

Кайшева Анна Леонидовна

**МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКАЯ ИДЕНТИФИКАЦИЯ БЕЛКОВ И
БЕЛКОВЫХ КОМПЛЕКСОВ НА ЧИПАХ АТОМНО-СИЛОВОГО МИКРОСКОПА**

03.01.04. – биохимия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва – 2010

Работа выполнена в Учреждении Российской академии медицинских наук Научно-исследовательском институте биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича РАМН (ИБМХ РАМН)

Научный руководитель:

доктор биологических наук,
Иванов Юрий Дмитриевич

Официальные оппоненты:

доктор биологических наук, профессор,
Соколов Николай Николаевич

доктор биологических наук,
Карягина Анна Станиславовна

Ведущая организация:

Московский государственный университет
имени М.В. Ломоносова

Защита состоится «25» ноября 2010г. в 14⁰⁰

часов на заседании Диссертационного совета Д 001.010.01 при ИБМХ РАМН по адресу: 119121, Москва, ул. Погодинская, д.10.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ИБМХ РАМН по адресу: 119121, Москва, ул. Погодинская, д.10.

Автореферат разослан «__»_____ 2010г.

Ученый секретарь

Диссертационного совета

кандидат химических наук

Карпова Елена Анатольевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность работы.

Одним из приоритетных направлений в современной биохимии является создание эффективных аналитических методов для протеомного анализа, главная задача которых заключается в обнаружении и инвентаризации белков организма, исследовании их структуры, функций, выявлении белковых взаимодействий. Решение данной задачи позволит создать новые системы диагностики заболеваний и их лечения. Стандартные методы современного протеомного анализа базируются на разделении многокомпонентных белковых смесей с помощью хроматографии, электрофореза в комбинации с масс-спектрометрическими методами (МС) идентификации белков. При несомненном достоинстве стандартного МС-анализа в плане быстродействия и достоверности идентификации белковых молекул, он обладает существенными ограничениями применения, обусловленными низкой концентрационной чувствительностью анализа на уровне 10^{-8} - 10^{-9} М и высоким динамическим диапазоном содержания белков в биологическом материале. В то же время подавляющее количество функциональных белков, в том числе биомаркеры таких социально-значимых заболеваний, как вирусные гепатиты В и С, онкомаркеры и др., присутствуют в плазме крови в области концентраций 10^{-13} М и менее.

Один из путей преодоления такого методологического ограничения концентрационной чувствительности анализа заключается в использовании биомолекулярных детекторов, которые позволяют регистрировать единичные молекулы и их комплексы и теоретически не имеют ограничений концентрационной чувствительности. К биомолекулярным детекторам относятся детекторы на базе нанотехнологических устройств, таких как атомно-силовые микроскопы (АСМ), нанопроводные детекторы, нанопоры и ряд других детекторов. Уникальная чувствительность АСМ-детекторов позволяет визуализировать отдельные молекулы белков и подсчитывать их количество. При использовании АСМ в качестве биомолекулярного детектора необходимо применение специальных чипов, позволяющих сконцентрировать биологические макромолекулы аналита из большого объема инкубационного раствора на ограниченной поверхности чипа. Исследуемые белковые объекты могут быть сконцентрированы на поверхности чипа как за счет физической или химической адсорбции, так и за счет биоспецифических взаимодействий (АСМ-биоспецифический фишинг).

Однако на практике ограничение применения нанодетекторов на базе АСМ заключается в том, что несмотря на возможность визуализации отдельных белковых молекул на поверхности чипа, такие детекторы не способны идентифицировать их, что особенно важно в исследовании сложных белковых смесей, в том числе биологического материала. Поэтому разработка метода анализа, дополняющего возможности метода АСМ, представляется актуальной задачей. На сегодняшний день единственным протеомным методом, позволяющим однозначно и достоверно идентифицировать белковые молекулы, является МС-анализ. В диссертационной работе разработан подход, объединяющий высокую чувствительность метода АСМ и достоверную МС-идентификацию для детекции белков и их комплексов из раствора анализата.

Цель и задачи исследования.

Цель настоящей работы состояла в масс-спектрометрической идентификации белков и белковых комплексов, выявленных в биоматериале с помощью атомно-силовой микроскопии.

Для достижения поставленной цели были решены следующие задачи:

1. Разработана схема МС-идентификации белков, выловленных на поверхность АСМ-чипа с помощью химического или биоспецифического фишинга;
2. Разработаны условия ферментативного гидролиза белков на поверхности АСМ-чипа для последующей МС-идентификации;
3. Проведена МС-идентификация модельных белков на поверхности АСМ-чипа;
4. Проведена МС-идентификация белков на поверхности АСМ-чипа, биоспецифически выловленных из многокомпонентной смеси (сыворотки).

Научная новизна работы.

В диссертации разработана схема, позволяющая проводить МС-идентификацию белков и белковых комплексов, выловленных из раствора или многокомпонентной смеси на поверхности АСМ-чипа. Для этого были подобраны оптимальные условия подготовки образцов, в том числе режим проведения гидролиза (температурный режим, влажность, состав трипсинолитической смеси, время трипсинолиза) белковых молекул, ковалентно и нековалентно иммобилизованных на поверхности АСМ-чипа. Особенность настоящей работы заключалась в том, что по сравнению со стандартными протеомными протоколами ферментативного гидролиза подготовка образцов для МС-анализа проводилась не в растворе, а на ограниченной площади

поверхности чипа. Разработанная схема позволила эффективно провести МС-анализ и идентифицировать на поверхности АСМ-чипа как отдельные белки, так и белковые комплексы. МС-анализ протеотипических пептидов исследуемых белков проводился с использованием двух типов ионизации (*MALDI* и *ESI*) и двух типов детекторов (времяпролетного и типа ионная ловушка). Разработанная схема сопряжения АСМ-биоспецифический фишинг и МС также была успешно апробирована для детекции белковых маркеров вирусного гепатита С (ВГС) (HCVcoreAg и E2) в образцах сыворотки крови.

Практическая значимость работы.

Результаты данной работы дают возможность создания высокочувствительных протеомных методов без использования меток и дополнительных процедур подготовки образцов для обнаружения белков, находящихся в биологическом материале в низкой концентрации, в том числе в сыворотке крови. Предложен подход на основе атомно-силовой микроскопии и масс-спектрометрии, который позволит выявлять и идентифицировать белковые маркеры вируса гепатита С в сыворотке крови человека.

Подход может быть использован в разработках, направленных на создание новых диагностических чипов, поиск биомаркеров широкого диапазона социально-значимых заболеваний.

Апробация работы.

Основные результаты исследования были представлены на «1-м, 2-м и 3-м Международном форуме по нанотехнологиям» (Москва, 2008-2010); «IV съезде Российского общества биохимиков и молекулярных биологов», Новосибирск, 2008; на Международной конгрессе «Протеом человека», Амстердам, 2008; на Международной конгрессе «Протеом человека», Сидней, 2010.

Публикации.

По материалам диссертации опубликовано 7 научных работ: 2 статьи в российских научных изданиях и 5 публикаций в докладах научных конференций.

Структура и объем диссертации.

Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, результатов исследования и их обсуждения, заключения, выводов и списка литературы. Работа изложена на 104 страницах, иллюстрирована 33 рисунками и 4 таблицами, список литературы состоит из 159 наименований.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

АСМ-чипы.

В экспериментальной части работы использовались два типа АСМ-чипов, с помощью первого типа проводилась МС-идентификация модельных белков на их поверхности. Эти чипы представляли собой подложки с химически активированной поверхностью, на которую были ковалентно выловлены исследуемые молекулы (с помощью химического фишинга). Второй тип АСМ-чипов использовался для МС-идентификации на их поверхности белков, биоспецифически выловленных из раствора анализата. На поверхности данных чипов в рабочих зонах предварительно были иммобилизованы биологические зонды. В качестве биологических зондов использовались моноклональные антитела против маркерных белков ВГВ и ВГС или аптамеры против белка GP120 и тромбина. Для процедуры биоспецифического фишинга чипы с ковалентно иммобилизованными молекулами-зондами инкубировались в растворе анализата, содержащий только детектируемый белок, либо образцы сыворотки крови. В процессе инкубации происходило биоспецифическое связывание детектируемых белковых молекул с молекулами-зондами на поверхности АСМ-подложки (рис.1). После процедуры биоспецифического фишинга чипы были охарактеризованы с помощью АСМ, при этом число комплексов, зарегистрированных и подсчитанных на поверхности АСМ-чипа, представлялось в виде числа визуализированных объектов в зоне его активации (рис.1).

