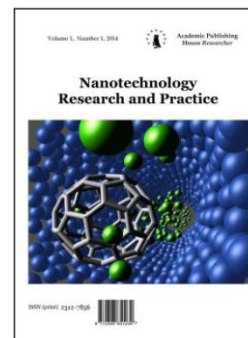


Copyright © 2014 by Academic Publishing House *Researcher*



Published in the Russian Federation
Nanotechnology Research and Practice
Has been issued since 2014.
ISSN: 2312-7856
Vol. 1, No. 1, pp. 43-56, 2014

DOI: 10.13187/issn.2312-7856
www.ejournal13.com



UDC 577.37 + 537.86

The Natural Phototransforming Photochrome Membrane Protein Bacteriorhodopsin From Purple Membranes of Halobacterium *Halobacterium Halobium*

¹Oleg Mosin
²Ignat Ignatov

¹Moscow State University of Applied Biotechnology, Russian Federation
Senior research Fellow of Biotechnology Department, Ph. D. (Chemistry)
103316, Moscow, Talalihin ulitsa, 33
E-mail: mosin-oleg@yandex.ru

²The Scientific Research Center of Medical Biophysics (SRC MB), Bulgaria
Professor, D. Sc., director of SRC MB.
1111, Sofia, N. Kopernik street, 32
E-mail: mbioph@dir.bg

Abstract. The article presents the technology of microbiological synthesis of natural phototransforming photochrome transmembrane protein bacteriorhodopsin (output 8–10 mg) from purple membranes of photo-organotrophic halobacterium *Halobacterium halobium*, which is capable to transform light energy to electrochemical energy of generated protons H⁺ and adenosine-5'-triphosphate (ATP). These data are important for nanoindustry of new modern domestic phototransforming nanomaterials on the base of bacteriorhodopsin and molecular bioelectronics.

Keywords: *Halobacterium halobium*; purple membranes; bacteriorhodopsin; biosynthesis; biomolecular electronics.

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

Бактериородопсин в центре внимания био- и нанотехнологии благодаря своей высокой светочувствительности и разрешающей способности, и используется в молекулярной

биоэлектронике как природный фотохромный материал для управляемых светом или электрическими импульсами модулей компьютерных и оптических систем [2]. Кроме того, бактериородопсин очень привлекателен как модельный объект изучения функциональной активности и структурных свойств фотопреобразующих белков в составе искусственных нативных энерго- и фотопреобразующих мембран и нанополенок [3].

Природные фотопреобразующие наноматериалы на основе бактериородопсина также представляют большую ценность для коммерческой нано- и биотехнологии, микроэлектроники и биофотоники [4]. Например, бактериородопсин-содержащие нанополенки, полученные на основе пурпурных мембран галобактерий, используются в качестве компонента в биомолекулярной электронике, использующей биоматериалы и принципы переработки информации биологическими объектами для создания электронных устройств в вычислительной технике. Впервые в мире нанополенки на основе молекул бактериородопсина были получены и исследованы в нашей стране в рамках проекта “Родопсин”, в ходе которого была продемонстрирована эффективность и перспективы использования наноматериалов “Биохром” в качестве фотохромных материалов для голографической записи и микроэлектронных устройств [5]. Эти наноматериалы обратимо изменяют свою структуру в ответ на физические воздействия и генерируют два дискретных состояния, поддающихся измерению спектральными методами. Это определяет их использование в качестве логических вычислительных систем. Так, на основе бактериородопсина был сконструирован фоторецептор с микроэлектродом из SnO_2 , состоящий из 64 ячеек (пикселей), размером $2,5 \times 2,5$ мм и напряжением 0,3–0,7 В. Для преобразования сигналов в данном фоторецепторе, слабый ток элементов (3–10 нА) усиливается до достижения значения напряжения) от 1 до 10 В и затем подается на светоизлучающие диоды. Данная конструкция свидетельствует о возможности эффективной интеграции бактериородопсина в современные микроэлектронные системы.

Основной задачей при изготовлении бактериородопсин-содержащих нанополенок является ориентация пурпурных мембран, между гидрофобными и гидрофильными средами, например, между водой и воздухом, как это распространено в природе. Как правило, для улучшения характеристик бактериородопсин-содержащих пленок, используется несколько слоев пурпурных мембран, которые наносятся на поверхность полимерного носителя – подложки и высушиваются в определенных условиях с сохранением своей природной структуры. Подложка, на которой сформирован препарат, изготавливается из натуральных и синтетических полимеров, гидрогелей, стекла, керамики, металлов и быть электропроводящей, многослойной с функциональными подслоями и т.д. Наилучшие технические показатели достигаются при изготовлении нанополенок на основе желатина. Это позволяет добиться высокой концентрации бактериородопсина (до 50 масс.%) в нанополенках, избежать агрегации фрагментов пурпурных мембран, а также разрушения бактериородопсина в процессе изготовления. Встроенные в желатиновую подложку фрагменты пурпурных мембран с бактериородопсином долговечны (время жизни $\sim 10^4$ часов) и устойчивы к воздействию многих факторов, как при изготовлении, так и в процессе эксплуатации (колебания температуры, интенсивное воздействие светом с помощью лазера и др.). При высыхании пурпурные мембраны укладываются друг на друга, ориентируясь в плоскости подложки. Слой высушенных мембран толщиной 1 мкм содержит около 200 монослоев. При освещении в таких сухих нанополенках регистрируется электрический потенциал 100–200 мВ, совпадающий с величиной мембранного потенциала живой клетки.

