

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ**КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА МЕЧЕННЫХ FITC БЕЛКОВ ДЛЯ ИНТЕРАКТОМНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ МЕТОДАМИ КАПИЛЛЯРНОГО SDS ГЕЛЬ-ЭЛЕКТРОФОРЕЗА И SPR БИОСЕНСОРОМ**

П.В. Ершов, Л.А. Калужский, Е.О. Яблоков*, А.С. Иванов

Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича,
119121, Москва, ул. Погодинская, 10; *e-mail: evgeyablokov1988@mail.ru

Технология меченых красителем белков имеет очень много областей использования, в том числе и для интерактомных исследований. Целью данной работы была оценка применимости протокола меченя белков флуоресцеин изотиоционатом (изомер I, (FITC)) для белков с небольшой молекулярной массой (12–15 кДа) путем их ковалентной конъюгации с FITC, а также контроль качества включения метки в белок и сравнительная оценка его способности к белок-белковым взаимодействиям. На примере цитохрома *c* (12 кДа) было показано, что комбинированное использование методов традиционной спектрофотометрии, капиллярного гель-электрофореза и SPR-анализа позволяет сделать выводы о: а) сохранении способности меченого целевого белка взаимодействовать с белками-партнёрами и белковым материалом тканевых лизатов; б) факте включения метки в белок; в) качестве очистки финального белкового препарата от не прореагировавших с ним свободных молекул красителя.

Ключевые слова: поверхностный плазмонный резонанс (SPR); капиллярный гель-электрофорез; интерактомика; цитохром *c*; флуоресцентный краситель; FITC

DOI: 10.18097/BMCRM00112**ВВЕДЕНИЕ**

В нашей предыдущей работе [1] были выполнены эксперименты по SEC (Size Exclusion Chromatography)-профилированию тканевого лизата и, таким образом, стало возможным составить интерактомный «паспорт» для каждого идентифицированного белка в лизате. Было выявлено, что почти три четверти всех идентифицированных во фракциях белков находятся в виде гомо- и гетеродимерных комплексов и белковых комплексов более высокого порядка. Также в работах [2, 3] был продемонстрирован оригинальный способ диссоциации интактных белковых комплексов лизата, заключающийся в кратковременной кислотной обработке лизата с последующей нейтрализацией, для увеличения чувствительности и специфичности прямого молекулярного фишинга белковых партнеров целевого белка. Вместе с тем, остается пока неизвестным, насколько отличается обычный SEC профиль белков/белковых комплексов лизата от профиля ре-ассоциированных белков обработанного лизата. Представляется удобным использовать технологию меченых красителем белков для оценки количественных и качественных различий в распределении белковых комплексов по SEC фракциям (в интактном и обработанном лизате) для некоторых целевых гем-содержащих белков. Целью данной работы была проверка применимости стандартного протокола меченя флуоресцеин изотиоционатом (FITC) гем-содержащих белков (на примере цитохрома *c*, 12 кДа) небольшой молекулярной массы с мониторингом включения метки в белок, а так же сохранности способности меченой формы белка взаимодействовать с белками-партнёрами.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ*Реактивы и препараты*

Белковый препарат цитохрома *c* (CYTC, cytochrome c from equine heart) приобретали от фирмы «Sigma Aldrich» (США). Белковый препарат СХХС1 (фактор транскрипции СХХС1, содержащий домен «цинковые пальцы») был получен из Института биоорганической химии НАН Беларуси. Флуоресцеин изотиоционат FITC (изомер I) был получен от «Biotium» (США). Маточный раствор FITC готовили путем его растворения в безводном ДМСО до финальной концентрации 1 мг/мл. Образец ткани печени крысы был приобретен у «Innovative Research» (США).

Приготовление лизата ткани печени крысы осуществляли при помощи буферного раствора для экстракции белков CellLytic Mammalian Tissue Lysis/Extraction Reagent («Sigma Aldrich») с добавлением коктейля ингибиторов протеаз («Sigma Aldrich») по методике, описанной в работе [1]. Содержание общего белка в образцах тканевого лизата определяли по методу Бредфорда. Диссоциацию белковых комплексов тканевого лизата выполняли согласно протоколу [3].

