

Установка выращивания биокристаллов с активным управлением процессом кристаллизации

© И.Ж. Безбах¹, Б.Г. Захаров², В.И. Стрелов²,
О.В. Крицкий¹, И.Н. Радченко¹

¹КФ МГТУ им. Н.Э. Баумана, Калуга, 248000, Россия

²ФИК им. А.В. Шубникова РАН НИЦ «Космическое материаловедение»,
Калуга, 248640, Россия

Проведен анализ проблем и факторов, определяющих качество и структурное совершенство кристаллов белков. Особое внимание уделено процессам кристаллизации с использованием температуры. Рассмотрены аппаратура и методы, применяемые при кристаллизации белков в нашей стране и за рубежом. На основе проведенных исследований разработан и реализован метод управляемой кристаллизации белков, который обеспечивает оперативное разделение процессов зародышеобразования и роста образовавшихся кристаллов. Этот метод не требует большого количества растворов белков, исключает возможность повреждения кристаллов при проведении дифракционных исследований. В конструкцию оборудования заложен модульный принцип компоновки: увеличение производительности установок сводится к простому наращиванию однотипных блоков, базовая конструкция модулей допускает модернизацию и модификацию для наращивания числа ростовых ячеек и дооснащения диагностическим и контрольно-измерительным оборудованием.

Ключевые слова: белок, кристалл, рост, управление, математическое моделирование.

Теоретическая часть. Кристаллы белков используют для определения пространственной структуры этих сложных молекул методом рентгеноструктурного анализа. Данные о пространственной структуре необходимы для разработки эффективных лекарственных средств нового поколения и изучения механизмов развития заболеваний. Несмотря на значительные успехи, достигнутые в последнее время в методах получения пригодных для рентгеноструктурного анализа белковых кристаллов, именно стадия кристаллизации до сих пор остается наименее предсказуемой и часто определяет успешность всех сил и средств, затрачиваемых на исследование пространственной структуры белков.

Кристаллы белков выращивают из раствора путем его доведения до определенного пересыщения. Пересыщение σ определяется как отношение текущей концентрации белка к его концентрации в насыщенном растворе. В общем случае пересыщение может достигаться путем изменения концентрации осадителя, белка и нейтральных добавок, водородного показателя pH, температуры и других параметров. Как и в случае неорганических соединений, при достижении пересыщения система, содержащая белок, движется к состоянию рав-

новесия, при котором вещество распределяется между раствором и твердой фазой.

Условия кристаллизации белков в настоящее время выбирают в основном эмпирически, путем осуществления многочисленных проб в различных условиях (так называемый скрининг) [1–2]. При этом работа в значительной степени осложняется тем, что начало кристаллизации (зародышеобразование) требует значительно большего пересыщения раствора белка (до 5–10 раз), чем последующий рост образовавшихся зародышей. По этой причине большое значение имеет реализация таких методов кристаллизации, которые позволяли бы управлять пересыщением белкового раствора как в процессе зарождения, так и последующего разращивания кристаллов [3]. В силу сложившихся обстоятельств большую часть экспериментов по кристаллизации белков выполняют при отсутствии необходимой информации о ходе процесса кристаллизации. В среднем в 20...40 % опытов кристаллы вообще не могут быть получены или оказываются значительно худшего качества по сравнению с аналогами.

Зародышеобразование (нуклеация) — первая стадия фазового перехода — во многом определяет последующие результаты. Между тем образование зародышей требует большого пересыщения, что при дальнейшем разращивании приводит к большим скоростям роста и, как следствие, отрицательно сказывается на качестве кристаллов. В идеальном случае сразу после зарождения зародыша следует понижать уровень пересыщения для перехода в оптимальную область роста. На практике этот момент неизвестен, переход чаще происходит, когда зародыш еще не образовался или же образовалось множество зародышей. На данный момент знания о геометрии, размерах и структуре зародышей на ранних стадиях развития далеки от понимания и открыты для дальнейших исследований. Также время индукции, определяемое как время от создания пересыщения до образования зародышей критического размера, трудно измерить экспериментально, но можно измерить время инкубации, т. е. временной интервал от установления пересыщения до появления первых зародышей достаточного размера, чтобы зафиксировать их появление. Что же касается земных и космических условий, то общих закономерностей, описывающих времена инкубации в космосе и в тех же условиях на Земле, до сих пор не выявлено.

