

Магнитные аффинные сорбенты для выделения рекомбинантных белков

**М. А. Федорчак, О. М. Шаронова, Е. В. Мазурова,
Т. А. Верещагина, А. Г. Аншиц**

Получен аффинный сорбент по типу “ядро – оболочка”, в котором в качестве магнитного ядра использовали ферросферы летучих зол с содержанием алюмосиликатной стеклофазы 41 масс. %. Синтез функционального покрытия включал 4 стадии: паровую обработку фракции, синтез мезопористого силикатного покрытия на поверхности ферросфер, активацию поверхности кипячением в щелочной среде и последующую иммобилизацию ионов Ni^{2+} на поверхности модифицированных ферросфер методом пропитки. Модифицированные ферросферы исследованы методами синхронного термического анализа, ИК-спектроскопии, рентгенофазового анализа и низкотемпературной адсорбции азота. Установлено, что полученный сорбент характеризуется приемлемой прочностью связывания функциональной оболочки и сорбционной емкостью в отношении зеленого флуоресцентного белка до $6,7 \text{ мг/см}^3$. Исследована стабильность сорбента при его многократном использовании. Сорбционная емкость после седьмого цикла сохранилась на уровне 70 % от первоначальной емкости.

Ключевые слова: ферросферы, магнитный аффинный сорбент, зеленый флуоресцентный белок.

Введение

В современных медико-биологических исследованиях, включая молекулярную диагностику (иммуноанализ, ПЦР (полимеразная цепная реакция) -диагностика) социально-значимых заболеваний, важная роль отводится методам селективного выделения из биологических жидкостей определенных соединений и биомолекул — иммуноглобулинов, рекомбинантных белков, моно-, ди- и олигонуклеотидов, наркотических веществ и др. К таким методам относится металл-аффинная хроматография (Immobilized-Metal Affinity Chromatography — IMAC), основанная на сродстве (affinity) ионов переходных металлов к гетероатомам N, S, O или P функциональных групп белков и нуклеиновых кислот [1 – 3]. Адсорбция соответствующих соединений на носителе осуществляется за счет образования координационной связи между электронодонорными центрами органических молекул и ионами металла, иммобилизованными на его поверхности. Для проведения десорбции достаточно изменить pH элюирующего раствора или использовать более сильные хелатирующие агенты.

Одной из наиболее известных областей применения металл-аффинной хроматографии является очистка рекомбинантных белков, имеющих на N-конце последовательность из шести и более остатков аминокислоты гистидин (Histag — меченые белки) [1, 4 – 6]. В основе метода лежит взаимодействие атомов азота, входящих в состав имидазольного кольца гистидина, с ионами переходных металлов таких, как Cu^{2+} , Zn^{2+} , Co^{2+} или Ni^{2+} , хелатированными на поверхности агарозы или диоксида кремния с помощью химически привитых полидентантных лигандов — нитрилотриуксусной кислоты, карбоксиметиласпартата, имиодидиуксусной кислоты и др. [3, 7 – 10].

Выделение белков в хроматографическом режиме с использованием стационарной фазы металл-хелатного носителя имеет ряд недостатков, основными из которых являются длительное время процесса, необходимость предварительной обработки носителя с целью извлечения остатков органических веществ и коллоидных примесей, вымывание ионов металла на стадии элюирования Histag-меченых белков имидазолом, что приводит к дезактивации сорбента и необходимости введения ионов после

каждого цикла адсорбции-десорбции [3]. Поэтому разработка эффективных аффинных сорбентов с иммобилизованными катионами металлов, позволяющими быстро и селективно выделить His-tag-меченные белки из различных биологических систем, является актуальной.

Проблемы, связанные с оптимизацией ИМАС методик, решаются путем придания аффинным сорбентам магнитных свойств, что обеспечивает возможность манипулирования сорбентами с использованием магнитного поля и таким образом упрощает процедуру извлечения рекомбинантных белков из гетерогенных смесей [11 – 15]. В большинстве магнитных аффинных сорбентов ионы никеля иммобилизованы посредством различных хелатирующих лигандов [11 – 14]. Так, коммерчески доступный магнитный аффинный сорбент Ni^{2+} -NTA MABs (Qiagen, Германия) с емкостью по белкам (~20 кДа) 5 – 10 мг/см³ представляет собой микросферические частицы 20 – 70 мкм, состоящие из магнитного ядра на основе оксидов железа и полисахаридной оболочки с ковалентно привитыми остатками нитрилотриуксусной кислоты, хелатирующей ионы Ni^{2+} [14, 15]. Другим направлением усовершенствования сорбентов является повышение прочности связывания ионов металла на поверхности носителя за счет исключения использования комплексообразователей в структуре сорбента. В ряде работ предложены сорбенты, состоящие из ядра на основе синтетического магнетита или маггемита и силикатной оболочки, в которую без участия хелатирующих лигандов инкорпорированы катионы Ni^{2+} (Ni^{2+} -SiMAG, Chemicell, Германия) [16, 17] или Zn^{2+} [8]. Полученные сорбенты характеризуются прочным связыванием ионов Me^{2+} в кремнеземной матрице, что позволяет многократное использование сорбента без промежуточной реактивации.

Последние разработки этого направления связаны с созданием более эффективных композитных мезоструктурированных материалов с развитой поверхностью и высокой сорбционной емкостью. Так, в [17, 18] продемонстрированы сорбционные свойства в отношении рекомбинантных белков полых наносфер силиката никеля и магнитных композитных наносфер $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{NiSiO}_3$, в которых активным компонентом являются ковалентно связанные ионы никеля.

В последние годы появился интерес к использованию в качестве носителей аффинных зондов микросфер из летучих зол от сжигания угля [19], например полых алюмосиликатных микросфер — ценосфер [20], а также ферросфер на основе феррошпинелидов, способных по своему составу, морфологии и свойствам конкурировать с синтети-

ческими аналогами и пригодных для создания сорбентов по типу “ядро – оболочка” для биомедицинских приложений [21]. В [21] получен магнитный сорбент Ni^{2+} - SiO_2 /ММ на основе магнитных микросфер энергетических зол от сжигания угля с иммобилизованным ионом Ni^{2+} на поверхности кремнеземного слоя, синтезированного золь-гель методом. В случае тестового выделения рекомбинантного зеленого флуоресцентного белка, имеющего в своем составе фрагмент из 6-и повторяющихся гистидиновых остатков по NH_2 -концу (6His-CLGFP), адсорбционная специфическая емкость указанного аффинного сорбента составила 1 – 3,5 мг на 1 г сорбента. Недостатками таких сорбентов являются многостадийность нанесения кремнеземного слоя на магнитные микросферы и низкая адгезионная прочность силикатного покрытия, вызывающая снижение адсорбционной емкости сорбента в многоцикловом процессе сорбции-десорбции белка. Поэтому представляет интерес упрощение синтеза сорбента и повышение адгезионной прочности кремнеземной оболочки на поверхности магнитных микросфер без ухудшения сорбционной емкости в отношении белков среднего размера (20 – 30 кДа).