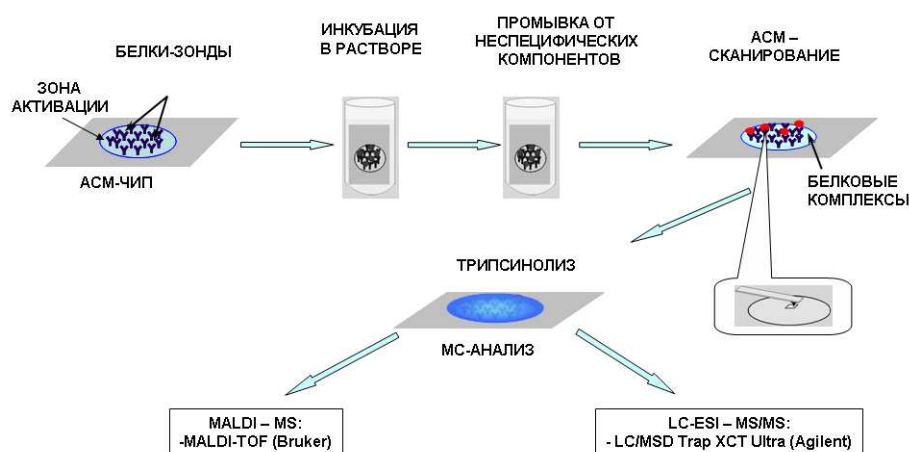


Рис. 1. Схема АСМ-МС-анализа белков, выловленных на молекулы-зонды, иммобилизованные на поверхности АСМ-чипа, за счет биоспецифических взаимодействий,

Качество поверхности чипов и эффективность формирования объектов на их поверхности (белков или белковых комплексов) тестировалось методом АСМ в лаборатории нанобиотехнологии ИБМХ РАМН. Характеристики, полученные в АСМ-исследовании, приведены в таблице 1.

МС-анализ (*MALDI* и *ESI*) проводился на поверхности АСМ-чипа после стадии отмывки от неспецифически сорбированных молекул в рабочей зоне чипа и подготовки образца.

Препараты белков и реактивы.

В работе использовались следующие модельные белки. Для выполнения задачи МС-идентификации модельных белков, ковалентно иммобилизованных на поверхности АСМ-чипов первого типа, были использованы: авидин (Agilent, США), HSA (Agilent, США), P450 BM3 (любезно предоставленный профессором А.В. Мурро, Манчестерский университет, Великобритания), тромбин (Sigma, США), α -FP и анти- α -FP (USBio, США);

Для выполнения задачи МС-идентификации белков на поверхности АСМ-чипов второго типа, биоспецифически выловленных из раствора аналита, в качестве молекул-зондов использовались моноклональные антитела (МКА): анти-HCVcore (Virogen, США), анти-HBVcore (НИИ молекулярной диагностики, Москва), анти-HBsAg (Aldevron, США), в качестве молекул-мишеней: HBVcoreAg, HCVcoreAg (Virogen, США) и HBsAg (Aldevron, США), GP120 (Sigma, США), тропонин (USBio, США).

В работе использовались следующие реагенты и белки: ацетонитрил, изопропанол, муравьиная кислота, дистиллированная вода (Merck, США), трифторуксусная кислота (ТФУ), бикарбонат аммония (Sigma, США), α -циано-4-гидроксикоричная кислота (НССА), дигидроксибензойная кислота (ДНВ) (Bruker Daltonics, Германия), трипсин (Promega, США).

Образцы сывороток крови для АСМ-исследования были предоставлены Кафедрой инфекционных болезней у детей РГМУ, ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора, МНИИЭМ им. Габричевского. Наличие частиц HCV в образцах сывороток крови подтверждалось с помощью метода полимеразной цепной реакции (ПЦР) с использованием тест-системы “Амплисенс HCV Монитор” (ЦНИИ эпидемиологии МЗ РФ, Москва).

Подготовка образцов для масс-спектрометрического анализа.

На поверхность АСМ-чипа с иммобилизованными молекулами-зондами наносилась трипсинолитическая смесь, содержащая буферный раствор 150 мМ NH_4HCO_3 , ацетонитрил, 0,5 М гуанидин гидрохлорид, глицерол (рН 7,4). Затем к буферному раствору добавлялось 0,5 мкл раствора свиного модифицированного трипсина с концентрацией 0,1 мкМ. АСМ-чип инкубировался во влажной среде в течение 2 часов при постоянной температуре 45°C, на его поверхность снова добавлялось 0,5 мкл раствора трипсина (0,1 мкМ), и инкубация продолжалась еще 12 часов. Трипсинолитическая смесь смывалась с поверхности АСМ-чипа раствором элюции объемом 10 мкл, содержащим 70% ацетонитрил в 0,7% трифторуксусной кислоте (ТФУ). Полученный таким образом с поверхности АСМ-чипа гидролизат высушивался в вакуумном испарителе при 45°C и 4200 об./мин. Далее пептидная смесь растворялась в 10 мкл 5% раствора муравьиной кислоты или в 10 мкл 0,7% раствора ТФУ для проведения последующего МС-анализа.

При проведении МС-анализа с *MALDI*-типом ионизации подготовка образцов осуществлялась следующим образом. Пробы, растворенные в 0,7% растворе ТФУ объемом 10 мкл, концентрировались и обессоливались с использованием микронаконечников ZipTip C18 (Millipore, США) в соответствии с протоколом производителя и смешивались с насыщенным раствором матрицы, содержащей НССА или ДНВ в 50% ацетонитриле с 0,7% ТФУ. Полученную смесь наносили на *MALDI*-мишень размера МТР.

При проведении МС-анализа с *ESI*-типом ионизации подготовка образцов проходила следующим образом. Пробы, растворенные в 5% растворе муравьиной кислоты, наносились на чип Chip Cube (Agilent) с интегрированной обратнофазной колонкой Zorbax (40 нл Trap 75 мкм×43 мм, 5 мкм, C-18SB-ZX). Загрузка 1 мкл пробы проводилась в течение 6 мин при скорости потока 3000 мкл/мин в изократическом растворе С (5% ацетонитрил и 0,1% раствор муравьиной кислоты); каждый образец анализировался не менее 3 раз. Элюция пептидов с хроматографической колонки осуществлялась в градиенте растворов А (водный раствор 0,1% муравьиной кислоты) и Б (80% раствор ацетонитрила в 0,1% муравьиной кислоте) при скорости потока 0,3 мкл/мин в течение 80 мин по следующей схеме: 0 мин – 5% раствор Б, 45 мин – 45% раствор Б, 60 мин – 100%, 75 мин – 5% раствор Б.

Масс-спектрометрический анализ.

MALDI-TOF-МС-анализ белков на поверхности АСМ-чипа.

Масс-спектрометрический анализ выполнялся на времяпролетных масс-спектрометрах Bruker Microflex (Bruker Daltonics, Германия) и Autoflex III (Bruker Daltonics, Германия), оснащенных азотным лазером с длиной волны излучения $\lambda=337$ нм и лазерной системой Smartbeam, соответственно. МС-анализ проводился в режиме электростатического отражателя (рефлектрона) с напряжением 17 кВ, время задержки импульса составляло 200 нс. Накопление спектра происходило за 3000 лазерных импульсов. Калибровка масс-спектрометра осуществлялась с использованием белковых стандартов («Peptide Calibration Standard» и «Protein Calibration Standard II», Bruker Daltonics, Германия).

