



(51) МПК
B01J 20/22 (2006.01)
B01J 20/02 (2006.01)
B01J 20/24 (2006.01)
B01J 20/28 (2006.01)
B01J 20/32 (2006.01)

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
 ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК

B01J 20/22 (2023.02); *B01J 20/02* (2023.02); *B01J 20/24* (2023.02); *B01J 20/28* (2023.02); *B01J 20/32* (2023.02)

(21)(22) Заявка: 2022126151, 07.10.2022

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
07.10.2022

Дата регистрации:
25.04.2023

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 07.10.2022

(45) Опубликовано: 25.04.2023 Бюл. № 12

Адрес для переписки:

660036, г. Красноярск, ул. Академгородок, 50,
 ФГБНУ "Федеральный исследовательский
 центр "Красноярский научный центр
 Сибирского отделения Российской академии
 наук", Мастепако Елена Геннадьевна

(72) Автор(ы):

Красицкая Василиса Валерьевна (RU),
 Кудрявцев Александр Николаевич (RU),
 Столяр Сергей Викторович (RU),
 Ярославцев Роман Николаевич (RU),
 Герасимова Юлия Валентиновна (RU),
 Великанов Дмитрий Анатольевич (RU),
 Баюков Олег Артемьевич (RU),
 Чеканова Лидия Александровна (RU),
 Франк Людмила Алексеевна (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Федеральное государственное бюджетное
 научное учреждение "Федеральный
 исследовательский центр "Красноярский
 научный центр Сибирского отделения
 Российской академии наук" (RU)

(56) Список документов, цитированных в отчете
 о поиске: RU 2540312 C1, 10.02.2015. М. А.
 Федорчак и др., Магнитные аффинные
 сорбенты для выделения рекомбинантных
 белков / Перспективные материалы, 2015, N
 11, стр.35-44. В. В. Толмачева и др., Магнитные
 сорбенты на основе наночастиц оксидов
 железа для выделения и концентрирования
 органических соединений / Журнал
 аналитической химии, 2016, том 71, (см.
 прод.)

(54) Магнитный аффинный сорбент для выделения рекомбинантных белков

(57) Реферат:

Настоящее изобретение относится к магнитному аффинному сорбенту для выделения рекомбинантных белков, характеризующемуся тем, что состоит из крахмал-активированных магнитных наночастиц оксида железа со средним размером 11,5 нм, значением намагниченности насыщения при комнатной температуре 29,8 эме/г, температурой блокировки, близкой к комнатной температуре, один грамм которых

позволяет выделить 100-590 мг рекомбинантных МВР-содержащих гибридных белков из лизата клеток *E.coli*. Настоящее изобретение обеспечивает повышение удельной сорбционной емкости магнитного аффинного сорбента, представляющего собой крахмал-активированные магнитные наночастицы оксида железа. 2 табл., 5 ил.

(56) (продолжение):

стр.339-356. Mbolantenaina Rakotomalala Robinson et al., Starch functionalized magnetite nanoparticles: New insight into the structural and magnetic properties / Journal of Solid State Chemistry, 2019, Vol.277, pp.587-593.

R U 2 7 9 4 8 8 9 C 1

R U 2 7 9 4 8 8 9 C 1



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.

B01J 20/22 (2006.01)*B01J 20/02* (2006.01)*B01J 20/24* (2006.01)*B01J 20/28* (2006.01)*B01J 20/32* (2006.01)(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(52) CPC

B01J 20/22 (2023.02); *B01J 20/02* (2023.02); *B01J 20/24* (2023.02); *B01J 20/28* (2023.02); *B01J 20/32* (2023.02)

(21)(22) Application: **2022126151, 07.10.2022**(24) Effective date for property rights:
07.10.2022Registration date:
25.04.2023

Priority:

(22) Date of filing: **07.10.2022**(45) Date of publication: **25.04.2023** Bull. № 12

Mail address:

660036, g. Krasnoyarsk, ul. Akademgorodok, 50,
FGBNU "Federalnyj issledovatel'skij tsentr
"Krasnoyarskij nauchnyj tsentr Sibirskogo
otdeleniya Rossijskoj akademii nauk", Mastepako
Elena Gennadevna

(72) Inventor(s):

**Krasitskaia Vasilisa Valerevna (RU),
Kudriavtsev Aleksandr Nikolaevich (RU),
Stoliar Sergei Viktorovich (RU),
Iaroslavtsev Roman Nikolaevich (RU),
Gerasimova Iuliia Valentinovna (RU),
Velikanov Dmitrii Anatolevich (RU),
Baiukov Oleg Artemevich (RU),
Chekanova Lidiia Aleksandrovna (RU),
Frank Liudmila Alekseevna (RU)**

(73) Proprietor(s):

**Federalnoe gosudarstvennoe biudzhethnoe
nauchnoe uchrezhdenie "Federalnyi
issledovatel'skii tsentr "Krasnoyarskii nauchnyi
tsentr Sibirskogo otdeleniia Rossiiskoi akademii
nauk" (RU)**

(54) **MAGNETIC AFFINITY SORBENT FOR ISOLATION OF RECOMBINANT PROTEINS**

(57) Abstract:

FIELD: sorbents.

SUBSTANCE: present invention relates to a magnetic affinity sorbent for isolation of recombinant proteins, characterized in that it consists of starch-activated magnetic iron oxide nanoparticles with an average size of 11.5 nm, a saturation magnetization at room temperature of 29.8 emu/g, a blocking temperature close to room temperature, one gram of which

allows isolating 100-590 mg of recombinant MBP-containing hybrid proteins from the lysate of *E. coli* cells.

EFFECT: increased specific sorption capacity of a magnetic affinity sorbent, which is starch-activated magnetic iron oxide nanoparticles.