Для выращивания кристаллов биологических макромолекул любым из применяемых в настоящее время методов требуется предварительное исследование условий, в которых образование таких кристаллов вообще возможно. Как в отечественной, так и в мировой практике это чаще всего делается путем эмпирического варьирования ионного состава среды, ее водородного показателя рН, концентрации осадителя и температуры. Такие измерения выполняют либо вручную, либо с помощью серийных автоматизированных установок. Проведение же длительных экспериментов, связанных с варьиро-

ванием температуры в заданном режиме при непрерывном наблюдении за состоянием кристаллизационной пробы, в обычных лабораторных условиях затруднительно. Все это препятствует широкому внедрению метода температурно-управляемой кристаллизации, несмотря на большие возможности, которые он предоставляет для управления процессом формирования кристалла как на стадии зародышеобразования, так и на стадии его последующего роста [4–5]. Таким образом, представляет интерес разработка оборудования и методики измерения температурно-концентрационных диаграмм растворимости биомакромолекул, позволяющих проводить эти эксперименты в лабораторных условиях. Знание таких диаграмм растворимости для данной кристаллизационной системы позволяет составить алгоритм автоматического изменения температуры, позволяющий по определенному закону приближаться к требуемому пересыщению, регулируя количество зародышей и скорость роста кристаллов.

Решение масштабных задач по кристаллизации тысяч белков с высоким разрешением возможно лишь при использовании автоматизированного оборудования с активным управлением процессом кристаллизации, оснащенного системами диагностики и видеонаблюдения. При этом вследствие ограниченности ресурсов и высокой стоимости экспериментов в космосе подавляющую часть экспериментов выполняют на Земле. В условиях микрогравитации эксперименты следует проводить для исследования механизмов и кинетики процессов кристаллизации и параллельно для получения кристаллов белков с таким совершенством структуры, которое необходимо для решения прикладных задач по развитию новых методов диагностики и разработке лекарственных средств. Такая постановка задачи подтверждается и тем, что сейчас на Международной космической станции задействованы исследовательские установки PCDF Европейского космического агентства (ESA) и PCRF Японского космического агентства (JAXA), оснащенные современным диагностическим и измерительным оборудованием для контроля температуры с точностью до $\pm(0,1...0,5)^\circ\text{C}$. Проведение космических экспериментов дает возможность получать кристаллы белков с более высоким пространственным разрешением (до 0,1 нм) и точно определять активные центры биомакромолекул для создания высокоэффективных лекарственных препаратов.

Температура является существенным физическим параметром при кристаллизации белков, поскольку она непосредственным образом влияет на их растворимость. Из анализа литературных данных можно сделать вывод о том, что растворимость используемого как модельный белка лизоцима при $\text{pH} = 4,5$ и $2...3\%$ NaCl меняется на порядок по величине при изменении температуры в диапазоне $10...30^\circ\text{C}$ [4]. Аналогичные данные приводят для канавалина, инсулина и альбумина [5]. Как правило, растворимость большинства бел-

ков повышается с ростом температуры, но такие белки, как лошадиный альбумин, более растворимы с понижением температуры (ретроградная растворимость). Однако для белков, не кристаллизовавшихся ранее, данные по растворимости как функции температуры принципиально неизвестны.

Как было показано ранее [3, 6], способ температурного управления процессом кристаллизации белков является значительно более технологичным и более эффективным для выращивания высокосовершенных кристаллов по сравнению с традиционными методами. При этом исключается конвекция в растворе, практически устраняется влияние вибраций на процессы кристаллизации и таким образом в земных условиях обеспечивается максимально возможное приближение к диффузионным условиям тепломассопереноса в растворе белка, а в космических — диффузионный режим, т. е. условия самоорганизации макромолекул белка при встраивании их в кристаллическую решетку. Процесс кристаллизации макромолекул становится управляемым и воспроизводимым.