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

Материалы и методы. В качестве продуцента бактериородопсина использовали каротиноидсодержащий штамм экстремальных фотоорганотрофных галобактерий *Halobacterium halobium* ET 1001, полученный из коллекции культур МГУ. Штамм

модифицирован селекцией отдельных колоний на твердой (2 %-ный агар) пептоновой среде с 4,3 М NaCl. Штамм выращивали в синтетической среде (г/л): *D,L*-аланин – 0,43; *L*-аргинин – 0,4; *D,L*-аспарагиновая кислота – 0,45; *L*-цистеин – 0,05; *L*-глутаминовая кислота – 1,3; *L*-глицин – 0,06; *D,L*-гистидин – 0,3; *D,L*-изолейцин – 0,44; *L*-лейцин – 0,8; *L*-лизин – 0,85; *D,L*-метионин – 0,37; *D,L*-фенилаланин 0,26; *L*-пролин 0,05; *D,L*-серин 0,61; *D,L*-треонин 0,5; *L*-тирозин 0,2; *D,L*-триптофан 0,5; *D,L*-валин – 1,0; АМФ – 0,1; УМФ – 0,1; NaCl – 250; MgSO₄·7H₂O – 20; KCl – 2; NH₄Cl – 0,5; KNO₃ – 0,1; KH₂PO₄ – 0,05; K₂HPO₄ – 0,05; Na⁺-цитрат – 0,5; MnSO₄·2H₂O – 3·10⁻⁴; CaCl₂·6H₂O – 0,065; ZnSO₄·7H₂O – 4·10⁻⁵; FeSO₄·7H₂O – 5·10⁻⁴; CuSO₄·5H₂O – 5·10⁻⁵; глицерин – 1,0; биотин – 1·10⁻⁴; фолиевая кислота – 1,5·10⁻⁴; витамин В₁₂ – 2·10⁻⁵. Ростовую среду автоклавировали 30 мин при 0,5 атм, pH доводили 0,5 М КОН до pH = 6,5–6,7. Выращивание проводили в колбах Эрленмейера, вместимостью 500 мл (объем реакционной смеси 100 мл) 4–5 сут при 35–37 °С в условиях интенсивной аэрации на орбитальном шейкере “ Biorad 380-S” (Biorad, Венгрия) и освещении монохромными лампами ЛДС-40-2 (40 Вт) (ООО “Альфа-Электро”, Россия) (3 лампы освещенностью 1,5 люкс). Последующие операции по выделению бактериородопсина производились с использованием светозащитной лампы, снабженной оранжевым светофильтром ОРЖ-1Х (75×50 см) (“Marbel”, Германия).

Для выделения пурпурных мембран биомассу (1 г) промывали дистиллированной водой и осаждали центрифугированием (1500 *g*, 20 мин). Осадок суспендировали в 100 мл дист. Н₂О и выдерживали 3 ч при 4 °С. Реакционную смесь центрифугировали (1500 *g*, 15 мин), осадок ресуспендировали в 20 мл дист. Н₂О и дезинтегрировали ультразвуком (22 кГц, 3×5 мин) в водяной бане со льдом (0 °С). Клеточный гомогенат после промывки дист. Н₂О суспендировали в 10 мл буфера 125 мМ NaCl, 20 мМ MgCl₂, 4 мМ Трис-НCl, (pH = 8,0), добавляли 5 мкг РНК-азы I (2–3 ед акт.) и инкубировали 2 ч при 37 °С. Затем добавляли 10 мл того же буфера, выдерживали 10–12 ч при 4 °С. Водную фракцию отделяли центрифугированием (1500 *g*, 20 мин), осадок ПМ обрабатывали 50 %-ным этанолом (5×5 мл) при 4 °С с последующим отделением растворителя. Процедуру повторяли трижды до получения бесцветных промывных вод. Содержание белка в пробах определяли спектрофотометрически по соотношению D₂₈₀/D₅₆₈ ($\epsilon_{280} = 1,1 \cdot 10^5$ и $\epsilon_{568} = 6,3 \cdot 10^4$ М⁻¹·см⁻¹). Выход фракции пурпурных мембран, 120 мг (хим. чистота, 80–85 %).

Для выделения бактериородопсина фракцию пурпурных мембран (в Н₂О) (1 мг/мл) растворяли в 1 мл 0,5 % ДДС-Na, инкубировали 5–7 ч при 37 °С с последующим центрифугированием (1200 *g*, 15 мин). Осадок отделяли, к супернатанту добавляли дробными порциями метанол (3×100 мкл) при 0 °С, выдерживали 14–15 ч при 4 °С и центрифугировали при охлаждении (1200 *g*, 15 мин). Фракционирование проводили трижды, уменьшая концентрацию 0,5 % ДДС-Na до 0,2 и 0,1 %. Кристаллический белок (8–10 мг) промывали холодной дист. ²H₂O и центрифугировали (1200 *g*, 15 мин). Пробу белка (5 мг) растворяли в 100 мкл буферного раствора и помещали на колонку, размерами 150×10 мм; неподвижная фаза – Сефадекс G-200 (“Pharmacia”, США) (удельный объем упакованных гранул – 30–40 ед на 1 г сух. сефадекса), уравновешенную буферным раствором, содержащим 0,1 %-ный додецилсульфат натрия (ДДС-Na) и 2,5 мМ раствор этилендиаминтетрауксусной (ЭТДА) кислоты. Элюирование проводили 0,09 М Трис-боратным буфером, содержащим 0,5 М NaCl с pH = 8,35 (*I* = 0,075) со скоростью 10 мл/см²·ч. Объединенные белковые фракции подвергали лиофильной сушке, запаивали в стеклянные ампулы (10×50 мм) и хранили в морозильной камере холодильника при –10 °С.

Спектры поглощения регистрировали на программируемом спектрофотометре Beckman DU-6 (“Beckman Coulter”, США) в диапазоне длин волн $\lambda = 200$ –700 нм.

Электрофорез белка проводили в 12,5 %-ном полиакриламидном (ПААГ) геле с 0,1 %-ным додецилсульфатом натрия (ДДС-Na) в соответствии с протоколом фирмы LKB (Швеция). Для количественного определения содержания синтезированного в клетке белка проводили сканирование окрашенного в растворе кумасси-голубой R-250 электрофоретического геля на лазерном денситометре Beckman CDS-200 (“Beckman Coulter”, США).