Анализ и идентификация полученных масс-спектров проводилась с помощью программного обеспечения flexAnalysis версии 2.0 (Bruker Daltonics, Германия) и Mascot Daemon (Matrix Science, London, UK) со следующими параметрами поиска: библиотека данных NCBI или MSDB, число пропущенных сайтов гидролиза не более 2, точность измерения моноизотопных масс менее 100 ppm, при этом учитывались возможное окисление метионинов и модификация цистеинов акриламидом, вероятность определения белка составляла более 95%.

ESI-Trap-МС-анализ белков на поверхности АСМ-чипа.

Масс-спектрометрический тандемный анализ белков проводился на хромато-масс-спектрометрической системе типа ионной ловушки LC/MSD Trap XCT Ultra (Agilent, США), оснащенной электроспрейным интерфейсом chip-ESI-online.

Ионизация осуществлялась при температуре капилляра 180°C, напряжение на капилляре составляло 1,8 кВ. Скорость потока осушающего газа в масс-спектрометре составляла 3,5 л/мин. Значение параметра числа накопленных ионов в ловушке задавался равным 50000 ионов в 1 мс. Детекция ионов в ионной ловушке проводилась в режиме ESI-положительной ионизации в диапазоне $m/z=400-1250$ с массой оптимизации ловушки $m/z=800$, МС/МС-фрагментация ионов – в диапазоне $m/z=200-1350$.

Данные МС- и МС/МС-спектров обрабатывались с использованием программы Data Analysis версии 3.3 (Bruker Daltonics, Германия) с установленным пороговым значением интенсивности пиков $1 \cdot 10^4$. Идентификация пептидов и белков проводилась с помощью программного пакета Mascot Server (Matrix Science, London,

UK) со следующими параметрами поиска: библиотека данных NCBI или MSDB, использованный фермент – трипсин, число пропущенных сайтов гидролиза не более 1, вероятное зарядовое состояние пептида +1,+2,+3, возможные модификации пептидов – окисленный метионин, точность определения массы иона-предшественника 200 ppm, точность определения массы дочерних ионов 300 ppm, вероятность определения белка составляла более 95%, минимальное число уникальных пептидов, соответствующих одному белку, – 2.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

МС-идентификация белков, выловленных с помощью химического фишинга на поверхность АСМ-чипа первого типа из раствора аналита.

На данном этапе экспериментальной работы были получены МС-спектры для модельных белков, химически иммобилизованных на поверхности АСМ-чипов из раствора аналита. Диапазон концентраций исследуемых белков в растворе аналита для авидина, HSA, анти- α FP составлял 10^{-6} - 10^{-9} М, тропонина, α FP и P450 BM3 – 10^{-6} - 10^{-8} М.

МС-анализ проводился для 6 типов белков, различных по своему происхождению, молекулярной массе, количеству сайтов трипсинолиза и их пространственной доступности, которые были ковалентно иммобилизованы на поверхности АСМ-чипа из раствора аналита. В данных экспериментах использовались АСМ-чипы, которые содержали рабочую и контрольную зоны. Рабочая зона являлась химически активированной областью поверхности АСМ-чипа, на которой происходил химический фишинг модельных белков; контрольной зоной являлась химически неактивная область поверхности чипа. Подсчет визуализированных выловленных молекул регистрировали с помощью АСМ. Экспериментальные данные АСМ-анализа, полученные для вышеперечисленных модельных белков, а именно число молекул, выловленных на поверхности рабочей зоны АСМ-чипа, представлены в таблице 1. В колонке «концентрация белковых молекул в растворе» таблицы 1 приведены данные для минимально зарегистрированной концентрации соответствующего белка в растворе аналита.

Масс-спектрометрический анализ образцов проводили с использованием *MALDI*- и *ESI*-типов ионизации.

На рисунке 2 представлены тандемные спектры фрагментации белка авидина, полученные с химически активированной рабочей зоны АСМ-чипа после инкубации в соответствующем растворе авидина с концентрацией 10^{-9} М. Анализ этих спектров позволил достоверно идентифицировать авидин (*Gallus Gallus*) по двум его протеотипическим пептидам: *SSVNDIGDDWK* ($m/z=618,6$) и *VGINIFTR* ($m/z=460,4$).

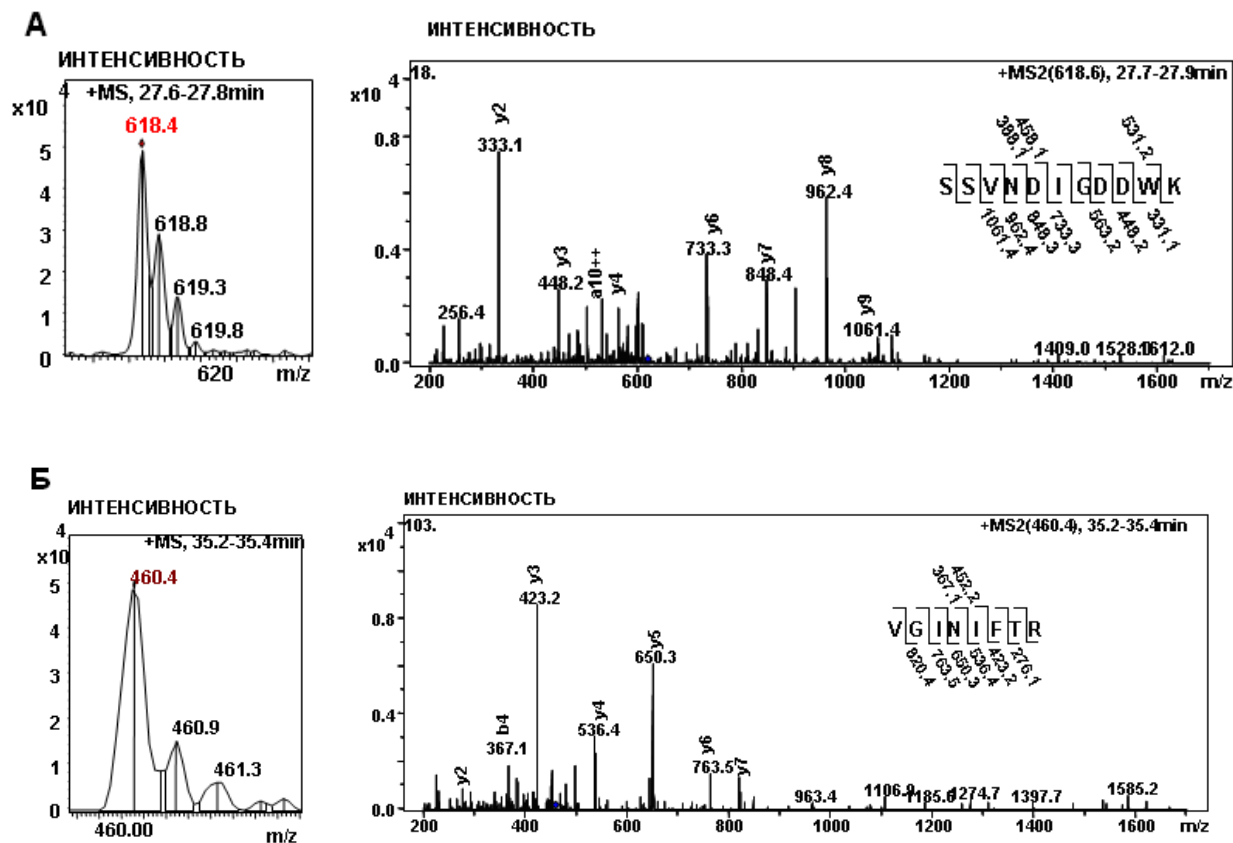


Рис. 2. Тандемные масс-спектры пептидов авидина: (А) *SSVNDIGDDWK* ($m/z=618,4$), (Б) *VGINIFTR* ($m/z=460,4$). Экспериментальные условия: измерения были проведены на масс-спектрометре LC/MSD Trap XCT Ultra (Agilent).

Результаты АСМ-МС-анализа вышеперечисленных 6 типов белков представлены в таблице 1.