Цель данной работы — получение магнитного аффинного сорбента для выделения рекомбинантных белков с использованием в качестве магнитного ядра узкой фракции ферросфер, поверхность которых модифицирована Ni-силикатным покрытием, с повышенной стабильностью сорбционных свойств в циклическом процессе.

Экспериментальная часть

Для получения аффинного сорбента использовали узкую фракцию –0,063 + 0,050 мм ферросфер, выделенную из летучей золы от сжигания Экибастузского угля. Метод выделения фракции, химический и фазовый составы подробно описаны в [22]. Изучение структуры и состава поверхности глобул проводили на порошковых образцах ферросфер методом растровой электронной микроскопии (РЭМ) с использованием растрового электронного микроскопа ТМ-1000 Hitachi (Япония), оснащенного EDS спектрометром фирмы Bruker (Германия), с разрешением 35 нм при ускоряющем напряжении 15 кВ. Анализ осуществляли в центре или в нескольких точках глобулы.

Получение магнитных сорбентов осуществляли по двум маршрутам (рис. 1). По маршруту 1, включающему 3 стадии, получен образец № 1 (табл. 1). На первой стадии проводили синтез мезопористого кремнеземного покрытия на поверхности магнитных

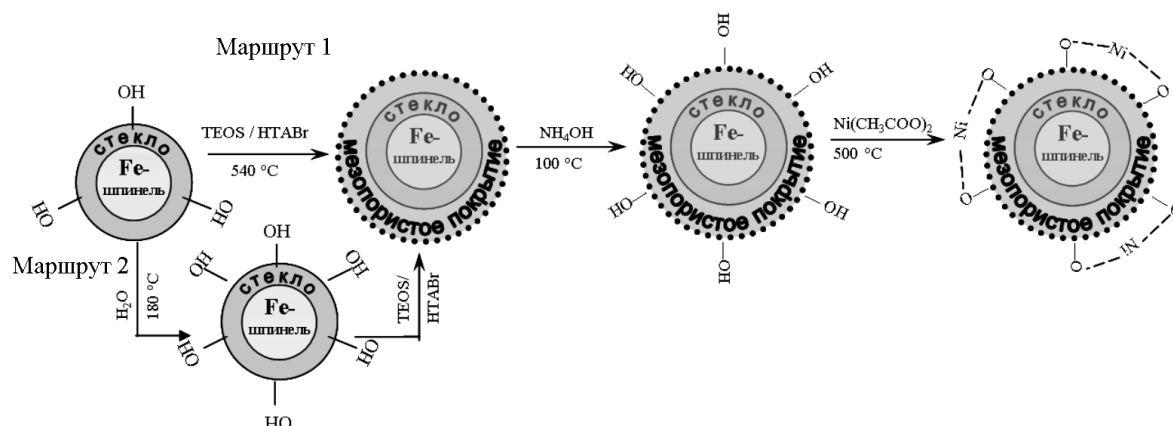


Рис. 1. Схема получения магнитного аффинного сорбента.

микрофер в спиртово-аммиачной среде в динамическом режиме в автоклаве при температуре 60 °С в течение 15 ч с использованием тетраэтоксисилана (ТЭОС) и органического темплата гексаметилтри-метиламмония бромида (ЦТАБ) в мольном соотношении: 475 H₂O : 22 NH₃ : 52 EtOH : 1 ТЭОС : 0,2 ЦТАБ в автоклаве [23]. Вращение автоклава, закрепленного перпендикулярно оси вала, осуществлялось со скоростью 30 об./мин. По окончании синтеза микро-сферы, удерживая магнитом, отделяли и промывали дистиллированной водой до pH = 7, сушили при 80 °С, прокаливали в течение 4 ч при 540 °С. Вторая стадия заключалась в проведении активации поверхности мезопористого покрытия микрофер путем кипячения в водном растворе при pH 12,6 в течение 4 ч. Заключительная стадия включала инкорпорирование в силикатное покрытие катионов Ni²⁺ пропиткой 10 %-м раствором Ni(CH₃COO)₂ при соотношениях: 0,3 г микрофер: 1 мл или 0,2 мл раствора Ni(CH₃COO)₂ с последующей сушкой и прокалкой при 500 °С в течение 4 ч.

По маршруту 2 (рис. 1), включающему те же стадии, но с предварительной активацией поверхности ферросфер в автоклаве водяным паром при 180 °С в течение 2 ч с последующей сушкой при 150 °С [24], получен образец № 2 (табл. 1).

Таблица 1

Сорбционная емкость модифицированных магнитных микрофер

№ образца	Удельная поверхность, S _{уд} , м ² /г	Сорбционная емкость	
		мг/г	мг/см ³
Аналог [21]	61	1,0 – 3,5	2,0 – 6,9
1	8,21±0,04	4,40±0,02	6,16±0,03
2	8,12±0,04	4,81±0,03	6,73±0,04
3	1,30±0,01	2,37±0,02	3,32±0,03

В качестве сравнения был получен образец № 3 (табл. 1) с активированной водяным паром поверхностью ферросфер и инкорпорированными катионами никеля, исключая стадию синтеза кремнеземного покрытия.

Удельную поверхность образцов определяли термической десорбцией азота многоточечным методом БЭТ (Брунауэра – Эммета – Тейлора) на приборе NOVA 3200e (США).

Регистрацию ИК-спектров исходных и модифицированных ферросфер проводили на ИК-спектрометре “Tensor 27” (Bruker, Германия) в области 400 – 4000 см⁻¹ с использованием стандартной методики таблетирования образцов с KBr. Точность прибора по волновому числу составляла 0,01 см⁻¹. Массовое соотношение — образец : KBr = 1:400. Навеска исследуемого образца — 1 – 3 мг.

Термогравиметрический (ТГ) анализ проводили на приборе NETZSCH STA 449C Jupiter (Германия) с блоком Aeolos QMS 403C, позволяющем осуществлять анализ отходящих газов. Исследование проводили в платиновых тиглях в потоке смеси 20 % O₂ – Ar, масса навески 43 мг, скорость подъема температуры 10 град./мин. Инструментальная ошибка прибора составляла 0,0001 мг.