Обсуждение результатов. По своей структуре и расположению в мембране клетки бактериородопсин относится к интегральным трансмембранным белкам (рис. 1), пронизывающим всю толщину клеточной мембраны, которая подразделяется на три фракции: желтую, красную и пурпурную. Содержащая 75 масс.% бактериородопсина пурпурная фракция в составе каротиноидов, фосфолипидов (в основном диэферы фосфоглицерина с небольшим содержанием неполярных липидов и изопреноидов) и воды образует естественные двумерные кристаллы, которые можно исследовать с помощью электронной микроскопии и дифракционных методов анализа – рассеивания рентгеновского излучения, электронов и нейтронов на поверхности кристаллов пурпурных мембран. Этими методами было установлено существование в молекуле бактериородопсина семи спиральных белковых сегментов, в середине которых симметрично расположена хромофорная часть молекулы в виде остатка ретиналя.

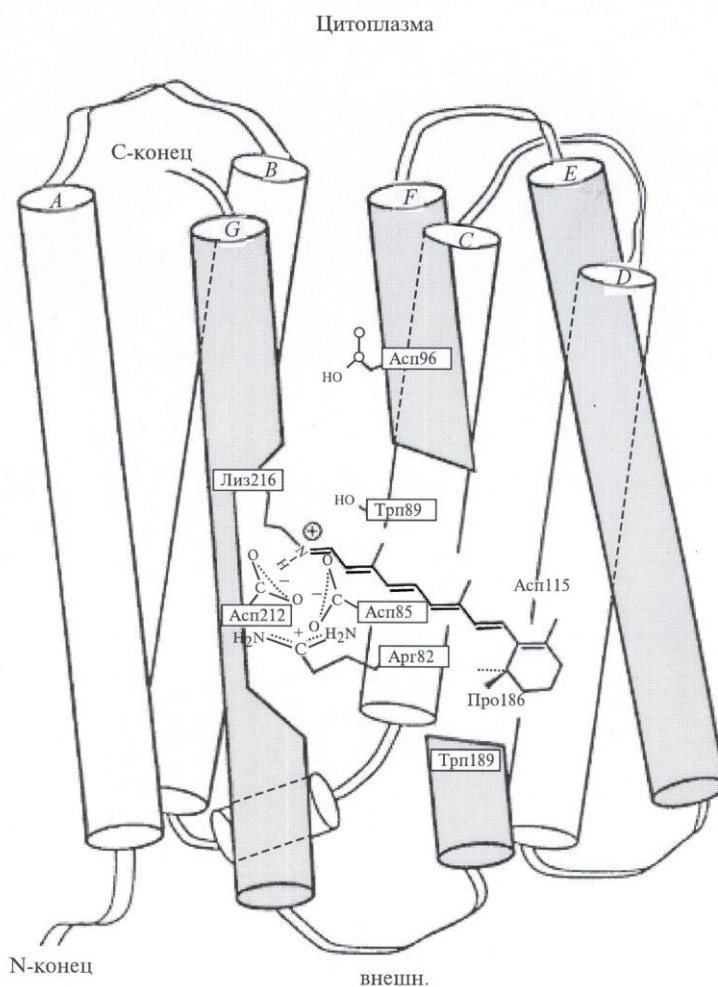


Рисунок 1. Расположение белковой части молекулы бактериородопсина и остатка ретиналя в клеточной мембране галобактерии *Halobacterium halobium* по данным компьютерного моделирования: латинскими цифрами обозначены белковые фрагменты молекулы бактериородопсина в виде 7 пронизывающих клеточную мембрану α -спиральных сегментов обозначены; русскими цифрами показаны аминокислотные остатки в белковом фрагменте; темным цветом обозначены сегменты, ответственные за связывание остатка ретиналя в молекуле бактериородопсина с белковой частью молекулы

Полипептидная цепь бактериородопсина состоит из 248 аминокислотных остатков, 67 % которых являются гидрофобными [6], а 33 % – гидрофильными остатками из аспарагиновой и глутаминовой кислотами, аргинина и лизина (рис. 2, а). Эти остатки

играют важную структурно-функциональную роль в пространственной ориентации α -спиральных сегментов молекулы бактериородопсина, которая организована в пурпурной мембране упорядоченно в виде тримеров со средним диаметром около 0,5 мкм и толщиной 5–6 нм; каждый тример окружен шестью другими так, что образуется правильная гексагональная кристаллическая решетка (рис. 2, б). Отдельная молекула бактериородопсина состоит из семи находящихся в конформации α -спирали сегментов (A–G), расположенных в направлении, перпендикулярном плоскости цитоплазматической мембраны (рис. 2, в). Гидрофобные домены представляют собой трансмембранные сегменты, а гидрофильные домены выступают из мембраны и соединяют отдельные внутримембранные α -спиральные сегменты белковой части молекулы бактериородопсина. Наряду с бактериородопсином пурпурные мембраны содержат липиды, каротиноиды и воду [7].

