



# Многоволновое аналитическое ультрацентрифугирование человеческого сывороточного альбумина, образующего комплекс с порфирином

Courtney N. Johnson | UTHSCSA, Dept. of Biochemistry and Structural Biology, San Antonio, Texas

Heidi Ramsower | UTSA, Dept. of Physics and Astronomy, San Antonio, Texas

Julio Urquidi | UTSA, Dept. of Physics and Astronomy, San Antonio, Texas

Lorenzo Brancaleon | UTSA, Dept. of Physics and Astronomy, San Antonio, Texas

Borries Demeler | UTHSCSA, Dept. of Biochemistry and Structural Biology, San Antonio, Texas

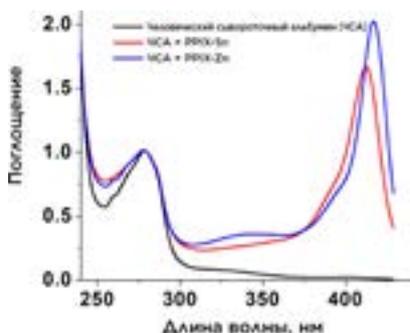
## Аннотация

Аналитическое ультрацентрифугирование (AUC) является распространенным методом для характеристики коллоидных систем в условиях физиологического раствора. Недавно был разработан новый многоволновой детектор (MWL) на аналитической ультрацентрифуге Optima AUC компании Beckman Coulter. Благодаря этому разделению впервые удалось соединить гидродинамическое разделение коллоидных смесей со спектральной деконволюцией взаимодействующих и не взаимодействующих растворенных веществ, присутствующих в смеси. В данной статье мы продемонстрируем, как можно воспользоваться преимуществами полосы поглощения Соре порфиринов, образующих комплекс с различными катионами, для деконволюции спектра разнородных оптических свойств разных молекул. Было сделано предположение, что несколько участков человеческого сывороточного альбумина (ЧСА) обладают способностью непосредственно связывать ионы металлов, а также металлоорганические соединения. Эти данные вызвали огромный интерес к физиологической роли ЧСА как к металл-связывающему белку, а также как к транспортеру при применении в синтетической биологии свойства связывания металлов (например, синтетическая кровь и преобразование солнечной энергии). Одним из наиболее интригующих и потенциально полезных из этих взаимодействий является способность ЧСА связывать гем и другие металлопорфирины. В данной статье мы продемонстрируем, как детектор MWL-AUC на аналитической ультрацентрифуге Optima AUC может исходно разделять до базовой линии даже незначительные изменения в гидродинамической форме и размере между ЧСА-PPIX и апо-ЧСА.

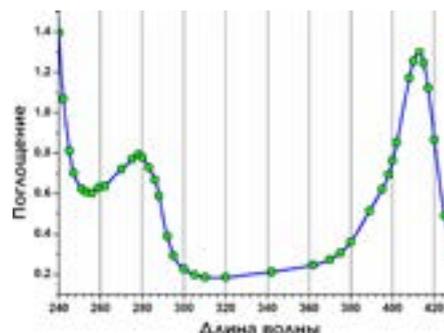
## Методы

### Связывание и очистка ЧСА-PPIX

Был использован человеческий сывороточный альбумин (ЧСА) и диметилсульфоксид (ДМСО) компании Sigma-Aldrich (Сент-Луис, штат Миссури) и хлорид олова (Sn (IV) PPIX) компании Frontier Scientific Inc. (Логан, штат Юта). Твердый Sn (IV) PPIX растворяли в ДМСО, затем разбавляли до получения базового водного раствора, содержащего <1 % ДМСО. ЧСА добавляли в этот базовый водный раствор, а затем подвергали диализу и последующему центрифугированию для получения раствора без включений.<sup>1</sup>



**Рисунок 1.** Спектры поглощения сыворотки человека (ЧСА), ЧСА + PPIX-Sn и ЧСА + PPIX-Zn



**Рисунок 2.** График измеренных длин волн (зеленые кружки) При выборе длин волн руководствовались требованием выделить области спектра, в которых поглощение имеет наибольшую степень изменения

## УФ-спектроскопия

Спектры поглощения УФ/видимой области апо-ЧСА и ЧСА, образующих комплекс с порфирином, измеряли с помощью настольного спектрофотометра. Максимальное поглощение порфиринов обнаружено в полосе Соре в диапазоне 370–420 нм. Максимальное поглощение ЧСА составляет примерно 278 нм (см. рисунок 1)1. Фактические значения использовали для определения концентрации ЧСА и мономеризованных порфиринов в каждом образце.