Другие химические реактивы были аналитической чистоты и закупались от отечественных производителей.

Протокол конъюгации FITC и цитохрома c

Исходный препарат цитохрома *c* растворяли в 50 мМ боратном буфере (рН 9.0) до финальной концентрации 2 мг/мл. К 950 мкл раствора цитохрома *c* порциями по 10 мкл



медленно добавляли раствор FITC общим объемом 50 мкл при постоянном пипетировании. Далее инкубировали смесь в течение 12 ч в холодильной камере при 6–8°C в темноте. После этого для дезактивации непрореагировавшего с белком красителя к смеси добавляли раствор NH₄Cl до финальной концентрации 50 мМ и инкубировали в течение 2 ч при 4°C. Для смены буфера на гравитационных колонках PD-10 mini trap («GE Healthcare», США) инкубационную смесь переводили в PBS буфер, содержащий 10 мМ Na₂HPO₄, 1.8 мМ KH₂PO₄, 137 мМ NaCl, 2.7 мМ KCl (pH 7.4), тем самым удаляли не связавшийся с белком дезактивированный FITC. Отношение измеренного поглощения FITC_{495нм}/Белок_{280нм} составило в среднем 0.40±0.04 (n=5).

Капиллярный гель-электрофорез в присутствии SDS (SDS-CGE-UV)

Капиллярный гель-электрофорез был выполнен на оборудовании PA 800 Plus («Beckman Coulter», США), укомплектованным UV-источником с дейтериевой лампой и фотодиодным детектором PDA (Photo Diode Array Detector, «Beckman Coulter»), с использованием непокрытого кремниевого капилляра с внутренним диаметром 75 мкм и общей длиной 30.2 см (эффективная длина 20 см) («Beckman Coulter»). К 10 мкл образца добавляли 85 мкл SDS-Sample Buffer (Beckman Coulter), 5 мкл 2-меркаптоэтанола (99%) и денатурировали в течение 5 мин на кипящей водяной бане. Для дифференциальной детекции анализируемых компонентов (белок и FITC) в образцах использовали длину волны 214 нм поглощения пептидных связей цитохрома *c* и 495 нм (пик поглощения FITC). Регистрировали спектр поглощения продуктов электрофореза в диапазоне длин волн 190–600 нм. Процедуры SDS-CGE-UV выполняли согласно рекомендациям производителя:

1) Промывка капилляра, его заполнение гелем и кондиционирование

Rinse - Pressure Value: 20.0 psi Duration: 10.00 min Summary: forward Description: NaOH 0.1 M

Rinse - Pressure Value: 20.0 psi Duration: 5.00 min Summary: forward Description: HCl 0.1 M

Rinse - Pressure Value: 20.0 psi Duration: 2.00 min Summary: forward Description: H₂O

Rinse - Pressure Value: 80.0 psi Duration: 10.00 min Summary: forward Description: GEL

Wait Time: Duration: 0.00 min Description: H₂O

Separate - Voltage Value: 15.0 kV Duration: 15.00 min Summary: Override, reverse 5.00 Min ramp

2) Разделение компонентов пробы в геле

Inject - Voltage Value: 10.0 kV Duration: 90.0 sec Summary: Override, reverse

Wait Time: Duration: 0.00 min Description: H₂O

Wait Time: Duration: 0.00 min Description: H₂O

Separate - Voltage Value: 15.0 kV Duration: 120.00 min Summary: Override, reverse 1.00 Min ramp

Channel data rate: 4 Hz

3) Промывка капилляра после окончания анализа

Rinse - Pressure Value: 80.0 psi Duration: 10.00 min Summary: forward Description: H₂O

Rinse - Pressure Value: 20.0 psi Duration: 10.00 min Summary: forward Description: NaOH

Rinse - Pressure Value: 20.0 psi Duration: 5.00 min Summary: forward Description: HCl

