

Установка для выращивания кристаллов белков в земных и космических условиях с активным управлением процессом кристаллизации

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

¹Калужский филиал МГТУ им. Н.Э. Баумана, Калуга, 248000, Россия

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

Кристаллизация биоматериалов в настоящее время необходима в биологии и медицине для определения пространственных структур органических молекул кристаллографическими методами, что в дальнейшем позволяет проводить как синтез новых веществ с требуемыми свойствами, так и решать некоторые фундаментальные вопросы функционирования живых систем в целом. Одним из важнейших факторов, определяющих успех этих исследований, являются процессы роста биокристаллов, осуществляемые не только в наземных, но и в космических экспериментах. Способ температурного управления процессами кристаллизации белка является значительно более технологичным и более эффективным для выращивания высокосовершенных кристаллов по сравнению с традиционными методами, при этом исключается конвекция в растворе, а также практически устраняется влияние вибраций на процессы кристаллизации, и таким образом в земных условиях обеспечивается максимально возможное приближение к диффузионным условиям тепло-массопереноса в растворе белка, а в космических условиях — диффузионный режим, т. е. условия самоорганизации макромолекул белка при встраивании их в кристаллическую решетку. При этом процесс кристаллизации макромолекул становится управляемым и воспроизводимым. На основе проведенного анализа сделан вывод о необходимости создания автоматизированной установки с управлением температурой процессов зарождения и кристаллизации белков как наиболее эффективной для получения высокосовершенных белковых кристаллов. На основе разработанной простой по конструкции маломассогабаритной установки-кристаллизатора проведена серия экспериментов по успешному получению качественных кристаллов белка лизоцима.

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

Введение. 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.

Выбор условий кристаллизации белков в настоящее время проводится 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 разраствивания кристаллов [3]. В силу сложившихся обстоятельств большая часть экспериментов по кристаллизации белков выполняется при отсутствии необходимой информации о ходе процесса кристаллизации. В 20...40 % опытов кристаллы вообще не были получены или оказывались значительно худшего качества по сравнению с аналогами [4, 5].

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 в силу ограниченности ресурсов и высокой стоимости экспериментов в космосе подавляющая часть экспериментов проводится на земле. В условиях микрогравитации эксперименты должны проводиться 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. Такие эксперименты ведутся уже более 25 лет. Обнадеживающие результаты первых экспериментов и государственная поддержка планируемых исследований в рамках принятых в начале 1990-х годов. долгосрочных программ космических исследований в США, Европе и Японии, стимулировали разработку современного высокопроизводительного оборудования, оснащенного развитыми системами диагностики, контроля и управления. К разработке оборудования подключились крупные аэрокосмические фирмы и научные учреждения: Дассо/Дорнье в Европе, Калифорнийский университет и Центр кристаллографических исследований в США, Национальная аэрокосмическая лаборатория и фирма Фуджицу в Японии. Космическими агентствами США, Европы, России и Японии разработано не менее 20 базовых вариантов ростовой аппаратуры, многие из которых имеют несколько модификаций. Установки раз-

личаются используемыми методами кристаллизации, оснащенностью системами диагностики, контроля и управления.

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 значение растворимости обычно используемого в качестве модельного белка лизоцима при $pH = 4,5$ и $2...3\%$ $NaCl$ меняется на порядок при изменении температуры в пределах $10...30\text{ }^{\circ}C$ [4]. Аналогичные данные приводятся для канавалина, инсулина и альбумина [5]. Как правило, растворимость большинства белков повышается с ростом температуры, однако такие белки, как лошадиный альбумин, более растворимы с понижением температуры (так называемая ретроградная растворимость). Однако для белков, не кристаллизовавшихся ранее, данные по растворимости как функции температуры принципиально неизвестны.

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

Практическая часть. Предлагаемый подход к решению проблемы кристаллизации белков с высоким совершенством структуры получаемых кристаллов заключается в реализации метода управляемой кристаллизации, обеспечивающего управление процессом роста кристаллов как на этапе их зародышеобразования, так и в процессе кристаллизации. В земных условиях этот метод обеспечивает приближение к диффузионному массопереносу, а в условиях невесомости — чисто диффузионный механизм массопереноса при исключении конвекций любого вида с прецизионной $\pm 0,1...0,2^{\circ}C$ локальной стабилизацией температуры и управлением ею в ходе процесса кристаллизации. Это обеспечивает условия самоорганизации молекул белка при встраивании их в кристаллическую решетку и позволяет реализовать высокое совершенство выращиваемых кристаллов. При этом в невесомости появляется возможность оптимизировать массоперенос, обусловленный возникновением концентрационной неоднородности вокруг растущего кристалла. Отсутствие конвекции в процессе кри-

сталлизации позволяет также минимизировать влияние вибраций на процессы кристаллизации.

