

КАЙШЕВА АННА ЛЕОНИДОВНА

**МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ БЕЛКОВ НА
ФУНКЦИОНАЛИЗИРОВАННЫХ ЧИПАХ ДЛЯ АТОМНО-СИЛОВОГО
МИКРОСКОПА**

1.5.4. – Биохимия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
доктора биологических наук

Москва – 2022

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича» (ИБМХ)

Научные консультанты: доктор биологических наук
Плешакова Татьяна Олеговна
доктор биологических наук
Пономаренко Елена Александровна

Официальные оппоненты: **Шевченко Валерий Евгеньевич**, доктор биологических наук, профессор, ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н. Блохина» Министерства здравоохранения Российской Федерации, главный научный консультант

Ларина Ирина Михайловна, доктор медицинских наук, профессор, ФГБУН Государственный научный центр Российской Федерации Институт медико-биологических проблем Российской академии наук, лаборатория протеомики, заведующая лабораторией

Вирус Эдуард Даниэлевич, доктор химических наук, ФГБНУ «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии», лаборатория регуляции агрегатного состояния крови, ведущий научный сотрудник

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук

Защита состоится «10» ноября 2022 г в 11.00 часов на заседании диссертационного совета Д 001.010.01 на базе Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича» по адресу: 119121, Москва, ул. Погодинская, д. 10, стр. 8.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ИБМХ и на сайте www.ibmc.msk.ru.

Автореферат разослан «___» _____ 2022 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
кандидат химических наук

Карпова Е.А.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования. Создание новых аналитических систем для изучения молекулярных основ развития патологических процессов в организме человека уже несколько десятилетий остается перспективным направлением биомедицинских исследований. Несмотря на то, что зачастую в клинической практике постановка диагноза и планирование терапии не требуют знаний об этиологии заболевания или патогенезе, требуется осознание событий на молекулярном и клеточном уровне. Это позволяет предложить новые подходы для определения групп риска среди условно-здоровых людей (Funkhouser 2018). Важным является развитие методов высокочувствительного обнаружения белков, сопровождающих развитие заболевания на ранней стадии, то есть в момент «перепрограммирования» физиологических процессов из состояния здоровья в болезнь (Archakov и др. 2007; Zhang и др. 2012; Liotta и др. 2012).

Необходимость применения новых высокочувствительных методов в протеомном анализе обусловлена, в том числе, пониманием сложности функционирования генома и высокой значимости эпигенетической регуляции экспрессии генов (Peng и др. 2015). После завершения международного проекта «Геном человека» убедительных успехов в сфере популяционной диагностики не наблюдается: расшифрованный геном не избавил человечество от болезней. Начиная с 2000-х годов, развитие в области живых систем получила протеомика. Ограничения, связанные с применением протеомных экспериментальных подходов, обусловлены недостаточной концентрационной чувствительностью в детектировании белковых маркеров заболеваний в крови в концентрации 10^{-12} М и ниже (Liotta и др. 2012).

В детектировании нуклеиновых кислот проблема чувствительности решена методами полимеразной цепной реакции, в основе которых успешно применяется процедура амплификации. В протеомном анализе усиление сигнала отдельных молекул за счет амплификации не представляется возможным. Зарубежные и отечественные коллективы предпринимают усилия для решения проблемы ограничения концентрационной чувствительности в детектировании

белков. Одним из решений является развитие нанотехнологических подходов, которые позволяют регистрировать биологические молекулы в диапазоне ультранизких концентраций (10^{-15} М и ниже) вплоть до единичных молекул (Pleshakova и др. 2015). Использование указанных подходов ориентировано на применение сенсорных элементов соразмерных исследуемым биомолекулам и использование поверхностей, обладающих особыми свойствами на наноразмерном уровне. Оба направления реализованы в молекулярных детекторах, к которым относятся атомно-силовой микроскоп (АСМ) и нанопроволочный биосенсор.

При использовании АСМ сенсорным элементом является кантилевер, радиус острия которого сравним с размером белковой молекулы (~1 нм), при этом концентрирование молекул проводится на специально подготовленных атомарно-ровных подложках (чипах). Поверхность чипов обычно функционализована химически или биоспецифически за счет иммобилизации молекулярных зондов – антител или аптамеров (Kaysheva и др. 2021; Pleshakova и др. 2017; Ivanov и др. 2015). В первом случае концентрирование белков на поверхности осуществляется посредством ковалентного связывания биомакромолекул с активными группами на поверхности (химический фишинг), а во втором – посредством формирования биоспецифических комплексов между целевыми молекулами белка и зондами на поверхности (биоспецифический фишинг). Подход для обнаружения белков с применением комбинации фишинга и атомно-силового микроскопа был обозначен как «АСМ-фишинг» и подробно рассмотрен в докторской диссертации Т.О. Плешаковой (2019). Возможность использования АСМ-фишинга для детектирования белков из растворов низкой концентрации и образцах сывороток крови экспериментально показана для белков вирусного происхождения (Pleshakova и др. 2017 и 2018).

Существенным ограничением применения АСМ-фишинга для решения биомедицинских задач является невозможность идентификации выявленных объектов. Возник запрос на развитие методов подтверждения и верификации результатов измерений, выполненных с использованием молекулярных детекторов: данные детекторы достигли столь критичного уровня

чувствительности, что альтернативного метода подтверждения не существует. Необходимо найти диапазон концентраций, в котором результаты анализа с применением молекулярных детекторов могут быть подтверждены и дополнены другим методом, рутинно применяемым в биоанализе.

Эффективным методом, позволяющим провести идентификацию биомолекул, является масс-спектрометрический анализ (далее – МС-анализ). В настоящей диссертационной работе масс-спектрометрия выбрана как основополагающий метод для верификации результатов АСМ-фишинга. Методы масс-спектрометрического анализа характеризуются высокой точностью, селективностью и производительностью (Alharbi и др. 2020). В диссертационной работе исследован диапазон концентраций анализируемых растворов, в котором комбинация АСМ-фишинга и масс-спектрометрии, обозначенная как «АСМ/МС подход», успешно применена для высокочувствительного детектирования белков. В фокусе описанных далее исследований находятся чипы для АСМ. Следует подчеркнуть, что в контексте выполненных исследований АСМ-чипы рассмотрены как пример поверхностей, обладающих особыми свойствами на наноразмерном уровне. Разработанные методики и полученные знания могут быть применены для разных типов поверхностей для нанотехнологических устройств, такие как кюветы оптического биосенсора и чипы для нанопроволочного детектора. В работе обобщены результаты масс-спектрометрического анализа молекулярных объектов с поверхностями чипов для нанотехнологических устройств.

Цель работы: интеграция масс-спектрометрии в систему высокочувствительного биологического анализа на основе молекулярных детекторов и фишинга.

Задачи исследования

1. Выполнить расчётное обоснование критериев применимости и предела концентрационной чувствительности АСМ/МС подхода.
2. Подтвердить расчетное обоснование в экспериментах по обнаружению белков с использованием различных типов функционализированных поверхностей и различных масс-спектрометрических детекторов.

3. Провести экспериментальную проверку применимости АСМ/МС подхода для идентификации белков в биологических образцах, сконцентрированных на функционализированной поверхности с учетом биоспецифического взаимодействия.

4. Определить применимость АСМ/МС подхода для анализа биологической активности ферментативных систем, иммобилизованных на поверхности чипов.

Научная новизна работы. Впервые предложен подход, позволяющий верифицировать результаты анализа с применением нового метода – АСМ-фишинга – путем масс-спектрометрической идентификации пептидных фрагментов белков. Установлено, что химически и биоспецифически функционализированные поверхности чипов в сочетании с процедурой фишинга позволяют концентрировать целевые белки из большого объема ($V=1$ мл) на небольшой площади чипа (до 1 см^2) в количестве, достаточном для масс-спектрометрического анализа.

Разработаны и апробированы на нескольких типах чипов для АСМ процедуры подготовки поверхностей для последующей идентификации белков. Впервые показано, что концентрирование белков на функционализированной поверхности чипов позволяет повысить концентрационную чувствительность масс-спектрометрического метода на два порядка по сравнению с измерениями в растворе без предварительного концентрирования.

Экспериментально показана эффективность концентрирования целевых белков на специально подготовленных поверхностях для повышения концентрационной чувствительности масс-спектрометрических детекторов (времяпролетный, ионная ловушка, тройной квадруполь) в диапазоне концентраций от 10^{-6} до 10^{-15} М.

Показано, что масс-спектрометрический анализ может быть использован не только для идентификации белков с чипов для АСМ, но и для оценки биологической активности ферментативных систем.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Атомарно-ровные поверхности (АСМ-чипы), функционализированные посредством химических агентов или иммобилизованных молекулярных зондов

(антитела или аптамеры), могут быть использованы для концентрирования белков в количестве, достаточном для масс-спектрометрического анализа.

2. АСМ/МС подход обеспечивает повышение концентрационной чувствительности масс-спектрометрических методов на два порядка по сравнению с измерениями в растворе без использования функционализированных поверхностей.

3. Масс-спектрометрический анализ предоставляет возможность анализа активности ферментативных систем, иммобилизованных на поверхности чипов.

4. АСМ/МС подход позволяет проводить анализ белков в растворах с концентрацией 10^{-15} М и выше.

Практическая значимость работы. Разработанный подход позволяет решать фундаментальные биологические задачи инвентаризации белкового состава образцов биологического происхождения для исследования и уточнения молекулярных механизмов развития физиологических и патологических процессов в организме человека. Предлагаемое направление применимо для решения прикладных медицинских задач, в том числе, выявления кандидатных маркеров белковой природы, ассоциированных с развитием заболеваний. Результаты работы предлагают методы для верификации данных, полученных с помощью нанотехнологических устройств. Полученные результаты могут быть в дальнейшем использованы для развития высокочувствительных подходов детектирования белков с применением таких устройств.

Личный вклад соискателя. Автором предложен дизайн исследования и разработаны процедуры предварительной подготовки чипов для масс-спектрометрических измерений. Спланированы и реализованы экспериментальные работы, проведен масс-спектрометрический анализ белков, сконцентрированных на чипах, с использованием:

– матрично активированной лазерной десорбции/ионизации в комбинации с времяпролетным детектором,

– детектора типа ионная ловушка в режиме сканирования фрагментных ионов в комбинации с системой высокоэффективной жидкостной хроматографии.

Проведен анализ белкового состава химически и биоспецифически функционализированной поверхности чипов после инкубации в растворах аналита и образцах плазмы и сыворотки крови.

Автором выполнен цикл масс-спектрометрических экспериментов по идентификации и оценке функциональных свойств ферментов семейства цитохромов P450, иммобилизованных на поверхности чипов.

Апробация работы. Результаты доложены и обсуждены на ежегодных итоговых конференциях и конгрессах: 11th Human Proteome World Congress (Бостон, 2012), «Биотехнология: состояние и перспективы развития» (Москва, 2011 и 2020), «Клиническая протеомика и постгеномная медицина» (Москва, 2017), «Молекулярные основы клинической медицины – возможное и реальное» (Санкт-Петербург, 2017), «Патофизиология, клиника и последствия нарушений микробиоты» (Москва, 2019), «Генетика XXI век» (Москва, 2019), «III Объединенный научный форум физиологов, биохимиков и молекулярных биологов» (Москва, 2021).

Публикации. Материалы диссертационной работы отражены в 42 публикациях: 30 статей (6 – в российских и 24 – в международных научных изданиях), 9 тезисов российских и международных научных конференций, а также монография, глава в книге и патент. Индекс Хирша соискателя ученой степени составляет 13 по данным системы Scopus.

Объем и структура диссертации. Работа изложена на 241 странице машинописного текста, включает 27 таблицы, 43 рисунка. Состоит из введения, обзора литературы, описания методов исследования, результатов и обсуждения полученных данных, заключения, выводов и списка литературы, включающего 341 источник.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

В первой главе диссертации приведен обзор современной литературы по направлению исследования с глубиной анализа 15 лет. Анализ проблемы практического применения современных протеомных аналитических систем высвечивает ограничения концентрационной чувствительности. Несомненно

сложность разработки новых клинко-диагностических решений вследствие низкого содержания в биообразце кандидатных молекулярных маркеров (Liotta и др. 2012). Рассмотрены нанотехнологические подходы, основанные на регистрации сигнала от единичных молекул, которые позволяют преодолеть барьер концентрационной чувствительности. Выполнен анализ современных подходов концентрирования целевых белков, (1) предусматривающих использование высокоразвитых поверхностей, в том числе хроматографические колонки, пористые наноматериалы, трехмерные гидрогелевые капли, и (2) основанных на особенностях взаимодействия макромолекул с поверхностями и обладающих особыми свойствами на наноразмерном уровне. К этой категории относятся чипы для оптических биосенсоров, атомно-силового микроскопа и нанопроволочного детектора. Описаны принципы создания поверхностей, обладающих химическим или биоспецифическим сродством к целевым молекулам аналита. Представлены данные о современном научном заделе зарубежных и отечественных научных коллективов в области комбинации биосенсорных устройств и масс-спектрометрических детекторов для выявления и идентификации белков.

Во второй главе диссертации приведено описание материалов, объектов исследования, а также методов, разработанных в работе. Описаны методики получения гидролизата белков на функционализированных поверхностях чипов для АСМ, методики масс-спектрометрической регистрации белков в растворе и образцах биологического происхождения, протоколы идентификации биологических молекул.

Третья глава работы посвящена расчетному обоснованию возможности применения АСМ/МС подхода в детектировании белков. Представлены экспериментальные результаты, подтверждающие эффект концентрирования различающихся по физико-химическим свойствам белковых молекул на поверхностях чипов из исследуемых растворов с концентрацией аналита в диапазоне от 10^{-6} до 10^{-15} М.

В четвертой главе рассматриваются пути разработки методик предварительной подготовки АСМ-чипов для масс-спектрометрического

анализа. Описан выбор оптимального состава смеси для гидролиза, условий проведения процедуры трипсинолиза, а также условий элюции триптической смеси с поверхности.

В пятой главе показаны результаты определения аналитической чувствительности АСМ/МС подхода с применением трех вариантов фишинга, в том числе сорбции белков на нефункционализированную поверхность, ковалентного связывания белков с функционализированной химическими агентами поверхностью (химический фишинг) и биоспецифического связывания белков с поверхностью, содержащей иммобилизованные молекулярные зонды (биоспецифический фишинг).

В шестой главе представлены результаты применения АСМ/МС подхода для детектирования вирусных и медицинских значимых белков в исследуемых образцах сыворотки и плазмы крови.

В седьмой главе обсуждаются результаты применения комбинации нанотехнологических устройств и масс-спектрометрических детекторов для анализа функциональной активности ферментов. В частности, показаны результаты количественного анализа продуктов ферментативных реакций для белков семейства цитохромов P450.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали чипы для атомно-силового микроскопа (АСМ), которые представляли собой специально подготовленные атомарно-ровные поверхности. В зависимости от решаемой задачи поверхности использовали без модификации, а также функционализированные химическими агентами (кросс-линкеры) либо посредством иммобилизации молекулярных зондов. В качестве молекулярных зондов использовали моноклональные антитела или аптамеры, специфичные по отношению к целевым белкам. В процессе инкубации чипов на поверхности осуществлялся фишинг молекул белка из исследуемого раствора. В работе рассмотрены три варианта фишинга белков. Сорбция для не функционализированных поверхностей чипов. Химический фишинг для чипов, функционализированных химическими агентами, при котором осуществляется

ковалентное связывание белков с поверхностью. На поверхностях с иммобилизованными молекулярными зондами проводился биоспецифический фишинг. После процедуры концентрирования с поверхности проводили элюцию пептидов исследуемых белков в раствор для проведения масс-спектрометрического анализа.

