ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ НАУЧНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ "НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ БИОМЕДИЦИНСКОЙ ХИМИИ ИМЕНИ В.Н. ОРЕХОВИЧА" (ИБМХ)

на правах рукописи

КАЙШЕВА АННА ЛЕОНИДОВНА

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

1.5.4. – биохимия

Диссертация на соискание ученой степени
доктора биологических наук

Научные консультанты:
д.б.н. Плешакова Т.О.
д.б.н. Пономаренко Е.А.

Москва – 2022

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ 6
ГЛАВА 1. Обзор литературы 13
1.1 Содержание белков в образцах крови 13
1.2 Подходы концентрирования целевых белков 19
1.3 Атомно-силовая микроскопия в детектировании биологических молекул 28
1.4 Масс-спектрометрический анализ для идентификации биологических молекул в биосенсорных технологиях 34
1.4.1 Оптические биосенсоры в протеомике 35
1.4.2 Нанопроволочные биосенсоры в протеомике 41
1.5 Детектирование молекулярных маркеров заболеваний в образцах крови 45
1.6 Масс-спектрометрические методы идентификации белков 50
1.7 Предварительная подготовка образца для масс-спектрометрического анализа 52
1.7.1 Гидролиз биологического образца 53
1.8 Методы масс-спектрометрического анализа белков 58
1.8.1 Тандемная масс-спектрометрия 58
1.8.2 Времяпролетная масс-спектрометрия 61
1.8.3 Направленная масс-спектрометрия 62
1.8.4 Масс-спектрометрическая визуализация пространственного распределения молекулярных компонентов 65
1.9 Идентификация белков в тандемной и времяпролетной масс-спектрометрии 68
ГЛАВА 2. Материалы и методы 77
2.1 Масс-спектрометрические детекторы 78
2.2 Вспомогательное лабораторное оборудование 81
2.3 Препараты белков 82

2.4 Функционализированные поверхности чипов, реагенты и биологические образцы 86
2.5 Гидролиз белков на поверхности чипа 90
2.5.1 Вспомогательные операции 90
2.5.2 Гидролиз на поверхности чипов для АСМ 91
2.5.3 Гидролиз на поверхности чипов для нанопроволочного биосенсора 92
2.5.4 Гидролиз на поверхности чипов для оптического биосенсора 93
2.5.5 Обессоливание конечного раствора (элюата) 93
2.6 Предварительная подготовка образцов сыворотки и плазмы крови для масс-спектрометрического анализа 94
2.7 Масс-спектрометрический анализ белков 98
2.7.1 Масс-спектрометрический анализ белков с применением времяпролетного детектора с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией 98
2.7.2 Масс-спектрометрический анализ белков с применением детектора типа ионная ловушка 98
2.7.3 Масс-спектрометрический анализ белков с применением орбитальной ловушки ионов 99
2.7.4 Масс-спектрометрический анализ белков с применением детектора типа тройной квадруполь 100
2.7.5 Масс-спектрометрический анализ гидроксикамфоры и прегненолона с системой прямого ввода 102
2.7.6 Масс-спектрометрический анализ гидроксилауриновой кислоты 103
2.8 Идентификация белковых компонентов 103
ГЛАВА 3. Обоснование применения АСМ/МС подхода 105
3.1 Расчетное обоснование возможности применения АСМ/МС подхода 105

3.2 Экспериментальное подтверждение эффекта концентрирования белков на поверхности АСМ-чипов 112
ГЛАВА 4. Разработка методик для масс-спектрометрического анализа в АСМ/МС подходе 114
4.1 Подбор состава смеси для гидролиза белков на поверхности чипа 114
4.2 Подбор условий проведения гидролиза белков на поверхности чипа 118
4.3 Подготовка конечных растворов (элюат) для масс-спектрометрического анализа 122
4.4 Подбор условий хранения образцов плазмы крови с использованием мембранного носителя 125
ГЛАВА 5. Определение аналитической чувствительности АСМ/МС подхода 133
5.1 Масс-спектрометрический анализ белков, сконцентрированных на поверхности чипов с помощью химического фишинга и сорбции 133
5.2 Масс-спектрометрический анализ белков, сконцентрированных на поверхности чипов с помощью биоспецифического фишинга из раствора аналита 139
5.3 Масс-спектрометрический анализ кор-антигена вирусного гепатита С, иммобилизованного на поверхности чипов для нанопроволочного биосенсора 144
5.4 Масс-спектрометрический анализ белков, сконцентрированных на поверхности компакт-дисков 146
ГЛАВА 6. АСМ/МС подход для идентификации белков в биологических образцах 151
6.1 АСМ/МС подход для идентификации кор-антигена вирусного гепатита С в образцах сыворотки крови 151
6.2 АСМ/МС подход для обнаружения нуклеинопротеиновых комплексов в образцах сыворотки крови 164

6.3 АСМ/МС подход в детектировании медицински значимых белков 170
6.3.1 Белки, кодируемые генами хромосомы 18 человека 170
6.3.2 Белки, ассоциированные с развитием рака яичников 176
ГЛАВА 7. АСМ/МС подход для анализа биологической активности ферментов 185
7.1 Комбинация масс-спектрометра и оптического биосенсора для анализа биологической активности цитохром Р450-содержащих систем 185
7.2 АСМ/МС подход для анализа биологической активности цитохрома Р450 BM3 190
ЗАКЛЮЧЕНИЕ 196
ВЫВОДЫ 198
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ 200
БИБЛИОГРАФИЯ 203
Благодарности 241

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность проблемы

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 [1]. 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 [2–4].

Необходимость применения новых высокочувствительных методов в протеомном анализе обусловлена, в том числе, пониманием сложности функционирования генома и высокой значимости эпигенетической регуляции экспрессии генов [5]. 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 [4].

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

преодоления методологического барьера 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 [6]. 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). Для обеспечения детектирования белков поверхность чипов функционализирована химически (за счет применения химических агентов) или биоспецифически (за счет иммобилизации молекулярных зондов – антител или аптамеров) [7–9][*1]. В первом случае концентрирование белков на поверхности осуществляется посредством ковалентного связывания биомакромолекул белка 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 [10,11].

[1]Ссылки на список литературы приведены цифрами, ссылки на список статей автора – цифрами со звездочкой

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-спектрометрия (далее – МС-анализ).

В настоящей работе масс-спектрометрия выбрана как основополагающий метод для верификации результатов АСМ-фишинга. Методы масс-спектрометрического анализа характеризуются высокой точностью, селективностью и производительностью [12]. 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 поверхностей 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. 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 АСМ-чипов 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.

Теоретическая и практическая значимость работы. Разработанный подход позволяет решать фундаментальные биологические задачи инвентаризации белкового состава образцов биологического происхождения. Предлагаемое направление применимо для решения прикладных медицинских задач, в том числе, выявления кандидатных маркеров белковой природы, ассоциированных с развитием заболеваний. В диссертационной работе предложены 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 Р450, иммобилизованных на поверхности чипов для атомно-силового микроскопа и оптического биосенсора.

Апробации результатов. 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.

Работа выполнена в лаборатории нанобиотехнологии Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича» (ИБМХ) при поддержке:

1. программ ФНИ (ГАН) по темам «Поиск постгеномных биомаркеров социально-значимых заболеваний и разработка методов их детектирования» (2015-2017 гг) и "Создание биоаналитических методов для диагностики заболеваний" (2013-2020);
2. грантов РФФИ № 09-04-12113-офи_м (2009-2010), № 11-04-12018-офи_м (2011-2012 гг), № 12-04-31570 мол_а (2012-2013 гг), 15-04-08368 А (2015-2017 гг);
3. государственных контрактов № 02.512.11.2334 (2009-2010 гг), № 02.552.11.7060 (2009-2010 гг) и 14.512.11.0018 (2013 г) в рамках ФЦП «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса РФ на 2007-2013 гг.»;
4. гранта в форме субсидии в рамках ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009-2013 гг.» по Соглашению №8717 (2012-2013 гг.).

ГЛАВА 1. Обзор литературы

1.1 Содержание белков в образцах крови

В последние два десятилетия активное развитие получили постгеномные технологии (транскриптомика, протеомика и метаболомика), которые предоставляют исследователю обширный объем данных о молекулярных механизмах и роли отдельных биологических факторов в реализации генетической информации на уровне фенотипа, в онтогенезе и развитии патологии [13]. Наиболее яркими генетически программируемыми биологическими событиями в здоровой клетке, определяющими изменение фенотипа, являются смена стадий клеточного цикла от профазы до анафазы, *de novo* глюконеогенез, дифференциация и созревание клетки. Большое внимание исследователей привлекает изучение регуляции метаболических превращений, изменяющих нормальное функционирование клетки. Знания, которые предоставляют многомерные постгеномные данные об экспрессии генов, содержании транскриптов, белковом и метаболитном составе, важны для понимания молекулярных событий, сопровождающих патологический процесс. Такими молекулярными событиями являются регуляция трансляции белка и пост-трансляционное модифицирование (ПТМ), регуляция экспрессии генов, метилирование нуклеиновых кислот, РНК-интерференция.

Изменения протеома при патологии отражают ключевые моменты механизмов фенотипических превращений клетки [14]. Благодаря методологическим и инструментальным достижениям в области постгеномной биологии стал возможен поиск молекулярных маркеров широкого спектра мультигенных заболеваний на ранних стадиях, когда лекарственная терапия наиболее эффективна, предикторов ответа на эффективность терапии и развитие подходов персонализированной медицины. Системный подход, объединяющий успехи постгеномной биологии в исследовании динамической природы сигнальных процессов в клетке, помогает пролить свет на решение наиболее важных вызовов биомедицины – трансформации здоровой клетки в опухолевую.

Результатом крупнейшего международного проекта «Геном человека» (завершен в 2000 году) стало аннотирование около 20000 белок-кодирующих генов. Спустя 20 лет по завершении проекта «Геном человека» исследователи не ответили на вопрос о многообразии белковых типов, определяющий совокупный протеом [15]. Оценку возможных типов белков затрудняют, с одной стороны, многообразие белковых форм, а с другой, – технические и методологические ограничения их детектирования.

Многообразие белковых форм обусловлено сложностью биологических процессов. К таким процессам исследователи относят посттрансляционные модификации (ПТМ) белка, которые не кодируются геномом. Большая часть белков в организме человека может присутствовать в модифицированной форме и даже в нескольких вариантах модифицированных форм [14]. ПТМ являются одним из важнейших регуляторных механизмов метаболических процессов. Биологическая функция множества белков регулируется ПТМ, которые, в ряде случаев являются обратимыми. На сегодня в литературе аннотировано более 300 типов модификаций белков, которые осуществляются ферментативно, являются сайт-специфичными и направленными. Наиболее распространенными в природе являются фосфорилирование, ацетилирование, метилирование, цитруллирование и убиквитинирование [16,17]*. Современные исследования доказывают важность изучения «сигнатуры» ПТМ белков в первую очередь для нужд онкологической медицины [17*, 18–23, 24*] и эндокринологии [25,26]. На сегодня множество научных исследований посвящено определению роли посттрансляционного сигналинга белков в реализации сложного молекулярного репрограммирования здорового фенотипа в патологический.

Вклад в многообразие белковых форм также вносит дифференциальная экспрессия генов в зависимости от типа ткани, стадии клеточного цикла. Клетки разных типов экспрессируют отличные наборы генов, что обуславливает фенотипические особенности тканей. Дифференциальная экспрессия генов в зависимости от типа клетки приводит к различиям в качественном и количественном составе протеома во времени [27,28]. В оценке многообразия

белковых форм важны хорошо изученные явления альтернативного сплайсинга, организации четвертичных гетеромерных белковых комплексов, эффективности трансляции мРНК, реализации однонуклеотидных полиморфизмов в аминокислотные замены [14].

Образцы плазмы или сыворотки крови являются перспективными объектами исследования в клинической лабораторной практике и в научно-исследовательских изысканиях благодаря малоинвазивному способу забора биоматериала. Кровь включает обширный вариант протеома человека, поскольку помимо белков, циркулирующих в кровеносном русле, содержит тканевые секреторные белки, а также белки, которые высвобождаются клетками вследствие повреждения клеточной мембраны [29].

Протеом крови характеризуется чрезвычайно обширным динамическим диапазоном концентраций белков, который составляет более десяти порядков и включает для здоровых людей наиболее высокопредставленный альбумин на уровне 80 мМ и цитокины с низким содержанием, например, интерлейкин-6 с содержанием на уровне 0,2 пМ [29,30]. В классическом труде *«Белки плазмы»* (1975 год) Патнэм определил, что в плазме присутствуют белки, которые выполняют функции кровообращения [31]. Позднее с развитием точности, чувствительности и высокой производительности аналитического оборудования была сформулирована концепция «протеома плазмы», которая обобщает более широкий перечень белков, циркулирующих в кровеносном русле, функционально не связанных с кровообращением. С функциональной точки зрения белки крови можно классифицировать на следующие группы [29]:

– секретируемые тканевые белки (синтезируются и секретируются в основном печенью и кишечником);

– иммуноглобулины (у здорового взрослого человека в кровотоке находится порядка десяти миллионов типов антител, отличные по аминокислотной последовательности);

– лиганды для рецепторов «дальнего действия» (гормоны белковой природы);

– лиганды для рецепторов «местного действия» (цитокины и другие медиаторы клеточного ответа ближнего окружения);

– транспортируемые белки (в составе везикул в кровеносном русле, в том числе лизосомальные белки);

– клеточные белки, которые высвобождаются в кровеносное русло в результате повреждения клеточной мембраны или гибели клетки (зачастую отражают развитие патологического процесса в организме);

– опухолевые белки, в том числе онкомаркеры, которые экспрессируются опухолевыми клетками и секретируются в кровоток;

– белки других таксономических групп (в том числе инфекционных организмов или паразитов, которые высвобождаются в кровоток).

Белки крови играют критически важную роль в физиологии человека и являются объектами исследования в области биомедицины. Содержание белков в биообразце коррелирует со здоровым и больным состоянием человека [30,32]. Кошик Кумар Дей и соавторы из Медицинской школы Нанкинского университета (Цзянсу, Китай) в исследовании протеома плазмы и сыворотки крови человека, посвященном поиску новых биомаркеров болезни Альцгеймера, указывают на то, что «профилирование белков в крови стало обширной практикой среди научных групп для выявления биомаркеров широкого спектра заболеваний человека» [30, 32]. Авторы отмечают, что профилирование протеома крови с использованием высокоэффективной жидкостной хроматографии в комбинации с тандемной масс-спектрометрией (ВЭЖХ-МС/МС) является сложной задачей вследствие значительного динамического диапазона содержания белков. Результатом исследования стало глубокое профилирование плазмы и сыворотки крови для небольшой выборки больных Альцгеймером (n=5). В работе представлены данные 4826 идентифицированных белков. Авторы отмечают, что на небольшой когорте участников удалось достоверно выявить различия в содержании для 30 белков по сравнению с контрольной группой условно-здоровых участников (n=6). Большая часть дифференциально-экспрессируемых белков являются участниками

митохондриального пути и являются потенциальными маркерами прогрессирования болезни Альцгеймера [30,32].

Циркулирующие и клеточные белки, интерлейкины представлены в крови в обширном динамическом диапазоне (рисунок 1).

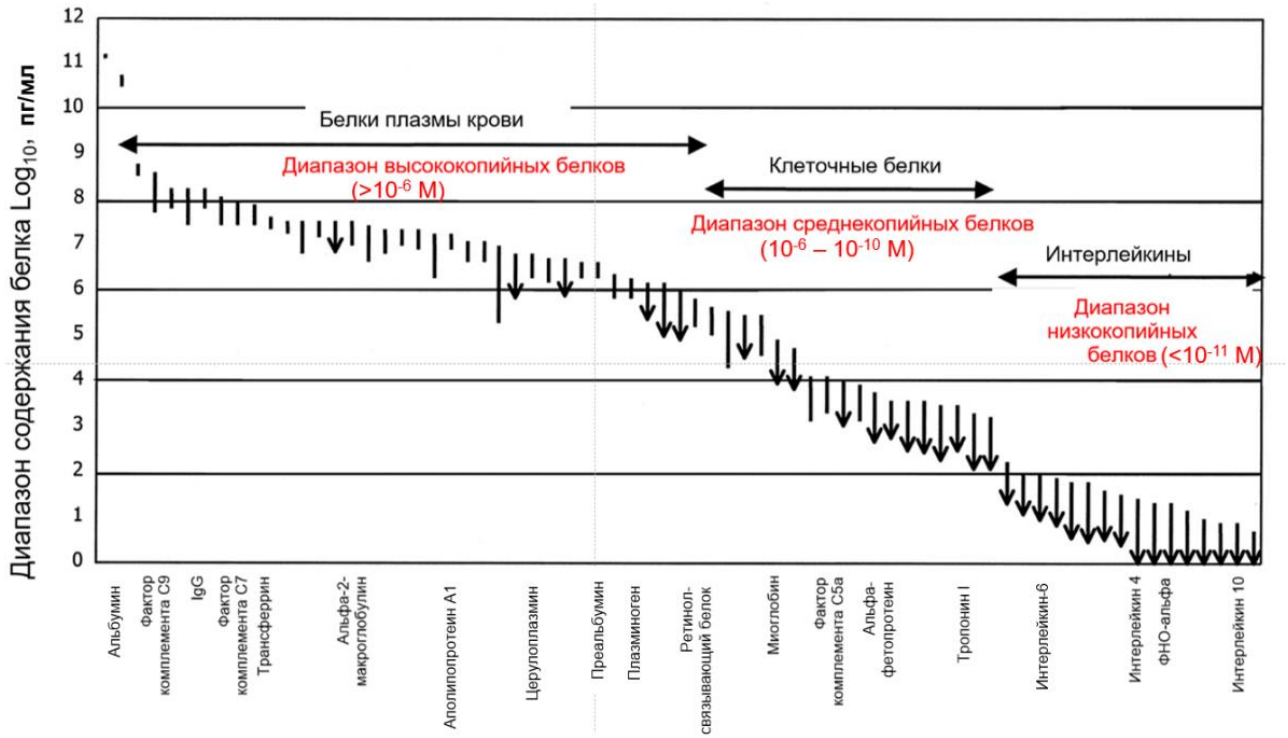


Рисунок 1. – Концентрации циркулирующих в крови белков. Белки плазмы крови, расположенные слева, могут быть отнесены к диапазону высококопийных белков (>10^{-6} М и выше), клеточные белки, сгруппированные в центральной части, соответствуют диапазону среднекопийных белков (10^{-6}-10^{-10} М), цитокины, сгруппированные справа, соответствуют диапазону низкокопийных белков (10^{-11} М и ниже). Сокращения: ФНО – фактор некроза опухоли, IgG – иммуноглобулин класса G. Содержание белков представлено в логарифмической шкале, охватывающей 12 порядков. Рисунок адаптирован из [29].

Как видно из рисунка 1, содержание белков плазмы крови соответствует концентрационному диапазону для высококопийных белков с молярной концентрацией от 60 мкМ для ретинол-связывающего белка до 80 мМ для альбумина. Клеточные белки, циркулирующие в кровотоке, большей частью относятся к диапазону среднекопийных белков с молярными концентрациями от 40 пМ для тропонина I до170 нМ для миоглобина. Интерлейкины могут быть

отнесены к диапазону низкокопийных белков – от 1,5 пМ для интерлейкина 10 до 42 пМ для интерлейкина 6 [29].

Широкий динамический диапазон белков в образцах крови обуславливает возникновение методологического барьера для глубокого профилирования белков крови. В плазме крови на долю 22 наиболее высокопредставленных белков приходится примерно 99% от содержания общего белка [33]. Удаление высокопредставленных белков из образцов крови с применением иммуноаффинной колоночной очистки позволяет снизить динамический диапазон концентраций белков, увеличить число белковых идентификаций и повысить концентрационную чувствительность анализа [30]. Наиболее распространенными способами очистки плазмы крови от высокопредставленных белков является аффинная хроматография с применением колонок с ковалентно иммобилизованными антителами, специфичными к наиболее распространенным белкам плазмы крови.

Применение аффинных реагентов для очистки образцов крови от высокопредставленных белков имеет несколько ограничений. Во-первых, антитела не обладают абсолютной специфичностью к целевым белкам, наблюдается перекрестная специфичность, которая приводит к удалению нецелевых белков. Во-вторых, обеднение биообразцов осуществляется в неденатурирующих условиях, что приводит к коиммунопреципитации и удалению антиген-связанных белков. Коиммунопреципитация приводит к удалению не только антиген специфичных белков, но и их белков-партнеров [34–36]. В-третьих, процедура иммунного обеднения крови является причиной высокой вариации результатов измерений. Научная группа Палстрем (Центр клинической протеомики, Дания) сравнила эффективность процедуры удаления из образцов плазмы крови высокопредставленных белков с применением нескольких аффинных платформ, в том числе популярных среди исследователей MARS-14 (Agilent, США) и Proteominer (BioRad, США). Было показано, что уровень извлечения целевых белков составляет около 99,9 %. Несмотря на высокие показатели извлечения высокопредставленных белков в образцах плазмы крови с применением

иммуноаффинных методов, ряд авторов отмечает низкую эффективность этого подхода. Авторы обращают внимание на то, что даже в очищенных образцах крови на долю 50-ти наиболее распространенных белков плазмы приходится 90 % спектральных идентификаций ионов-предшественников. В связи с этим можно говорить лишь о частичном обеднении образцов, которое не приводит к ожидаемому понижению динамического диапазона содержания белков крови.

Сканирующий (панорамный) протеомный анализ с использованием современных платформ ВЭЖХ-МС/МС даже в условиях иммунного очищения от мажорных типов белков не позволяет эффективно детектировать низкокопийные белки в образцах крови [35]. На сегодня важным представляется развитие новых аналитических подходов для селективного детектирования целевых белков в низкой и ультранизкой концентрации в биологических образцах.

Таким образом, методологические ограничения выявления белков в образцах биологического происхождения обусловлены сложностью состава биообразцов, широким динамическим диапазоном содержания компонентов, а также недостаточной концентрационной чувствительностью анализаторов для регистрации белков в низком и ультранизком диапазоне концентраций [37]. Данные ограничения обусловливают сложность разработки новых клинико-диагностических решений для выявления белковых маркеров, представленных в биологическом образце в низких концентрациях [38].

1.2 Подходы концентрирования целевых белков

Несмотря на обширные возможности масс-спектрометрического детектирования белков, существуют ограничения по чувствительности анализа ультранизкокопийных белков (10^{-15} М и ниже). Значимость выявления низко- и ультранизкокопийных белков сложно переоценить для решения фундаментальных задач, в том числе каталогизации белков тканей и организмов, и поисковых биомедицинских задач – ранней диагностики заболеваний. Повысить концентрационную чувствительность белкового анализа позволяют

хроматографические и электрофоретические системы (таблица 1), совместимые с масс-спектрометрическими детекторами. Предел концентрационной чувствительности таких сопряженных систем ограничен:

(а) эффективностью концентрирования белков на поверхности аффинного носителя;

(б) полнотой элюции, или извлечения, белков и их компонентов с поверхности носителя;

(в) ограничениями концентрационной чувствительности масс-спектрометрического детектора.

Таблица 1. Концентрационная чувствительность измерительных систем, сочетающих возможность фракционирования и / или концентрирования белков и масс-спектрометрического детектирования.

Измерительная система	**Чувствительность, М**	**Назначение**	**Источник**
Хроматография (SELDI*-масс-спектрометрия)	10^{-12}	Детектирование белков	[39,40]
Электрофорез	10^{-10}-10^{-11}	Детектирование белков	[41,42]
Магнитные микро- и наноразмерные частицы	10^{-10}-10^{-14}	Детектирование пептидов и белков	[43,44]
иммуно-МАЛДИ масс-спектрометрия (iMALDI**)	10^{-11}	Детектирование пептидов и белков	[45]
Гелевые микрочипы в комбинации с МАЛДИ-анализом	10^{-8}	Детектирование белков	[46]

SELDI-масс-спектрометрия – масс-спектрометрия с активированной поверхностью лазерной десорбцией/ионизацией от англ. «Surface-Enhanced Laser Desorption Ionization time-of-flight»; iMALDI(иммуно-МАЛДИ) – технология матрично активированной лазерной десорбции/ионизации с использованием иммуноматрицы в комбинации с времяпролетным масс-спектрометрическим детектором*

Процедуры предварительного фракционирования белковых смесей в биомедицинских исследованиях зачастую проводятся с применением изоэлектрического фокусирующего гель-электрофореза, хроматографии [47]. В SELDI-масс-спектрометрическом анализе (от англ. «*Surface-Enhanced Laser Desorption Ionization time-of-flight*») осуществляется многомерное разделение

белковых компонентов с использованием белковых чипов. Белки разделяются сначала по их сродству к неподвижной (стационарной) фазе хроматографической системы в условиях селективности по анион/катионному потенциалу, гидрофобности/гидрофильности или специфическому биомолекулярному распознаванию.

Второе направление разделения аналитов осуществляется по значениям отношения массы ионов к заряду [48]. SELDI-масс-спектрометрия является гибридной технологией, сочетающей хроматографию и времяпролетную масс-спектрометрию с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией (МАЛДИ-МС). SELDI-масс-спектрометрию можно отнести к технологии «протеомика-на-чипе», которая использует специально подготовленные чипы «ProteinChip», на поверхности которых организовано 8 или 16 сенсорных зон. Каждая сенсорная зона представляет собой твердофазную хроматографическую поверхность для концентрирования белков. Последующая элюция пептидов и белков с хроматографического носителя и ионизация в присутствии матрицы, слабой органической кислоты (α-циано-4-гидроксикоричная кислота), позволяет выполнить идентификацию белковых компонентов по значениям отношений массы ионов к соответствующим зарядам (*m/z*). Нормализованная интенсивность масс-спектрометрического пика прямо пропорциональна концентрации белковой молекулы в исследуемом образце. На сегодня в лабораторной практике применяются сенсорные массивы в «ProteinChip» с различными хроматографическими свойствами, в том числе гидрофобные, гидрофильные, анионообменные, катионообменные, которые позволяют концентрировать и детектировать белки в соответствии с их физико-химическими свойствами [47]. Чувствительность такого анализа составляет не менее 10^{-12} М (таблица 1). SELDI-масс-спектрометрический анализ с применением «ProteinChip» позволяет фракционировать 40 биологических образцов в течение 1-2 дней [47].

Ограничениями метода SELDI-масс-спектрометрии для практического медико-биологического применения являются [47]:

– низкое разрешение в анализе белков с молекулярным весом более 20 кДа, невозможность разделения белков с небольшими отличиями в аминокислотной последовательности (посттрансляционные модификации, аминокислотные замены, изоформы белков);

– результаты количественного анализа белковых компонентов в исследуемом образце чувствительны к изменениям экспериментальных процедур преаналитического этапа (предварительная подготовка образцов плазмы/сыворотки крови) и аналитического этапа (условий и режимов проведения масс-спектрометрических измерений);

– отсутствие стандартизованных протоколов анализа приводит к вариации в количественных моделях и качестве протеомных профилей между научными группами;

– ограниченный динамический концентрационный диапазон подхода затрудняет идентификацию кандидатных маркерных белков, присутствующих в анализируемом образце в концентрации ниже 10^{-8} М;

– трудоемкие и сложные процедуры концентрирования и идентификации белков.

В 2002 году Петрикоин и его коллеги в авторитетном журнале «The Lancet» опубликовали тест для диагностики рака яичников с применением метода SELDI-масс-спектрометрии [49]. Однако, воспроизвести полученные результаты другим исследовательским группам не удалось. Повторный анализ исходных данных показал, что идентифицированные диагностические масс-спектрометрические пики могли быть обусловлены, вероятно, особенностями процедур предварительной обработки биологических образцов [50,51].

В лабораторной практике популярно фракционирование сложных белковых смесей с использованием изоэлектрического фокусирующего гель-электрофореза. Путь от разделения белковой смеси в полиакриламидном геле (2D-ПААГ) до окрашивания и сканирования изображений занимает у исследователя около 2 дней. Высокопроизводительные устройства для автоматизированного проведения процедур 2D-ПААГ позволяют проводить

фракционирование до 12 биологических образцов в одном анализе. Концентрационная чувствительность подхода комбинации разделения белков по физико-химическим свойствам в ПААГ и масс-спектрометрической идентификации соответствует 10^{-10}-10^{-11} М (таблица 1).

Ограничениями метода 2D-ПААГ для практического медико-биологического применения являются [52]:

– недостаточная воспроизводимость результатов разделения белковых смесей, в том числе, вследствие вариативности между партиями амфолитов-носителей;

– сложность разделения гидрофобных, кислых и основных белков. Несмотря на то, что солюбилизация широкого спектра белков может быть достигнута с использованием денатурирующих растворов (мочевина и тиомочевина) и цвиттерионных детергентов, недостаточная устойчивость белков зачастую приводит к процессам денатурации и последующей их агрегации;

– ограниченный динамический диапазон разделения белков. Высокопредставленные белки «маскируют» белки с низким содержанием в исследуемом образце. Визуализация аналитов с низким содержанием затруднена. Так, краситель Кумасси характеризуется узким динамическим диапазоном с пределом обнаружения на уровне 10^{-7} М;

– низкая производительность и высокая трудоемкость процедур 2D-ПААГ разделения является препятствием для выполнения проектов, направленных на скрининг большого количества биологических образцов.

Пределы концентрационной чувствительности SELDI-масс-спектрометрического анализа и 2D-ПААГ представлены в таблице 1 и составляют для отдельных белков 10^{-12} и 10^{-11} М, соответственно.

Привлекательно в биомедицинских исследованиях применение функционализированных молекулярными зондами магнитных частиц для биоспецифического концентрирования целевых белков. Функционализированные магнитные частицы, благодаря развитой поверхности аффинного реагента и большому соотношению площади поверхности к объему,

позволяют эффективно концентрировать на поверхности микро- и наноразмерных частиц молекулы целевых белков из раствора аналита. Комбинация концентрирования белков на поверхности магнитных частиц и масс-спектрометрического анализа обеспечивает создание лабораторных тестов по типу сэндвич-иммуноанализа.

В последние 15 лет развитие получил иммуно-МАЛДИ подход для количественного детектирования белков и пептидов в анализируемых образцах биологического происхождения. В данном подходе для повышения чувствительности анализа применяется комбинация селективного концентрирования целевых белков на функционализированной антителами поверхности микроразмерных частиц и МАЛДИ-МС анализа [53–55]. Подход применяется научными коллективами для селективного детектирования медицински значимых белков. Так, научный коллектив Университета Виктория (Центр протеомных исследований, Канада) разработал автоматизированный подход иммуно-МАЛДИ для обнаружения белков сигнальных путей в образцах раковых опухолевых клеток и в клетках микроокружения опухоли [53,55]. Концентрационная чувствительность иммуно-МАЛДИ подхода составляет около 10^{-11} М (для пептида ангиотензин I с молекулярной массой 1295,7 Да) в образцах плазмы человека [45].

В литературных источниках для подхода иммуно-МАЛДИ-МС в образцах плазмы крови удалось достичь концентрационной чувствительности для сывороточного амилоида А и циклина С на уровне 10^{-7} М, транстиретина на уровне 10^{-9} М [56,57]. Для подхода иммуно-ВЭЖХ-ММР – на уровне 10^{-11} М для аннексина А1 и А4, кальретикулина, CD44 антигена [58].

В подходе ковалентного необратимого связывания белков из исследуемых растворов в комбинации с ВЭЖХ-ММР анализом отечественному научному коллективу ИБМХ удалось достичь концентрационной чувствительности для белков БСА на уровне 10^{-14} М и бактериального цитохрома Р450 BM3 на уровне 10^{-18} М [59].

Компанией ООО «БИОЧИП-ИМБ» создано новое направление – комбинация гелевых микрочипов (биочипы) и масс-спектрометрии для детектирования биомакромолекул [60]. Гелевые микрочипы представляют собой гидрофобный субстрат, на поверхности которого организованы капли геля нанолитрового и субнанолитрового объема с иммобилизованными молекулярными зондами. Биочипы обеспечивают среду близкую к физиологическим условиям. Иммобилизация молекулярных зондов осуществляется одновременно с полимеризацией геля, что обеспечивает их равномерное распределение в объеме капли геля [60]. Научной группой профессора, д.б.н. Заседателева А.С. показано успешное применение гелевых микрочипов с иммобилизованными антителами для количественного иммуноанализа токсинов растений (рицин и вискумин) и бактерий (стафилококковый энтеротоксин В, столбнячный и дифтерийный токсины) [46]. Формирование иммуноаффинных комплексов регистрировалось методами флуоресцентной, хемилюминесцентной спектроскопии или МАЛДИ масс-спектрометрии непосредственно с гелевых сенсорных элементов. Концентрационная чувствительность подхода комбинации трехмерного гелевого микрочипа и МАЛДИ-МС анализа для стафилококкового энтеротоксина В составила на уровне 1000 нг/мл (или ~30 нМ) [46].

Перспективным для практического применения является подход, предложенный в настоящей диссертации, который основан на использовании атомарно-ровных чипов с функционализированной поверхностью для концентрирования целевых белков в количестве достаточном для последующего масс-спектрометрического анализа. При таком подходе чипы для нанотехнологических устройств могут рассматриваться в качестве аффинного реагента, а нанотехнологический детектор – в качестве контроля качества эффективности функционализации поверхности чипа и формирования аффинных комплексов (рисунок 2) [7,9]*. Применение атомно-силового микроскопа в области биологических исследований подробно описано в следующем разделе.

Рисунок 2. – Схема комбинации атомно-силовой микроскопии и масс-спектрометрии для высокочувствительного детектирования белков в биообразце («АСМ/МС» подход).

АСМ/МС подход согласно статьям зарубежных научных коллективов, направлен на характеризацию геометрии биологических объектов на суборганелльном уровне и идентификацию белков, локализованных в таких объектах. Так, в 2014 году научный коллектив факультета биологических наук Папского католического университета (Чили) опубликовал исследование, посвященное комбинации атомно-силовой микроскопии и масс-спектрометрии для структурной характеризации липидных рафтов и идентификации белков в составе плазмодесм [61]. Липидные рафты представляют собой участки, или микродомены, плазматической мембраны, обогащённые гликосфинголипидами и холестерином. Такие микродомены участвуют в регуляции клеточных процессов и перемещении мембранных белков [62]. В исследовании фракции растительных везикул было показано, что атомно-силовая микроскопия высокого разрешения (~0,1 нм) позволяет визуализировать липидные рафты, а масс-спектрометрический анализ – идентифицировать визуализированные мембранные белки [61].

В этом же году (2014) Эллисон Уатид и Пол Парк опубликовали подробный научный обзор, характеризующий возможности применения атомно-силовой микроскопии для изучения изменения структуры единичных мембранных белков в результате взаимодействия с лигандами [63]. Авторы отмечают, что атомно-силовая микроскопия относится к технологии, в которой исследуемый образец должен быть иммобилизован на твердой подложке – чипе для атомно-силового микроскопа.

Эллисон Уатид и Пол Парк в научном обзоре обобщили возможности АСМ для исследования структуры единичных комплексов мембранный белок/лиганд и изменения трехмерной структуры мембранных белков в результате формирования биоспецифических комплексов в условиях близких к физиологическим [63]. В таблице 2 перечислены некоторые типы мембранных белков, которые ранее успешно были исследованы с применением методов АСМ.

Таблица 2. Атомно-силовая микроскопия в детектировании белков (адаптировано их источника [63]).

Мембранный белок (происхождение)	**Биологический объект**	**Лиганд**	**Тип белка**	**Источник**
Визуализация мембранных белков				
Интегрин $\alpha_{IIb}\beta_3$ (человек)	Липидный бислой	Фибриноген	Белок адгезии	[64]
Рецептор P2X4 (крыса)	Липидный бислой	АТФ	Лиганд-зависимые ионные каналы	[65]
OmpF (кишечная палочка)	Липидный бислой	Протон	Порины	[66]
Исследование диссоциации комплексов белок-лиганд				
CD44 (человек)	Клетки колоректального рака, липидный бислой	Фибриноген P-селектин	Белок адгезии	[67]
Рецептор TGF-β (человек)	HEK293 клетки	TGF-β1	Киназный рецептор	[68]
Исследование денатурации белка				
β2-адренергический рецептор (человек)	Липидный бислой	адреналин альпренолол	Рецепторы, связанные с G-белком	[69]
Родопсин (мышь)	Мембраны	11-цис-ретиналь		[70]

Таким образом, современный исследователь располагает разнообразными технологическими подходами для концентрирования исследуемых белков и/или понижения динамического концентрационного диапазона белков в многокомпонентных образцах биологического происхождения. Каждый подход

применим с ограничениями, которые освещены в настоящем разделе. Перспективным для селективного анализа исследуемых белков представляется использование чипов с функционализированной поверхностью для атомно-силового микроскопа. Разрешающая способность атомно-силового микроскопа позволяет оценить эффективность формирования белковых комплексов на поверхности чипа, проводить их визуализацию и подсчет. Возможности применения методов атомно-силовой микроскопии в детектировании биологических молекул описаны в следующем разделе литературного обзора.

1.3 Атомно-силовая микроскопия в детектировании биологических молекул

Начиная с 90-х гг. XX века активное развитие получили методы атомно-силовой микроскопии (АСМ) в области детектирования биологических молекул. На сегодня АСМ применяется для детектирования и визуализации как «больших» молекул – ДНК (200 кДа и более), белковые комплексы (100 кДа и более), надмолекулярные структуры – мембранные белки с участками мембраны, так и относительно небольших – среднеразмерные белки (более 30 кДа). Для детектирования биомолекул в технологиях АСМ используются атомарно-ровные подложки, или чипы. Сканирование с использованием кантилевера поверхности чипа предоставляет исследователю информацию о топологии поверхности, размерах биологических объектов, а также об их количестве. Наиболее популярными чипами, в методах атомно-силовой микроскопии является атомарно-ровная слюда [71]. Выбор способа подготовки поверхности чипа является важным этапом для последующего эффективного фишинга и визуализации биологических молекул [72].

В ранних работах, посвященных созданию методов детектирования биомолекул с помощью АСМ, в качестве объекта исследования выступали молекулы ДНК. В работе Бустаманта 1992 года показана эффективная сорбция кольцевых структур плазмидной ДНК (*E.Coli*) размером 3000 пар оснований на поверхности АСМ-чипа (материал слюда). Сканирование в воздушной среде с

использованием кантилевера с радиусом кривизны 10 нм позволил получить разрешение для топологии поверхности на уровне 5-10 нм, и определить размеры кольцевой ДНК, которые составили 940 нм (длина) × 12 нм (ширина) × 1 нм (высота) [73].

В том же году (1992), в работах Весенка и Гарция было показано повышение эффективности сорбции кольцевой и линейной структуры ДНК на поверхности слюды в присутствии двухвалентных катионов магния и платины [74,75]. Данный эффект авторы объясняют тем, что молекулы ДНК несут выраженный отрицательный заряд, а присутствие в инкубационном растворе положительно заряженных катионов повышает сродство биомолекул с поверхностью [72]. Сорбция, как способ фишинга биомолекул на поверхность чипа, обладает очевидными достоинствами (простота подготовки поверхности, производительность анализа и дешевизна) и недостатками (сложность, а зачастую и невозможность проведения процедуры отмывки поверхности после сорбции от контаминантных объектов – кристаллы соли, пылевые частицы и проч.).

В 2000-х годах в дополнении к сорбции стали развиваться методы, которые обеспечивают концентрирование биомолекул на поверхности чипов для атомно-силового микроскопа, функционализированных посредством химических агентов.

Так, в серии публикаций Шляхтенко Л.С. и соавт. представлены протоколы функционализации поверхности с применением 3-аминопропилтриэтоксисилана (АПТЭС) с формированием на поверхности активных аминогрупп (рисунок 3) [72,76].