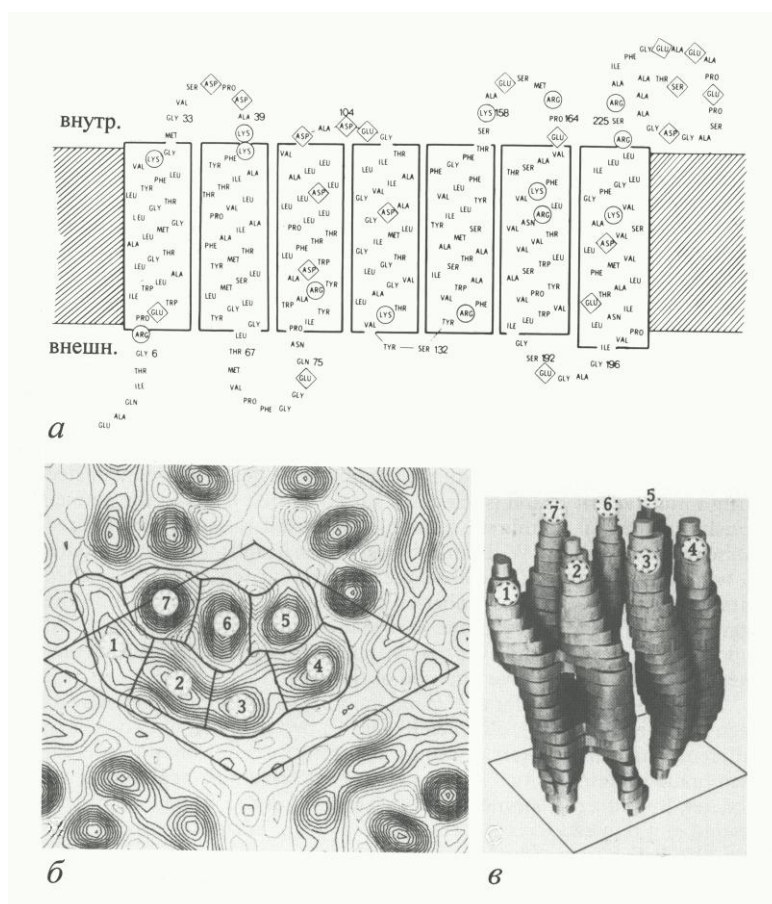


Рисунок 2. Структура молекулы бактериородопсина по данным дифракционного анализа: **а** – первичная структура молекулы бактериородопсина: аминокислоты обозначены латинскими символами, кружками и ромбами показаны функционально-важные аминокислоты – лизин (LYS), аргинин (ARG), аспарагиновая (ASP) и глутаминовая (GLU) кислота, ответственные за пространственную ориентацию α -спиральных сегментов белковой части молекулы и формирование каналов для транслокации протонов H^+ через клеточную мембрану; **б** – карта электронной плотности пурпурных мембран (в центре обведена отдельная молекула белка). Цифрами 1–7 обозначены α -спиральные сегменты молекулы бактериородопсина: 1 – A-сегмент; 2 – B-сегмент; 3 – C-сегмент; 4 – D-сегмент; 5 – E-сегмент; 6 – F-сегмент; 7 – G-сегмент; **в** – пространственная структура молекулы бактериородопсина

Бактериородопсин выполняет в клетке галофилов функции светозависимого протонного насоса, перекачивающего протоны через мембрану клетки и создающего электрохимический градиент протонов H^+ на поверхности клеточной мембраны, энергия

которого используется клеткой для синтеза аденозин-5'-трифосфорной кислоты (АТФ) в анаэробном фотосинтетическом фосфорилировании. Этот механизм синтеза АТФ получил название “бесхлорофильный фотосинтез” в отличие от реализуемого растениями фотосинтеза с участием хлорофилла. В этом механизме при каждом поглощении молекулой кванта света бактериородопсин обесцвечивается, вступая в цикл фотохимических превращений, в результате происходит высвобождение протона на внешней стороне мембраны и поглощение протона из внутриклеточного пространства. Вследствие этого между внутренней и внешней сторонами цитоплазматической мембраны устанавливается градиент концентрации протонов H^+ [8]. Механизм последующего переноса H^+ через мембрану клетки включает цепь водородных связей, образованных боковыми радикалами гидрофильных аминокислот и простирающихся через всю толщу белка. Протонная проводимость обеспечивается в том случае, если белок состоит из двух участков и содержит функциональную фотохромную группу, способную под воздействием кванта света изменять свое микроокружение и тем самым последовательно соединять и разъединять участки связывания и переноса H^+ через клеточную мембрану.

Роль такого переносчика между двумя белковыми проводниками H^+ , один из которых сообщается с внешней, а другой – с цитоплазматической поверхностью мембраны клетки, играет ретиналь, связанный альдиминной связью (как в зрительных пигментах животных) с остатком лизина-216 белкового фрагмента молекулы бактериородопсина. Ретиналь имеет 13-*транс*-конформацию и располагается в мембранном туннеле между белковыми α -сегментами, блокируя поток протонов. При поглощении кванта света происходит обратимая световая фотоизомеризация 13-*Z*-БР ($\lambda_{\text{макс}} = 548$ нм) в *all-E*-БР ($\lambda_{\text{макс}} = 568$ нм) [9], инициирующая каскад быстрых фотохимических реакций продолжительностью от 3 миллисекунд до 1 пикосекунды, с образованием промежуточных интермедиантов J_{625} , K_{590} , L_{550} , M_{412} , N_{560} и O_{640} с последующим отрывом H^+ от ретинального остатка бактериородопсина и его присоединением со стороны цитоплазмы (рис. 3). В процессе фотоизомеризации молекула ретиналя изгибается в мембранном туннеле, формируя канал трансмембранного переноса протонов из цитоплазмы во внешнюю среду, и переносит протон H^+ с внутренней цитоплазматической мембраны на внешнюю мембрану клетки. При этом протон из ретинального остатка переносится на остаток Asp85, после чего образовавшаяся вакансия заполняется протоном, перешедшим с Asp96. В результате между внутренней и внешней поверхностью мембраны образуется градиент концентрации H^+ , приводящий к тому, что при освещении светом клетки начинают синтезировать АТФ, т.е. преобразуют энергию света в химическую энергию связей. Этот процесс обратим, и в темноте протекает в обратном направлении, когда бактериородопсин самопроизвольно возвращается в исходную форму [10]. Таким образом, молекула бактериородопсина ведет себя как фотохромный переносчик с малым временем релаксации – переходом из возбужденного состояния в основное. Оптические и динамические характеристики бактериородопсина изменяются в зависимости от условий получения пурпурных мембран и составом полимерной матрицы.