Использованные для фишинга целевые белки и молекулярные зонды приведены в Приложении. *Моноклональные антитела*: анти-альфа-фетопротеин (USBio, США), анти-GP120 (Sigma, США), анти-HCVcore (Immuno Diagnostics, США), анти-HBsAg (Aldevron, США) и анти-миоглобин (Fluka, США). *Аптамеры*: анти-GP120 был синтезирован в научной группе С.П. Радько (ИБМХ, Россия) и аптамеры трех вариантов, специфичные для HCVcoreAg производства ЗАО «Евроген» (Россия) чистотой 99%.

Образцы сыворотки крови для исследований получены от условно-здоровых участников исследования (n=10) и участников с диагнозом вирусный гепатит С (n=17). Образцы предоставлены ФБУН МНИИЭМ им. Габричевского¹ и ФГБУ «НМХЦ им. Н. И. Пирогова» Минздрава России². Образцы сыворотки крови предварительно исследовали на содержание вируса гепатита С методом иммуноферментного анализа «Бест анти-ВГС» (ВекторБест, Россия). Образцы сыворотки крови детей (n=7) с расстройствами аутистического спектра (РАС), средний возраст детей 9 ± 2 лет и образцы сыворотки крови здоровых родителей со средним возрастом $31,5 \pm 18$ лет были предоставлены «Школой-интернатом № 2» Краснодарского края. Образцы плазмы венозной крови условно-здоровых участниц исследования (n=22) в возрасте 18-53 года и женщин (n=55) с диагнозом рак яичников (I-III стадии) в возрасте 19-77 лет были предоставлены НМИЦО им. Н.Н. Блохина Минздрава России³. Получено заключение этического комитета и информированное согласие участников исследования или

¹ Федеральное бюджетное учреждение науки Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора

² Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медико-хирургический центр имени Н. И. Пирогова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

³ ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н. Н. Блохина» Минздрава России

их законных представителей на проведение научного исследования с использованием образцов сыворотки или плазмы крови.

В изготовлении чипов для АСМ в работе использовалась слюда мусковит (SPI, США) и высокоориентированный графит (ООО «НТ-МДТ», Россия). Поверхность чипов, изготовленных из слюды, была функционализирована химическими агентами или содержала иммобилизованные молекулярные зонды⁴. Способы предварительной подготовки чипов для проведения масс-спектрометрических измерений разработаны в исследовании и отражены в четвертой главе диссертации и разделе «Результаты и обсуждение» данного автореферата.

Для выполнения масс-спектрометрических измерений МАЛДИ (матрично активированная лазерная десорбция/ионизация) сухие триптические смеси растворяли в 10 мкл 0,7% раствора ТФУ; для измерений методом электроспрея – в 10 мкл 0,1% раствора муравьиной кислоты.

В работе использованы следующие масс-спектрометрические (МС) системы: (1) Autoflex III (Bruker, Германия) – МАЛДИ-МС; (2) LC/MSD Trap XST Ultra (Agilent, США) – прямой ввод методом электроспрея и ВЭЖХ-МС/МС; (3) Q Exactive (Thermo Scientific, США) – сопряжение детектора типа орбитальная ловушка ионов и ВЭЖХ; (4) Agilent 6495 Triple Quadrupole (Agilent, США) – ВЭЖХ-ММР. Использовали хроматографические системы: Agilent 1200 (Agilent, США) и Ultimate 3000 Nano-flow (Thermo Scientific, США) (табл. 1).

Калибровочные измерения для масс-спектрометрических детекторов с электрораспылением проводили прямым вводом калибрантов для положительного и отрицательного режимов измерений в соответствии с рекомендациями производителя. Калибровку времяпролетного детектора осуществляли с использованием пептидного стандарта «Peptide Calibration Standard» (Bruker Daltonics, Германия).

⁴АСМ-анализ выполнен научной группой под руководством Плешаковой Т.О. в лаборатории нанобиотехнологии ИБМХ.

Тандемные масс-спектры анализировали с использованием протеомных поисковых машин⁵: OMSSA (Geer и др. 2004), Mascot (Perkins и др. 1999), X!Tandem (Craig и др. 2004). Спектры МАЛДИ анализировали с использованием программы Mascot. Достоверность поиска оценивали методом симуляции инвертированных аминокислотных последовательностей.

Таблица 1. Условия масс-спектрометрических измерений.

МС-анализ	Состав фазы А и Б	Градиент, мин	Параметры измерения		
			Диапазон m/z	Накопление МС-спектра	Программное обеспечение
МАЛДИ-МС, AutoflexIII (Bruker, Германия)	прямой ввод с МАЛДИ мишени	–	750-3000 (MC1)	10 ⁵ лазерных ударов	flexAnalysis 2.0
ВЭЖХ-МС/МС, LC/MSD TrapXCT Ultra (Agilent, США)	0,1% HCOOH в деионизованной воде; 0,1% HCOOH в 90% ACN	80	400-1200 (MC1) 200-1350 (MC2)	1×10 ⁵	Data Analysis 3.3
ВЭЖХ-Orbitrap, Q Exactive (Thermo Scientific, США)	0,08% HCOOH, 0,015% трифторуксусная кислота; 0,08% HCOOH, 0,015% ТФУ в ACN	80	420-1250 (MC1) 200-1350 (MC2)	5×10 ⁵	Mass Hunter B 2.0
ВЭЖХ-ММР*, Agilent 6495 Triple Quadrupole (Agilent, США)	0,1% HCOOH в деионизованной воде; 0,1% HCOOH в растворе 90% ACN	75	400-1500 (MC1)	1×10 ⁵	Mass Hunter Analysis B02

ММР* – масс-спектрометрический метод мониторинга множественных реакций.

Реактивы: ацетонитрил (ACN), изопропанол, муравьиная кислота (HCOOH, Acros, США), трифторуксусная кислота (ТФУ), бикарбонат аммония, мочеви́на (Sigma, США); α-циано-4-гидроксикоричная кислота (HCCA), дигидроксибензойная кислота (DHB) (Bruker Daltonics, Германия); трипсин (Promega, США); натрия этилен диамин тетраацетат двузамещенный (ЭДТА), N-

⁵Параметры идентификации белков: библиотека “Swiss-Prot” для Homo sapiens, дополненная библиотекой случайно сгенерированных аминокислотных последовательностей, заряд ионов-предшественников 2⁺-4⁺, гидролитическое расщепление трипсином с разрешенным одним пропущенным сайтом для гидролиза. Допускалась точность измерений ионов-предшественников и фрагментных ионов для масс-спектрометра типа ионная ловушка и времяпролетного масс-спектрометра не более 200 м.д. и 0,3 Да, для орбитальной ловушки ионов – не более 10,0 м.д. и 0,01 Да. Учитывалось наличие модифицированных форм пептидов и белков: пиридилэтилирование цистеина и окисление метионина. Допустимый порог ложноположительных identifications для ионов-предшественников (FDR) составлял не более 1 %

гидроксиметиламинометан гидрохлорид (Tris-HCl), 4-винилпиридин и N,N-диметилформамид (Sigma, США); деионизованная вода, очищенная при помощи установки Millipore Simplicity UV (Франция), этанол (Реахим).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Расчетное обоснование применения АСМ/МС подхода

Технологии белковых чипов развиваются в направлении миниатюризации, экономичности потребления реагентов и молекулярных зондов, дизайна поверхностей с массивом сенсорных зон. Сформировалась отдельная область протеомного анализа с использованием плоских чипов, пригодных для спектроскопического детектирования (Kung, 2014). В частности, атомно-силовая микроскопия (АСМ) позволяет не только визуализировать белки, но и наблюдать за «жизненным» циклом отдельной молекулы в ходе каталитического цикла. Ограничением применения методов АСМ является затруднение подсчета числа визуализированных объектов в области высоких концентраций $>10^{-6}$ М в зависимости от физико-химических свойств исследуемого белка. При этих значениях концентраций формируется сложная топология поверхности с чрезмерно высокой плотностью объектов (Ivanov и соавт., 2020). В свою очередь масс-спектрометрическая идентификация эффективна в данном диапазоне концентраций. Сочетание двух принципиально разных типов детектирования – единичных объектов со стороны АСМ, и ансамбля молекул со стороны масс-спектрометрии требует понимания концентрационной зоны их «перекрытия», в которой один аналитический метод может быть верифицирован другим.

В диссертационной работе предложен расчет эффекта концентрирования молекул белка на специально подготовленной поверхности АСМ-чипа из раствора в количестве, достаточном для масс-спектрометрической идентификации (на уровне 10^4 - 10^5 молекул). Расчет приведен для конфигураций АСМ-чипов, способы изготовления которых подробно описаны в докторской диссертации Т.О. Плешаковой (2019 г.). Расчет выполнен для поверхности (тип слюда), функционализированной химическим агентом (сукцинимидным кросс-линкером), которая содержит терминальные $-NH_2$ -группы (рис. 1).

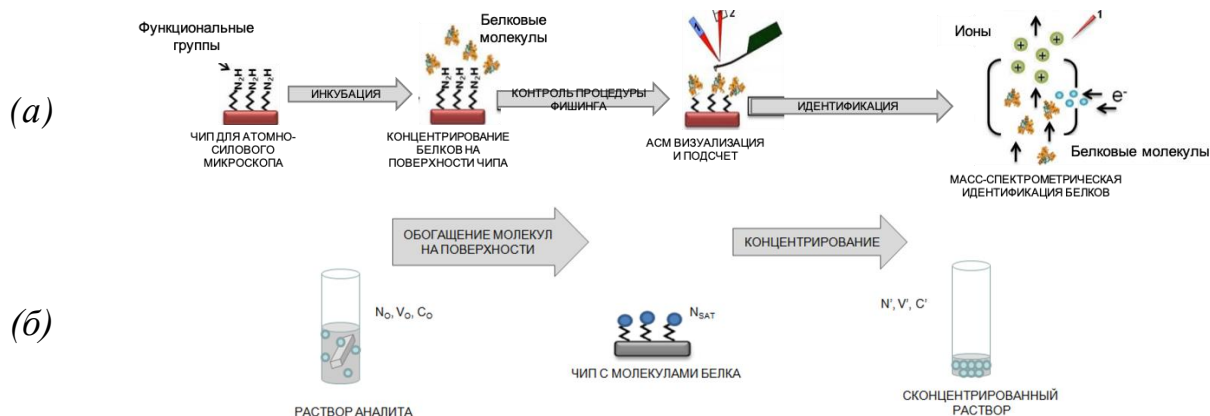


Рисунок 1. – (а) Схема химического фишинга белков на поверхности чипов с последующими измерениями методами атомно-силовой микроскопии и масс-спектрометрии. (б) Принцип АСМ/МС подхода. Проводится инкубация чипа с химически активированной поверхностью в растворе аналита (объем V_0 , количество частиц N_0 , концентрация C_0). В результате химического фишинга осуществляется концентрирование молекул белка на поверхности чипа (количество частиц N_{SAT}). Далее проводится элюция молекул (фрагментов) белка с поверхности чипа (количество частиц N') в объем конечного раствора (объем V' , концентрация C'), $V' \ll V_0$.

Площадь сенсорной зоны чипа представлена двумя вариантами – 1 см^2 («большая» сенсорная зона) и 1 мм^2 («малая» сенсорная зона). Процедура химического фишинга реализуется посредством необратимого ковалентного связывания молекул белка на поверхности чипов (Ivanov и соавт., 2015; Valueva и соавт., 2020). Теоретическое определение предела концентрационной чувствительности АСМ/МС подхода для идентификации белков основано на допущении, что молекулы белка необратимо связываются с поверхностью с формированием монослоя (допущение №1). Таким образом, для химического фишинга чип с функционализированной поверхностью инкубируется в растворе аналита, после чего проводится элюция пептидных фрагментов в раствор небольшого объема (см. рис. 1б). В такой модели фактор концентрирования (F) целевого аналита можно определить как отношение концентраций аналита в конечном растворе (элюат) и в растворе аналита:

$$F = \frac{C'}{C_0} = \frac{n'/V'}{n_0/V_0} = \frac{N_{scan}}{V'} \times \frac{V_0}{N_0}, \quad (1)$$

где C_0 , n_0 – концентрация белка и количество вещества в растворе аналита; C' , n' – концентрация белка и количество вещества в конечном растворе; N_0 , V_0 – число

молекул белка и объем раствора аналита; N_{scan} – число молекул белка на поверхности, V' – объем конечного раствора.

Число частиц на поверхности чипа (N_{scan}), которое может быть визуализировано и подсчитано с использованием методов АСМ, можно сравнить с максимально возможным числом частиц (N_{sat}), размещенных на поверхности чипа, то есть с емкостью сенсорной зоны чипа. В случае, если число частиц в растворе аналита (N_o) не превосходит N_{sat} , то в конечном растворе (элюат) число частиц будет соответствовать N_{scan} . Напротив, если N_o превосходит N_{sat} , то в конечном растворе число частиц (N_{scan}) будет соответствовать максимально возможному числу частиц, размещенных на чипе (N_{sat}):

$$\begin{cases} N_{scan} = N_o, \text{ если } N_o \leq N_{sat} \\ N_{scan} = N_{sat}, \text{ если } N_o > N_{sat} \end{cases} \quad (2)$$

При условии (допущение №1), что на поверхности чипа молекулы располагаются в виде монослоя и занимают площадь (S_{mol}), равную их характерному размеру (высота молекулы, h) в квадрате (h^2), можно представить площадь сенсорной зоны чипа (S) в следующем виде:

$$N_{sat} \times S_{mol} = S \quad (3)$$

Тогда максимально возможное число частиц, размещенных на поверхности чипа (N_{sat}), будет определяться по формуле:

$$N_{sat} = \frac{S}{S_{mol}} = \frac{S}{h^2} \quad (4)$$

Определим насыщающую концентрацию белка-аналита (C_{sat}), соответствующую N_{sat} , при которой возможно насыщение молекулами белка поверхности сенсорной зоны чипа:

$$C_{sat} = \frac{N_{sat}}{N_a \times V_0}, \quad (5)$$

где N_a – число Авогадро ($6,02 \times 10^{23}$ моль⁻¹).

Используя определение N_{sat} (формула 4), преобразуем выражение для C_{sat} :

$$C_{sat} = \frac{S}{h^2 \times N_a \times V_0} \quad (6)$$

Найдем конечную формулу для фактора концентрирования (F), выразив N_{scan} через параметры чипа и размеры молекулы (согласно формулам 4 и 6):

$$F = \frac{S}{h^2 \times N_0} \times \frac{V_0}{V'} \quad (7)$$

Рассмотрим два случая: число частиц в растворе аналита ниже ($N_0 < N_{sat}$) или выше ($N_0 > N_{sat}$) максимального числа частиц, которые могут разместиться на поверхности сенсорной зоны чипа (N_{sat}).