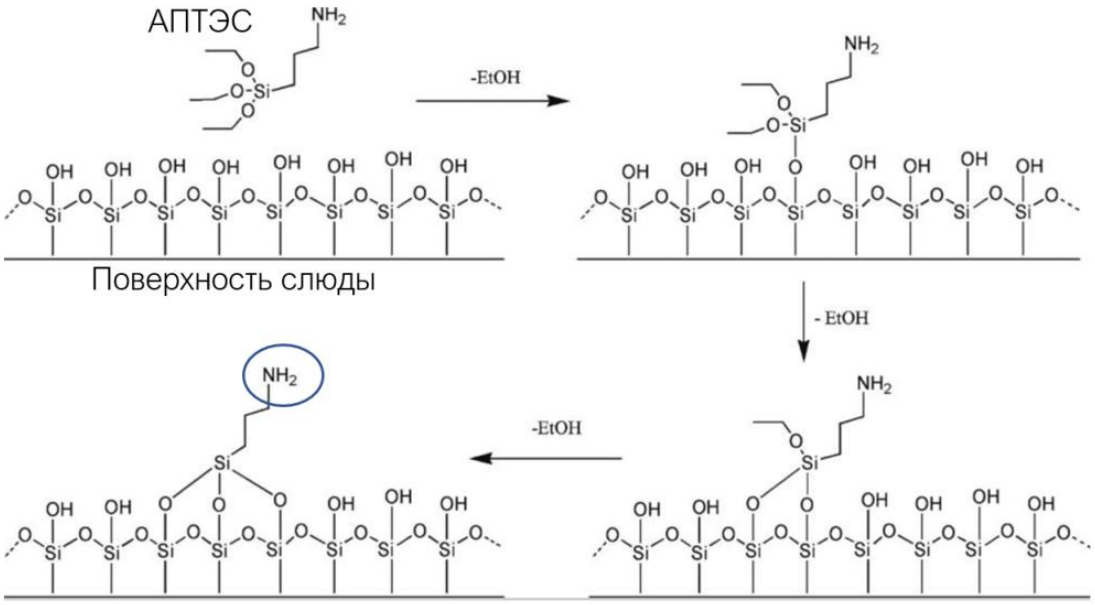


Рисунок 3. – Схема функционализации свежесколотой поверхности слюды. АПТЭС реагирует с гидроксильными группами на поверхности слюды, образующимися спонтанно после скалывания слюды. Результатом функционализации поверхности является формирование на поверхности аминогрупп. Рисунок адаптирован из [72].

На рисунке 4 представлен другой химический агент для функционализации поверхности 1-(3-аминопропил)силатран (АПС), который также популярен в научных исследованиях. В отличие от силанов, АПС менее реакционноспособен и более устойчив к гидролизу и полимеризации при нейтральных значениях *pH* [77]. Медленный гидролиз силатрановой части обеспечивает однородную модификацию поверхности аминогруппами.

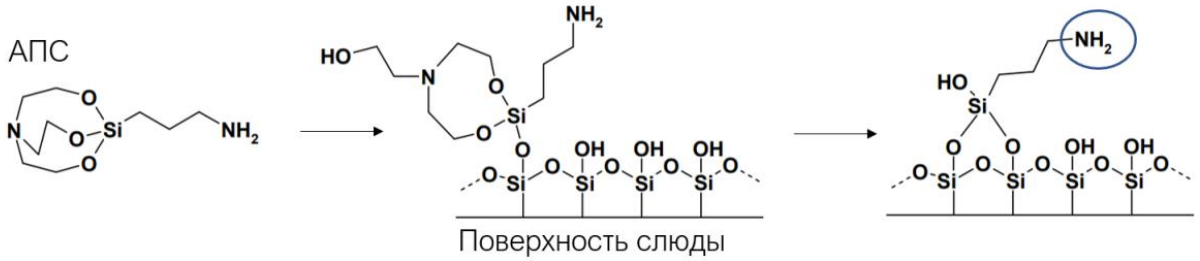


Рисунок 4. – Схема функционализации свежесколотой поверхности слюды. АПС реагирует с гидроксильными группами на поверхности слюды, образующимися спонтанно после скалывания слюды. На поверхности формируется аддукт, который в результате гидролиза превращается стабильную форму со свободной аминогруппой. Рисунок адаптирован из [77].

В описанных выше способах функционализация поверхности обеспечивает ковалентное связывание молекул белка, то есть реализуется процедура химического фишинга. При образовании ковалентной связи осуществляется реакция дегидратации между свободной карбоксильной группой молекулы белка и аминогруппой на поверхности чипа с формированием амидной связи.

Для задач иммуноселективного концентрирования целевых молекул белка поверхность чипа может быть функционализирована молекулярными зондами, что обеспечивает возможность реализации биоспецифического фишинга. В качестве молекулярных зондов применяются антитела, белки/партнеры, участки ДНК (аптамеры), специфичные по отношению к целевому белку. Иммобилизация молекулярных зондов проводится за счет ковалентного связывания с поверхностью, функционализированной по вышеуказанным схемам (рисунки 3 и 4).

В отличии от подходов концентрирования биомолекул с использованием развитых поверхностей (нано- и микроразмерные сферы, хроматографические колонки), использование плоских чипов позволяет проводить детектирование эффективности иммобилизации биомолекул с использованием методов атомно-силовой микроскопии [78]. Атомно-силовая микроскопия (АСМ) предоставляет возможность визуализировать и подсчитывать биологические объекты на поверхности чипа.

Атомно-силовая микроскопия сверхвысокого разрешения (0,1 нм и ниже) в режиме высокоскоростного сканирования обеспечивает исследователя информацией об архитектуре единичных биомолекул с высоким пространственно-временным разрешением [79]. Методы АСМ анализа развиваются в направлении анализа «тонких» конформационных изменений отдельной молекулы в ходе каталитического цикла, пространственного разрешения аминокислотных остатков [79]. В подтверждении вышесказанному целесообразно проиллюстрировать возможности АСМ в детектировании биомолекул разной природы, геометрии и размеров (таблица 3).

По данным АСМ анализа высота небольшого белка авидина (17 кДа) по сравнению с бинарным (P450cam/PdR, 47/95 кДа) и тройным (PdR/Pd/P450cam, 95/23/47 кДа) белковым комплексом в три и почти в шесть раз меньше, соответственно. С другой стороны, крупный объект – двухцепочечная плазмидная ДНК с молекулярным весом более 190 кДа по высоте (около 3 нм) соразмерна со средними по молекулярному весу белками. В этом случае, наблюдаемое явление может объясняться формой объекта в виде кольца (тор). На поверхности чипа плазмида ориентирована параллельно плоскости поверхности.

Белки с небольшим молекулярным весом (10-18 кДа), склонные к олигомеризации, формируют на поверхности чипа фибриллярные структуры высотой 3-10 нм в зависимости от числа мономеров в составе протофибрилл.

Таблица 3. Примеры применения АСМ для визуализации биологических молекул.

Объект	**Природа**	**Происхож-дение**	**Мол. вес, кДа**	**Геометрия молекулы**	**Высота объекта, нм***	**Источник**
авидин	белок	*pullum*	17	глобула	1,6±0,2	[80]
гистон H2A	белок	*human*	15	глобула	3,0±0,4	[80]
плазмида двухцепочечная	ДНК	синтетический	198	плазмида	3,0±0,2	[80]
анти-gp120	антитело	*mus*	150	глобула	<10	[81]
gp120/ анти-gp120	белок/ аптамер	*HIV-1*/ синтетический	120/23	глобула	1,6±0,1	[81]
gp120/ анти-gp120	белок/ антитело	*HIV-1*/ антитело	120/150	глобула	2,5±0,2	[81]
P450cam	белок	*Escherichia coli*	47	глобула	2,6±0,3	[82]
Путидаредоксин (Pd)	белок	*Escherichia coli*	23	глобула	2,0±0,3	[82]
Путидаредоксин-редуктаза (PdR)	белок	*Escherichia coli*	95	глобула	2,8±0,3	[82]
Pd/PdR	белок / белок	*Escherichia coli*	23/95	глобула	4,9±0,3	[82]
P450cam/PdR	белок / белок	*Escherichia coli*	47/95	глобула	5,1±0,3	[82]
PdR/Pd/P450cam	белок / белок / белок	*Escherichia coli*	95/23/47	глобула	9,1±0,3	[82]
CYP102A1 (мономер)	белок	*Bacillus megaterium*	118	глобула	2,2±0,1	[83]
CYP102A1 (олигомер)	белок	*Bacillus megaterium*	118	глобула	3,4±0,7	[83]
MinE (олигомер)	белок	*Escherichia coli*	10	фибрилла	2,6±0,3 и 4,0±0,3	[84]
β-лактоглобулин (олигомер)	белок	*caprae*	18	фибрилла	4,0±0,5	[85]
Aβ(1–42)	пептид	синтетический	4,5	фибрилла	~5	[86]
α-синуклеин (олигомер)	белок	*human*	14	фибрилла	10,0±1,1	[87]

*высота объектов по данным АСМ анализа с указанием величин стандартного отклонения.

Таким образом, в последние три десятилетия наблюдается развитие методов атомно-силовой микроскопии для решения биологических задач – детектирования биологических макромолекул, изучения их архитектуры и повышения сродства молекул с поверхностью. Важным аспектом в области прикладных исследований стало развитие методов АСМ для детектирования иммуноаффинных комплексов

(белок/антитело, белок/партнер) в условиях близких к нативным. На сегодня рутинными методами определения трехмерной конформации белков и белковых комплексов являются криоэлектронная микроскопия (крио-ЭМ) и рентгеноструктурный анализ (РСА). Данные методы предоставляют сведения о структуре белка на основе усреднения измерений для больших ансамблей молекул в составе кристалла и/или изображений при криогенной температуре [79]. В то время как конформация отдельных молекул в физиологических условиях динамична. В условиях клетки белки даже с высокой термодинамической стабильностью находятся в равновесии между нативным состоянием и небольшой долей развернутых состояний. Другим примером является «жизненный» цикл фермента в ходе каталитического превращения, в котором конформация белка изменяется в момент связывания субстрата, образования продукта. АСМ позволяет исследовать свойства отдельного биологического объекта в условиях близких к естественным, а именно при температуре окружающей среды, атмосферном давлении, в физиологическом буфере или в мембранах [79]. Дальнейшее развитие технологий АСМ по пути повышения разрешающей способности вплоть до атомарного и высокой скорости сканирования позволит конкурировать с методами крио-ЭМ и РСА.

1.4 Масс-спектрометрический анализ для идентификации биологических молекул в биосенсорных технологиях

В последние два десятилетия активное развитие получили микрофлюидные и «чиповые» технологии для массивов сенсорных зон [88–90]. Аналитические методы, основанные на нанотехнологических системах, характеризуются высокой чувствительностью (10^{-12} М и ниже) и быстродействием в формате многопараметрического анализа [91]. Такие методы позволяют не только эффективно детектировать белки с низким содержанием в биологическом образце, но и выявлять биоспецифические взаимодействия в режиме реального времени, проводить оценку кинетических и термодинамических параметров таких

взаимодействий, а также измерять физико-химические свойства отдельных белков, в том числе активность, эластичность, силу межбелковых и белок-ДНК взаимодействий.

1.4.1 Оптические биосенсоры в протеомике

В технологиях оптических биосенсоров в качестве сенсорных поверхностей используются структуры поверхностного плазмонного резонанса, резонансные зеркала, оптические фотонные кристаллы и кольцевые резонаторы [91]. Привлекательным недорогим типом оптических биосенсоров являются также системы детектирования биологических объектов с использованием специально подготовленных поверхностей компакт-диска BioCD [92].

Поверхностный плазмонный резонанс и резонансные зеркала в комбинации с масс-спектрометрическим анализом

Оптические плоские чипы для поверхностно-плазмонного резонансного (ППР) и резонансного зеркального (РЗ) биосенсоров получили широкое применение в протеомике [93]. Производством оптических биосенсоров занимаются свыше 20 коммерческих компаний, в том числе HVD (BIAcore), Affinity Sensors (Thermo BioAnalysis Corporation), Texas Instruments, Bio-Rad, EcoChemie, NipponLaser & Electronics и др. [94]. Предел концентрационной чувствительности белков в системах ППР и РЗ составляет для отдельных белков 10^{-8}–10^{-11} М [95]. Причинами ограничений концентрационной чувствительности является низкое сродство белков-партнеров, перекрестная специфичность, стерические ограничения доступности сайта связывания после иммобилизации белка [96]. Наиболее высокая концентрационная чувствительность была достигнута в детектировании интерферон-γ человека (молекулярный вес 19,3 кДа) на уровне 10^{-11} М [95]. Для РЗ биосенсора (IAsys^{+}) была достигнута концентрационная чувствительность для поверхностного антигена вирусного гепатита В (HBsAg, молекулярный вес 25,5 кДа) на уровне 10^{-9} М и антикардиотропонина (молекулярный вес 150 кДа) на уровне 10^{-10} М [91].

Несмотря на то, что оптические биосенсоры представляют собой устройства, позволяющие детектировать белковые молекулы без использования меток, в некоторых подходах для достижения более высокой концентрационной чувствительности применяются метки – вторичные антитела, в том числе конъюгированные с коллоидными частицами золота, авидин-биотинилирование [97].

В литературных данных присутствуют примеры интеграции анализа биоспецифического взаимодействия на основе поверхностного плазмонного резонанса и масс-спектрометрической идентификации для характеристики событий комплексообразования и возможности идентификации молекул-партнеров [98].

Автоматизированная система Biacore 3000 оснащена проточными кюветами с сенсорной поверхностью. Каждая проточная кювета содержит сенсорную поверхность площадью около 1 мм^2. Типичный эксперимент по выявлению лиганда осуществляется путем иммобилизации белка-партнера на сенсорной поверхности с последующей инкубацией в растворе аналита (лиганда). После формирования биоспецифических комплексов проточная кювета промывается буфером, элюированный раствор с лигандом подается на мишень для МАЛДИ-МС анализа или в виалу для ВЭЖХ-МС/МС анализа [99]. Такой анализ может применяться для качественной и количественной оценки содержания лиганда в исследуемом образце. Кроме того, белковые компоненты могут быть гидролизованы непосредственно на сенсорной поверхности для последующего масс-спектрометрического анализа. Примером интеграции ППР и МС является эксперимент по детектированию кальмодулина (молекулярный вес 17 кДа) при биоспецифическом взаимодействии с легкой цепью миозин-киназы в экстрактах мозга. Количество выявленного кальмодулина в проточной кювете составило около 300 фемтомоль, что соответствует молярной концентрации на уровне 10^{-9} М, то есть в количестве достаточном для последующей МАЛДИ-МС идентификации [99].

Оптико-сенсорные биосенсоры на основе компакт-диска в комбинации с масс-спектрометрическим анализом

Создание недорогих и простых в эксплуатации аналитических систем регистрации белков является флагманским направлением развития протеомных подходов. Одним из возможных решений по удешевлению производства анализатора является адаптация для проведения аналитических измерений недорогих CD- или DVD-ROM [100]. Привлекательным в данном типе биосенсоров является использование в качестве чипов компакт-дисков, на поверхности которых иммобилизованы молекулярные зонды.

В настоящее время проводятся исследования в направлении адаптации считывателей компакт-дисков (CD), так и самих CD для регистрации белок-белковых взаимодействий. Для регистрации белков на поверхности CD в научной литературе представлены варианты «*laser-based*» детектора: (1) модифицированные [100] и (2) немодифицированные CD-ROM [92,100]. В качестве чипов в таких оптических системах используют:

(а) специально сконструированные компакт-диски, например, bioCD на базе кремниевых пластин или дисков, изготовленных из диэлектрика с напыленными на поверхность золотыми структурами. Регистрация сигнала с сенсорной поверхности диска осуществляется посредством специальных аналитических считывателей [101];

(б) стандартные компакт-диски для CD-ROM с иммобилизованными на сенсорной поверхности молекулярными зондами, как было продемонстрировано в работах [102,103].

В работах нескольких исследовательских групп была показана принципиальная возможность регистрации белков в системе стандартный CD-ROM и компакт-диск [102,104]. Был достигнут предел концентрационной чувствительности на уровне 10^{-12} М для белковой пары биотин/стрептавидин ($Kd=10^{-14}$ М) с иммобилизованным биотином на поверхности сенсорной зоны CD, и около 10^{-6} М для белковой пары α-маннозид/конкавалин А ($Kd=10^{-4}$ М) [105].

В работе Юньчао Ли и соавторов отмечается, что концентрационная чувствительность детектирования биомолекул размером менее 10 нм, в том числе белков, в случае применения стандартного устройства CD-ROM (λ=780 нм) недостаточна [103]. В связи с этим, авторы рекомендуют проводить регистрацию белков путем усиления сигнала посредством автометаллографии. Применение метода автометаллографии заключается в том, что целевой белок ковалентно иммобилизуется на поверхности наноразмерных частиц золота. Процедура восстановительной преципитации серебра на золотых частицах приводит к значительному увеличению размеров регистрируемых частиц до 200 нм. Для сравнения размер глобулярного белка с молекулярным весом около 50 кДа по данным АСМ составляет около 1,5-2 нм [106]*. Авторам удалось достичь концентрационной чувствительности для пары биотин/стрептавидин на уровне 10^{-12} М. Для анализа результатов измерений авторы использовали стандартное программное обеспечение, которое осуществляет регистрацию числа ошибок и представляет результат измерения в графическом виде [103].

К основным компонентам оптического считывающего устройства (ОСУ) в приводе *CD/DVD/Blu-ray* относятся лазер с длиной волны 780, 650 и 405 нм, дифракционно-ограниченная оптика, оптоэлектронный преобразователь с широким диапазоном частот до 400 МГц и наноразрешением по x-, z-осям и привод наклона. ОСУ могут применяться для считывания массива биомаркеров в цитометрическом анализе, визуализации, биоспецифическом анализе молекул ДНК и других биомакромолекул [107].

Биосенсоры типа «лаборатория-на-диске» (от англ. «*Lab-on-a-Disc*») привлекательны для проведения высокопроизводительного анализа биоспецифических взаимодействий между белками, нуклеиновыми кислотами и другими биологическими молекулами. Биосенсоры типа «*Lab-on-a-Disc*» представляют собой центробежные микрофлюидные устройства. Двигатель, приводящий в движение компакт-диск, создает на поверхности диска несколько сил разного направления [108]:

– центробежную силу, которая создает градиент силы, влияющий на жидкости в радиальных положениях;

– силу Кориолиса, которая позволяет управлять перемещением жидкости в зависимости от направления движения;

– силу Эйлера, которая формирует турбулентность во время перемешивания жидкости (рисунок 5).

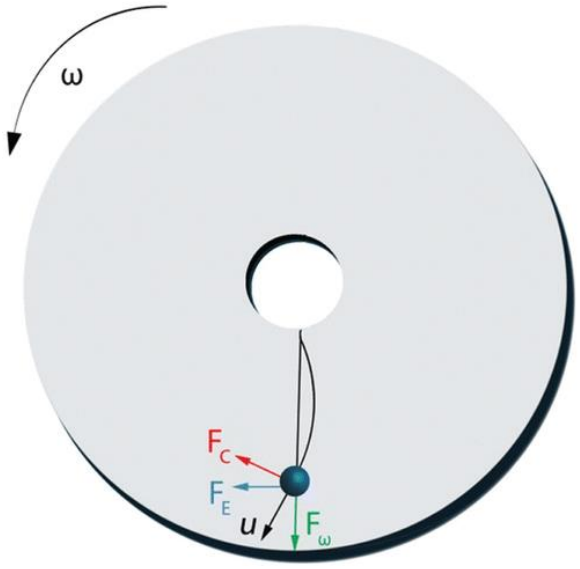


Рисунок 5. – Схема сил, действующих на компакт-диск при его вращении. F_ω – центробежная сила; F_E – сила Эйлера перпендикулярна центробежной силе; и F_C – сила Кориолиса перпендикулярна скорости. Синяя точка – жидкость на поверхности диска. ω – направление вращения диска. Рисунок адаптирован из [108].

В работе Джеффри Эриксона и Фрэнсиса Лиглера, озвучена принципиальная возможность интеграции микрожидкостных структур на поверхности компакт-диска [109]. Исследователи показали, что центробежная сила может быть использована для перемещения жидкости через каналы и ячейки сенсорной зоны во вращающемся диске. Для этого предложено формирование методами литографии или тиснения прозрачного слоя на поверхности диска, который содержит микрофлюидные каналы, ячейки с буфером и лиофилизированными реагентами. Авторы предположили, что поверхности, образующие микрофлюидные каналы и ячейки, должны быть изготовлены из материалов с одинаковым показателем преломления. В свою очередь, удаление жидкого слоя в

процессе вращения должно осуществляться без повреждения поверхности сенсорных зон диска [109].

Таблица 4. Примеры применения оптических биосенсоров для детектирования белков. Адаптировано из источника [110].

Аналит	**Метод**	**Время анализа, мин**	**Концентрационная чувствительность, М**	**Состав исследуемого образца**	**Источник**
Белок вируса лихорадки денге NS1	Оптомагнитный сигнал Blu-ray	8	$0{,}3\times10^{-12}$	Сыворотка крови: 6 мкл	[111]
Тромбин	Оптомагнитный сигнал Blu-ray	15	25×10^{-12}	Аналит в калий-фосфатном буфере	[112]
С-реактивный белок	Оптомагнитный сигнал Blu-ray	14	$1{,}2\times10^{-6}$	Разбавленный образец крови: 35 мкл	[113]
IgG	Поверхностно-плазмонный резонанс	60	$1{,}7\times10^{-6}$	Аналит в калий-фосфатном буфере	[114]

На сегодня практически отсутствуют литературные данные о комбинации биосенсора типа «*Lab-on-a-Disc*» и масс-спектрометра для детектирования и идентификации целевых белков.

Таким образом, компакт-диски также являются чипами с функционализированной поверхностью, на поверхности которых могут быть сконцентрированы молекулы белка из раствора аналита. В соответствии с результатами, приведенными в таблице 4, белки могут быть зарегистрированы в диапазоне концентраций от микромолярной до пикомолярной, что позволяет впоследствии провести их масс-спектрометрическую идентификацию.

Оптические биосенсоры типа «*Lab-on-a-Disc*» характеризуются низкой стоимостью производства, возможностью одновременного скрининга нескольких аналитов или образцов на одном чипе. В связи с тем, что для функционирования ОСУ не требуется аппаратного или программного усовершенствования,

биосенсоры могут быть привлекательны для создания быстрой, недорогой и высокопроизводительной биомедицинской диагностики [103,115].

1.4.2 Нанопроволочные биосенсоры в протеомике

Перспективным для лабораторной и в дальнейшем для клинической практики является использование нанопроволочных биосенсоров [116]. Преимуществами таких биосенсоров являются высокая чувствительность (менее 10^{-15} М) [116], возможность регистрации белков и нуклеиновых кислот в режиме реального времени без использования специальных меток, а также возможность миниатюризации устройств за счет интеграции с микрофлюидными инкубационными ячейками [117*]. Нанопроволочные биосенсоры (НП-БС) характеризуются уникальными структурными и химическими свойствами сенсорных элементов, в том числе:

– размер сенсорных элементов сопоставим с диаметром регистрируемого объекта (белок);

– высокое отношение поверхности к объему [118];

– пространственное разделение сенсорных элементов [119];

– отсутствие предела концентрационной чувствительности, биосенсор может быть отнесен к группе детекторов единичных молекул;

– возможность проведения многопараметрического анализа.

Сенсорный элемент для НП-БС является вариантом нанопроволочного полевого транзистора, который включает затвор, исток и сток [120]. В качестве затвора между истоком и стоком выступает тонкий изолирующий слой из оксида кремния, который обеспечивает колебания электрического потенциала и изменение проводимости между истоком и стоком [121]. Изменение электрического потенциала возникает в ответ на приложение внешнего напряжения. Адсорбция заряженных химических и биологических молекул на поверхности сенсорного элемента приводит к изменению его потенциала, и как следствие, проводимости [120]. Данный эффект был описан еще в 1972 году в научной работе профессора Бергвельда (Университет Твенте, Нидерланды) [122].

Современные НП-БС позволяют регистрировать молекулы ДНК и белков на уровне фемтомолярных [123,124] и даже субфемтомолярных концентраций [116].

Для направленной регистрации молекулярных маркеров заболеваний поверхность нанопроволочных сенсорных элементов может быть функционализирована молекулярными зондами. Организация на одном чипе массива сенсорных зон с иммобилизованными молекулами-зондами, специфичными к различным типам биомолекул, обусловливает другое преимущество использования НП-БС – возможность проведения мультипараметрического анализа, то есть регистрации нескольких десятков целевых биомолекул в одном анализе. Таким образом, НП-БС обеспечивает возможность:

– высокочувствительной регистрации целевых молекул без использования меток;

– одновременной экспресс-диагностики сочетанных или близких по этиологии заболеваний (таблица 5).

В таблице 5 обобщены данные по регистрации биомолекул с использованием НП-БС в зависимости от геометрических размеров сенсорных элементов (нанопроволока) и типа электронной проводимости. Нанопроволока n-типа характеризуется примесной природой, в качестве примесного элемента выступает мышьяк, при этом носителями отрицательного заряда являются электроны. Нанопроволока p-типа содержит индий с положительным зарядом носителей. Как видно из таблицы 5, высокая концентрационная чувствительность была достигнута для нанопроволоки n-типа с толщиной менее 40 нм в регистрации простатического специфического антигена на уровне десятков зептомолей. Также показана чувствительность на уровне единичных вирусных частиц вируса гриппа А при использовании нанопроволоки p-типа с диаметром 20 нм [125].

Таблица 5. Примеры применения НП-БС для детектирования. Адаптировано из [125].

Тип НП-БС, размеры сенсорной зоны	**Тип взаимодействия**	**Мишень**	**Концентрационная чувствительность, М**
КНИ* p-типа, 20 нм	Биотин-авидин	Стрептавидин	10×10^{-12}
КНИ n-типа, КНН p-типа, 20 нм	Антитело-антиген	ПСА**, СЭА3*	2×10^{-15} (для ПСА), $0{,}55\times10^{-15}$ (для СЭА)
КНИ p-типа, диаметр 20 нм; КНН p-типа, 20 нм	РНК-ДНК гибридизация	ДНК	10^{-14}
КНИ p-типа, 20 нм	Антитело-вирус	Вирус гриппа А	Отдельная вирусная частица
КНИ n-типа, КНН p-типа, толщина 40 нм, ширина 50-150 нм	Биотин-авидин	Стрептавидин	10^{-14}
КНИ n-типа, p-типа, толщина 40 нм, ширина 50–-50 нм	Антитело-антиген	ПСА	$8{,}6\times10^{-14}$
КНИ n-типа, p-типа, толщина 20 нм, ширина 30 нм	ДНК-ДНК-гибридизация	ДНК	10×10^{-12}
КНИ n-типа, p-типа, ширина 50 нм, длина 20 нм	ДНК-ДНК-гибридизация	ДНК	$2{,}5\times10^{-11}$
КНИ n-типа, ≤40 нм	Антитело-антиген	ПСА	3×10^{-20}
КНИ p-типа, 30–60 нм	Белок-белок	Тропонин I	7×10^{-12}
КНИ n-типа, ширина 50 нм, толщина 60 нм, длина 100 нм	РНК-ДНК гибридизация	ДНК	10^{-14}
КНИ n-типа, ширина 50 нм, толщина 60 нм, длина 100 нм	РНК-ДНК гибридизация	Продукт ОТ-ПЦР	10^{-14}
КНИ n-типа, ширина 50 нм, толщина 60 нм, длина 100 нм	РНК-ДНК гибридизация	микроРНК	10^{-15}

КНИ* – кремний-на-изоляторе, ПСА** – простатический специфический антиген, СЭА3* – карциноэмбриональный антиген

Чип для НП-БС также может рассматриваться в качестве сенсорного элемента с функционализированной поверхностью для селективного концентрирования биологических молекул и их последующей регистрации. Согласно

представленным в таблице 5 данным, концентрационный диапазон детектирования биомолекул с использованием НП-БС составляет 10^{-11} М и ниже, что соответствует области низко- и ультранизкокопийных белков (ПСА, СЭА, стрептавидин).

Таким образом, в последние годы активное развитие получили белковые чипы. Технологии белковых чипов развиваются в направлении миниатюризации, экономичности потребления реагентов и молекулярных зондов, дизайна поверхностей с массивом сенсорных зон для проведения многопараметрического анализа. Сформировалась отдельная область протеомного анализа с использованием плоских чипов, пригодных для спектроскопического детектирования [78]. Поверхность таких чипов может быть функционализирована посредством химических агентов или иммобилизованных молекулярных зондов (антитела или аптамеры). В последнем случае специально подготовленная поверхность обеспечивает селективное концентрирование целевых молекул белка на поверхности сенсорных зон, при этом детектирование белков осуществляется с использованием нанотехнологических устройств.

На сегодня единственным подходом, обеспечивающим однозначную идентификацию зарегистрированных объектов, является масс-спектрометрия. Важно развитие масс-спектрометрических методов валидации результатов измерений, выполненных с использованием нанотехнологических устройств. Особенное значение развитие методов валидации представляется для детектирования белков в образцах биологического происхождения, для которых характерен высокий динамический концентрационный диапазон содержания белков. В литературных данных область сопряжения нанотехнологических устройств и масс-спектрометрического детектирования представлена лишь небольшим числом исследований. До сих пор такая интеграция подходов не получила должного развития. Авторы исследований не приводят обоснования эффектов концентрирования на специально подготовленных поверхностях, не определяют концентрационные диапазоны успешной интеграции таких ортогональных подходов – нанотехнологических устройств, с одной стороны, и масс-спектрометрических детекторов – с другой.

1.5 Детектирование молекулярных маркеров заболеваний в образцах крови

Как было показано в разделе 1.1, биологические образцы, в том числе образцы крови, характеризуются широким динамическим диапазоном содержания белков, что является препятствием для детектирования белков в низких концентрациях. Возможность внедрения в клиническую практику методов ранней диагностики заболеваний требует развития подходов эффективного детектирования кандидатных белковых маркеров в низких концентрациях в образцах биологического происхождения. Далее мы рассмотрим примеры детектирования биологических молекул в образцах крови с концентрацией 10^{-11} М и ниже.

Иммуноферментный анализ (ИФА) является важным методом детектирования белковых маркеров, успешно применяемый в клинической практике [126]. Как уже упоминалось выше, предел концентрационной чувствительности данного метода составляет около 10^{-10} М [127], а для отдельных белков – 10^{-14} М [128–130]. Результаты данных ИФА регистрации белков согласуются с данными, полученными методом направленной масс-спектрометрии [131]. ИФА позволяет проводить одновременный анализ относительного большого числа аналитов – нескольких десятков целевых белков [132]. Эти показатели ИФА зависят от качества используемых пар антител против двух эпитопов целевого белка (так называемый метод двойного узнавания). Процедуры получения двух типов антител – селекция, циклическая иммунизация и очистка являются дорогостоящими и продолжительными [133]. Тест-панели для ИФА такие, как *XMap-Luminex* позволяют проводить мультиплексный анализ до 100 целевых аналитов [134]. *XMap-Luminex* представляет собой комплексное приборное решение для скрининга биомаркеров и анализа белков, которое включает:

– ИФА-тест на основе магнитных флуоресцентно-меченых частиц xMAP, функционализированных молекулярными зондами;

– проточный цитофлуориметрический анализатор;

– программное обеспечение для обработки данных мультиплексного ИФА-анализа [134].

Комплекс *XMap-Luminex* применяется для детектирования молекулярных компонентов, сопровождающих метаболические заболевания, нарушения иммунологических процессов, нейродегенеративные заболевания, токсические воздействия, неопластические процессы [134].

Согласно стратегиям ИФА, в качестве молекулярных зондов могут выступать антитела или аптамеры (нуклеиновые кислоты). После инкубации в растворе аналита добавляется препарат меченых вторичных антител для связывания с целевыми белками. Именно метка в процедуре измерения обеспечивает флуоресцентный, оптический или электрохимический сигнал, который позволяет отслеживать реакцию, катализируемую меткой. Этот подход хорошо подходит для обнаружения биомаркеров некоторых онкологических заболеваний, обеспечивает возможность относительно быстрого определения ограниченных перечней биомаркеров в образцах крови с высокой точностью (таблица 6) [129]. Предел концентрационной чувствительности для отдельных белков определяется содержанием на уровне нескольких пикомолей (таблица 6) [135].

В научных исследованиях широко применяются методы тандемного масс-спектрометрического анализа (высокоэффективная жидкостная хроматография в комбинации с детектором типа ионная ловушка или орбитальная ловушка – ВЭЖХ-МС/МС и высокоэффективная жидкостная хроматография в комбинации с детектором типа тройной квадруполь – ВЭЖХ-ММР), которые обеспечивают многопараметрический высокопроизводительный анализ молекулярных компонентов в биообразцах. Технологии ВЭЖХ-МС/МС и ВЭЖХ-ММР представляются дорогостоящими, трудоемкими и технически сложными для рутинного клинического применения [129,136–138]. В настоящее время методы масс-спектрометрии широко применяются для исследовательских целей. Тем не менее, научное сообщество стремится адаптировать методические подходы ВЭЖХ-МС/МС и ВЭЖХ-ММР для клинического применения [136–139].

Наряду с масс-спектрометрическими методами технологии для оптического или электрохимического детектирования молекулярных маркеров разрабатываются в направлении высокоточных и чувствительных измерений при

низкой стоимости анализа [135]. В отличие от широкодоступных на рынке многопараметрических генетических тестов, точные, чувствительные многопараметрические методы белковой детекции все еще находятся на стадии разработки [129,140–142]. Ожидается дальнейшее развитие технологий белковых чипов в направлении повышения селективности, чувствительности и автоматизации процедур анализа. В таких технологиях применяются поверхности, которые содержат массивы сенсорных зон с иммобилизованными молекулярными зондами, специфичные по отношению к исследуемым биомаркерам.

Возможность детектирования белков в ультранизком диапазоне концентраций важна для достижения положительного терапевтического результата, определения групп лиц высокого риска развития заболевания. Поскольку образцы крови представляют собой сложные смеси белков, липидов и углеводов, то достижение высокой специфичности и чувствительности анализа является важным вызовом. С целью достижения желаемых пределов обнаружения молекулярных компонентов в биообразце целесообразно использовать амплификацию сигнала. Методами амплификации сигнала могут быть электрохимические [104,143], хемилюминесцентные [144] метки с использованием наноразмерных частиц [145,146]. Одна из основных проблем усиления сигнала заключается в том, что агент, который обеспечивает усиление сигнала, не должен перемещаться между сенсорными зонами массива, чтобы сохранить пространственное разрешение сигнала [135].

Многопараметрические методы обнаружения белков на основе флуоресценции на сегодня не нашли клинического применения и предназначены для исследовательских целей (таблица 6). В таблице 6 представлены методы, которые предназначены для детектирования клинически значимых белков – цитокинов, комплексов антиген/антитело в концентрациях, близких к физиологическим. Методы, основанные на применении беловых чипов, предназначены для обнаружения биомаркеров в образцах крови, ткани и других биологических средах. Для практического применения в рутинном биоанализе

необходимо улучшение предела концентрационной чувствительности и воспроизводимости результатов измерений.

Таким образом, с целью достижения наилучшей концентрационной чувствительности в детектировании биологических молекул перспективным является применение нанотехнологических устройств, в том числе молекулярных детекторов, теоретически не имеющих ограничений по концентрационной чувствительности.

Таблица 6. Примеры применения белковых чипов в детектировании молекулярных маркеров в образцах крови. Адаптировано из источника [135].

Технология	**Способ детектирования**	**Усиление сигнала**	**Тип анализа**	**Концентрационная чувствительность, М**	**Источник**
Микроразмерные сферы	Флуоресценция	Цикл амплификации	Сэндвич-иммуноанализ	10^{-14} для ИЛ*-6, ИЛ-8	[147]
Микроразмерные сферы (Luminex Corp)	Проточная цитометрия	Отсутствует		2×10^{-11} для перечня белков	[134]
ИФА	Флуоресценция	Отсутствует		4×10^{-11} для С-реактивного белка	[148]
Микроразмерные золотые частицы	Светорассеяние	Осаждение золотых частиц	ИФА	10^{-15} для ПСА	[149]
Массив антител	Флуоресценция	Цикл амплификации	Сэндвич-иммуноанализ	$\sim10^{-11}$ для перечня, включающего 71 цитокин	[150]
Массив антител	Флуоресценция		ИФА	10^{-15} для перечня белков	[147]
Массив антител	Флуоресценция	Отсутствует	ИФА	2×10^{-12} для перечня 115 белков	[151]
Массив нуклеиновых кислот	Оптическая	Осаждение	РНК-аптамерные микрочипы	10^{-12} для фактора роста эндотелия сосудов А	[104]
Микроразмерные золотые частицы	Оптическая	Осаждение золотых частиц	Сэндвич-иммуноанализ	$3{,}4\times10^{-14}$ для ПСА	[152]
Чип	Оптическая	Отсутствует	Биоспецифическое связывание	4×10^{-12} для белка p53	[153]

ИЛ* – интерлейкин, ПСА** – простатический специфический антиген

1.6 Масс-спектрометрические методы идентификации белков

Белки участвуют в реализации всех клеточных процессов. Характеристика белков стала важной частью современной биологии, что привело к созданию новой дисциплины – протеомики для классификации и функциональной аннотации белкового состава, закодированного геномом организма. Создание технологий белкового анализа стимулирует быстрое развитие этой области знаний [154]. Три десятилетия назад методы электрофоретического разделения белков в полиакриламидном геле (ПААГ), вестерн-блот (ВБ) и иммуноферментный анализ (ИФА) являлись столпами белкового анализа. Фотометрическая или флуоресцентная визуализация белков в этих методах осуществлялась с использованием красителей, таких как серебро или Кумасси [155].

Инновации в ионизации биологических молекул, а именно метод электроспрея (ЭСИ) [156] и матрично активированная лазерная десорбция/ионизация (МАЛДИ) [157], около 40 лет назад определили лидерство масс-спектрометрии (МС) в области протеомных исследований. Последующее стремительное развитие масс-спектрометрических методов выявило недостатки методов детектирования белков с использованием ПААГ, ВБ и ИФА. К недостаткам этих методов можно отнести сложность и многостадийность процедур: (а) подготовки анализируемого образца к проведению анализа, (б) окрашивания, а также (в) низкую концентрационную чувствительность на уровне 10^{-8} М для ПААГ и ВБ, 10^{-7}-10^{-10} М для ИФА [127,158,159] (таблица 7).

Таблица 7. Сравнение параметров аналитических систем в детектировании белков.

Параметр	**МС**	**ИФА**	**ВБ**	**Иммуно-гистохимия**
Количественный анализ	▲	▲	–	–
Число аналитов в анализе	1-100	1-40	1-5	1-5
Высокопроизводительный анализ	▲	▲	–	–
Мультиплексный анализ	▲	▲	–	–
Ложноположительные результаты детекции	–	▲	▲	▲
Посттрансляционные модификации, аминокислотные замены белка	▲	–	–	–
Концентрационная чувствительность, М	10^{-15*} [43, 160]	10^{-10} [127]	10^{-8} [159]	10^{-8} [161]

▲ − возможность реализации параметра в аналитической системе; МС – масс-спектрометрический анализ; ИФА – иммуноферментный анализ; ВБ – вестерн-блот; *для метода мониторинга множественных реакций.

На смену оптическим методам регистрации белков пришли высокопроизводительные масс-спектрометрические методы с высокой концентрационной чувствительностью, совместимые с системами фракционирования анализируемого образца и концентрирования целевых белков с последующей идентификацией (таблица 7). Как видно из таблицы 7, масс-спектрометрия обладает рядом преимуществ перед другими методами. Масс-спектрометрия обеспечивает идентификацию белка, исключая возможность ложноположительной детекции, в том числе, вследствие перекрестной специфичности аффинного узнавания. В последние годы активно развиваются направления масс-спектрометрического выявления аберрантных форм белков, обусловленных посттрансляционным модифицированием, аминокислотными заменами для решения широкого спектра медико-биологических задач [162–165]. Преимуществом масс-спектрометрии для практического применения является возможность стандартизации процедур предварительной подготовки анализируемых образцов, методов измерений и интерпретации результатов, а также высокая точность измерений [43,160,166*].

Независимо от аналитической системы дизайн масс-спектрометрического

исследования представлен следующими ключевыми этапами:

– преаналитический, который включает процедуры сбора, хранения и предварительной подготовки образцов для последующего проведения измерений;

– аналитический, который включает процедуры проведения измерений;

– постаналитический, который охватывает процедуры анализа результатов измерений. Обоснованный выбор условий и режимов проведения каждой процедуры определяют качество полученных результатов.

В последующих разделах литературного обзора представлены ключевые процедуры данных этапов в масс-спектрометрическом эксперименте.

1.7 Предварительная подготовка образца для масс-спектрометрического анализа

В постгеномную эру важной для области биомедицинских исследований стало детектирование отдельных типов биомолекул, либо набора биомолекул определенного состава и содержания в исследуемом образце. Экспериментально определенное содержание молекул в образце может варьировать в зависимости от особенностей выполнения процедур сбора, хранения и предварительной подготовки образцов, что приводит к искажению результатов измерений. Вариация режимов и условий выполнения процедур преаналитического этапа влияют на достоверность и воспроизводимость результатов измерений [166–168]. В связи с этим стандартизация процедур преаналитического этапа становится обязательным компонентом научного исследования. В преаналитическом этапе можно выделить следующие фазы.