Сорбционную емкость магнитного сорбента в отношении рекомбинантных белков среднего размера (20 – 30 кДа), имеющих в своем составе фрагмент из шести повторяющихся гистидиновых остатков по NH₂-концу (6His), определяли на примере выделения зеленого флуоресцентного белка медузы *Clytia gregaria* (6His-CLGFP). Рекомбинантные клетки *E.coli* BL21-gold, экспрессирующие этот белок, суспендировали в трис-HCl-солевом буфере (0,02M ТрисHCl, pH 7, 0,15M NaCl) и разрушали с помощью ультразвукового дезинтегратора UD-20 (Techpan,

Польша) (6 имп. по 20 с, 0 °С). Для тестирования образцов использовали раствор очищенного белка 6His-CLGFP. В пробирку с навеской частиц сорбента вносили 1 мл раствора белка с оптической плотностью $OD_{485\text{nm}} = 0,76–0,83$ и перемешивали в течение 2 мин. Частицы сорбента фиксировали у стенки пробирки с помощью магнита, а раствор белка удаляли пипеткой. Спектр поглощения раствора записывали на спектрофотометре UVIKON 943 (Kontron Instruments, Италия). Оценку сорбционной емкости сорбента (m) проводили по разнице оптических плотностей растворов (OD) при длине волны 485 нм до и после поглощения с использованием значения молярной экстинкции (E_{485}) 6His-CLGFP в зеленой области [25]:

$$m = \frac{OD_{\text{исх}} - OD_{\text{сорбц}}}{E_{485}} \cdot \frac{V \cdot 26,4 \cdot 10^3}{m_{\text{сорбента}}},$$

где $OD_{\text{исх}}$ — оптическая плотность исходного раствора белка при 485 нм; $OD_{\text{сорбц}}$ — оптическая плотность раствора белка при 485 нм после сорбции; E_{485} — коэффициент экстинкции при 485 нм и толщине слоя $L = 1$ см, $M^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$; M — молярность, моль/л; V — объем раствора белка, взятого для тестирования навески сорбента ($m_{\text{сорбента}}$), л; $26,4 \cdot 10^3$ — молекулярная масса зеленого флуоресцентного белка, г/моль.

Результаты и обсуждение

Ферросферы в летучих золах образуются в результате термохимических и фазовых превращений железосодержащих минеральных форм угля в процессе его пылевидного сжигания [26], имеют широкий интервал химического и фазового составов, что обуславливает разнообразие их морфологии и структуры, с размерами от субмикронных до ~500 мкм. Тонкое разделение концентратов ферросфер с использованием комбинированной схемы разделения, включающей стадии гранулометрической классификации, гравитационной и магнитной сепарации, позволяет получать узкие фракции стабилизированного состава и морфологии с высокой насыпной плотностью до $2,5 \text{ г/см}^3$ [27, 28]. Текстура магнитных микросфер образована кристаллитами феррошпинели с примесью минорных фаз: гематита, кварца, кальцита, муллита и $\epsilon\text{-Fe}_2\text{O}_3$ [22], капсулированных в силикатном стекле разного состава, которая служит своего рода защитной оболочкой, препятствующей окислению магнитного компонента и его потенциально возможному растворению в случае контактирования с водными средами. Наряду

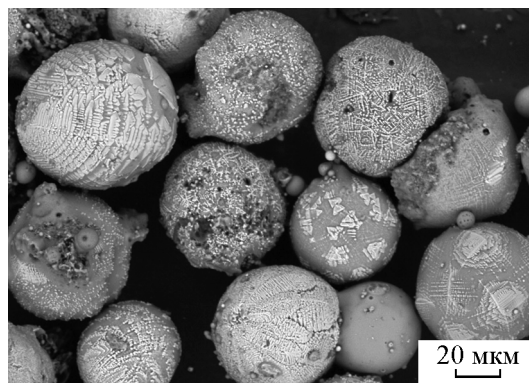
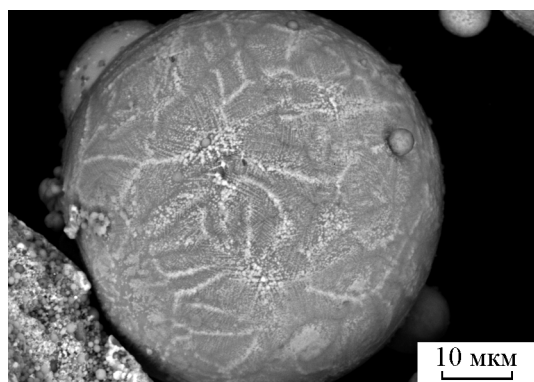


Рис. 2. РЭМ-изображение фракции ферросфер $-0,063 + 0,05$ мм.

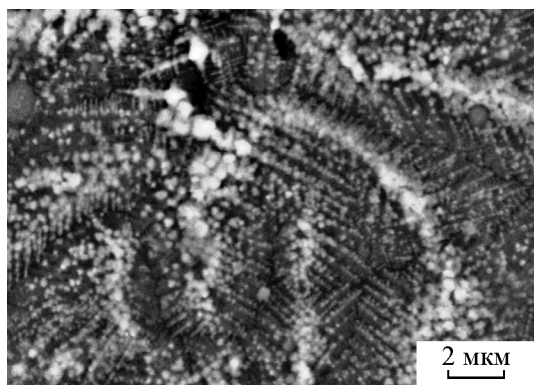
с этим, силикатное стекло содержит на своей поверхности реакционноспособные силанольные группы $\equiv\text{Si-OH}$, которые могут служить якорными группами для связывания дополнительного функционального слоя SiO_2 высокой поверхности или закрепления катионов d -металлов.

В химическом составе используемой фракции ферросфер $-0,063 + 0,050$ мм преобладает Fe_2O_3 (59,8 масс. %), и значительно меньше содержится SiO_2 и Al_2O_3 — 26,5 и 9,4 масс. %, соответственно, в фазовом составе фракции основными являются железоксидные фазы: феррошпинель — 48,8 масс. % и гематит 2,9 масс. %, а также аморфная фаза (41,2 масс. %), обогащенная Fe_2O_3 , SiO_2 и Al_2O_3 [22, 29]. Удельная поверхность фракции составила $1,3 \text{ м}^2/\text{г}$. На рис. 2 приведено РЭМ-изображение фракции общего вида. В ней преобладают глобулы с высоким содержанием стекла и различающиеся кристаллической микроструктурой. Высокое содержание силикатного стекла позволило получить в процессе “темплатного” синтеза на поверхности ферросфер дополнительный функциональный слой и повысить удельную поверхность фракции до $8 \text{ м}^2/\text{г}$. На рис. 3 приведены РЭМ-изображения ферросферы с мезопористым силикатным покрытием (рис. 3а) и локального участка при большом увеличении (рис. 3б). РЭМ индивидуальной ферросферы с инкорпорированными в мезопористое покрытие катионами Ni^{2+} и EDX-спектрами составов областей кристалла (1) и стеклофазы (2) приведен на рис. 4. Несмотря на значительное различие локализаций элементов в двух областях, можно предположить, что силикатное покрытие образуется на всей поверхности глобул, что подтверждается наличием элементов Si и Ni не только в области стеклофазы, но и в области кристалла.