1 cl, 2 tbl, 5 dwg

Изобретение относится к области биотехнологии и предназначено для очистки рекомбинантных белков, представляющих практический интерес.

Одним из важнейших направлений современной биотехнологии является получение белков для биомедицинского применения с помощью бактериального синтеза. При этом решают проблемы правильного формирования пространственной структуры целевого белка, а также простой и эффективной очистки. Для повышения растворимости целевых белков методами генетической инженерии получают так называемые гибридные белки, в которых ген целевого белка слит в одной рамке считывания с генами вспомогательных полипептидов, которые обеспечивают более высокую растворимость белка в цитоплазме бактерий, а также независимое «сворачивание» целевого и вспомогательного полипептидов. Помимо этого, вспомогательные полипептиды обеспечивают быстрое выделение целевого белка с помощью хроматографии на специально созданных аффинных сорбентах [1]. В качестве вспомогательных полипептидов применяют низкомолекулярные (например, полигистидиновые, His-tag, 0.84 кДа), средней величины, например, стрептавидин-связывающий пептид (SBP-tag, 4.03 кДа) и сравнительно крупные полипептиды, среди которых одноцепочечный мальтоза-связывающий белок (maltose-binding protein, MBP, 40 кДа), выделенный из *E.coli* K12. Технологии с использованием MBP-содержащих гибридных белков использовали для получения самых разнообразных белков [2-4]. В настоящее время соответствующие плазмидные векторы для получения гибридных конструкций являются коммерчески доступными (напр., Gateway Cloning, Invitrogen). MBP широко используется в качестве партнера слияния при производстве рекомбинантного белка в бактериальных клетках для повышения уровня экспрессии, улучшения растворимости и укладки целевого белка [5], а также для обеспечения его одностадийной очистки на носителях, содержащих амилозу. Очистка проводится в физиологических условиях, а элюирование в мягких условиях сохраняет активность целевого белка. Мягкие условия позволяют очищать даже интактные белковые комплексы. Благодаря высокой специфичности связывания с MBP-сорбентом, высокая чистота элюированного белка достигается всего за один этап хроматографии [6, 7].

Для очистки MBP-содержащих гибридных белков колоночной хроматографией используют сорбенты, представляющие собой поперечно-сшитую амилозу [6], препараты которой поставляют на рынок иностранные биотехнологические фирмы (Fisher Scientific, New England BioLabs и др.).

Магнитные наночастицы (МНЧ) находят широкое применение в различных областях биотехнологических и биомедицинских исследований [8], в том числе и в качестве аффинного сорбента для выделения различных молекул-мишеней, благодаря таким важным свойствам как простота методов получения, небольшой размер (менее 100 нм), высокая площадь специфичной поверхности и, как следствие, высокая сорбционная емкость, химическая стабильность. Наличие магнитных свойств обеспечивает легкость выделения и концентрирования интересующих биомолекул с помощью магнитной сепарации в объеме. Это позволяет сократить время пробоподготовки по сравнению с другими методами очистки и концентрирования, избежать необходимости использования дорогостоящего хроматографического оборудования и колонок, а также центрифугирования и фильтрации. Среди широкого выбора магнитных наночастиц (на основе металлов Co, Fe, Ni, оксидов железа (Fe_3O_4 , Fe_2O_3), ферритов ($MgFe_2O_4$, $CoFe_2O_4$, $MnFe_2O_4$, $LiFe_5O_8$) и других, для биологических и биомедицинских приложений наночастицы оксида железа являются лучшим выбором из-за простоты их синтеза, низкой токсичности, высокой намагниченности и восприимчивости при насыщении,

биосовместимости, суперпарамагнитного действия и химической стабильности [9]. Магнитные наночастицы без покрытия имеют, тенденцию к формированию крупных комплексов (агрегированию). Для повышения стабильности МНЧ оксида железа используют различные типы покрытий: неорганические соединения (оксид кремния, углерод, благородные металлы), синтетические (ПЭГ, ПВС и др.) или природные (хитозан, полисахариды, белки, пептиды) полимеры [10], при этом область применения полученных функционализированных наночастиц становится значительно шире. Среди различных стабилизаторов или покрывающих агентов часто используются различные полисахариды из-за их химического и структурного разнообразия, что дает прекрасную возможность для разработки новых магнитных микро- или нанокомпозитов, обладающих высокой сорбционной емкостью и специфичным связыванием с выделяемым объектом. Разнообразные магнитные наночастицы, несущие такие полисахариды, как целлюлоза, хитозан, арабиногалактан, декстран и амилоза, были синтезированы и функционализированы различными биомолекулами для применения в биотехнологических и биомедицинских исследованиях [11-13].

В литературе имеются сведения о различных способах получения, физико-химических свойствах и применению МНЧ, активированных крахмалом.

В работе [14] описано получение и свойства магнитных наночастиц Fe_3O_4 , покрытых крахмалом. Для получения наночастиц авторы использовали метод химического осаждения из раствора хлоридов железа добавлением раствора аммиака. Имобилизацию крахмала на поверхность проводили инкубацией синтезированных наночастиц в приготовленном растворе крахмала (60°C, 2 часа при интенсивном перемешивании и 12 часов при комнатной температуре). Описанный метод позволяет получить покрытые крахмалом наночастицы магнетита сферической формы и диаметром около 20 нм. Авторы показали, что крахмал иммобилизуется на поверхность наночастиц за счет взаимодействия его гидроксильных групп с железом, что обеспечивает высокую коллоидальную стабильность полученных наночастиц. Магнитные наночастицы, покрытые крахмалом демонстрировали суперпарамагнитное поведение с температурой блокировки около 170 К и намагниченностью насыщения в диапазоне от 30 до 50 эме/г.