1. Создание программы исследования, в том числе выбор групп участников в зависимости от генотипа, образа жизни, питания, принимаемой терапии, сопутствующих заболеваний, хирургических вмешательств, протоколов забора биологического материала (натощак или после приема пищи).

2. Сбор биологического материала, хранение и транспортировка. Аннотация и статистический анализ клинических данных образцов. Важными являются условия

транспортировки, соблюдение режима холодовой цепи, продолжительности хранения образцов.

3. Выполнение процедур предварительной подготовки биообразца для последующего анализа.

Интересны результаты деятельности крупного международного консорциума, объединяющего научно-производственные и исследовательские организации для реализации Проекта «*Horizon 2020 SPIDIA4P*». Основной задачей проекта является определение важных преаналитических факторов для молекулярного анализа биологических образцов, стандартизация процедур преаналитического этапа. На сегодня консорциумом разработаны и внедрены в практику 22 общеевропейских (*CEN*) и международных (*ISO*) стандартов, схемы внешней оценки качества (*EQA*) [147*,150].

1.7.1 Гидролиз биологического образца

Неотъемлемой процедурой предварительной подготовки образца для масс-спектрометрического анализа пептидных компонентов (подход «*bottom up*») является гидролиз [170]. Гидролиз может осуществляться с применением химических реагентов или протеаз. Наиболее популярным в протеомных исследованиях является сайт-направленный ферментативный гидролиз. Для этого доступно множество протеаз – трипсин, химотрипсин, LysC, GluC, ArgC, LysN и AspN. Эти ферменты отличны по специфичности, эффективности и оптимальным условиям для проведения гидролиза.

Трипсин считается «золотым стандартом» в протеомике, отличается доступностью, низкой стоимостью и высокой специфичностью [171]. Этот фермент относится к классу сериновых протеаз, который гидролизует пептидные связи, образованные осн*о*вными аминокислотными остатками лизина или аргинина с С-конца аминокислотной последовательности белка, если за этими аминокислотами не следует пролин [172]. Именно аминокислоты лизин и аргинин наиболее часто встречаются в белках человека [173]. В протеомных исследованиях используется

модифицированный трипсин, в котором аминокислотные остатки лизина метилированы. Модификация защищает молекулы фермента от автолитической деградации [172]. Наиболее эффективно гидролитическое расщепление белков в образце с участием трипсина осуществляется при температуре около 37°C, в слабощелочных условиях (pH от 7 до 8) и в присутствии катионов [174]. Оптимальное соотношение содержания фермента к субстрату в образце находится в диапазоне от 1:20 до 1:100. Трипсин гидролизует преимущественно денатурированные белки. В связи с этим трипсинолиз белков исследуемого образца обычно проводится в присутствии хаотропных веществ – мочевины или гидрохлорид гуанидина. Хаотропы необходимы для денатурации белка и перехода молекулы из состояния компактной и плотно упакованной глобулы в расплавленную. В последнем случае сайты для трипсина экспонированы на растворитель и доступны для контакта с молекулами фермента. Процедура трипсинолиза требует продолжительной инкубации для полного расщепления белка в исследуемом образце. Многие авторы рекомендуют проводить дополнительные процедуры восстановления дисульфидных связей в белках и алкилирования для стабилизации восстановленных *SH*-групп непосредственно до гидролиза, которые также приводят к потере молекулой белка жесткой и компактной укладки [175,176].

В ряде случаев целесообразно применение комбинации ферментов для увеличения покрытия аминокислотной последовательности белка пептидами. Данный подход обусловлен тем, что гидролитическое расщепление трипсином зачастую бывает неполным, с пропуском сайтов трипсинолиза. Помимо этого, как уже отмечалось выше, белки с плотной пространственной укладкой устойчивы к протеолизу [177]. Комбинация модифицированного трипсина и устойчивого к гидролизу LysC благодаря плотной трехмерной укладке позволяет нивелировать эти недостатки. [177]. Фермент LysC также является представителем сериновых протеаз, и осуществляет гидролиз пептидной связи, образованной лизином с C-конца аминокислотной последовательности белка. Фермент активен в тех же условиях, что и трипсин, то есть в слабощелочной среде (pH до 8,5) и при температуре инкубации около 37°C [177].

Применение химотрипсина и пепсина позволяет получить отличный набор пептидов по отношению к триптическим пептидам [170]. Химотрипсин является менее специфичной сериновой протеазой, осуществляющей гидролиз пептидных связей, образованных с участием гидрофобных аминокислотных остатков (фенилаланин, триптофан, тирозин и лейцин). Наиболее эффективен химотрипсин при соотношении фермента к субстрату 1:50 в слабощелочных условиях, температуре около 37°C в присутствии катионов [178].

В совместном исследовании компании Promega (США), выпускающей линейку препаратов трипсина и других гидролаз для протеомных исследований, и Кафедры медицинской биохимии и биофизики Каролинского института (Швеция) был проведен сравнительный анализ эффективности идентификации белков (ВЭЖХ-МС/МС) в экстрактах дрожжей и клеточной линии *HeLa* после гидролитического расщепления трипсином и смесью ферментов трипсин/LysC [177]. Авторы исследования получили интересные результаты. Во-первых, при инкубации экстракта общего белка дрожжей в течение ночи с трипсином более 20% сайтов гидролиза остались негидролизованными. Соотношение пропущенных сайтов гидролиза для лизина к сайтам для аргинина составило примерно 5:1. Однако, гидролиз белков с помощью смеси трипсин/LysC позволил достичь практически полного гидролитического расщепления белков в исследуемой смеси. Во-вторых, для образцов *HeLa* и дрожжей применение смеси трипсин/LysC по сравнению с трипсином позволило увеличить число белковых идентификаций на 10% и 20%, соответственно [177].

В другом исследовании, выполненном Группой биохимической протеомики Института биохимии им. Макса Планка (Германия) и Факультетом фармации Уппсальского университета (Швеция), авторы использовали смесь трех ферментов – трипсин, LysC и химотрипсин для анализа белкового состава биоптатов печени человека методом ВЭЖХ-МС/МС [179]. Авторы показали, что применение смеси трипсин/LysC по сравнению с LysC позволяет повысить число пептидных идентификаций на 18%. В свою очередь, использование смеси

трипсин/LysC/химотрипсин позволяет повысить глубину белкового анализа дополнительно в 1,5 раза [179].

Также в протеомных исследованиях применяются ферменты GluC, ArgC, LysN, AspN как самостоятельные гидролазы либо в сочетании с трипсином. Фермент GluC, выделенный из золотистого стафилококка, является сериновой протеазой, которая специфична по отношению к глутаминовой и аспарагиновой кислоте (расщепление с С-конца аминокислотной последовательности) при проведении протеолиза в фосфатном буфере, либо исключительно к глутаминовой кислоте в присутствии ацетата аммония (pH 4,0) или бикарбоната аммония (pH 7,8) [170]. Другой фермент ArgC, выделенный из *Clostridium histolyticum*, представляет собой цистеиновую сайт-специфическую эндопептидазу, осуществляющую гидролиз с С-конца полипептидной цепи пептидной связи с аргинином, реже с лизином [180]. Оптимальными для фермента является слабощелочные условия и присутствие катионов в инкубационной смеси.

Помимо использования гидролаз, сайт-специфическое расщепление белка может осуществляться с использованием химических реагентов. Наиболее распространенными химическими реагентами для расщепления пептидной связи являются разбавленные кислоты, такие как соляная кислота, муравьиная кислота и уксусная кислота, а также бромистый циан (CNBr), гидроксиламин и 2-нитро-5-тиоцианобензоат (NTCB) [171]. В условиях присутствия в инкубационной смеси разбавленных кислот белки гидролизуются преимущественно по пептидной связи с аспарагином, и в меньшей степени по другим аминокислотным остаткам [181]. NTCB специфичен по отношению к цистеину, тогда как гидроксиламиновый реагент расщепляет пептидные связи, образованные аспарагином или глицином. Как правило, химически опосредованное расщепление применяется для гидролиза пептидных связей наименее распространенных аминокислот для получения длинных пептидов [171]. В таблице 8 обобщены сведения о вышеописанных ферментах и химических реагентах, применяемых для гидролиза белков в протеомном анализе.

Таблица 8. Гидролиз белков с применением ферментов и химических реагентов. Адаптировано из [171].

Фермент/химический реагент	Происхождение	Специфичность	Диапазон pH
ArgC	*Clostridium histolyticum*	R	7,2−8,0
AspN	*Pseudomonas fragi*	D	7,0−8,0
GluC	*Staphylococcus aureus*	E	4,0-7,8
LysC	*Lysobacter enzymogenes*	K	8,5-8,8
LysN	*Lysobacter enzymogenes*	K	8,0
Trypsin	*Bos taurus*	K, R	8,0
Chymotrypsin	*Bos taurus*	F, W, Y	7,0-9,0
Циан бромистый	–	M	Кислота
Муравьиная кислота	–	D	Кислота
Соляная кислота	–	D	Кислота
2-нитро-5-тиоцианобензоат	–	C	9,0-10,0

Обозначения: R – аргинин; D – аспартат; C – цистеин; K – лизин; F – фенилаланин; W – триптофан; Y – тирозин; M – метионин.

В протеомных исследованиях важно обеспечение условий полного расщепления белка в исследуемом биологическом образце, что на практике не всегда достигается вследствие большого числа реагирующих компонентов в инкубационной среде, а также возможности образования неканонических пептидов.

Идентификация белков тканевых и клеточных лизатов требует дополнительной процедуры солюбилизации мембранных белков, которые характеризуются высокой гидрофобностью. В данной процедуре используются детергенты, в том числе додецилсульфат натрия (ДСН) и дезоксихолат натрия. В научной литературе отмечается, что присутствие в анализируемой среде ДСН оказывает негативное влияние на результаты масс-спектрометрических измерений [182]. В связи с этим в масс-спектрометрическом анализе для солюбилизации мембранных белков используются хаотропы – мочевина, гуанидин хлорид [183]. Однако применение хаотропов препятствует протеолизу [184].

Привлекательно для улучшения масс-спектрометрического анализа мембранных белков применение поверхностно-активных веществ, не

ингибирующих активность гидролаз [185]. Коммерчески доступный сурфактант «RapiGest SF» (Waters, США) улучшает солюбилизацию белков, не влияет на активность трипсина и других эндопептидаз и эффективность масс-спектрометрических измерений. RapiGest SF деградирует в условиях низких значений pH [185]. Лаурат натрия также является сильным поверхностно-активным веществом, обладающим высокой способностью к лизированию мембран и экстрагированию мембранных белков [186]. Эффективность лаурата натрия сравнима с ДСН и превосходит RapiGest SF [185].

По завершении процедуры гидролиза биообразца (плазма или сыворотка) в триптической смеси суммарно присутствует до миллиона различных пептидных последовательностей. С целью понижения сложности анализируемой смеси осуществляется разделение на фракции, так называемое, префракционирование, в том числе, с использованием двумерного гель-электрофореза. Префракционирование позволяет снизить динамический диапазон содержания белков в исследуемом образце и, как следствие, повысить глубину масс-спектрометрического анализа [187].

1.8 Методы масс-спектрометрического анализа белков

1.8.1 Тандемная масс-спектрометрия

Тандемная масс-спектрометрия применяется для инвентаризации белкового состава исследуемого образца в фундаментальных и поисковых исследованиях [154]. Методы тандемной масс-спектрометрии применимы для широкого спектра исследований в области системной биологии и изучения молекулярных, клеточных событий в организме в норме и патологии, для оценки активности ферментов в биологических жидкостях (скрининг новорожденных на лизосомальные ферменты), поиска новых биомаркеров, а также для нужд пищевой промышленности [188–191]. Основные шаги стратегии протеомного профилирования с применением тандемной масс-спектрометрии отражены на рисунке 6.

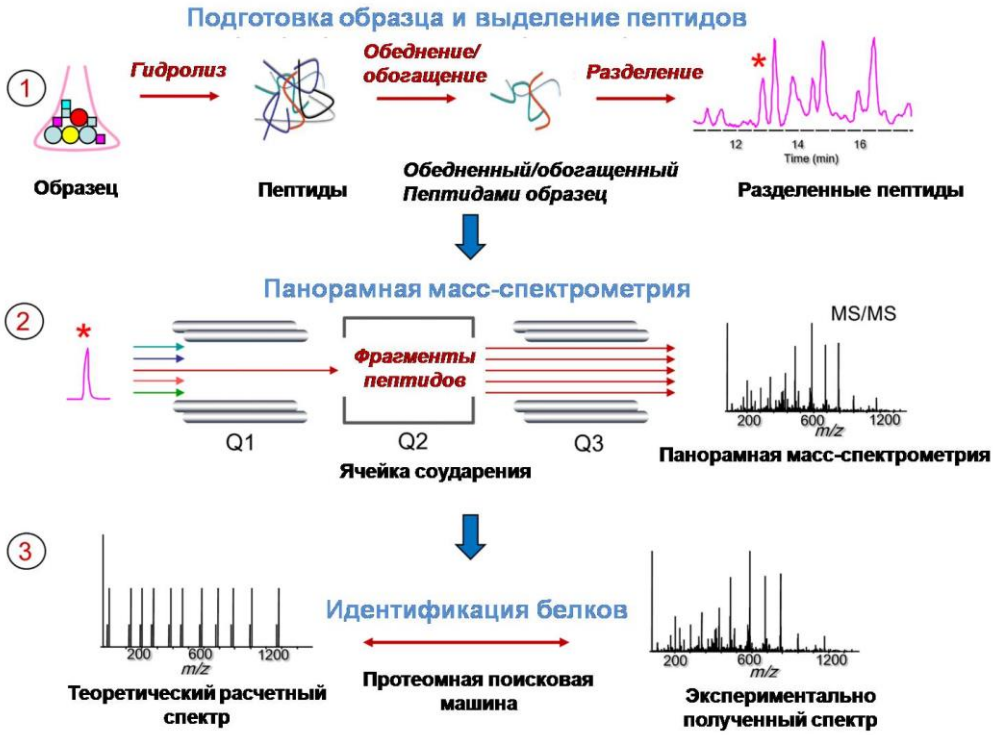


Рисунок 6. – Схема идентификации белков в образце с использованием метода ВЭЖХ-МС/МС. Фрагментация в протеомном профилировании многокомпонентных белковых смесей осуществляется, как правило, в ионных ловушках высокого и сверхвысокого разрешения (адаптировано из [192]).

На первом этапе многокомпонентная белковая смесь подвергается сайт-специфичному гидролизу для получения смеси пептидов. Затем пептидная смесь разделяется на фракции с помощью жидкостной высокоэффективной хроматографии (ВЭЖХ) и подается для анализа значений отношения массы ионов к заряду в масс-спектрометрический детектор. На втором этапе фракции пептидов последовательно подаются в тандемный масс-спектрометр высокого или сверхвысокого разрешения для последовательной изоляция пептидных ионов (прекурсорные ионы) и их фрагментации с последующим измерением тандемных спектров, или спектров фрагментации второго уровня МС/МС.

На третьем этапе проводится анализ полученных масс-спектров, включая спектры первого уровня для прекурсорных ионов пептидов и второго уровня для спектров фрагментации, с последующей идентификацией пептидных последовательностей с использованием протеомных поисковых машин (рисунок 6).

Основной задачей тандемной масс-спектрометрии является получение информации об аминокислотной последовательности пептидов. Такую информацию предоставляют спектры фрагментации пептидов (МС/МС). Наиболее популярными в протеомных исследованиях являются эргодичные методы фрагментации. Элюция пептидов с обращенно-фазовой хроматографической колонки осуществляется в определенное время градиента смесью органического растворителя (хроматографическое время удержания компонентов), далее осуществляется ионизация и перенос пептидных ионов в камеру соударений. В камере соударений прекурсорные ионы определенной массы изолируются и подвергаются воздействию молекулами инертного газа. В качестве последнего, как правило, используется молекулярный азот, аргон или гелий. Данный процесс, определяемый как диссоциация, активируемая столкновением, обеспечивает перенос кинетической энергии на химическую связь, что приводит к разрыву ковалентной связи. В газовой фазе амидные связи пептидного остова являются предпочтительными сайтами протонирования. Такие протонированные амидные связи ослабевают, и при активации столкновением происходит их разрыв с образованием ряда ионов-продуктов двух типов – «*y*-» и «*b*-» [154, 193]. Таким образом, процесс направлен на получение набора ионов пептидных фрагментов, которые отличаются по *m/z* на одну аминокислоту, что позволяет реконструировать аминокислотную последовательность пептида-предшественника.

На сегодня в масс-спектрометрах реализованы разные методы фрагментации пептидов-ионов, в том числе столкновительная диссоциация *CID* (*от англ. «collision-induced dissociation»*), диссоциация с переносом электрона *ETD* (*от англ. «electron-transfer dissociation»*), импульсная Q-диссоциация *PQD* (*от англ. «pulsed-Q-dissociation»*), столкновительная диссоциация при повышенной энергии *HCD* (*от англ. «higher energy collision dissociation»*) и другие методы [194–197]. В исследованиях с применением тандемной масс-спектрометрии наиболее распространена столкновительная диссоциация *CID*. Многообещающим методом для идентификации пептидов и белков с посттрансляционным модифицированием (фосфорилирование, убиквитинирование) является диссоциация с переносом

электрона *ETD* [198,199]. Глубокий охват протеома в масс-спектрометрическом анализе может быть достигнут сочетанным использованием двух методов фрагментации [194].

1.8.2 Времяпролетная масс-спектрометрия

Времяпролетная масс-спектрометрия – аналитический метод, в котором источником ионов является матрично активированная лазерная десорбция/ионизация (МАЛДИ), а масс-анализатором является времяпролетный анализатор (*TOF, от англ. «time-of-light»*). Основной принцип времяпролетной масс-спектрометрии заключается в разделении ионов с разными характеристиками *m/z* во времени в результате перемещения в свободной от поля траектории дрейфа известной длины (рисунок 7). Ионы начинают путь практически одновременно, более легкие ионы достигают детектор быстрее по сравнению с тяжелыми.

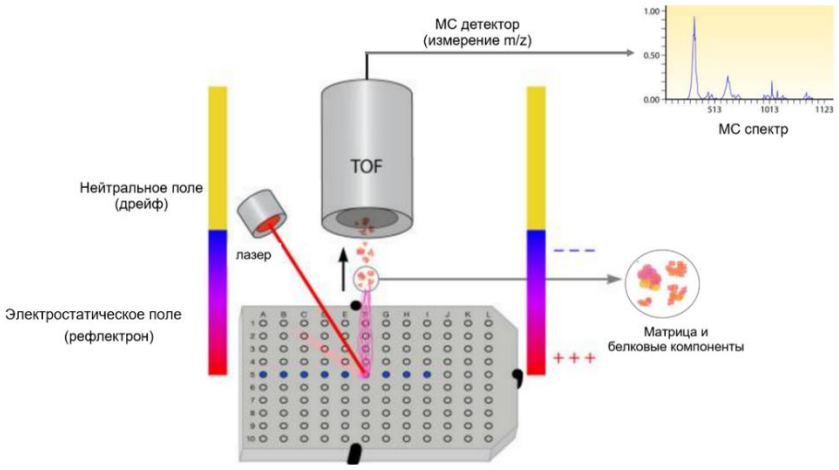


Рисунок 7. – Схема времяпролетного анализа компонентов исследуемого образца. Смесь образца и матрицы после нанесения на металлическую мишень подвергается воздействию лазера. Такое воздействие приводит к сублимации и ионизации компонентов образца и матрицы. Образованные ионы разделяются во времяпролетной трубе по значениям m/z. Программное обеспечение МС представляет профиль зарегистрированных m/z в виде спектра. Рисунок адаптирован из [200].

Времяпролетный анализатор предоставляет возможность линейного и рефлектронного режима измерений [201]. Несмотря на то, что ионам придается одинаковая начальная кинетическая энергия, на практике импульс воспринимается ионами с разной интенсивностью, поэтому не все ионы с одинаковыми значениями

m/z достигают своих расчетных скоростей. Для решения этой проблемы в конце траектории дрейфа применяется отражение (рефлектрон). Рефлектрон содержит последовательность кольцевых электродов с высоким напряжением, в которых происходит смещение ионов в обратном направлении вдоль времяпролетной трубы с небольшим углом смещения [201]. Ионы с разной кинетической энергией проникают в рефлектрон на разную глубину в направлении выхода из рефлектрона. Более быстрые ионы, характеризующиеся высокими значениями кинетической энергии, проходят более длинный путь по сравнению с «медленными» ионами. Как следствие, быстрые ионы проводят больше времени в рефлектроне, чем медленные ионы, несущие меньшую энергию. В результате детектор принимает ионы одинаковой массы примерно в одно и то же время. Режим отражения в масс-спектрометрическом анализе позволяет повысить разрешающую способность измеряемых *m/z*, однако рефлектронный времяпролетный анализатор не подходит для аналитов, которые недостаточно стабильны при воздействии электрического поля [202]. МАЛДИ с времяпролетным детектором широко применяется в области протеомики [203], липидомики [204], клинической патологии [205], метаболомики [206].

1.8.3 Направленная масс-спектрометрия

Тандемная масс-спектрометрия с изотопным мечением в протеомном анализе используется для детектирования и количественного анализа содержания белков [207,208]. Направленный масс-спектрометрический анализ представлен подходом мониторинга множественных реакций в комбинации с высокоэффективной жидкостной хроматографией (ВЭЖХ-ММР). Данный анализ широко применяется в научных исследованиях для определения количественного содержания известного набора белков в многокомпонентных системах [209,210]. В анализе ВЭЖХ-ММР участвуют один или два протеотипических пептида. Такие пептиды уникальны для исследуемого белка и не встречаются в других белках. ВЭЖХ-ММР анализ протеотипических пептидов выполняется на масс-спектрометре типа тройной

квадруполь, который обеспечивает возможность селективного отбора прекурсорных ионов известных *m/z* характеристик, и отбора соответствующих фрагментных ионов, или транзиций. ВЭЖХ-ММР анализ можно рассматривать в качестве масс-спектрометрического аналога вестерн-блота или ИФА, поскольку в методах проводится направленный анализ белковых мишеней. Метод ВЭЖХ-ММР отличается рядом преимуществ:

(а) не требует отбора и наработки антител с высокой аффинностью к исследуемому белку;

(б) предел концентрационной чувствительности более чем в 100 раз ниже по сравнению с тандемной масс-спектрометрией благодаря детектированию целевых ионов прекурсоров и их транзиций, при этом значительно снижен уровень шума.

Использование изотопно-меченых пептидов ^{13}C и/или ^{15}N позволяет проводить многопараметрический количественный анализ содержания белков путем детектирования от сотен до тысячи транзиций прекурсорных ионов в одном эксперименте [209].

Процесс разработки количественного метода ВЭЖХ-ММР для целевых белков представлен на рисунке 8. На первом этапе для каждого целевого белка отбирают 3-5 кандидатных пептидов с высоким уровнем масс-спектрометрического сигнала. Такой выбор может быть основан на данных ВЭЖХ-МС/МС анализа (детектор типа ионная ловушка или орбитальная ловушка ионов), эмпирических данных в общедоступных протеомных репозиториях, либо расчетных прогнозов.

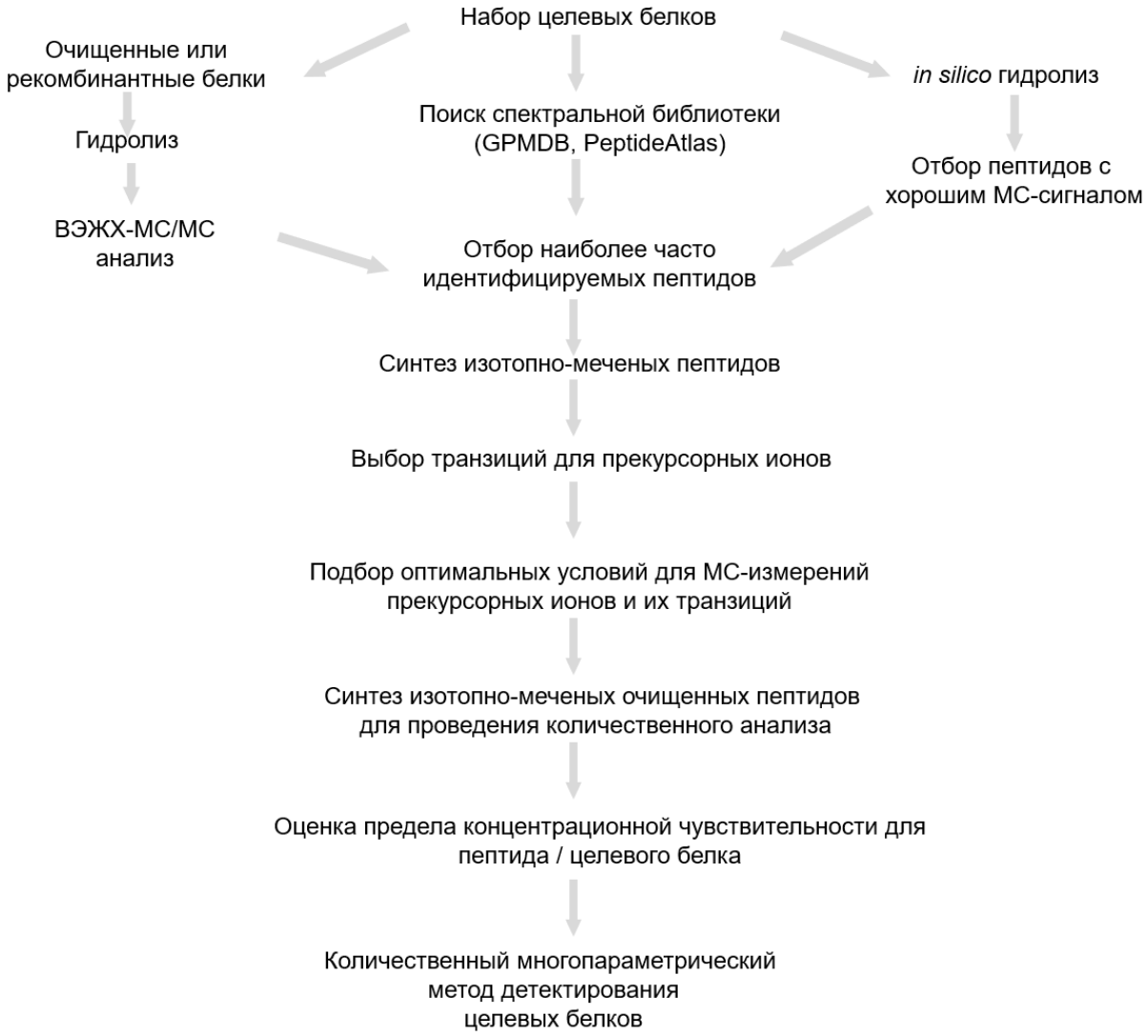


Рисунок 8. – Схема разработки количественного ВЭЖХ-ММР метода детектирования целевых белков. Адаптировано из [209].

На втором этапе меченые изотопами пептиды-кандидаты синтезируют в неочищенном виде. Для смеси неочищенных пептидов проводится ВЭЖХ-ММР анализ с целью определения оптимальных условий фрагментации каждого прекурсорного иона и выявления наиболее подходящих для них транзиций. Затем для каждого пептида отбирают от трех до пяти транзиций. Смесь синтезированных пептидов добавляют в триптический гидролизат клеточного экстракта, чтобы подтвердить специфичность детектирования выбранных пептидов в многокомпонентной матрице. Далее отбирают пептиды с наилучшей чувствительностью и специфичностью. Проводится химический синтез легких и тяжелых форм выбранных пептидов с высоким масс-спектрометрическим сигналом

[209]. Чистота синтезированных пептидов, точность определения их концентрации являются жесткими требованиями к проведению количественного анализа. Оценивается чувствительность и линейный динамический диапазон созданного количественного метода с использованием подхода добавления смеси изотопно-меченых пептидов известной концентрации. Оптимизированный ВЭЖХ-ММР метод можно использовать для обнаружения и количественной оценки содержания перечня исследуемых белков в многокомпонентных матрицах (образцы крови, клеточный лизат) [209].

1.8.4 Масс-спектрометрическая визуализация пространственного распределения молекулярных компонентов

Масс-спектрометрия пространственного распределения молекулярных компонентов на поверхности плоского чипа, или «MALDI Imaging», предоставляет возможность исследования образцов ткани с высокой пространственной детализацией. Анализ широкого спектра аналитов – белки, пептиды, лекарственные средства, фармацевтические компоненты, эндогенные клеточные метаболиты и другие аналиты, становится доступным благодаря этому *in situ* подходу в ткани [211]. Подход «MALDI Imaging» по сравнению с (иммуно)гистологическими исследованиями объединяет информацию о молекулярном составе и морфологических свойствах (гистология) исследуемого образца за счет сбора информации о пространственной локализации аналитов в ходе проведения масс-спектрометрического измерения. «MALDI Imaging» позволяет одновременно проводить мультипараметрический анализ от сотен до тысяч молекул в одном срезе ткани. Масс-спектрометрия с визуализацией исследуемого образца обеспечивает новое качество молекулярных данных и связывает дисциплину молекулярной патологии с глубоким масс-спектрометрическим анализом биомолекул в образцах ткани (таблица 9).

«MALDI Imaging» подход применяется для анализа пространственного распределения белков в исследуемом образце [212]. Визуализация белков

предоставляет исследователю информацию об их распределении в области нанесения образца, изоформах белков, а также наличия посттрансляционных модификаций. Сравнительный анализ возможностей «MALDI Imaging» и иммуногистохимических методов представлены в таблице 9.

Таблица 9. Сравнение методов иммуногистохимического анализа, «MALDI Imaging» и метода ВЭЖХ-МС/МС (адаптировано из [211]).

Параметр	**Иммуногистохимия**	**MALDI Imaging**	**ВЭЖХ-МС/МС**
Пространственное разрешение	▲	▲	–
Многопараметрический анализ	▲	▲	▲
Анализ без меток (химических, флуоресцентных, изотопных)	–	▲	▲
Идентификация биомолекулы	–	▲	▲
Количественная оценка содержания биомолекулы	–	▲	▲
Чувствительность анализа	▲	▲	▲
Производительность подхода	▲	▲	▲
Небольшой объем биообразца	▲	▲	▲

▲ − возможность реализации параметра в аналитической системе

Как видно в таблице 9, подход «MALDI Imaging» отличает ряд преимуществ по сравнению с иммуногистохимическими методами. В первую очередь, данный подход предоставляет возможность измерения сотен белковых аналитов в одном анализе, что сравнимо с ВЭЖХ-МС/МС анализом, выявления посттрансляционных модификаций, аберрантных форм белков [213]. Исследование «MALDI Imaging» проводится с использованием свежезамороженных образцов ткани. Распространены исследования для срезов ткани, зафиксированных в формалине или парафине [214]. Получили развитие технологии по созданию тканевых микрочипов, которые позволяют проводить высокопроизводительный скрининг для образцов тканей с целью определения молекулярных «сигнатур». Стратегия успешно реализована для рака поджелудочной железы, опухолей легких, рака желудка, пищевода, простаты,

почечно-клеточного рака и рака мочевого пузыря [214–217]. Сочетание аналитических возможностей масс-спектрометрии с гистологической информацией помогает исследователю в изучении молекулярных процессов, происходящих в разных типах клеток и тканей.

Основной принцип стратегии «MALDI Imaging» заключается в ионизации и извлечении молекулярных компонентов образца ткани для масс-спектрометрического анализа. Нижележащие клеточные слои ткани остаются пригодными для проведения последующего гистологического исследования [211]. Использование в «MALDI Imaging» различных типов масс-спектрометрических детекторов – времяпролетного или орбитальной ловушки ионов, позволяет детектировать различные классы аналитов (таблица 10). Образец ткани в масс-спектрометрическом измерении сканируется в растровом формате (множество пикселей) с пространственным разрешением в диапазоне от 20 до 200 мкм, при этом для каждой точки измерения генерируется масс-спектр. Фосфолипиды, нейропептиды и лекарственные препараты могут быть детектированы по значениям *m/z* с размером пикселя от 5 до 10 мкм [211].

Таблица 10. Возможности детектирования биологических молекул с использованием «MALDI Imaging» подхода для времяпролетного масс-анализатора и орбитальной ловушки ионов. Адаптировано из [34].

Детектор		Условия измерений				Эндогенные аналиты							Экзоген-ные аналиты	
		Точность (м.д.)	Разрешение	Чувствительность, фмоль	Тандемные измерения	Белки	Модификации белков	Пептиды	Метаболиты	Гликаны	Липиды	Гормоны	Лекарства	Токсины
Орбитальная ловушка ионов		1	10^5	10^{-3}	▲	▲	▲▲▲	▲ ▲ ▲	▲ ▲ ▲	▲ ▲ ▲	▲▲ ▲	▲▲ ▲	▲▲▲	▲▲ ▲
Времяпро-летный анализатор, режим	Линейный	200	10^3	1	▲	▲ ▲ ▲	▲▲	-	-	-	-	-	-	-
	Рефлектрон	20	10^4	1	▲	-	-	▲	▲	▲	▲	▲	▲	▲▲

▲ − возможность реализации параметра в аналитической системе

1.9 Идентификация белков в тандемной и времяпролетной масс-спектрометрии

На заключительном этапе масс-спектрометрического анализа осуществляется идентификация измеренных характеристик *m/z*. Результаты масс-спектрометрических измерений анализируются с использованием специальных математических алгоритмов – протеомных поисковых машин (ППМ), реализованных в виде веб-сервисов. Центральным элементом ППМ является алгоритм соотнесения *m/z* прекурсорных ионов пептидов в спектрах первого уровня с расчетными массами протеолитических пептидов белков, а также сравнения теоретически предсказанных и измеренных масс-спектров второго уровня для тандемной масс-спектрометрии. Существующие стратегии идентификации пептидов можно условно разделить на несколько стадий, которые упрощенно представлены на рисунке 9. Идентификация пептида осуществляется путем сравнения полученного экспериментального спектра фрагментации с теоретическими спектрами, предсказанными для каждого пептида в протеомной базе данных, или сравнения со спектрами, которые содержатся в спектральной библиотеке. Теоретические спектры составляются для всех пептидов-кандидатов, *m/z* которых соответствуют экспериментально измеренным для прекурсорных ионов с учетом точности измерения масс для используемого типа масс-анализатора.

Как видно из рисунка 9, пептидные последовательности могут быть получены непосредственно из экспериментальных спектров фрагментации, то есть без обращения к протеомным базам данных, так называемое секвенирование *de novo*. Развиты также гибридные подходы, которые основаны на получении коротких аминокислотных последовательностей длиной 3-5 аминокислотных остатков, которые реконструируются в последовательность пептида. Использование баз данных белковых последовательностей остается флагманом для идентификации белков в многокомпонентных белковых матрицах (таблица 11).

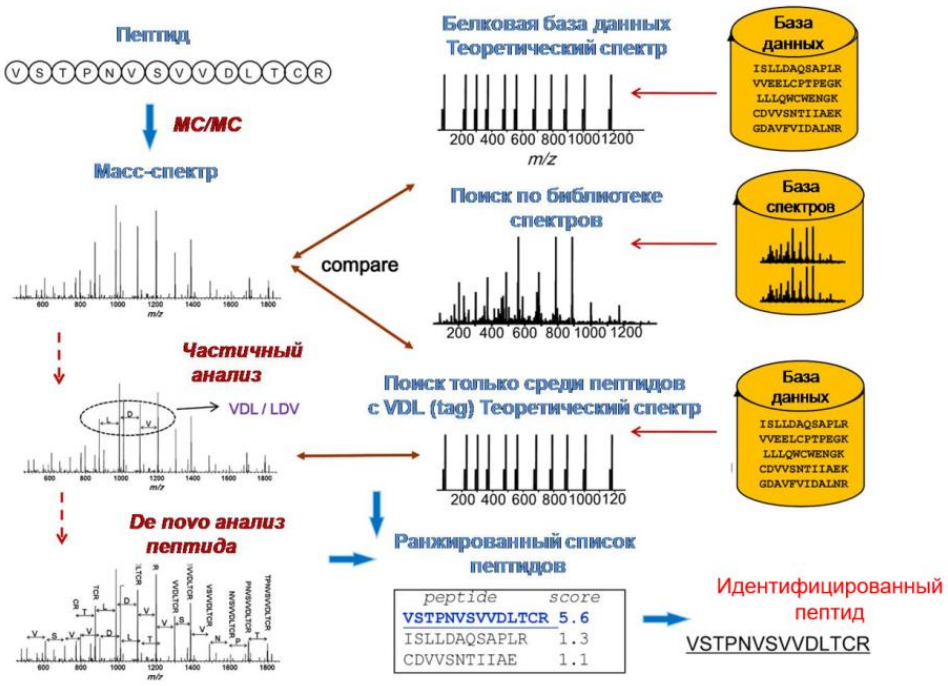


Рисунок 9. – Стратегии идентификации пептидов. Идентификация пептидов выполняется путем сравнения экспериментальных тандемных спектров с расчетными спектрами, предсказанными для каждого пептида, либо путем сравнения со спектральными библиотеками. Теоретические спектры фрагментации содержатся в протеомных поисковых базах данных. Пептидные последовательности, не представленные в протеомных базах данных, могут быть получены de novo на основе спектров фрагментации. Возможно применение гибридных подходов, в которых определяются короткие последовательности длиной несколько аминокислотных остатков, затем с участием базы данных белковых последовательностей формируется ранжированный список пептидов-кандидатов (адаптировано из [192]).

ППМ использует в качестве входных данных результаты масс-спектрометрических измерений фрагментов пептида и сравнивает их с теоретически предсказанными спектрами (рисунок 9). Важно отметить, что сравнение выполняется не для всех возможных пептидных последовательностей, а по существенно меньшему набору пептидов-кандидатов. Набор пептидов-кандидатов генерируется в ППМ *in silico* с использованием правил гидролиза и специфичности фермента, а также экспериментальных критериев. К таким критериям относятся точность определения массы прекурсорного иона, выбор фермента, наличие посттрансляционных или химических модификаций. Дополнительными критериями поиска являются определение ионов-фрагментов в спектре (*y*- и *b*- ионы в CID) и

точность измерения масс фрагментов [192]. Результатом идентификации является список пептидов для каждого тандемного спектра, ранжированный в соответствии с достоверностью идентификации («скор-функция»). Пептиды с лучшими «скор» значениями входят в список достоверных пептидных идентификаций.

Таблица 11. Инструменты для анализа данных тандемной и времяпролетной масс-спектрометрии (адаптировано из [192]).

Инструмент	**Веб-ресурс**			
de novo секвенирование	PepNovo [218]		PEAKS [219]	
Поиск по белковым базам данных	SEQUEST [220]	MASCOT [221]	X! Tandem [222]	OMSSA [223]
Tag-секвенирование, гибридные инструменты	InsPecT [224]	TagRecon [225]	Spectral Networks [226]	
Поиск по спектральным базам данных	SpectraST [227]	X! P3 [228]	Bibliospec [229]	
Базы данных для хранения результатов масс-спектрометрических измерений	PeptideAtlas [230]	PRIDE [231]	Peptidome [232]	

Вероятностные «скор-функции»

«Скор-функция» позволяет оценить степень совпадения между экспериментальными и теоретически предсказанными тандемными спектрами. В современных ППМ используются два типа «скор-функций»:

(1) спектральные корреляционные функции – от скалярного произведения до более высокого уровня перекрестных корреляционных функций *SEQUEST, X!Tandem, OMSSA, MASCOT* (методические указания «Error tolerant search», «Scoring» [233], «Calculation of protein expectation value from peptide expectation values in X! Tandem» [234]);

(2) эмпирические правила (*SpectrumMill,* методические указания G2721AA Spectrum Mill Application Guide A.03.03), или статистически наиболее вероятностные частоты фрагментации (*PHENYX*).

Достоверность идентификации, определяемая значением «скор-функции», или индексом достоверности, может рассчитываться в произвольном масштабе (Xcorr в *SEQUEST*), быть преобразована в статистические параметры, такие как *p*-значение или среднее *E*-значение [235–237].