По данным рентгенофазового анализа (рис. 5) и низкотемпературной адсорбции азота в составе модифицированных микросфер присутствует фаза мезо-



a

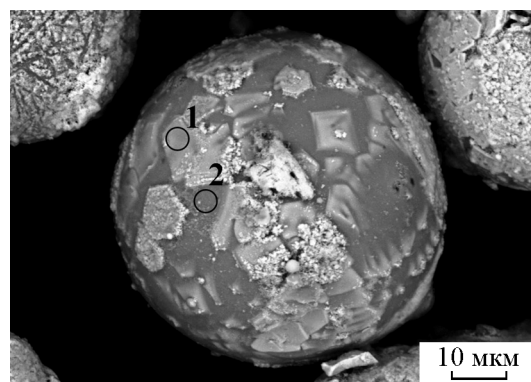


б

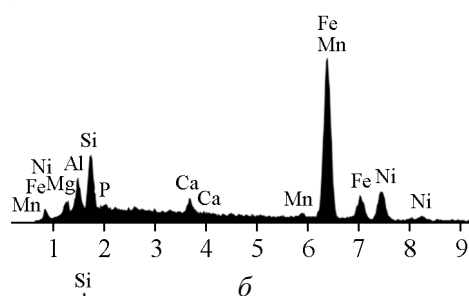
Рис. 3. РЭМ-изображение индивидуальной ферросферы с мезопористым силикатным покрытием (*a*) и локального участка поверхности (*б*).

пористого силиката с диаметром пор 29 Å, аналогичная материалу MCM-41 [30]. Слабовыраженный рефлекс в области основного пика MCM-41 на дифрактограмме полученного материала (рис. 5, рентгенограмма 2) свидетельствует о низком содержании синтезированного силикатного компонента и/или низкой упорядоченности его структуры по сравнению с эталонным образцом MCM-41. Исходя из сопоставления величин удельной поверхности полученного материала ($\sim 8,2 \text{ м}^2/\text{г}$) и MCM-41 ($\sim 1000 \text{ м}^2/\text{г}$), оценочное содержание мезопористого SiO_2 в составе микросферического композитного материала составило около 1 масс. %.

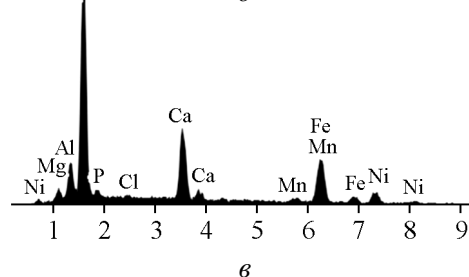
На рис. 6 приведены ИК-спектры исходной фракции ферросфер (1), фракции с мезопористым силикатным покрытием (2) и их дифференциальный спектр (3). В ИК спектре исходной фракции ферросфер присутствует полоса поглощения (ПП) с максимумом при 1082 см^{-1} , относящаяся к валентным колебаниям Si – O связи. После нанесения мезопористого силикатного покрытия в ИК-спектре наблюдается новая ПП с максимумом при 1096 см^{-1} .



a



б



в

Рис. 4. РЭМ-изображение индивидуальной ферросферы с мезопористым силикатным покрытием с инкорпорированными катионами Ni^{2+} (*a*) и спектры электронно-волновой дисперсии областей: *б* – кристалла 1, *в* – стеклофазы 2.

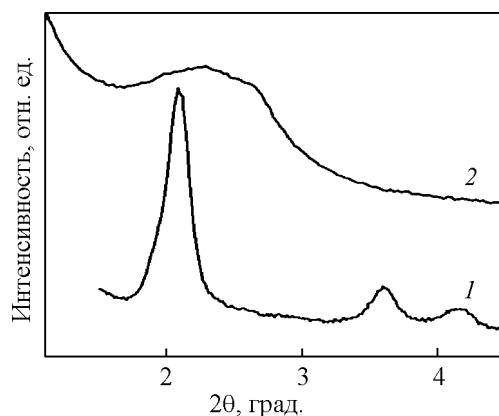


Рис. 5. Рентгенограммы: 1 – индивидуального MCM-41, 2 – фракции ферросфер с мезопористым силикатным покрытием.

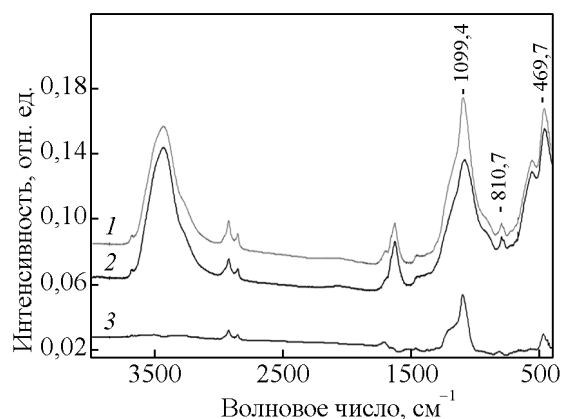


Рис. 6. ИК-спектры: 1 — исходной фракции ферросфер $-0,063 + 0,050$ мм, 2 — фракции ферросфер с нанесенным силикатным мезопористым покрытием после прокалывания, 3 — дифференциальный спектр. Частотные характеристики приведены для дифференциального спектра.

Присутствие в дифференциальном спектре (3) ПП 1098 , 810 и 470 см^{-1} , относящихся к валентным и деформационным колебаниям $\text{Si}-\text{O}$ связи, указывает на наличие дополнительного силикатного покрытия на ферросферах. После введения катионов никеля для ПП 1096 см^{-1} наблюдается смещение ПП на 33 см^{-1} (1063 см^{-1}), что может свидетельствовать о связи катионов никеля с атомом кислорода $\text{Si}-\text{O}$ группы нанесенного силикатного покрытия.