В первом случае при $N_0 < N_{sat}$ емкость сенсорной зоны (N_{sat}) позволяет разместиться всем молекулам из раствора аналита (N_0) на поверхности чипа. При условии полной элюции белковых молекул с поверхности сенсорной зоны происходит перенос всех молекул из раствора аналита в конечный раствор (элюат), то есть $N_{scan} = N_0$, и F зависит только от соотношения объемов V_0 и V' :

$$F = \frac{N_{scan}}{N_0} \times \frac{V_0}{V'} = \frac{N_{scan}}{N_{scan}} \times \frac{V_0}{V'} = \frac{V_0}{V'} \quad (8)$$

Для второго случая, когда $N_0 > N_{sat}$, емкость сенсорной зоны чипа (N_{sat}) не позволяет разместиться всем молекулам из раствора аналита (N_0) и часть молекул остается в растворе. В этом случае число частиц в конечном растворе (N_{scan}) будет соответствовать максимально возможному числу частиц (допущение №1), размещенных на поверхности чипа (N_{sat}), то есть $N_{scan} = N_{sat}$.

$$F = \frac{N_{scan}}{N_0} \times \frac{V_0}{V'} = \frac{S}{h^2 \cdot N_0} \times \frac{V_0}{V'} = \frac{S}{h^2 \times C_0 \times N_a \times V'} \quad (9)$$

Суммируя вышесказанное, фактор концентрирования (F) можно представить для двух случаев:

$$\left\{ \begin{array}{l} F = \frac{V_0}{V'}, \text{ если } N_0 < N_{sat} \text{ (} C_0 < C_{sat} \text{)} \\ F = \frac{S}{h^2 \times C_0 \times N_a \times V'}, \text{ если } N_0 > N_{sat} \text{ (} C_0 > C_{sat} \text{)} \end{array} \right. \quad (10)$$

В типичном эксперименте с использованием АСМ/МС подхода объем исходного раствора аналита (V_0) составляет 1 мл, объем конечного раствора (V') – 10 мкл, площадь функционализированной поверхности чипа (S) – 1 мм² («малая сенсорная зона»). Для данных типичных условий найдем C_{sat} , если характерные

размеры белковой молекулы составляют $2 \times 2 \text{ нм}^2$ (см. раздел 1.3). Согласно формулам 4 и 5:

$$C_{sat} = \frac{N_{sat}}{N_a \times V_0} = 0,4 \times 10^{-9} \text{ (М)} \quad (11)$$

Тогда в соответствии с системой уравнений (10), можно рассчитать фактор концентрирования для двух случаев:

$$\begin{cases} F = \frac{V_0}{V'} = \frac{10^{-3}}{10^{-5}} = 100 \text{ (если } C_0 < C_{sat}) \\ F = \frac{S}{h^2 \times C_0 \times N_a \times V'} \text{ (если } C_0 > C_{sat}) \end{cases} \quad (12)$$

Для данных типичных условий теоретический фактор концентрирования не превышает 100. Определим концентрацию аналита (C_{max}), как пограничное значение C_0 между концентрированием и разбавлением, для которой эффект концентрирования нивелирован ($F=1$) (согласно формуле 12):

$$C_{max} = \frac{1}{4 \cdot 10^{-12} \times 6,02 \cdot 10^{23} \times 10^{-5}} = 4 \cdot 10^{-8} \text{ (М)} \quad (13)$$

Результаты расчета представлены в графическом виде на рисунке 2. Согласно полученным результатам, фактор концентрирования не зависит от исходной концентрации аналита, если она ниже насыщающей концентрации ($C_0 < C_{sat}$) и экспоненциально снижается, если исходная концентрация аналита превосходит концентрацию насыщения ($C_0 > C_{sat}$) (рис. 2) (Kaysheva и др. 2021).

Как показано на рисунке 2а, с повышением концентрации исходного раствора аналита значение F снижается (см. уравнение 12). Наблюдается насыщение поверхности чипа, и большая часть молекул из раствора аналита уже не может разместиться на поверхности. В связи с этим, для растворов аналита с концентрацией $> 4 \cdot 10^{-8} \text{ М}$ (на рис. 2а область $C_0 > C_{max}$ отмечена голубым цветом) целесообразно применение развитых поверхностей: микросферы, хроматографические колонки с высоким уровнем емкости.

Для концентраций аналита ниже значения C_{sat} наблюдается насыщение функции фактора концентрирования F : емкость чипа позволяет всем молекулам из раствора аналита разместиться в виде монослоя (допущение №1) на поверхности сенсорной зоны. В условиях максимальных значений F (при $C_0 <$

$0,4 \cdot 10^{-9}$ М для «малой» сенсорной зоны) применение АСМ/МС подхода наиболее эффективно (область $C_0 < C_{sat}$ на рис. 2а отмечена красным цветом). Нижний концентрационный предел АСМ/МС подхода ограничен чувствительностью масс-спектрометрического детектора.

Важным параметром для оценки фактора концентрирования является объем конечного раствора (V'). Расчеты показали, что зависимость F от отношения объемов раствора аналита и конечного раствора (V_0/V') является линейной, а угол наклона определяется соотношением между насыщающей концентрацией (C_{sat}) и концентрацией аналита в растворе (C_0) (рис. 2б). Для концентраций аналита меньше C_{sat} угол наклона кривой не зависит от значения концентрации аналита и равен 45° . На том же рисунке видно, что с увеличением концентрации аналита в исследуемом растворе ситуация иная – угол наклона прямой уменьшается.

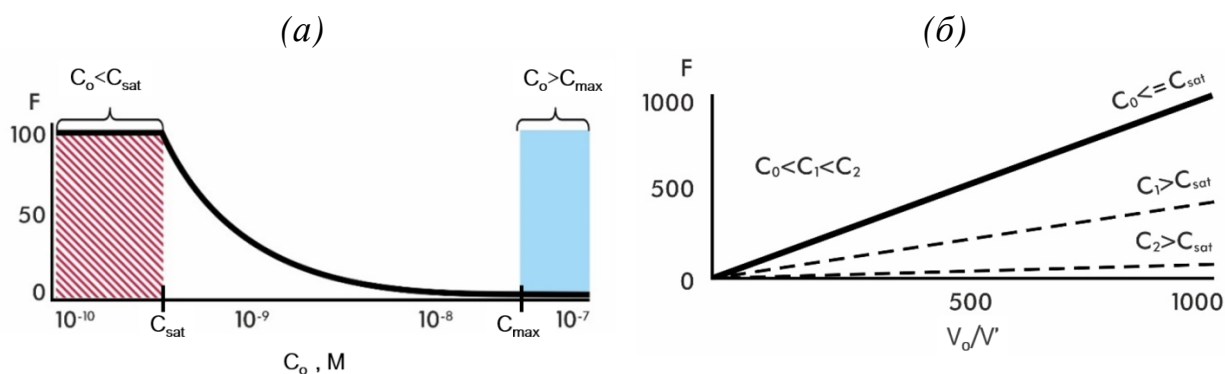


Рисунок 2. – Расчетное обоснование применения АСМ/МС подхода. (а) Оценка зависимости фактора концентрирования (F) от концентрации аналита в растворе (C_0 , М). Условия для расчета: «малая» сенсорная зона чипа, объем исходного раствора аналита 1 мл, объем конечного раствора 10 мкл, насыщающая концентрация $C_{sat}=0,4 \times 10^{-9}$ М, $C_{max}=4 \times 10^{-8}$ М (для $F=1$). (б) Зависимости фактора концентрирования (F) от соотношения объемов раствора аналита и конечного раствора. $C_0 < C_{sat}$ для концентрации белка в растворе аналита, не превосходящей насыщающую концентрацию (C_{sat}). $C_1 > C_{sat}$ и $C_2 > C_{sat}$ для концентраций белка в растворе аналита, превосходящих насыщающую концентрацию.

Таким образом, в зависимости от экспериментальных условий: конфигурации чипа, характерного размера молекулы аналита, значения соотношения объемов раствора аналита и конечного раствора, возможно определение двух характеристических концентраций раствора аналита – C_{sat} , при которой фактор концентрирования будет максимальным и C_{max} , при которой

фактор концентрирования равен 1, при дальнейшем повышении концентрации раствора аналита наблюдается эффект разбавления.

Экспериментальное подтверждение эффекта концентрирования белков на поверхности АСМ-чипов

Экспериментальное обоснование расчетных значений для фактора концентрирования проводили с использованием девяти глобулярных белков, различных по физическим и химическим свойствам. Молекулярный вес белков составил от 17 до 118 кДа, алифатический индекс – от 69 до 91, что свидетельствует о высокой термической стабильности выбранных белков и большом количестве гидрофобных аминокислотных остатков. Набор белков был представлен белками вирусного (НСVcoreAg), бактериального (P450 BM3), растительного (пероксидаза С1А) происхождения, а также белками млекопитающих (список белков приведен в Приложении).

В экспериментах использованы поверхности с «малой» сенсорной зоной. Процедуру химического фишинга молекул белков проводили из растворов аналита ($V_o=1$ мл) с концентрацией от 10^{-5} до 10^{-11} М. Масс-спектрометрический анализ выполняли с использованием времяпролетного детектора, оснащенного МАЛДИ источником ионов. На рисунке 3 представлены наименьшие значения концентраций растворов (C_{min}), для которых удалось идентифицировать белки.

При значении концентрации белка в растворе аналита $0,4 \times 10^{-9}$ М наблюдается излом функции, который обусловлен насыщением поверхности сенсорной зоны чипа при заданных условиях. При повышении концентрации анализируемого белка ($C_0 > C_{sat}$) фактор концентрирования (F) снижается, причем эффект концентрирования исчезает для растворов белка с концентрацией, превышающей 4×10^{-8} М (C_{max} для $F=1$) (согласно формуле 13). Синяя кривая на рисунке 3 представлена двумя функциями, которые характеризуют эффект концентрирования для случаев: (1) концентрация раствора аналита ниже концентрации насыщения ($C_0 < C_{sat}$), то есть фактор насыщения $F=100$ (на рис. 3 область отмечена красным цветом) и (2) концентрация раствора аналита превосходит концентрацию насыщения ($C_0 > C_{sat}$). Отметим, что в последнем

случае F стремится к нулю с повышением концентрации раствора аналита (голубая область на рис. 3).

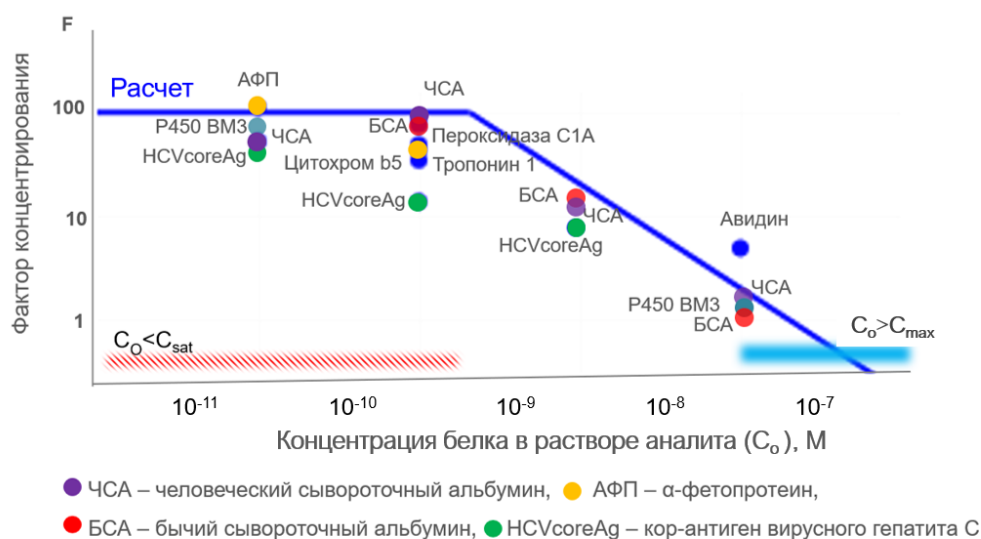


Рисунок 3. – Экспериментальное подтверждение расчетной модели концентрирования в результате химического фишинга. Синяя линия соответствует расчетному обоснованию функции зависимости фактора концентрирования (F) от концентрации аналита в растворе (C_0). Точками отображены экспериментальные значения C_{min} , определенные для разных белков. Измерения выполнены на масс-спектрометре Autoflex III (Bruker, Германия).

Для белков, у которых начальная концентрация в растворе соответствовала $C_0 < C_{sat}$, эффект концентрирования составил два порядка. Для авидина было показано превышение расчетного эффекта концентрирования при содержании в растворе на уровне 10^{-7} М. Данный эффект может быть обусловлен олигомеризацией молекул авидина как в растворе, так и на поверхности чипа. В растворе авидин формирует четвертичную структуру – гомотетрамеры и практически не представлен в мономерной форме (Macіan и соавт., 2005).

Таким образом, экспериментальные результаты подтвердили расчет эффекта концентрирования молекул белка в случае использования АСМ/МС подхода в комбинации с химическим фишингом.

Разработка методик для масс-спектрометрических экспериментов

Процедуры предварительной подготовки чипов для масс-спектрометрического анализа включали ферментативный гидролиз белка, элюцию триптической смеси с поверхности чипа, концентрирование или обессоливание смеси пептидов. Разработка процедур подготовки чипов

включала выбор и обоснование состава гидролитической смеси, условий проведения гидролиза для разных материалов и конфигурации чипов, а также определение оптимальных условий подготовки конечных растворов (элюат) для последующего МС-анализа. Процедуры предварительной подготовки чипов испытывались на чипах для АСМ в двух конфигурациях. В экспериментах использовалась слюда, на поверхности которой были организованы одна «большая» либо 2-4 «малых» сенсорных зон. Кроме того, применялся графит с одной «малой» сенсорной зоной.

Выбраны условия проведения гидролиза «в объеме» (вариант 1) и «на поверхности» (вариант 2). Результаты представлены для АСМ/МС подхода в сочетании с химическим фишингом белков для поверхности тип слюда, и сорбцией белков для поверхности тип графит. Соотношение массы трипсина к расчетной массе белка составляло: 1:100, 1:50, 1:5, продолжительность инкубации при температуре 45 °С соответствовала диапазону от 6 до 18 ч. Результаты масс-спектрометрических измерений в серии экспериментов по подбору условий гидролиза обобщены на рисунке 4.

Для варианта 1 «в объеме», представлены условия проведения гидролиза белков при погружении чипа в гидролитическую смесь. Как видно на рисунке 4а, объем смеси для гидролиза является важным параметром. В случае погружения чипа или его фрагмента в смесь для гидролиза большого объема ($V=900$ мкл) МС-анализ позволил идентифицировать меньшее число пептидов по сравнению с измерениями, проведенными для объемов 350 и 100 мкл. Наблюдаемый эффект, вероятно, обусловлен высоким содержанием в конечном растворе электролитов NH_4^+ , HCO_3^- в случае гидролиза в объеме 900 мкл по сравнению с меньшими объемами. В условиях высокого содержания электролитов затруднена ионизация (МАЛДИ) пептидных компонентов. Проведение процедуры обессоливания и концентрирования пептидной смеси с использованием твердофазной экстракции («ZipTip C18») позволило снять это ограничение.

В ходе нашей работы установлено, что для пробоподготовки не менее значимым параметром, чем объем смеси для гидролиза, является количество внесенного в смесь трипсина. В связи с тем, что молекулы белка

иммобилизованы на поверхности чипа, их тепловая диффузия ограничена, что ограничивает число событий взаимодействия с молекулами гидролазы. Оптимальное массовое соотношение содержания трипсина к расчетному количеству белка на поверхности чипа находится в диапазоне от 1:50 до 1:5. Предпочтительная продолжительность проведения процедуры гидролиза – 12 часов и более (на рисунке 4а см. варианты №1-9 и №1-10).