Использование разных алгоритмов идентификации увеличивает разнообразие и количество идентифицированных пептидов и белков [238]. Большая часть «скор-функций» оптимизирована для спектров, полученных методами столкновительной фрагментации *CID*. С появлением методов фрагментации диссоциативная передача электрона *ETD* и в столкновениях при высокой энергии *HCD (от англ. «higher energy collision dissociation»)* усилия разработчиков сосредоточились на создании новых подходов расчета «скор-функции» [239]. Существенное увеличение идентификаций (до 80 %) в спектрах фрагментации *ETD* было продемонстрировано за счет добавления в «скор-функцию» информации о зарядовом состоянии родительских ионов и последовательностей пептидов-кандидатов [240]. Даже для *CID* спектров сохраняется возможность улучшения числа идентификаций за счет использования интенсивностей ионных фрагментов в алгоритме определения индекса достоверности [241,242].

Базы данных белковых последовательностей

Выбор базы данных белковых последовательностей для анализа результатов масс-спектрометрических измерений зависит от таксономической принадлежности анализируемого биологического образца. Информация о белках доступна в настоящее время для большинства известных таксономических групп, для которых получены полные геномные данные. В большинстве случаев протеомные базы данных содержат аминокислотные последовательности белков от Национального центра биотехнологической информации (*NIST*), или более высокого качества библиотеки *RefSeq, UniProt* (*Swiss-Prot* и его дополнения *TrEMBL*). Протеомные базы данных отличаются между собой полнотой и качеством аннотации аминокислотных последовательностей пептидов и белков. При идентификации полиморфизмов в аминокислотной последовательности особенно важен поиск по обширной базе данных *Entrez,* которая помимо биологически известных вариантов последовательностей, содержит большое количество последовательностей, сгенерированных на основе данных геномной базы данных *GenBank*, и включающей белковые последовательности трансляции мРНК и возможные ошибки

секвенирования. Идентификация белков с использованием больших баз данных снижает число верно идентифицированных пептидов за счет увеличения ложноположительных идентификаций. Геномные базы данных также могут использоваться для идентификации тандемных спектров. Особенно они удобны для выявления новых пептидов, образованных за счет альтернативного сплайсинга [192,243].

Индексы достоверности идентифицированных спектров

Большой объем экспериментальных данных, получаемых в современном протеомном анализе, требует использования автоматизированной обработки спектров фрагментации и, соответственно, разработки высокопроизводительных вычислительных ресурсов. Несмотря на то, что ППМ идентифицирует большинство спектров второго уровня, то есть пептид-спектральное соответствие PSM (*от англ. «peptide spectrum match»*), не все из найденных совпадений достоверны. Более того, во многих случаях, особенно при использовании масс-анализаторов низкого разрешения (ионная ловушка), большинство полученных PSM являются недостоверными идентификациями [244]. Разработка методов оценки достоверности PSM, и уровня ложноположительных идентификаций FDR (*от англ «false discovery rate»*) является важной задачей, решаемой современными алгоритмами ППМ.

Локальный индекс PSM

При идентификации спектра фрагментации ППМ определяет локальный для каждого индивидуального спектра список пептидов-кандидатов, упорядоченных по значениям «скор-функции». Список отражает степень совпадения теоретически предсказанных спектров с экспериментально полученными. Например, индексы гиперскор (*Hyperscore)* в *X!Tandem* и кросс-корреляционный скор (*Xcorr*) в *SEQUEST*. Индекс наилучшего совпадения может быть преобразован в статистические параметры *p*- или *E*-значений.

Для каждого лучшего соответствия спектров, так называемое нулевое (случайное) распределение индекса достоверности, может быть оценено с помощью

гистограммы распределения для всех пептидов-кандидатов, за исключением лучшего результата. При этом индекс наилучшего соответствия присваивается нулевому распределению. Чем дальше результат поиска расположен от нулевого распределения, тем выше статистическая значимость поиска. Эти шаги представляют расчет *p*-значения [245, 246].

Альтернативный подход основан на использовании алгоритма сравнения, который рассчитывает наивысший индекс достоверности пептидной идентификации не относительно распределения индексов других пептидов-кандидатов, а по отношению к распределению, полученному для пространства всех теоретически возможных пептидов [246].

p- или *E*-значения, вычисленные как описано выше, являются мерами статистической достоверности пептидных идентификаций. Эти меры в значительной степени инвариантны для разных алгоритмов идентификации спектров, и обеспечивают стандартизованную интерпретацию результатов. Тем не менее, статистические критерии оценки достоверности идентификации единичных спектров недостаточны для анализа нескольких спектров фрагментации одновременно. В этих случаях требуется многократная коррекция индивидуально рассчитанных *p*-значений для определения индексов достоверности множества PSM. Однако, чрезмерное занижение *p*-значения для достижения низкого уровня ошибки идентификации пептида, в том числе коррекция Бонферрони, приводит к существенному снижению количества правильных идентификаций пептидов, представленных в пробе. Коррекция Бонферрони, или критерий частоты ошибок, не предназначена для больших размеров баз данных, типичных для исследований в области геномики и протеомики. Таким образом, вычисления статистического индекса достоверности должно осуществляться с учетом размера данных, со статистически значимым количеством идентифицированных PSM.

Уровень ложноположительных идентификаций

При работе с большими объемами данных распространенным и приемлемым для оценки достоверности идентификаций считается уровень ложноположительных идентификаций FDR (*от англ. «false discovery rate»*), который определяет

процентную долю ложных идентификаций. FDR может рассматриваться на уровне всего массива идентификаций в пробе, так и для каждого индивидуального PSM. В масс-спектрометрической терминологии FDR определяется как ожидаемое соотношение неправильно определенных PSM ко всем идентифицированным. Бенджамине и Хочберг впервые озвучили концепцию, в которой FDR был применен к *p*-значению в предположении, что все *p*-значения статистически независимы [247]. Другие подходы для контроля FDR включают методы случайных аминокислотных последовательностей, а также, эмпирические Байесовские методы. Методы анализа массива спектров, полученных для протеома конкретной пробы, и методы анализа отдельных PSM дополняют друг друга. Анализ FDR для массива спектров может быть выполнен для набора PSM, ранжированных по рассчитанным *p*- и *E*-значениям. Вычисление FDR базируется на анализе глобального распределения PSM по индексам во всем наборе данных, совокупности спектров фрагментации, а также с использованием одного, наиболее достоверного PSM для одного тандемного спектра. Напротив, критерии распределения отдельных спектров (*p*-значение) базируются на определении «скор-функции» отдельного спектра фрагментации против всех кандидатов протеомной базы.

Метод псевдослучайных последовательностей для оценки FDR

Используемые в настоящее время в протеомных исследованиях методы вычисления FDR для пептидных идентификаций на основе тандемной масс-спектрометрии определяются стратегией «target-decoy» основанной на использовании виртуальных протеомных баз данных, составленных из белков со случайными аминокислотными последовательностями [236]. В этой стратегии экспериментальные спектры фрагментации соотносятся с пептидами из базы данных белковых последовательностей и с аналогичной по размеру базой данных случайно сгенерированных аминокислотных последовательностей.

Набор спектров фрагментации от одного эксперимента выравнивается по базе данных последовательностей белков и по базе данных случайных последовательностей. Для дальнейшего анализа отбирается лучший пептид,

найденный по той или иной базе данных. Определяется число положительных результатов поиска из базы данных случайных последовательностей, которые считаются неправильными и которые используются для оценки FDR при заданном допустимом уровне (FDR=1 %).

В качестве альтернативы запросы в отношении таргетных и случайных последовательностей могут быть выполнены по отдельности, когда базы данных не объединяются для поиска. Аналогичный подход к оценке уровня FDR может быть использован для поиска по спектральным библиотекам [227]. Основное предположение стратегии «target-decoy» состоит в том, что идентификация последовательностей, принадлежащих базе данных случайных последовательностей и ложных идентификаций из таргетной базы данных имеют одно и то же распределение. На следующем шаге получения списка пептидных идентификаций, PSM фильтруют по так называемому «порогу пептидной идентичности» (peptide identity threshold), или «порогу отсечения». Например, в ППМ *X! Tandem* соответствует пороговому *E*-значение, в ППМ MASCOT – «*Ion Score cut-off»*, ниже которых идентификации считаются недостоверными независимо от базы данных, а соответствующий FDR для каждого порога отсечения оценивается как N_d/N_t, где N_d – число PSM из базы случайных последовательностей с индексом достоверности выше порогового (методические указания «Error tolerant search», N_t – количество PSM из таргетной базы данных с индексом достоверности выше порогового) [233].

Точность оценок FDR зависит от условий поиска по таргетной/случайной базе данных. Экспериментаторами широко применяются две стратегии поиска: (а) два запроса в таргетную и случайную базы данных и (б) один запрос в объединенную таргетную/случайную базу данных [248].

В первой стратегии FDR вычисляется по двум базам по уравнению N_d/N_t и представляет собой консервативную оценку уровня достоверности идентификаций. Число PSM из базы данных случайных последовательностей (N_d) приводит к завышению значения N_{inc}, если поиск всех спектров фрагментации проводится по базе данных случайных последовательностей, в том числе спектры, которые могут быть правильно определены по таргетной базе данных. На практике более

распространенным вариантом является поиск с использованием второй стратегии по объединенным таргетной базе данных и базе данных случайных последовательностей [249].

Базы данных случайных последовательностей могут быть созданы путем случайной организации последовательностей аминокислотных остатков в составе белков таргетной базы данных: это замены аминокислотных остатков в белках, или зеркальное обращение последовательности относительно C- и N-концевых групп белка. Некорректное определение пептида может быть следствием не только случайного определения, но и соответствия с гомологичным пептидом по аминокислотной последовательности или по значению *m/z* [250].

В главе «Обзор литературы» рассматриваются способы детектирования белков с использованием белковых чипов и методов протеомного анализа. Анализ литературы обосновывает актуальность проблемы интеграции ультрачувствительных подходов молекулярной детекции с методами масс-спектрометрического анализа для детектирования белков в низкой концентрации. Данная проблема обусловлена невозможностью идентификации зарегистрированных молекул в аналитических системах, представленных нанотехнологическими устройствами, в том числе молекулярными детекторами. На сегодняшний день единственным методом, позволяющим однозначно идентифицировать белковые молекул, является масс-спектрометрия. Развитие масс-спектрометрических методов анализа определило необходимость предварительного фракционирования сложных по составу биологических образцов, и развития подходов предварительного концентрирования целевых белков с использованием иммуноаффинных подходов. Специально подготовленная поверхность чипа может стать точкой интеграции детектирования белка с использованием нанотехнологического устройства и масс-спектрометрической идентификации. Развитие подходов такой интеграции позволит проводить надежное детектирование и идентификацию белков в низкой концентрации в биообразцах, что до сих пор остается важным вызовом в области биомедицинских исследований.

ГЛАВА 2. 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, либо функционализированные химическими агентами (кросс-линкеры), либо функционализированные посредством иммобилизации молекулярных зондов. В качестве молекулярных зондов использовали моноклональные антитела или аптамеры (олигонуклеотиды), специфичные по отношению к целевым белкам. В процессе инкубации чипов на поверхности осуществлялось концентрирование (фишинг) молекул белка из исследуемого раствора. Рассмотрены три варианта фишинга белков:

– сорбция – случай концентрирования биомолекул на поверхности чипа без модификации, тип чипов – свежесколотая слюда или высокоориентированный графит (ВОПГ);

– химический фишинг – случай концентрирования биомолекул на поверхности чипов, функционализированных химическими агентами, при фишинге осуществляется ковалентное связывание белков с поверхностью, тип чипов – слюда;

– биоспецифический фишинг – случай концентрирования биомолекул на поверхности чипов, функционализированных ковалентно иммобилизованными молекулярными зондами, при фишинге осуществляется аффинное взаимодействие зонд-целевой белок, тип чипов – слюда.

После процедуры концентрирования осуществлялись процедуры гидролиза белковых компонентов и элюция пептидов исследуемых белков с поверхности чипа в раствор для проведения масс-спектрометрического анализа (рисунок 10).

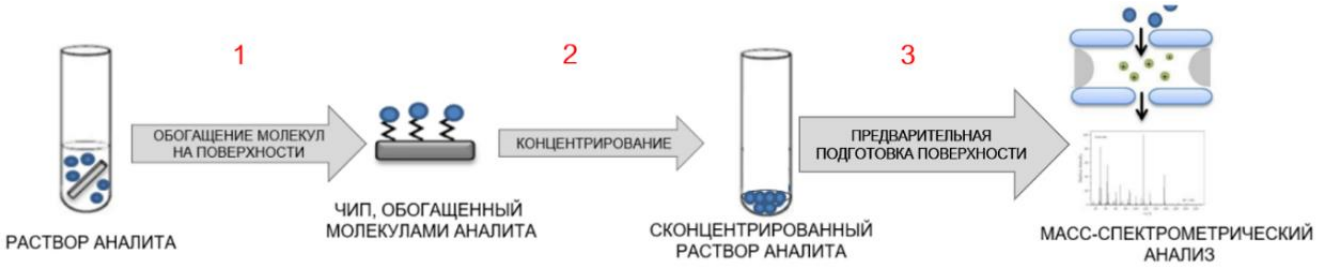


Рисунок 10. – Принцип комбинации АСМ и МС. Процедура фишинга (1). Результатом инкубации являлось обогащение поверхности чипа молекулами белка, реализовывался принцип фишинга (2). Далее проводились процедуры предварительной подготовки поверхности и МС-анализ белков (3). Рисунок адаптирован из [7].*

2.1 Масс-спектрометрические детекторы

В работе использованы следующие масс-спектрометрические (МС) системы: (1) Autoflex III (Bruker, Германия) – времяпролетный масс-спектрометр, МАЛДИ-МС; (2) LC/MSD Trap XCT 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) (таблица 12).

Калибровку 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 калибровочного стандарта «Peptide Calibration Standard» (Bruker Daltonics, Германия).

Таблица 12. Масс-спектрометры с указанием типа ионизации и детектора, которые применялись в экспериментальных работах.

Масс-спектрометр (производитель, страна)	Способ ввода образца	Тип ионизации	Детектор
Autoflex III (Bruker Daltonics, Германия)	МАЛДИ мишень	МАЛДИ	Времяпролетный
LC/MSD Trap XCT Ultra (Agilent, США)	Agilent 1200	Электроспрей	Ионная ловушка
Q Exactive (Thermo Scientific, США)	Ultimate 3000 Nano-flow		Орбитальная ловушка ионов
Agilent 6495 Triple Quadrupole (Agilent, США)	Agilent 1200		Тройной квадруполь

МАЛДИ-МС – времяпролетный масс-спектрометр с матрично активированной лазерной десорбцией/ионизацией (Autoflex III, Bruker Daltonics). Применяли «мягкий» тип лазерной ионизации для перевода молекул аналита и матрицы в газовую фазу без фрагментации. Исследуемый образец с поверхности проводящей металлической мишени с нанесенной смесью матрицы (органическая кислота) подавался напрямую в масс-спектрометрический детектор. Матрицу использовали для сублимации и ионизации образца посредством передачи протона на молекулу аналита, а также для защиты молекул аналита от прямого воздействия лазерных лучей. В работе использовали систему «Smartbeam», оснащенную азотным лазером с длиной волны излучения 337 нм и частотой 1 кГц, диаметр фокуса лазера составлял 10 мкм, время задержки импульса составляло 200 нс.

После ионизации компоненты исследуемого образца направлялись электромагнитным фокусированием во времяпролетный масс-анализатор для регистрации отношений массы ионов к заряду (*m/z)*. Измерения выполняли в режиме рефлектрона с напряжением 1500-10000 В. В зависимости от содержания белка в растворе аналита число лазерных ударов составляло 500-50000. Точность измерения *m/z* составляла до 200 м.д. Калибровку детектора проводили с использованием коммерческого стандарта «Peptide Calibration Standard» (Bruker Daltonics, Германия), содержащего восемь пептидов в диапазоне масс от 800 до 3500 Да.

Полученные файлы результатов измерений анализировали с использованием программного обеспечения flexAnalysis 2.0 согласно инструкции производителя.

ВЭЖХ-МС/МС – масс-спектрометр с ионной ловушкой (LC/MSD Trap XCT Ultra, Agilent, США) с электрораспылением. В работе применяли интерфейс ChipCube (Agilent, США), который включал микрожидкостной чип для хроматографического разделения, покрытый полиимидной пленкой с микроканалами, сформированными методом лазерного травления. На поверхности чипа были размещены: игла наноэлектрораспыления образца, нанопотоковая хроматографическая колонка (нано-ХМ колонка), колонка обогащения. Применение микрожидкостного чипа (в многоразовом режиме) обеспечивало поддержание потока со скоростью порядка 300 нл/мин для сокращения свободного «мертвого» объема колонки по сравнению с хроматографической системой Agilent 1200 (Agilent, США). Системный контроль осуществляли с использованием программного обеспечения Agilent Chem Station и Mass Hunter. Режимы съема МС/МС-спектров соответствовали следующим: метод ионизации электроспрей, анализ положительно заряженных ионов, температура в источнике ионизации – 180°С, напряжение на капилляре –1800 В, скорость осушающего газа – 3-4 л/мин, накопление ионов в ловушке – 50000 (1 мс).

Калибровочные измерения ВЭЖХ-МС/МС проводили прямым вводом калибровочной смеси для анализа положительно и отрицательно заряженных ионов в соответствии с рекомендациями производителя. Результаты измерений анализировали с использованием программного обеспечения Mass Hunter Qualitative Analysis B02 согласно инструкции производителя.

ВЭЖХ-Orbitrap – масс-спектрометр с орбитальной ловушкой ионов (Thermo Scientific, США) с системой ВЭЖХ Ultimate 3000 (Thermo Scientific, США). Фрагментацию выполняли в режиме высокоэнергетической активации (HCD). Результаты измерений анализировали программным обеспечением *Xcalibur* (Thermo Fisher Scientific).

2.2 Вспомогательное лабораторное оборудование

Процедуры предварительной подготовки чипов для АСМ, нанопроволочного и оптического биосенсора проводили с использованием центрифужного концентратора Eppendorf 5301 (Германия) со скоростью вращения ротора – 1400 об/мин, обеспечивающего термостатирование при 30, 45 и 60 °С.

Приготовление навесок реагентов для буферных растворов, растворов матрицы для МАЛДИ-МС анализа осуществляли на аналитических весах CP 324S Sartorius (Германия) с ценой деления – 0,0001 г, ценой поверочного деления – 1 мг.

В процедурах предварительной подготовки чипов для МС-анализа применяли Центрифугу Microcentrifuge Model 5415D Eppendorf (Германия) с максимальной скоростью вращения – 13200 об/мин, загрузкой до 24 пробирок объемом 2,0 мл, 36 пробирок объемом 0,5 мл.

Проверку pH буферных растворов и титрование буферных растворов проводили с применением pH-метра/иономера Эксперт-001 (Россия) с диапазоном измерения pH от 0,00 до 14,00 и точностью измерения ±0,01.

Ультразвуковую обработку пептидных смесей в процедурах предварительной подготовки чипов проводили в ультразвуковой ванне Elma P30 H SE (Россия) с частотой ультразвука 37 кГц и режимом термостатирования от комнатной температуры до 80 °С.

Приготовление растворов аналита заданной концентрации проводили путем последовательных разбавлений с последующим перемешиванием с применением шейкера Reax top Heidolph (Германия) со скоростью вращения – 20-100 об/мин. Гидролиз раствора аналита осуществляли в термостате MBT 250 Kleinfeld (Германия) с температурным диапазоном от 20 до 250 °С.

Хранение пептидных смесей, биообразцов осуществляли в холодильнике глубокого охлаждения Haier DW-86L486 (Китай) объемом 480 л, обеспечивающего температурный режим до –80 °С.

2.3 Препараты белков

В работе использовали 17 очищенных рекомбинантных и природных белков. Чистота белковых препаратов оценивалась производителем методом гель-электрофереза. Степень очистки составляла >95%.

(1) Альфа-фетопротеин (АФП, P02771) относится к классу гликопротеинов. Молекулярный вес белка составляет 69 кДа. Белок представлен одной полипептидной цепью и включает 609 аминокислотных остатка. Белок характеризуется высоким значением алифатического индекса 82,7. Биологическая функция АФП транспортная, белок участвует в переносе низкомолекулярных соединений, обладает высоким сродством к полиненасыщенным жирным кислотам [252]. В работе использован альфа-фетопротеин человека производства MyBioSource (США), степень очистки 99%.

(2) Сывороточный альбумин человека (P02768) является глобулярным белком с молекулярным весом 69 кДа. Белок содержит одну полипептидную цепь, включающую 609 аминокислотных остатков. Значение алифатического индекса белка составляет 77,6. Биологическая роль альбумина человека заключается в регуляции коллоидно-осмотического давления крови, связывает катионы Ca^{2+}, Na^{+}, K^{+}, жирные кислоты, гормоны, билирубин и лекарства [253,254]. В работе использован стандарт белка производства Agilent (США) со степенью очистки 98%.

(3) Пероксидаза C1A (ПХ, P00433) является гликопротеином растения *Armoracia rusticana*, относится к классу оксидоредуктаз с молекулярным весом 38,8 кДа. Белок содержит одну полипептидную цепь, включающую 353 аминокислотных остатка. Алифатический индекс белка составляет 90,3. Биологическая роль ПХ заключается в инактивации пероксида водорода и катаболизме гормонов (ауксин) растительного происхождения. В работе использован белок производства Sigma (США) со степенью очистки 98%.

(4) Бычий сывороточный альбумин (БСА, P02769) является глобулярным белком с молекулярным весом 69 кДа. Белок содержит одну полипептидную цепь, включающую 607 аминокислотных остатков. Алифатический индекс белка

составляет 77,5. Биологическая роль БСА заключается в регуляции коллоидно-осмотического давления крови, связывает катионы Ca^{2+}, Na^{+}, K^{+}, жирные кислоты, гормоны, билирубин [255,256]. В работе использован белок производства Sigma (США) со степенью очистки 98%.

(5) Цитохром b5 (P00167) – связанный с мембраной гем-содержащий белок человека с молекулярным весом 14,3 кДа, является переносчиком электронов для нескольких мембраносвязанных оксигеназ [257]. Алифатический индекс белка составляет 86,6. Белок содержит одну полипептидную цепь, включающую 134 аминокислотных остатка. В работе использован цитохром b5, любезно предоставленный профессором С.А. Усановым (Институт биоорганической химии, Республика Беларусь). Степень очистки белка составляла 96%.

(6) Цитохром P450scc (P05108) – связанный с мембраной гем-содержащий белок человека с молекулярным весом 60 кДа, является монооксигеназой цитохрома P450 и участвует в гидроксилировании боковой цепи и расщеплении холестерина, 7-дегидрохолестерина и витамина D [258]. Белок содержит одну полипептидную цепь, включающую 521 аминокислотный остаток. Алифатический индекс белка составляет 89,1. В работе использован цитохром P450scc, любезно предоставленный профессором С.А. Усановым (Институт биоорганической химии, Республика Беларусь). Степень очистки белка составляла не менее 95%.

(7) Цитохром P450 BM3 (P14779) – гем-содержащий белок с молекулярным весом 118 кДа, характеризующийся монооксигеназной активностью. Фермент участвует в окислении жирных кислот, ксенобиотиков [259]. Белок бактериального происхождения *Bacillus megaterium* содержит одну полипептидную цепь, включающую 1049 аминокислотных остатка. Алифатический индекс белка составляет 80,7. В работе использован цитохром P450 BM3, любезно предоставленный профессором А.В. Мунро, (Манчестерский университет, Великобритания). Степень очистки белка составляла 96%.

(8) Тимидилат-синтаза (P04818) – фермент человека с молекулярным весом 35,7 кДа, который катализирует превращение дезоксиуридинмонофосфата в дезокситимидинмонофосфат. Участвует в пути биосинтеза митохондриального

тимидилата *de novo* [260], в биосинтезе ДНК [261]. Белок представляет собой гомодимер, каждая полипептидная цепь включает 313 аминокислотных остатка. Алифатический индекс белка составляет 83,2. В работе использовали тимидилат-синтазу производства USBio (США) со степенью очистки не менее 95%.

(9) Авидин (P02701) – белок с организацией четвертичной структуры в виде тетрамера [262], молекулярный вес каждой полипептидной цепи составляет 17 кДа. Белок животного происхождения *Gallus gallus domesticus* участвует в связывании биотина, биологическая функция авидина до сих пор не ясна. Предполагается, что авидин проявляет псевдокаталитические свойства и усиливает щелочной гидролиз биотинил-нитрофенилового эфира [263]. Каждая полипептидная цепь включает 152 аминокислотных остатка. Алифатический индекс белка составляет 86,6. Белок производства USBio (США) со степенью очистки 97%.

(10) Белок NFAT C1 (O95644) – белок с молекулярным весом 101 кДа принадлежит семейству факторов транскрипции, играет важную роль в иммунном ответе [264]. Факторы транскрипции NFAT участвуют в развитии некоторых типов рака [265]. Белок человека NFAT C1 содержит одну полипептидную цепь, включающую 943 аминокислотных остатка. Алифатический индекс белка составляет 101,2. В работе использован белок NFAT C1, любезно предоставленный к.х.н. А.Ю. Рубиной (ИМБ РАН, Москва) со степенью очистки 95%.

(11) Серпин B3 (P29508) – глобулярный белок с молекулярным весом 45 кДа. Вероятно, является папаиноподобным ингибитором цистеиновой протеазы, участвует в модулировании иммунного ответа хозяина против опухолевых клеток [266]. Белок содержит одну полипептидную цепь, включающую 390 аминокислотных остатка. Алифатический индекс белка серпин B3 составляет 76,3. В работе использовали белок производства USBio (США) со степенью очистки 97%.

(12) Тромбин (P00734) – глобулярный белок человека с молекулярным весом 70 кДа является фактором свертывания крови и относится к группе сериновых протеаз. Биологическая роль тромбина заключается в переводе растворимой формы фибриногена в нерастворимую фибрин, участвуют в каскаде свертывания крови [267]. Белок содержит одну полипептидную цепь из 622 аминокислотных остатка, и

характеризуется алифатическим индексом равным 69,8. В работе использовали тромбин производства Sigma (США) со степенью очистки 99%.

(13) HCVcoreAg (Q8V7V3) – кор-антиген нуклеокапсида гепатита С, молекулярный вес 20,7 кДа [268]. Белок содержит одну полипептидную цепь, включающую 191 аминокислотный остаток. Алифатический индекс HCVcoreAg составляет 74,6. В работе использовали белок производства Virogen (США) со степенью очистки 99%.

(14) Миоглобин (P02144) – белок суперсемейства глобинов с молекулярным весом 17 кДа, состоит из восьми альфа-спиралей, соединенных неструктурированными петлями. Миоглобин человека содержит порфириновое кольцо с железом. Биологическая роль миоглобина заключается в создании в мышцах кислородного резерва, который восполняет временную нехватку кислорода [269]. Миоглобин содержит 154 аминокислотных остатка. Алифатический индекс миоглобина составляет 84,3. В работе использовали белок производства USBio (США) со степенью очистки 97%.

(15) Гликопротеин ВИЧ-1 gp120 (P04578) является гликопротеином вируса иммунодефицита человека с молекулярным весом 120 кДа. Участвует в адгезии вируса с лимфоидной клеткой хозяина, связываясь с рецептором CD4 [270]. Белок содержит одну полипептидную цепь, включающую 856 аминокислотных остатков. Алифатический индекс gp120 составляет 91,0. В работе использовали белок производства USBio (США) со степенью очистки не менее 95%.

(16) Адренодоксин (P10109) является белком-переносчиком электронов в митохондриальных системах P450, катализирует расщепление боковой цепи холестерина [258]. Необходим для синтеза стероидных гормонов [271], участвует в восстановлении митохондриального цитохрома P450 при стероидогенезе [258,271]. Молекулярный вес белка составляет 19 кДа. Адренодоксин человека содержит одну полипептидную цепь, включающую 184 аминокислотных остатка. Алифатический индекс адренодоксина составляет 85,4. Белок был выделен из фракции митохондрий. В работе использован адренодоксин, любезно предоставленный

профессором С.А. Усановым (Институт биоорганической химии, Республика Беларусь). Степень очистки белка составляла не менее 95%.

(17) Адренодоксин-редуктаза (P22570) – фермент, участвующий в метаболизме холестерина и стероидов [272]. Молекулярный вес белка составляет 53,8 кДа. Белок человека содержит одну полипептидную цепь, включающую 491 аминокислотный остаток. Алифатический индекс адренодоксина составляет 86,7. Белок был выделен из фракции митохондрий. В работе использована адренодоксин-редуктаза, любезно предоставленная профессором С.А. Усановым (Институт биоорганической химии, Республика Беларусь). Степень очистки белка составляла не менее 95%.

2.4 Функционализированные поверхности чипов, реагенты и биологические образцы

В работе использованы следующие материалы чипов для нанотехнологических устройств. Чипы для атомно-силового микроскопа были изготовлены из слюды мусковит (SPI, США) и высокоориентированного графита (НТ-МДТ, Россия), чипы для нанопроволочного биосенсора на базе кремниевых структур были изготовлены ИФП СО РАН (Россия), также в работе использованы чипы для оптического биосенсора производства Iasys (Великобритания).

Поверхности чипов, за исключением высокоориентированного графита и свежесколотой слюды, были функционализированы химическими агентами или содержали иммобилизованные молекулярные зонды. Поверхности, изготовленные из графита, функционализированы не были.

В работе в качестве молекулярных зондов использованы моноклональные антитела или аптамеры (олигонуклеотиды) следующего состава. Моноклональные антитела: анти-gp120 производства Immune Diagnostics (США) в концентрации 1 мг/мл в фосфатно-солевом буфере и анти-HCVcoreAg клон 1E5 производства Virogen (США) в концентрации 7 мкМ в фосфатно-солевом буфере.

Аптамеры содержали NH_2-(T)10-линкер на 5'-конце для обеспечения ковалентной иммобилизации на поверхности АСМ-чипов: анти-GP120 5'-biotin-

GGGAGGACGATGCGGAAXGCGCGAGCXXCCGAAAAGGAAAXXACGCAG ACGACGAGCGGGA-poly(dT)10-NH2-3′ был синтезирован научной группой С.П. Радько (ИБМХ, Россия); анти-HCVcore производства ЗАО Евроген (Россия) со степенью очистки 99% в составе трех вариантов №1 5′–NH2–$(T)_{10}$-ACGCTCGGATGCCACTACAGGCACGCCAGACCAGCCGTCCTCTCTTCATCCG AGCCTTCACCGAGCCTCATGGACGTGCTGGTGA–3′, №2 5′–NH2–$(T)_{10}$-ACGCT CGGATGCCACTACAGTAACACACACAACTTAAAATCATACAAAAAAGAGTA AATGCCTCATGGACGTGCTGGTGA–3′, №3 5′–NH2–$(T)_{10}$-ACGCTCGGATGCCA CTACAGCCAAATACTACCGCAAAAACCACCTCCCCCTCGATAATAGCCTCA TGGACGTGCTGGTGA–3′.

Олигонуклеотиды производства ЗАО Евроген (Россия) со степенью очистки 99%, специфичные некодирующим микроРНК (miR), ассоциированных с развитием расстройств аутистического спектра у детей в составе: miR-106a-5p 5′–NH_2-$(T)_{10}$-CTACCTGCACTGTAAGCACTTTT–3′; miR-106b-5p 5′–NH_2-$(T)_{10}$-ATCTGCACTGTCAGCACTTTA–3′; miR-19b-3p 5′–NH_2-$(T)_{10}$-TCAGTTTTGCATGGATTTGCACA–3′; miR-494-5p 5′–NH_2-$(T)_{10}$-TCAGTTTT GCATGGATTTGCACA–3′; miR-494-3p 5′–NH_2-$(T)_{10}$-AGAGAAGACAACACGGA CAACCT–3′; miR-494-3p 5′–NH_2-$(T)_{10}$-GAGGTTTCCCGTGTATGTTTCA–3′; miR-15b-5p 5′–NH_2-$(T)_{10}$-TGTA AACCATGATGTGCTGCTA–3′; miR-320a 5′–NH_2-$(T)_{10}$-TCGCCCTCTCAACC CAGCTTTT–3′.

Аптамеры производства ЗАО Евроген (Россия) со степенью очистки 99%, специфичные белкам, закодированных в 18 хромосоме человека, в составе: №1 и №2 TGTCA, CTGTCA для белка Homeobox protein TGIF1 [273]; №3, №4 и №8 CAGGTG(C/T) и (A/T/G)(C/G)(T/A)(T/A)CAAAG для фактора транскрипции 4 (TCF4) [274]; №6 и №7 (A/T/C)GAT(A/T)(A), AGATAAGA, GATATCG для фактора транскрипции GATA-6 [275]; №8 ATGGAAAAT для белка NFATc1 [276]; TCTAAGTCAATAAT для белка HNF-6-beta [277]; CTACCTGCACAGTTCACGGA для Zinc finger protein 161 homolog [278]; GTCTAGAC для белка Mothers against decapentaplegic homolog 4 (SMAD4) [279]; (TCAT)n –для фактора транскрипции Zinc finger protein 24 [280].

Реагенты, необходимые для проведения процедур предварительной подготовки образцов и масс-спектрометрических измерений, поставлялись в сопровождении эксплуатационных документов и сертификатов соответствия с указанием наименования, изготовителя, срока годности, подтверждения соответствия качества, гарантийных обязательств. В работе использовали реагенты для проведения следующих процедур.

(а) Подготовки чипов для биосенсора к гидролизу, в том числе, для изготовления гидролитической смеси и ингибирующего раствора в составе: трипсин с ферментативной активностью не менее 5000 ед/г производства Promega (США); бикарбонат аммония с массовой долей не менее 99,5% производства Sigma (США), глицерин с массовой долей не менее 99%, мочевина с массовой долей примесей менее 0,005% и муравьиная кислота с массовой долей не менее 90% производства Merck (Германия); натриевая соль дезоксихолевой кислоты со значением агрегационного числа мицеллы 3-12, тиомочевина с массовой долей не менее 99%, натрия этилен диамин тетраацетат двузамещенный (ЭДТА) с массовой долей не менее 98,5%, N-гидроксиметиламинометан гидрохлорид Трис-HCl с массовой долей не менее 99,9%, 4-винилпиридин с массовой долей не менее 95% и N,N-диметилформамид с массовой долей не менее 99,8% производства Sigma (США).

(б) Калибровочные измерения для масс-спектрометров в составе: стандарт ESI-L/T tuning mix ВЭЖХ-МС/МС с массовой долей компонентов 95-99,9%, стандарта Pierce ESI negative ion calibration с массовой долей компонентов 95-99,9% и стандарта Pierce LFQ Velos ESI positive ion calibration с массовой долей компонентов 95-99,9% производства Thermo Scientific (США); стандарта Peptide Calibration Standard II для МАЛДИ-МС и бычий сывороточный альбумин гидролизованный лиофилизированный с массовой долей не менее 96% производства Bruker Daltonics (Германия);

(в) Масс-спектрометрические измерения, включая подготовку масс-спектрометра к работе, проведение масс-спектрометрических измерений в составе: ацетонитрил с массовой долей не менее 99,8% производства Fisher Scientific (Великобритания); ацетонитрил с массовой долей не менее 99,8% производства

Merck (Германия); изопропанол с массовой долей не менее 99,5% производства Acros Organic (США), альфа-циано-4-гидроксикоричная кислота (HCCA) и 2,4-дигидроксибензойная кислота (DHB) с массовой долей не менее 99% производства Bruker Daltonics (Германия); уксусная кислота с массовой долей не менее 99,5%, гидроксид аммония с массовой долей не менее 99,5%, лауриновая кислота и гидроксилауриновая кислота с массовой долей не менее 98%, калия хлорид и калий-фосфатный буфер (KH_2PO_4) с массовой долей не менее 99%, ацетат аммония с массовой долей не менее 98,5%, никотинамидадениндинуклеотидфосфат (НАДФН) с массовой долей не менее 97%, камфора с массовой долей не менее 96%, холестерин с массовой долей не менее 99% и трифторуксусная кислота с массовой долей не менее 99% производства Sigma (США).

В работе для проведения процедуры обессоливания триптических гидролизатов использовали наконечники «ZipTip C18» производства Merck Millipore (Германия). Деионизированная вода применялась при проведении всех процедур, очищенная на установке Millipore Simplicity UV (Франция).

Образцы сыворотки и плазмы крови

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. Габричевского[2] и ФГБУ «НМХЦ им. Н. И. Пирогова» Минздрава России[3]. 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±18 лет были предоставлены «Школой-интернатом № 2» Краснодарского края. Образцы плазмы венозной крови условно-здоровых участниц

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

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

исследования (n=22) в возрасте 18-53 года и женщин (n=55) в возрасте 19-77 лет с диагнозом рак яичников (I-III стадии) предоставлены НМИЦО им. Н.Н. Блохина Минздрава России[4]. Получено заключение этического комитета и информированное согласие участников исследования или их законных представителей на проведение научного исследования с использованием образцов сыворотки или плазмы крови.

2.5 Гидролиз белков на поверхности чипа

2.5.1 Вспомогательные операции

(а) Приготовление буфера для гидролиза концентрацией 100 мМ (pH 7.4)

Готовили навески бикарбоната аммония (NH_4HCO_3) 0,395 г и гуанидин хлорида 0,05 г, которые переносили в мерную пластиковую пробирку объемом 50 мл. В пробирку добавляли 2 мл глицерина, после чего объем буфера доводили деионизованной водой до объема 50 мл. pH полученного буфера для гидролиза соответствовал диапазону 7,4-8,0. При необходимости pH буфера доводили до требуемого гидроксидом аммония. Буфер перешивали встряхиванием и хранили при плюс 4 ºС не более 1 мес.

(б) Приготовление сток-раствора трипсина

В заводскую мензурку с лиофилизированным препаратом трипсина добавляли 200 мкл буфера для растворения препарата. Полученный сток-раствор трипсина тщательно перемешивали. Проводили дозирование на аликвоты объемом 5 мкл в микропробирки типа «Эппендорф» объемом 200 мкл. Пробирки с аликвотами сток-раствора трипсина хранили в условиях глубокого холода при температуре – 80 ºС не более 1 мес.

(в) Приготовление 0,7% раствора трифторуксусной кислоты

При помощи пипетки отбирали 350 мкл трифторуксусной кислоты и переносили в мерную пробирку, содержащую 40 мл деионизованной воды. Объем раствора доводили деионизованной водой до 50 мл. Полученный раствор

[4] ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н. Н. Блохина» Минздрава России

перемешивали встряхиванием и хранили в холодильнике в условиях глубокого холода при температуре – 80 ºС не более 1 мес.

(г) Приготовление 70 % раствора ацетонитрила в 0,7 % растворе трифторуксусной кислоты

Раствор 0,7 % ТФУ объемом 0,3 мл добавляли в пробирку «Эппендорф» объемом 1,7 мл, содержащую 0,7 мл ацетонитрила. При помощи пипетки отбирали 0,3 мл раствора трифторуксусной кислоты и добавляли в пробирку с ацетонитрилом. Раствор перемешивали пипетированием и готовили непосредственно перед работой.

2.5.2 Гидролиз на поверхности чипов для АСМ

Для приготовления трипсинолитической смеси аликвоту сток-раствора трипсина объемом 5 мкл размораживали при комнатной температуре. Далее в пробирку со сток-раствором трипсина добавляли буфер для гидролиза (NH_4HCO_3, 100 мМ) объемом 75 мкл (трипсинолитическая смесь).

(а) Гидролиз «на поверхности» чипа

Чипы с двумя сенсорными зонами разрезали на две части таким образом, чтобы каждая содержала одну сенсорную зону. По окружности чашки Петри диаметром 4,5 см наносили не менее 20 капель деионизованной воды объемом по 20 мкл. Часть чипа с сенсорной зоной помещали в центр чашки Петри. Далее на сенсорную зону чипа наносили 5-7 мкл трипсинолитической смеси. Чашку Петри герметично закрывали с использованием ленты парафилма и перемещали в термостат для проведения инкубации при температуре 42 ºС в течении 8 ч. Осуществляли визуальный контроль капли каждые 2 ч, в случае высыхания капли добавляли трипсинолитическую смесь объемом 5 мкл на сенсорную зону чипа. Пипеткой отбирали 5 мкл раствора 70 % ацетонитрила в 0,7 % ТФУ и добавляли на сенсорную зону чипа, посредством пипетирования элюировали триптическую смесь. Триптическую смесь переносили в промаркированную чистую пробирку. Операцию элюции проводили три раза. Конечный объем элюата составлял 15 мкл. После чего пробирку с триптической смесью помещали в вакуумный испаритель при

температуре 45˚С на 10-15 мин до полного испарения жидкости. Высушенную триптическую смесью хранили в холодильнике при – 80 ºС не более 1 мес.