Как видно из таблицы 1, число молекул, зарегистрированных в рабочей зоне АСМ-чипа для всех представленных белков, составило $\sim 10^7$ - 10^8 молекул. Минимально зарегистрированная концентрация модельных белков в инкубационном растворе была при этом достаточно низкой $\sim 10^{-8}$ - 10^{-9} М.

Таблица 1. Белки, масс-спектрометрически идентифицированные с поверхности АСМ-чипа.

Исследуемые объекты	Число молекул, выловленных на АСМ-чипе	Концентрация белковых молекул в растворе, М
1. Авидин	$2,0 \cdot 10^8$	10^{-9}
2. HSA	$1,7 \cdot 10^8$	10^{-9}
3. Тропонин	$1,8 \cdot 10^8$	10^{-8}
4. α -FP	$8,0 \cdot 10^7$	10^{-8}
5. анти- α -FP	$3,4 \cdot 10^8$	10^{-9}
6. P450 BM3	$1,3 \cdot 10^8$	10^{-8}

Таким образом, МС-анализ позволил идентифицировать белки, обнаруженные с помощью АСМ-анализа. На основании полученных данных была выявлена зависимость между числом идентифицированных протеотипических пептидов на поверхности АСМ-чипа и содержанием искомого белка в растворе аналита. Такая зависимость, например, для белков P450 BM3 и HSA, ковалентно иммобилизованных на химически активированной поверхности АСМ-чипа, приведена на рисунке 2.

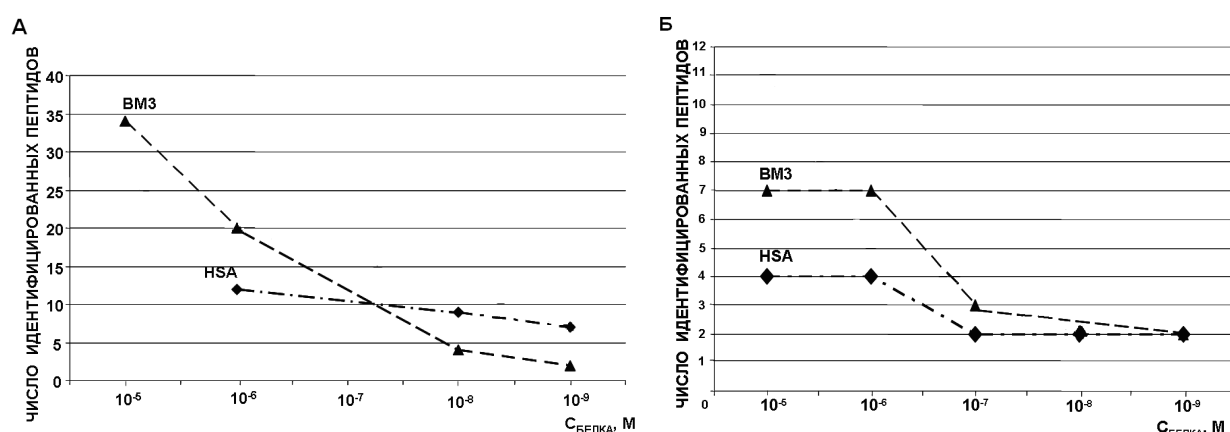


Рис.2 Зависимости числа идентифицированных пептидов молекул аналита от концентрации белка в инкубационном растворе. (А) – анализ смеси пептидов модельных белков HSA, BM3 на масс-спектрометрах с MALDI-типом ионизации Bruker Microflex (Bruker Daltonics, Германия) и Autoflex III (Bruker Daltonics, Германия); (Б) – анализ смеси пептидов модельных белков HSA, BM3 на масс-спектрометре с ESI-типом ионизации LC/MSD Trap XCT Ultra (Agilent, США).

Как видно на рисунке 2, чем выше концентрация белка в растворе анализата ($\sim 10^{-6}$ М), тем большее число пептидов удается достоверно идентифицировать как в случае *MALDI-МС*, так и *ESI-МС*-анализа. Значительных различий между числом идентифицированных пептидов в диапазоне концентраций 10^{-6} - 10^{-9} М среди анализируемых белков в растворе анализата не наблюдалось.

Полученные результаты позволили заключить, что АСМ-МС (*MALDI* и *ESI*) позволяет выявлять и идентифицировать ковалентно выловленные из раствора анализата на поверхности АСМ-чипа белковые молекулы, различные по своим физико-химическим свойствам.

В то же время, в контрольной зоне АСМ-чипа (неактивированной) после его инкубации в растворе анализата, методом АСМ не зарегистрировано наличия на поверхности чипа объектов, соответствующих по высоте белковым молекулам. МС-анализ также не выявил объектов белковой природы. Таким образом экспериментально было доказано, что АСМ адекватно регистрирует искомые объекты – белковые молекулы анализата.

МС-идентификация белков, биоспецифически выловленных на поверхности АСМ-чипа из раствора анализата.

Следующим этапом данной работы стала отработка схемы комбинации АСМ-МС для идентификации белков, выловленных из раствора за счет биоспецифических взаимодействий.

Экспериментальная часть данного раздела подразумевала проведение двух этапов анализа. На первом этапе необходимо было провести МС-идентификацию ковалентно иммобилизованных на АСМ-чипе белковых молекул-зондов, на втором этапе – белков-мишеней, выловленных на соответствующие молекулы-партнеры из раствора или из образцов сыворотки крови за счет биоспецифических взаимодействий. Для этого был проведен МС-анализ ковалентно иммобилизованных на поверхности АСМ-чипов МКА против маркерных белков ВГС и ВГВ: анти-НСVcore, NF5, NE3 и NE2. Для этих белков в настоящей работе впервые были получены тандемные спектры фрагментации и спектры пептидных карт. По данным АСМ-анализа антитела были иммобилизованы монослоем без образования агрегатов, МС-анализ подтвердил их наличие на поверхности АСМ-чипа. При использовании аптамеров в качестве молекул-зондов МС-идентификация АСМ-визуализированных на поверхности АСМ-чипа объектов не проводилась. На втором этапе экспериментальной части данного

раздела анализировались АСМ-чипы с биоспецифически выловленными молекулами после инкубации в растворах аналита. Модельные растворы содержали детектируемые белки-мишени в концентрационном диапазоне 10^{-8} - 10^{-11} М. АСМ-анализ показал формирование белковых комплексов в рабочей зоне АСМ-чипа при АСМ-биоспецифическом фишинге соответствующих 5 белковых пар. Данные АСМ-анализа, а именно число комплексов, зарегистрированных на АСМ-чипе, представлены в таблице 2.

Таблица 2. MALDI- и ESI-МС-идентификация белковых комплексов в рабочей зоне АСМ-чипа с использованием биоспецифического фишинга.

Исследуемые объекты			
Иммобилизованные молекулы-зонды	Молекулы аналита	Число комплексов, зарегистрированных на АСМ-чипе	Концентрация белковых молекул аналита в растворе, М
1. Аптамер	GP120	$1,2 \cdot 10^7$	10^{-11}
2. Анти-HCVcore	HCVcoreAg	$3,8 \cdot 10^7$	10^{-10}
3. Анти-HBs	HBsAg	$6,0 \cdot 10^7$	10^{-9}
4. Анти-HBVcore	HBVcoreAg	$5,0 \cdot 10^6$	10^{-9}
5. Аптамер	Тромбин	$1,8 \cdot 10^7$	10^{-8}

Как видно из таблицы 2, число сформированных комплексов для исследуемых молекул аналита составляло порядка 10^6 - 10^7 как в случае белковых молекул-зондов, так и в случае использования аптамеров в качестве зондов. В контрольной химически неактивированной зоне АСМ-чипа после инкубации в растворе аналита не наблюдалось неспецифической сорбции белковых молекул. Результаты МС-идентификации этих АСМ-чипов приведены в таблице 2.