В работе [15] изучены структурные свойства магнитных наночастиц Fe_3O_4 , покрытых крахмалом разного происхождения (из кукурузы и пшеницы). Используя описанный метод «зеленого» синтеза данных магнитных нанокомпозитов (соосаждение из растворов солей железа $FeSO_4$ и $FeCl_3$, содержащего 0,5-2% крахмала в присутствии гидроксида натрия) были получены сферические наночастицы со средним размером 10 нм, обладающие высокими площадью поверхности и намагниченностью (40 эме/г). В работе показано, что концентрация крахмала и гидроксида натрия влияет на размер синтезируемых частиц, а также что кукурузный крахмал в большей степени стабилизирует магнитные нано-биоккомпозиты, в отличие от крахмала, полученного из пшеницы.

Недостатками описанных материалов является то, что они не предназначены как сорбенты для аффинной хроматографии рекомбинантных белков.

В работе [16] описан новый подход к получению монодисперсных магнитных полимерных частиц на основе крахмала, контролируемого размера, который может быть использован как высокоэффективный материал для иммуномагнитного разделения. Подход включает в себя: 1) синтез наночастиц Fe_3O_4 , покрытых декстраном (Dex-IONPs) методом соосаждения из раствора железа ($FeSO_4$ и $FeCl_3$), содержащего декстран

раствором пероксида аммония во время ультразвуковой обработки; 2) двух-этапную обработку крахмала ферментом пуллуланазой для образования короткоцепочечных глюкоанов (отщепление амилопектина), длительность первого этапа 4 часа, второго этапа - ночь; 3) инкубацию короткоцепочечных глюкоанов с Dex-IONPs (24 часа), во время которой происходит самопроизвольное образование монодисперсных магнитных полимерных частиц, содержащих амилопектин. Для иммобилизации антител на поверхность синтезированных частиц, авторы использовали рекомбинантный мальтоза-связывающий белок (MBP), генетически сшитый с белком G стрептококка (proteinG), обладающего способностью связывать Fc фрагменты иммуноглобулинов.

Эффективность использования полученных частиц для иммуно-магнитного разделения была продемонстрирована на примере выделения клеток *E.coli*O157:H7. Элюцию связавшихся клеток проводили добавлением раствора мальтозы.

Недостатком описанного материала являются сложный способ получения, а также описанный материал не предназначен как сорбент для аффинной хроматографии рекомбинантных белков.

В работе [17] рассматриваются вопросы токсичного воздействия амилоза-ассоциированных наночастиц Fe_3O_4 в сравнении с таковыми, не покрытыми углеводом, на организм zebrafish, *Danio rerio*. Поскольку показано, что крахмал (и амилоза) увеличивает биосовместимость магнитных частиц, и при этом может использоваться для различной функционализации поверхности нанокompозитов лекарственными веществами, появляется все больше работ по синтезу магнитных крахмал-активированных био-нанокompозитов, пригодных для доставки лекарств [18].

В работе [19] были получены магнетитовые наночастицы оксида железа, стабилизированные крахмалом, имеющие квази-сферическую форму, со средним размером магнитного ядра 6-7 нм, средним гидродинамическим радиусом 46 нм, намагниченностью насыщения 45 эме на 1 грамм частиц. Их использовали для химического конъюгирования с гепатокарцинома-связывающим пептидом. Авторы изучили магнитные свойства полученных композитов и их специфичность к клеткам гепатоцеллюлярной карциномы человека в экспериментах *in vitro* и *in vivo* и показали, что полученные модифицированные наночастицы являются перспективным материалом для диагностики и терапии злокачественных опухолей (доставка лекарств, магнитная гипертермия и магнитно-резонансная томография).

Недостатками описанных материалов является то, что они не предназначены как сорбенты для аффинной хроматографии рекомбинантных белков.

В работе [20] методом соосаждения получены сферические Fe_2O_3 магнитные наночастицы (размером 90 нм), покрытые крахмалом, который в дальнейшем модифицировали глутаровым альдегидом для иммобилизации термоалкалофильного фермента эстеразы для получения стабильного биокатализатора. Выход иммобилизации и эффективность иммобилизации эстеразы составляла 74% и 82% соответственно. Кроме этого, иммобилизация эстеразы на предложенные частицы позволяет улучшить термостабильность фермента.

В обзоре [21] описаны методы получения магнитных композитов (от нано до микросфер) на основе крахмала и его различных модификаций и приведены примеры их использования в качестве адсорбентов для очистки воды от загрязнений тяжелыми металлами (Cd(II), Cr(VI), Cu(II)) и органическими веществами (лекарства, нефть и др.).

Недостатками описанных материалов является то, что они не предназначены как сорбенты для аффинной хроматографии рекомбинантных белков.

В работе [22], принятой за прототип, разработан ферментативный метод получения

амилоза-активированных магнитных микросфер (размером $2,09 \pm 0,42$ мкм и намагниченностью 4,5 эме/г). Авторы использовали фермент амилосахарозу, синтезирующий амилозные цепочки из сахарозы, которые способны самоорганизовываться в сферические микроструктуры. Показано, что магнитные наночастицы оксида железа эффективно включаются в амилозные микросферы в процессе их самосборки, реакция идет при 30°C в течение 24 часов. Полученные магнитные микросферы использовали как аффинный сорбент для выделения из лизата рекомбинантных клеток *E.coli* зеленого флуоресцентного белка (GFP), имеющего домен MBP в своем составе. Сорбционная емкость полученных микросфер составляла 72,31 мкг GFP на мг микросфер. В процессе трехкратного повторного использования, сорбционная емкость амилозных микросфер составляла 88%.