(б) Гидролиз чипа в «объеме»

Чип нарезали по контуру сенсорных зон и скалывали тыльную сторону чипа с нефункционализированной поверхностью. В пробирку типа «Corning» объемом 2 мл добавляли бикарбонатный буфер объемом 90 мкл и аликвоту трипсина объемом 3 мкл. В пробирку помещали часть чипа с сенсорной зоной и инкубировали в термостате при температуре 42 ºС в течение 18 ч. Пипеткой отбирали раствор пептидной смеси в пробирку типа «Эппендорф» объемом 200 мкл. Далее пробирку с пептидной смесью помещали в вакуумный испаритель. Раствор высушивали до полного испарения жидкости в течение 15 мин при температуре 45˚С. Далее в пробирку добавляли 10 мкл раствора 70 % ацетонитрила в 0,7 % ТФУ и помещали в вакуумный испаритель при температуре 45 ˚С до полного испарения (10-15 мин). Пробирки с триптической смесью хранили в холодильнике при – 80 ºС не более 1 мес.

2.5.3 Гидролиз на поверхности чипов для нанопроволочного биосенсора

Аликвоту сток-раствора трипсина объемом 5 мкл размораживали при комнатной температуре и добавляли буфер (NH_4HCO_3 100 мМ) объемом 100 мкл. В чип для нанопроволочного биосенсора добавляли смесь для гидролиза. Далее верхнюю часть чипа герметично укупоривали лентой парафилма и инкубировали в термостате при температуре 42 ºС в течении 18 ч. После инкубации отбирали раствор триптической смеси в пробирку типа «Эппендорф» объемом 200 мкл. Пробирку с триптической смесью помещали в вакуумный испаритель при температуре 45˚С до полного испарения жидкости (15 мин). После высушивания в пробирку добавляли 10 мкл раствора 70 % ацетонитрила в 0,7 % ТФУ и помещали в вакуумный испаритель до полного испарения жидкости при температуре 45 ˚С (15 мин). Пробирку с сухой триптической смесью хранили в холодильнике при минус 80 ºС не более 1 мес.

2.5.4 Гидролиз на поверхности чипов для оптического биосенсора

Аликвоту сток-раствора трипсина объемом 5 мкл размораживали при комнатной температуре. В пробирку с аликвотой сток-раствора трипсина добавляли бикарбонатный буфер (NH_4HCO_3, 100 мМ) объемом 100 мкл (смесь для гидролиза). На поверхность чипа для оптического биосенсора добавляли смесь для гидролиза. Верхнюю часть чипа герметично закрывали лентой парафилма и инкубировали в термостате при температуре 42 ºС в течении 18 ч. Раствор пептидной смеси отбирали в промаркированную чистую пробирку типа «Эппендорф» объемом 200 мкл. Далее пробирку с триптической смесью помещали в вакуумный испаритель. Смесь высушивали при температуре 45˚С и до полного испарения в течение 15 мин. После высушивания в пробирку добавляли раствор 70 % ацетонитрила в 0,7 % ТФУ объемом 10 мкл и помещали в вакуумный испаритель при температуре 45 ˚С на 15 мин до полного испарения жидкости. Пробирки с сухой триптической смесью хранили в холодильнике при минус 80 ºС не более 1 мес.

2.5.5 Обессоливание конечного раствора (элюата)

Готовили растворы для работы: а) 100% ацетонитрил в объеме 500 мкл в «Эппендорфе»; б) раствор 0,7 % ТФУ объемом 500 мкл в «Эппендорфе».

Сухую триптическую смесь растворяли деионизованной водой до объема 20 мкл. Водный раствор пептидной смеси, не содержал растворители (спирт, ацетонитрил и прочие). Для процедуры обессоливания применяли наконечники типа «ZipTip C18», содержащие обращеннофазовую смолу. Активацию носителя С18 в наконечнике проводили в присутствии 100 % ацетонитрила. Далее наконечник промывали раствором 0,7 % ТФУ, не менее 5 раз по 10 мкл. Многократным пипетированием проводили обессоливание образца пептидной смеси в пробирке с триптической смесью. Элюцию пептидов с обращеннофазового носителя наконечника проводили раствором ацетонитрила объемом 10 мкл. Элюат собирали в промаркированную чистую пробирку типа «Эппендорф» объемом 200 мкл. Образец высушивали на вакуумном испарителе. Перерастворение обессоленной триптической смеси проводили в растворе 0,7 % ТФУ объёмом 10 мкл. После чего

раствор триптической смеси озвучивали в ультразвуковой камере в течение 5 мин и центрифугировали в течение 1 мин при 12000 об/мин. Обессоленный раствор триптической смеси передавали для проведения масс-спектрометрических измерений.

2.6 Предварительная подготовка образцов сыворотки и плазмы крови для масс-спектрометрического анализа

Процедуры предварительной подготовки биологических образцов для проведения хромато-масс-спектрометрических измерений включали следующие стадии (рисунок 11).

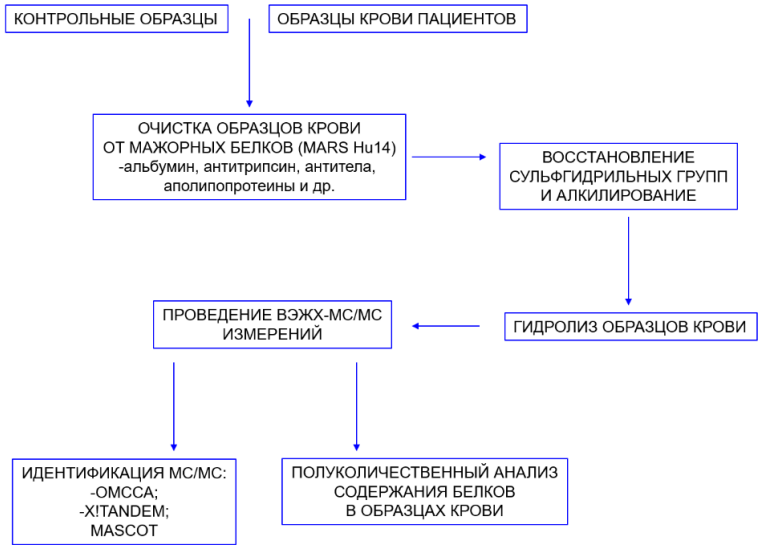


Рисунок 11. – Схема предварительной подготовки образцов сыворотки или плазмы крови для проведения масс-спектрометрического анализа.

На первом этапе проводили очистку биообразцов от высокопредставленных белков (альбумин, антитрипсин, антитела, белки системы комплемента, аполипопротеины) проводили для оптимизации масс-спектрометрического сигнала для средне- и низкокопийных белков. К образцу плазмы/сыворотки крови (V=40 мкл) добавляли раствор 15 мМ MOPS (V=120 мкл). Для иммуноаффинной очистки образцов крови (V=40 мкл) от высокопредставленных белков использовали стандартные хроматографической колонки MARS Hu-14 производства Agilent (США). Подвижная фаза А включала 15 мМ MOPS (pH 7,4), фаза Б – 15 мМ MOPS

и 2 М мочевину (pH 3,0). Сбор фракций осуществляли в диапазоне хроматографических времен удерживания компонентов 3,9-4,6 мин. Далее фракции объединяли и высушивали в вакуумном испарителе при температуре 30°С [281]*.

На втором этапе для полученных фракций белков осуществляли процедуры восстановления *SH*-групп и алкилирования. «Сухой остаток фракций восстанавливали в присутствии раствора 0,1% натриевой соли дезоксихолевой кислоты (V=500 мкл), раствора 6% ацетонитрила и 75 мМ триэтиламмония бикарбоната (pH 8,5). Полученный раствор инкубировали при температуре 90°С в течение 10 минут на шейкере (1100 об/мин). После охлаждения фракций белков до комнатной температуры добавляли 3 мМ раствор TCEP (трис(2-карбоксиэтил)фосфина) для восстановления *SH*-групп аминокислотных остатков цистеина при температуре 45 °С в течение 20 мин. Для алкилирования к фракциям денатурированного белка добавляли раствор 0,2% 4-винилпиридина и 30% пропанола и инкубировали смесь 30 мин при комнатной температуре в защищённом от света месте» [281]*. Процедуры восстановления сульфгидрильных групп и алкилирования проводили с целью денатурирования белков в биологическом образце, потери жесткости их трехмерной белковой глобулы и, как следствие, экспозиции на растворитель аминокислотных сайтов для гидролиза специфичными протеазами.

На третьем этапе проводили процедуру гидролиза белков для последующего масс-спектрометрического анализа, подробно описанную в нашей работе [281]*. Проводился двухступенчатый гидролиз фракций денатурированных белков в присутствии трипсина в соотношении 1:50 к расчетному количеству общего белка в течение 4 час и при повторном добавлении в инкубационную смесь гидролазы в соотношении 1:100 в течение 12 часов. Гидролиз проводили при 42°С. После осаждения дезоксихолевой кислоты (12000 об/мин) при температуре 15°С отбирали супернатант (V=0,5 мл) отбирали и наносили на хроматографическую колонку *Discovery DSC*. Пептиды элюировали с подвижной фазой Б, содержащей раствор 70% метанола и 5% муравьиной кислоты (V=1 мл) [281]*. Элюат высушивали на

вакуумном испарителе при температуре 30ºС в течение 45 минут. Сухой элюат хранили в холодильнике при минус 80 ºС не более 6 мес.

Контроль качества процедуры гидролиза осуществляли посредством регистрации пиков автолиза трипсина в биообразце методом МАЛДИ-МС. Для этого готовили насыщенный раствор матрицы HCCA (α-циано-4-гидроксикоричная кислота). Сухой элюат растворяли 0,7 % раствором трифторуксусной кислоты и наносили в объеме 1 мкл и 1 мкл раствора матрицы HCCA на мишень MTP384 для проведения МАЛДИ-МС измерений. Далее мишень MTP384 помещали в термостат для высушивания при температуре 42 ˚С (контроль визуальный). Мишень MTP384 с нанесенным элюатом помещали в масс-спектрометр МАЛДИ-МС. Параметры регистрации масс-спектра были следующие:

а) метод измерения – «pept_mix.m»;

б) значение интенсивности лазера – в диапазоне 75-90%, рабочая интенсивность – 75%;

в) число лазерных ударов на один спектр – 10000;

г) частота излучения лазера – 20 Гц;

д) в меню «Детекция»:

– диапазон регистрируемых m/z – 780-3000;

– значение рефлектора – 4,5.

Проводили внешнюю калибровку масс-спектрометра с использованием стандартных калибровочных пептидов. Для этого смесь калибровочных пептидов и матрицу HCCA в соотношении по объему 1:1 наносили на мишень MTP384.

Регистрацию масс-спектров проводили, как описано в разделе 2.1 Главы «Материалы и методы». Спектры МАЛДИ анализировали в программе *Flex Analysis*, версия 2.0. Внутреннюю калибровку масс-спектра проводили путем регистрации в программе *Flex Analysis* пиков автолиза трипсина со значениями *m/z* 842,5 и 2211,1 по схеме: *Calibr→internal calibration→porcine trypsin Promega* (рисунок 12).

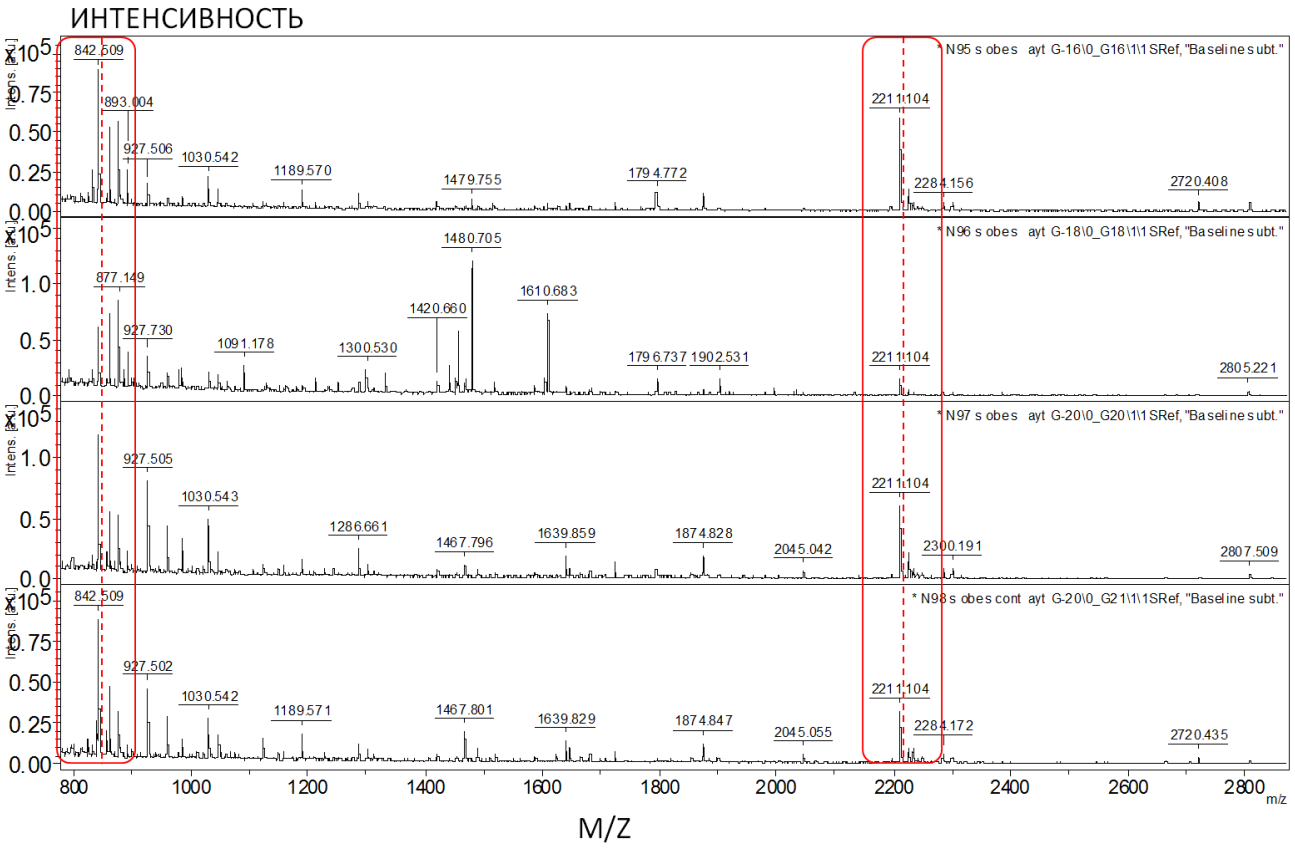


Рисунок 12. – Спектры МАЛДИ, полученные в ходе процедуры контроля качества гидролиза четырех образцов обедненной сыворотки крови, полученных от детей с расстройствами аутистического спектра. Красными прямоугольниками отмечены зоны целевых пиков, пунктирной линией отмечены целевые пики автолиза трипсина – m/z 842,5 и m/z 2211,1. Для каждого образца были обнаружены оба целевых пика с соотношениями сигнал/шум более 3,0.

При регистрации одного пика автолиза трипсина или регистрации пика автолиза с соотношением сигнал/шум менее 3,0 образец методами масс-спектрометрии не анализировали. В этих случаях, вероятно, процедура ферментативного расщепления белков трипсином прошла не полностью.

2.7 Масс-спектрометрический анализ белков

2.7.1 Масс-спектрометрический анализ белков с применением времяпролетного детектора с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией

Коммерческий стандарт калибровочных пептидов был представлен пептидами (моноизотопная однократно протонированная масса иона): брадикинин (757,3992 Да), ангиотензин II (1046,5420 Да), ангиотензин I (1296,6853Да), пептид P (1347,7361 Да), бомбезин (1619,8230 Да), ренин (1758,9326 Да), АКТГ фрагмент 1-17 (2093,0868 Да), АКТГ фрагмент 18-39 (2465,1990 Да) и соматостатин (3147,4714 Да) [290]*. Масс-спектрометрические сигналы матрицы не учитывались при анализе спектров. Накопление спектра осуществлялось до 50000 лазерных ударов в зависимости от содержания аналита в исследуемом растворе или биологическом образце. Исследуемый образец растворялся в буфере для нанесения, который содержал раствор 0,7% трифторуксусной кислоты (V=10 мкл). В качестве матрицы использовалась слабая кислота HCCA в растворе 50% ацетонитрила и 0,7% трифторуксусной кислоты. Содержание матрицы к расчетному количеству белка в образце составляло в диапазоне от 1:1000 до 1:10,000. Смешивание образца с матрицей осуществлялось непосредственно на поверхности мишени MTP AnchorChip 384 в соотношении 1:1 (по объему).

2.7.2 Масс-спектрометрический анализ белков с применением детектора типа ионная ловушка

ВЭЖХ-МС/МС анализ белков проводили с применением масс-спектрометра LC/MSD Trap XCT Ultra (Agilent, США) в комбинации с источником ионизации chip-*ESI*-online. Параметры детектирования пептидов были следующими: режим регистрации положительных ионов, напряжение на капилляре -1800 В, температура капилляра 180°С, диапазон регистрируемых масс для прекурсорных ионов *m/z* 400-

1250, для фрагментных ионов *m/z* 200-1350, скорость газа 3,5 л/мин, зарядовое состояние прекурсорного ионе 2^+-4^+, время накопления сигнала 50 мс.

2.7.3 Масс-спектрометрический анализ белков с применением орбитальной ловушки ионов

Масс-спектрометрический анализ белков проводили с применением орбитальной ловушки ионов в соответствии с методикой, описанной в наших работах [281,282]*. «ВЭЖХ-МС/МС анализ белков проводили с применением масс-спектрометрического детектора типа орбитальная ловушка ионов *Q Exactive* (Thermo Scientific, США) в комбинации с хроматографической системой Ultimate 3000 Nano-flow HPLC (Thermo Scientific, США). Фракцию триптических пептидов (V=5 мкл) наносили на хроматографическую колонку PepMap C18 (3 мм×500 мкм, 5 мкм размер частиц) в изократическом потоке подвижной фазы С (раствор 2 % ацетонитрил, 0,08% муравьиной кислоты и 0,015% трифторуксусной кислоты) [281]*. Фракционирование триптических пептидов проводили с помощью обращенно-фазовой ВЭЖХ на колонке Acclaim PepMap C18 (75 мм×150 мкм). Подвижная фаза А представляла собой раствор 0,08 % муравьиной кислоты в 0,015 % трифторуксусной кислоте, фаза Б – раствор 0,08 % муравьиной кислоты, 0,015 % трифторуксусной кислоты в ацетонитриле. Скорость потока подвижных фаз составляла 0,4 мкл/мин» [281,282]*. Для разделения триптических пептидов использовали следующую программу градиентного элюирования: 0-20 мин (уравновешивание ВЭЖХ) 98% А, 20-100 мин градиент элюции от 98% до 65% А, 100-110 мин 10% А.

Ионизация компонентов осуществлялась методом электроспрея. Максимальное время удерживания ионов составляло 80 мс. Регистрировались ионы с зарядовым состоянием от 2^+ до 5^+. Столкновительная диссоциация при повышенной энергии *HCD* использовалась в качестве метода фрагментации пептидов-ионов [281]*. Анализ ВЭЖХ-МС/МС спектров осуществлялся с использованием программы *Mass Hunter* версия B2.0. Первичная обработка данных ВЭЖХ-МС/МС измерений

включала конвертацию файлов «*.raw» с использованием пакета приложений MSConvert (ProteoWizard) (http://proteowizard.sourceforge.net) в стандартный цифровой формат «*.mgf», который совместим со всеми протеомными поисковыми машинами.

2.7.4 Масс-спектрометрический анализ белков с применением детектора типа тройной квадруполь

Количественное масс-спектрометрическое ВЭЖХ-ММР измерение белков проводилось для смеси пептидов гидролизованного образца. Был проведен подбор параметров сканирования пептидного иона и его фрагментов для повышения чувствительности и разрешающей способности анализа, эффективности фрагментации ионов, скорости сканирования, времени накопления ионов и времени цикла.

Выбор уникальных пептидов целевых белков

Проводился отбор из базы данных Uniprot KB аминокислотных последовательностей целевых белков http://www.uniprot.org/uniprot/N.fasta, где N – идентификатор целевого белка. Проведение виртуального трипсинолиза выполнялось в программе Skyline версия 1.4 (https://sciex.com/products/software/skyline-software) со следующими настройками: окно времени – 2 мин; длина пептида – от 6 до 25; исключение N-концевых аминокислотных остатков – один; прекурсорный ион – моноизотопный; ион продукт – моноизотопный; энергия соударения – Agilent 6460; значения m/z – минимальное 50 Th, максимальное 1500 Th; точность измерения – 0,055 Th. Уникальность пептидных последовательностей подтверждалось с использованием программы Blast (http://www.uniprot.org/blast).

Был выполнен отбор фрагментных ионов для уникальных пептидов, отвечающие следующим критериям:

а) длина от 6 до 20 аминокислотных остатков;

б) молекулярная масса не более 2400 Да;

в) зарядовое состояние 2^+ или 3^+;

г) для аминокислотных последовательностей, содержащих триплет глутаминовой кислоты (EEE) или пролина (PPP), в отборе учитывали все *y*- и *b*-ионы независимо от длины и зарядового состояния пептидного иона;

д) длина фрагментного иона составляла не менее четырех аминокислотных остатков с C- или N-конца пептида;

е) коэффициент относительной гидрофобности пептида не более 60.

Анализ полученных результатов масс-спектрометрических измерений проводился с использованием программного обеспечения *Qualitative Analysis B02.00* в составе пакета программ *MassHunter* (Agilent). Учитывалось присутствие целевого пептида во всех трех технических повторениях измерений биологической пробы. Для каждого пептида в масс-спектрометрическом анализе определены хроматографические времена удерживания. Параметры измерения были следующие: напряжение на капилляре –1970 В, температура осушающего газа (азот) 280 °С, скорость потока осушающего газа 5 л/мин. Пробы термостатировались при 7 °С. Для каждого образца регистрировалась масса прекурсорного иона и массы фрагментных ионов.

Триптическая смесь поступала для анализа в сухом виде. Смесь растворяли в 100 мкл раствора 1 % муравьиной кислоты. Из каждого флакона отбирали по 5 мкл пептидной смеси и помещали в одну пробирку. Нанесение 1 мкл смеси осуществляли на обогащающую колонку Zorbax 300SB-C18 300A. Хроматографическое разделение при скорости потока 0,3 мкл/мин проводили в градиенте фазы А (раствор 0,1 % муравьиной кислоты) и Б (раствор 80 % ацетонитрила и 0,1 % муравьиной кислоты). Градиент элюции пептидов соответствовал содержанию фазы А: 0-2 мин – 95 %, 2-32 мин – 95-35 %, 32-34 мин – 35-0 %, 34-38 мин – 0%, 38-41 мин –95 %. Общее время одного анализа составило 47 мин.

2.7.5 Масс-спектрометрический анализ гидроксикамфоры и прегненолона с системой прямого ввода

В работах по оценке функциональных свойств ферментов семейства цитохромов Р450, иммобилизованных на поверхности чипов для оптического биосенсора, проводились количественные измерения содержания гидроксикамфоры и прегненолона. В экспериментах применялся детектор типа ионная ловушка с системой прямого ввода образца. Использовались коммерческие препараты бетаина, гексаметоксифосфазена концентрацией 0,150 мкМ в качестве стандартов для количественных измерений содержания гидроксикамфоры и прегненолона, соответственно [283]*. Экстракцию продуктов монооксигеназных систем из инкубационных растворов с чипов для оптического биосенсора проводили по методике, описанной в работе [284], а также в нашем исследовании [283]*. К инкубационному раствору (V=20 мкл, pH 3,0) добавляли гексан (V=200 мкл) и центрифугировали при 10000 об/мин в течение 10 мин. Затем отбирали стероидсодержащую гексановую фракцию (верхняя фракция) и высушивали с использованием вакуумного испарителя при комнатной температуре. Полученные сухие экстракты растворяли в буфере, содержащий раствор 10% ацетонитрила с 0,1 % муравьиной кислотой (V=20 мкл), для проведения масс-спектрометрических измерений [283]*.

Масс-спектрометрический анализ

В работе использовался масс-спектрометрический детектор типа ионная ловушка Agilent 1100 серии LC-MSD Trap SL с системой прямого ввода [283]*. Ввод образцов проводился с использованием капилляров «Protana» (Дания) с металлическим напылением. Напряжение на капилляре варьировалось от -900 до -1200 В, диапазон регистрируемых положительных ионов соответствовал соответствовал (*m/z*) от 100 до 400 при скорости сканирования 1650 Th/c. Скорость потока осушающего газа (азот) составляла 6 л/мин (при 250 °C) [283]*. Буфер для нанесения содержал раствор 50% ацетонитрила в 0,1 % муравьиной кислоте.

2.7.6 Масс-спектрометрический анализ гидроксилауриновой кислоты

В работах по оценке функциональных свойств фермента P450 BM3 (семейство цитохромов P450), сорбированного на поверхности АСМ-чипов, определяли содержание гидроксилауриновой кислоты с помощью направленной масс-спектрометрии (ВЭЖХ-ММР). Наработка гидроксилауриновой кислоты осуществлялась в капле объемом 40 мкл на поверхности чипа для атомно-силового микроскопа. Содержание лауриновой и гидроксилауриновой кислоты в модельных растворах определяли по площади хроматографического пика. Масс-спектрометрический анализ гидроксилауриновой кислоты проводили на масс-спектрометре Agilent 6495 (Agilent, США). Использовали хроматографическую колонку Zorbax 300SB-C18 300A. Скорость потока подвижных фаз составляла 0,3 мл/мин. Фаза А содержала ацетат аммония 5 мМ в воде, pH 7,5, фаза Б – ацетат аммония 5 мМ, ацетонитрил 50 %, изопропанол 45 % в деионизованной воде, pH 7,5. Элюцию аналита проводили в градиенте фазы А по следующей схеме: 5 мин – 95 %, 12 мин – 50 %, 22 мин – 0 %, 30 мин – 0 %, 35 мин – 95 %. Время выхода лауриновой кислоты с колонки составляло 16,5 мин [285].

Параметры фрагментации целевого аналита были следующими: режим ионизации – отрицательный, энергия декластеризации – минус 50 В, CXP (cell exit potential) – минус 3 В, *m/z* прекурсорного иона – 199,0. Ожидаемое время выхода гидроксилауриновой кислоты составляло – 8-18 мин.

2.8 Идентификация белковых компонентов

После проведения ВЭЖХ-МС/МС измерений проводилась идентификация пептидов и белков с использованием протеомных поисковых машин Mascot, OMSSA или X!Tandem, после МАЛДИ-МС измерений – с использованием Mascot. Использовали библиотеку “Swiss-Prot” для Homo sapiens, дополненную библиотекой случайно сгенерированных аминокислотных последовательностей (рандомные или инвертированные). В поисковых протеомных машинах устанавливались следующие параметры: 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 идентификаций для ионов-предшественников (FDR) составлял не более 1 % [286,287]*.

ГЛАВА 3. Обоснование применения АСМ/МС подхода

3.1 Расчетное обоснование возможности 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 [78]. В частности, атомно-силовая микроскопия (АСМ) позволяет не только визуализировать белки, но и наблюдать за «жизненным» циклом отдельной молекулы в ходе каталитического процесса. Ограничением применения методов АСМ является затруднение подсчета числа визуализированных объектов в области высоких концентраций (10^{-6} М и выше): характерно формирование сложной по топологии поверхности с чрезмерно высокой плотностью объектов [288]. В свою очередь, для данной области концентраций эффективна масс-спектрометрическая идентификация. Сочетание двух принципиально разных типов детектирования – единичных объектов со стороны АСМ и ансамбля молекул со стороны масс-спектрометрии требует понимания концентрационной зоны их пересечения – области, в которой один аналитический метод может быть верифицирован другим.

В данной главе предложен расчет эффекта концентрирования молекул белка на специально подготовленной поверхности АСМ-чипа из раствора в количестве 10^4-10^5 молекул, достаточном для масс-спектрометрической идентификации (рисунок 13). Расчет приведен для конфигураций АСМ-чипов, способы изготовления которых подробно описаны в докторской диссертации Т.О. Плешаковой (2019 г.) [289].

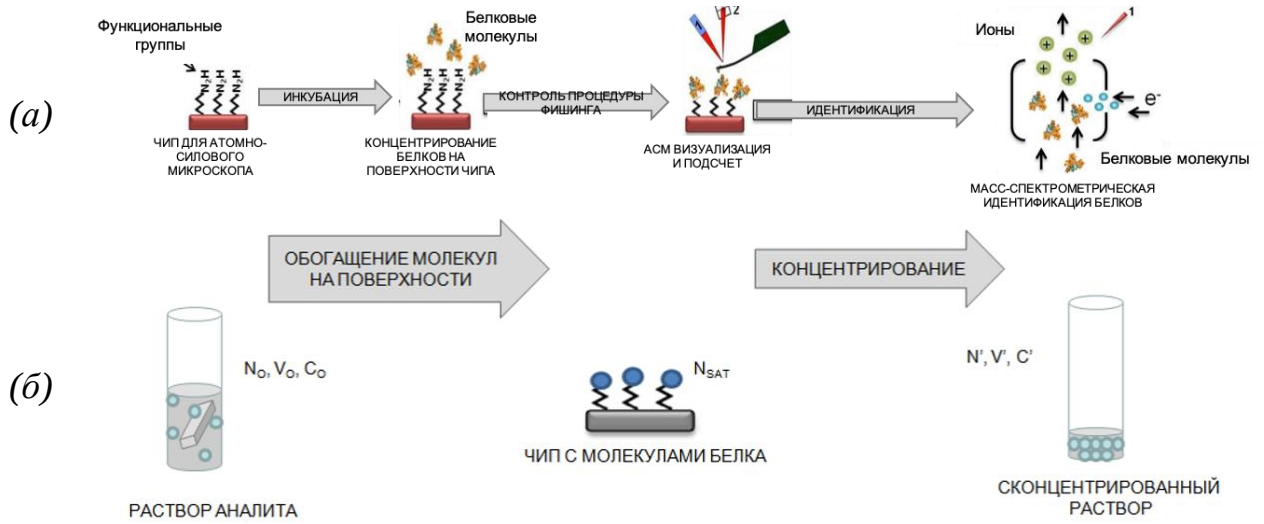


Рисунок 13. – (а) Схема химического фишинга белков на поверхности чипов для последующего анализа методами атомно-силовой микроскопии и масс-спектрометрии. (б) Принцип АСМ/МС подхода. Проводится инкубация чипа с химически активированной поверхностью в растворе аналита (объем V_O, количество частиц N_o, концентрация C_o). 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'), $V' << V_o$.

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 [8,9]*. 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). Для химического фишинга чип с функционализированной поверхностью инкубируется в растворе аналита, после чего проводится элюция пептидных фрагментов в раствор небольшого объема (см. рисунок 13*б*). В такой модели фактор концентрирования (F) целевого аналита можно определить как отношение концентраций аналита в конечном растворе (элюат) и в растворе аналита [7]*:

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

где C_o, n_o – концентрация белка и количество вещества в растворе аналита; C', n' – концентрация белка и количество вещества в конечном растворе; N_o, V_o – число молекул белка и объем раствора аналита; N_{scan} – число молекул белка на поверхности чипа, 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 [7]*. 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}):

$$\begin{cases} N_{scan} = N_0, \text{если } N_0 \leq N_{sat} \\ N_{scan} = N_{sat}, \text{если } N_0 > N_{sat} \end{cases} \quad (2)$$

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}:

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

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_o *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 $N_{scan} = N_{sat}$.

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

При сокращении V_0 получим:

$$F = \frac{S}{h^2 \times C_0 \times N_a \times V'} \quad (10)$$

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

$$\begin{cases} F = \frac{V_0}{V'}, \text{если } N_0 < N_{sat} \ (C_0 < C_{sat}) \\ F = \frac{S}{h^2 \times C_0 \times N_a \times V'}, \text{если } N_0 > N_{sat} \ (C_0 > C_{sat}) \end{cases} \quad (11)$$

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 мм^2 («малая сенсорная зона»). Для данных типичных условий найдем C_{sat}, если характерные размеры белковой молекулы составляют 2×2 нм^2 (см. раздел 1.3). Согласно формулам 4 и 5:

$$C_{sat} = \frac{N_{sat}}{N_a \times V_0} = \frac{2{,}5 \times 10^{11}}{6{,}02 \times 10^{23} \times 10^{-3}} = 0{,}4 \times 10^{-9} \text{ (М)} \quad (12)$$

Тогда в соответствии с системой уравнений (11), можно рассчитать фактор концентрирования для двух случаев:

$$\begin{cases} F = \frac{V_0}{V'} = \frac{10^{-3}}{10^{-5}} = 100 \ (\text{если } C_0 < C_{sat}) \\ F = \frac{S}{h^2 \times C_0 \times N_a \times V'} \ (\text{если } C_0 > C_{sat}) \end{cases} \quad (13)$$

Для данных типичных условий теоретический фактор концентрирования не превышает 100. Определим концентрацию аналита (C_{max}), для которой эффект концентрирования нивелирован и F=1 (согласно формуле 13):

$$1 = \frac{S}{h^2 \times C_0 \times N_a \times V'} \quad (14)$$

Из уравнения 14 определим C_{max}, как пограничное значение C_o между концентрированием и разбавлением (F=1):

$$C_{max} = \frac{1}{4 \cdot 10^{-12} \times 6{,}02 \cdot 10^{23} \times 10^{-5}} = 4 \cdot 10^{-8}\ (\text{М}) \quad (15)$$

Результаты расчета представлены в графическом виде на рисунке 14. Согласно полученным результатам расчета 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}) (рисунок 14) [7]*. Как показано на рисунке 14*а*, с повышением концентрации исходного раствора аналита значение F снижается (см. уравнение 13). 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 $>4 \cdot 10^{-8}$М (на рисунке 14*а* 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 рисунке 14*а* отмечена красным цветом). Нижний концентрационный предел АСМ/МС подхода ограничен чувствительностью масс-спектрометрического детектора.

(а) *(б)*

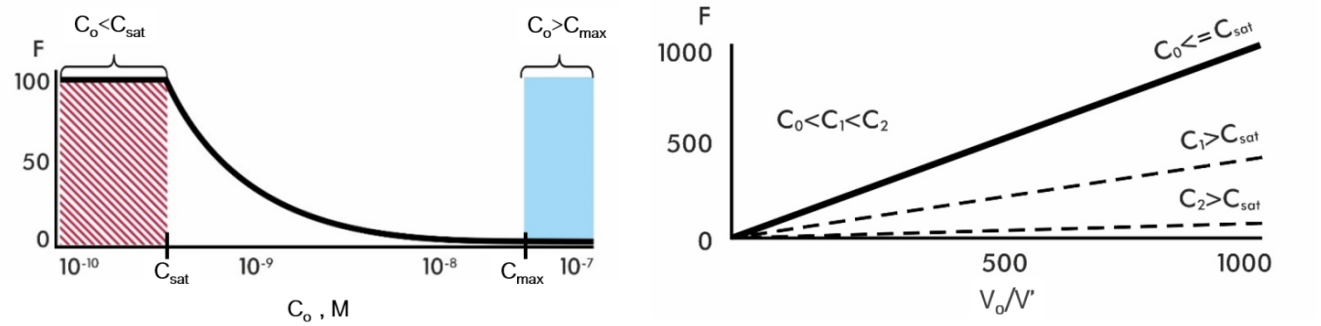


Рисунок 14. – Расчетное обоснование применения ACM/MC подхода. (а) Оценка зависимости фактора концентрирования (F) от концентрации аналита в растворе (C_o, М). Условия для расчета: «малая» сенсорная зона чипа, объем исходного раствора аналита 1 мл, объем конечного раствора 10 мкл, насыщающая концентрация $C_{sat}=0,4\times10^{-9}$ М, $C_{max}=4\times10^{-8}$ 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.

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) (рисунок 14*б*). 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 [7]*. 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.

3.2 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 (HCVcoreAg), бактериального (P450 BM3), растительного (пероксидаза C1A) происхождения, а также белками млекопитающих (см. раздел 2.3).

В экспериментах использованы поверхности с «малой» сенсорной зоной, для которых проводилась процедура химического фишинга молекул белков из растворов аналита (V_o=1 мл) с концентрацией от 10^{-5} до 10^{-11} М. Масс-спектрометрический анализ выполняли с использованием времяпролетного детектора. На рисунке 15 представлены наименьшие значения концентраций растворов (C_{min}), для которых удалось идентифицировать белки.

При значении концентрации белка в растворе аналита $0{,}4\times10^{-9}$ 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 15). Синяя кривая на рисунке 15 представлена двумя функциями, которые характеризуют эффект концентрирования для случаев: (1) концентрация раствора аналита ниже концентрации насыщения ($\boldsymbol{C_0 < C_{sat}}$), то есть фактор насыщения F=100 (на рисунке 15 область отмечена красным цветом) и (2) концентрация раствора аналита превосходит концентрацию насыщения ($\boldsymbol{C_0 > C_{sat}}$). Отметим, что в последнем случае F стремится к нулю с повышением концентрации раствора аналита (голубая область на рисунке 15).

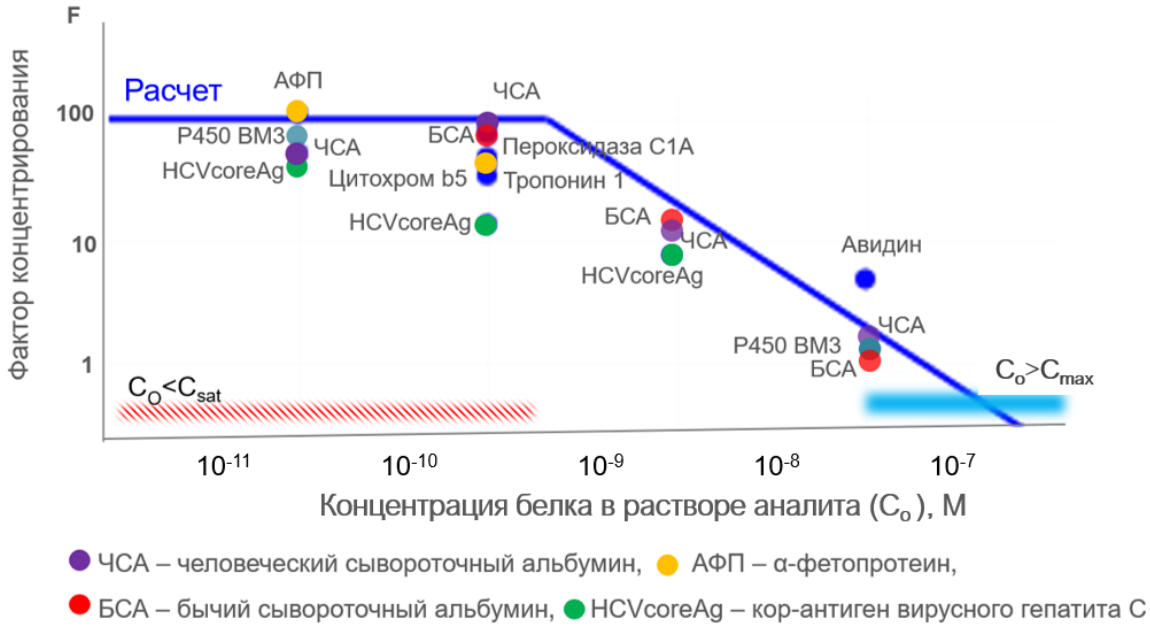


Рисунок 15. – Экспериментальное подтверждение расчетной модели концентрирования в результате химического фишинга. Синяя линия соответствует расчетному обоснованию функции зависимости фактора концентрирования (F) от концентрации аналита в растворе. Точками отображены экспериментальные значения C_{min}, определенные для разных белков. Измерения выполнены на масс-спектрометре Autoflex III (Bruker, Германия).

Для белков, у которых начальная концентрация в растворе соответствовала $\boldsymbol{C_0 < C_{sat}}$, 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 [291].