Управление процессом кристаллизации осуществляется путем:

- задания и прецизионного поддержания требуемой температуры всего раствора белка в капилляре;
- поддержания с точностью $\pm 0,1 \dots 0,2$ °С в локальной точке капилляра с раствором соответствующей температуры для обеспечения необходимого пересыщения для зарождения единичных (1 — 2) центров кристаллизации;
- управления температурой в локальной точке капилляра и, соответственно, пересыщения в процессе разращивания кристалла из образовавшегося зародыша.

Основная идея реализованного метода показана на рис. 1. Капилляр с раствором белка помещается в термостат, в объеме которого посредством термоэлектрических модулей Пельтье устанавливается требуемая для роста кристаллов температура T_2 , которую можно задать в диапазоне $0 \dots 40$ °С. Одновременно локально в одной точке капилляра посредством отдельного элемента Пельтье устанавливается другое значение температуры T_1 , благоприятное 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 седиментации и минимизируется развитие термогравитационной конвекции. После образования одного или нескольких зародышей во всем объеме капилляра устанавливается или одна и та же температура T_2 , которая остается неизменной в течение всего последующего процесса роста, или могут плавно меняться по определенной программе как T_1 , так и T_2 для компенсации истощения раствора по мере роста кристалла. Применение такой методики позволяет разделить процессы зародышеобразования и

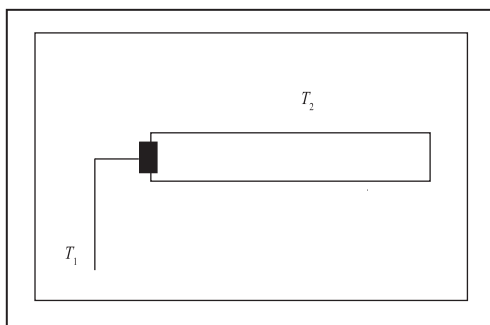


Рис. 1. Схематическое изображение кристаллизационной ячейки с капилляром

дальнейшего роста кристалла путем изменения степени пересыщения, которая для этих двух стадий может отличаться в 5 — 10 раз.

Циклограмма эксперимента включает несколько фаз:

- выход установки на рабочий режим при температуре T_1 в точке и температуре T_2 всего раствора;

- выдержку при заданных температурах до появления первых зародышей;

- регулируемое управление температурой в точке и всего объема раствора до роста кристалла размером 0,5 ... 1,0 мм.

На основе проведенных исследований и экспериментов была разработана простая по конструкции маломассогабаритная (массой до 5 кг и объемом 4...5 дм³) ростовая установка, обеспечивающая в течение одного цикла рост кристаллов белков в капиллярах при минимальном расходе растворов белков.

В результате оптических и рентгеновских исследований выращенных кристаллов лизоцима, проведенных в Институте кристаллографии РАН, установлено, что во всех капиллярах вырастают монокристаллы лизоцима и во всех капиллярах получены кристаллы высокого качества с дифракционным разрешением не хуже 1,54 Å, т. е. с предельным разрешением, которое достижимо на лучшем имеющемся в институте рентгеновском оборудовании. Полученные кристаллы лизоцима, находящиеся с раствором в капиллярах, имели различные размеры в разных капиллярах и разное количество: от одного крупного кристалла около 1 мм³ до 3 — 5 кристаллов размерами 0,2...0,3 мм³ в большинстве капилляров, а в одном капилляре их было несколько десятков малого размера в сотых долях мм³.

Высокий уровень совершенства структуры больших и малых по размеру кристаллов — все они проявляют дифракционное разрешение не хуже 1,54 Å — свидетельствует о нормальном температурно-управляемом без спонтанной кристаллизации процессе роста кристаллов.

Различные размеры и количество выращенных кристаллов в разных капиллярах свидетельствует лишь о различии точечных тепловых контактов поверхности капилляров с пьедесталами, специально охлаждаемыми для создания единичных на каждый капилляр центров ускоренного зародышеобразования и дальнейшего разрастания единичных кристаллов. В целях экономии при кристаллизации дорогостоящих белков и ускорения процессов зародышеобразования при выращивании кристаллов белков целесообразно дальнейшее конструктивное и технологическое совершенствование теплового точечного контакта и теплопереноса в нем для обеспечения точечного зародышеобразования и дальнейшего разрастания на нем более крупного и совершенного по структуре кристалла вместо возможного спонтанного зарождения многочисленных зародышей и далее кристаллов по всему объему капилляров.