Практическая часть. Решение поставленных задач получения высокосовершенных биокристаллов в земных и космических условиях, по нашему мнению, возможно лишь при использовании автоматизированных установок с активным управлением процессом кристаллизации, оснащенных системами диагностики и видеонаблюдения при контроле температуры до $\pm(0,1 \dots 0,2)^\circ\text{C}$. Использование температуры как средства контроля и управления процессом зарождения и кристаллизации белков (и разработка на этом методе ростового оборудования) предпочтительно по многим причинам, из которых ключевой является возможность целенаправленно менять пересыщение белка.

Для реализации предлагаемого метода в ФИК РАН НИЦ КМ проработаны и реализованы возможные варианты компоновки оборудования для проведения в автоматическом режиме экспериментов по росту кристаллов белков методом управляемой кристаллизации.

Основная идея метода такова. Капилляр с раствором белка помещают в термостат, в объеме которого посредством термоэлектрических модулей Пельтье устанавливают требуемую для роста кристаллов температуру T_2 , заданную в представляющем интерес диапазоне $0 \dots 40^\circ\text{C}$. Одновременно локально в одной точке капилляра посредством отдельного элемента Пельтье устанавливают другую температуру T_1 , благоприятную для образования зародышей. При этом температура T_1 может быть задана как ниже T_2 — для белков типа лизоцима с нормальной зависимостью растворимости от температуры, так и выше T_2 — при кристаллизации белков типа альбумина с ретроградной (понижающейся с повышением температуры) растворимостью. В земных условиях предпочтительным является горизонтальное расположение капилляра (тем самым устраняется проблема оса-

ждения и минимизируется развитие термогравитационной конвекции). После образования одного или нескольких зародышей во всем объеме капилляра либо устанавливается одна и та же температура T_2 , которая остается неизменной в течение всего последующего процесса роста, либо T_1 и T_2 могут плавно меняться по определенной программе для компенсации истощения раствора по мере роста кристалла. Применение такой методики позволяет гарантированно разделить процессы зародышеобразования и дальнейшего роста кристалла путем изменения степени пересыщения.

В ходе экспериментов было установлено, что уже первый экспериментальный образец аппаратуры для кристаллизации биоматериалов позволил осуществлять прецизионное управление градиентом температуры в ячейках капиллярного типа, исключая образование зародышей по всему объему раствора. Полученные экспериментально кристаллы модельного белка лизоцима показали высокое совершенство структуры, установленное с применением рентгенодифракционных исследований, что подтвердило эффективность метода [6].

Конструктивно были возможны два варианта компоновки оборудования: моноблочный и двухблочный. Моноблочный вариант содержал автономный герметичный модуль «Биорост-1» с интегрированной электронной системой управления и измерения (ЭСУИ). Установка «Биорост-1» включала в себя технологический блок кристаллизатора, капилляр с раствором белка (объем раствора 10...15 мкл), систему автоматизированного управления процессом роста и систему визуального контроля с использованием микроскопа. ЭСУИ предназначена для управления процессом эксперимента, сбора и предварительной обработки данных с различных датчиков, накопления результатов эксперимента и передачи их в компьютер. В моноблочной конструкции система автоматизированного управления установкой, способная поддерживать температуру в диапазоне 0...40 °С, размещена в одном корпусе с блоком кристаллизатора и содержит платы ключей, процессора и аналого-цифрового преобразователя; широтно-импульсный модулятор; усилители; силовой разъем; интерфейсные разъемы для связи с персональным компьютером. В технологическом отсеке размещены термоэлектрические модули Пельтье, термосопротивления и термодатчики, медный конус, капилляр, интерфейсный разъем. Анодированные алюминиевые радиаторы установлены снаружи (рис. 1).

Капилляр, подсвечиваемый светодиодом, находится в левой части корпуса, а в правой части располагается управляющая электроника. Капилляр контактирует с медным конусом (пьедесталом), создающим перепад температур в данной точке. Управляющими параметрами являются две температуры: всего корпуса и конуса, которые могут быть установлены независимо в диапазоне 0...40 °С с шагом 0,1 °С. При практических экспериментах корпус работает как термостат, а конус — как источник или сток теплоты в зависимости от режима работы.