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

ГЛАВА 4. Разработка методик для масс-спектрометрического анализа в АСМ/МС подходе

Процедуры предварительной подготовки чипов для масс-спектрометрического анализа включали ферментативный гидролиз белка, элюцию триптической смеси с поверхности чипа, концентрирование или обессоливание смеси пептидов. В настоящей главе диссертационной работы представлены результаты разработки процедур подготовки чипов в части выбора и обоснования (а) состава гидролитической смеси, (б) условий проведения гидролиза для разных материалов и конфигурации чипов, а также (в) определение оптимальных условий подготовки конечных растворов (элюат) для последующего МС-анализа. Процедуры предварительной подготовки 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.

4.1 Подбор состава смеси для гидролиза белков на поверхности чипа

В работе осуществлен выбор состава смеси для гидролиза «в объеме» (вариант 1) и «на поверхности» (вариант 2).

Основным компонентом смеси для гидролиза белков являлась сайт-специфичная гидролаза трипсин, содержание которой по рекомендации производителя определяется из соотношения к общему белку в исследуемом образце 1:100. Трипсин активен в слабощелочных условиях, поэтому вторым компонентом смеси для гидролиза был выбран бикарбонатный буфер (NH_4HCO_3) с молярной концентрацией 200 мМ [292]. Бикарбонатный буфер характеризуется умеренной емкостью в области pH 7,5-8,0 (физиологические значения pH для крови).

Помимо этих основных компонентов смесь для гидролиза белковых образцов содержала мочевину концентрацией до 2 М, при которой модифицированный трипсин сохраняет стабильность и биологическую активность. Присутствие в смеси для гидролиза мочевины обеспечивало денатурацию молекул белка в состояние

«расплавленной» глобулы и экспонирование сайтов для трипсинолиза на растворитель. Смесь для гидролиза включала дитиотреитол (ДТТ) до 5 мМ, который осуществлял восстановление дисульфидных связей в белке, что также приводило к потере четвертичной и третичной структуры белка и экспонированию сайтов для трипсинолиза на растворитель. Денатрутрирующий агент гуанидинхлорид не был включен в состав компонентов смеси для гидролиза, поскольку ингибирует активность фермента. Ингибирование гидролиза осуществлялось добавлением раствора трифторуксусной кислоты до конечного содержания 1 %.

В таблице 13 представлены варианты составов смесей для гидролиза белков, отличные по компонентному составу. В соответствии с представленным выше кратким описанием возможных компонентов, смеси для гидролиза содержали основные компоненты – трипсин и бикарбонатный буфер, обеспечивающий оптимальные для ферментного препарата условия (варианты №1-1 для гидролиза «в объеме» и №2-1 для гидролиза «на поверхности» в таблице 13). Также рассмотрены варианты смесей более сложного состава, содержащие помимо основных компонентов, денатурирующие агенты мочевину (варианты №1-2 и №2-2) и дитиотреитол (вариант №1-3). Для гидролиза «на поверхности» учитывалось содержание глицерина, обеспечивающего повышение вязкости инкубационного раствора (вариант №2-3).

Таблица 13. Выбор состава гидролитической смеси для варианта 1 «в объеме» и варианта 2 «на поверхности».

Номер состава	Состав гидролитической смеси для варианта 1 «в объеме»
№1-1	NH_4HCO_3, 200 мМ, трипсин 0,1 мкМ (1÷50 по отношению к расчетной массе белка)
№1-2	NH_4HCO_3, 200 мМ, трипсин 0,1 мкМ, 2 М мочевина
№1-3	NH_4HCO_3, 200 мМ, трипсин 0,1 мкМ, дитиотреитол 2,5 мМ
№1-4	NH_4HCO_3, 200 мМ, трипсин 0,1 мкМ, 2 М мочевина, 1 % ацетонитрил
	Состав гидролитической смеси для варианта 2 «на поверхности»
№2-1	NH_4HCO_3, 200 мМ, трипсин 0,1 мкМ (~1÷50 по отношению к расчетной массе белка)
№2-2	NH_4HCO_3, 200 мМ, трипсин 0,1 мкМ, 2 М мочевина
№2-3	NH_4HCO_3, 200 мМ, трипсин 0,1 мкМ, 20 % глицерин

На рисунке 16 представлены экспериментальные результаты, полученные для разных по составу смесей для гидролиза «в объеме» (рисунок 16*а*) и «на поверхности» (рисунок 16*б*).

Вариант 1 «в объеме» – выбор состава смеси для гидролиза белков при погружении чипа в гидролитическую смесь.

Гидролиз белковых объектов, иммобилизованных на функционализированной поверхности чипа, осуществляли в микроцентрифужных пробирках с плоским дном типа «Corning» объёмом 2 мл. Соотношение массы трипсина к расчетной массе белка составило 1:5, продолжительность инкубации при температуре 45°С 18 ч. Конфигурация чипа (тип слюда) для АСМ содержала одну зону площадью 0,5 см^2.

Как видно на рисунке 16*а*, эффективность гидролиза белка для выбранных составов схожа. Однако, предпочтительным для проведения МС-анализа является состав с минимальным количеством компонентов (на рисунке 16*а* вариант №1-1). МАЛДИ и ионизация методом электроспрея белковых фрагментов наиболее эффективна для растворов с низкой ионной силой и содержанием электролитов [293]. В случае лазерной десорбции и ионизации, на поверхности МАЛДИ-мишени из растворов высокой ионной силы формируются кристаллы, в решетке которых находятся молекулы аналита. Мощность лазерного удара не обеспечивает эффективного испарения молекул с кристалла для последующей ионизации. На эффективность ионизации методом электроспрея также большое влияние оказывают ионы раствора (электролиты). Такое влияние описывает модель равновесного распределения Энке, согласно которой эффективность ионизации белка/пептида обратно пропорциональна концентрации электролита в растворе. Оптимально содержание аналита в растворе на четыре порядка выше по сравнению с концентрацией электролита [293].

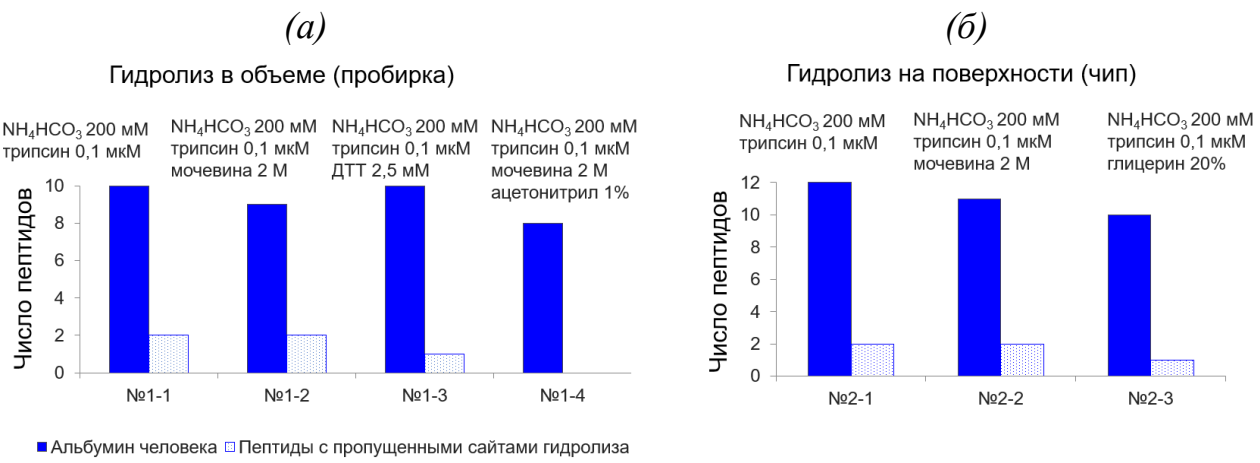


Рисунок 16. – Выбор состава гидролитической смеси: (а) Вариант 1 «в объеме»; (б) Вариант 2 «на поверхности». Указана концентрация бикарбонатного буфера, количество трипсина, мочевины, ДТТ, ацетонитрила в смеси. Гистограммы отображают результаты масс-спектрометрических измерений (Autoflex III, Bruker, Германия) для чипов после инкубации в растворе альбумина человека с концентрацией 10^{-7} М. Указаны количество идентифицированных пептидов белков (сплошная заливка) и количество пептидов с пропущенными сайтами гидролиза (градиентная заливка) с соотношением сигнал/шум > 2.

При выборе состава смеси для гидролиза важно учитывать физико-химические характеристики белка, в том числе молекулярный вес, долю альфа-спиралей в структуре белка, наличие четвертичной или компактной третичной структуры, дисульфидных связей, углеводного компонента (гликопротеины). Глобулярные альфа- и альфа/бета белки со средним молекулярным весом (20-50 кДа) с компактной третичной структурой с отсутствием дисульфидных связей и углеводного компонента могут быть эффективно гидролизованы составом №1-1.

Вариант 2 «на поверхности» – выбор состава смеси для гидролиза белков. Гидролитическая смесь наносится и выдерживается на поверхности чипа. В случае проведения гидролиза на поверхности чипа в капле важно учитывать компоненты, которые повышают поверхностное натяжение капли. Компактная капля высокой вязкости и поверхностного натяжения позволяет увеличить продолжительность гидролиза в жидкой фазе по сравнению с составом №2-1. Таким компонентом является глицерин. Вязкость 20 % раствора глицерина на шесть порядков выше по сравнению с водой [294]. При этом глицерин хорошо растворим в воде.

Гидролиз белков осуществляли на поверхности чипа для АСМ с вариантами состава смеси, указанными в таблице 13. Как видно на рисунке 16*б,* эффективность гидролиза белка для выбранных составов смеси одинакова, однако, предпочтительным для МС-анализа является состав с минимальным количеством компонентов (вариант №2-1). Присутствие в смеси для гидролиза компонента для повышения вязкости смеси не повлияло на скорость высыхания капли на поверхности чипа. Капля со смесью для гидролиза обновлялась дважды за время инкубации для каждого состава смеси.

Таким образом, оба варианта гидролиза («в объеме» и «на поверхности») успешны и могут применяться на этапе предварительной подготовки поверхностей чипов для последующего масс-спектрометрического анализа, при этом целесообразен выбор состава смеси для гидролиза с наименьшим количеством компонентов.

4.2 Подбор условий проведения гидролиза белков на поверхности чипа

В работе осуществлен выбор условий проведения гидролиза «в объеме» (вариант 1) и «на поверхности» (вариант 2) для разных конфигураций чипов для АСМ, содержания в смеси фермента трипсина, объема смеси для гидролиза и продолжительности проведения процедуры. Условия проведения гидролиза «в объеме» и «на поверхности» представлены в таблице 14. В работе рассмотрены варианты различного содержания в смеси для гидролиза трипсина, с соотношением массы трипсина к расчетной массе белка 1:100, 1:50, 1:5, продолжительности инкубации при температуре 45 ^{o}C в диапазоне от 6 до 18 часов, объема смеси для гидролиза в диапазоне от 100 до 900 мкл для гидролиза «в объеме» и 5, 10 мкл для гидролиза «на поверхности». В работе использовали типичные в экспериментах конфигурации чипов для АСМ: на поверхности чипов, изготовленных из слюды, были организованы от одной («большая») до четырех («малых») сенсорных зон. Изготовленные из графита поверхности чипов содержали одну («малую») сенсорную зону.

Таблица 14. Выбор условий проведения гидролиза белков, иммобилизованных на поверхности АСМ-чипа, «в объеме» и «на поверхности».

Вариант условий	Содержание трипсина к белку, (весовые части)	Время гидролиза, часы	Конфигурация чипа, число зон	Объем смеси для гидролиза, мкл
Гидролиз «в объеме» (Вариант 1)				
№1-1	1:100	6	1	900
№1-2	1:100	12	1	900
№1-3	1:50	12	1	900
№1-4	1:5	12	1	900
№1-5	1:5	18	1	900
№1-6	1:50	6	2	350
№1-7	1:50	12	2	350
№1-8	1:50	18	2	350
№1-9	1:50	12	4	100
№1-10	1:50	18	4	100
Гидролиз «на поверхности» (Вариант 2)				
Слюда				
№2-1	1:50	12	2	10
№2-2	1:5	12	2	10
№2-3	1:50	18	2	10
№2-4	1:5	18	2	10
Графит				
№2-5	1:50	18	1	5
№2-6	1:5	18	1	5
№2-7	1:50	12	1	5
№2-8	1:5	12	1	5

Результаты получены для АСМ/МС подхода в сочетании с химическим фишингом белков для поверхности тип слюда, и сорбцией белков для поверхности тип графит. Результаты масс-спектрометрических измерений в серии экспериментов по подбору условий гидролиза обобщены на рисунке 17.

Для варианта 1 «в объеме», представлены условия проведения гидролиза белков при погружении чипа в гидролитическую смесь. Как видно на рисунке 17*а*, 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.

Проведение процедуры обессоливания и концентрирования пептидной смеси с использованием твердофазной экстракции («ZipTip» C18) позволило снять это ограничение (раздел 4.3).

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 затруднена, 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 17*а* см. варианты условий №1-9 и №1-10).

Варианты условий гидролиза «на поверхности», в которых гидролитическая смесь наносится и выдерживается на поверхности сенсорной зоны чипа, представлены на рисунке 17*б*. Как видно на рисунке 17*б*, также как и для варианта гидролиза «в объеме», важным условием является продолжительность процедуры и высокое содержание фермента в смеси для гидролиза (на рисунке 17*б* см. №2-4 и №2-8). Предпочтительными условиями гидролиза в этом случае являются: продолжительность проведения процедуры от 12 до 18 часов, высокое содержание в смеси трипсина 1:50 или 1:5 (по отношению к расчетному количеству белка в конечном растворе).

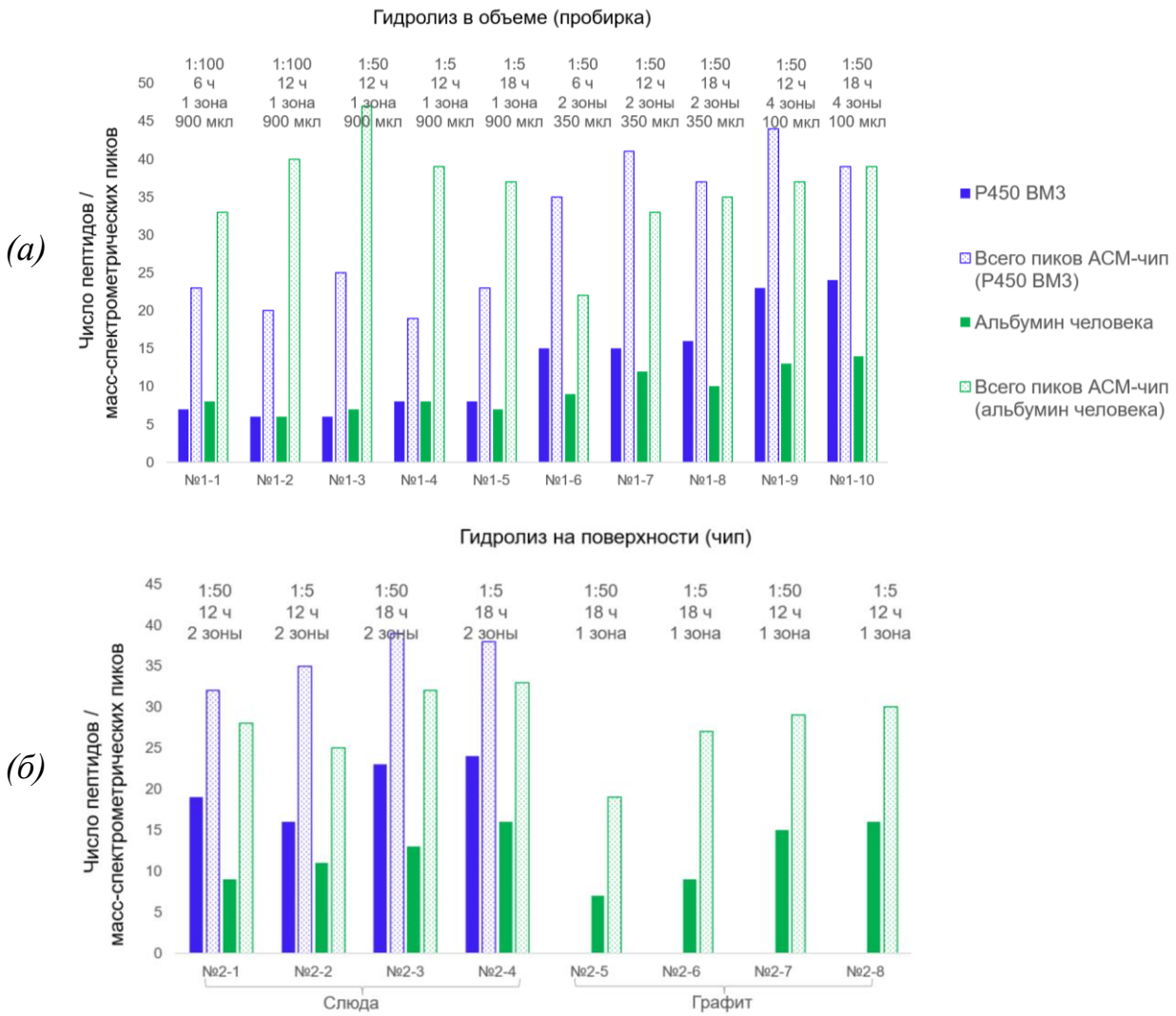


Рисунок 17. – Выбор условий проведения гидролиза: (а) Вариант 1 «в объеме»; (б) Вариант 2 «на поверхности». Указано соотношение трипсина к белку (1:100, 1:50 или 1:5), продолжительность гидролиза (6, 12 или 18 ч), число сенсорных зон (1, 2 или 4), а также объем смеси для гидролиза (900, 350, 100 мкл). 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.

Таким образом, для вариантов «в объеме» и «на поверхности» предпочтительными условиями проведения процедуры гидролиза являются высокое содержание гидролазы трипсина в инкубационной среде и продолжительность инкубации (12-18 часов), а также минимально возможный объем смеси для гидролиза. В зависимости от конфигурации чипа целесообразно применение одного из вариантов. В случае организации на поверхности нескольких сенсорных зон

(слюда) рекомендуется 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.

4.3 Подготовка конечных растворов (элюатов) для масс-спектрометрического анализа

Процедура гидролиза белка завершалась высушиванием триптической смеси в пробирке типа «Эппендорф» объемом 200 мкл. Как отмечалось выше, наличие в исследуемом образце электролитов препятствует ионизации аналита с использованием методов МАЛДИ и электроспрея. Процедура обессоливания образцов с применением наконечников «ZipTip C18» обеспечивает удаление детергентов (додецилсульфат натрия) и концентрирование пептидной смеси [295]. Снижение негативного вклада электролитов может быть достигнуто путем разбавления анализируемого образца. Последний вариант является наиболее экономичным, производительным и стабильным по результатам измерений. Процедуры предварительной подготовки смеси пептидов (после процедуры гидролиза) для последующего МС-анализа включают обессоливание и концентрирование пептидной смеси, растворение смеси пептидов в растворе для нанесения мишень (МАЛДИ-МС), хроматографическую колонку (ВЭЖХ-МС/МС, ВЭЖХ-ММР). В работе рассмотрены варианты подготовки конечных растворов, которые представляли собой триптические смеси, элюированные с поверхности чипа (таблица 15).

Таблица 15. Подготовка конечных растворов (элюатов) для масс-спектрометрического анализа.

№1	№2	№3	№4	№5
Способ подготовки элюатов	Вариант способа	Ультразвуковое озвучивание, мин	Объем конечного раствора, мкл	Число процедур до МС-анализа
Растворение	№1-1	5	5	1
	№1-2	5	10	1
Обессоливание	№1-3	5	5	5
	№1-4	5	10	5
Разбавление	№1-5	5	10	2
	№1-6	5	20	2

Варианты подготовки высушенной пептидной смеси (элюата) в работе представлены: (а) растворением с последующим нанесением на мишень (МАЛДИ-МС) или хроматографическую колонку (ВЭЖХ-МС/МС), (б) обессоливанием с применением наконечников «ZipTip C18» содержащие обращеннофазовую смолу и (в) разбавлением раствором для нанесения.

В таблице 15 столбец №5 содержит информацию о количестве процедур, предшествующих проведению масс-спектрометрических измерений. Как видно из таблицы 15, число таких процедур для выбранных способов подготовки элюатов различно. В случае растворения смеси пептидов в растворе для нанесения применялась кратковременная ультразвуковая обработка раствора элюата (одна процедура, столбец №5 в таблице 15). Способ обессоливания триптической смеси с применением наконечников «ZipTip C18» включал: (а) растворение элюата в растворе для нанесения, (б) кратковременную обработку раствора элюата ультразвуком, (в) обессоливание, (г) высушивание обессоленной смеси в вакуумном испарителе для последующей замены буфера, (д) растворение смеси пептидов в растворе для нанесения (5 процедур, столбец №5 в таблице 15). И, наконец, третий способ предварительной подготовки смеси пептидов путем кратного разбавления включал процедуру растворения элюата в растворе для нанесения и последующее озвучивание растворенной смеси пептидов в ультразвуковой камере (2 процедуры).

Как видно на рисунке 18, для вариантов обессоливания и разбавления были получены сопоставимые результаты. При этом данные варианты более эффективны по результатам масс-спектрометрических измерений по сравнению с растворением

смеси пептидов в растворе для нанесения. В последнем случае наличие электролитов в составе пептидной смеси, вероятно, препятствовали ионизации аналита.

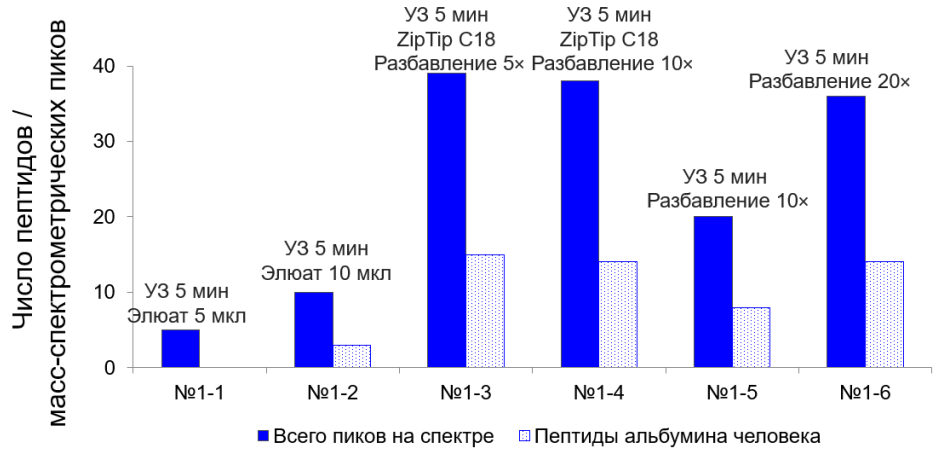


Рисунок 18. – Выбор условий элюции. Указана продолжительность ультразвукового воздействия (УЗ), объем элюата, использование процедуры обессоливания с использованием «ZipTip C18» и разбавление элюата в 5 и 10 раз. Гистограммы отображают результаты масс-спектрометрических измерений (Autoflex III, Bruker, Германия) для чипов после инкубации в растворе альбумина человека с концентрацией 10^{-7} М. Указаны количество идентифицированных пептидов белков (градиентная заливка) и общее число масс-спектрометрических пиков (сплошная заливка) с соотношением сигнал/шум > 2.

Таким образом, эффективными являются способы подготовки конечных растворов разбавление и обессоливание. Разбавление для подготовки конечных растворов (элюатов) для последующего масс-спектрометрического анализа может применяться с ограничениями. Количество белка, иммобилизованного на поверхности сенсорной зоны чипа, с учетом последующего разбавления, должно быть достаточным для проведения МС-анализа. Результаты исследований по определению возможных диапазонов концентраций для растворов аналита, при которых комбинация АСМ-фишинга и масс-спектрометрии может быть успешно применена для детектирования белков, подробно описаны в Главе 5.

4.4 Подбор условий хранения образцов плазмы крови с использованием мембранного носителя

За последние два десятилетия технология транспортировки и хранения биологических образцов с использованием специально подготовленных мембранных носителей, обозначенная как технология сухой капли крови (СКК), получила широкое распространение в лабораторной и клинической практике. В технологии СКК на поверхность мембранного носителя сорбируются биологические молекулы из исследуемого образца для последующего проведения качественных и количественных аналитических измерений. Преимуществами такой технологии являются использование небольшого объема биологического образца, удобная транспортировка, возможность длительного хранения, а также высокая стабильность молекулярных компонентов образца. В настоящем разделе представлены результаты исследования сохранности сорбированных на мембранном носителе гидролизованных образцов плазмы крови для разных температурных режимов и продолжительности хранения. Исследование было проведено для шести образцов плазмы крови условно-здоровых участников (n=3) и пациенток с установленным диагнозом рак яичников (n=3).

В качестве носителя использовали мембранные полоски из стекловолокна с шириной 0,5 см (производства ООО «Иммуновед», Россия). Участок мембраны (5 мм) погружался в исследуемый образец. После высушивания мембранного носителя в воздушной среде при комнатной температуре проводился анализ стабильности компонентов в биологических образцах для следующих временных точек: непосредственно после нанесения биообразца, а также спустя 7, 14, 21, 35-е сутки хранения. Температурные режимы хранения соответствовали: –20, +4 и +25^{o}C.

На первом этапе была проведена подготовка СКК с нанесенным биологическим образцом для следующих вариантов: предварительная экстракция белков с поверхности мембранного носителя (вариант 1) и гидролиз белков непосредственно на поверхности мембранного носителя (вариант 2).

Вариант 1 – «Экстракция белков с поверхности мембранного носителя»

Сектор мембранного носителя помещался в пробирку с раствором ацетонитрила (V=200 мкл), проводилась процедура ультразвуковой обработки носителя в течение 10 мин. Затем раствор с экстрагированными компонентами высушивался в вакуумном испарителе при комнатной температуре. Процедуры предварительной подготовки проводились в соответствии с разделом 2.6.

Вариант 2 – «Гидролиз белков на поверхности мембранного носителя»

Мембранный носитель с нанесенным биообразцом помещался в пробирку с раствором 200 мМ бикарбонатного буфера (V=20 мкл) и 5 мкМ трипсина для проведения процедуры гидролиза (12 часов). Гидролизованный образец на поверхности СКК обрабатывался ультразвуком в течение 3 мин и высушивался в вакуумном испарителе при комнатной температуре с последующим растворением в 0,7% ТФУ (V=20 мкл) для проведения масс-спектрометрических измерений.

На втором этапе для двух вариантов предварительной подготовки СКК проведен анализ стабильности компонентов плазмы крови в зависимости от продолжительности хранения (до 35-и суток) и температурного режима (–20, +4 и +25^{o}C). Оценка стабильности образцов при разных условиях хранения осуществлялась путем характеризации наиболее интенсивных пиков в спектре, зарегистрированных в МАЛДИ-МС анализе.

Анализ масс-спектрометрических измерений позволил определить десять *m/z* характеристик, которые были зарегистрированы во всех биологических образцах в нулевой временной точке, то есть непосредственно после нанесения на СКК. Результаты анализа стабильности образцов плазмы крови с использованием мембранного носителя для разных вариантов температурных режимов хранения представлены на рисунке 19.

Рисунок 19. – Результаты анализа стабильности образцов плазмы крови с использованием мембранного носителя. Характеристики m/z указаны справа; p-значения для групп сравнения образцов в зависимости от продолжительности хранения СКК указаны квадратными скобками. Данные представлены для двух вариантов предварительной обработки биообразцов. Значимым изменениям интенсивности m/z характеристик соответствовало p<0.05 (адаптировано из [296]).*

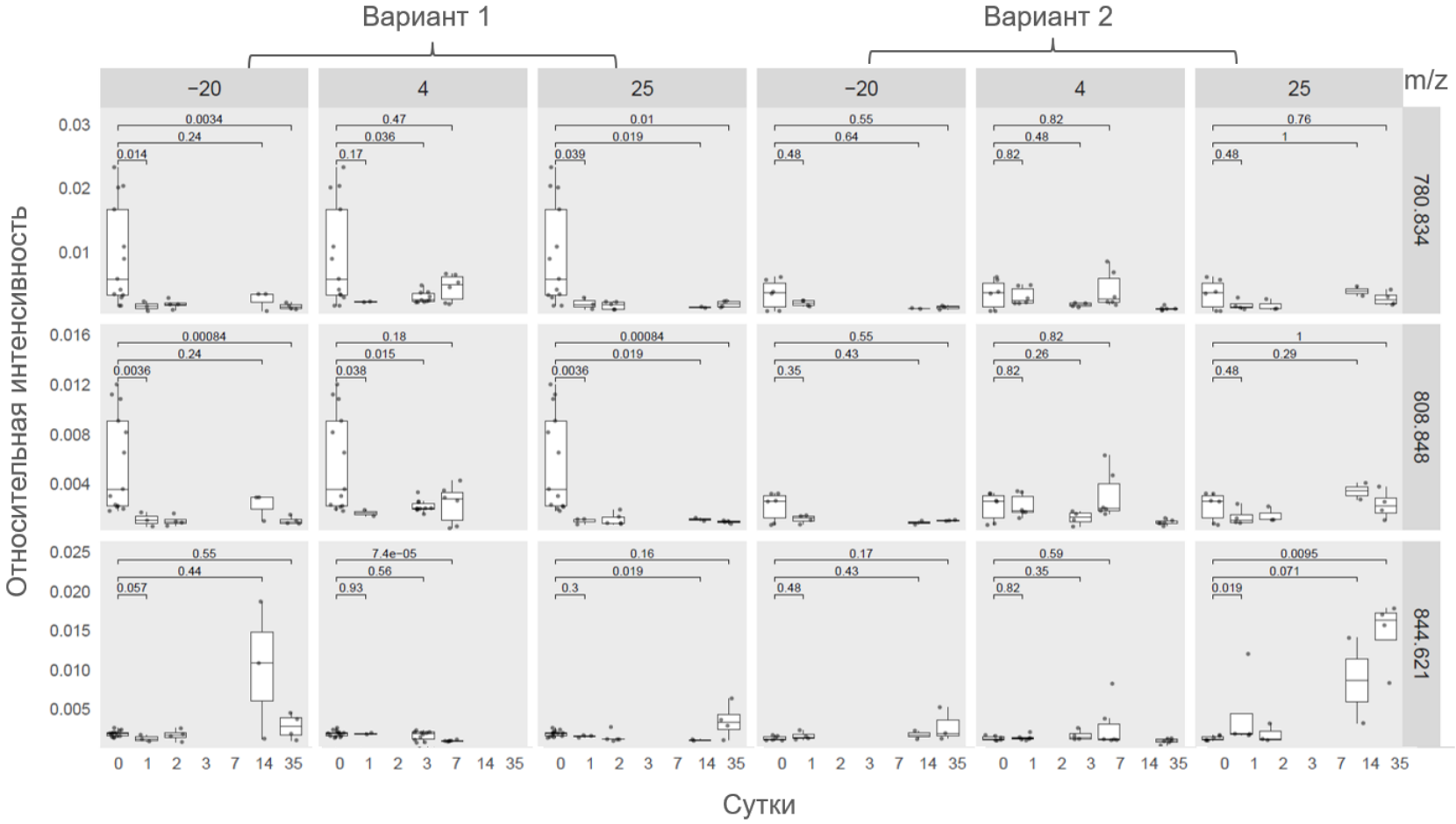


Рисунок 19 (продолжение). – Результаты анализа стабильности образцов плазмы крови с использованием мембранного носителя.

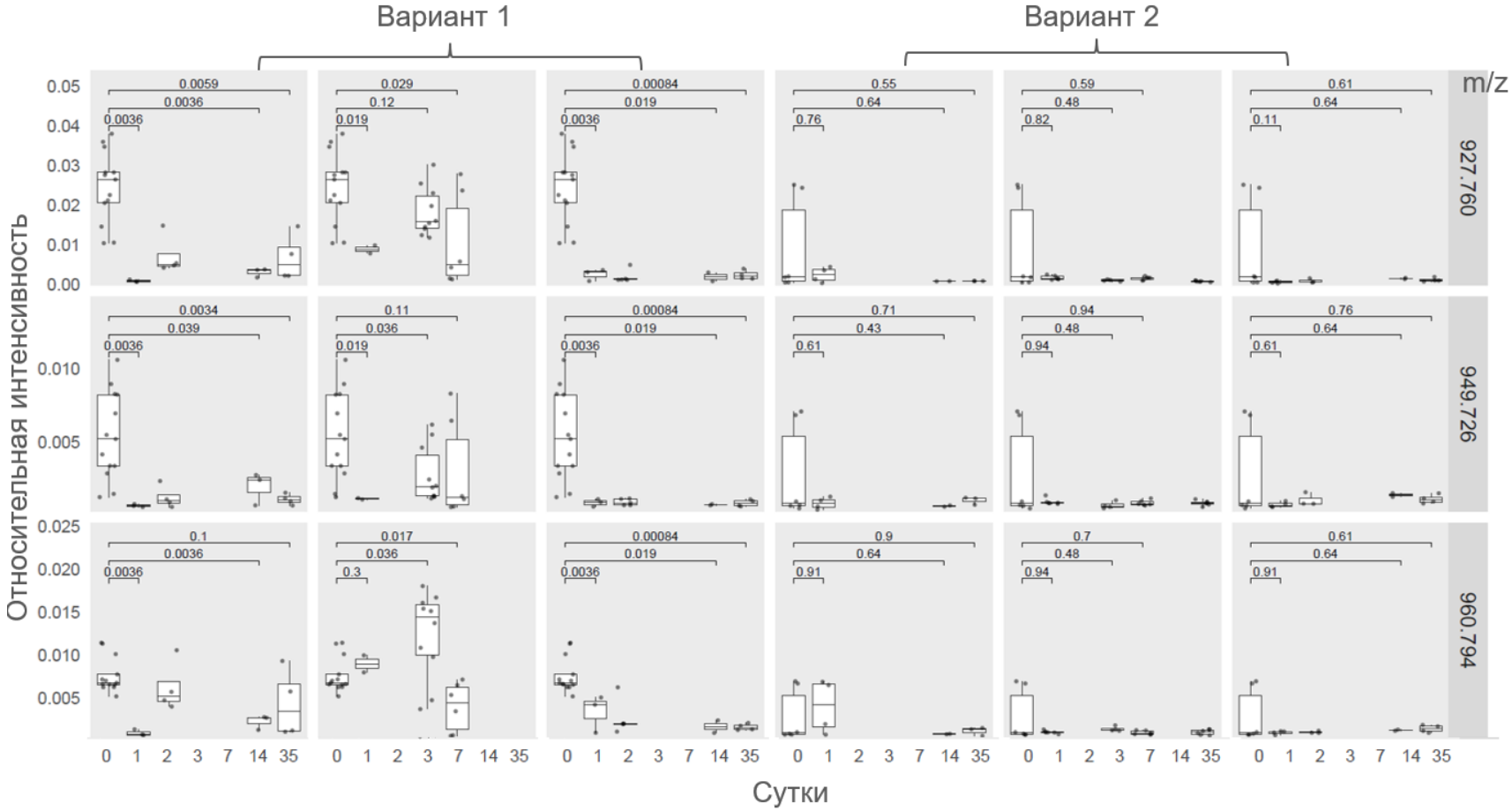
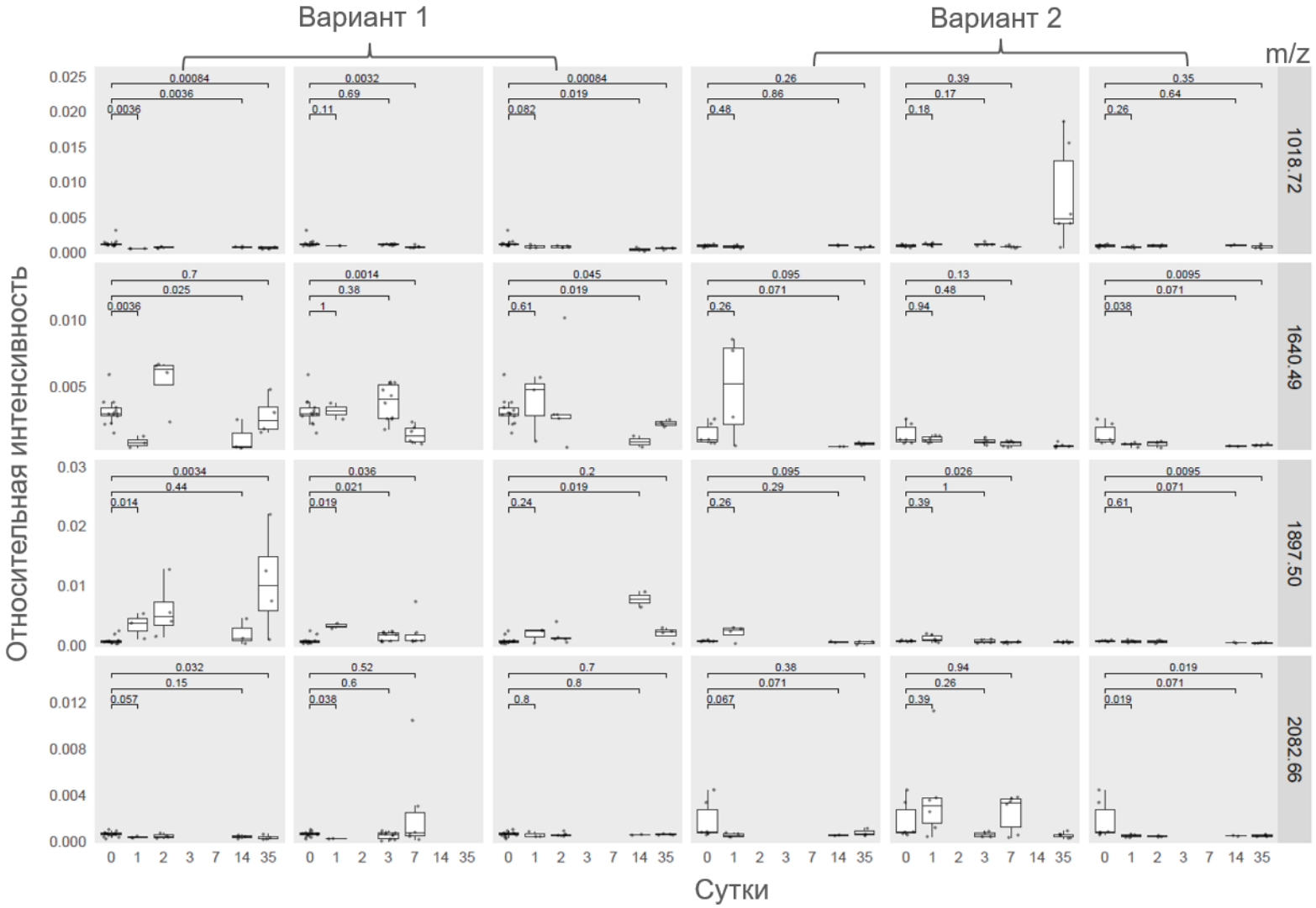


Рисунок 19 (продолжение). – Результаты анализа стабильности образцов плазмы крови с использованием мембранного носителя.



Как видно из рисунка 19, при непродолжительном хранении мембранного носителя с адсорбированными компонентами плазмы крови (до семи суток), приготовленных в соответствии с вариантом 1, наблюдаются значительные изменения содержания выбранных компонентов (*m/z* характеристики на рисунке 19 указаны справа) для выбранных температурных режимов. Напротив, для варианта 2 наблюдается неизменность содержания компонентов для температурных режимов – 20°C и +4°C в течение всего срока наблюдений (35 суток). Для режима хранения при температуре +25°C изменение содержания компонентов наблюдаются после 14-и суток хранения (таблица 16).

Таблица 16. Результаты анализа стабильности образцов плазмы крови с использованием мембранного носителя: p-значения для групп сравнения биообразцов для выбранных характеристик m/z.