Недостатком прототипа является сложный способ получения материала и его низкая удельная сорбционная емкость.

Задачей настоящего изобретения является получение и изучение свойств крахмал-активированных магнитных наночастиц оксида железа как аффинного сорбента для выделения рекомбинантных белков, включающих в качестве вспомогательного домена мальтоза-связывающий белок (MBP).

Техническим результатом является повышение удельной сорбционной емкости магнитного аффинного сорбента, представляющего собой крахмал-активированные магнитные наночастицы оксида железа.

Технический результат достигается тем, что магнитный аффинный сорбент для выделения рекомбинантных белков характеризуется тем, что состоит из крахмал-активированных магнитных наночастиц оксида железа со средним размером 11,5 нм, значением намагниченности насыщения при комнатной температуре 29,8 эме/г, температурой блокировки близкой к комнатной температуре, один грамм которых позволяет выделить 100-590 мг рекомбинантных MBP-содержащих гибридных белков из лизата клеток *E.coli*.

Определяющими отличиями предлагаемого изобретения от прототипа являются: полученные наночастицы характеризуются существенно меньшими размерами, по сравнению с прототипом - 11,5 нм против $2,09 \pm 0,42$ мкм, что обеспечивает более высокую поверхность взаимодействия с молекулами в растворе;

полученные наночастицы имеют намагниченность насыщения 29,8 эме/г, и среднюю температуру блокировки близкую к комнатной, что обеспечивает и большой магнитный отклик, и коллоидную устойчивость;

сорбционная емкость полученного аффинного сорбента составляет 100-590 мкг рекомбинантных MBP-содержащих гибридных белков на 1 мг наночастиц, что превышает сорбционную емкость частиц, полученных в прототипе (72,31 мкг GFP на 1 мг частиц);

чистота очищенных с помощью полученного аффинного сорбента рекомбинантных белков составляет 80-94%;

полученные крахмал-активированные наночастицы могут быть трехкратно использованы без потерь их сорбционной емкости, а также стабильны до 6 месяцев при хранении образцов в камере бытового холодильника (+8-12°C) с добавлением 0,05% NaN_3 . Информации о стабильности материала при хранении в прототипе не приведено;

простой, дешевый и удобный метод синтеза крахмал-активированных наночастиц оксида железа на основе метода соосаждения, в котором крахмал используется как стабилизирующий агент. Метод не требует дополнительной функционализации поверхности наночастиц и модификации крахмала;

Изобретение поясняется чертежами.

На Фиг. 1 приведены изображения наночастиц оксида железа, покрытых крахмалом, полученные с помощью просвечивающего электронного микроскопа высокого разрешения.

5 На Фиг. 2 приведены спектры Мессбауэра наночастиц оксида железа, покрытых крахмалом, полученных при комнатной температуре.

На Фиг. 3 приведены ИК-спектры наночастиц оксида железа, покрытых крахмалом. (а) - крахмал, (б) - наночастицы оксида железа, покрытые крахмалом

10 На Фиг. 4 представлены температурная зависимость коэрцитивной силы (оранжевые квадраты), подгонка уравнением (1) (черная линия) и температурная зависимость намагниченности, измеренная в поле 5 кЭ (синие квадраты).

На Фиг. 5 представлены 12,5% ДСН-ПААГ электрофореграммы белковых препаратов в процессе очистки МВР-TnI (А), МВР-MIA (Б) и МВР-Surv (В) с помощью полученных крахмал-активированных наночастиц: белки трансформированных клеток *E.coli* до (15 колонки 1) и после (колонки 2) индукции ИПТГ; цитоплазматические фракции (колонки 3); фракции после элюции раствором 10 мМ мальтозы (колонки 4); стандартные белки (BioRad, США) (колонки 5), молекулярный вес которых показан цифрами справа. Стрелки указывают на полосы гибридных белков.

20 Сущность изобретения заключается в синтезе магнитных наночастиц оксида железа, активированных крахмалом, которые используются в качестве сорбента для аффинного выделения рекомбинантных белков, имеющих домен мальтоза-связывающего белка (МВР) в качестве вспомогательного фрагмента.

Пример синтеза крахмал-активированных магнитных наночастиц оксида железа:

25 Получение наночастиц оксида железа проводят методом соосаждения из раствора следующего состава: соль Мора - 50 г/л, цитрат Na - 50-100 г/л, EDTA-Na₂ - 20 г/л, крахмал - 5-50 г/л. При температуре 80°C к раствору добавляют NaOH (0.1 М) до достижения нейтрального pH. Необходимую температуру поддерживают с помощью водного термостата. Покрытые наночастицы оксида железа тщательно промывают дистиллированной водой для удаления ионов.

30 *Физические свойства крахмал-активированных магнитных наночастиц:*

Электронно-микроскопические исследования выполняются на просвечивающем электронном микроскопе Hitachi HT7700 при ускоряющем напряжении 100 кV (Фиг. 1). Частицы представляют собой нанокристаллы кубической формы со средним размером 11,5 нм. Дифракционная картина исследуемого образца характерна для 35 структуры магнетита или маггемита.

Измерения Мессбауэровских спектров выполняются на спектрометре MS-1104Em с источником ⁵⁷Co(Cr) при комнатной температуре (Фиг. 2). Экспериментальный спектр хорошо описывается показанными на рисунке компонентами. Ошибка подгонки 3%. 40 Обнаруживаются 4 секстета и один дублет. Результаты расшифровки свидетельствуют о том, что все ионы железа находится в трехвалентном состоянии. Таким образом, образец можно считать дефектным маггемитом γ -Fe₂O₃.

В таблице 1 представлены результаты расшифровки спектров Мессбауэра.