Rinse - Pressure Value: 20.0 psi Duration: 2.00 min Summary: forward Description: H₂O

Rinse - Pressure Value: 40.0 psi Duration: 5.00 min Summary: forward Description: Air

Поверхностный плазмонный резонанс (SPR)

Все SPR измерения выполняли при 25°C в 8-ми канальном оптическом биосенсоре Biacore 8K («GE Healthcare»). Ковалентную иммобилизацию белков CXXC1 и цитохрома *c* за свободные аминокислотные группы на поверхности белка выполняли на оптическом чипе CM5 серии S по стандартному протоколу. В качестве рабочего буфера использовали HBS-EP+ (10 мМ HEPES (pH 7.4), 150 мМ NaCl, 3 мМ ЭДТА, 0.05% v/v Tween-20). Инъекции белковых анализов выполняли в течение 10 мин при скорости 10 мкл/мин, регенерацию поверхности оптического чипа выполняли раствором содержащим 1М NaCl и 0,2% CHAPS в течение 30 с при скорости потока 25 мкл/мин. Инъекции образцов лизата печени крысы (разбавленного рабочим буфером в 25 раз) выполняли в течение 3 мин при скорости потока 25 мкл/мин. Уровни связывания анализов с поверхностью чипа на выходных данных биосенсора (сенсограммах) представлены в RU, а 1 RU (resonance unit) соответствует связыванию 1 пг белка на 1 мм² поверхности чипа. Образцы цитохрома *c* (без метки и с меткой) для сравнительного анализа предварительно выравняли по содержанию общего белка, измеренного спектрофотометрически по методу Бредфорда.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для исследования белок-белковых взаимодействий в растворе с использованием белков, ковалентно конъюгированных с низкомолекулярными флуоро- и люминофорами (метками), важно соблюдать баланс между чувствительностью детекции (оптимальное мольное соотношение метка/белок) и сохранением способности меченого белка взаимодействовать с другими белками. Ещё одним лимитирующим фактором может быть взаимное тушение флуоресценции при большом числе меток на одну молекулу белка, что особенно актуально при мечении белков небольшой молекулярной массы (менее 20 кДа). На первый взгляд, относительно FITC, который произвольно связывается с поверхностными аминокислотными остатками лизина белка, логично предположить о существовании параллели между числом молей ковалентно связанной метки и числом закрытых меткой аминокислотных групп. В данной ситуации может закономерно проявиться вероятное влияние модифицированных меткой аминокислотных остатков белка на его связывающую способность, что, в частности, уже было показано для цитохрома *c* [4]. Тем не менее, как было недавно подтверждено масс-спектрометрией UHPLC-ESI-TOF-MS, эффективность процедуры мечения разных белков составила всего от 3% до 30% с использованием стандартных протоколов мечения и флуоресценция на моль белка не была пропорциональна количеству остатков лизинов [5].

SDS-CGE-UV метод использовался для контроля конъюгации цитохрома *c* с FITC по принципу «да-нет» и контроля отсутствия примесей не связавшейся метки в финальном препарате меченого белка. В первом случае, детектировали не содержащий метки цитохром *c* по