Сорбционная емкость полученного сорбента № 1 составила $4,4$ мг белка на 1 г сорбента (табл. 1), что превышает сорбционную емкость ($1-3,5$ мг/г) сорбента, полученного золь-гель методом с $S_{\text{уд}} = 61$ $\text{м}^2/\text{г}$ [21]. Исследование в многоцикловом

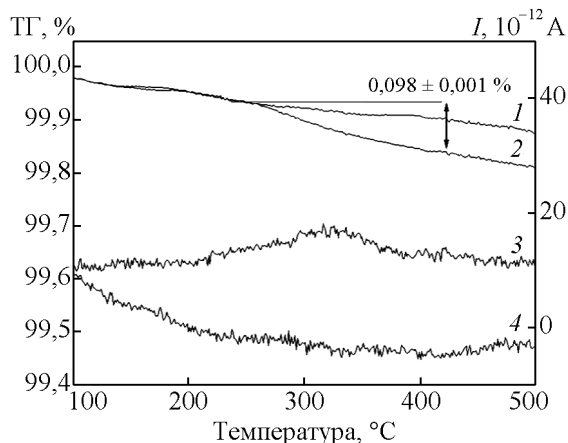


Рис. 7. ТГ-кривые (1, 2) и интенсивности иона с $m/z = 18$ (H_2O) (3, 4) в зависимости от температуры для ферросфер фракции $-0,063 + 0,05$ мм: 1, 4 — исходной, 2, 3 — после паровой активации.

сорбционном процессе показало, что сорбционная емкость не изменялась после трех циклов, а после седьмого цикла сохранилась на уровне 70% . В аналогичных условиях адсорбционная емкость сорбента-аналога снизилась до 20% . Это свидетельствует об улучшении прочности связывания покрытия с поверхностью по сравнению с аналогом. Вместе с тем, наблюдаемое снижение сорбционной емкости после 7 цикла и визуально регистрируемое помутнение раствора после сорбции белка свидетельствует о продолжающейся, хоть и менее значительной, миграции компонентов кремнеземной оболочки в раствор. Причинами этого может быть как отслоение непрочно связанных силикатных частиц, так и выход в раствор избыточных координационно-ненасыщенных форм ионов Ni^{2+} .

С целью увеличения прочности связывания кремнеземного покрытия с поверхностью ферросфер за счет увеличения концентрации якорных силанольных групп $\equiv\text{Si}-\text{OH}$ на поверхности силикатного стекла, капсулирующего магнитное ядро ферросфер, была проведена стадия предварительной паровой активации поверхности ферросфер фракции в автоклаве при температуре 180 $^{\circ}\text{C}$ в течение 2 ч, а затем высушены при 150 $^{\circ}\text{C}$ (рис. 1, маршрут 2). Результаты дифференциально-термического анализа обработанного паром образца свидетельствуют о потере массы $\sim 0,1\%$ в области температур > 200 $^{\circ}\text{C}$ с максимумом при 309 $^{\circ}\text{C}$ (рис. 7), связанной с дегидратацией силанольных групп, что подтверждает образование на поверхности ферросфер прогнозируемого количества дополнительных гидроксильных групп [31]. Для снижения выхода в раствор слабо закрепленных форм ионов Ni^{2+} было уменьшено количество вводимой соли никеля при использовании базового “темплатного” способа синтеза. Таким образом, получен магнитный сорбент № 2 ($S_{\text{уд}} = 8$ $\text{м}^2/\text{г}$) (табл. 1). Адсорбционная емкость образца № 2 в отношении белка 6His-CLGFP увеличилась на $\sim 10\%$ и составила $4,8$ мг белка на 1 г сорбента. При объемной плотности фракции ферросфер $-0,063 + 0,050$ мм $1,4$ г/см³ сорбционная способность единицы объема сорбентов достигает $6,7$ мг/см³, что близко к сорбционной способности коммерческих образцов ($5-15$ мг/см³ для Ni NTA MAB, Qiagen, Германия и Co-Talon Magnetic Beads, Clontech, США). Адсорбционная емкость активированных паром ферросфер без силикатного покрытия с иммобилизованными ионами никеля (образец № 3) составила $2,4$ мг/г ($3,4$ мг/см³). Для всех образцов сорбента не наблюдалось образования взвесей в растворах сорбции, что свидетельствует о достижении требуемой адгезионной прочности покрытия и более прочном связы-

вании катионов Ni^{2+} в кремнеземной оболочке по сравнению с ранее полученными образцами.

Выводы

Получен магнитный аффинный сорбент по типу “ядро – оболочка” для выделения рекомбинантных белков среднего размера (20 – 30 кДа), в котором в качестве магнитного ядра использовали ферросферы узкой фракции с содержанием аморфной алюмосиликатной фазы около 40 масс. %, поверхность которых была функционализирована созданием мезопористого силикатного покрытия с инкорпорированными ионами никеля без участия хелатирующих агентов. Полученный сорбент характеризуется приемлемой прочностью связывания кремнеземной оболочки и аффинного компонента (Ni^{2+}), улучшенной стабильностью сорбционных свойств в циклическом процессе и сорбционной емкостью относительно зеленого флуоресцентного белка 6His-CLGFP на уровне 7 мг/см³, что близко к показателям коммерческих образцов (5 – 15 мг/см³ для Ni NTA MAB, Qiagen, Германия и Co-Talon Magnetic Beads, Clontech, США). Предложен более простой способ синтеза сорбентов с емкостью по белку до 3,4 мг/см³, исключающий стадию синтеза кремнеземного покрытия.

Авторы выражают благодарность сотрудникам Института химии и химической технологии С.Н. Верещагину за проведение термического анализа, В.В. Юмашеву за проведение измерений удельной поверхности, Л.А. Соловьеву за проведение РФА, Н.И. Павленко и С.А. Козловой за проведение ИК-спектроскопических исследований, а так же сотрудникам Института биофизики Л.А. Франк и А.Н. Кудрявцеву за предоставленный раствор зеленого флуоресцентного белка.