45

Таблица 1						
	IS	H	QS	W ₃₄	A	
1	0.34	474	0.01	0.50	0.14	S1
	0.42	440	-0.04	0.73	0.24	S2
	0.45	386	0.01	0.67	0.26	S3
	0.37	193	0.01	1.24	0.25	S4

	0.35	-	0.96	1.08	0.11	D
--	------	---	------	------	------	---

IS - изомерный химический сдвиг относительно ОЦК-Fe, QS - квадрупольное расщепление,

W - ширина линии поглощения, H - сверхтонкое поле на ядре железа, A - долевая заселенность позиции.

Спектры поглощения ИК исследуемых образцов получают в матрице KBr на вакуумном Фурье-ИК спектрометре VERTRX-80V (BRUKER) в спектральном диапазоне 7500 - 380 см^{-1} со спектральным разрешением 0.2 см^{-1} (Фиг. 3). Следует отметить, что спектры соединений с магнитными наночастицами имеют характерное увеличение фона в области 2000-4000 см^{-1} . В спектре (Фиг. 3б) связи в области 1200-1500 см^{-1} исчезают, остаются связи в области 800-1200 см^{-1} и гидроксильные. Спектральный анализ показывает: пики поглощения на 388 и 570 см^{-1} в спектре магнитных наночастиц покрытых крахмалом, относятся к изгибным колебаниям O-Fe-O и модам растяжения Fe-O, на поверхности наночастиц происходит хемосорбция крахмала через ацетальные связи.

В таблице 2 представлены пики ИК-поглощения и их соотношение.

Диапазон	Максимум полосы поглощения, крахмал	Максимум полосы поглощения, крахмал +MNP's	описание
		388	O-Fe-O
400-800	413		Область колебаний пиранозного кольца и δ -гидроксильных групп
	432		
	487		
	527		
		570	Fe-O
	573		соответствует колебаниям цепочки C - C - C...
	617		Область колебаний пиранозного кольца и δ гидроксильных групп
	706		
767			
800-1000	855		C-O в C-O-H
		866	
	922	900	
1000-1200	1001		C-O растяжения внутренних колебаний связей C-O (Характерные для полисахаридов полосы, обусловленные наличием ацетальных связей)
		1025	
	1075		
		1092	
		1150	
	1161		
1200-1500	1238		δ - групп CH_2 в CH_2OH
	1341		δ - связей O-H в CH_2OH
	1368		δ - связи групп CH_2
	1421		δ - групп CH_2
	1461		δ - OH
1500-2000	1654	1635	δ - связей в H-O-H (адсорбированная вода)
2000-3000	2060		ν - связей в группах CH и CH_2
	2153		
	2890		
	2930	2928	C-H
3000-4000	3406	3413	Внутренние колебания OH групп, участвующих в межмолекулярных и внутримолекулярных H-связях

С целью определения магнитных характеристик (намагниченность, коэрцитивная сила, температура блокировки) наночастиц записываются петли гистерезиса в полях от -2 кЭ до 2 кЭ в температурном диапазоне 80-295 К. Намагниченность насыщения наночастиц при комнатной температуре составляет 29,8 эме/г.

5 Температура блокировки является важной характеристикой для биомедицинских применений наночастиц, в частности магнитной сепарации. Температура блокировки - это температура, разделяющая суперпарамагнитное состояние и заблокированное состояние. Суперпарамагнитные наночастицы характеризуются безгистерезисным поведением и лучшей коллоидной устойчивостью. Наночастицы в заблокированном
10 состоянии отличаются полевым гистерезисом, большей магнитной восприимчивостью, но менее устойчивы в коллоиде. Наночастицы с температурой блокировки близкой к комнатной более предпочтительны для использования в магнитной сепарации.

Температурная зависимость коэрцитивной силы $H_c(T)$ может быть описана уравнением (1), согласно которому коэрцитивная сила H_c уменьшается с температурой
15 T вплоть до температуры блокировки T_B [23]. Данное уравнение обычно используется для однодоменных невзаимодействующих наночастиц при температурах, ниже температуры блокировки T_B [24].

$$20 \quad H_c(T) = H_c(0) \cdot \left(1 - \left(\frac{T}{T_B}\right)^\alpha\right) \quad (1),$$

где $H_c(0)$ (коэрцитивное поле при $T=0K$), T_B , α (показатель степени) являются подгоночными параметрами.

На Фиг. 4 приведена экспериментальная температурная зависимость коэрцитивной силы $H_c(T)$. Видно, что при комнатной температуре экспериментальные значения H_c
25 существенно снижаются, свидетельствуя о близости температуры блокировки к комнатной температуре. Подгонка экспериментальных данных уравнением (1) дает следующие параметры подгонки: $H_c(0) = 173 \text{ Э}$, $T_B = 377 \text{ К}$, $\alpha = 0,67$.

30 Таким образом, средняя температура блокировки близка к комнатной температуре и поэтому такие наночастицы хорошо подходят для использования в магнитной сепарации.

Использование крахмал-активированных магнитных наночастиц для одностадийной аффинной очистки рекомбинантных белков:

Полученные крахмал-активированные магнитные наночастицы использовались в
35 качестве аффинного сорбента для очистки следующих рекомбинантных МВР-содержащих гибридных белков: сердечного тропонина I (МВР-сTnI), белок с меланомы ингибирующий активность (МВР-MIA) и сурвивина (МВР-Surv).

Экспрессия гибридных белков МВР-сTnI, МВР-MIA и МВР-Surv проводится в клетках
40 *E. coli* BL21-CodonPlus (DE3)-RIPL, трансформированных соответствующими плазмидами. Клетки культивируются в LB среде, содержащей 2 г/л глюкозы и 200 мкг/мл ампициллина при 37 °С до достижения оптической плотности $OD_{590} = 0,5-0,7$.