На рис. 2 приведена дифракционная картина кристалла лизоцима, выращенного в капилляре в земных условиях при температурном управлении процессом кристаллизации и при хорошем тепловом кон-

также ножа с пониженной температурой с поверхностью капилляра. Как видно из дифракционной картины, дифракционное разрешение у кристалла не хуже $1,54 \text{ \AA}$, т. е. метод капиллярного выращивания кристаллов с температурным управлением процессом кристаллизации позволяет по степени совершенства получаемых кристаллов в земных условиях приблизиться к результатам, получаемым в космических условиях [7]. Это и есть важнейший результат применения данного метода температурного управления процессом кристаллизации.

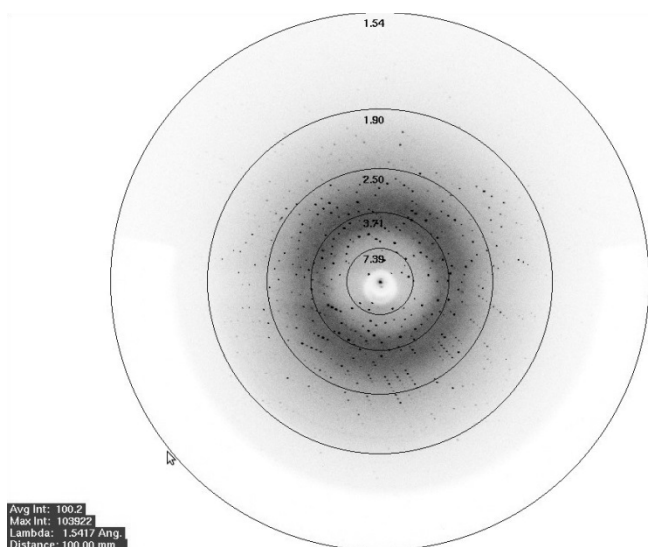


Рис. 2. Рентгенодифракционная картина для кристалла лизоцима, выращенного в земных условиях эксперимента

Выводы. Предложенный и практически реализованный авторами способ температурного управления процессами кристаллизации белка является значительно более технологичным и более эффективным для выращивания высокосовершенных 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, № 6, с. 4–12.
- [2] Chayen N.E. Turning protein crystallization 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., De Titta 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: мат. VI Междунар. науч. семинара, 19–27 августа 2013 г.* Великий Новгород, Изд-во НФ СПбГУСЭ, 2013, с. 206–208.

Статья поступила в редакцию 27.11.2014

Ссылку на эту статью просим оформлять следующим образом:

Безбах И.Ж., Радченко И.Н., Захаров Б.Г., Стрелов В.И. Установка для выращивания кристаллов белков в земных и космических условиях с активным управлением процессом кристаллизации. *Инженерный журнал: наука и инновации*, 2015, вып. 1. URL: <http://engjournal.ru/catalog/fundamentals/physics/1357.html>

Безбах Илья Жанович родился в 1978 г., окончил Калужский филиал МГТУ им. Н.Э. Баумана. Канд. физ.-мат. наук, доцент кафедры «Физика» Калужского филиала МГТУ им. Н.Э. Баумана. Автор более 20 статей по методам и аппаратуре выращивания кристаллов (полупроводники, кристаллы биологических материалов). e-mail: biz001@mail.ru

Радченко Ирина Николаевна родилась в 1961 г., окончила Ленинградский политехнический институт им. М.И. Калинина. Канд. физ.-мат. наук, доцент кафедры «Физика» Калужского филиала МГТУ им. Н.Э. Баумана. Автор более 40 научных работ в области физической электроники и физики твердого тела. e-mail: rin-kf@yandex.ru

Захаров Борис Георгиевич родился в 1937 г., окончил Ленинградский государственный университет им. А.А. Жданова. Д-р техн. наук, главный научный сотрудник Филиала Института кристаллографии им. А.В. Шубникова РАН НИЦ «Космическое материаловедение». Автор более 200 научных работ в области роста кристаллов и физики твердого тела. e-mail: zakharov@kaluga.rosmail.com

Стрелов Владимир Иванович родился в 1952 г., окончил Московский институт электронной техники. Д-р физ.-мат. наук, директор Филиала Института кристаллографии им. А.В. Шубникова РАН НИЦ «Космическое материаловедение». Автор более 150 научных работ в области роста кристаллов и физики твердого тела. e-mail: strelovvi@kaluga.ru