Рис. 1. Опытный образец кристаллизатора «Биорост-1»

В дальнейшем по результатам проведенных экспериментов были сделаны определенные выводы и проведена модернизация установки «Биорост-1»: улучшена теплоизоляция технологического блока; изменена конструкция металлического корпуса и способ установки элементов Пельтье для повышения однородности распределения температуры в объеме термостата; изменена конструкция пьедестала в целях размещения большего количества капилляров и возможности создания температурного градиента по его длине для одновременного проведения экспериментов в разных температурных условиях.

Двухблочный вариант приведен на рис. 2. Технологический блок и ЭСУИ размещены в отдельных корпусах и соединены комплектом силовых и интерфейсных кабелей. Данный вид конструктивного исполнения аппаратуры дает возможность при необходимости установить два или несколько технологических блоков при использовании одного многоканального блока ЭСУИ, давая заметный выигрыш по массогабаритным показателям. При этом принципиальная схема осталась практически неизменной, хотя отдельные блоки были доработаны и проведена замена ряда электронных компонентов. Габаритные размеры технологического модуля составили $180 \times 150 \times 100$ мм, электронного — $200 \times 145 \times 80$ мм; суммарная масса 2,55 кг.

На опытном образце блока-кристаллизатора «Биорост-2» проведена серия экспериментов по кристаллизации ряда белков в капиллярах, выращены единичные кристаллы лизоцима размером до 1,5 мм с высоким структурным совершенством (дифракционное разрешение 0,16 нм на излучении 0,154 нм) и альбумина размером 0,9 мм (дифракционное разрешение 0,16 нм на излучении 0,154 нм) [7].

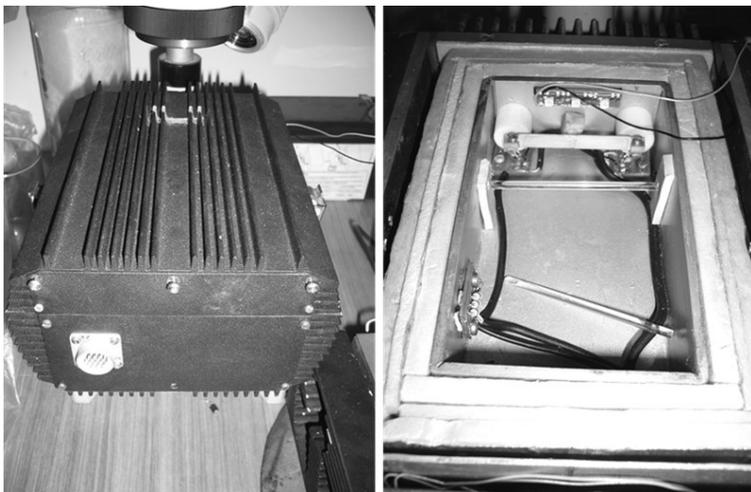


Рис. 2. Опытный образец кристаллизатора «Биорост-2»

Выводы. Предложенный и практически реализованный авторами способ температурного управления процессами кристаллизации белка является значительно более технологичным и эффективным для выращивания высокосоввершенных кристаллов по сравнению с традиционными методами. Процесс кристаллизации при этом становится управляемым и воспроизводимым.