Индукция синтеза белков проводится добавлением ИПТГ (1 мМ), клетки культивируют еще в течение трех часов, а после осаждают центрифугированием (4000 г, 20 мин, 4°С), супернатант отбрасывают.

45 Биомассу клеток ресуспендируют в буфере А (20 мМ Трис-НСlрН 7,5, 0,2 МNaCl, 1 мМ ЭДТА) в пропорции 1:5 (w/v), разрушают ультразвуком (6 раз по 20 сек.) при 0°С и снова центрифугируют. Осадок отбрасывают, супернатант (цитоплазматическая фракция) (1 мл) смешивают с 0,5 мл суспензии крахмал-активированных наночастиц

(в буфере А) (20 мг/мл) и инкубируют при 4°C в течение часа при перемешивании. Затем наночастицы фиксируют магнитом, а раствор удаляют пипетированием. После промывки наночастиц (трижды буфером А по 1 мл) гибридный белок элюируют буфером, содержащим 10 мМ мальтозу, 20 мМ Трис-НСlрН 7,5, 0,2 М NaCl, 1 мМ ЭДТА (буфер для элюации).

Чистоту белковых препаратов при выделении контролируют электрофорезом в 12,5 % полиакриламидном геле (ПААГ), содержащем 0,1% ДСН по методу Лэммли [25]. Концентрацию белков определяют спектрофотометрически с помощью набора DС™ProteinAssay (BioRad, США). В качестве калибровочного белка используют бычий сывороточный альбумин.

Повторное использование крахмал-активированных магнитных наночастиц.

0,5 мл суспензии крахмал-активированных магнитных наночастиц (20 мг/мл) используют для очистки гибридного белка МВР-сТnI последовательно три раза. После нанесения цитоплазматической фракции (0,8 мл), промывки наночастиц и элюции белка (как описано в примере 3), наночастицы 5-кратно промывают буфером для элюции, уравнивают буфером А и вновь используют для очистки белка из следующей порции лизата.

Выход очищенного МВР-сТnI составляет 94,7, 104,1 и 102,8 мкг на миллиграмм крахмал-активированных МНЧ после первого, второго и третьего циклов выделения, соответственно.

Таким образом, предлагаемый аффинный сорбент на основе крахмал-активированных магнитных наночастиц оксида железа обладает следующими физическими характеристиками: средний размер 11,5 нм, значение намагниченности насыщения при комнатной температуре 29,8 эме/г, температура блокировки близкая к комнатной температуре (377 К).

Сорбент обладает высокой сорбционной емкостью - 100-590 мг рекомбинантных МВР-содержащих гибридных белков на один грамм наночастиц и стабильностью, позволяет получать белковые препараты высокой степени очистки (80-94%) за одну стадию хроматографической очистки, а также может быть трехкратно использован без потери сорбционной емкости.

Метод получения магнитных наночастиц, отличается высокой воспроизводимостью (коэффициент вариации составляет 14,2%).

Список литературы

1. Terpe K. Overview of tag protein fusions: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems / K. Terpe // Appl. Microbiol. Biotechnol. - 2003. - V. 60. - P. 523-533
2. Sachdev D. Fusions to maltose-binding protein: Control of folding and solubility in protein purification / D. Sachdev, J. Chirgwin // Methods Enzymol. - 2000. - V. 326. - P. 312-321
3. Stepanyuk G.A. Coelenterazine-v ligated to Ca²⁺-triggered coelenterazine-binding protein is a stable and efficient substrate of the red-shifted mutant of Renilla muelleri luciferase / G. A. Stepanyuk, J. Unch, N. P. Malikova, S. V. Markova, J. Lee, E. S Vysotski // Anal. Bioanal. Chem. - 2010. - V. 398(4). - P. 1809-1817
4. Kataeva I. Improving solubility of Shewanella oneidensis MR-1 and Clostridium thermocellum JW-20 proteins expressed into Escherichia coli / I. Kataeva, J. Chang, H. Xu, C.-H. Luan, J. Zhou, V. N. Uversky, D. Lin, P. Horanyi, Z. J. Liu, L. G. Ljungdahl, J. Rose, M. Luo, B.-C. Wang // J. Proteome Res. - 2005. - V. 4(6). - P. 1942-1951, <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16335938/> - affiliation-1
5. Waugh, D. S. The remarkable solubility-enhancing power of Escherichia coli maltose-binding protein / D. S. Waugh // PostepyBiochem. - 2016. -V. 62. - P. 377-382