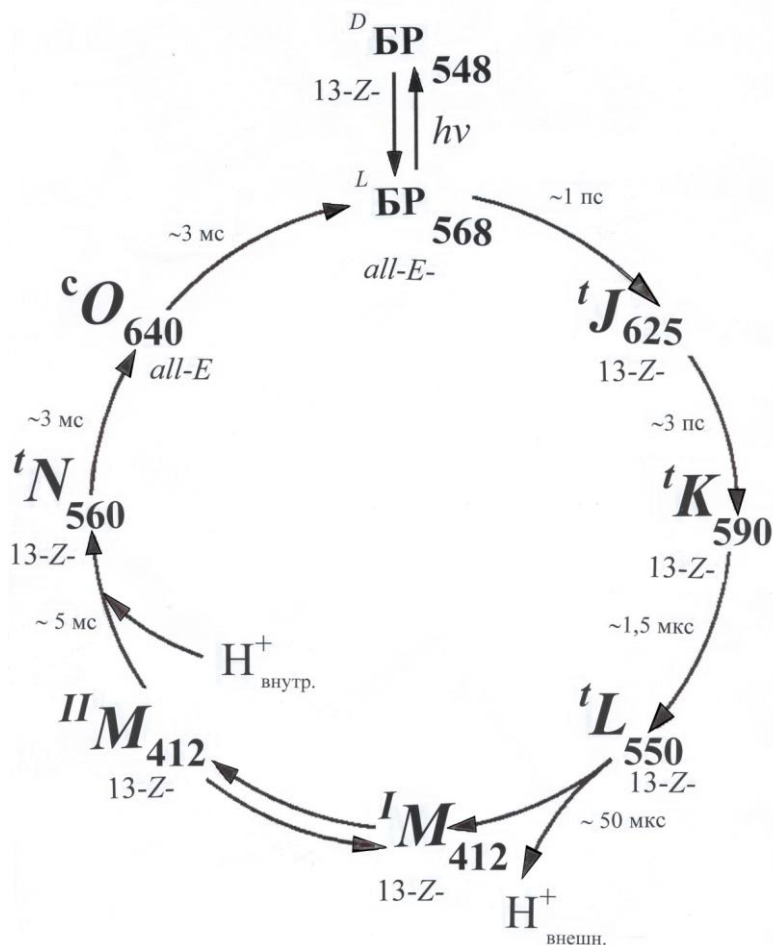


Рисунок 3. Схема фотохимического цикла молекулы бактериородопсина (водная суспензия, рН = 7,2, t = 20 °С). Латинские цифры J, K, L, M, N, O обозначают спектральные интермедианты бактериородопсина (БР). $^I M$ и $^{II} M$ обозначают спектральные интермедианты мета-бактериородопсина с протонированной и депротонированной альдиминной связью. Верхние индексы “с” и “t” относятся к циклам 13-цис- и 13-транс-производных бактериородопсина (БР), “L” и “D” обозначают световую и темновую формы бактериородопсина. Нижние индексы соответствуют положению максимума поглощения интермедиаторов фотоцикла (в нм). Символами 13-Z и all-E показаны изомеры бактериородопсина. H^+ _{внестр.} и H^+ _{внутр.} – внешний и внутренний протоны. $h\nu$ – квант света. Продолжительности реакций измерены в мс (миллисекундах), мкс (микросекундах) и пс (пикосекундах).

Бактериородопсин-содержащие пурпурные мембраны устойчивы к солнечному свету, воздействию кислорода, температуре более чем 80 °С (в воде) и до 140 °С (на воздухе), рН от 1–12, высокой концентрации NaCl (15–20 масс.%), действию большинства ферментов-протеаз, устойчивы к неполярным растворителям типа гексана, но чувствительны к смесям полярных органических растворителей с водой. Эти факторы имеют большое практическое значение для встраивания пурпурных мембран в полимерные наноматрицы с сохранением фотохимических свойств.

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

бактериородопсина из пурпурных мембран клеток производится комбинацией методов физико-химического разделения.

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

- 18 аминокислот: *D,L*-аланин — 0,43; *L*-аргинин — 0,4; *D,L*-аспарагиновая кислота — 0,45; *L*-цистеин — 0,05; *L*-глутаминовая кислота — 1,3; *L*-глицин — 0,06; *D,L*-гистидин — 0,3; *D,L*-изолейцин — 0,44; *L*-лейцин — 0,8; *L*-лизин — 0,85; *D,L*-метионин — 0,37; *D,L*-фенилаланин — 0,26; *L*-пролин — 0,05; *D,L*-серин — 0,61; *D,L*-треонин — 0,5; *L*-тирозин — 0,2; *D,L*-триптофан — 0,5; *D,L*-валин — 1,0 г/л;
- нуклеотиды: аденозин-5-монофосфат — 0,1; уридин-5-монофосфат — 0,1 г/л;
- соли: NaCl — 250; MgSO₄ · 7H₂O — 20; KCl — 2,0; NH₄Cl — 0,5; KNO₃ — 0,1; KH₂PO₄ — 0,05; K₂HPO₄ — 0,05; Na⁺-цитрат — 0,5; MnSO₄ · 2H₂O — 3 · 10⁻⁴; CaCl₂ · 6H₂O — 0,065; ZnSO₄ · 7H₂O — 4 · 10⁻⁵; FeSO₄ · 7H₂O — 5 · 10⁻⁴; CuSO₄ · 5H₂O — 5 · 10⁻⁵ г/л;
- глицерин — 1,0 г/л;
- ростовые факторы: биотин — 1 · 10⁻⁴; фолиевая кислота — 1,5 · 10⁻⁴; витамин В₁₂ — 2 · 10⁻⁵ г/л.

Выращивание бактерий проводили в колбах Эрленмейера вместимостью 500 мл (объем реакционной смеси — 100 мл) 3–4 сут. при 35–37 °С в условиях интенсивной аэрации (расход воздуха — 0,5–2,0 л/мин на 1 л среды) и освещении монохромными люминисцентными лампами.