## Аналитическое ультрацентрифугирование

Эксперименты по скоростной седиментации проводились при скорости центрифугирования 45 000 об/мин и температуре 20 °С. Образцы помещали в ячейки, снабженные основными элементами из эпоксидной смолы и кварцевыми окошками. Дополнительные образцы измеряли в буферном растворе NaPO4 10 ммоль. Эксперименты проводили на новой аналитической ультрацентрифуге Optima AUC, оснащенной как оптикой поглощения, так и интерференционной оптикой Рэлея. 42 длины волны измерили в режиме интенсивности. Настройки длин волн должны были гарантировать, что линейная интерполяция спектра будет генерировать наименьшую разницу среднеквадратического отклонения между интерполяцией и измеренным спектром. Этот метод выделяет области спектра, в которых поглощение быстро изменяется. Для каждой длины волны были сняты 45 сканов в течение 10,5 часа.

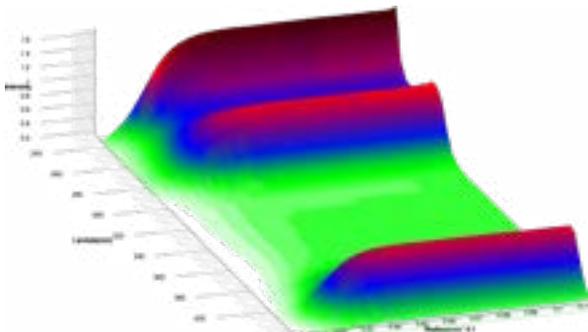
## Анализ данных MWL-AUC

Все данные проанализировали с помощью программного обеспечения UltraScan-III (версия 2352).<sup>2</sup> Данные экспериментов по скоростной седиментации отредактировали путем определения мениска, диапазона данных и плато для каждой длины волны. Мениск привели в соответствие с данными двумерного спектрального анализа (2D-СА)<sup>3</sup> с одновременным вычитанием инвариантного по времени и радиально инвариантного шума. Повторный этап 2D-СА выполняется в конце. Используя окончательную модель 2D-СА для каждой длины волны, рассчитывают синхронизированную по времени модель конечных элементов для каждой длины волны, что позволяет создать многоволновую поверхность (см. рисунки 3, 4). Полученную модель раскладывают на базовые спектральные векторы, чтобы сгенерировать новый набор данных для каждого спектрально уникального компонента (см. уравнение 1)<sup>4</sup>.

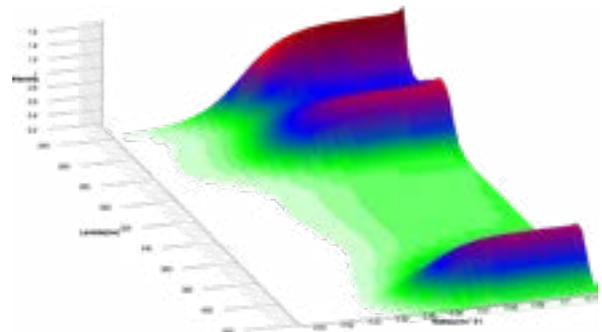
$$C_{MWL} = X_a \begin{matrix} \text{HSA} \\ \text{NNLS} \\ \left[ \begin{matrix} \epsilon_{a1} \\ \epsilon_{a2} \\ \dots \\ \epsilon_{ai} \end{matrix} \right]_{r,t} \end{matrix} + X_b \begin{matrix} \text{HSA-PPIX} \\ \left[ \begin{matrix} \epsilon_{b1} \\ \epsilon_{b2} \\ \dots \\ \epsilon_{bi} \end{matrix} \right]_{r,t} \end{matrix}$$

**Уравнение 1.** Неотрицательные наименьшие квадраты многоволнового набора данных путем разложения профилей длин волн на 2 базовых вектора, представляющих собственные спектры поглощения ЧСА и ЧСА-PPIX-Sn.

