. P. 5726–5736.
14. Nepal D., Geckeler K.E. // Small. 2006. Vol. 2, N 3. P. 406–412.
15. Chernysheva M.G. *et al.* // Colloids Surf. A: Physicochem. Eng. Asp. 2017. Vol. 520. P. 1–8.
16. Badun G.A., Chernysheva M.G., Ksenofontov A.L. // Radiochim. Acta. 2012. Vol. 100, N 6. P. 401–408.
17. Chernysheva M.G. *et al.* // Colloids Surf. A: Physicochem. Eng. Asp. 2019. Vol. 565. P. 25–29.
18. Chernysheva M.G., Myasnikov I.Y., Badun G.A. // Diam. Relat. Mater. 2015. Vol. 55. P. 45–51.
19. Petit T., Puskar L. // Diam. Relat. Mater. 2018. Vol. 89. P. 52–66.
20. Badun G.A. *et al.* // Radiochim. Acta. 2014. Vol. 102, N 10. P. 941–946.
21. Лукашина Е.В. и др. // Радиохимия. 2002. Т. 44, № 1. С. 78–82.
22. Wang H.-D. *et al.* // Nanotechnology. 2011. Vol. 22, N 14. P. 145703.
23. Dideikin A.T. *et al.* // Carbon. 2017. Vol. 122. P. 37–745.
24. Lu J.R., Su T.J., Howlin B.J. // J. Phys. Chem. B. 1999. Vol. 103, N 28. P. 5903–5909.
25. Boyaci I.H. *et al.* // RSC Adv. 2015. Vol. 5, N 70. P. 56606–56624.
26. Miller L.M., Bourassa M.W., Smith R.J. // // Biochim. Biophys. Acta - Biomembr. Elsevier B.V., 2013. Vol. 1828, N 10. P. 2339–2346.
27. Yeung P.S.W., Eskici G., Axelsen P.H. // Biochim. Biophys. Acta–Biomembr. 2013. Vol. 1828, N 10. P. 2314–2318.
28. Kretlow A. *et al.* // Biochim. Biophys. Acta–Biomembr. 2006. Vol. 1758, N 7. P. 948–959.