По данным суточных измерений оптической плотности построены кривые бактериального роста в синтетической среде, показанные на рис. 4 (кривая 2) относительно контроля (кривая 1) на пептоновой среде. В данных экспериментальных условиях в клетке синтезируется каротиноидсодержащий фиолетовый пигмент, идентифицируемый как природный бактериородопсин по спектральному соотношению белкового и хромофорного фрагментов молекулы $D_{280}/D_{568} = 1,5 : 1$. Как показали результаты исследования, рост галобактерий *Halobacterium halobium* в синтетической среде (рис. 4, кривая 2) ингибировался незначительно по сравнению с контролем (рис. 4, кривая 1) в пептоновой среде, что существенно упрощает и удешевляет оптимизацию условий биосинтеза бактериородопсина. Они заключаются в выращивании галобактерий в синтетической среде при освещении монохромным светом с длиной волны $\lambda = 560$ нм в течение 4–5 сут при 35 °С. Существенным преимуществом является то, что в отличие от пептоновой среды, синтетическая среда не содержит в своем составе загрязняющих белковых продуктов, которые могут усложнить последующее выделение и очистку бактериородопсина.

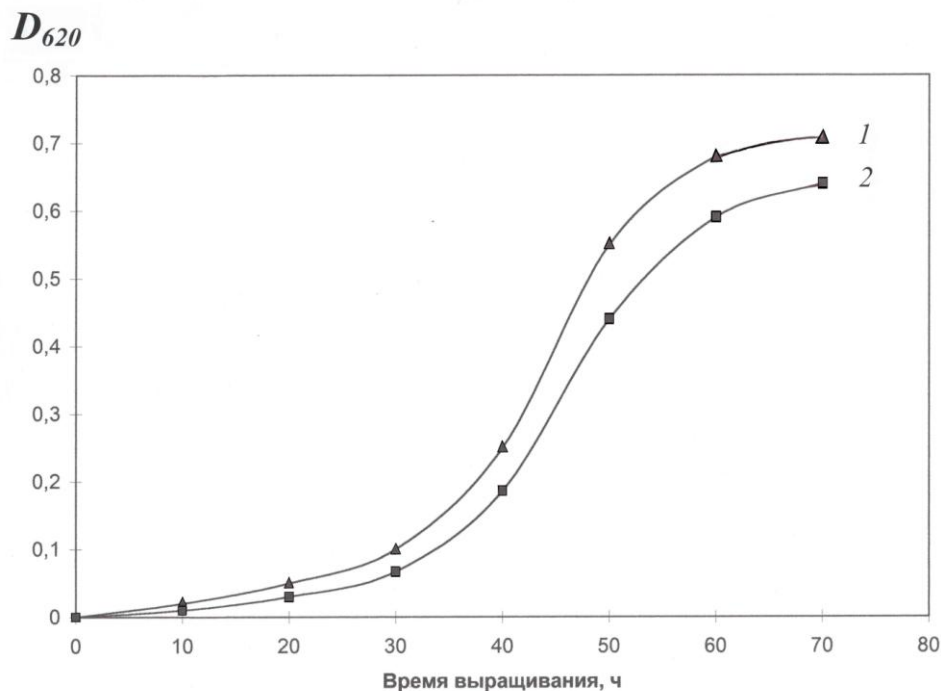


Рисунок 4. Динамика роста галобактерии *Halobacterium halobium*, измеренная по оптической плотности клеточной суспензии (D) при $\lambda = 620$ нм на спектрофотометре Beckman DU-6 (“Beckman Coulter”, США) в различных экспериментальных условиях: 1 – пептоновая среда; 2 – комплексная синтетическая среда. Условия выращивания: период инкубации 4–5 сут при 35 °С, освещение монохромным светом с длиной волны $\lambda = 560$ нм. В качестве контроля использовали пептоновую среду

Основными этапами получения бактериородопсина являлись:

- выращивание галобактерий *Halobacterium halobium* на синтетической среде;
- дезинтеграция клеток и лизис клеточных стенок;
- выделение фракции пурпурных мембран;
- очистка пурпурных мембран от низко- и высокомолекулярных примесей, клеточной РНК, каротиноидов и липидов;
- растворение пурпурных мембран в 0,5 %-ном растворе ионного детергента – додецилсульфата натрия (ДДС-Na) с образованием микроэмульсии;
- осаждение бактериородопсина из микроэмульсии метанолом;
- гель-проникающая хроматография (ГПХ) на сефадексе G-200;
- электрофорез в 12,5 %-ном полиакриламидном (ПААГ) геле с 0,1 %-ным ДДС-Na.

Поскольку выделяемый белок локализуется в пурпурных мембранах, освобождения от низкомолекулярных примесей и внутриклеточного содержимого достигали осмотическим шоком клеток дистиллированной водой на холоде после удаления 4,3 М NaCl и последующим разрушением клеточной оболочки ультразвуком с частотой 22 кГц. Последующую обработку клеточного гомогената ферментом РНК-азой I (активность – 2–3 ед. акт.) проводили для разрушения клеточной РНК. В результате получают фрагменты пурпурных мембран, содержащих бактериородопсин. Поскольку фракция пурпурных мембран наряду с выделяемым белком в комплексе с липидами и полисахаридами содержала примесь связанных каротиноидов и посторонних белков, применялись специальные методы фракционирования белка без повреждения его природной структуры и диссоциации ретинального остатка. Это существенно усложняло задачу выделения индивидуального бактериородопсина с применением методов декаротинизации и делипидизации (удаление каротиноидов и липидов), а также очистки и колоночной ГПХ на сефадексе. Декаротинизация, заключающаяся в многократной обработке суспензии пурпурных мембран 50 %-ным этанолом при -4 °С, являлась рутинным, но обязательным