Литература

- Gabert-Porecar V., Menart V. Perspectives of immobilized-metal affinity chromatography. J. Biochem. Biophys. Methods, 2001, v. 49, p. 335 – 360.
- Кельцьева О.А., Гладилович В.Д., Подольская Е.П. Металл-аффинная хроматография. Основы и применение. Научное приборостроение, 2013, т. 23, № 1, с. 74 – 85.
- Block H., Maertens B., Priestersbach A., Brinker N., Kubicek J., Fabis R., Labahn J., Schafer F. Immobilized-Metal Affinity Chromatography (IMAC): A Review. Methods in Enzymology, 2009, v. 463, p. 439 – 473.
- Knecht S., Ricklin D., Eberle A.N., Ernst B. Oligohistags: Mechanisms of binding to Ni^{2+} -NTA surfaces. J. Mol. Recognit., 2009, v. 22, p. 270 – 279.
- Stiborova H., Kostal J., Mulchandani A., Chen W. One-step metal-affinity purification of histidine-tagged proteins by temperature-triggered precipitation. Biotechnol. Bioeng., 2003, v. 82, no. 5, p. 605 – 611.
- Fischer N.O., Blanchette C.D., Chromy B.A., Kuhn E.A., Segelke B.W., Corzett M., Bench G., Mason P.W., Hoepflich P.D. Immobilization of his-tagged proteins on nickel-chelating nanolipoprotein particles. Bioconjugate Chem., 2009, v. 20, p. 460 – 465.
- Ren D., Penner N.A., Slentz B.E., Inerowicz H.D., Rybalko M., Regnier F.E. Contributions of commercial sorbents to the selectivity in immobilized metal affinity chromatography with Cu(II). J. Chromatogr. A, 2004, v. 1031 (1 – 2), p. 87 – 92.
- Bele M., Hribar G., Campelj S., Makovec D., Gaberc-Porekar V., Zorko M., Gaberscek M., Jamnik J., Venturini P. Zinc-decorated silica-coated magnetic nanoparticles for protein binding and controlled release. J. Chromatogr. B, 2008, v. 867, p. 160 – 164.
- Wegner S.V., Spatz J.P. Cobalt (III) as a stable and inert mediator ion between NTA and His6-Tagged proteins. Angew. Chem. Int. Ed., 2013, v. 52, p. 7593 – 7596.
- Kim J., Park H.Y., Kim J., Ryu J., Kwon D.Y., Grailhe R., Song R. Ni-nitrilotriacetic acid-modified quantum dots as a site-specific labeling agent of histidine-tagged proteins in live cells. Chem. Commun., 2008, issue 16, p. 1910 – 1912.
- Zhang Y., Yang Y., Ma W., Guo J., Lin Y., Wang C. Uniform magnetic core/shell microspheres functionalized with Ni^{2+} -iminodiacetic acid for one step purification and immobilization of his-tagged enzymes. ACS Appl. Mater. Interfaces, 2013, v. 5, p. 2626 – 2633.
- Chiang C.L., Chen C.Y., Chang L.W. Purification of recombinant enhanced green fluorescent protein expressed in *Escherichia coli* with new immobilized metal ion affinity magnetic absorbents. J. Chromatogr. B, 2008, v. 864, p. 116 – 122.
- Zou X., Li K., Zhao Y., Zhang Y., Li B., Song C. Ferroferric oxide/L-cysteine magnetic nanospheres for capturing histidine-tagged proteins. J. Mater. Chem. B, 2013, v. 1, p. 5108 – 5113.
- Schafer F., Romer U., Emmerlich M., Blumer J., Steinert K. Automated high-throughput purification of 6xHis-tagged proteins. J. Biomol. Tech., 2002, v. 13, p. 131 – 142.
- QIAGEN. Ni-NTA Magnetic Agarose Bead Handbook, Hilden, Germany, 12/2001.
- Frenzel A., Bergemann C., Kohl G., Reinard T. Novel purification system for 6His-tagged proteins by magnetic affinity separation. J. Chromatogr. B, 2003, v. 793, p. 325 – 329.
- Wang Y., Wang G., Xiao Y., Yang Y., Tang R. Yolk-Shell nanostructured Fe_3O_4 - NiSiO_3 for selective affinity and magnetic separation of his-tagged proteins. ACS Appl. Mater. Interfaces, 2014, v. 6 (21), p. 19092 – 19099.
- Wu Y., Chang G., Zhao Y., Zhang Y. Preparation of hollow nickel silicate nanospheres for separation of His-tagged proteins. Dalton Trans., 2014, v. 43, p. 779 – 783.
- Dhokte A.O., Khillare S.L., Lande M.K., Arbad B.R. Synthesis, characterization of mesoporous silica materials

- from waste coal fly ash for the classical Mannich reaction. *J. Ind. Eng. Chem.*, 2011, v. 17, p. 742 – 746.
20. Wang D.J., Zhang Y.H., Xu F., Shan W., Zhu G.B., Yang P.Y., Tang Y.J. The application of zeolite/FAC composites in protein separation. *Stud. Surf. Sci. Catal.*, 2004, v. 154, p. 2027 – 2033.
 21. Франк Л.А., Борисова В.В., Верещагина Т.А., Фоменко Е.В., Аншиц А.Г., Гительзон И.И. Выделение рекомбинантных белков с использованием аффинных магнитных сорбентов на основе микросфер энергетических зол. *Прикладная биохимия и микробиология*, 2009, т. 45, с. 237 – 242.
 22. Sharonova O.M., Anshits N.N., Solovyov L.A., Salanov A.N., Anshits A.G. Relationship between composition and structure of globules in narrow fractions of ferrospheres. *Fuel*, 2013, v. 111, p. 332 – 343.
 23. Верещагина Т.А., Шаронова О.М., Федорчук М.А., Франк Л.А., Кудрявцев А.Н., Аншиц А.Г. Способ получения магнитного аффинного сорбента для выделения рекомбинантных белков. Патент РФ №2540312, 2015 г.
 24. Drozhzhin V.S., Danilin L.D., Pikulin I.V., Khovrin A.N., Maximova N.V., Regiushev S.A., Pimenov V.G. Functional materials on the basis of cenospheres. 2005 World of Coal Ash (WOCA), April 11 – 15, 2005, Lexington, Kentucky, USA, <http://www.flyash.info/2005/47dro.pdf>.
 25. Markova S.V., Burakova L.P., Frank L.A., Golz S., Korostileva K.A., Vysotski E. S. Green-fluorescent protein from the bioluminescent jellyfish *Clytia gregaria*: cDNA cloning, expression, and characterization of novel recombinant protein. *Photochem. Photobiol. Sci.*, 2010, v. 9, p. 757 – 765.
 26. Кизильштейн Л.Я., Дубов И.В., Шпицглюз А.Л., Парада С.П. Компоненты зол и шлаков ТЭС. М.: Энергоатомиздат, 1995, 176 с.
 27. Шаронова О.М., Аншиц Н.Н., Оружейников А.И., Акимочкина Г.В., Саланов А.Н., Низовский А.И., Семенова О.Н., Аншиц А.Г. Состав и морфология магнитных микросфер энергетической золы каменных углей Экибастузского и Кузнецкого бассейнов. *Химия в уст. разв.*, 2003, т. 11, с. 673 – 682.
 28. Шаронова О.М., Аншиц Н.Н., Аншиц А.Г. Состав и морфология ферросфер узких фракций, выделенных из разных типов летучих зол. *Неорган. материалы*, 2013, т. 49, № 6, с. 625 – 634.
 29. Баюков О.А., Аншиц Н.Н., Балаев А.Д., Шаронова О.М., Рабчевский Е.В., Петров М.И., Аншиц А.Г. Мёссбауэровское исследование магнитных микросфер, выделенных из энергетических зол. *Неорган. материалы*, 2005, т. 41, № 1, с. 54 – 63.
 30. Meynen V., Cool P., Vansant E.F. Verified syntheses of mesoporous materials. *Micropor. Mesopor. Mater.*, 2009, v. 125, p. 170 – 223.
 31. Ek S., Root A., Peussa M., Niinisto L. Determination of the hydroxyl group content in silica by thermogravimetry and a comparison with ¹H MAS NMR results. *Thermochim. Acta*, 2001, v. 379, p. 201 – 212.