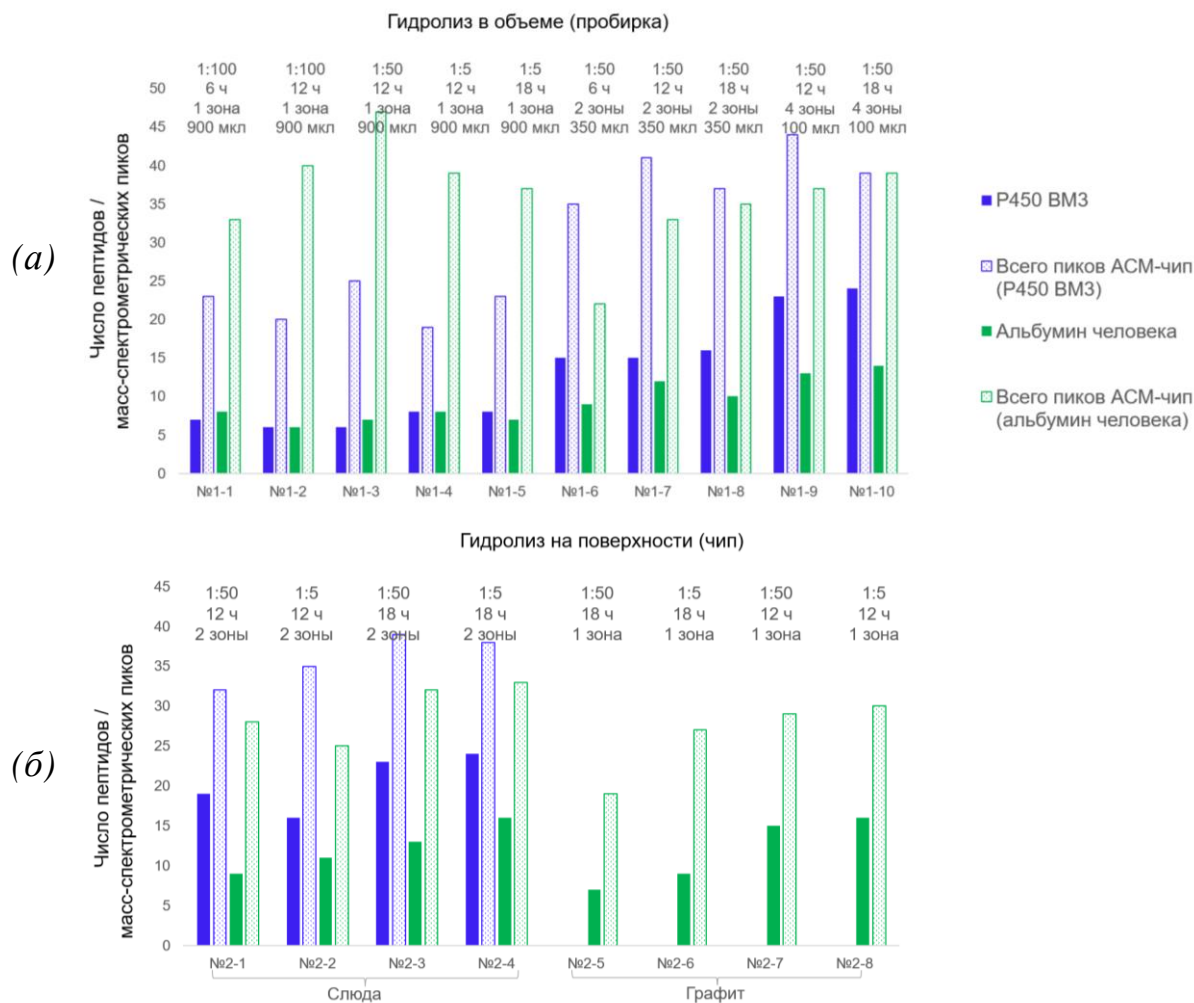


Рисунок 4. – Выбор состава гидролитической смеси и условий проведения гидролиза: (а) Вариант 1 «в объеме»; (б) Вариант 2 «на поверхности». Указано соотношение трипсина к белку (1:100, 1:50 или 1:5), продолжительность гидролиза (6, 12 или 18 ч), число сенсорных зон (1, 2 или 4), а также объем смеси для гидролиза (900, 350, 100 мкл). Гистограммы отображают результаты масс-спектрометрических измерений (Autoflex III, Bruker, Германия) для чипов после инкубации в растворе цитохрома P450 BM3 и альбумина человека с концентрацией 10^{-7} М. Указаны количество идентифицированных пептидов белков (сплошная заливка) и общее число масс-спектрометрических пиков (градиентная заливка) с соотношением сигнал/шум > 2.

Второй вариант гидролиза, «на поверхности», при котором гидролитическая смесь наносится и выдерживается на поверхности. Как видно на рисунке 4б, также как и в варианте 1, важным условием является продолжительность проведения процедуры и высокое содержание фермента в смеси для гидролиза (на рисунке 4б см. №2-4 и №2-8).

Таким образом, оба варианта гидролиза, как «в объеме», так и «на поверхности» эффективны и могут применяться для последующей масс-спектрометрической идентификации белков. В зависимости от конфигурации чипа целесообразно применение одного из вариантов. В случае организации на поверхности нескольких сенсорных зон (слюда) подходит фрагментация чипа по числу зон и проведение гидролиза «в объеме». Для чипов с одной сенсорной зоной (слюда или графит) оптимален второй вариант «на поверхности», в котором объем смеси для гидролиза минимален.

Определение аналитической чувствительности АСМ/МС подхода

Масс-спектрометрический анализ белков, сконцентрированных на поверхности чипов с помощью химического фишинга и сорбции

Проведена сравнительная оценка аналитической чувствительности предлагаемого в работе подхода комбинации атомно-силовой микроскопии и трех типов масс-спектрометрических детекторов. Для экспериментального обоснования эффективности идентификации белков с применением АСМ/МС подхода были выбраны типичные для протеомных исследований масс-спектрометрические детекторы – времяпролетный, детектор типа ионная ловушка и тройной квадруполь. В качестве объектов исследования были выбраны белки альбумин человека, пероксидаза хрена С1А, тимидилат-синтаза и бактериальный цитохром Р450 ВМ3, различающиеся по физико-химическим свойствам: молекулярному весу (36-70 кДа), количеству сайтов гидролиза для трипсина и их пространственной доступности. Последнее исследовали путем визуализации трёхмерных структур белков, загруженных из банка PDB, (<https://www.rcsb.org/>), и картирования сайтов гидролиза с применением программы RasMol (<http://www.openrasmol.org/>). Степень гидрофобности белков оценивали в программе ProtParam (<https://web.expasy.org/protparam/>).

Сравнительный анализ включал две серии экспериментов для каждого типа масс-спектрометрического детектора. В каждой серии выполнены масс-спектрометрические измерения в растворах аналита («в растворе») в концентрационном диапазоне от 10^{-5} до 10^{-15} М и для того же диапазона концентраций были проведены измерения с применением поверхностей «АСМ/МС подход». Напомним, что исследуемые белки были сконцентрированы с помощью химического фишинга или сорбции на поверхности «большой» (слюда) или «малой» (графит) сенсорной зоны, соответственно.

Рассмотрим (рис. 5) результаты измерений, полученных для обеих серий экспериментов с использованием времяпролетного масс-спектрометрического детектора (МАЛДИ-МС) и детектора типа ионная ловушка (ВЭЖХ-МС/МС).

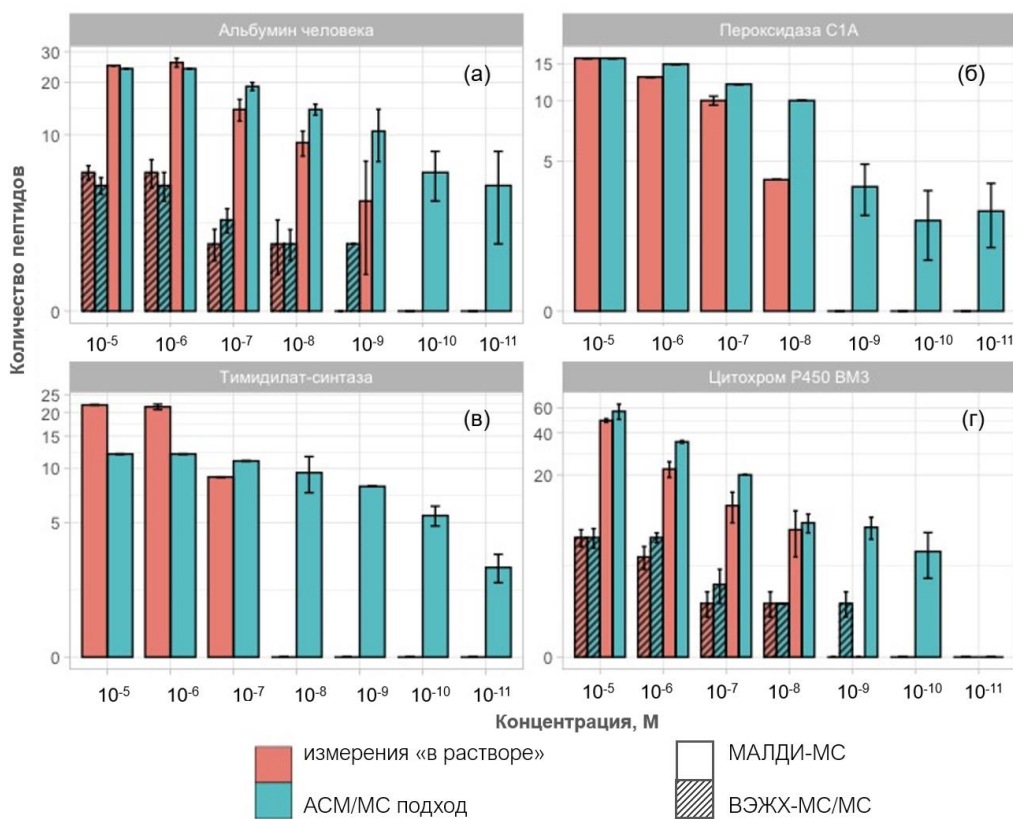


Рисунок 5. – Сравнительная оценка аналитической чувствительности детектирования белков «в растворе» и «с поверхности» (кодирование цветом) с применением времяпролетного детектора Autoflex III – МАЛДИ-МС и детектора типа ионная ловушка LC/MSD Trap XCT Ultra – ВЭЖХ-МС/МС (сплошная или градиентная заливка, соответственно). Экспериментальные условия: «большая» сенсорная зона, объем триптической смеси $V=10$ мкл. На гистограммах (а-г) по оси абсцисс указана концентрация белка в растворе аналита (C_0), по оси ординат – количество идентифицированных пептидов. Приведены величины стандартного отклонения для измерений по трем техническим повторениям.

Полученные результаты хорошо согласуются с обоснованной ранее теоретической оценкой эффекта концентрирования белков на поверхности чипов (см. рис. 3). Как видно на рисунке 5, в области высоких концентраций аналита в исследуемом растворе (10^{-5} - 10^{-7} М) количество идентифицированных пептидов сопоставимо для обеих серий экспериментов – «в растворе» и «с поверхности». В концентрационном диапазоне $C_o > 10^{-7}$ М АСМ/МС подход не востребован, поскольку не влияет на эффективность детектирования белков с применением выбранных типов масс-спектрометрических детекторов.

При переходе в область низких концентраций (10^{-9} - 10^{-11} М) экспериментальные результаты показали следующее. В данной области для серий «в растворе» масс-спектрометрический анализ уже не позволил идентифицировать исследуемые белки. Напротив, в случае применения АСМ/МС подхода белки идентифицированы, что указывает на эффективность процедуры концентрирования белков на поверхности чипов.

Предел концентрационной чувствительности для серий экспериментов «в растворе» составил 10^{-8} М для двух типов детекторов. Использование АСМ/МС подхода позволило повысить концентрационную чувствительность анализа на два порядка и достичь чувствительности на уровне 10^{-10} - 10^{-11} М методом МАЛДИ-МС и 10^{-9} М методом ВЭЖХ-МС/МС.

Аналогично проведена серия экспериментов с использованием еще одного масс-спектрометрического детектора типа тройной квадруполь (ВЭЖХ-ММР). В этой серии регистрировали площади хроматографических пиков для четырех пептидов пероксидазы С1А, указанных в таблице 2. Значения площади хроматографических пиков использовали для оценки содержания пептида в растворе аналита. Как видно в таблице 2, для концентрации белка $C_o = 10^{-9}$ М площади хроматографических пиков пептидов в серии экспериментов «в растворе» превосходят таковые значения, полученные для экспериментов «с поверхности» (АСМ/МС подход). Однако в экспериментах с содержанием белка в растворах аналита с концентрацией 10^{-11} М и ниже применение АСМ/МС подхода позволяет достичь лучшего масс-спектрометрического сигнала для целевых пептидов. Так, площади хроматографических пиков пептидов в серии

«в растворе» на 1-2 порядка меньше таких значений, полученных для АСМ/МС подхода.

Таблица 2. Сравнительная оценка аналитической чувствительности детектирования белков «в растворе» и «с поверхности» (АСМ/МС) с использованием масс-спектрометрического детектора типа тройной квадруполь (Agilent 6495 Triple Quadrupole, США). Приведены значения площади хроматографического пика (усл.ед.) с указанием стандартного отклонения.

С, М	DTIVNELR		DAFGNANSAR		TPTIFDNK		YYVNLEEOK	
	«в растворе»	АСМ/МС	«в растворе»	АСМ/МС	«в растворе»	АСМ/МС	«в растворе»	АСМ/МС
10 ⁻⁹	225556±7637	32205±556	48188±721	8683±38	31859±625	3833±19	24330±523	2601±23
10 ⁻¹¹	437±27	5097±25	256±15	1476±19	4±5	560±25	5±12	356±45
10 ⁻¹³	10±1	664±79	–	167±34	3	66±11	3	32±3
10 ⁻¹⁵	8±3	63±12	–	19±16	–	28	–	–

Экспериментальные условия: «большая» сенсорная зона (чип), объем триптической смеси V=10 мкл. Указаны величины стандартного отклонения для измерений по трем техническим повторениям.

Таким образом, предел концентрационной чувствительности МС-анализа с применением детектора типа тройной квадруполь для серий измерений «в растворе» составил 10⁻¹³ М. АСМ/МС подход показал чувствительность на уровне 10⁻¹⁵ М.

В таблице 3 обобщены сведения о достигнутых значениях концентрационной чувствительности АСМ/МС подхода для трех типов масс-спектрометрических детекторов.

Таблица 3. Предел концентрационной чувствительности АСМ/МС подхода в зависимости от типа масс-спектрометрического детектора для выявления белков после концентрирования.

Белок	Молекулярный вес, кДа	Алифатический индекс	Число сайтов трипсинолиза	МС-анализ	Концентрация раствора аналита, М
Альбумин человека	69,4	82,7	49	МАЛДИ-МС	10 ⁻¹¹
Бычий сывороточный альбумин*	69,3	77,5	39	МАЛДИ-МС	10 ⁻¹¹
				ВЭЖХ-ММР	10 ⁻¹³
Цитохром b5*	14,3	86,6	6	МАЛДИ-МС	10 ⁻⁹
				ВЭЖХ-ММР	10 ⁻¹⁵
Пероксидаза С1А	38,8	90,3	16	ВЭЖХ-ММР	10 ⁻¹⁵
				МАЛДИ-МС	10 ⁻¹¹
Р450 ВМ3	118	80,7	70	МАЛДИ-МС	10 ⁻¹⁰
α-фетопротеин	69	82,7	38	МАЛДИ-МС	10 ⁻¹⁰

* данные получены для поверхности графит; ** данные представлены для тяжелой цепи иммуноглобулина класса G. Фоном выделены ячейки с наилучшими значениями концентрационной чувствительности подхода АСМ/МС.

Видно, что ультрачувствительное детектирование белков достигается в случае применения метода ВЭЖХ-ММР, который позволяет выявлять белки после инкубации чипов в растворе аналита с концентрацией 10^{-13} - 10^{-15} М. Для области низких концентраций (10^{-9} - 10^{-11} М) целесообразно применение высокопроизводительных масс-спектрометрических методов – МАЛДИ-МС и ВЭЖХ-МС/МС, которые не требуют проведения дополнительных процедур отбора триптических пептидов для исследуемого белка и создания специальных методов их детектирования.

В зависимости от решаемой задачи в АСМ/МС подходе могут успешно применяться разные типы масс-спектрометрических детекторов.

Масс-спектрометрический анализ белков, сконцентрированных на поверхности чипов с помощью биоспецифического фишинга

Белки на поверхности чипа могут быть сконцентрированы с использованием процедуры биоспецифического фишинга. В качестве примера приведены результаты идентификации гликопротеина gp120 оболочки вируса иммунодефицита человека типа 1. Раствор аналита содержал белок gp120 с концентрацией от 10^{-8} до 10^{-11} М в фосфатном буфере Дульбекко (10 мМ, pH 7,4, объем 1 мл). Молекулы белка были сконцентрированы на поверхности чипа (материал слюда) с иммобилизованными молекулярными зондами двух типов – антитела и аптамеры. Конфигурация чипа включала две «малые» зоны – сенсорную и контрольную. Контрольная зона чипа не содержала иммобилизованные молекулярные зонды. В результате инкубации чипа в растворе аналита происходило формирование иммуноаффинных белковых комплексов на поверхности сенсорной зоны, то есть осуществлялся биоспецифический фишинг.