6. Duong-Ly K. C. Affinity purification of a recombinant protein expressed as a fusion with the maltose-binding protein (MBP) tag / K. C. Duong-Ly, S. B. Gabelli // *Methods Enzymol.* - 2015. - V. 559. - P. 17-26
7. Huang Y. C. Purification of recombinant nacre-associated mineralization protein AP7 fused with maltose-binding protein / Y. C. Huang, H. H. Chang, Y. Mou, P. Chi, J. C. Chan, S. C. Luo // *Protein Expr. Purif.* - 2014. - V. 100. - P. 26-32
8. Stueber D. D. Magnetic nanoparticles in biology and medicine: past, present, and future trends / D. D. Stueber, J. Villanova, I. Aponte, Z. Xiao, V. L. Colvin // *Pharmaceutics* - 2021. - V. 13. - P. 943
9. Elahi N. Progress and prospects of magnetic iron oxide nanoparticles in biomedical applications: A review / N. Elahi, M. Rizwan // *Artif Organs.* - 2021. - V. 45(11). - P. 1272-1299
10. Егунова О. Р. Магнитные наночастицы магнетита в разделении и концентрировании / О. Р. Егунова, Т. А. Константинова, С. Н. Штыков // *Изв. Сарат. ун-та. Нов. сер. Сер. Химия. Биология. Экология.* - 2014. - Т.14. - Вып 4. - С. 27-35
11. Assa F. Chitosan magnetic nanoparticles for drug delivery systems / F. Assa, H. Jafarizadeh-Malmiri, H. Ajamein, H. Vaghari, N. Anarjan, O. Ahmadi, A. Berenjian // *Crit. Rev. Biotechnol.* - 2017. - V. 37. - P. 492-509
12. Stolyar S.V. Polysaccharide-coated iron oxide nanoparticles: Synthesis, properties, surface modification. / S.V. Stolyar, V.V. Krasitskaya, L.A. Frank, R.N. Yaroslavtsev, L.A. Chekanova, Y.V. Gerasimova, M.N. Volochaev, M.S. Bairmani, D.A. Velikanov // *Mater. Lett.* - 2021. - V. 284. - P. 128920
13. Kheilkordi, Z. Recent advances in the application of magnetic bio-polymers as catalysts in multicomponent reactions / Z. Kheilkordi, G. MohammadiZiarani, F. Mohajer, A. Badiei, M. Sillanpää // *RSC Adv.* - 2022. - V. 12. - P. 12672-12701
14. Dung T. T. Structural and magnetic properties of starch-coated magnetite nanoparticles / T. T. Dung, T. M. Danh, L. T. M. Hoa, D. M. Chien, N. H. Duc // *J. Exp. Nanoscience.* - 2009. - V. 4(3). - P. 259-267
15. Prill B. Synthesis and characterization of magnetic nanoparticles functionalized with different starch types / B. Prill, S. Yusan // *Particulate Science and Technology.* - 2022. - V. 40. - P. 521-530
16. Luo K. Molecular rearrangement of glucans from natural starch to form size-controlled functional magnetic polymer beads / K. Luo, K.-B. Jeong, S.-M. You, D.-H. Lee, Y.-R. Kim // *J Agric. Food Chem.* - 2018. - V. 66(26). - P. 6806-6813
17. Zheng M. Effects of starch-coating of magnetite nanoparticles on cellular uptake, toxicity and gene expression profiles in adult zebrafish / M. Zheng, J. Lu, D. Zhao // *Sci. Total Environ.* - 2018. - V. 622-623. - P. 930-941
18. Rami M. R. Synthesis of magnetic bio-nanocomposites for drug release and adsorption applications / M. R. Rami, M. Meskini, L. M. Qarebaghi, M. Salami, S. Forouzandehdel, M. Cheraghali // *S. Afr. J. Chem. Eng.* - 2022. - V. 42. - P. 115-126
19. Jiang J.-S. A novel magnetic fluid based on starch-coated magnetite nanoparticles functionalized with homing peptide / J.-S. Jiang, Z.-F. Gan, Y. Yang, B. Du, M. Qian, P. Zhang // *J. Nanopart Res.* - 2009. - V. 11. - P. 1321-1330
20. Öz Y. Enhanced thermostability of the immobilized thermoalkalophilic esterase onto magnetic-cornstarch nanoparticle / Y. Öz, Y. Sürmeli, G. Şanlı-Mohamed // *BiotechnolApplBiochem.* - 2022. - V. 69. - P. 1418-1427
21. Fang K. Recent advances in starch-based magnetic adsorbents for the removal of contaminants from wastewater: A review / K. Fang, L. Deng, J. Yin, T. Yang, J. Li, W. He // *Int. J. Biol. Macromol.* - 2022. - V. 218. - P. 909-929

22. Lim M.-C. Amylosucrase-mediated synthesis and selfassembly of amylose magnetic microparticles / M.-C. Lim, G.-H. Lee, D. T. N. Huynh, C. A. M. Letona, D.-H. Seo, C.-S. Park, Y.-R. Kim // RSC Adv. - 2015. - V.5. - P. 36088

23. Pfeiffer H. Determination of anisotropy field distribution in particle assemblies taking into account thermal fluctuations / H. Pfeiffer // Phys. status solidi. - 1990. - V. 118(1). - P. 295-306

24. Komogortsev S. V. Square plate shaped magnetite nanocrystals / S. V. Komogortsev, S. V. Stolyar, L. A. Chekanova, R. N. Yaroslavtsev, O. A. Bayukov, D. A. Velikanov, M. N. Volochaev, P. E. Eroshenko, R. S. Iskhakov // JMMM. - 2021. - V. 527. - P. 167730

25. Laemmli U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4 / U. K. Laemmli // Nature. - 1970. - V. 227. - P. 680-685

(57) Формула изобретения

Магнитный аффинный сорбент для выделения рекомбинантных белков, характеризующийся тем, что состоит из крахмал-активированных магнитных наночастиц оксида железа со средним размером 11,5 нм, значением намагниченности насыщения при комнатной температуре 29,8 эме/г, температурой блокировки, близкой к комнатной температуре, один грамм которых позволяет выделить 100-590 мг рекомбинантных МВР-содержащих гибридных белков из лизата клеток *E.coli*.