На рисунке 3 приведены тандемные спектры фрагментации для GP120, биоспецифически выловленного на соответствующий аптамер. Особенностью данной белок-аптамерной пары «GP120-аптамер», где в качестве молекул-зондов использовались аптамеры, а в качестве молекул аналита белок GP120, являлось то, что технически такая схема с использованием аптамера была реализована в настоящей работе впервые. Для комбинации АСМ-биоспецифического фишинга и МС-идентификации удалось идентифицировать GP120 по двум его протеотипическим пептидам *AFYAGDIIGDIRQAY* ($m/z=559,4$) и *NEQDVLALDK* ($m/z=573,5$), представленным в виде тандемных спектров фрагментации на рисунке 3. На примере

этой белковой пары была продемонстрирована возможность повышения чувствительности АСМ-МС-анализа на 2 порядка до 10^{-11} М по сравнению с чувствительностью стандартных протеомных подходов без предварительного АСМ-фишинга (Kuster B. Et al., 1998; Archakov A.I. et al., 2007).

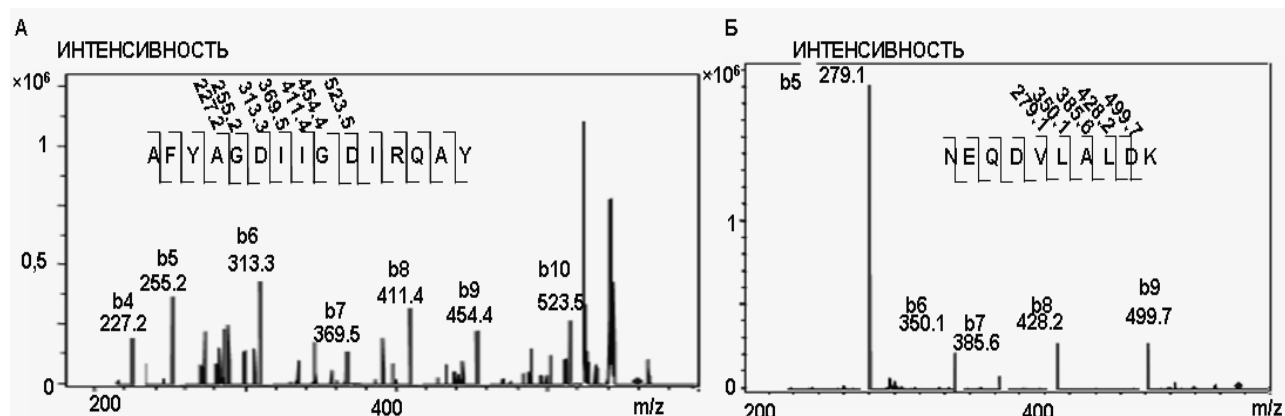


Рис. 3. Тандемные масс-спектры пептидов GP120: (А) AFYAGDIIGDIRQAY ($m/z=559,4$), (Б) NEQDVLALDK ($m/z=573,5$). Экспериментальные условия: измерения были проведены на масс-спектрометре LC/MSD Trap XCT Ultra (Agilent).

Результаты МС-анализа белков, биоспецифически выловленных на иммобилизованные МКА, представлены на рисунке 4. МС-идентификация белок-белковых комплексов на поверхности АСМ-чипа была продемонстрирована на примере пары «анти-HCVcore_{im}-HCVcoreAg». В данном случае в рабочей зоне чипа были ковалентно иммобилизованы антитела – анти-HCVcore_{im}.

МС-анализ спектров АСМ-визуализированных объектов в рабочей зоне поверхности чипа позволил идентифицировать анти-HCVcore по 10 пептидам: IVPRDCGCK ($m/z=990,5$), VNSAAFPAIEK ($m/z=1243,8$), PKDVLITLTPK ($m/z=1325,8$), APQVYTIPPPKEQMAK ($m/z=1798,1$), SVSELPIMHQDWLNGK ($m/z=1854,8$), EFKCRVNSAAFPAIEK ($m/z=1906,8$), SVSELPIMHQDWLNGKEFK ($m/z=2275,1$), PKAGPQADRRLHRCTPFHLPR ($m/z=2452,0$) (рис.4А). МС-анализ поверхности контрольной неактивированной зоны не выявил присутствия на ней объектов белковой природы.

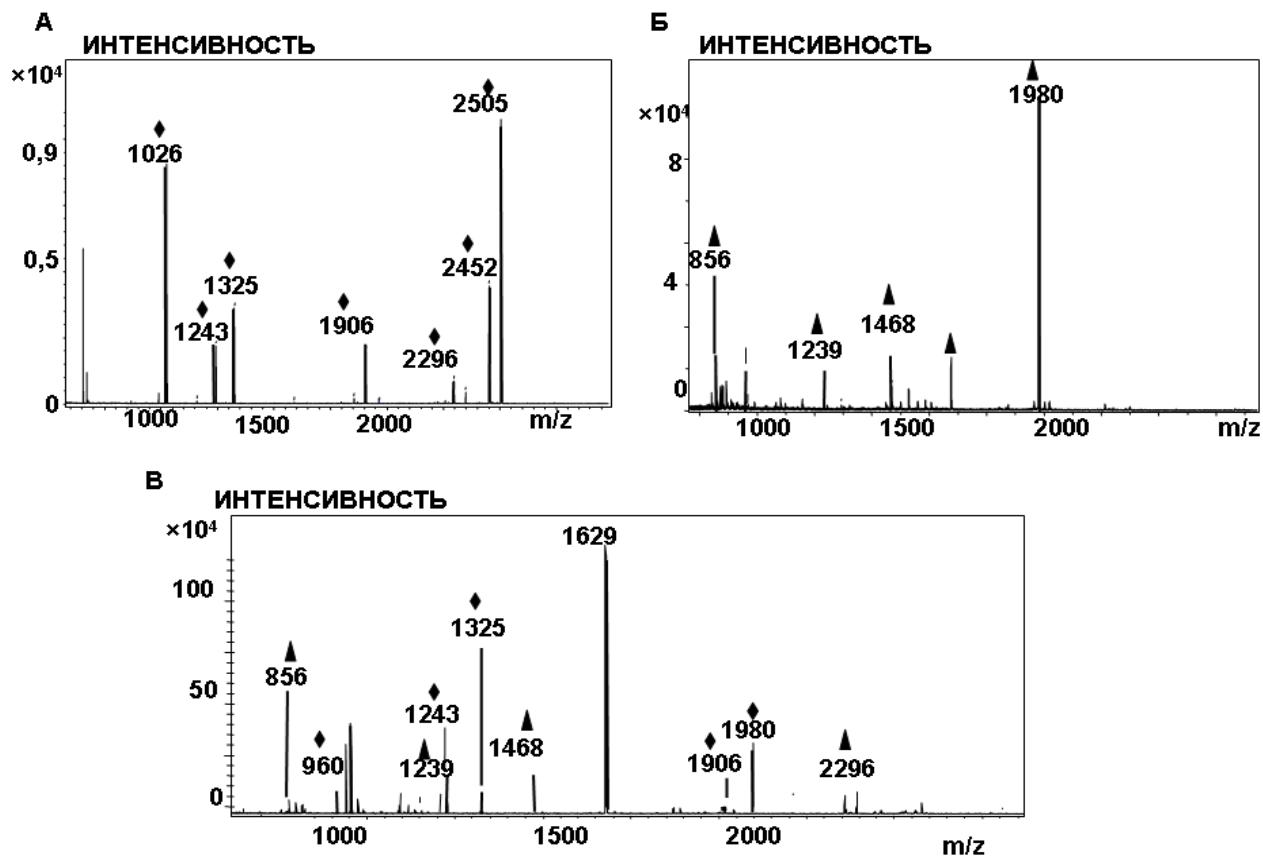


Рис. 4. (А) Масс-спектр трипсинолизированных объектов рабочей зоны АСМ-чипа с анти- $HCVcore_{im}$; (Б) масс-спектр рекомбинантного $HCVcoreAg$; (В) масс-спектр рабочей зоны АСМ-чипа с анти- $HCVcore_{im}$ после инкубации в растворе рекомбинантного $HCVcoreAg$ ($C=10^{-10}$ М). Экспериментальные условия: измерения были проведены на MALDI-TOF масс-спектрометре Microflex (Bruker).