Для идентификации белков в составе комплексов был использован времяпролетный детектор (МАЛДИ-МС). На рисунках бв и бг представлены спектры, полученные в этой серии экспериментов. Как видно из рисунка ба, до инкубации на поверхности с иммобилизованными аптамерами не выявлены пики, соответствующие по значениям отношений массы ионов к заряду целевому белку. После инкубации чипа в растворе gp120 были выявлены две

группы пиков, соответствующие по значениям соотношения массы иона к заряду пептидам автолиза трипсина и целевого гликопротеина (рис. 6в). На спектре, полученном для чипа с иммобилизованными антителами (рисунок 6г), кроме двух групп пиков присутствует третья группа пиков, соответствующая пептидам моноклонального антитела анти-gp120, специфичного целевому белку.

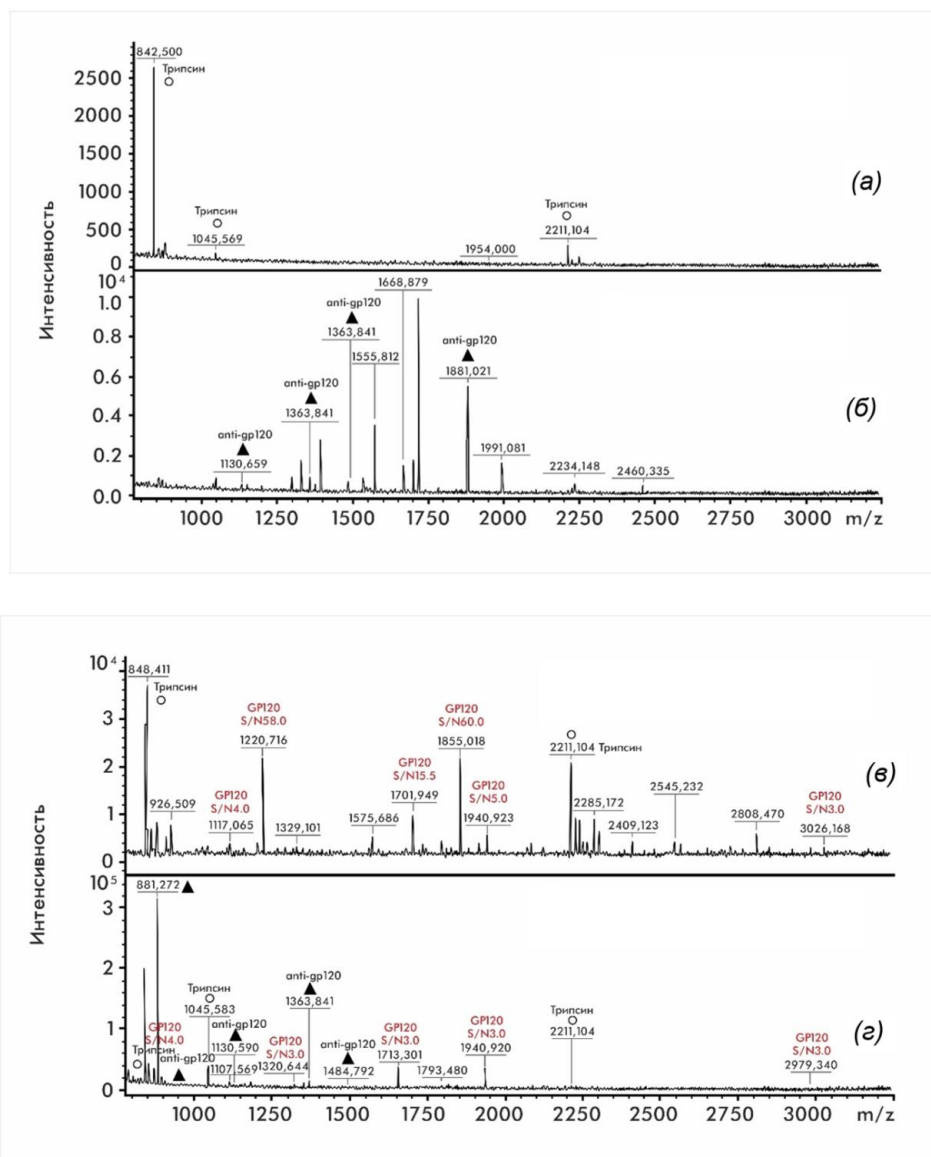


Рисунок 6. – АСМ/МС подход с применением биоспецифического фишинга. МС-анализ триптических смесей с поверхности чипов для АСМ до проведения биоспецифического концентрирования белка gp120 (а, б) и после (в, г). Экспериментальные условия: чип (слюда) с иммобилизованными аптамерами (а, в) и антителами (б, г); $C_{gp120}=0,8 \times 10^{-11}$ М (в) и $C_{gp120}=10^{-8}$ М (г). На спектрах, полученных на приборе Autoflex III (Bruker, Германия), отмечены маркерами: ○ – пептиды автолиза трипсина, «S/N» – пептиды gp120, значения соответствуют отношению сигнал/шум, ▲ – пептиды антител anti-gp120.

Показано, что в результате биоспецифического фишинга гликопротеина gp120 из исследуемых растворов на поверхности чипа для АСМ удалось

идентифицировать целевой белок с пределом концентрационной чувствительности 10^{-8} М для пары антитело/gp120 и $0,8 \times 10^{-11}$ М для пары аптамер/gp120.

В таблице 4 обобщены результаты масс-спектрометрического анализа белков, сконцентрированных на поверхности чипов с помощью биоспецифического фишинга. Данные представлены для трех вариантов масс-спектрометрических детекторов: времяпролетный детектор (МАЛДИ-МС), детектор типа ионная ловушка (ВЭЖХ-МС/МС) и тройной квадруполь (ВЭЖХ-ММР). Как видно из данных, представленных в таблице 4, антитела сохраняют свою биологическую активность на поверхности чипа, а сформированные иммуноаффинные комплексы успешно детектированы с применением АСМ/МС подхода.

Таблица 4. Предел концентрационной чувствительности АСМ/МС подхода в случае использования процедуры биоспецифического фишинга белков.

МС-анализ	Мишень	Молекулярный зонд	Концентрация раствора аналита, М
МАЛДИ-МС	HCVcoreAg	Аптамер	10^{-11}
	HCVcoreAg	МКА*	10^{-11}
	Гликопротеин gp120	Аптамер	10^{-11}
	α -фетопротеин	МКА	10^{-10}
	HBsAg	МКА	10^{-10}
ВЭЖХ-ММР	Тимидилат-синтаза	МКА	10^{-13}
	Ядерный фактор активации Т-клеток	Аптамер	10^{-13}
	Серпин В3	МКА	10^{-11}

*МКА – моноклональное антитело. Фоном выделены ячейки с наилучшими значениями концентрационной чувствительности подхода АСМ/МС.

Как видно из таблицы 4, результаты детектирования белков хорошо согласуются с таковыми для химического фишинга (табл. 3). Задача ультрачувствительной идентификации молекулярных объектов на поверхности чипа может быть решена с применением ВЭЖХ-ММР, который позволяет выявлять белки после инкубации чипов в растворе аналита с концентрацией 10^{-13} М. Для задачи детекции низко- и среднекопийных белков (10^{-11} М и выше) успешно применимы времяпролетный масс-спектрометрический детектор и детектор типа ионная ловушка. В случае применения химического фишинга

белков на поверхности чипов для АСМ удается достичь концентрационной чувствительности на уровне 10^{-15} М с применением детектора типа тройной квадруполь (табл. 3), что эффективнее на два порядка по сравнению с биоспецифическим фишингом белков (табл. 4).

АСМ/МС подход для идентификации белков в биологических образцах

АСМ/МС подход использовали для выявления HCVcoreAg в образцах сыворотки крови с применением биоспецифического фишинга. В качестве молекулярных зондов в работе использовали моноклональное антитело и аптамеры. Вначале исследования были выполнены подготовительные эксперименты для оценки эффективности концентрирования молекул маркера вирусного гепатита С – HCVcoreAg – на поверхности чипов с иммобилизованными аптамерами трех вариантов (см. Приложение). Детектировали рекомбинантный HCVcoreAg в растворах аналита объемом 1 мл в диапазоне концентраций (C_0) от 10^{-10} до 10^{-13} М. В экспериментах конфигурация чипа включала три «малых» сенсорных зон и одну контрольную зону. В сенсорных зонах были ковалентно иммобилизованы аптамеры трех вариантов, специфичных по отношению к HCVcoreAg. Контрольная зона не содержала иммобилизованных молекулярных зондов. Масс-спектрометрический анализ, выполненный с использованием времяпролетного детектора, показал, что целевой белок присутствует в трех сенсорных зонах чипа (рис. 7). Интересные в практическом плане результаты масс-спектрометрических измерений были получены для аптамеров №2 и №3. Для этих вариантов аптамеров удалось идентифицировать целевой белок HCVcoreAg после биоспецифического фишинга на поверхности чипа из раствора с концентрацией до 10^{-13} . Полученные результаты согласуются с данными АСМ визуализации (рис. 7б): наблюдается увеличение числа идентифицированных пептидов белка при высоких значениях количества визуализированных с помощью АСМ объектов на поверхности сенсорных зон чипа. Данные АСМ визуализации были предоставлены научной группой д.б.н. Т.О. Плешаковой.

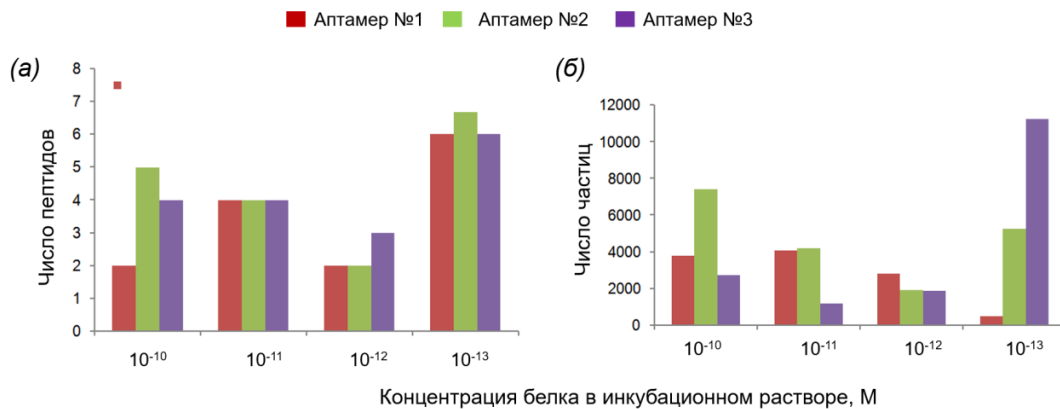


Рисунок 7. – АСМ/МС подход и биоспецифический фишинг. Результаты (а) масс-спектрометрических и (б) атомно-силовых измерений для сенсорных зон с иммобилизованными аптамерами №1, №2 и №3 после инкубации чипов в растворе HCVcoreAg с концентрацией 10^{-13} М и выше.

Далее были проведены эксперименты с применением АСМ/МС подхода для детектирования целевого белка HCVcoreAg в образцах сыворотки крови. Помимо пептидов целевого белка на спектре МАЛДИ обнаружены пики автолиза трипсина, а также контаминантные пики, соответствующие по значениям отношения массы ионов к заряду пептидам аполипопротеинов и сывороточного альбумина. Масс-спектрометрический анализ поверхности контрольной зоны чипа, свободной от молекул анти-HCVcore и аптамеров, не позволил достоверно обнаружить целевой белок. В контрольных зонах чипа также были обнаружены контаминантные пики аполипропротеинов и сывороточного альбумина.

Нами сделано предположение, что повышение достоверности идентификации белкового маркера вирусного гепатита С может быть достигнуто путем выявления пептидов-аддуктов, то есть пептидов целевого белка, модифицированных катионами калия и натрия. Концентрация этих катионов в сыворотке крови достаточно высока и составляет 150 мМ и 5 мМ, соответственно.

В подтверждение этой гипотезы проведен масс-спектрометрический анализ HCVcoreAg с учетом модификации катионами для элюатов, полученных с поверхностей чипов с иммобилизованными молекулярными зондами (антитела, аптамеры) после инкубации в образцах сыворотки крови (рис.8).

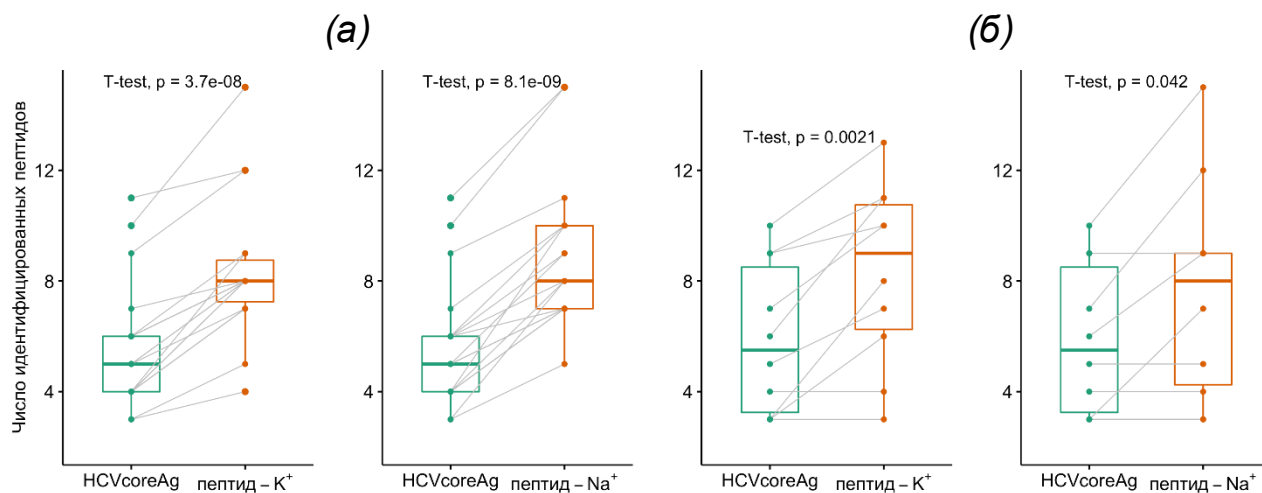


Рисунок 8. – АСМ/МС подход с применением биоспецифического фишинга. Анализ элюатов с поверхности АСМ-чипов после инкубации в образцах сыворотки крови с учетом пептидов-аддуктов для HCVcoreAg. Поверхности были функционализированы молекулярными зондами: (а) моноклональными антителами, (б) аптамерами. р-значения получены парным Т-тестом для разницы средних.

Как для аптамеров, так и для антител показано, что учет наряду с триптических пептидами белка соответствующих аддуктов повышает достоверность масс-спектрометрического анализа. Обобщая вышесказанное, можно сказать, что комбинация биоспецифического фишинга белков с МС-анализом показала эффективность для выявления вирусного маркера HCVcoreAg в образцах сыворотки крови с использованием моноклональных антител и аптамеров в качестве молекулярных зондов. Ясно, что в образцах крови катионы взаимодействуют с циркулирующими в сыворотке белками, в том числе с молекулами HCVcoreAg.

Применение АСМ/МС подхода в детектировании медицински значимых белков

Результативность изучения патогенеза мультигенных, в том числе системных и онкологических заболеваний, зависит от выбора маркеров заболевания. В связи с этим в разработке дизайна и состава функционализированных поверхностей чипов для АСМ основополагающим является использование биоинформатических подходов, позволяющих обоснованно отбирать целевые белки на основе анализа многомерных

постгеномных данных. Мы показали, что для концентрирования целевых белков на поверхности чипов требуется учитывать их физико-химические свойства, а также доступность молекулярных зондов (антитела или аптамеры). В связи с этим проведение масс-спектрометрических измерений сверхвысокого разрешения с последующим биоинформатическим анализом результатов измерений является важным элементом в дизайне массива сенсорных зон на поверхности АСМ-чипов. Наряду с белками, отобранными на основе анализа опубликованных данных, результаты масс-спектрометрических измерений позволяют дополнить состав кандидатных белков для АСМ/МС подхода.