Вариант 1				Вариант 2		
Хранение при –20°C, p-значения						
m/z	7е сутки	14е сутки	35е сутки	7е сутки	14е сутки	35е сутки
780,834	0,014	0,24	0,0034	0,48	0,64	0,55
808,848	0,0036	0,24	0,00084	0,35	0,43	0,55
844,621	0,057	0,44	0,55	0,48	0,43	0,17
927,760	0,0036	0,0036	0,0059	0,76	0,64	0,55
949,726	0,0036	0,039	0,0034	0,61	0,43	0,71
960,794	0,0036	0,0036	0,1	0,91	0,64	0,9
1018,72	0,0036	0,0036	0,00084	0,48	0,86	0,26
1640,49	0,0036	0,025	0,7	0,26	0,071	0,0095
1897,50	0,014	0,44	0,0034	0,26	0,29	0,095
2082,66	0,057	0,15	0,032	0,067	0,071	0,38
Хранение при +4°C, p-значения						
780,834	0,17	0,036	0,47	0,82	0,48	0,82
808,848	0,038	0,015	0,18	0,82	0,26	0,82
844,621	0,93	0,56	0,000074	0,82	0,35	0,59
927,760	0,019	0,12	0,029	0,82	0,48	0,59
949,726	0,019	0,036	0,11	0,94	0,48	0,94
960,794	0,3	0,036	0,017	0,94	0,48	0,7
1018,72	0,11	0,69	0,0032	0,18	0,17	0,39
1640,49	1	0,38	0,0014	0,94	0,48	0,13
1897,50	0,019	0,021	0,036	0,396	1	0,026
2082,66	0,038	0,6	0,52	0,39	0,26	0,071

Фоном отмечены значимые изменения интенсивностей масс-спектрометрического сигнала относительно значений нулевой временной точки (непосредственно после нанесения биообразца), для которых $p<0.05$ (адаптировано из [296]).*

Таблица 16 (продолжение). Результаты анализа стабильности образцов плазмы крови с использованием мембранного носителя

Хранение при +25°C, p-значения						
780,834	0,039	0,019	0,01	0,48	1	0,76
808,848	0,0036	0,019	0,00084	0,48	0,29	1
844,621	0,3	0,019	0,16	0,019	0,071	0,0095
927,760	0,0036	0,0036	0,0059	0,11	0,64	0,16
949,726	0,0036	0,0019	0,00084	0,61	0,64	0,76
960,794	0,0036	0,019	0,00084	0,91	0,64	0,61
1018,72	0,082	0,019	0,00048	0,26	0,64	0,35
1640,49	0,61	0,019	0,045	0,038	0,071	0,0095
1897,50	0,24	0,019	0,2	0,61	0,071	0,0095
2082,66	0,8	0,8	0,7	0,019	0,071	0,019

Фоном отмечены значимые изменения интенсивностей масс-спектрометрического сигнала относительно значений нулевой временной точки (непосредственно после нанесения биообразца), для которых $p<0.05$ (адаптировано из [296]).*

Как видно из таблицы 16, целесообразно применение варианта 2, в котором гидролиз белков осуществляется на поверхности мембранного носителя. Данный вариант продемонстрировал наиболее стабильный результат.

На рисунках 20*а* и 20*б* проедставлены типичные спектры МАЛДИ, полученные для гидролизатов образцов плазмы крови, экстрагированных с СКК в соответствии с вариантом 1 или 2 при хранении в течение 35-и суток при –20°C. Как видно на рисунке 20*а*, удалось зарегистрировать две из десяти характеристик *m/z* (вариант 1). Изменение интенсивностей регистрируемых спектральных характеристик, вероятно, свидетельствует об изменении компонентного состава исследуемого образца. На том же рисунке 20*б* видно, что в результате хранения образца в указанных выше условиях удается зарегистрировать шесть из десяти характеристик *m/z*, что свидетельствует о стабильности содержания выбранных компонентов образца в результате хранения.

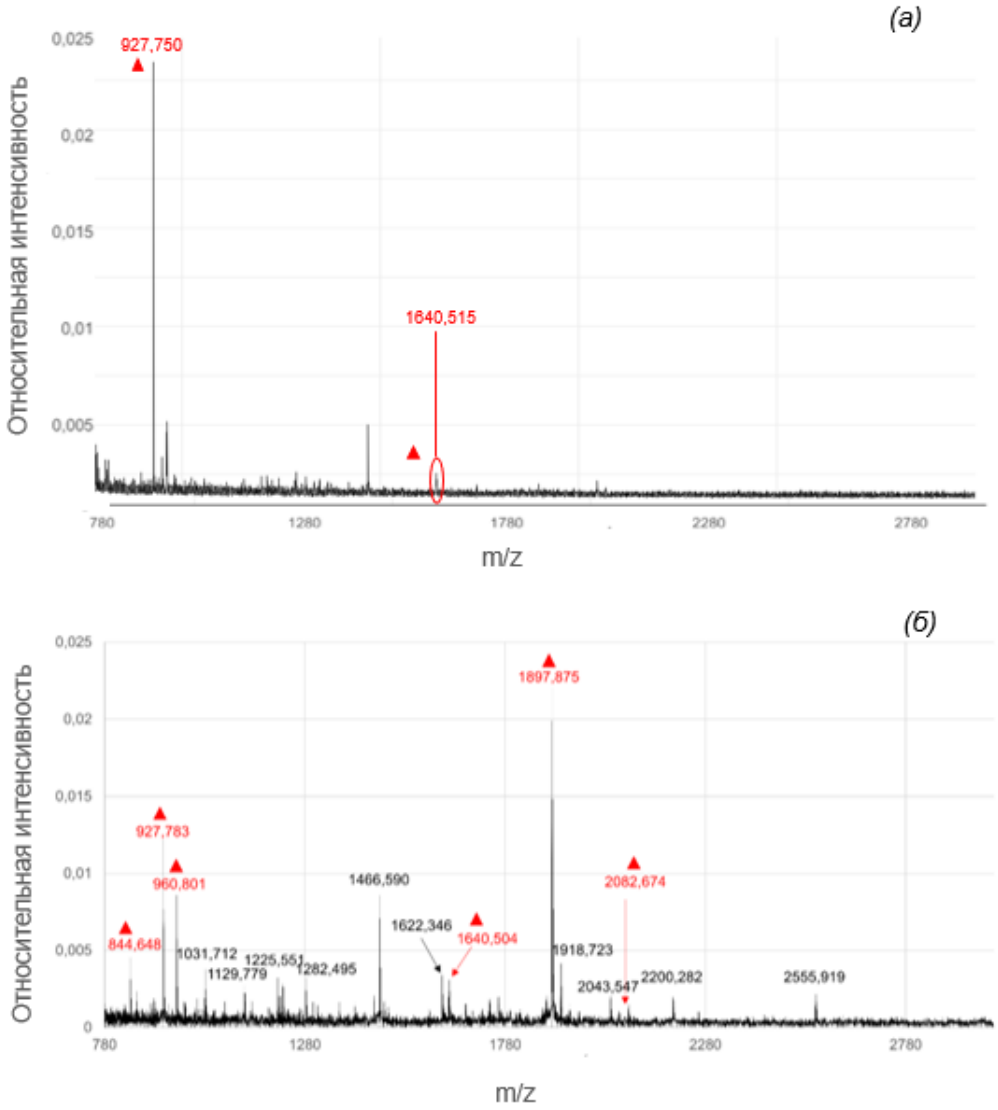


Рисунок 20. – Результаты анализа стабильности образцов плазмы крови с использованием СКК: спектры МАЛДИ, полученные для (в) варианта 1 и (б) варианта 2. Условия хранения:–20°С и 35 суток; красными маркерами отмечены пики (m/z), выбранные для оценки стабильности образца. Отмеченные маркерами пики характеризуются отношением сигнал/шум >5.

Таким образом, показана возможность хранения до 35-и суток образцов плазмы крови, адсорбированных на стекловолоконном носителе. Наиболее подходящим способом предварительной подготовки СКК являются процедуры, проведенные непосредственно в мембранном носителе с последующей экстракцией компонентов для проведения аналитических измерений. Показано на примере триптических компонентов белков, что состав биообразцов остается стабильным при –20 и –4°С в течение 35 суток хранения, и при +25 °С в течение 14 суток.

ГЛАВА 5. Определение аналитической чувствительности АСМ/МС подхода

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

Проведена сравнительная оценка аналитической чувствительности предлагаемого в диссертационной 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. Объектами исследования являлись альбумин человека, пероксидаза хрена С1А, тимидилат-синтаза и бактериальный цитохром Р450 BM3, различающиеся по физико-химическим свойствам: молекулярному весу (36-120 кДа), количеству сайтов гидролиза для трипсина и их пространственной доступности (таблица 17). 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/).

Таблица 17. Физико-химические свойства белков, использованные в экспериментах.

Белок	Происхождение	Молекулярный вес, кДа	Число сайтов для гидролиза*	Алифатический индекс**	Число доступных сайтов для гидролиза
Альбумин человека	*Human*	69	49	77,6	26
Пероксидаза хрена С1А	*Armoracia rusticana*	38,8	16	90,3	10
Цитохром Р450 BM3	*Bacillus megaterium*	118	70	80,7	31***
Тимидилат-синтаза	*Human*	35,7	18	83,2	16

*фермент трипсин, с учетом полного гидролитического расщепления; **алифатический индекс отражает относительное содержание гидрофобных аминокислотных остатков и объема, занимаемого боковыми группами аминокислотных остатков. Белки с высоким алифатическим индексом (70 и более) являются термостабильными; ***по данным AlphaFold (AF-P14779-F1).

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 результаты измерений (рисунок 21), полученные для обеих серий экспериментов с использованием времяпролетного масс-спектрометрического детектора (МАЛДИ-МС) и детектора типа ионная ловушка (ВЭЖХ-МС/МС).

Как видно на рисунке 21, в области высоких концентраций аналита в исследуемом растворе (C_o от 10^{-5} до 10^{-7} М) количество идентифицированных пептидов сопоставимо для обеих серий экспериментов – «в растворе» и «с поверхности». В данном концентрационном диапазоне АСМ/МС подход не востребован, поскольку не влияет на эффективность детектирования белков с применением выбранных типов масс-спектрометрических детекторов. Полученные результаты хорошо согласуются с обоснованной ранее теоретической оценкой эффекта концентрирования белков на поверхности чипов (см. рисунок 14, область $C_o > C_{max}$ отмечена голубым цветом).

При переходе в область низких концентраций (C_o от 10^{-10} до 10^{-11} М) для серий «в растворе» масс-спектрометрический анализ не позволил достоверно идентифицировать исследуемые белки. Напротив, применение АСМ/МС подхода в указанном диапазоне концентраций C_o позволило идентифицировать белки, что указывает на эффективность процедуры концентрирования молекул аналита на поверхности чипов.

Как отмечалось ранее, белки отличны по молекулярному весу, числу сайтов для гидролиза и экспонированных на растворитель сайтов, то есть доступных для гидролазы (таблица 17). Объединяет выбранные в эксперименте белки высокие значения алифатического индекса, который косвенно отражает гидрофобность

белковой молекулы. Трехмерные структуры белков представляют собой компактные глобулы, которые богаты по содержанию альфа-спиралями, что объясняет высокие значения алифатического индекса. Несмотря на отличия в физико-химических свойствах белков, в масс-спектрометрических экспериментах были получены схожие результаты (рисунок 21).

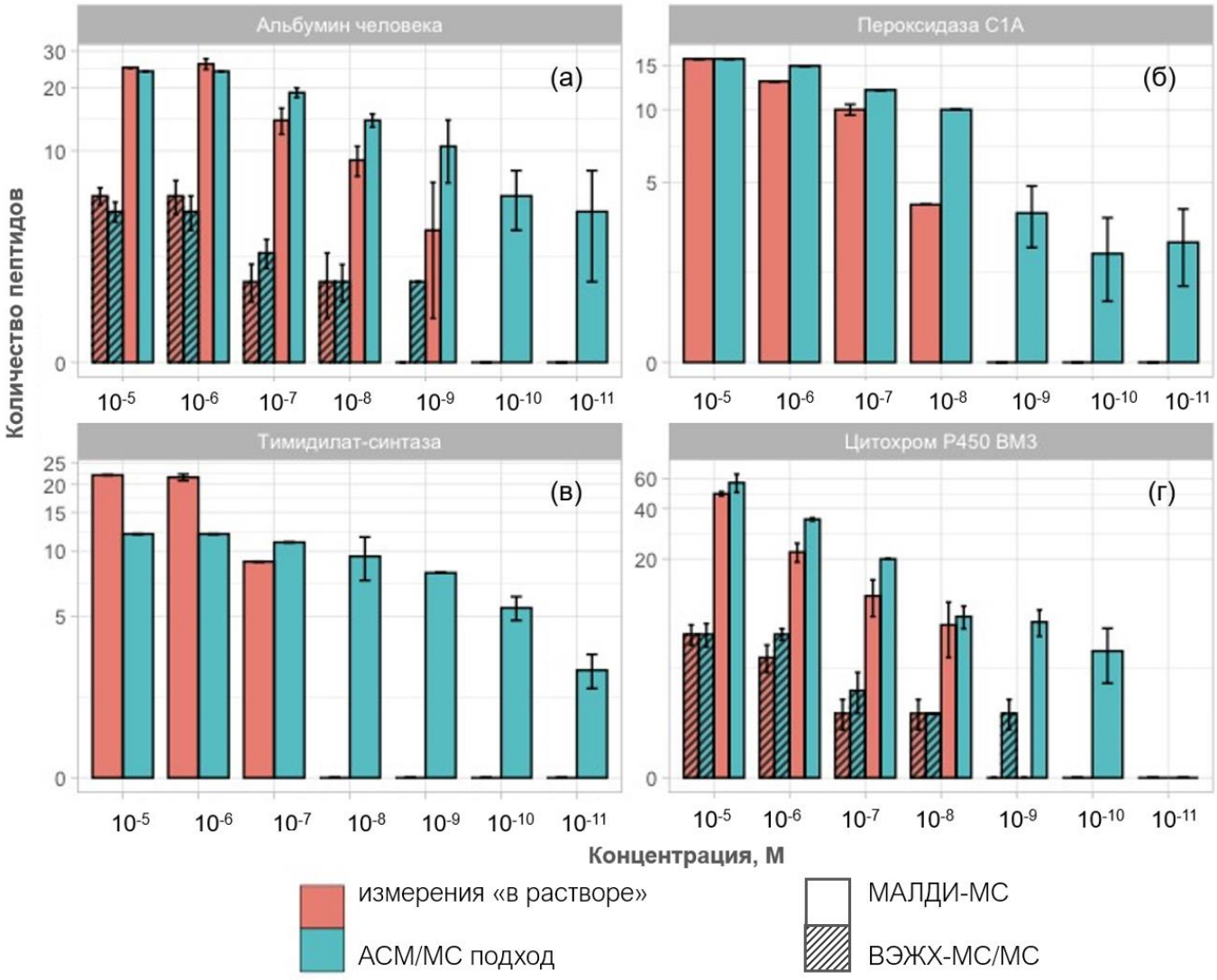


Рисунок 21. – Сравнительная оценка аналитической чувствительности детектирования белков «в растворе» и «с поверхности», или с применением АСМ/МС подхода (кодирование цветом) с применением времяпролетного детектора Autoflex III – МАЛДИ-МС и детектора типа ионная ловушка LC/MSD Trap XCT Ultra – ВЭЖХ-МС/МС (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, по оси ординат – количество идентифицированных пептидов. Приведены величины стандартного отклонения для измерений по трем техническим повторениям.

В случае использования масс-спектрометрического детектора типа ионная ловушка для альбумина и цитохрома P450 BM3 в серии экспериментов «в растворе» удалось достичь концентрационной чувствительности на уровне 10^{-8} М (рисунки 21*а* и 21*г*). Как видно на рисунке 21, применение АСМ/МС подхода («с поверхности») позволило улучшить этот результат на один порядок: концентрационная чувствительность для этих белков составила 10^{-9} М.

Применение времяпролетного масс-спектрометрического детектора в сериях экспериментов «в растворе» позволяет детектировать белки из растворов с концентрацией C_o=10^{-7} М для тимидилат-синтазы (рисунок 21*в*), C_o=10^{-8} М для пероксидазы C1A (рисунок 21*б*) и цитохром P450 BM3 (рисунок 21*г*) и C_o=10^{-9} М для альбумина человека (рисунок 21*а*). Анализ результатов, полученных «с поверхности», позволил выявить повышение концентрационной чувствительности анализа: для тимидилат-синтазы C_o=10^{-10} М (на три порядка), для пероксидазы C1A C_o=10^{-11} М (на три порядка), цитохром P450 BM3 C_o=10^{-10} М (на два порядка) и для альбумина человека C_o=10^{-11} М (на два порядка).

Предел концентрационной чувствительности для серий экспериментов «в растворе» для двух типов масс-спектрометрических детекторов составил на уровне 10^{-7}-10^{-9} М. Использование АСМ/МС подхода позволило повысить концентрационную чувствительность анализа на два порядка и достичь чувствительности на уровне 10^{-10}-10^{-11}М для метода МАЛДИ-МС и 10^{-9} М для метода 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 C1A, указанных в таблице 18. Значения площади хроматографических пиков использовали для оценки содержания пептида в исследуемом растворе. Сопоставление площадей хроматографических пиков позволяет оценить количество аналита: чем больше площадь хроматографического пика, тем выше концентрация аналита в исследуемом растворе [297]. Как видно в

таблице 18, для концентрации белка C_o=10^{-9} М в инкубационном растворе площади хроматографических пиков пептидов в серии экспериментов «в растворе» превосходят таковые значения, полученные для экспериментов «с поверхности» (АСМ/МС подход). В экспериментах с содержанием целевого белка в растворах аналита с концентрацией C_o=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 таковых значений, полученных для АСМ/МС подхода.

Таблица 18. Сравнительная оценка аналитической чувствительности детектирования белков «в растворе» и «с поверхности» (АСМ/МС подход) 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*		*YYVNLEEQK*	
	«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 19 обобщены сведения о достигнутых значениях концентрационной чувствительности АСМ/МС подхода для трех типов масс-спектрометрических детекторов.

Таблица 19. Концентрационная чувствительность 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}
Цитохром Р450 ВМ3	118	80,7	70	МАЛДИ-МС	10^{-10}
Альфа-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 (C_{min}).

Как видно из таблицы 19, ультрачувствительное детектирование белков достигается в случае применения метода ВЭЖХ-ММР, который позволил зарегистрировать 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.

Таким образом, в зависимости от решаемой задачи в АСМ/МС подходе могут быть успешно использованы разные типы масс-спектрометрических детекторов.

5.2 Масс-спектрометрический анализ белков, сконцентрированных на поверхности чипов с помощью биоспецифического фишинга из раствора аналита

Белки на поверхности чипа могут быть сконцентрированы с использованием процедуры биоспецифического фишинга. При отработке методики был идентифицирован гликопротеин 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 [81]*.

Для идентификации белков в составе комплексов был использован времяпролетный детектор с МАЛДИ ионизацией (МАЛДИ-МС). Как видно на рисунках 22*а* и 22*б*, 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 *m/z* пептидам автолиза трипсина и целевого гликопротеина (рисунок 22*в*). На спектре, полученном для чипа с иммобилизованными антителами (рисунок 22*г*), кроме двух групп пиков присутствует третья группа, соответствующая пептидам моноклонального антитела анти-gp120, специфичного по отношению к целевому белку.

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 $0{,}8\times10^{-11}$ М для пары аптамер/gp120 [81*].

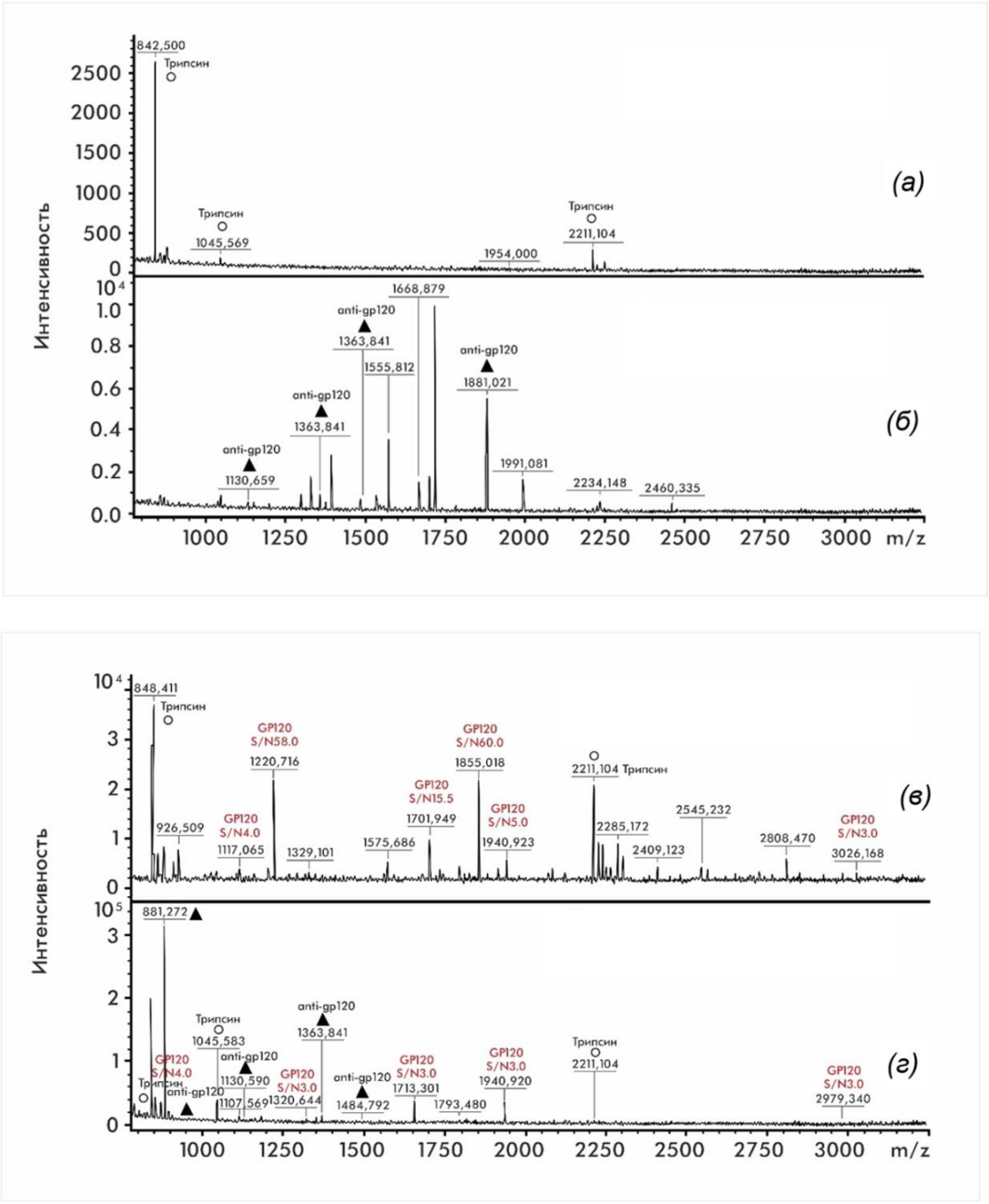


Рисунок 22. – АСМ/МС подход с применением биоспецифического фишинга. Спектры МАЛДИ, полученные для триптических смесей с поверхности чипов для АСМ (а, б) до проведения биоспецифического концентрирования белка gp120 и (в, г) после биоспецифического концентрирования белка gp120. Экспериментальные условия: материал чипа слюда с иммобилизованными аптамерами (а, в) и антителами (б, г); $C_{gp120}=0{,}8\times10^{-11}$ М) (в) и $C_{gp120}=10^{-8}$ М (г). На спектрах МАЛДИ, полученных на приборе Autoflex III (Bruker, Германия), отмечены маркерами: ○ – пептиды автолиза трипсина, «S/N» – пептиды gp120, значения соответствуют сигнал/шум, ▲– пептиды антител anti-gp120. Адаптировано из [81].

На следующем этапе были выполнены эксперименты по идентификации медицински-значимых белков, кандидатных белковых маркеров онкологических заболеваний.

Обоснование выбора набора белков для АСМ/МС подхода в комбинации с биоспецифического фишингом

Белок альфа-фетопротеин (АФП) является глобулярным белком, который кодируется геном хромосомы 4 человека. Белок участвует в регуляции клеточной пролиферации и иммуномодуляции [298,299]. В ряде научных работ отмечается повышение уровня содержания АФП в крови выше 400 нг/мл (~6,7 нМ) при гепатоцеллюлярной карциноме [299,300]. В связи с этим, уровень АФП в образцах крови привлекателен для клинического скрининга гепатоцеллюлярной карциномы.

Тимидилат-синтаза (TYMS) является глобулярным белком, кодируемый геном хромосомы 18 человека. Белок участвует в биосинтезе тимидилата в митохондриях, играет важную роль в синтезе и репарации ДНК [301]. В 2000-х годах были опубликованы исследования, которые указывают на повышение уровня экспрессии гена TYMS в биоптатах опухолевых тканей больных с метастатическим колоректальным раком по сравнению с первичным колоректальным раком и нормальной тканью толстой кишки [301,302]. Отмечается повышение уровня содержания белка TYMS и транскрипта в биообразцах при раке груди, шейки матки, мочевого пузыря, почек и немелкоклеточном раке легких [301].

Ядерный фактор активации Т-клеток (NFAT C1) также является белком, кодируемый геном хромосомы 18 человека. NFAT C1 играет важную роль в процессах инициации и прогрессирования рака, таких как пролиферация, инвазия, миграция и ангиогенез [303–305]. Высокий уровень экспрессии гена, кодирующего белок, высокая транскрипционная активность изоформ NFAT обнаружена в различных солидных опухолях человека и клеточных линиях, а также при гематологических злокачественных новообразованиях [303].

Глобулярный белок серпин B3 также может быть отнесен к кандидатному онкомаркеру. Количественное измерение содержания транскриптов и белка серпин B3 в биологических образцах (сыворотка крови, биоптаты опухолей) используется в

исследованиях для прогнозирования стадии развития онкологического заболевания и эффективности ответа на лекарственную терапию [306–308]. Гистологический анализ показал, что уровень транскрипта серпин B3 значимо повышается при плоскоклеточных карциномах языка, пищевода, миндалин, эпидермальных волосяных фолликулов, легких и матки [306,309–311].

Результаты экспериментальных измерений

Белки были сконцентрированы на поверхности чипов для АСМ посредством биоспецифического связывания из раствора аналита (Таблица 20). Выбранные белки характеризовались различными физико-химическими свойствами (см. раздел 2.3).

В таблице 20 обобщены результаты масс-спектрометрического анализа белков, сконцентрированных на поверхности чипов с помощью биоспецифического фишинга. Данные представлены для вариантов масс-спектрометрических детекторов: времяпролетный детектор (МАЛДИ-МС) и тройной квадруполь (ВЭЖХ-ММР). Как видно из данных, представленных в таблице 20, антитела сохраняют свою биологическую активность на поверхности чипа, а сформированные иммуноаффинные комплексы успешно зарегистрированы с применением АСМ/МС подхода.

Результаты детектирования белков хорошо согласуются с таковыми для химического фишинга (таблица 19). В сериях экспериментов с применением АСМ/МС подхода в комбинации с химическим фишингом для модельных белков удалось достичь концентрационной чувствительности на уровне 10^{-9}-10^{-11} М для времяпролетного МС-детектора (МАЛДИ-МС). В аналогичных экспериментах с применением биоспецифического фишинга выбранные белки были выявлены в растворах аналита в том же диапазоне концентраций (C_o=10^{-9}-10^{-11} М).

Для масс-спектрометрического детектора типа тройной квадруполь в экспериментах с применением АСМ/МС подхода в комбинации с химическим фишингом белки были зарегистрированы из растворов с концентрацией C_o=10^{-13}-10^{-15} М. В аналогичных экспериментах с применением биоспецифического фишинга удалось достичь концентрационной чувствительности 10^{-11}-10^{-13} М. Задача ультрачувствительного детектирования молекулярных объектов на поверхности

чипа может быть решена с применением ВЭЖХ-ММР, который позволяет выявлять белки после инкубации АСМ-чипов в растворе аналита с концентрацией до 10^{-13}М с использованием биоспецифического фишинга и до 10^{-15} М с применением химического фишинга (таблицы 19 и 20). Низкая концентрационная чувствительность анализа (на два порядка) в случае применения биоспецифического фишинга по сравнению с химическим фишингом, вероятно, обусловлена сложностью и динамичностью исследуемой системы, в которой помимо аналита, присутствует белок-партнер. Биоспецифичесие взаимодействия являются обратимыми, а формирующиеся белковые пары находятся в динамическом равновесии между связанным и свободным состоянием.

Таблица 20. Концентрационная чувствительность АСМ/МС подхода в случае использования процедуры биоспецифического фишинга белков.

МС-анализ	Мишень	Молекулярный зонд	Концентрация раствора аналита, М
МАЛДИ-МС	альфа-фетопротеин	МКА*	10^{-10}
	Гликопротеин gp120	Аптамер	10^{-11}
	HCVcoreAg	Аптамер	10^{-11}
	HCVcoreAg	МКА	10^{-11}
	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.

Для задачи детектирования среднекопийных 10^{-6}-10^{-10} М и низкокопийных белков 10^{-11}-10^{-13} М успешно применимы времяпролетный масс-спектрометрический детектор и детектор типа ионная ловушка. Следует также обратить внимание на то, что 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 (таблица 19), что эффективнее на два порядка по сравнению с биоспецифическим фишингом белков (таблица 20).

5.3 Масс-спектрометрический анализ кор-антигена вирусного гепатита С, иммобилизованного на поверхности чипов для нанопроволочного биосенсора

Была показана возможность обнаружения медицински значимого белка кор-антигена вируса гепатита С в исследуемом растворе с применением другого типа функционализированной поверхности – чипа для нанопроволочного биосенсора. На поверхности чипа был сформирован массив сенсорных элементов – нанопроволок (см. раздел 1.4.2). Для биоспецифического обнаружения целевого белка поверхность нанопроволок была модифицирована аптамерами, специфичными по отношению к кор-антигену. Нанопроволочные биосенсоры (далее – НП-биосенсоры) могут быть отнесены к молекулярным детекторам. Сенсорным элементом НП-биосенсора является нанопроволока с функционализированной поверхностью [312]. Нанопроволоки организованы на поверхности чипа, и обеспечивают возможность проведения многопараметрического анализа до десяти аналитов в одном эксперименте (см. раздел 1.4.2). Был проведен масс-спектрометрический анализ (МАЛДИ-МС) белков биоспецифически сконцентрированных на поверхности чипа после инкубации в растворе HCVcoreAg с концентрациями от 10^{-9} до 10^{-15} М. Спектр МАЛДИ, полученный для элюата с поверхности чипа после инкубации в растворе кор-антигена с концентрацией C_o=10^{-13} М, представлен на рисунке 23. Были выявлены пики (n=14), соответствующие по значениям *m/z* эталонному спектру, полученному для раствора рекомбинантного HCVcoreAg с концентрацией 10^{-7} М [313]*. Как видно на спектре МАЛДИ (рисунок 23), наиболее интенсивные пики в спектре соотнесены по *m/z* характеристикам белку кор-антигена.

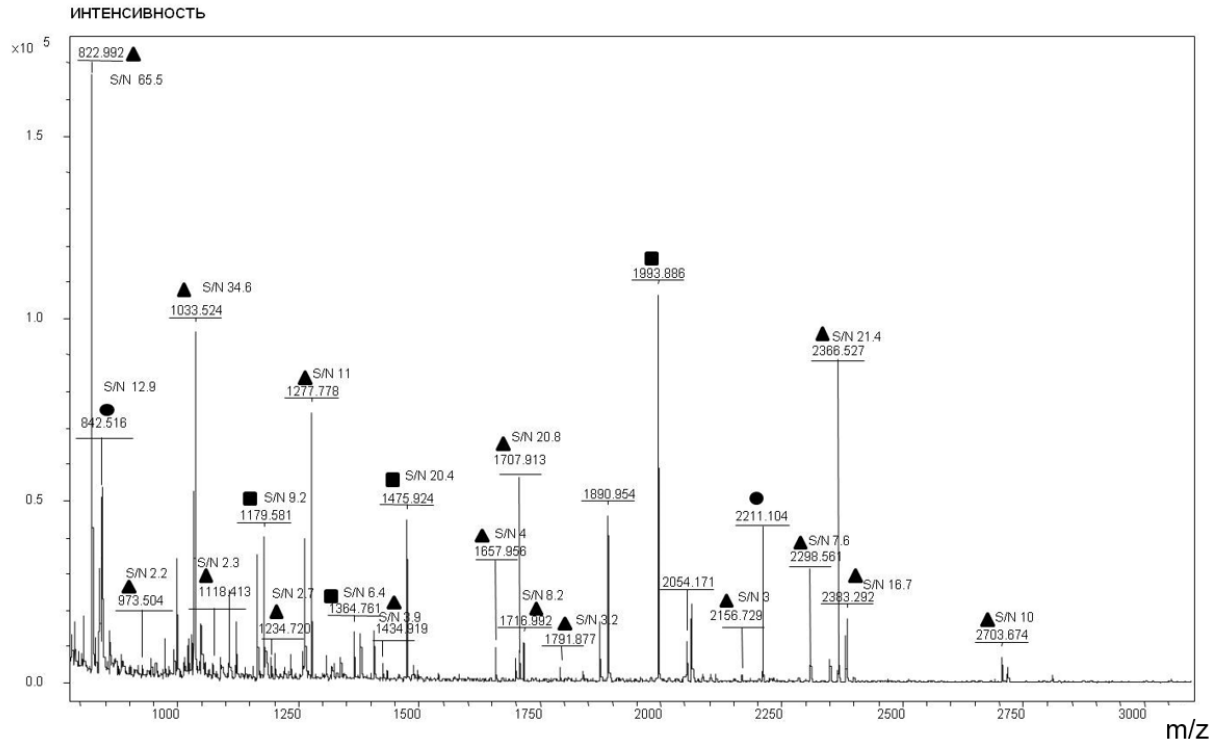


Рисунок 23. – МАЛДИ-МС спектр белковых объектов, биоспецифически сконцентрированных на поверхности чипа для нанопроволочного биосенсора после инкубации в растворе HCVcoreAg концентрацией 10^{-13} М. Точками обозначены пики автолиза трипсина; треугольники – пептиды HCVcoreAg, квадраты обозначают пики примесей, отнесенные к кератинам I и II человека; S/N указывают значения, соответствующие отношениям сигнал / шум.

В результате проведенного масс-спектрометрического анализа подтверждено наличие HCVcoreAg на поверхности чипа для нанопроволочного биосенсора.

Было показано, что концентрирование целевого белка осуществляется из раствора аналита низкой концентрации на поверхности сенсорных элементов НП-биосенсора в количестве достаточном для последующего масс-спектрометрического анализа (МАЛДИ-МС).

5.4 Масс-спектрометрический анализ белков, сконцентрированных на поверхности компакт-дисков

В лаборатории нанобиотехнологии ИБМХ был создан оптико-акустический биосенсор (ОАБ), в котором в качестве анализатора использовали стандартное устройство чтения компакт-дисков [314*]. Для регистрации сигнала с биосенсора было разработано программное обеспечение, которое позволяет представлять данные в цифровом, графическом и аудио формате. ОАБ осуществляет регистрацию белков, ковалентно иммобилизованных на поверхности сенсорной зоны без использования меток (ошибка первого уровня), а также иммуноаффинных белковых комплексов (ошибка второго уровня) (рисунок 24) [314*].

Оптико-акустический биосенсор представляет собой CD-ROM, который обеспечивает считывание дорожек на поверхности компакт-диска, трансляцию в цифровой код изменения оптического сигнала от белков и их комплексов, иммобилизованных на поверхности компакт-диска. Цифровой код может быть представлен в виде акустического ряда, как подробно описано в работе [314*].

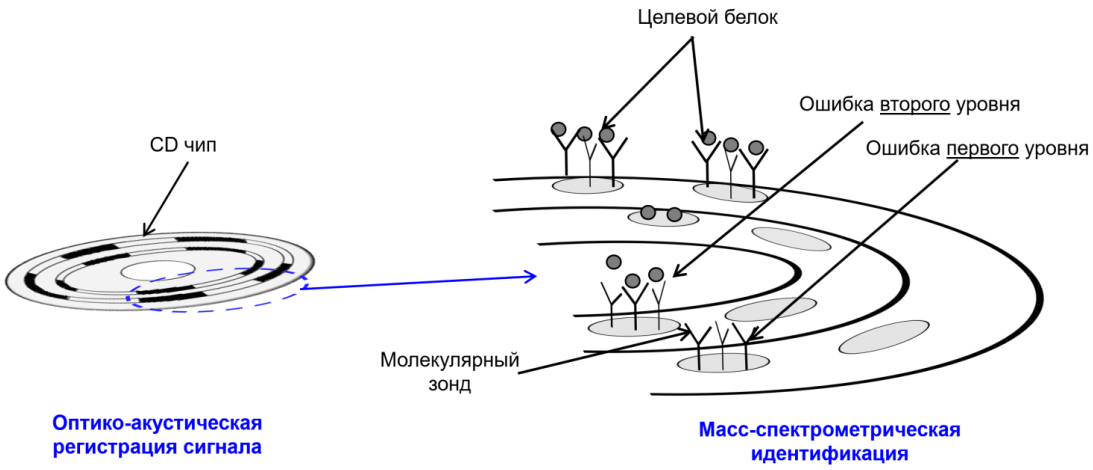


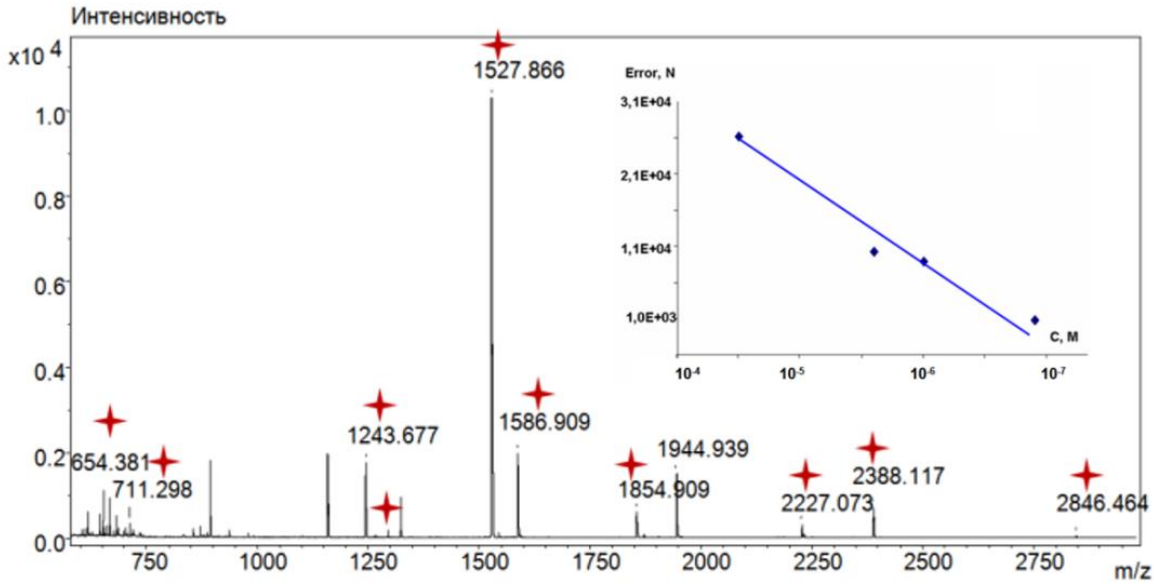
Рисунок 24. – Схематическое изображение сенсорных зон на поверхности CD (тёмно-серые зоны), формирования биоспецифических комплексов на поверхности сенсорных зон. Ошибке первого уровня соответствует сигнал для иммобилизованных молекул зонда, ошибке второго уровня – аффинных комплексов (антиген/антитело, белок/партнер).

Химический фишинг белков, как процесс иммобилизации белков из раствора аналита на небольшую поверхность чипа (сенсорная зона), направлен на концентрирование молекул аналита. Эффективность ковалентной иммобилизации белков оценивалась в масс-спектрометрическом анализе [314*]. Поверхность сенсорных зон CD была функционализирована миоглобином (Mb), бычьим сывороточным альбумином (БСА), цитохромом P450scc и моноклональным антителом, специфичным по отношению к поверхностному антигену вирусного гепатита B (далее – анти-HBsAg).

Поскольку CD-детектирование основано на регистрации неоднородностей на поверхности чипа, в том числе, важным является верифицирование сформированных объектов, но не контаминантов и артефактов, связанных с этими неоднородностями. Был проведен масс-спектрометрический анализ (МАЛДИ-МС) состава белков, сконцентрированных посредством химического фишинга. МАЛДИ-МС спектры идентификации целевых белков в наименьшей зарегистрированной ОАБ концентрации приведены на рисунке 25. Как видно на рисунке 25, наиболее интенсивные пики в спектрах МАЛДИ соотнесены к исследуемым белкам. Для миоглобина было зарегистрировано 10 *m/z* характеристик (рисунок 25*а*), для бычьего сывороточного альбумина – 16 *m/z* характеристик (рисунок 25*б*), для цитохром P450scc – 13 *m/z* характеристик (рисунок 25*в*) и для анти-HBsAg – 10 *m/z* характеристик (рисунок 25*г*). Контаминантные пики в конечных растворах (элюаты с поверхностей сенсорных зон) не были выявлены или не были достоверно идентифицированы как белковые объекты.