Примечания: 1 цифрами указаны идентифицированные фрагменты белка; 2 \blacklozenge – идентифицированные фрагменты для анти- $HCVcore_{im}$; 3 \blacktriangle – идентифицированные фрагменты для $HCVcoreAg$.

МС-анализ АСМ-чипов с иммобилизованными молекулами анти- $HCVcore_{im}$ после инкубации в растворе рекомбинантного $HCVcoreAg$ с концентрацией 10^{-10} М позволил идентифицировать как анти- $HCVcore$, так и $HCVcoreAg$ (рис.4 Б,В). В результате МС-анализа рабочей зоны АСМ-чипа были выявлены следующие пептиды, соответствующие анти- $HCVcore$: $VNSAAFPAIEK$ ($m/z=1243,8$), $PKDVLITLTPK$ ($m/z=1325,8$), $VNSAAFPAIEKTISK$ ($m/z=1673,8$), $TISKTKGRPQADR$ ($m/z=1812,0$), $SVSELPIMHQDWLNGK$ ($m/z=1854,8$), $EFKCRVNSAAFPAIEK$ ($m/z=1906,8$), а также пептиды, соответствующие $HCVcoreAg$: $STNPKPQK$ ($m/z=899,51$), $MSTNPKPQK$ ($m/z=1030,58$), $GPRLGVRATR$

($m/z=1082,075$), *FPGGGQIVGGVYLLPR* ($m/z=1629,82$), *TSERSQPRGGRQPIPK* ($m/z=1793,8600$), *RPQDVKFPGGGQIVGGVYLLPR* ($m/z=2353,23$).

Для белковой пары «анти-HCVcore_{im}-HCVcoreAg» была выявлена зависимость между числом идентифицированных протеотипических пептидов и концентрацией исследуемых белков-мишеней в инкубационном растворе. Аналогично ранее полученным результатам для химического фишинга, в случае высокого содержания молекул белка-мишени в растворе ($\sim 10^{-8}$ М) удалось достоверно идентифицировать большее число пептидов как в случае *MALDI*-, так и *ESI*-МС-анализа по сравнению с низким содержанием белка-мишени в растворе аналита (рис.5).

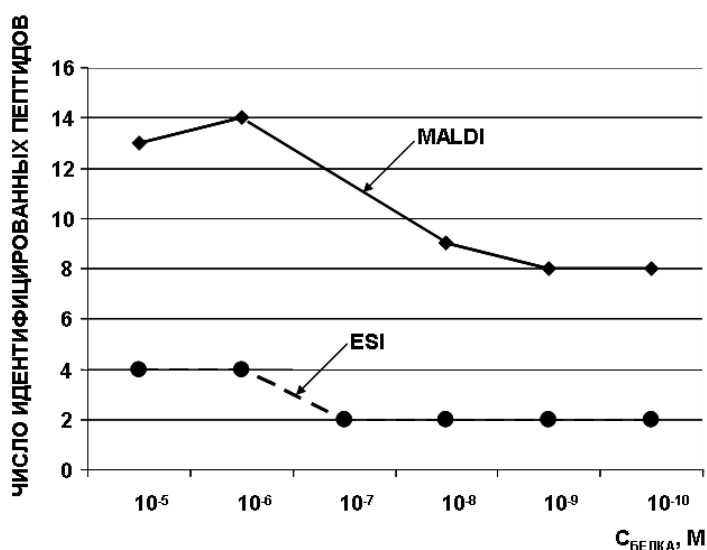


Рис. 5. Зависимости числа идентифицированных пептидов HCVcoreAg от концентрации белка в инкубационном растворе на масс-спектрометрах с MALDI-типом ионизации Autoflex III (Bruker Daltonics, Германия) и ESI-типом ионизации LC/MSD Trap XCT Ultra (Agilent, США).

В контрольной серии экспериментов анализировались АСМ-чипы, содержащие 2 контрольные зоны. Первая контрольная зона не включала иммобилизованные молекулы-зонды, на поверхности второй контрольной зоны были иммобилизованы МКА против другого белка – поверхностного антигена ВГВ (HBsAg). МС-анализ не выявил наличия детектируемых белковых молекул HCVcoreAg, что соответствует данным АСМ-регистрации, которая также не зафиксировала формирования объектов, соответствующих белковым молекулам в первой контрольной зоне и белковым комплексам во второй контрольной зоне АСМ-чипа.

МС-идентификация белков на поверхности АСМ-чипа, биоспецифически выловленных из образцов сыворотки крови.

Следующим этапом исследования стала адаптация АСМ-МС-метода для выявления и идентификации белков вирусных частиц HCV в сыворотке человека. В данном разделе проводился МС-анализ белков с поверхности АСМ-чипов после инкубации в растворах образцов сыворотки крови, положительных и отрицательных на наличие РНК вируса гепатита С по данным ПЦР анализа. В качестве молекул-зондов, иммобилизованных в рабочей зоне АСМ-чипа, выступали МКА против HCVcoreAg.

С целью выяснения вклада неспецифической сорбции компонентов сыворотки крови в формирование объектов на поверхности АСМ-чипа были проведены контрольные эксперименты. В первой серии экспериментов АСМ-чип, не содержащий анти-HCVcore_{im}, инкубировали в образце сыворотки человека положительной на наличие ВГС. МС-анализ таких чипов подтвердил данные АСМ и не выявил наличия объектов белковой природы. Вторая серия контрольных экспериментов проводилась для АСМ-чипов, содержащих иммобилизованные молекулы-зонды анти-HCVcore_{im} после его инкубации в образце сыворотки крови человека отрицательной на наличие ВГС, с целью обнаружения перекрестной специфичности моноклональных анти-HCVcore с компонентами сыворотки крови. В результате этого контрольного эксперимента также не удалось МС-идентифицировать белковые молекулы (Kaysheva A.L., Ivanov Yu. D., 2010).

Таким образом, МС-анализ АСМ-чипов после контрольных экспериментов не выявил неспецифической сорбции на поверхности АСМ-чипа компонентов сыворотки крови и сорбции на иммобилизованные моноклональные антитела за счет перекрестной реактивности для образцов сывороток крови, что доказывает специфичность АСМ-анализа.

Всего было проанализировано 28 АСМ-чипов, инкубированных в растворах образцов сыворотки крови, 14 из которых содержали и 14 – не содержали частицы HCV.

В результате MALDI-TOF-МС-анализа 9 АСМ-чипов после инкубации в растворе образцов сыворотки крови положительных на наличие частиц HCV по данным ПЦР была идентифицирована преимущественно Q8V7V3_9HEPC-изоформа HCVcoreAg, гомологичность выявленных изоформ кор-антигена HCV составила 90-96%.

В результате АСМ-МС-анализа с *MALDI*-типом ионизации было обнаружено, что наиболее часто в результате идентификации встречались следующие пептиды в составе HCVcoreAg: в 7 образцах сыворотки крови встретились $m/z=899,5$ 2-*AGWLLSPR*-9 и $m/z=1030,5$ 1-*MSTNPKPQK*-9, в 6 образцах – $m/z=1158,8$ 1-*MSTNPKPQKK*-10, $m/z=1529,8$ 1-*MSTNPKPQKKTNR*-13, $m/z=1629,8$ 24-*FPGGGQIVGGVYLLPR*-39, в 5 образцах – $m/z=1003,6$ 10-*KTNRNTNR*-17 и $m/z=1468,7$ 102-*GSRPSWGPTDPRR*-114, в 4 образцах – $m/z=900,5$ 44-*LGVRATRK*-51. Анализ положения в аминокислотной последовательности HCVcoreAg этих наиболее часто идентифицируемых пептидов показал, что все они принадлежат к консервативным областям HCVcoreAg (рис. 6). Литературные данные указывают на то, что HCVcoreAg является достаточно консервативным белком, степень идентичности аминокислотных остатков которого составляет около 85,3%, при этом наиболее высококонсервативными его участками являются: гидрофобный домен, включающий аминокислотные остатки (а.о.) 24-39, кластеры 2-23, 39-74 а.о. и 101-121 а.о. (Bukh et al., 1993).