Белки, ассоциированные с онкологическими патологиями

Альтернативой иммуноаффинным методам является использование чипов с массивом сенсорных зон, функционализированных посредством иммобилизации молекулярных зондов. Перспективно использование недорогих аптамеров с высокой аффинностью и низкой скоростью диссоциации комплексов с белком-мишенью. Мы подтвердили этот тезис в нижеизложенных экспериментах. Для шести кандидатных онкомаркеров (продукты генов хромосомы 18 человека)⁶: GATA-связывающий фактор 6 (GATA-6), ядерный фактор активированных Т-клеток (NFATc1), транскрипционный фактор 4 (TCF4), белки, кодируемые генами TGIF1, Рах и серпин В3 были подобраны аптамеры, специфично связывающие эти белки. В литературных источниках приведены данные об увеличении содержания канонических форм выбранных кандидатных онкомаркеров в биоматериале при развитии онкологических заболеваний.

Дизайн эксперимента включал разработку количественных масс-спектрометрических методов мониторинга множественных реакций (ВЭЖХ-ММР) для детектирования выбранных шести белков. Для создания количественных методов были синтезированы протеотипические (или уникальные) пептиды (этап 1). Предложен дизайн массива сенсорных зон на поверхности АСМ-чипа с иммобилизованными аптамерами, специфичными по

⁶Эксперименты проводились в рамках реализации российской части международного проекта «Протеом человека» по исследованию транскриптов и белков, кодируемых хромосомой 18 человека.

отношению к целевым белкам (этап 2). Завершал эксперимент сравнительный масс-спектрометрический анализ содержания белков в образцах крови больных онкологическими заболеваниями с использованием и без использования АСМ/МС подхода (этап 3).

В соответствии с изложенным выше дизайном эксперимента, были отобраны уникальные (протеотипические) пептиды для шести белков с использованием программного обеспечения SkyLine 1.4. Проверку уникальности пептидных последовательностей осуществляли с использованием программы *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST, <http://www.uniprot.org/blast>). Отобранные пептиды были синтезированы и далее в масс-спектрометрических измерениях были определены фрагментные ионы, характеризующиеся наибольшими интенсивностями в спектре. Для синтезированных пептидов были выполнены калибровочные ВЭЖХ-ММР измерения в концентрационном диапазоне от 10^{-9} до 10^{-14} М. В результате анализа масс-спектров было установлено, что воспроизводимость результатов измерений между техническими повторениями составила более 85 %, варьирование значений хроматографических времен удерживания компонентов не превосходило ± 3 сек.

Далее была наработана партия чипов для АСМ (слюда) в количестве 25. Поверхность чипов содержала массив сенсорных зон с иммобилизованными аптамерами (рис. 9). На рисунке 9 показан дизайн поверхности чипов с 8 кластерами сенсорных зон для проведения многопараметрического детектирования отобранных для эксперимента белков. Каждая сенсорная зона содержала вариант аптамера, специфичный одному из шести белков. Чипы инкубировали в образцах плазмы крови больных онкологическими заболеваниями.

Количественный анализ белков проводили методом мониторинга множественных реакций (ВЭЖХ-ММР) для двух серий экспериментов – «с поверхности» (АСМ/МС подход) и «в растворе», в образцах плазмы крови без проведения процедуры биоспецифического фишинга.

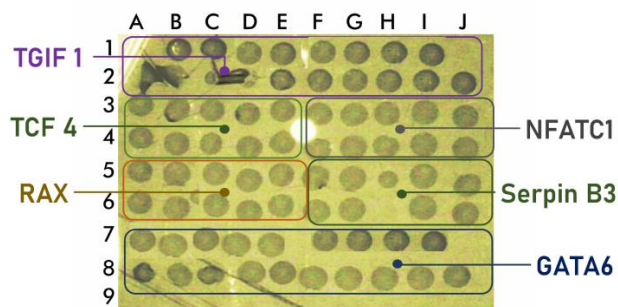


Рисунок 9. – Изображение массива сенсорных зон на поверхности чипа для проведения измерений с применением АСМ/МС подхода.

В таблице 5 обобщены результаты сравнительного анализа для 25 образцов плазмы крови. В таблице приведены белки (см. столбец №1), успешно детектированные по двум пептидам (аминокислотные последовательности пептидов указаны в столбце №3). Количество образцов плазмы крови, в которых были обнаружены целевые белки, представлено в столбце №2. В столбцах №4 и №5 обобщены результаты количественных измерений – порядок установленной концентрации белка в случае применения АСМ/МС подхода (столбец №4) и без его использования (столбец №5). В семи образцах плазмы крови успешно детектированы пептиды целевых белков в обеих экспериментальных сериях.

Таблица 5. Результаты мультипараметрического ВЭЖХ-ММП анализа для образцов плазмы крови.

1 Белок (UniProt ID)	2 Число образцов	3 Последовательность пептида	4 Концентрация, М	
			АСМ/МС	МС
TGIF1 (Q15583)	3	<i>ISETSSVESVMGIK</i>	10 ⁻¹²	10 ⁻¹²
		<i>SPSQGAQGPAPR</i>		
NFATc1 (O95644)	2	<i>MVLSGHNFLQDSK</i>	10 ⁻¹³	Не обнаружен
		<i>LHDLSPAAYTK</i>		
TCF4 (P15884)	2	<i>MAALGTDK</i>	10 ⁻¹²	10 ⁻¹²
		<i>GSGAAGSSQTGDALGK</i>		
GATA-6 (Q92908)	2	<i>FGAAGADASDSR</i>	10 ⁻¹²	10 ⁻¹²
		<i>GPSADLLEDLSESR</i>		
Серпин В3 (P29508)	2	<i>GLVLSGVLHK</i>	10 ⁻¹¹	10 ⁻¹²
		<i>VLHFDQVTENTTGK</i>		

Белок *Rax* в исследуемых биообразцах обнаружен не был. Белок *NFATc1* не был обнаружен в масс-спектрометрических измерениях в серии измерений без использования АСМ/МС подхода (в таблице 5 указано «не обнаружен»). Однако применение АСМ/МС подхода позволило детектировать данный белок

в двух биологических образцах. Другие целевые белки были выявлены в обеих сериях измерений в сопоставимых количествах, при этом содержание белков составило 10^{-11} - 10^{-13} М, что соответствует диапазону низких концентраций.

АСМ/МС подход для анализа биологической активности фермента

Как было показано в предыдущих разделах, молекулы белков на поверхности сохраняют свои биологические свойства. Антитела сохраняют аффинные свойства и формируют комплексы с белками-мишенями. В следующей серии экспериментов показано успешное применение АСМ/МС подхода для подтверждения сохранения функциональных свойств белков на поверхности путем количественной регистрации продуктов ферментативной активности.

В качестве объекта исследования выбран цитохром P450 BM3 (CYP102A1), который является первым обнаруженным бактериальным белком суперсемейства P450, аналогичный по биологической активности дифлавинредуктазам эукариот. Этот факт вызвал интерес исследователей к растворимому CYP102A1 в качестве модели печеночных ферментов P450 млекопитающих, в том числе для изучения монооксигеназной активности для жирных кислот.

Проводилась масс-спектрометрическая (ВЭЖХ-ММР) регистрация содержания 11-гидроксилауриновой кислоты на поверхности АСМ-чипов (материал слюда) с сорбированными молекулами фермента CYP102A1. Процедуру сорбции проводили из растворов аналита с концентрацией 10^{-10} М (серия №1), 10^{-11} М (серия №2), 10^{-13} М (серия №3).

Наработка продукта осуществлялась в течение 180 мин в присутствии НАДФН и субстрата. Оценка содержания продукта в реакционной смеси проводилась для временных точек – 0, 5, 10, 20, 40, 80, 120 и 180 мин. Объем конечного раствора (элюат) составлял 30 мкл.

На первом этапе проведен количественный МС-анализ лауриновой кислоты (субстрат) в растворе с целью определения условий (состав жидких фаз для хроматографического разделения, ожидаемого хроматографического времени

удержания и условий масс-спектрометрического анализа) измерения целевого компонента – 11-гидроксиауриновой кислоты. Хроматограмма лауриновой кислоты для концентрации 2 мкМ, масс-спектрометрический пик и фрагменты диссоциации представлены на рисунке 10. Хроматографическое время удерживания для лауриновой кислоты составило 16,5 мин (рис. 10а).

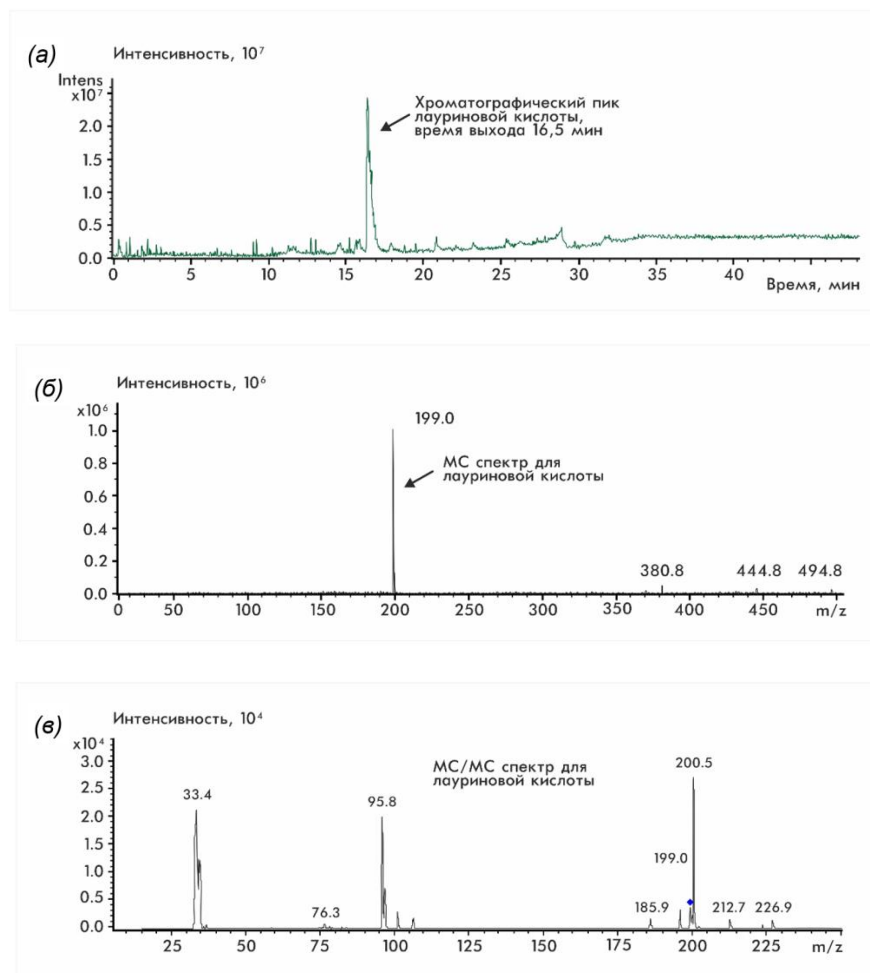


Рисунок 10. – АСМ/МС подход для подтверждения сохранения функциональных свойств белков на поверхности: подбор условий. (а) Хроматографическое время удерживания лауриновой кислоты (2 мкМ). (б) Вид наблюдаемого сигнала масс-спектрометрического пика для лауриновой кислоты. (в) Спектр фрагментации лауриновой кислоты с указанием наиболее интенсивных пиков. Результаты масс-спектрометрических измерений получены на приборе Agilent 6495 Triple Quadrupole (Agilent, США).

На втором этапе для подтверждения природы визуализированных объектов с помощью АСМ была проведена масс-спектрометрическая идентификация с применением времяпролетного детектора. МС-анализ позволил достоверно идентифицировать белок СУР102А1, сорбированный на поверхности чипов. На рисунке 10 представлен спектр МАЛДИ конечного раствора (элюат),

полученный для АСМ-чипа после инкубации в растворе фермента. Наиболее интенсивные пики в спектре, которые отмечены красными маркерами, соответствуют целевому белку по значениям отношения массы ионов к заряду.

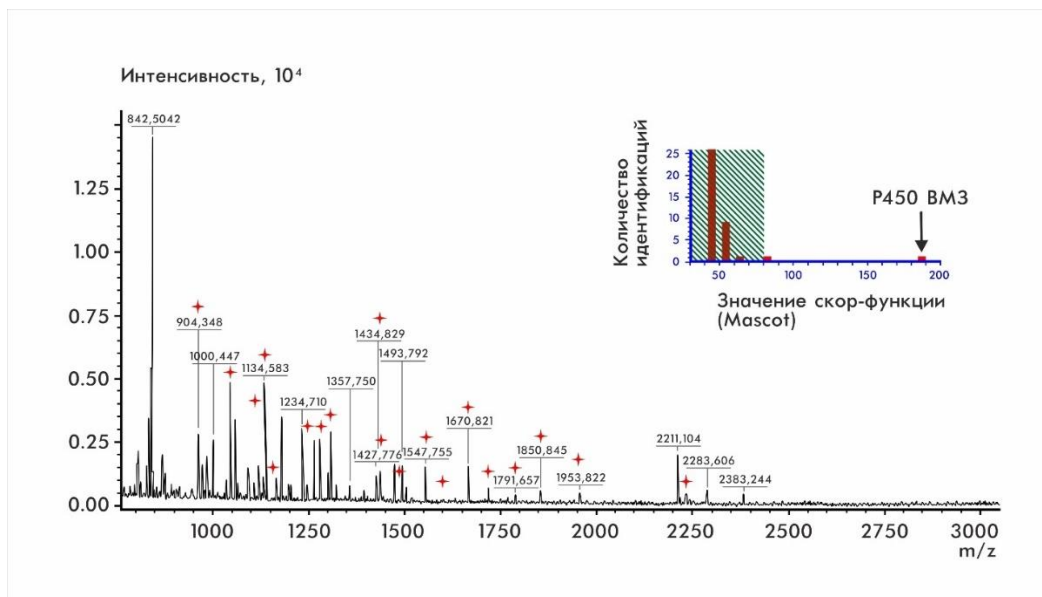


Рисунок 10. – АСМ/МС подход для подтверждения сохранения функциональных свойств белков на поверхности: идентификация белка. Красными маркерами отмечены пики целевого белка. Измерения выполнены на масс-спектрометре Autoflex III (Bruker, Германия).

На третьем этапе получена калибровочная прямая для очищенного препарата гидроксилауриновой кислоты (рис. 11а). Линейный диапазон калибровки составил 10^{-14} - 10^{-16} М, предел детекции составил 10^{-15} М. Хроматографическое время удерживания гидроксилауриновой кислоты составило 13,5 мин, отличное от такого значения для субстрата лауриновой кислоты (16,5 мин).

Выполнены три серии экспериментов наработки гидроксилауриновой кислоты для АСМ-чипов. Регистрация содержания 11-гидроксилауриновой кислоты проводилась на поверхности АСМ-чипов для следующих серий экспериментов: в серии №1 фермент был сорбирован на поверхности чипа из раствора аналита с концентрацией 10^{-10} М, в серии №2 – из раствора аналита с концентрацией 10^{-11} М и в серии №3 – из раствора аналита с концентрацией 10^{-13} М.

Для каждой серии выполнен расчет количественного содержания продукта монооксигеназной активности СУР102А1 (рис.11а). Предполагается, что на

поверхности чипа содержится различное количество молекул фермента. Ожидаемое содержание продукта в трех экспериментальных сериях отражает количество белка на поверхности.