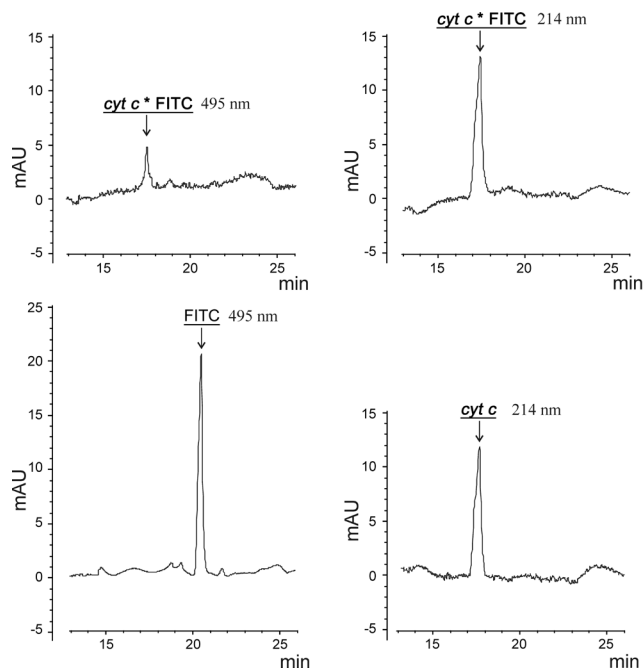


Рисунок 1. Электрофореграммы SDS-CGE-UV препаратов цитохрома *c* без метки и меченого FITC. Для сравнительного анализа были взяты одинаковые количества (150 мкг) цитохрома *c* без метки и меченого FITC. Образец свободного FITC был взят на анализ в количестве 20 мкг.

времени появления пика на длине волны 214 нм, во втором определяли время выхода свободного FITC (пик поглощения на длине волны 495 нм), в третьем – время выхода меченого цитохрома *c* (пики поглощения на длинах волн 214 нм и 495 нм) (рис. 1). Важно отметить, что подвижность в геле (время выхода пика с максимумом поглощения при длине волны 214 нм на 17.3 мин) немеченой и меченой FITC форм цитохрома *c* не менялась (рис. 1). Из рисунка 1 следует, что на 17.3 мин (время выхода цитохрома *c*) помимо поглощения по 214 нм, наблюдается так же поглощение на длине волны 495 нм (максимум поглощения FITC), что является подтверждением включения метки в белок. Также на электрофореграмме меченого FITC цитохрома *c* (рис. 1) видно, что пик поглощения на длине волны 495 нм на 20.5 мин (свободный FITC) отсутствует. Этот факт говорит о достижении полной очистки финального белкового препарата от непрореагировавших молекул FITC.

Как было отмечено выше, для интерактомных исследований следует убедиться, что включение метки не оказывает существенного влияния на свойства самого белка и его белок-белковые взаимодействия. Принимая во внимание, что существенный избыток молекул FITC на поверхности небольшого по молекулярному весу белка может значительно ограничивать доступные для белковых взаимодействий участки, мы использовали SPR анализ для сравнительного анализа связывания разных форм цитохрома *c* (без метки и меченого FITC) в следующих экспериментах.

Во-первых, были оценены количества ковалентно иммобилизованного на чипе цитохрома *c*, как без метки так и меченого FITC. Из рисунка 2А следует, что фактически отсутствует разница в уровнях иммобилизации на карбоксилированной поверхности чипа обеих форм цитохрома *c* за аминокислотные группы белка. Так как именно поверхностные аминокислотные группы задействованы при карбодимидной иммобилизации, значит можно косвенно

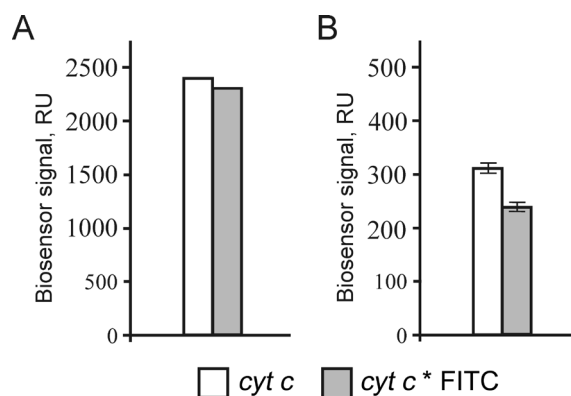


Рисунок 2. Средний уровень ($n=2$) иммобилизации разных препаратов цитохрома *c* (немеченого и меченого FITC) (А); уровни сигналов биосенсора при инъекции образцов, содержащих 50 мкМ цитохрома *c* ($n=5$) без метки и меченого FITC, поверх ковалентно иммобилизованного на оптическом чипе белка СХХС1 (В).