ЛИТЕРАТУРА

- [1] Куранова И.П. Кристаллизация белков на земле и в невесомости. *Поверхность. Рентгеновские, синхротронные и нейтронные исследования*, 2004, № 7, с. 4–12.
- [2] Chayen N.E. Turning protein crystallisation from an art into a science. *Current Opinion in Structural Biology*, 2004, vol. 14, pp. 577–583.
- [3] Безбах И.Ж., Косушкин В.Г., Захаров Б.Г., Стрелов В.И., Артемьев В.К., Гинкин В.П., Фоломеев В.И. Оптимизация роста кристаллов белков с применением метода теплового управления. *Методы исследования и проектирования сложных технических систем. Сб. ст. (Труды МГТУ № 592)*. Москва, Изд-во МГТУ им. Н.Э. Баумана, 2006, с. 18–26.
- [4] Rosenberger F., Howard S.B., Sowers J.W., Nyce T.A. Temperature dependence of protein solubility — determination and application to crystallization in X-ray capillaries. *Journal of Crystal Growth*, 1993, vol. 129, pp. 1–12.
- [5] Luft J.R., Rak D.M., DeTitta G.T. Microbatch macromolecular crystallization on a thermal gradient. *Journal of Crystal Growth*, 1999, vol. 196, pp. 447–449.
- [6] Стрелов В.И., Захаров Б.Г., Безбах И.Ж., Сосфенов Н.И. Кристаллизация белка лизоцима в прецизионно-управляемом градиенте температуры. *Кристаллография*, 2008, т. 53, № 1, с. 145–148.
- [7] Безбах И.Ж., Стрелов В.И., Захаров Б.Г. Рентгенодифракционная характеристика кристаллов белков, выращенных методом управления температурой. *Современные методы анализа дифракционных данных и актуальные проблемы рентгеновской оптики. Материалы VI Междунар. науч. семинара*. 19–27 августа 2013 г. Великий Новгород, 2013, с. 206–208.

Статья поступила в редакцию 03.04.2014

Ссылку на эту статью просим оформлять следующим образом:

Безбах И.Ж., Захаров Б.Г., Стрелов В.И., Крицкий О.В., Радченко И.Н. Установка выращивания биокристаллов с активным управлением процессом кристаллизации. *Инженерный журнал: наука и инновации*, 2014, вып. 3. URL: <http://engjournal.ru/catalog/bio/hidden/1249.html>

Безбах Илья Жанович родился в 1978 г., окончил КФ МГТУ им. Н.Э. Баумана в 2001 г. Канд. физ.-мат. наук, доцент кафедры «Физика» КФ МГТУ им. Н.Э. Баумана. Область научных интересов: рост кристаллов, физика твердого тела. e-mail: biz001@mail.ru

Захаров Борис Георгиевич родился в 1937 г., окончил ЛГУ им. А.А. Жданова в 1959 г. Д-р техн. наук, главный научный сотрудник ФИК им. А.В. Шубникова РАН НИЦ «Космическое материаловедение». Область научных интересов: рост кристаллов, физика твердого тела. e-mail: zakharov@kaluga.rosmail.com

Стрелов Владимир Иванович родился в 1952 г., окончил МИЭТ в 1976 г. Д-р физ.-мат. наук, директор ФИК им. А.В. Шубникова РАН НИЦ «Космическое материаловедение». Область научных интересов: рост кристаллов, физика твердого тела. e-mail: strelovvi@kaluga.ru

Крицкий Олег Владиславович родился в 1993 г., студент 4-го курса КФ МГТУ им. Н.Э. Баумана, специальность 210201 «Проектирование и технология радиоэлектронных средств». e-mail: jungarik93@list.ru

Радченко Ирина Николаевна родилась в 1961 г., окончила ЛПИ им. М.И. Калинина в 1984 г. Канд. физ.-мат. наук, доцент кафедры «Физика» КФ МГТУ им. Н.Э. Баумана. Область научных интересов: физическая электроника, физика твердого тела. e-mail: rin-kf@yandex.ru

Biocrystal growth apparatus installing with active control of the crystallization process

© I.Zh. Bezbakh¹, B.G. Zakharov², V.I. Strelov², O.V. Kritskiy¹,
I.N. Radchenko¹

¹Kaluga Branch of Bauman Moscow State Technical University, Kaluga, 248000, Russia

²"Space Materials" Science and Research Center of Shubnikov Institute of Crystallography, Russian Academy of Sciences, Kaluga, 248640, Russia

The main purpose of the article is to analyze the problems and factors determining the quality and structural perfection of protein crystal. Special attention is paid to crystallization processes by means of temperature. We consider the equipment and methods of protein crystallization employed in our country and abroad. The findings of this research led to developing a method of controlled protein crystallization, which allows real-time division of nucleation and crystal growth processes. This method does not require large amounts of protein solutions and excludes the possibility of crystal damage during diffraction studies. The construction of such apparatus implements a modular principle: better throughput is achieved by aggregation of single-type blocks. Their basic design allows modernizing and upgrading for increasing the number of growth cells and using diagnostic and test equipment.