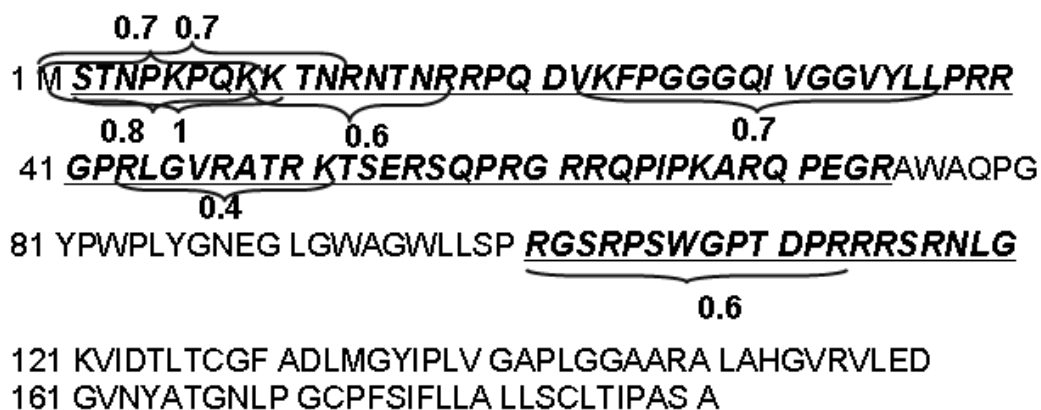


Рис. 6. Схематическое изображение частоты встречаемости пептидов Q8V7V3_9HEPC в образцах сыворотки крови.

Примечание: 1 – жирным шрифтом выделены высококонсервативные участки аминокислотной последовательности Q8V7V3, 2 – фигурными скобками с цифрами указаны наиболее часто идентифицируемые пептиды в сыворотке и частота их встречаемости МС-анализе белков с поверхности АСМ-чипов, инкубированных в различных образцах сыворотки крови.

Экспериментальные данные позволили выявить неравномерную частоту встречаемости пептидов HCVcoreAg среди MS-идентифицированных белков, выявленных в различных образцах сыворотки крови, содержащих HCV (рис.6). Данная информация может быть полезна для проведения диагностических анализов на основе масс-спектрометрии.

В ряде случаев в MS-спектрах белков, биоспецифически выловленных на поверхность рабочей зоны АСМ-чипов после инкубации в растворе образцов сыворотки крови, помимо детектируемого белкового маркера ВГС – HCVcoreAg, был выявлен другой белковый маркер – поверхностный гликопротеин E2. Соответствующие данному гликопротеиду пептиды представлены на масс-спектре, приведенном на рисунке 7. Идентификация данного вирусного белка (E2), входящего в состав частиц HCV, повышает достоверность результатов АСМ-МС-анализа.

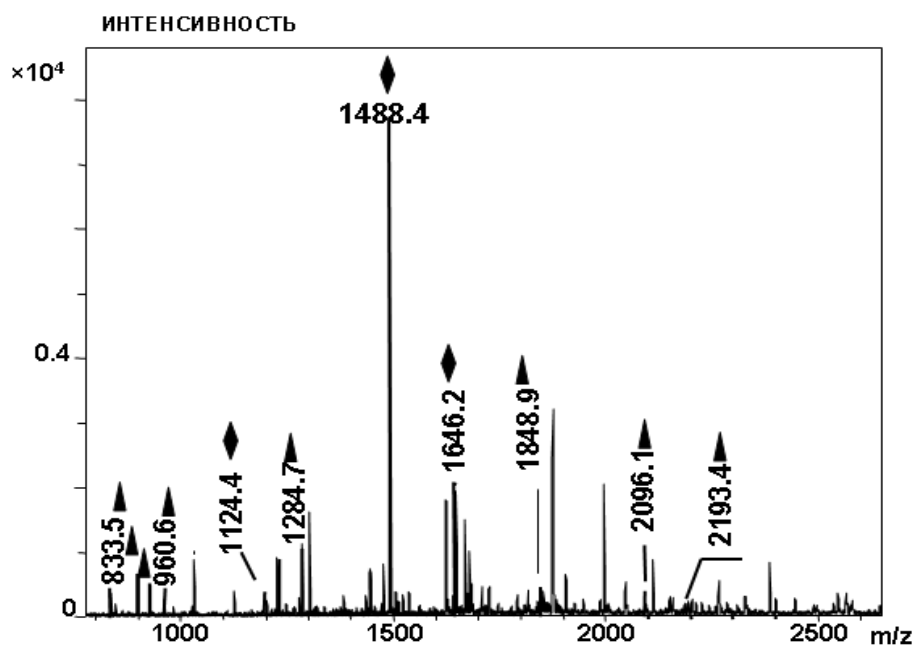


Рис. 7. Масс-спектр рабочей зоны АСМ-чипа с анти-HCVcore_{im} после инкубации в сыворотке, содержащей вирусные частицы гепатита С, экспериментальные условия: измерения были проведены на MALDI-TOF-масс-спектрометре Microflex (Bruker).

Примечание: 1. ▲ – идентифицированные фрагменты для HCVcoreAg; 2. ◆ – фрагменты гликопротеина E2.

МС-анализ с применением электроспрейного типа ионизации (ESI) АСМ-чипов после инкубации в растворах образцов сыворотки крови также позволил

идентифицировать маркерный белок HCV – HCVcoreAg – на поверхности АСМ-чипа. Полученные результаты АСМ-МС-анализа с двумя различными типами ионизации образцов хорошо согласуются между собой.

В результате анализа тандемных спектров, полученных с поверхности АСМ-чипов после инкубации в растворах образцов сыворотки крови, также был идентифицирован HCVcoreAg по двум его протеотипическим пептидам: *RPQDVKFPTGGQIVGGVYLLPR* ($m/z=799,7$) и *RPQDVKFPSGGQIVGGVYLLPR* ($m/z=795,0$).

Следует отметить, что те же пептиды были идентифицированы и при *ESI*-МС/МС-анализе рекомбинантного HCVcoreAg из раствора.