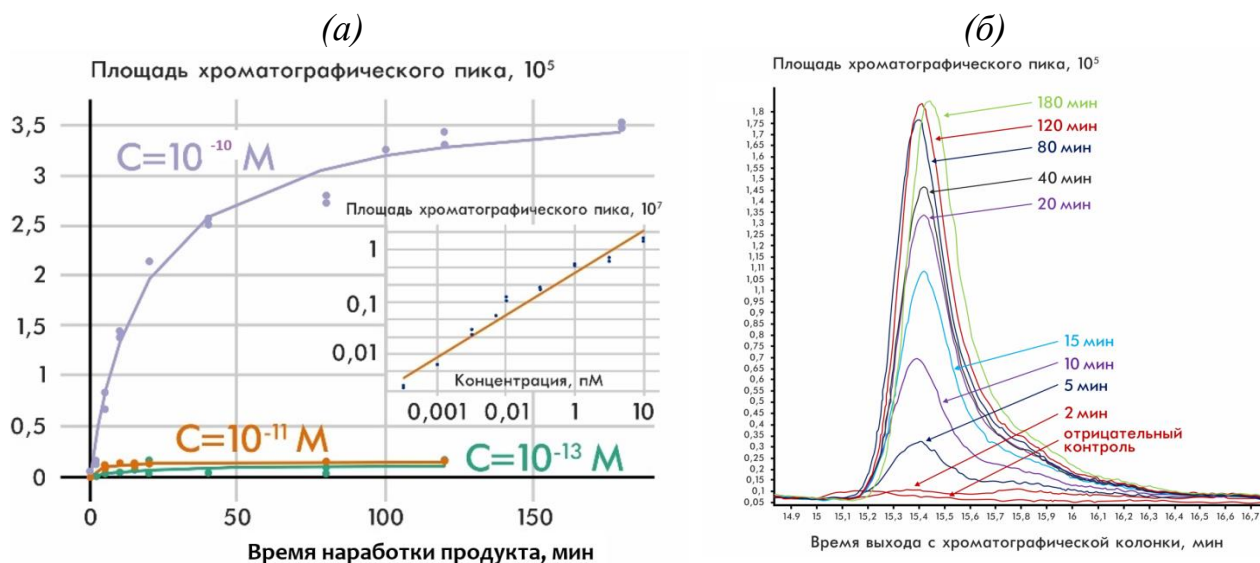


Рисунок 11. – АСМ/МС подход для подтверждения сохранения функциональных свойств белков на поверхности. (а) Кинетика наработки гидроксилауриновой кислоты на поверхности чипов для АСМ. Чипы содержат белки, сорбированные из растворов с концентрацией 10^{-10} М (серия №1, синяя кривая), 10^{-11} М (серия №2, оранжевая кривая) и 10^{-13} М (серия №3, зеленая кривая). Ось абсцисс – время наработки продукта, ось ординат – площадь хроматографического пика, которая отражает содержание продукта в исследуемой системе. На врезке представлена калибровочная прямая для гидроксилауриновой кислоты ($R^2=0,96$). Экспериментальные условия: фаза А – ацетат аммония 5 мМ в воде, рН 7,5, фаза Б – ацетат аммония 5 мМ, ацетонитрил 50%, изопропанол 45%, рН 7,5. (б) Хроматограммы наработки продукта для серии чипов, функционализированных цитохромом СYP102A1 из растворов с концентрацией 10^{-10} М. Отрицательный контроль: система СYP102A1 и НАДФН без субстрата. Количество технических повторов 2-4.

На рисунке 11 представлены результаты экспериментов, полученные для трех серий. Концентрация гидроксилауриновой кислоты возрастает в процессе инкубации для всех экспериментальных серий. Время выхода наработку продукта на плато для трех серий экспериментов составило 20 мин (рис. 11а). Наиболее эффективная наработка продукта наблюдалась в серии №1 (раствор фермента с концентрацией 10^{-10} М). Зарегистрирована сопоставимая продуктивность для серий №2 и №3. Количество продукта 11-гидроксилауриновой кислоты в исследованных системах достигло около 1 пМ для серии №1 и 30 фМ для серий №2 и №3.

Таким образом, показано сохранение биологических свойств фермента СУР102А1 на поверхности АСМ-чипов путем количественного детектирования продукта в процессе инкубации.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты, полученные в исследовании, показали возможность интеграции масс-спектрометрии в систему высокочувствительного биологического анализа на основе молекулярных детекторов и фишинга. В проведенных экспериментах показана возможность идентификации белков, как из буферных растворов, так и в образцах сыворотки и плазмы крови. Предложенный в работе АСМ/МС подход отвечает на запрос развития методов подтверждения и верификации результатов измерений, полученных с использованием нанотехнологических детекторов. В работе теоретически обоснован и экспериментально подтвержден диапазон концентраций растворов аналита, в котором успешно применим АСМ/МС подход на уровне 10^{-15} М и выше. Данный диапазон соответствует ультрачувствительному детектированию белков. Дальнейшее повышение концентрационной чувствительности масс-спектрометрического анализа белков с использованием функционализированных атомарно-ровных поверхностей представляется путем создания технологий прямого масс-спектрометрического анализа непосредственно с поверхности чипа без перевода исследуемых молекул в конечный раствор, или элюат. Необходимо создание интерфейсов для высокочувствительных масс-спектрометрических детекторов (тройной квадруполь), позволяющих, с одной стороны, эффективно ионизировать молекулы белка непосредственно с поверхности чипа, а с другой – без потерь переносить ионы в детектор.

В исследовании с использованием разных материалов и конфигураций поверхностей показано, что фишинг молекул белка, включающий варианты сорбции, химического и биоспецифического фишинга, позволяет успешно концентрировать биомолекулы в количестве, достаточном для последующей масс-спектрометрической идентификации. Это определяет применимость масс-спектрометрического детектирования белков не только в интеграции с атомно-

силовым микроскопом, но и с другими нанотехнологическими детекторами, в которых используются в качестве сенсорных элементов поверхности со схожими свойствами и размерами.

Масс-спектрометрическое детектирование может успешно применяться для подтверждения функциональных свойств биомолекул, иммобилизованных на поверхностях чипов для АСМ, нанопроволочного детектора и оптического биосенсора. Последнее особенно перспективно в поисковых и прикладных исследованиях в области биомедицины, но также в области инженерной энзимологии. Исследователей беспокоит вопрос взаимодействия биомолекул с поверхностью – а именно сохраняет ли белковая молекула свои биологические свойства после сорбции или иммобилизации. В серии экспериментов с цитохром Р450-содержащими системами мы показали, что на поверхности чипа исследуемая молекула фермента сохраняет свою ферментативную активность.

На момент написания труда использованы максимальные возможности современных технологий – в части выбора масс-спектрометрических детекторов, так и в части методологического сопровождения экспериментов. В перспективе чувствительность анализа с применением предложенного АСМ/МС подхода может быть улучшена, в том числе, за счет увеличения чувствительности МС-анализа.

ВЫВОДЫ

1. Выполнено расчетное обоснование, которое показало, что АСМ/МС подход эффективен при анализе растворов аналита с концентрацией менее 10^{-9} М. Фактор концентрирования зависит от отношения объема раствора анализируемого белка к объему элюата.

2. Экспериментально подтверждена применимость АСМ/МС подхода для детектирования белков в буферных растворах и биологических образцах.

3. Экспериментально определено, что предел концентрационной чувствительности АСМ/МС подхода достигает 10^{-15} М в случае использования химического фишинга и 10^{-13} М в случае использования биоспецифического фишинга.

4. В АСМ/МС подходе могут быть применены различные масс-спектрометрические детекторы. Выбор детектора определяется решаемой задачей. Наилучшие результаты достигнуты на уровне 10^{-9} М в системе интеграции АСМ-фишинга с масс-спектрометрическим детектором типа ионная ловушка, на уровне 10^{-11} М в системе интеграции с времяпролетным детектором и источником ионов МАЛДИ и 10^{-15} М в системе интеграции с масс-спектрометрическим детектором типа тройной квадруполь. Полученные результаты на два порядка превышают по концентрационной чувствительности результаты, полученные для измерений в растворе.

5. АСМ/МС подход может быть успешно применен для детектирования белков в биологических образцах для случаев использования разных типов молекулярных зондов – моноклональных антител и аптамеров. Показана возможность детектирования HCVcoreAg в образцах сыворотки крови больных вирусным гепатитом С, а также белков, кодируемых генами хромосомы 18 человека, в образцах плазмы крови больных онкологическими заболеваниями. Предложен метод анализа масс-спектров МАЛДИ путем детектирования наряду с интактными триптическими пептидами целевого белка, пептидов-аддуктов, модифицированных наиболее представленными в образцах крови катионами натрия и калия. Показана возможность применения АСМ/МС подхода для проведения количественного анализа содержания целевых белков в биологических образцах.

6. Подтверждена активность ферментов на поверхности АСМ-чипа. На примере цитохрома СYP102A1, сорбированного на поверхности чипа для АСМ, показана возможность количественного определения продуктов функциональной активности фермента.

Финансирование работы

Исследования выполнены при поддержке двух программ Фундаментальных научных исследований, четырех грантов Российского фонда фундаментальных исследований, трех государственных контрактов в рамках Федеральной целевой программы «Исследования и разработки по приоритетным направлениям

развития научно-технологического комплекса РФ на 2007-2013 гг.», а также гранта в форме субсидии по Федеральной целевой программе «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009-2013 гг.».

Публикации по теме работы

Публикации в научных журналах

1. **Kaysheva A.L.**, Isaeva A.I., Pleshakova T.O., Shumov I.D., Valueva A.A., Ershova M.O., Ivanova I.A., Ziborov V.S., Iourov I.Y., Vorsanova S.G., Ryabtsev S.V., Archakov A.I., Ivanov Y.D. Detection of circulating serum microrna/protein complexes in ASD using functionalized chips for an atomic force microscope // *Molecules* – 2021. – V.26(19). – P.1-19. (IF=4,4).
2. **Kaysheva A.L.**, Frantsuzov P.A., Kopylov A.T., Pleshakova T.O., Stepanov A.A., Malsagova K.A., Archakov A.I., Ivanov Y.D. Mass spectrometric identification of proteins enhanced by the atomic force microscopy immobilization surface // *International Journal of Molecular Sciences* – 2021. – V.22 (1). – P.1-13. (IF=5,9).
3. Tikhonov D., Kulikova L., Kopylov A. T., Rudnev V., Stepanov A., Malsagova K., Izotov A., Kulikov D., Zulkarnaev A., Enikeev D., Potoldykova N., **Kaysheva A.** Proteomic and molecular dynamic investigations of PTM-induced structural fluctuations in breast and ovarian cancer // *Scientific reports* – 2021. – V.11(1). – P.19318. (IF=4,4).
4. Kopylov A.T., Stepanov A.A., Malsagova K.A., Soni D., Kushlinsky N.E., Enikeev D.V., Potoldykova N.V., Lisitsa A.V., **Kaysheva A.L.** Revelation of proteomic indicators for colorectal cancer in initial stages of development // *Molecules* – 2020. – V.25(3). – P.1-20. (IF=4,4).
5. Tikhonov D., Kulikova L., Kopylov A., Malsagova K., Stepanov A., Rudnev V., **Kaysheva A.** Super Secondary Structures of Proteins with Post-Translational Modifications in Colon Cancer. // *Molecules* – 2020. – V.25(14). – P.1-17. (IF=4,4).
6. Malsagova K.A., Stepanov A.A., Kopylov A.T., Enikeev D.V., Potoldykova N.V., Izotov A.A., Butkova T.V., **Kaysheva A.L.** Stability of Plasma Protein Composition in Dried Blood Spot during Storage // *Processes* – 2020. V.8. – P.1-8. (IF = 2,8).
7. Valueva A.A., Shumov I.D., **Kaysheva A.L.**, Ivanova I.A., Ziborov V.S., Ivanov Y.D., Pleshakova T.O. Covalent protein immobilization onto muscovite mica surface with a photocrosslinker. // *Minerals* – 2020. – V.10(5). – P.1-19. (IF=2,7).
8. Malsagova K., Kopylov A., Stepanov A., Butkova T., Izotov A., **Kaysheva A.** Dried Blood Spot in Laboratory: Directions and Prospects // *Diagnostics* – 2020. – V. 10(4). – P. 1-18 (IF= 3,7).
9. **Kaysheva A.L.**, Stepanov A.A., Kopylov A.T., Butkova T.V., Pleshakova T., Ryabtsev V.V., Iourov I.Y., Vorsanova S.G., Ivanov Y.D. Pilot data of serum proteins from children with autism spectrum disorders // *Data in Brief* – 2019. – V.27. – P.104558.
10. **Kaysheva A.L.**, Pleshakova, T.O., Stepanov A.A., Ziborov V.S., Saravanabhavan S.S., Natesan, B., Archakov A.I., Ivanov Y.D. Immuno-MALDI MS dataset for improved detection of HCVcoreAg in sera. // *Data in Brief* – 2019. – V.25. – P.104240.
11. **Кайшева А.Л.**, Плешакова Т.О., Мальсагова К.А., Чингин К., Матиур Раман, Проничев А.Н., Никитаев В.Г., Иванов Е.О., Василяк Л.М., Зиборов В.С.,

Иванова Н.Д., Валуева А.А., Иванов Ю.Д. АСМ-МС для белкового анализа образцов плазмы крови больных раком яичников // Краткие сообщения по физике ФИАН – 2019. – Т.8. – С.42-49.

12. **Кайшева А.Л.**, Копылов А.Т., Кушлинский Н.Е. и соавт. Сравнительный анализ протеома плазмы крови больных почечно-клеточным раком // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины – 2019. – Т.167(1). – С.99-104 (IF=0,8).

13. **Kaysheva A.L.**, Kopylov A.T., Ponomarenko E.A., Kiseleva O.I., Teryaev, N.B., Potapov A.A., Izotov A.A., Morozov S.G., Kudryavtseva V.Y., Archakov A.I. Relative Abundance of Proteins in Blood Plasma Samples from Patients with Chronic Cerebral Ischemia // Journal of Molecular Neuroscience – 2018. – V.64(3). – P.440-448. (IF=3,4).

14. Pleshakova T.O., **Kaysheva A.L.**, Shumov I.D., Ziborov V.S., Bayzyanova J.M., Konev V.A., Uchaikin V.F., Archakov A.I., Ivanov Y.D. Detection of hepatitis C virus core protein in serum using aptamer-functionalized AFM chips // Micromachines – 2018. – V.10(2). – P.1-13. (IF=2,9).

15. Pleshakova T.O., **Kaysheva A.L.**, Bayzyanova J.M., Anashkina A.S., Uchaikin V.F., Ziborov V.S., Konev V.A., Archakov A.I., Ivanov Y.D. The detection of hepatitis c virus core antigen using afm chips with immobilized aptamers // Journal of Virological Methods – 2018. – V.251. – P.99-105. (IF=2,0).

16. Malsagova K.A., Pleshakova T.O., Galiullin R.A., **Kaysheva A.L.**, Shumov I.D., Ilnitskii M.A., Popov V.P., Glukhov A.V., Archakov A.I., Ivanov Y.D. Ultrasensitive nanowire-based detection of HCVcoreAg in the serum using a microwave generator // Analytical Methods – 2018. – V.10(23). – P.2740-2749. (IF=2,9).

17. **Кайшева А.Л.**, Гришин Д.В., Каменский П.А., Федорончук Т.В., Мальсагова К.А., Чойнзонов Е.Л., Лисица А.В. Современные направления развития постгеномных медицинских технологий // Патологическая физиология и экспериментальная терапия. 2018. Т. 62. № 3. С. 95–105.

18. Khramova T.V., **Kaysheva A.L.**, Ivanov Y.D., Pleshakova T.O., Iourov I.Y., Vorsanova S.G., Yurov Y.B., Schetkin A.A., Archakov A.I. Serologic Markers of Autism Spectrum Disorder // Journal of Molecular Neuroscience – 2017. – V.62(3). – P.420-429. (IF=3,4).