Keywords: protein, crystal, growth, control, mathematical modeling.

REFERENCES

- [1] Kuranova I.P. *Poverkhnost'. Rentgenovskie, sinkhrotronnye i neitronnye issledovaniya — The Journal of Surface Investigation. X-ray Synchrotron and Neutron Techniques*, 2004, no. 7, pp. 4–12.
- [2] Chayen N.E. *Current Opinion in Structural Biology*, 2004, vol. 14, pp. 577–583.
- [3] Bezbakh I.Zh., Kosushkin V.G., Zakharov B.G. Optimizatsiya rosta kristallov belkov s primeneniem metoda teplovogo upravleniya [Optimization of protein crystal growth using the method of thermal control]. *Metody issledovaniya i proektirovaniya slozhnykh tekhnicheskikh sistem. Sb. statei* (Trudy MGTU № 592). [Research and design methods of complex technical systems. Collection of articles (MSTU Proc. No. 592)]. Moscow, Bauman MSTU Publ., 2006, pp. 18–26.
- [4] Rosenberger F., Howard S.B., Sowers J.W., Nyce T.A. *Journal of Crystal Growth*, 1993, vol. 129, pp. 1–12.
- [5] Luft J.R., Rak D.M., DeTitta G.T. *Journal of Crystal Growth*, 1999, vol. 196, pp. 447–449.
- [6] Strelov V.I., Zakharov B.G., Bezbakh I.Zh. *Kristallografiya — Crystallography*, 2008, vol. 53, no. 1, pp. 145–148.
- [7] Bezbakh I.Zh., Strelov V.I., Zakharov B.G. Rentgenodifraktsionnaya kharakterizatsiya kristallov belkov, vyrashchennykh metodom upravleniya temperaturoi [XRD characterization of protein crystals grown by temperature control]. *Sovremennye metody analiza difraktsionnykh dannykh i aktual'nye problemy rentgenovskoi optiki: materialy VI-go mezhdunarodnogo nauchnogo seminarra 19–27 avgusta 2013 g.* [Modern methods of diffraction data analysis and actual problems of X-ray optics: Materials of the VI International Scientific Seminar 19–27 August 2013], Veliky Novgorod, 2013, pp. 206–208.

Bezbakh I.Zh. (b. 1978) graduated from Kaluga Branch of Bauman Moscow State Technical University in 2001. Ph.D., Assoc. Professor of the Physics Department at KB of Bauman MSTU. Author of several articles on the methods and apparatus of growing crystals (semiconductors, crystals of biological materials). e-mail: biz001@mail.ru

Zakharov B.G. (b. 1937) graduated from Leningrad State University named after A.A. Zhdanov. Dr. Sci. (Eng.), Chief researcher of "Space Materials" Science and Research Center of Shubnikov Institute of Crystallography, Russian Academy of Sciences. Author of over 200 scientific papers in the fields of crystal growth and solid state physics. e-mail zakharov@kaluga.rosmail.com

Strelov V.I. (b. 1952) graduated from National Research University of Electronic Technology. Dr. Sci. (Phys.-Math.), Director of "Space Materials" Science and Research Center of Shubnikov Institute of Crystallography, Russian Academy of Sciences. Author of over 150 scientific papers in the fields of crystal growth and solid state physics. e-mail strelovvi@kaluga.ru

Kritskii O.V. (b. 1993), 4th year student of Kaluga Branch of Bauman Moscow State Technical University, specialty 210201 "Design and technology of radio electronic devices". Research interests correspond to the future profession. e-mail: jungarik93@list.ru

Radchenko I.N. (b. 1961) graduated from the Leningrad Polytechnic Institute named after M.I. Kalinin. Ph.D., Assoc. Professor of the Physics Department, Kaluga Branch of Bauman Moscow State Technical University. Author of more than 40 scientific papers in the areas of electronics and solid-state physics. e-mail: rin-kf@yandex.ru