этапом, несмотря на значительные потери хромопротеина. Использовалось не менее пяти обработок 50 %-ным этанолом, чтобы получить спектр поглощения суспензии очищенных от каротиноидов (4) и (5) пурпурных мембран (степень хроматографической чистоты 80–85 %), показанного на рис. 5 на различных стадиях обработки (B) и (C) относительно природного бактериородопсина (A). Образование 13-ретиальпротеинового комплекса в молекуле бактериородопсина приводит к батохромному сдвигу в спектре поглощения пурпурных мембран (рис. 5, C) – основной пик (1) при максимуме поглощения $\lambda = 568$ нм, вызванный световой изомеризацией хромофора по $C_{13}=C_{14}$ -кратной связи определяется наличием 13-*транс*-ретиального остатка в основной спектральной форме BR_{568} , дополнительный малоинтенсивный пик (2) при $\lambda = 412$ нм характеризует незначительную примесь образующейся на свету спектральной формы *мета*-бактериородопсина M_{412} с депротонированной альдиминной связью между остатком 13-*транс*-ретиала и белком, а общий для всех спектров пик (3) при $\lambda = 280$ нм определяется поглощением ароматических аминокислот (фенилаланин, тирозин, триптофан) в полипептидной цепи белка (для чистого бактериородопсина соотношение поглощений D_{280}/D_{568} равно 1,5 : 1). Данная технология биосинтеза бактериородопсина позволяет для лучшего результата контролировать содержание ароматических аминокислот – фенилаланина, тирозина и триптофана в ростовой среде штамма-продуцента, добавляемых в количествах 0,26, 0,2 и 0,5 г/л.

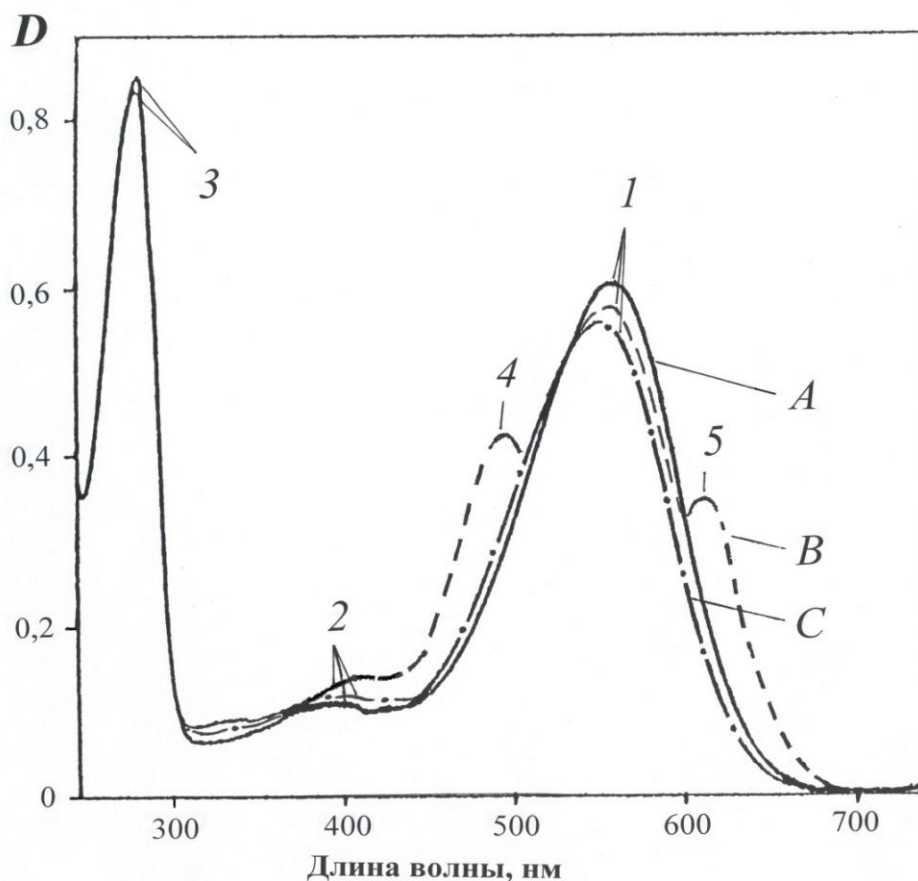


Рисунок 5. Спектры поглощения суспензии пурпурных мембран (в 50 %-м растворе этанола (в H_2O)) на различных стадиях обработки: A – природный бактериородопсин; B – пурпурные мембраны после промежуточной обработки; C – очищенные от посторонних каротиноидов пурпурные мембраны. Пик (1) соответствует основной спектральной форме бактериородопсина BR_{568} , (2) – примесь спектральной формы *мета*-бактериородопсина M_{412} , (3) – общий пик поглощения ароматических аминокислот, (4) и (5) – пики посторонних каротиноидов. В качестве контроля использовали природный бактериородопсин

Следующим необходимым этапом являлись фракционирование и тщательная хроматографическая очистка белка. Поскольку бактериородопсин, будучи трансмембранным белком, пронизывает билипидный слой в виде семи α -сегментов, применение сульфата аммония и других традиционных высаливающих агентов не дает положительного результата при выделении белка. Решение задачи заключалось в переводе белка в растворимую форму за счет коллоидного растворения (солюбилизацией) полученной фракции пурпурных мембран в 0,5 %-ном растворе ДДС-На с последующим низкотемпературным осаждением белка метанолом. Использование в качестве ионного детергента ДДС-На диктовалось необходимостью максимальной солюбилизации белка с комбинированием стадии делипидизации и осаждения в нативном (с сохранением природной конфигурации) виде, поскольку солюбилизованный в ДДС-На бактериородопсин сохраняет спиральную α -конфигурацию [11]. Поэтому отпала необходимость использования органических растворителей — ацетона, метанола и хлороформа для очистки от липидов, а делипидизация и осаждение белка совмещались в одну единственную стадию, существенно упрощающую фракционирование белка и уменьшающую его потери при выделении. Значительным преимуществом метода является, что целевой белок в комплексе с молекулами липидов и детергента распределяется в надосадочной жидкости, а другие высокомолекулярные примеси и остатки клеточных мембран — в непрореагировавшем осадке, легко отделяемом центрифугированием. Фракционирование солюбилизованного в 0,5 %-ном ДДС-На белка с его последующим выделением в кристаллическом виде проводилось в три стадии дробным осаждением метанолом при -4 °С, уменьшая концентрацию детергента от 0,5 до 0,2 и 0,1 %. Кристаллический белок (8–10 мг) промывали холодной дистиллированной водой (2×1 мл) и осаждали центрифугированием (1200 *g*, 15 мин).