19. **Кайшева А.Л.**, Копылов А.Т., Кушлинский Н.Е., Алферов А.А., Плешакова Т.О., Арчаков А.И., Иванов Ю.Д. Панорамная масс-спектрометрия: поиск кандидатных белковых маркеров рака яичников в плазме крови // Вопросы гинекологии, акушерства и перинатологии. 2018. Т. 17. № 3. С. 5–13.

20. **Kaysheva A.L.**, Pleshakova T.O., Kopylov A.T., Shumov I.D., Iourov I.Y., Vorsanova S.G., Yurov Y.B., Ziborov V.S., Archakov A.I., Ivanov Y.D. Combination of atomic force microscopy and mass spectrometry for the detection of target protein in the serum samples of children with autism spectrum disorders // IOP Conference Series: Materials Science and Engineering – 2017. – V.256(1). – P.1-3.

21. **Kaysheva A.L.**, Kopylov A.T., Pleshakova T.O., Iourov I.Y., Vorsanova S.G., Yurov Y.B., Shchetkin A.A., Archakov A.I., Ivanov Y.D. Proteomic analysis of serum proteins of children with autism // Biotechnologia Aplicada – 2017. – V.34(2). – P.2211-2214.

22. Pleshakova T.O., **Kaysheva A.L.**, Bayzyanova J.M., Anashkina A.S., Uchaikin V.F., Shumov I.D., Ziborov V.S., Konev V.A., Archakov A.I., Ivanov Yu.D.

Advantages of aptamers as ligands upon protein detection by AFM-based fishing // Analytical Methods – 2017. – V.9(42). – P.6049-6060. (IF=2,9).

23. Pleshakova T.O., Malsagova K.A., **Kaysheva A.L.**, Kopylov A.T., Tatur V.Y., Ziborov V.S., Kanashenko S.L., Galiullin R.A., Ivanov Y.D. Highly sensitive protein detection by biospecific AFM-based fishing with pulsed electrical stimulation // FEBS Open Bio – 2017. – V.7(8). – P.1186-1195. (IF=2,2).

24. Иванов Ю.Д., Плешакова Т.О., Мальсагова К.А., **Кайшева А.Л.**, Копылов А.Т., Изотов А.А., Татур В.Ю., Веснин С.Г., Иванова Н.Д. Зиборов В.С., Арчаков А.И. АСМ-фишинг белка в импульсном электрическом поле // Биомедицинская химия – 2016. – Т.62(4). – С.439-446. (IF=0,6).

25. **Кайшева А.Л.**, Иванов Ю.Д., Французов П.А., Учайкин В.Ф., Конев В.А., Арчаков А.И. Масс-спектрометрическое определение изоформа кор-антигена вируса гепатита С // Инфекционные болезни. 2016. Т. 14. № 4. С. 51–55.

26. **Kaysheva A.L.**, Ivanov Y.D., Frantsuzov P.A., Krohin N.V., Pavlova T.I., Uchaikin V.F., Konev V., Kovalev O.B. Ziborov V.S., Archakov A.I. Mass spectrometric detection of the amino acid sequence polymorphism of the hepatitis C virus antigen // Journal of Virological Methods – 2016. – V.229. – P.86-90. (IF=2,0).

27. Ivanov Y.D., **Kaysheva A.L.**, Frantsuzov P.A., Pleshakova T.O., Krohin N.V., Izotov A.A., Shumov I.D., Uchaikin V.F., Konev V.A., Ziborov V.S., Archakov A.I. Detection of hepatitis C virus core protein in serum by atomic force microscopy combined with mass spectrometry // International Journal of Nanomedicine – 2015. – V.10. – P.1597-1608. (IF=6,4).

28. Ivanov Y.D., Bukharina N.S., Pleshakova T.O., Frantsuzov P.A., Andreeva E.Y., **Kaysheva A.L.**, Zgoda V.G., Izotov A.A., Pavlov, T.I., Ziborov V.S., Radko S.P., Moshkovskii S.A., Archakov A.I. Atomic force microscopy fishing and mass spectrometry identification of gp120 on immobilized aptamers // International Journal of Nanomedicine – 2014. – V.9(1). – P.4659-4670. (IF=6,4).

29. Ivanov Y.D., Pleshakova T., Malsagova K., Kozlov A., **Kaysheva A.**, Kopylov A., Izotov A., Andreeva E., Kanashenko S., Usanov S., Archakov A. Highly sensitive protein detection by combination of atomic force microscopy fishing with charge generation and mass spectrometry analysis // FEBS Journal – 2014. – V.281(20). – P.4705-4717. (IF=5,5).

30. Ivanov Y.D., Pleshakova T.O., Krohin N.V., **Kaysheva A.L.**, Usanov S.A., Archakov A.I. Registration of the protein with compact disk // Biosensors and Bioelectronics – 2013. – V.43(1). – P.384-390. (IF=6,4).

Монографии и главы книг

31. **Кайшева А.Л.** и Иванов Ю.Д. Протеомный анализ образцов плазмы крови больных раком яичников (Глава 17). Рак яичников: фундаментальные и клинические исследования / под ред. Н.Е. Кушлинского, Л.Ф. Гуляевой, Н.А. Огнерубова, И.С. Стилиди. Москва, Россия. Издательство ЭБС «Проспект» 2021. – 748 с. ISBN: 978-5-6045698-9-4.

32. **Кайшева А.Л.** и Иванов Ю.Д. Идентификация белковых маркеров гепатита С на поверхности АСМ-чипов. LAP Lambert Academic Publishing GmbH & Co. 2015. – 64 с. ISBN-10:3659716952.

Тезисы

33. Степанов А.А., Копылов А.Т., Петровский Д.В., Руднев В.Р., Мальсагова К.А., **Кайшева А.Л.** Нейронная сеть для классификации неотнесённых масс-спектрометрических данных в протеометаболомике // Сборник тезисов III Объединенного научного форума физиологов, биохимиков и молекулярных биологов. – Сочи, Россия. – 2021. – С.158.
34. **Кайшева А.Л.**, Иванов Ю.Д., Копылов А.Т., Юров И.Ю., Ворсанова С.Г., Юров Ю.Б., Арчаков А.И. Протеомика расстройств аутистического спектра. // Российский вестник перинатологии и педиатрии. – Москва, Россия. – 2017. – Т.62. – С.170-171.
35. **Kaysheva A.L.**, Kopylov A.T., Pleshakova T.O., Izotov A.A., Yurov I.Y., Vorsanova S.G., Yurov Yu.B., Archakov A.I., Ivanov Yu.D. Estimating relative abundances of proteins from shotgun proteomics data in children with autism spectrum disorder // Book of Abstracts of the International Conference “Clinical proteomics. Postgenome Medicine”. – Москва, Россия. – 2017. – P.115.
36. Sidiyakin A., **Kaysheva A.**, Lobanov A., Morozov S. Proteomic analysis of suscrofa cerebral cortex extract with induced hemorrhagic stroke // Book of Abstracts of the International Conference “Clinical proteomics. Postgenome Medicine”. – Москва, Россия. – 2017 – P.167.
37. Kopylov A., Karateev D., Lisitsa A., Novikov A., **Kaysheva A.**, Dyigay A., Borodulina E., Aleksandrova E., Erdes Sh., Vyihodets I. Project «Corticoid-16»: simple answers for the difficult questions. detection of betamethasone in human urine of patients with rheumatoid arthritis and ankylosing spondylitis // Book of Abstracts of the International Conference “Clinical proteomics. Postgenome Medicine”. – Москва, Россия. – 2017 – P.70.
38. **Кайшева А.Л.**, Плешакова Т.О., Копылов А.Т., Шумов И.Д., Юров И.Ю., Ворсанова С.Г., Юров Ю.Б., Изотов А.А., Арчаков А.И., Иванов Ю.Д. Комбинация атомно-силовой микроскопии и масс-спектрометрии для регистрации целевых белков в образцах сыворотки крови детей с расстройствами аутистического спектра // Материалы международной конференции СЗМ-2017. – Екатеринбург, Россия. –2017. – С.200.
39. **Kaysheva A.L.**, Ivanov Y.D., Archakov A.I. Combining the AFM-Fishing and MS for the Detection and Identification of Low Abundance Proteins // In: proceedings the HUPO – 2012. – Boston, USA. – P.226.
40. **Кайшева А.Л.**, Иванов Ю.Д., Плешакова Т.О., Арчаков А.И. Обнаружение вирусных частиц гепатита С с помощью комбинированного подхода на базе атомно-силовой микроскопии и масс-спектрометрии// Материалы VI Московского международного конгресса «Биотехнология: состояние и перспективы развития». – Москва, Россия. – 2011. – С.425-426.
41. **Kaysheva A.L.**, Ivanov Y.D., Frantsuzov p.A., Pleshakova T.O., Krokhin N.V, Archakov A.I. AFM/MS detection of HCVcore-containing viral particles // In: proceedings the HUPO. – Geneva, Switzerland. – 2011. – P.1702.

Патенты:

42. Патент RU2013134985А Российская Федерация, Создание основ ультрачувствительной детекции бактериальной ДНК/РНК с использованием электрохимических (био)сенсоров Способ получения аналитической тест-системы для мультиплексной идентификации и количественного измерения

содержания интересующих белков в биологическом образце по содержанию соответствующих им протеотипических маркерных пептидов / Копылов А.Т., Ильгисонис Е.В., **Кайшева А.Л.**, Мошковский С.А, Филимонов А.Д., Ромашова Ю.А., Згода В.Г., Лисица А.В., Арчаков А.И., RU2013134985/15А, Заявл. 26.06.2013, опубл. 27.08.2016.

Список сокращений и обозначений

C_o – концентрация белка в растворе аналита, в котором инкубировался АСМ-чип (М); C' – концентрация белка в конечном растворе, после элюции с поверхности чипа (М); n_o – количество вещества в растворе аналита (моль); n' – количество вещества в конечном растворе (моль); N_o – число частиц в растворе аналита; N' – число частиц в конечном растворе; V_o – объем раствора аналита (мл); V' – объем конечного раствора (мкл); *ВМЗ* – флавоцитохром Р450 (*Bacillus megaterium*); *ДНВ* – дигидроксibenзойная кислота; *gp120* – гликопротеин 120 вируса иммунодефицита человека; *НССА* – α -циано-4-гидроксикоричная кислота; *НСVcoreAg* – нуклеокапсидный белок вируса гепатита С; m/z – отношение массы к заряду; *α -FP* – альфа-фетопротейн; *АСМ* – атомно-силовая микроскопия или атомно-силовой микроскоп; *АСМ-анализ* – анализ с применением метода атомно-силовой микроскопии; *АСМ/МС подход* – комбинация методов атомно-силовой микроскопии, фишинга и масс-спектрометрического анализа; *Биоспецифический фишинг* – концентрирование целевых молекул белка на функционализированную поверхность чипов для атомно-силового микроскопа посредством биоспецифических взаимодействий (антитело/антиген, аптамер/антиген); *ВГС* – вирус гепатита С; *ВЭЖХ* – высокоэффективная жидкостная хроматография; *Раствор аналита* – раствор, содержащий исследуемый белок, в котором проводилась инкубация АСМ-чипов; *Конечный раствор (элюат)* – раствор гидролизованного белка, полученный с поверхности АСМ-чипа; *МАЛДИ* – лазерная десорбция-ионизация посредством матрицы; *МАЛДИ-МС* – времяпролетная масс-спектрометрия с лазерной десорбцией-ионизацией посредством матрицы; *МКА* – моноклональное антитело; *ММР* – мониторинг множественных реакций, в настоящем документе: мониторинг фрагментов пептидных ионов; *Молекулярный детектор* – нанотехнологическое устройство, сенсорный элемент которого соизмерим с размерами биологической макромолекулы; *МС* – масс-спектрометрия; *МС-анализ* – масс-спектрометрический анализ; *МС/МС* – тандемная масс-спектрометрия; *Сенсорная зона* – выделенный на поверхности чипа участок, отличающийся по своим функциональным свойствам; зона может быть выделена за счет изоляции остальной поверхности (применяется в случае использования чипов на основе графита) либо за счет изменения свойств поверхности с помощью точно нанесенных растворов химических агентов (применяется в случае использования слюды); *Химический фишинг* – концентрирование

биомолекул на поверхности чипов, функционализированных химическими агентами, при фишинге осуществляется ковалентное связывание белков с поверхностью; *Фишинг* – концентрирование белковых молекул из анализируемого раствора большого объема на небольшую функционализированную поверхность чипа; *Функционализированная поверхность* – специально подготовленная подложка для АСМ на основе слюды или для другого нанотехнологического устройства, поверхность которой может быть функционализирована с помощью химических агентов (кросс-линкеров) или содержать иммобилизованные молекулярные зонды (антитела или аптамеры); *ППМ* – протеомные поисковые машины; *ТФУ* – трифторуксусная кислота; *ЭСИ* – метод электроспрея.

Приложение

Таблица. Белки, которые были использованы в работе

1	2	3	4	5	6	7
№	Белок (UniProt AC)	Молекулярный вес, кДа	Алифатический индекс	Организм	Степень очистки, %	Производитель
1	α -фетопротеин (P02771)	68,7	82,7	Human	99	MyBioSource (США)
2	Сывороточный альбумин человека (P02768)	69,4	77,6	Human	98	Agilent (США)
3	Пероксидаза С1А (P00433)	38,8	90,3	Horseradish	98	Sigma (США)
4	Бычий сывороточный альбумин (P02769)	69,3	77,5	Bovine	98	Sigma (США)
5	Цитохром b5 (P00167)	14,3	86,6	Human	96	предоставлен проф. С.А. Усановым, Институт биорганической химии (Республика Беларусь)
6	Цитохром P450sc (P05108)	60,1	89,1	Human	95	
7	Цитохром P450 BM3 (P14779)	117,8	80,7	<i>Bacillus megaterium</i>	96	предоставлен проф. А.В. Мунро, Манчестерский университет (Великобритания)
8	Тимидилат-синтаза (P04818)	35,7	83,2	Human	95	USBio (США)
9	Авидин (P02701)	16,8	86,6	<i>Gallus gallus</i>	97	USBio (США)
10	Белок NFAT C1 (O95644)	101,2	68,8	Human	95	предоставлен к.х.н. А.Ю.

						Рубиной, ИМБ РАН (Москва)
1	2	3	4	5	6	7
11	Серпин В3 (P29508)	44,9	76,3	Human	97	USBio (США)
12	Тромбин (P00734)	70,0	69,8	Human	99	Sigma (США)
13	НСVcoreAg (Q8V7V3)	20,7	74,6	Hepatitis C virus	95	Virogen (США)
14	Миоглобин (P02144)	17,2	84,3	Human	97	USBio (США)
15	Гликопротеин ВИЧ-1 gp120 (P04578)	115	91,0	HIV-1	95	USBio (США)
16	Адренодоксин (P10109)	19,4	85,4	Human	95	предоставлен проф. С.А. Усановым, Институт биоорганической химии (Республика Беларусь)
17	Адренодоксин-редуктаза (P22570)	53,8	86,7		95	

Аптамеры: анти-GP120 с нуклеотидной последовательностью 5'-biotin-GGGAGGACGATGCGGAAAXGCGCGAGCXXCCGAAAAGGAAAXXACGCAGACGACGAGCGGG A 3' (синтезирован в научной группе С.П. Радько, ИБМХ, Россия) и три аптамера анти-НСVcore, в том числе (№1) 5'-NH₂-(T)10-ACGCTCGGATGCCACTACAGGCACGCCAGACCAGCCGTCCTCTCTTCATCCGAGCCTTCACCGAGCCTCATGGACGTGCTGGTG A-3', (№2) 5'-NH₂-(T)10- ACGCTCGGATGCCACTACAGТААСАСАСААСТТАААА ТСАТА СААААААGAGТАААТGCCTCATGGACGTGCTGGTGA-3'и (№3) 5'-NH₂-(T)10-ACGCTCGGATGCCACTACAGCCAAАТАСТACCGCAAAAACCACCTCCCCCTCGATAAT AGCCTCATGGACGTGCTGGTGA-3' (производство ЗАО Евrogen, Россия, степень очистки 99%).