20

25

30

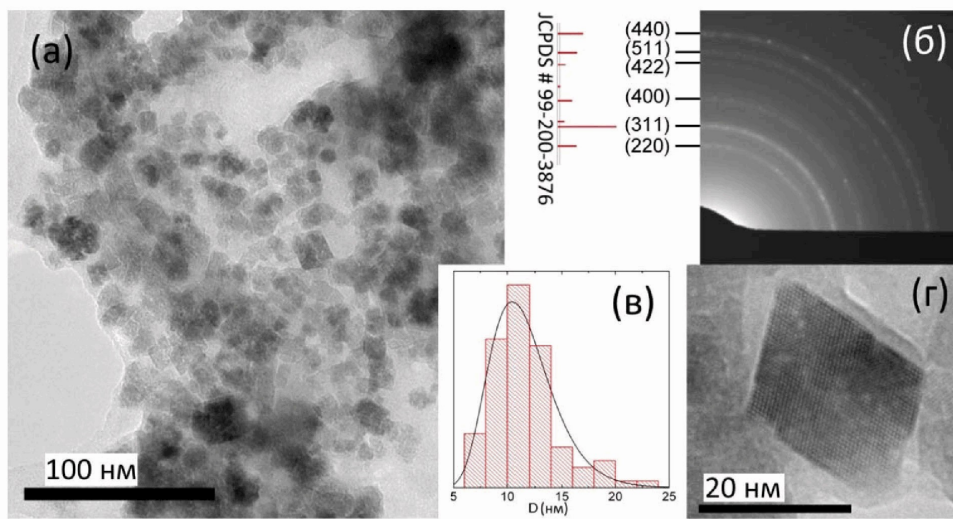
35

40

45

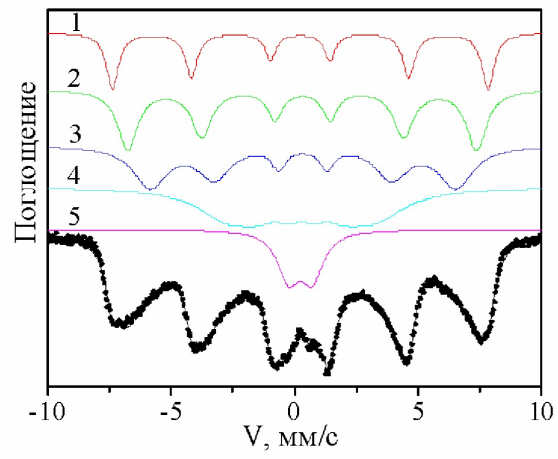
1

1/5

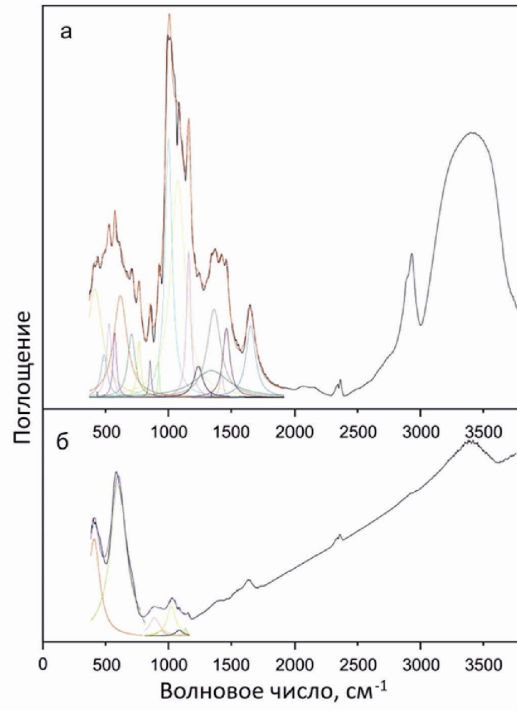


Фиг. 1

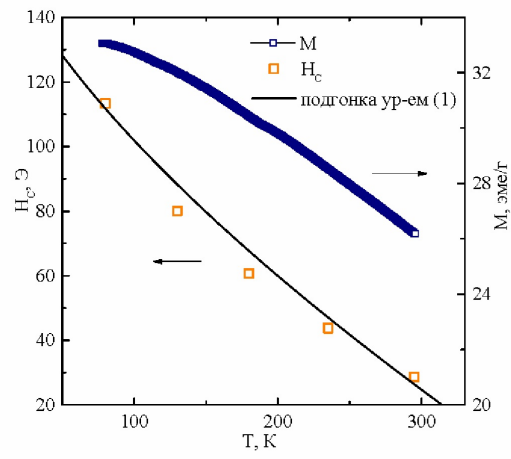
2



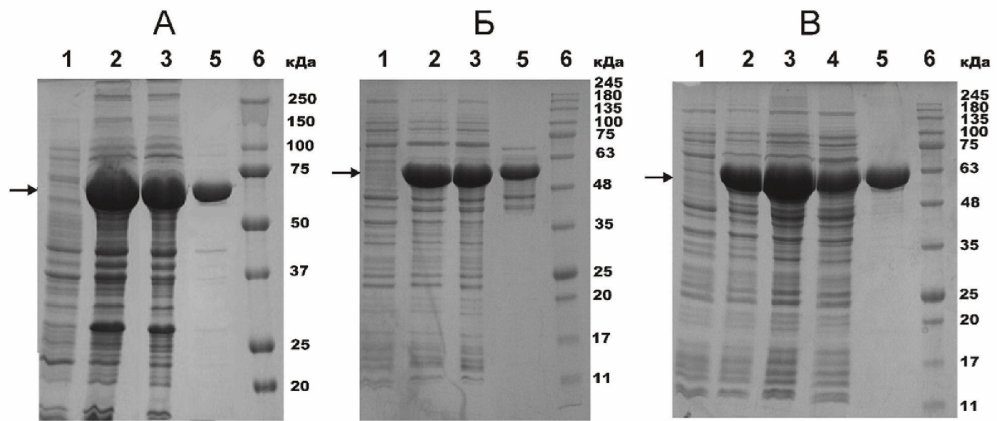
Фиг. 2



Фиг. 3



Фиг. 4



Фиг. 5