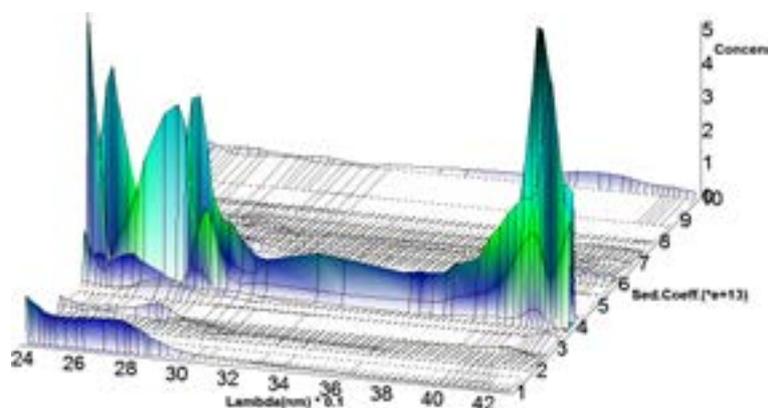
Этот метод формирует скалярную концентрацию для каждой радиальной позиции и время сканирования для каждого спектрально уникального компонента, в результате чего получают отдельные гидродинамические экспериментальные данные для каждого спектрально уникального компонента. В этом случае мы использовали спектры поглощения апо-ЧСА и ЧСА-PPIX-Sn для разделения сигналов на два спектрально отличных набора гидродинамических данных. Эти наборы данных проанализировали по методу Монте-Карло<sup>5</sup> с использованием 2D-СА или параметрически ограниченного спектрального анализа (ПОСА)<sup>6</sup>. Как показано на рисунке 5, график гидродинамики в качестве функции длины волны может выявить спектральные свойства каждого компонента<sup>7</sup>.



**Рисунок 3.** 25-е сканирование синхронизированной по времени модели конечных элементов



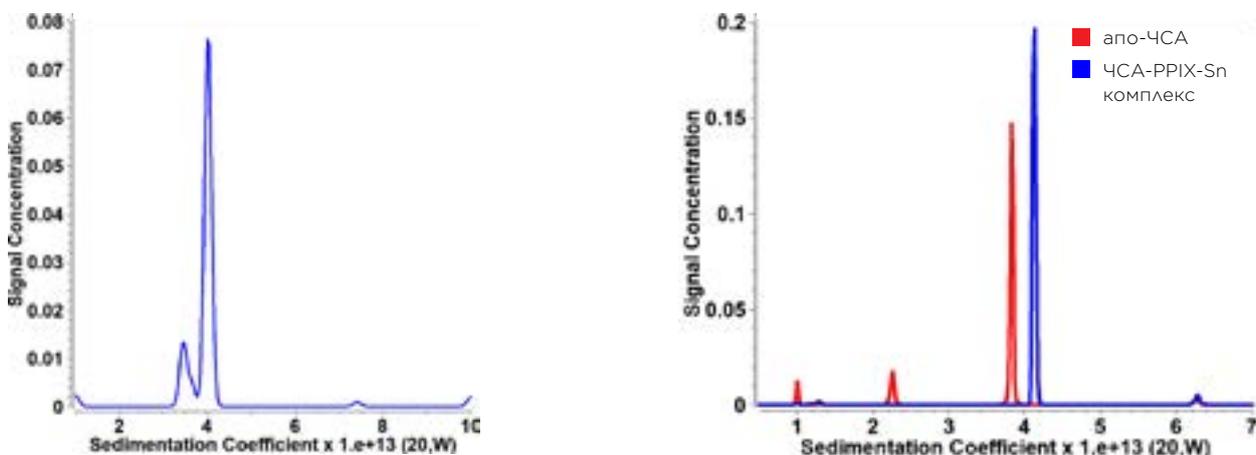
**Рисунок 4.** 50-е сканирование синхронизированной по времени модели конечных элементов



**Рисунок 5.** Гидродинамические свойства как функция длины волны, отображающая спектральные свойства

## Результаты

Цель данного исследования состояла в том, чтобы определить, можно ли достоверно отличить очищенный ЧСА-РРІХ от свободного ЧСА с помощью многоволнового АУС<sup>®</sup>. Для этого мы смешали апо-ЧСА с заранее приготовленным комплексом ЧСА-РРІХ-Sn. Результаты анализа отдельных гидродинамических наборов данных по методу Монте-Карло приведены на рисунке 6. Эти результаты демонстрируют, что разделение сигналов на два различных набора гидродинамических данных позволяет нам определять концентрацию и гидродинамические параметры для каждого спектрально уникального компонента в растворе. Эти результаты также указывают на то, что коэффициент седиментации ЧСА в комплексе с порфирином немного выше, чем коэффициент седиментации апо-ЧСА.