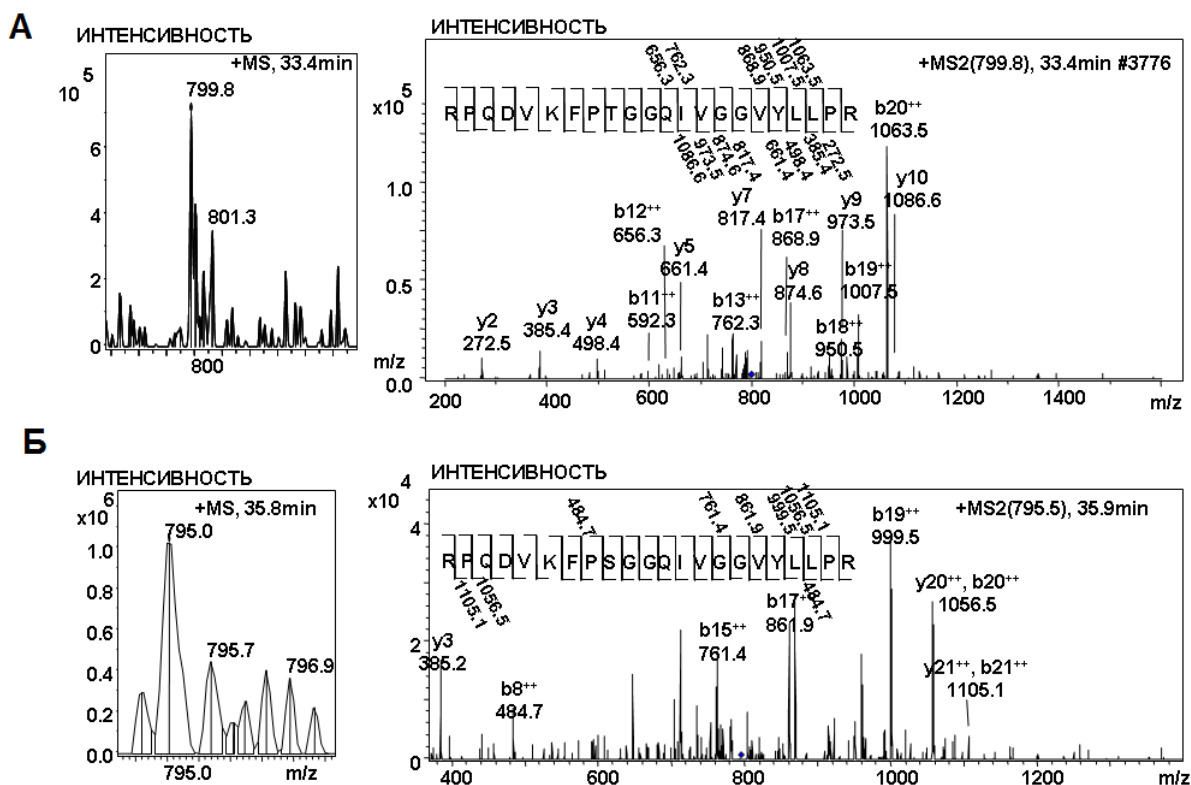


Рис. 8. *ESI*-МС/МС-спектр гидролизованных объектов с поверхности АСМ-наночипа с иммобилизованным анти-HCVcoreAg после инкубации в растворе образца сыворотки крови. (А) пептид HCVcoreAg *RPQDVKFPTGGQIVGGVYLLPR* ($m/z=799,8$); (Б) пептид HCVcoreAg *RPQDVKFPSGGQIVGGVYLLPR* ($m/z=795,5$). Экспериментальные условия: измерения были проведены на масс-спектрометре *LC/MSD Trap XCT Ultra* (Agilent).

Таким образом, МС-анализ с *MALDI*- и *ESI*-типами ионизации с использованием АСМ-биоспецифического фишинга позволяют проводить успешную идентификацию белков на поверхности АСМ-чипа после его инкубации в растворе многокомпонентной смеси – сыворотке крови.

Выводы:

1. Разработана схема МС-анализа белков, выловленных на поверхность АСМ-чипа с помощью химического или биоспецифического фишинга;
2. Подобраны условия ферментативного гидролиза белков на поверхности АСМ-чипа для последующей МС-идентификации с использованием *MALDI*- и *ESI*-типов ионизации;
3. Проведена МС-идентификация 11 типов белков на поверхности АСМ-чипов: в том числе 6 типов белков, выловленных на поверхность АСМ-чипа с помощью химического фишинга и 5 типов белков, выловленных за счет биоспецифического взаимодействия на соответствующие молекулы-зонды, иммобилизованные на АСМ-чипе;
4. Проведен МС-анализ белка GP120, биоспецифически выловленного из раствора анализата на аптамер, иммобилизованный на поверхности АСМ-чипа. Схема АСМ-МС-анализа с использованием аптамера к GP120 в качестве биологического зонда была реализована впервые;
5. Разработанная схема АСМ-МС-анализа апробирована для выявления белкового маркера заболевания гепатита С HCVcoreAg из сыворотки крови. Проведена МС-идентификация белков HCVcoreAg и E2 на поверхности АСМ-чипов, биоспецифически выловленных на иммобилизованные анти-HCVcore из образцов сыворотки крови, содержащей частицы HCV.

Публикации

1. Иванов Ю.Д., Иванов А.В., Кайшева А.Л., Згода В.Г., Козин С., Уи Бон Уа Г., Усанов С.А., Арчаков А.И. Продуктивные и непродуктивные комплексы в цитохром Р450-содержащих системах. // Биомедицинская химия. – 2009. – Т. 55, №3. – С. 310-330.

1a. Ivanov Yu.D., Ivanova A.V., Kaysheva A.L., Zgoda V.G., Gaston Hui-Bon-Noab, Usanov S.A., Archakova A.I. Productive and non-productive complexes in cytochrome P450-containing systems. // Biochemistry (Moscow) Supplemented series B: Biomedical Chemistry. – 2009. – Vol.3, № 2. – P. 183-197.

2. Кайшева А.Л., Плешакова Т.О., Французов П.А., Иванов Ю.Д., Згода В.Г., Зибров В.С., Крохин Н.В., Ястребова О.В., Конев В.А., Учайкин В.Ф., Арчаков А.И. Визуализация и идентификация вирусных частиц гепатита С при помощи атомно-силовой микроскопии, сопряженной с масс-спектрометрией. // Биомедицинская химия. – 2010. – Т. 56, № 1. – С. 26-39.

2a. Kaysheva A.L., Ivanov Yu.D., Zgoda V.G., Frantsuzov P.A., Pleshakova T.O., Krokhin N.V., Ziborov V.S., Archakov A.I. Visualization and Identification of Hepatitis C Viral Particles by Atomic Force Microscopy Combined with MS/MS Analysis. // Biochemistry (Moscow) Supplemented series B: Biomedical Chemistry. – 2010. – Vol. 4, № 1. – P. 16-25.

3. Кайшева А.Л., Французов П.А., Плешакова Т.О. Иванов Ю.Д. Згода В.Г. Зибров В. С., Крохин Н.В., Арчаков А.И. Идентификация белков и вирусных частиц с помощью комбинации атомно-силовой микроскопии и масс-спектрометрии. // Сборник тезисов докладов участников Первого международного конкурса научных работ молодых ученых в области нанотехнологий Rusnanotech 08. – Москва. – 3-5 декабря 2008. – С. 896.

4. Ivanov Y.D., Pleshakova T.O., Nikitina S.E., Ivanov A.V., Kaysheva A.L., Frantsuzov P.A., Archakov A.I. Nanobiochips for Proteomics and Diagnostics. // Материалы международной конференции HUPO 7th Annual World Congress. – Amsterdam, Netherlands. – August, 16-20. – 2008. – URL: <http://hupo.org/meetings/congress/?7>

5. Иванов Ю.Д., Плешакова Т.О., Никитина С.Е., Кайшева А.Л., Французов П.А., Иванов А.В., Арчаков А.И. Нанобиология для диагностики. // IV съезд Российского общества биохимиков и молекулярных биологов. – Новосибирск, Россия. – 11-15 мая 2008. – С.306.

6. Kaysheva A.L., Frantsuzov P.A., Pleshakova T.O., Ivanov Yu.D., Zgoda V.G., Ziborov V.S., Krokhin N.V., Archakov A.I. Combination of atomic force microscopy with mass spectrometry for identification of proteins and viral particles. // Сборник материалов международной конференции The Second Nanotechnology International Forum. – October, 6-8. – 2009. – Moscow, Russia. – P.896-897.

7. Kaysheva A.L., Ivanov Yu.D., Zgoda V.G., Frantsuzov P.A., Pleshakova T.O., Krokhin N.V., Archakov A.I. Combination of AFM fishing and MS for identification of

Финансирование работы

Проведенные исследования поддержаны финансированием из научных контрактов в рамках ФЦП «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2007-2012 годы» № 02.552.11.7060, в рамках ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» 02.740.11.0791, гранта РФФИ .09-04-12113-офи_м.

Список сокращений

ВГС – вирусный гепатит С

HBsAg –поверхностный антиген вируса гепатита В

HCVcoreAg – нуклеокапсидный белок вируса гепатита С

α -FP – альфа-фетопроtein

BM3 – флавоцитохром P450 (*Bacillus megaterium*)

GP120 – оболочечный гликопротеин 120 вируса иммунодефицита человека

МКА – моноклональные антитела

HCV – вирус гепатита С

ПЦР – полимеразная цепная реакция

АСМ – атомно-силовая микроскопия, атомно-силовой микроскоп

МС – масс-спектрометрия, масс-спектрометр

MALDI (matrix assisted laser desorption and ionization) – лазерная ионизация с участием матрицы

ESI – electro spray ionization – электроспрейный тип ионизации

ТФУ – трифторуксусная кислота

НССА – α -циано-4-гидроксикоричная кислота

DHB – дигидроксibenзойная кислота