References

1. Gabert-Porecar V., Menart V. Perspectives of immobilized-metal affinity chromatography. *J. Biochem. Biophys. Methods*, 2001, vol. 49, pp. 335 – 360.
2. Kelzieva O.A., Gladilovich W.D., Podolskaya E.P. Metall-affinnaya chromatografiya. Osnovy i primeneniye [Metal-affinity chromatography. Fundamentals and application]. *Nauchnoe priborostroenie — Scientific instrumentation*, 2013, vol. 23, no. 1, pp. 74 – 85.
3. Block H., Maertens B., Priestersbach A., Brinker N., Kubicek J., Fabis R., Labahn J., Schafer F. Immobilized-Metal Affinity Chromatography (IMAC): A Review. *Methods in Enzymology*, 2009, vol. 463, pp. 439 – 473.
4. Knecht S., Ricklin D., Eberle A.N., Ernst B. Oligohistags: Mechanisms of binding to Ni²⁺-NTA surfaces. *J. Mol. Recognit.*, 2009, vol. 22, pp. 270 – 279.
5. Stiborova H., Kostal J., Mulchandani A., Chen W. One-step metal-affinity purification of histidine-tagged proteins by temperature-triggered precipitation. *Biotechnol. Bioeng.*, 2003, vol. 82, no. 5, pp. 605 – 611.
6. Fischer N.O., Blanchette C.D., Chromy B.A., Kuhn E.A., Segelke B.W., Corzett M., Bench G., Mason P.W., Hoeplich P.D. Immobilization of his-tagged proteins on nickel-chelating nanolipoprotein particles. *Bioconjugate Chem.*, 2009, vol. 20, pp. 460 – 465.
7. Ren D., Penner N.A., Slentz B.E., Inerowicz H.D., Rybalko M., Regnier F.E. Contributions of commercial sorbents to the selectivity in immobilized metal affinity chromatography with Cu(II). *J. Chromatogr. A*, 2004, vol. 1031 (1 – 2), pp. 87 – 92.
8. Bele M., Hribar G., Campelj S., Makovec D., Gaberc-Porekar V., Zorko M., Gaberscek M., Jamnik J., Venturini P. Zinc-decorated silica-coated magnetic nanoparticles for protein binding and controlled release. *J. Chromatogr. B*, 2008, vol. 867, pp. 160 – 164.
9. Wegner S.V., Spatz J.P. Cobalt (III) as a stable and inert mediator ion between NTA and His6-Tagged proteins. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2013, vol. 52, pp. 7593 – 7596.
10. Kim J., Park H.Y., Kim J., Ryu J., Kwon D.Y., Grailhe R., Song R. Ni-nitrilotriacetic acid-modified quantum dots as a site-specific labeling agent of histidine-tagged proteins in live cells. *Chem. Commun.*, 2008, issue 18, pp. 1910 – 1912.
11. Zhang Y., Yang Y., Ma W., Guo J., Lin Y., Wang C. Uniform magnetic core/shell microspheres functionalized with Ni²⁺-iminodiacetic acid for one step purification and immobilization of his-tagged enzymes. *ACS Appl. Mater. Interfaces*, 2013, vol. 5, pp. 2626 – 2633.
12. Chiang C.L., Chen C.Y., Chang L.W. Purification of recombinant enhanced green fluorescent protein expressed in *Escherichia coli* with new immobilized metal ion affinity magnetic absorbents. *J. Chromatogr. B*, 2008, vol. 864, pp. 116 – 122.
13. Zou X., Li K., Zhao Y., Zhang Y., Li B., Song C. Ferroferric oxide/L-cysteine magnetic nanospheres for capturing histidine-tagged proteins. *J. Mater. Chem. B*, 2013, vol. 1, pp. 5108 – 5113.

14. Schafer F., Romer U., Emmerlich M., Blumer J., Steinert K. Automated high-throughput purification of 6xHis-tagged proteins. *J. Biomol. Tech.*, 2002, vol. 13, pp. 131 – 142.
15. QIAGEN. Ni-NTA Magnetic Agarose Bead Handbook, Hilden, Germany, 12/2001.
16. Frenzel A., Bergemann C., Kohl G., Reinard T. Novel purification system for 6His-tagged proteins by magnetic affinity separation. *J. Chromatogr. B*, 2003, vol. 793, pp. 325 – 329.
17. Wang Y., Wang G., Xiao Y., Yang Y., Tang R. Yolk-Shell Nanostructured Fe_3O_4 - NiSiO_3 for selective affinity and magnetic separation of His-Tagged proteins. *ACS Appl. Mater. Interfaces*, 2014, vol. 6 (21), pp. 19092 – 19099.
18. Wu Y., Chang G., Zhao Y., Zhang Y. Preparation of hollow nickel silicate nanospheres for separation of His-tagged proteins. *Dalton Trans.*, 2014, vol. 43, pp. 779 – 783.
19. Dhokte A.O., Khillare S.L., Lande M.K., Arbad B.R. Synthesis, characterization of mesoporous silica materials from waste coal fly ash for the classical Mannich reaction. *J. Ind. Eng. Chem.*, 2011, vol. 17, pp. 742 – 746.
20. Wang D.J., Zhang Y.H., Xu F., Shan W., Zhu G.B., Yang P.Y., Tang Y.J. The application of zeolite/FAC composites in protein separation. *Stud. Surf. Sci. Catal.*, 2004, vol. 154, pp. 2027 – 2033.
21. Frank L.A., Borisova V.V., Vereshchagina T.A., Fomenko E.V., Anshits A.G., Gitelson I.I. Affine magnetic sorbents supported on coal ash microspheres for recombinant protein isolation. *Appl. Biochem. Microbiol.*, 2009, vol. 45, pp. 215 – 220.
22. Sharonova O.M., Anshits N.N., Solovyov L.A., Salanov A.N., Anshits A.G. Relationship between composition and structure of globules in narrow fractions of ferrospheres. *Fuel*, 2013, vol. 111, pp. 332 – 343.
23. Anshits A.G., Sharonova O.M., Fedorchak M.A., Vereshchagina T.A., Kudryavtsev A.N., Frank L.A. *Sposob polucheniya magnitnogo affinnogo sorbenta dlya vydeleniya rekombinantnykh belkov* [Method for producing a magnetic affinity sorbent for the isolation of recombinant proteins]. Patent RF 2540312, 2015 г.
24. Drozhzhin V.S., Danilin L.D., Pikulin I.V., Khovrin A.N., Maximova N.V., Regiushev S.A., Pimenov V.G. Functional materials on the basis of cenospheres. 2005 World of Coal Ash (WOCA), April 11 – 15, 2005, Lexington, Kentucky, USA. <http://www.flyash.info/2005/47dro.pdf>
25. Markova S.V., Burakova L.P., Frank L.A., Golz S., Korostileva K.A., Vysotski E.S. Green-fluorescent protein from the bioluminescent jellyfish *Clytia gregaria*: cDNA cloning, expression, and characterization of novel recombinant protein. *Photochem. Photobiol. Sci.*, 2010, vol. 9, pp. 757 – 765.
26. Kizil'shtein L.Ya., Dubov I.V., Shpitsgluz A.L., Parada S.G. *Komponenty zol i shlakov TES*. [Components of ashes and slags of heat power plants], Moscow, Energoatomizdat Publ., 1995, 176 p.
27. Sharonova O.M., Anshits N.N., Orujeinikov A.I., Akimochkina G.V., Salanov A.N., Nizovskii A.I., Semenova O.N., Anshits A.G. Composition and morphology of magnetic microspheres in power-plant fly ash of coal from Ekibastuz and Kuznetsk basins. *Chemistry for Sustainable Development*, 2003, vol. 11, pp. 673 – 677.
28. Sharonova O.M., Anshits N.N., Anshits A.G. Composition and morphology of narrowly sized ferrospheres isolated from various types of fly ash. *Inorg. Mater.*, 2013, vol. 49, no. 6, pp. 586 – 594.
29. Bayukov O.A., Balaev A.D., Petrov M.I., Anshits N.N., Sharonova O.M., Rabchevskii E.V., Anshits A.G. Мұсбауер study of magnetic microspheres isolated from power plant fly ash. *Inorg. Mater.*, 2005, vol. 41, no. 1, pp. 50 – 59.
30. Meynen V., Cool P., Vansant E.F. Verified syntheses of mesoporous materials. *Micropor. Mesopor. Mater.*, 2009, vol. 125, pp. 170 – 223.
31. Ek S., Root A., Peussa M., Niinisto L. Determination of the hydroxyl group content in silica by thermogravimetry and a comparison with ^1H MAS NMR results. *Thermochim. Acta*, 2001, vol. 379, pp. 201 – 212.