**Рисунок 6.** Эксперимент с одной длиной волны (278 нм) (слева) показывает два пика, но компоненты, представленные этими пиками, различить невозможно. Многоволновой эксперимент (справа) позволяет нам разделить каждый компонент до базовой линии. Это позволяет нам определить, какой пик представляет собой апо-ЧСА (выделен красным цветом), а какой — комплекс ЧСА-РРІХ-Sn (выделен синим цветом).

Разница в спектрах поглощения свободного ЧСА и ЧСА, связанного с РРІХ, можно использовать для разделения гидродинамических данных на наборы данных, представляющие каждый из двух компонентов. На рисунке 6 показана способность спектрально разделять отдельные компоненты. Даже если они гидродинамически очень схожи, с помощью этого метода их можно разделить до базовой линии, в то время как при одной длине волны (278 нм, что является пиком поглощения апо-ЧСА) видны два пика, хотя неясно, какой из них представляет собой апо-ЧСА, а какой является ЧСА-РРІХ-Sn. В результате для любого эксперимента АУС мы получаем гораздо более высокое разрешение, чем это было возможно ранее. Кроме того, в отношении смесей, содержащих несколько компонентов с разными спектрами поглощения, теперь можно получить собственные спектры затухания для каждого компонента, если они гидродинамически хорошо разделены (см. рисунки 5 и 6). Однако в этом случае два компонента, присутствующие в этой смеси,

гидродинамически очень схожи, и уникальные спектры трудно различить (рисунок 5). Очевидно, что это улучшение предоставляет новые возможности для будущих экспериментов AUC, особенно для изучения взаимодействующих систем, в которых их компоненты обладают уникальными спектральными свойствами.

## Список литературы

1. Hu J, Demeler B, Brancaleon L. Experimental and Computational Study of the Binding of Metalloporphyrins to the Metal Binding Sites of Human Serum Albumin (2017) Unpublished
2. Demeler, B Methods for the Design and Analysis of Sedimentation Velocity and Sedimentation Equilibrium Experiments with Proteins. Cur. Protoc. Prot. Sci. (2010) Chapter 7:Unit 7.13.
3. Brookes E, Cao W, Demeler B A two-dimensional spectrum analysis for sedimentation velocity experiments of mixtures with heterogeneity in molecular weight and shape. Eur Biophys J. (2010) 39(3):405-14.
4. Gorbet GE, Pearson JZ, Demeler AK, Cölfen H, and B. Demeler. Next-Generation AUC: Analysis of Multiwavelength Analytical Ultracentrifugation Data Methods in Enzymology, Aug 2015. doi:10.1016/bs.mie.2015.04.013
5. Demeler B and E. Brookes. Monte Carlo analysis of sedimentation experiments. Colloid Polym Sci (2008) 286(2) 129-137
6. Gorbet G., T. Devlin, B. Hernandez Uribe, A. K. Demeler, Z. Lindsey, S. Ganji, S. Breton, L. Weise-Cross, E.M. Lafer, E.H. Brookes, B. Demeler. A parametrically constrained optimization method for fitting sedimentation velocity experiments. Biophys. J. (2014) Vol 106(8), pp1741-1750
7. Karabudak E, Brookes E, Lesnyak V, Gaponik N, Eychmüller A, Walter J, Segets D, Peukert W, Wohlleben W, Demeler B, H Cölfen. Simultaneous Identification of Spectral Properties and Sizes of multiple Particles in Solution with sub-nm Size Resolution. Angewandte Chemie 2016 Sep 19;55(39):11770-4.
8. Zhang J, Pearson JZ, Gorbet GE, Cölfen H, Germann MW, Brinton MA, Demeler B. Spectral and Hydrodynamic Analysis of West Nile Virus RNA-Protein Interactions by Multiwavelength Sedimentation Velocity in the Analytical Ultracentrifuge. Anal Chem. 2017 Jan 3;89(1):862-870.



© 2017 Beckman Coulter, Inc. Все права защищены. Название Beckman Coulter, стилизованный логотип Beckman Coulter, знаки продукции и услуг компании Beckman Coulter, использованные в данном документе, являются товарными знаками или зарегистрированными товарными знаками компании Beckman Coulter, Inc. в США и других странах. Все остальные торговые марки являются собственностью соответствующих правообладателей.

---

ООО "Бекмен Култер", представительство Beckman Coulter Life Sciences  
ул. Станиславского, д. 21, стр. 3, Москва, Россия, 109004.  
тел. +7 (495) 228 67 00, эл. почта: [ls-russia@beckman.com](mailto:ls-russia@beckman.com), [mybeckman.ru](http://mybeckman.ru)  
CENT-3235APP11.17RU