Installation for growing protein crystals under terrestrial and space conditions with active crystallization process control

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

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

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

Crystallization of biomaterials is necessary in biology and medicine for determination of spatial structures of organic molecules by crystallographic methods that further allows to carry out the synthesis of new substances having the desired properties, and to solve some fundamental problems of functioning live systems in general. One of the major factors determining success of this research is the processes of biocrystal growth implemented not only during earth-based experiments, but also in space. A method of temperature controlling protein crystallization processes is much more technologically advanced and more effective for growing highly perfect crystals in comparison with traditional methods. In this method convection in the solution is excluded, and the influence of vibration on the crystallization process is virtually eliminated. This way in terrestrial conditions the best possible approximation to the diffusion conditions of heat and mass transfer in the protein solution is ensured, and in the space environment the diffusion mode is achieved, i.e., conditions of protein macromolecule self-organization are provided during their embedding into a crystal lattice. Thus the process of macromolecule crystallization becomes controllable and reproducible. Based on the analysis performed it has been concluded that the automated equipment with temperature controlling processes of nucleation and crystallization of proteins, as the most effective for highly perfect protein crystals, should be created. On the basis of developed simple in design and low-mass-dimensional crystallization apparatus a series of experiments on the successful growth of high-quality protein crystals of lysozyme has been carried out.

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

REFERENCES

- [1] Kuranova I.P. *Poverkhnost. Rentgenovskie, sinkhrotronnye i neitronnye issledovaniya. – Surface. X-Ray, Synchrotron and Neutron Research*, 2004, no. 6, 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., Strelov V.I., Artemyev V.K., Ginkin V.P. Folomeev V.I. Optimizatsiya rosta kristallov belkov s primeneniem metoda teplovogo upravleniya [Optimization of protein crystal growth using the thermal control method]. In: *Metody issledovaniya i proektirovaniya slozhnykh tekhnicheskikh sistem: Sbornik statey (Trudy BMSTU no. 592)* [Methods of Complex Technical Systems Research and Design. Collection of articles (Proceedings of BMSTU no. 592)]. Moscow, BMSTU 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., De Titta G.T. *Journal of Crystal Growth*, 1999, vol. 196, pp. 447–449.
- [6] Strelov V.I., Zakharov B.G., Bezbakh I.Zh., Sosfenov N.I. *Kristallografiya – Crystallography*, 2008, vol. 53, no. 1, pp. 145–148.
- [7] Bezbakh I.Zh., Strelov V.I., Zakharov B.G. Rentgenodifraktsionnaya kharakterizatsiya kristallov belkov, vyraschennykh metodom upravleniya temperaturoy [X-ray diffraction characterization of protein crystals grown by temperature control]. In: *Sovremennye metody analiza difraktsionnykh dannykh i aktualnye problemy rentgenovskoy optiki: Materialy VI-go mezhdunarodnogo nauchnogo seminara, 19-27 avgusta 2013 g.* [Modern methods of diffraction data analysis and actual problems of X-ray optics: Proceedings of the International Scientific Workshop, August 19–27 августа 2013]. Velikiy Novgorod, N. Branch of St. Pet. SEU Publ., 2013, pp. 206–208.

Bezbakh I.Zh. (b.1978) graduated from Kaluga Branch of Bauman Moscow State Technical University. Ph.D., assoc. professor of the Physics Department at Kaluga Branch of BMSTU. The author of more than 20 works on methods and the equipment for crystal growth (semiconductors, crystals of biological materials). e-mail: biz001@mail.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 at Kaluga Branch of Bauman Moscow State Technical University. The author of more than 40 scientific works in physical electronics and solid state physics. e-mail: rin-kf@yandex.ru

Zakharov B.G. (b. 1937) graduated from the Leningrad state university named after A.A. Zhdanov. Dr. Sci.(Eng.), senior staff scientist at the Branch of Shubnikov Institute of Crystallography of the Russian Academy of Sciences, “Space Materials” Research Center. The author of more than 200 scientific works in crystal growth and solid state physics. e-mail: zakharov@kaluga.rosmail.com

Strelov V. I. (b. 1952) graduated from the Moscow Institute of Electronic Technology. Dr. Sci. (Phys.&Math.), director of the Branch of Shubnikov Institute of Crystallography of the Russian Academy of Sciences, “Space Materials” Research Center. The author of more than 150 scientific works in crystal growth and solid state physics. e-mail: strelovvi@kaluga.ru