Статья поступила в редакцию 7.05.2015 г.

Федорчак Марина Анатольевна — Институт химии и химической технологии Сибирского отделения РАН (660036, г. Красноярск, Академгородок, 50/24), младший научный сотрудник, специалист в области химии неорганических функциональных материалов. E-mail: mfed3@rambler.ru.

Шаронова Ольга Михайловна — Институт химии и химической технологии Сибирского отделения РАН (660036, г. Красноярск, Академгородок, 50/24), кандидат химических наук, ведущий научный сотрудник, специалист в области химии неорганических функциональных материалов. E-mail: shar@icct.ru.

Мазурова Елена Валентиновна — Институт химии и химической технологии Сибирского отделения РАН (660036, г. Красноярск, Академгородок, 50/24), кандидат технических наук, научный сотрудник, специалист в области микроскопии. E-mail: len.mazurova@yandex.ru.

Верецагина Татьяна Александровна — Институт химии и химической технологии Сибирского отделения РАН (660036, г. Красноярск, Академгородок, 50/24), доктор химических наук, ведущий научный сотрудник, специалист в области химии неорганических функциональных материалов. E-mail: tatiana@icct.ru.

Аншиц Александр Георгиевич — Институт химии и химической технологии Сибирского отделения РАН (660036, г. Красноярск, Академгородок, 50/24), доктор химических наук, заведующий лабораторией; Сибирский Федеральный Университет (660041, Красноярск, пр. Свободный, 79), заведующий кафедрой, специалист в области катализа, химии неорганических функциональных материалов. E-mail: anshits@icct.ru.

Magnetic affinity adsorbents for isolation of recombinant proteins

**M. A. Fedorchak, O. M. Sharonova, Ye. V. Mazurova,
T. A. Vereshchagina, A. G. Anshits**

The affinity sorbent of the "core – shell" type was prepared based on fly ash ferrospheres with the aluminosilicate glass phase content of 41 wt. % as a magnetic core. The synthesis of the functional coating included four steps: a steam treatment of fraction, the synthesis of mesoporous silica coating onto the ferrospheres surface, the surface activation by boiling in an alkaline medium followed by immobilization of Ni²⁺ ions on the surface of modified ferrospheres by the impregnation method. The modified ferrospheres were characterized by the methods of simultaneous thermal analysis, infrared spectroscopy, X-ray diffraction and low-temperature nitrogen adsorption. It was found that the sorbent obtained is characterized by an acceptable strength of binding of the functional shell and sorption capacity with respect to the green fluorescent protein of up to 6.7 mg/cm³. The stability of the sorbent in repeated use was studied. It was established that the sorption capacity after the seventh cycle was stabilized at 70% level of the initial capacity.

Keywords: ferrospheres, magnetic affinity sorbent, green fluorescent protein.

Fedorchak Marina — Institute of Chemistry and Chemical Technology, Siberian branch of Russian Academy of Sciences (660036, Krasnoyarsk, Akademgorodok, 50/24), junior researcher; expert in the field of chemistry of inorganic functional materials. E-mail: mfed3@rambler.ru.

Sharonova Olga — Institute of Chemistry and Chemical Technology, Siberian Branch of Russian Academy of Sciences (660036, Krasnoyarsk, Akademgorodok, 50/24), PhD (chem), leading researcher; expert in the field of chemistry of inorganic functional materials. E-mail: shar@icct.ru.

Mazurova Elena — Institute of Chemistry and Chemical Technology, Siberian Branch of Russian Academy of Sciences (660036, Krasnoyarsk, Akademgorodok, 50/24), PhD (eng), specialist in the field of microscopy. E-mail: len.mazurova@yandex.ru.

Vereshchagina Tatiana — Institute of Chemistry and Chemical Technology, Siberian Branch of Russian Academy of Sciences (660036, Krasnoyarsk, Akademgorodok, 50/24), DrSci (chem), leading researcher; expert in the field of chemistry of inorganic functional materials. E-mail: tatiana@icct.ru.

Anshits Alexander — Institute of Chemistry and Chemical Technology, Siberian Branch of Russian Academy of Sciences (660036, Krasnoyarsk, Akademgorodok, 50/24), DrSci (chem), head of laboratory; Siberian Federal University (660041, Krasnoyarsk, pr. Svobodny, 79), head of the Chair; expert in the field of catalysis, chemistry of inorganic functional materials. E-mail: anshits@icct.ru.