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

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

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

Выводы. Данная технология биосинтеза бактериородопсина свидетельствует о достаточно высоких выходах синтезируемого продукта. В результате получено 8–10 мг чистого бактериородопсина из 1 г бактериальной биомассы галобактерий, гомогенность, степень очистки и структура которого удовлетворяет требованиям, предъявляемым для конструкции нанопленок и искусственных мембран на основе бактериородопсина. Для обеспечения более высоких выходов бактериородопсина необходимо наработать большее количество сырьевой биомассы, что можно легко достичь в лабораторных условиях. Главным достоинством является то, что выделенный данным методом бактериородопсин сохраняет природную конфигурацию и способность к фотохимическим превращениям *in vitro*, что важно для дальнейшего использования полученных образцов бактериородопсина для конструирования бактериородопсин-содержащих фотопреобразующих пленок.

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

Литература:

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

References:

1. Oesterhelt D. Rhodopsin – like protein from the purple membrane of *Halobacterium halobium* / D. Oesterhelt, W. Stoerkenius // *Nature*. 1971. V. 233, № 89. P. 149–160.
2. Hampp N. Bacteriorhodopsin and its Potential in Technical Applications / N. Hampp, D. Oesterhelt. In: *Nanobiotechnology* (Ch. Niemeyer and C. Mirkin, eds.), Wiley-VCH-Verlag, Weinheim. 2004. P. 146–167.
3. Mosin O.V. Vkluchenie deiterirovannykh aromatcheskikh aminokislot v molekulu bakteriorodopsina *Halobacterium halobium* / O.V. Mosin, D.A. Skladnev, V.I. Shvets // *Prikladnaya biokhimiya i mikrobiologiya*. 1999. T. 35, № 1. С. 34–42.
4. Vought B.W. Molecular electronics and hybrid computers / B.W. Vought, R.R. Birge (eds.). in: *Wiley Encyclopedia of Electrical and Electronics Engineering*, New-York: Wiley-Interscience, 1999. P. 477–490.
5. Lanyi J.K. Understanding structure and function in the light-driven proton pump bacteriorhodopsin / J.K. Lanyi // *Journal of Structural Biology*. 1998. V. 124. P. 164–178.
6. Mosin O.V. Sintez [2N]bakteriorodopsina, mechennogo deiteriem po ostatkam aromatcheskikh aminokislot / O.V. Mosin, V.I. Shvets, D.A. Skladnev, I. Ignatov // *Khimicheskaya tekhnologiya, izdatel'stvo "Nauka i tekhnologiya"*, Moskva. 2012. № 9. S. 553–564.
7. Grigorieff N. Electron-crystallographic refinement of the structure of bacteriorhodopsin / N. Grigorieff // *Journal of Molecular Biology*. 1996. V. 259. P. 393–421.
8. Oesterhelt D. Bacteriorhodopsin as an Example of a Light-Driven Proton Pump / D. Oesterhelt. *Angew. Chemie, Intern. Ed. Engl.* 1976. P. 16–24.
9. Ignatov I. Photoreceptors in visual perception and additive color mixing. Bacteriorhodopsin in nano- and biotechnologies / I. Ignatov, O.V. Mosin // *Advances in Physics Theories and Applications*, 2014. V. 27. P. 20–37.
10. Haupts U. General Concept for Ion Translocation by Halobacterial Retinal Proteins: The Isomerization/Switch/Transfer Model / U. Haupts, J. Tittor, E. Bamberg, D. Oesterhelt // *Biochemistry*. 1997. V. 36. № 2–7. P. 78–85.
11. Mosin O.V. Biosintez trans-membrannogo fotopreobrazuyushchego belka [2N]bakteriorodopsina, mechennogo deiteriem po ostatkam aromatcheskikh aminokislot [2,3,4,5,6-2H₅]Phe, [3,5-2H₂]Tyr i [2,4,5,6,7-2H₅]Trp / O.V. Mosin, V.I. Shvets, D.A. Skladnev, I. Ignatov // *Problemy biologicheskoi, meditsinskoi i farmatsevticheskoi khimii*. 2013. № 8. S. 29–39.
12. Mosin O.V. Biosynthesis of photochrome transmembrane protein bacteriorhodopsin of *Halobacterium halobium* labeled with deuterium at aromatic amino acids residues of [2,3,4,5,6-2H₅]Phe, [3,5-2H₂]Tyr and [2,4,5,6,7-2H₅]Trp / O.V. Mosin, I. Ignatov // *Chemistry and material research*. 2014. V. 6. № 3. P. 1–15.

УДК 577.37 + 537.86

**Природный фотопреобразующий фотохромный мембранный белок
бakteriorodopsin из пурпурных мембран галобактерии
*Halobacterium halobium***

¹ Олег Викторович Мосин

² Игнат Игнатов

¹ Московский государственный университет прикладной биотехнологии, Российская Федерация

Старший научный сотрудник кафедры биотехнологии, канд. хим. наук.

103316, Москва, ул. Талалихина, 33

E-mail: mosin-oleg@yandex.ru

² Научно-исследовательский центр медицинской биофизики (РИЦ МБ), Болгария

Профессор, доктор наук Европейской академии естественных наук (ФРГ), директор НИЦ МБ.

1111, София, ул. Н. Коперника, 32/6

Аннотация. Описана технология микробиологического синтеза природного фотопреобразующего фотохромного трансмембранного белка бактериородопсина (выход 8–10 мг) из пурпурных мембран фотооргано́трофной галобактерии *Halobacterium halobium*, способного преобразовывать световую энергию в электрохимическую энергию генерируемых протонов H^+ и аденозин-5'-трифосфорной кислоты (АТФ). Эти данные важны для наноиндустрии новых отечественных фотопреобразующих наноматериалов на основе наноплёнок из бактериородопсина и биомолекулярной электроники.

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