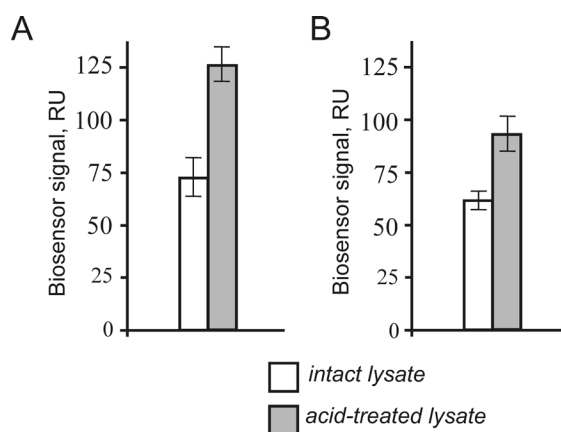


Рисунок 3. SPR анализ связывания белкового материала при инъекциях ($n=4$) из интактного и обработанного соляной кислотой/нейтрализованного лизатов ткани печени крысы с разными формами иммобилизованного цитохрома *c*: без метки (А) и меченой FITC (В).

говорить, что на поверхности меченого FITC белка все-таки остается такое количество свободных от красителя аминокислотных групп, при котором отсутствует влияние на эффективность ковалентной посадки на чип.

Во-вторых, была оценена эффективность взаимодействия цитохрома *c* с ранее установленным его белком партнером СХХС1 [6]. Для этого СХХС1 был иммобилизован на оптическом чипе по стандартному протоколу иммобилизации за аминокислотные группы белка, а образцы цитохрома *c* (без метки и меченая FITC форма) вводились в качестве аналита (в растворе) (рис. 2В). Возможно, что взаимодействие СХХС1/СУТС является очень чувствительным к изменению общего поверхностного заряда цитохрома *c*, что могло бы объяснить почти 30%-ное снижение связывания меченого FITC цитохрома *c* с иммобилизованным на поверхности чипа СХХС1.

В-третьих, в двухканальной биосенсорной системе с разными иммобилизованными формами цитохрома *c* (без метки и меченого FITC) были оценены уровни связывания белкового материала из образцов интактного лизата печени и лизата, обработанного кислотой/восстановленного (для диссоциации всех белковых комплексов). Так, из рисунка 3 следует, что имеет место некоторое падение уровней

связывания белкового материала из лизата печени крысы с иммобилизованным цитохромом с конъюгированным с FITC, что согласуется с падением уровней связывания для белок-белкового взаимодействия СХХС1/СУТС.

Таким образом, в представленной работе мы, используя ряд экспериментов с применением двух методик капиллярного гель-электрофореза и SPR биосенсора, подтвердили, что оптимизированный стандартный протокол ковалентного мечения красителем по поверхностным аминок группам гем-содержащих белков применим для подготовки подобных меченых белков к использованию в интерактомных исследованиях.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей. При использовании тканей животных были соблюдены все применимые международные, национальные и институциональные принципы.

БЛАГОДАРНОСТИ

Экспериментальная часть работы на оптическом биосенсоре была выполнена на оборудовании ЦКП «Протеом человека» Института биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича (финансовая поддержка в рамках соглашения № 075-15-2019-1502 от 5 сентября 2019 года)

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работы по капиллярному электрофорезу были выполнены при финансовой поддержке Российского Фонда

Фундаментальных Исследований (грант РФФИ № 18-04-00071).

ЛИТЕРАТУРА

1. Florinskaya, A.V., Ershov, P.V., Mezentsev, Y.V., Kaluzhskiy, L.A., Yablokov, E.O., Buneeva, O.A., Zgoda, V.G., Medvedev, A.E., Ivanov, A.S. (2018) The analysis of participation of individual proteins in the protein interactome formation. *Biomeditsinskaya Khimiya*, **64**(2), 169–174. DOI: 10.18097/PBMC20186402169
2. Ershov, P.V., Mezentsev, Y.V., Yablokov, E.O., Kaluzhskiy, L.A., Vakhrushev, I.V., Gnedenko, O.V., Florinskaya, A.V., Gilep, A.A., Usanov, S.A., Yarygin, K.N., Ivanov, A. S. (2019) A Method of Lysate Preparation to Improve the Isolation Efficiency of Protein Partners for Target Proteins Encoded by the Genes of Human Chromosome 18. *Biomed. Chem. Res. Methods*, **2**(1), e00090. DOI: <https://doi.org/10.18097/BMCRM00090>
3. Ershov, P.V., Mezentsev Y.V., Kopylov, A.T., Yablokov, E.O., Svirid, A.V., Lushchik, A.Ya., Kaluzhskiy, L.A., Gilep, A.A., Usanov, S.A., Medvedev, A.E. and Ivanov, A.S. (2019) Affinity Isolation and Mass Spectrometry Identification of Prostacyclin Synthase (PTGIS) Subinteractome. *Biology (Basel)*, **8**(2), 49. DOI:10.3390/biology8020049
4. Ng, S., Smith, M.B., Smith, H.T., Millett, F. (1977) Effect of modification of individual cytochrome c lysines on the reaction with cytochrome b5. *Biochemistry*, **16**(23), 4975–4978. DOI: 10.1021/bi00642a006
5. Arrell, M.S., Kálmán, F. (2016) Estimation of protein concentration at high sensitivity using SDS-capillary gel electrophoresis-laser induced fluorescence detection with 3-(2-furoyl)quinoline-2-carboxaldehyde protein labeling. *Electrophoresis*, **37**(22), 2913–2921. DOI: 10.1002/elps.201600246
6. Ershov, P.V., Mezentsev, Y.V., Yablokov, E.O., Kaluzhskiy, L.A., Florinskaya, A.V., Gnedenko, O.V., Zgoda, V.G., Vakhrushev, I.V., Raeva, O.S., Yarygin, K.N., Gilep, A. A., Usanov, S. A., Medvedev, A. E., Ivanov, A. S. (2018) Direct Molecular Fishing of Protein Partners for Proteins Encoded by Genes of Human Chromosome 18 in HepG2 Cell Lysate. *Russ. J. Bioorg. Chem.*, **44**, 759–776. DOI: 10.1134/S1068162019010059

Поступила: 05.12.2019

После доработки: 11.12.2019

Принята к публикации: 15.12.2019

QUALITY CONTROL OF FITC-LABELED PROTEINS FOR INTERACTOMICS INVESTIGATIONS USING SDS CAPILLARY GEL ELECTROPHORESIS AND SPR BIOSENSOR

P.V. Ershov, L.A. Kaluzhskiy, E.O. Yablokov, A.S. Ivanov*

Institute of Biomedical Chemistry, 10 Pogodinskaya str., Moscow, 119121 Russia; *e-mail: evgeyablokov1988@mail.ru

The technology of dye-labeled proteins has many fields of application, especially in interactomics. The aim of this work was to adapt protocol of conjugation of low molecular weight (12–15 kDa) heme-containing proteins with fluorescein isothiocyanate, isomer I, (FITC) for subsequent protein-protein interaction studies. We have monitored the quality of FITC-labeling of the target protein and comparative assessment of its binding capacity. Using the cytochrome C (Mw 12 kDa) as an example, it has been shown that using the three step method approach including conventional spectrophotometry, capillary gel electrophoresis and SPR analysis it is possible to assess: (i) the capability of the FITC-labeled target protein to interact with its protein partner and protein material from tissue lysates, (ii) the fact of dye conjugation with the protein, and (iii) the quality of purification for final protein preparation from unreacted free dye molecules

Key words: surface plasmon resonance (SPR); capillary gel electrophoresis; interactomics; cytochrome c; dye labeling; FITC

FUNDING: Capillary electrophoresis study was supported by the Russian Foundation for Basic Research (RFBR) (project No 18-04-00071).

Received: 05.12.2019, revised: 11.12.2019, accepted: 15.12.2019