Рисунок 25. – Спектры МАЛДИ, полученные для пептидных смесей, элюированных с поверхности сенсорных зон компакт-диска: (а) миоглобин Mb, 10^{-7} М, (б) БСА, 10^{-6} М. Маркерами отмечены пики на спектре, соответствующие по m/z пептидам исследуемых белков. На врезках представлены зависимости количества ошибок первого уровня от концентраций белков в растворе аналита. Рисунок адаптирован из [314].*

(а)



(б)

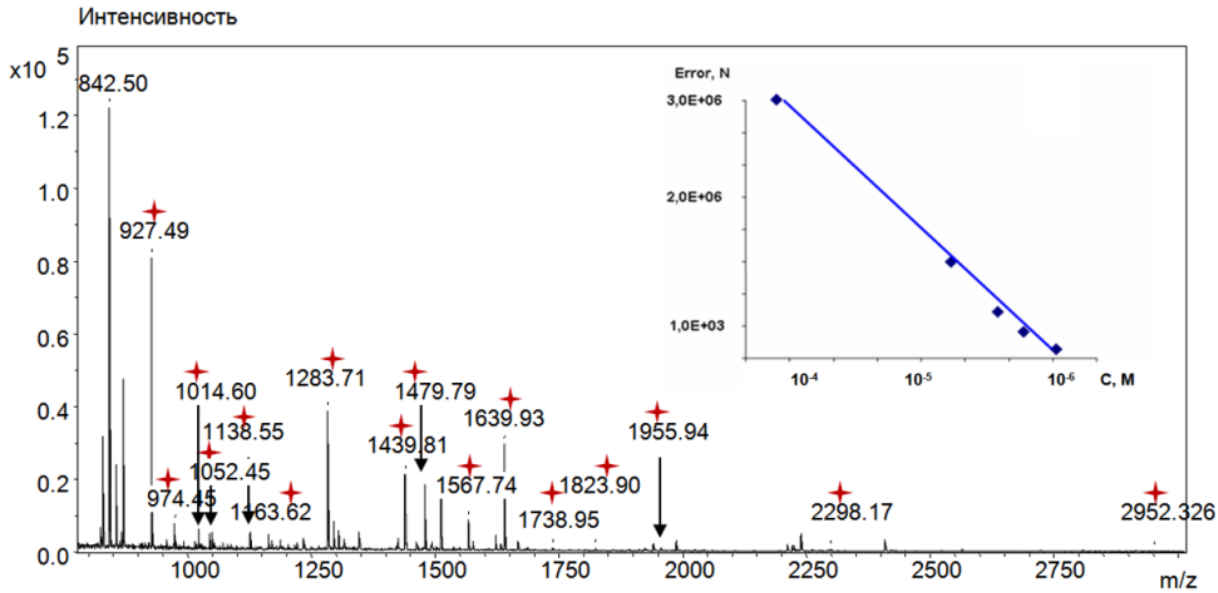
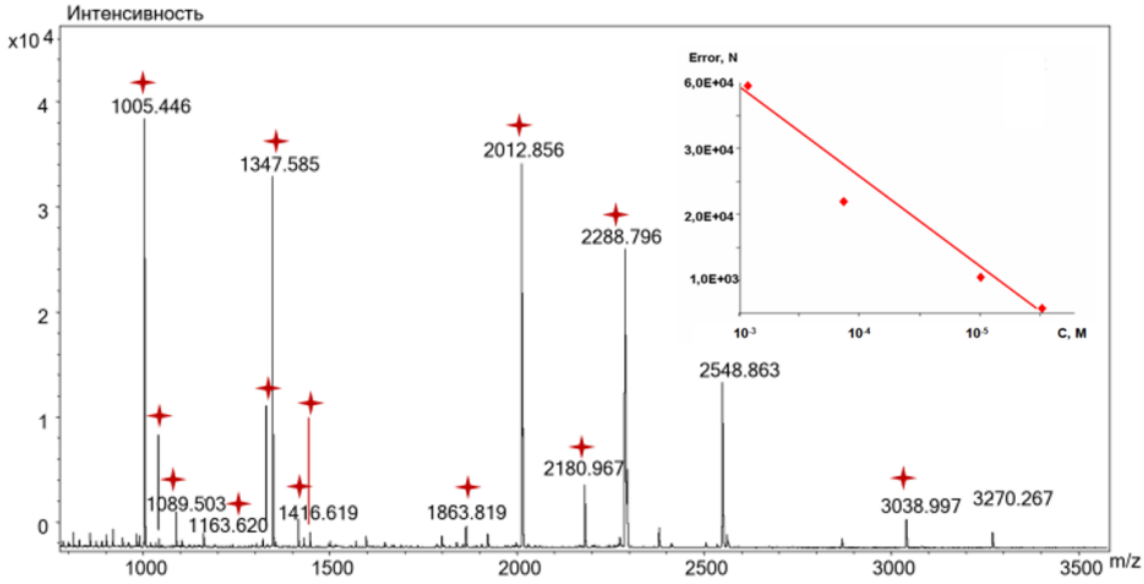
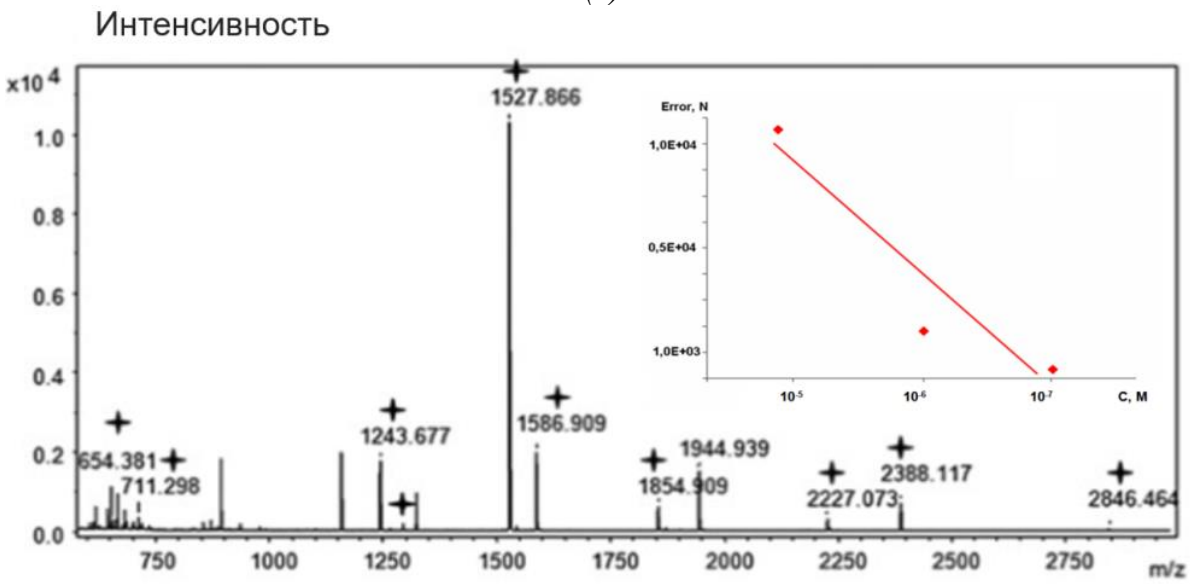


Рисунок 25. (продолжение) – Спектры МАЛДИ, полученные для пептидных смесей, элюированных с поверхности сенсорных зон компакт-диска: (в) цитохром P450scc, 10^{-7} М, (г) анти-HBsAg, 10^{-7} М. Маркерами отмечены пики на спектре, соответствующие по m/z пептидам исследуемых белков. На врезках представлены зависимости количества ошибок первого уровня от концентраций белков, ковалентно иммобилизованных на поверхности сенсорной зоны. Рисунок адаптирован из [314].*

(в)



(г)



Исследуемые белки, сконцентрированные на поверхности сенсорных зон CD за счет ковалентного связывания, были достоверно идентифицированы в масс-спектрометрическом анализе. Удалось достигнуть концентрационной чувствительности на уровне 10^{-7} М [314]*. Специфика проведения процедур предварительной подготовки поверхности компакт-диска по сравнению с чипами для АСМ для последующего МС-анализа обусловлена большими размерами поверхности компакт-диска. В связи с этим смесь для гидролиза для содержала глицерин (10 %), чтобы повысить поверхностное натяжение капли и понизить скорость испарения жидкости.

Таким образом, компакт-диски также являются чипами с функционализированной поверхностью, на поверхности которых могут быть сконцентрированы молекулы белка из раствора аналита. ОАБ характеризуются низкой стоимостью, возможностью одновременного скрининга множества аналитов или биологических образцов на одном чипе. В связи с тем, что для функционирования чипа (компакт-диска) не требуется аппаратного или программного усовершенствования, такие биосенсоры могут быть привлекательны для создания быстрой, недорогой и высокопроизводительной биомедицинской диагностики [103,115].

ГЛАВА 6. АСМ/МС подход для идентификации белков в биологических образцах

В предыдущих главах диссертационной работы представлены результаты, подтверждающие применимость АСМ/МС подхода для детектирования белков в модельных растворах. В настоящей главе представлены экспериментальные результаты применения АСМ/МС подхода для анализа белков в образцах сыворотки крови.

6.1 АСМ/МС подход для идентификации кор-антигена вирусного гепатита С в образцах сыворотки крови

АСМ/МС подход использовали для выявления кор-антигена 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 (далее – HCVcoreAg) на поверхности чипов с иммобилизованными аптамерами трех вариантов (см. раздел 2.4). Детектировали рекомбинантный HCVcoreAg в растворах аналита объемом 1 мл в диапазоне концентраций от 10^{-10} до 10^{-13} М. В экспериментах конфигурация чипа включала три «малых» сенсорных зоны и одну контрольную. В сенсорных зонах были ковалентно иммобилизованы аптамеры трех вариантов, специфичные 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 (рисунок 26).

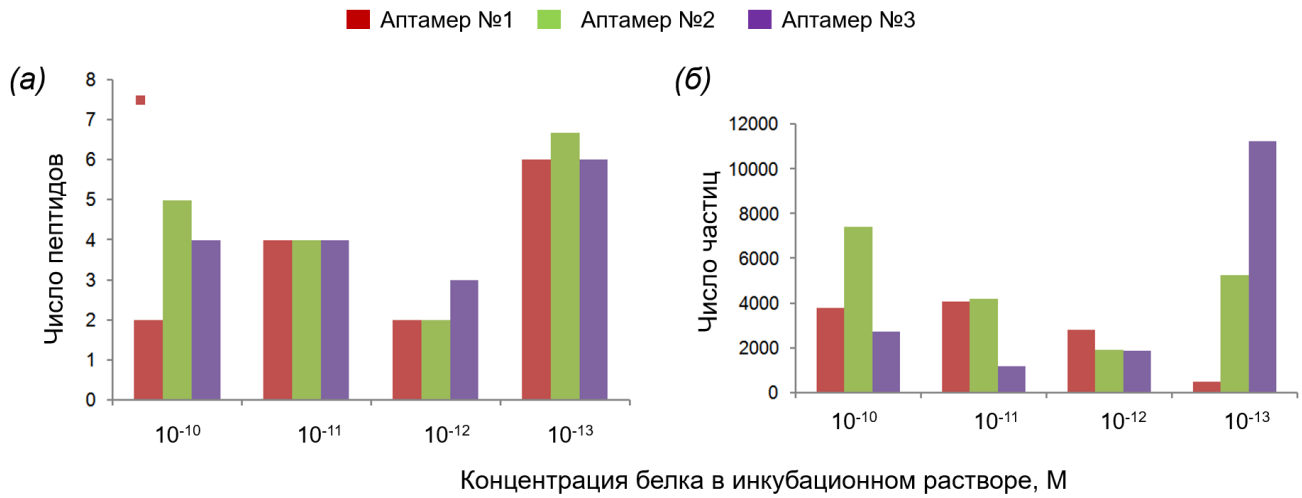


Рисунок 26. – АСМ/МС подход и биоспецифический фишинг. Результаты (а) масс-спектрометрических и (б) атомно-силовых измерений для сенсорных зон с иммобилизованными аптамерами №1, №2 и №3 после инкубации чипов в растворе HCVcoreAg с концентрацией $C_o=10^{-13}$ М и выше.

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 аналита с концентрацией до 10^{-13}М. Полученные результаты согласуются с данными АСМ визуализации (рисунок 26*б*): наблюдается увеличение числа идентифицированных пептидов белка при высоких значениях количества визуализированных объектов на поверхности сенсорных зон чипа. Данные АСМ визуализации были предоставлены научной группой д.б.н. Т.О. Плешаковой [289].

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 (рисунок 27). Масс-спектрометрический анализ поверхности контрольной зоны чипа, свободной от молекул анти-HCVcore и аптамеров, не позволил достоверно обнаружить целевой белок. В контрольных зонах чипа были обнаружены

контаминантные пики, соответствующие неспецифически сорбированным компонентам крови (рисунки 27*г*-27*е*) [10]*.

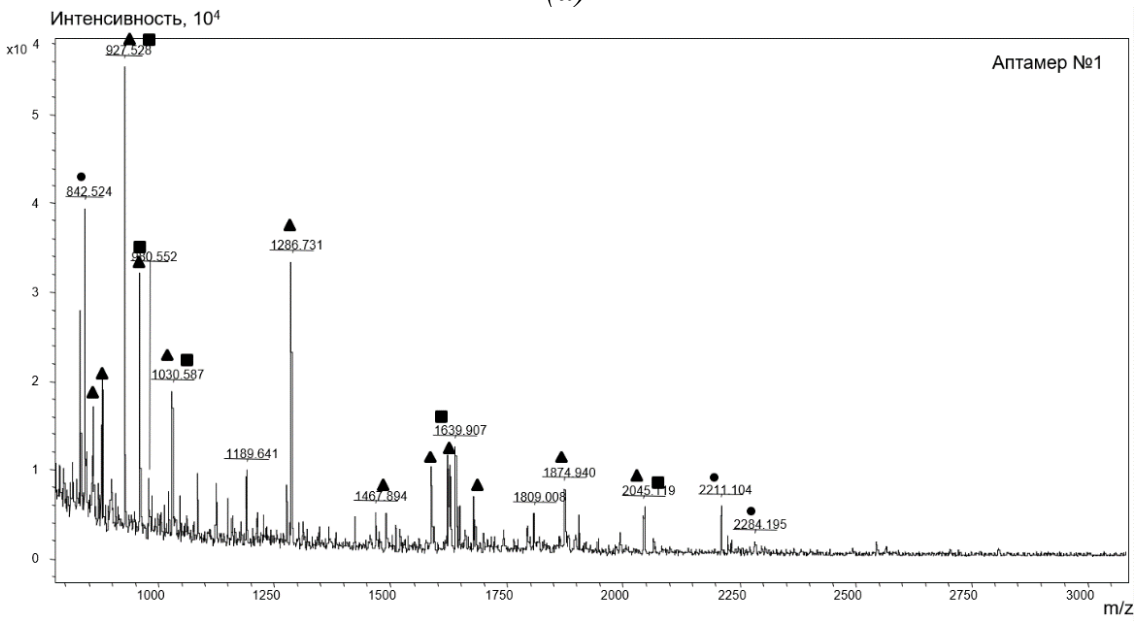
На рисунке 27*а* представлен спектр МАЛДИ, полученный для поверхности сенсорной зоны с иммобилизованными молекулами аптамера №1, после инкубации чипа в образце сыворотки крови, положительной на наличие ВГС (по данным ИФА анализа). Как видно на спектре, было выявлено 12 характеристик *m/z*, соответствующих целевому белку, которые отмечены треугольниками. Помимо пиков кор-антигена вирусного гепатита С, в типичном спектре МАЛДИ для элюатов с поверхности АСМ-чипов после инкубации в образцах сыворотки крови выявлены спектральные характеристики контаминантных белков, неспецифически сорбированных на поверхность сенсорной зоны чипа (отмечены на спектре квадратами), а также пики автолиза трипсина (выделены на спектре точками). На рисунке 27*б* представлен спектр МАЛДИ, полученный для элюата с другой сенсорной зоны чипа, содержащей аптамер №2 после инкубации в образце сыворотки крови, положительной на наличие ВГС. В данном случае кор-антиген был зарегистрирован также по 11 спектральным характеристикам. Были выявлены контаминантные пики, соответствующие по *m/z* альбумину человека. Аналогичные измерения были выполнены в экспериментах с применением АСМ/МС подхода, в которых поверхность сенсорной зоны была функционализирована аптамером №3. Спектр МАЛДИ для данного варианта представлен на рисунке 27*в,* на котором отмечены девять *m/z* характеристик, соответствующих целевому белку.

Результаты контрольных измерений, полученных для трех вариантов сенсорных зон АСМ-чипа, функционализированных молекулами аптамеров №1-№3 после инкубации в образцах сыворотки крови, отрицательных на наличие вирусного гепатита С, представлены на рисунках 27*г,* 27*д* и 27*е*. Для всех вариантов аптамеров наблюдается схожая картина. Целевой белок не был достоверно идентифицирован. На спектрах МАЛДИ указаны пики альбумина человека и аполипротеинов. Спектральные характеристики *m/z* целевого белка и неспецифически сорбированных белков частично перекрываются: в случае функционализации поверхности сенсорной зоны АСМ-чипа аптамером №1 три

значения *m/z* для триптических пептидов целевого белка соответствуют альбумину. При функционализации сенсорной зоны аптамерами №2 и №3 число таких перекрытий по спектральным характеристикам целевого белка и контаминантов составило шесть и пять, соответственно. Данное наблюдение указывает на необходимость, с одной стороны, оптимизации процедур отмывки чипов после инкубации в образцах сыворотки, что является затруднительным в случае формирования обратимых иммуноаффинных комплексов. С другой стороны, открывает возможности для развития новых подходов масс-спектрометрического детектирования. Следующая часть данного раздела диссертационной работы посвящена описанию возможных способов повышения числа идентификаций пептидов для исследуемого аналита.

Рисунок 27. – АСМ/МС подход и биоспецифический фишинг: результаты МС-идентификации белков, сконцентрированных на поверхности АСМ-чипов с иммобилизованными аптамерами после инкубации в образце сыворотки крови, положительной на наличие ВГС (по данным ИФА анализа) (а и б). Спектры, полученные при МС-анализе сенсорных зон чипа с иммобилизованным аптамером №1 (а); аптамером №2 (б). Маркерами отмечены пики автолиза трипсина (●), пептиды HCVcoreAg (▲) и пики контаминантов, относящиеся к человеческому альбумину, кератинам и т. д. (■).

(а)



(б)

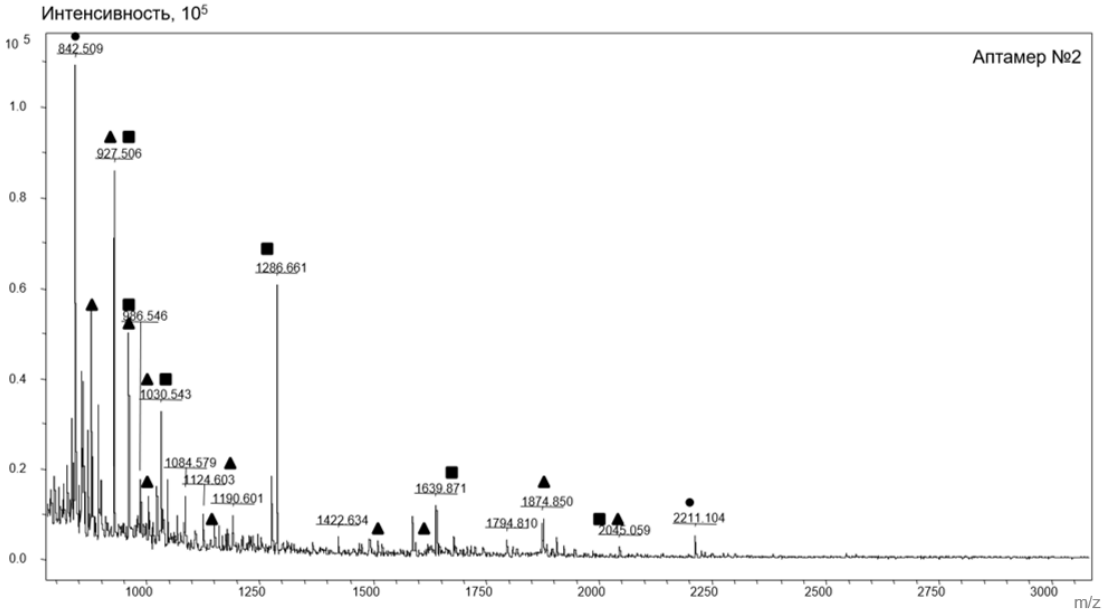
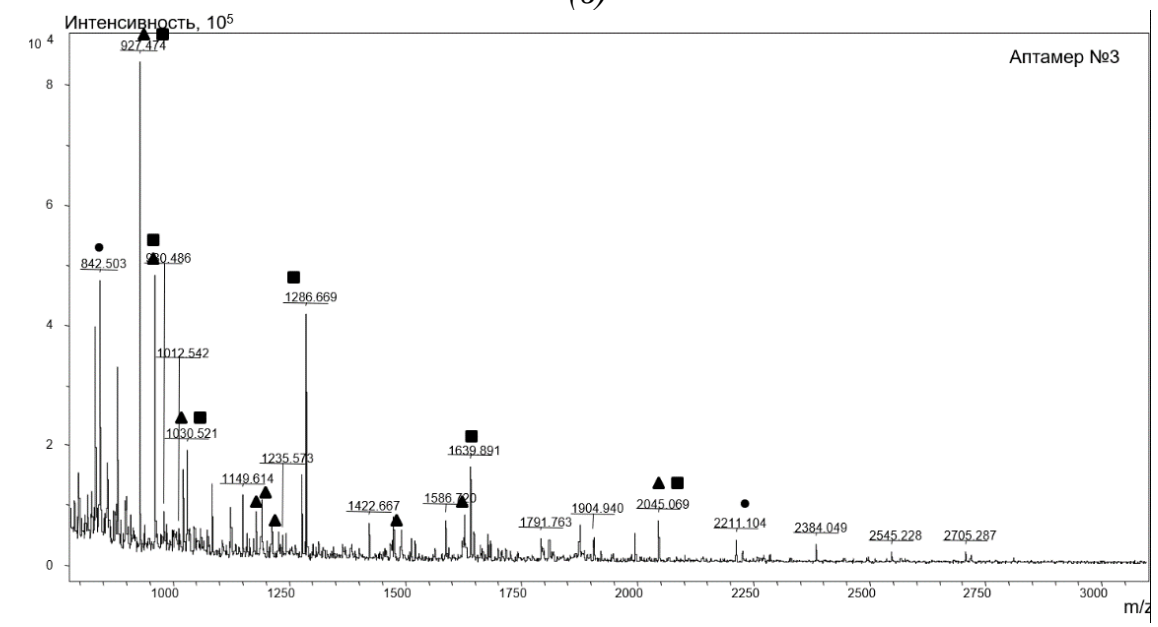


Рисунок 27. (продолжение) – АСМ/МС подход и биоспецифический фишинг: результаты МС-идентификации белков, сконцентрированных на поверхности АСМ-чипов с иммобилизованными аптамерами после инкубации в образце сыворотки крови, положительной на наличие ВГС (по данным ИФА анализа) (в) и в образце сыворотки крови, отрицательной на наличие ВГС (г). Спектры, полученные при МС-анализе сенсорных зон чипа с иммобилизованным аптамером №1 (г); аптамером №3 (в). Маркерами отмечены пики автолиза трипсина (●), пептиды HCVcoreAg (▲) и пики контаминантов, относящиеся к человеческому альбумину, кератинам и т. д. (■).

(в)



(г)

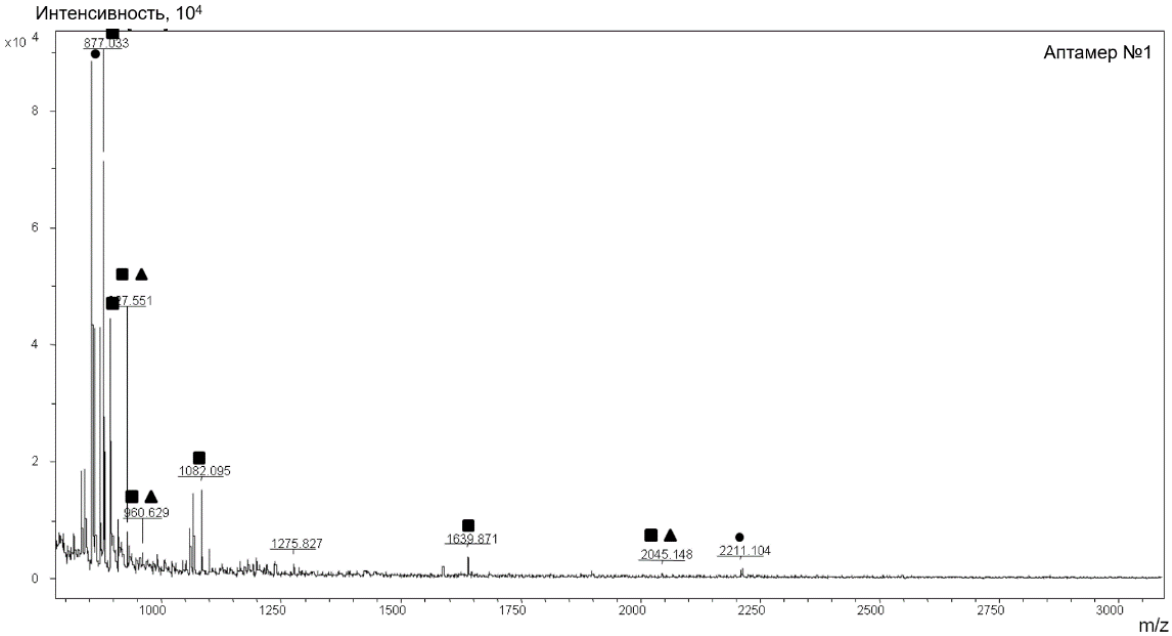
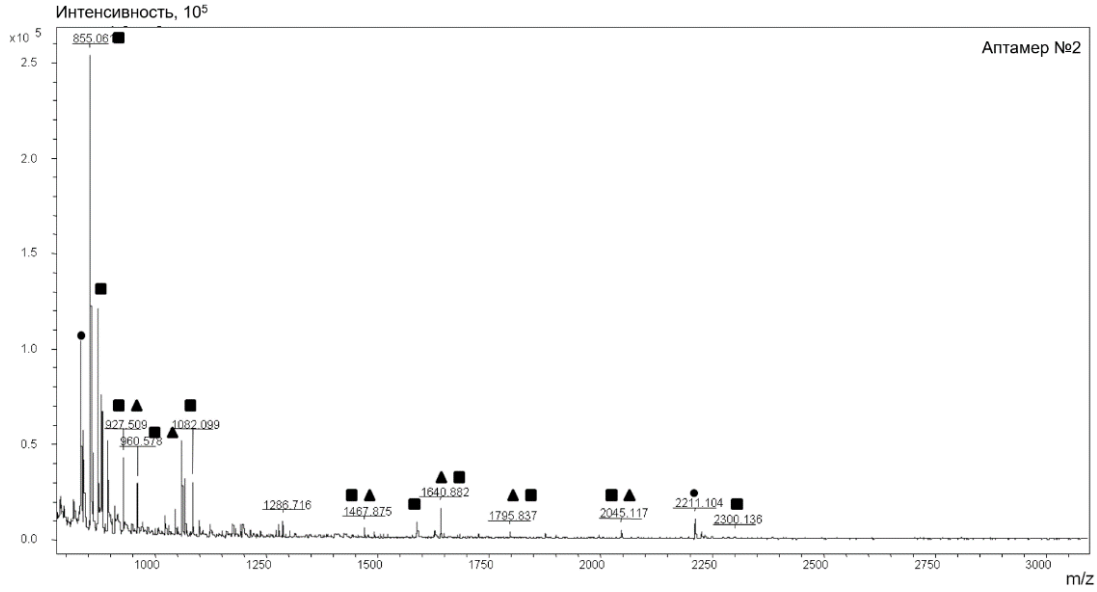
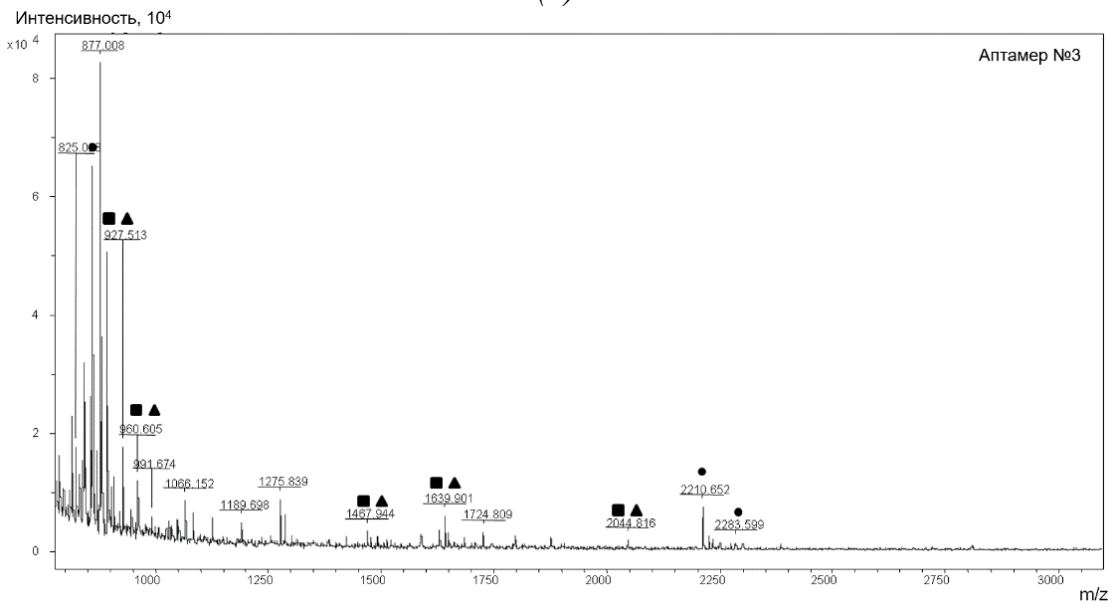


Рисунок 27. (продолжение) – АСМ/МС подход и биоспецифический фишинг: результаты МС-идентификации белков, сконцентрированных на поверхности АСМ-чипов с иммобилизованными аптамерами после инкубации в образце сыворотки крови, отрицательной на наличие ВГС (д и е). Спектры, полученные при МС-анализе сенсорных зон чипа с иммобилизованным аптамером №2 (д); аптамера №3 (е). Маркерами отмечены пики автолиза трипсина (●), пептиды HCVcoreAg (▲) и пики контаминантов, относящиеся к человеческому альбумину, кератинам и т. д. (■).

(д)



(е)



Нами было сделано предположение, что повышение числа идентификаций для белкового маркера вирусного гепатита С может быть достигнуто путем выявления пептидов-аддуктов, то есть пептидов целевого белка, модифицированных наиболее представленными в образцах крови катионами. К таким катионам относятся калий и натрий, концентрация которых в сыворотке крови 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, функционализированных двумя типами молекулярных зондов антителами и аптамерами после инкубации в образцах сыворотки крови (рисунок 28).

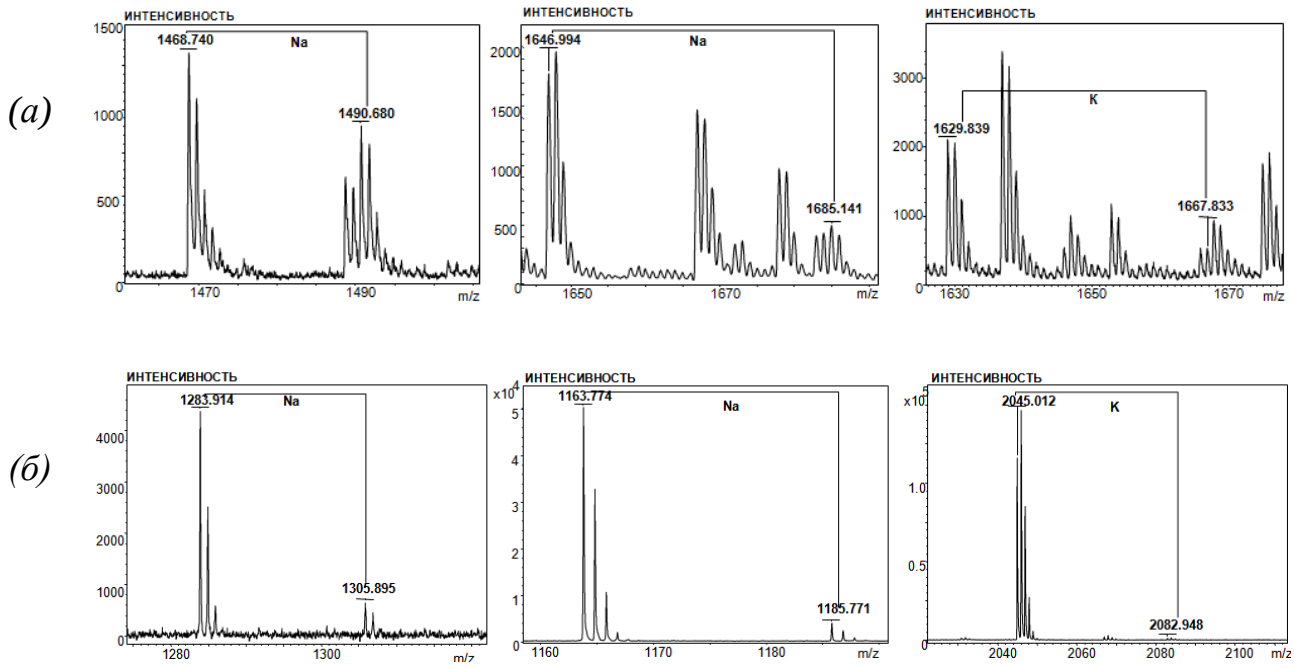


Рисунок 28. – АСМ/МС подход и биоспецифический фишинг: возможность повышения эффективности МС-анализа посредством выявления пептидов-аддуктов. Масс-спектры с поверхности чипа для АСМ, содержащего иммобилизованные анти-HCVcore (а) и аптамеры (б), после инкубации в образцах сыворотки крови, содержащей кор-антиген ВГС (по данным ИФА). Отмечены модифицированные катионами пептиды-аддукты кор-антигена ВГС: натрием и калием.

На рисунке 28 проиллюстрированы несколько вариантов детектирования интактных пептидов кор-антигена и соответствующих пептидов-аддуктов, связанных с катионами натрия или калия. Показаны фрагменты спектров МАЛДИ,

полученные для элюатов с сенсорных зон, функционализированных аптамерами (рисунок 28*а*) после инкубации в образцах сыворотки крови, положительных на наличие ВГС. На рисунке 28*б* представлены спектры, полученные в аналогичной серии экспериментов для элюатов с поверхностей АСМ-чипов, функционализированных молекулами моноклонального антитела [9,315]*. На каждом спектре МАЛДИ скобками отмечены пики, соответствующие по значениям *m/z* немодифицированному и модифицированному варианту пептида кор-антигена. Наличие в исследуемом биологическом образце форм анализируемого белка, модифицированных катионами, приводит к понижению интенсивности масс-спектрометрического сигнала для интактных пептидов. Подход детектирования вероятных пептидов-аддуктов наряду с расчетными спектральными характеристиками целевого белка позволяет увеличить количество идентификаций (рисунок 29).

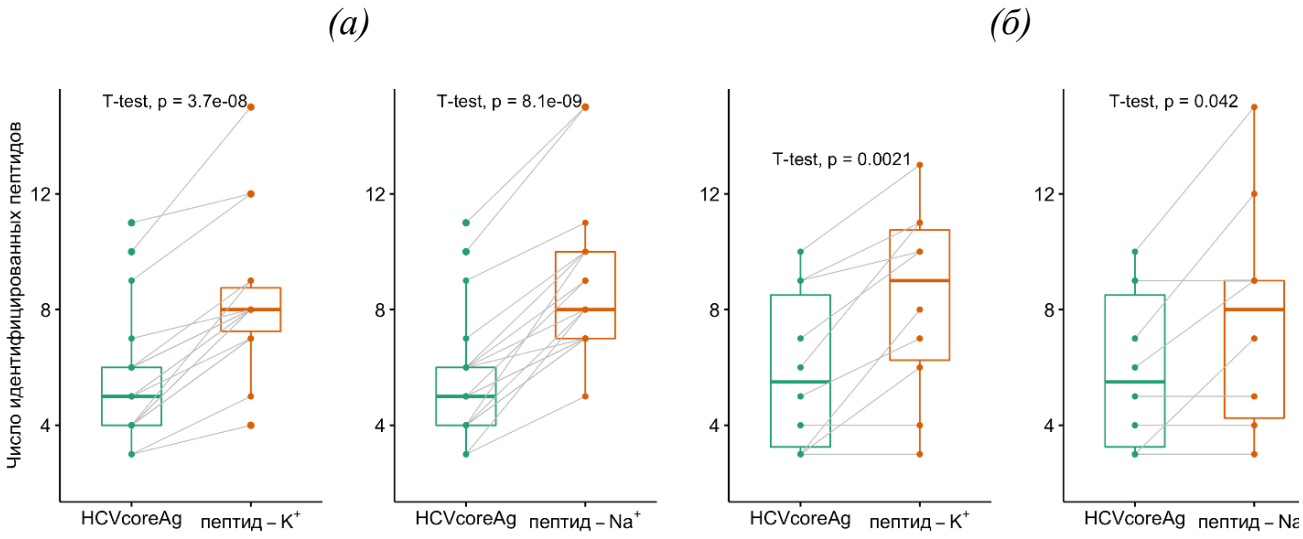


Рисунок 29. – АСМ/МС подход и биоспецифический фишинг: анализ элюатов с поверхности АСМ-чипов после инкубации в образцах сыворотки крови с учетом пептидов-аддуктов для HCVcoreAg. Поверхности были функционализированы молекулярными зондами: (а) моноклональными антилами, (б) аптамерами. p-значения получены парным Т-тестом для разницы средних.

Для двух вариантов иммуно-МАЛДИ анализа с применением аптамеров и антител в качестве молекулярных зондов показано, что учет, наряду с

триптическими пептидами белка, соответствующих аддуктов в биообразце повышает число идентификаций в среднем на 3 пептида (рисунок 29).

В таблице 21 обобщены сведения о выявленных пептидах кор-антигена ВГС с учетом аддуктов. Столбец «Пептид-катион (M+)» содержит информацию о количестве биологических образцов, в которых был выявлен интактный пептид и соответствующий ему пептид-аддукт. В данных, представленных в таблице 21 видно, что частота встречаемости модифицированных форм пептидов в образцах сыворотки неоднородна и варьирует от одного случая до встречаемости практически во всех исследованных образцах (n=19).

Для 19 триптических пептидов кор-антигена в образцах сывороток крови, положительных на наличие вирусного гепатита С, были выявлены соответствующие модифицированные катионами пептиды. В ряде случаев применение в качестве молекулярных зондов аптамеров и антител продемонстрировали схожие результаты. Для 11 из 19 пептидов показано, что в образцах крови присутствуют пептиды-аддукты в случае проведения биоспецифического фишинга с использованием двух типов молекулярных зондов. Наблюдается различное сродство пептидов кор-антигена с катионами натрия или калия. В полученных результатах наблюдается предпочтительное связывание пептида с ионом калия или натрия независимо от способа функционализации поверхности АСМ-чипа. Результаты АСМ/МС подхода с применением разных типов молекулярных зондов в большом количестве случаев согласуются. Анализ распределения пептидов-аддуктов, связанных с калием или натрием, показал, что доля пептидов-аддуктов, связанных с калием, примерно соответствует доле пептидов-аддуктов, связанных с натрием.

Таблица 21. Результаты выявления катион-модифицированных пептидов HCVcoreAg в 20 образцах сыворотки крови, положительных на наличие ВГС, с применением АСМ/МС подхода.

Пептид кор-антигена*	Зонд	m/z	Локус***	Пептид-катион (M^+)	
				Na^+, Na_2Cl^+	K^+, K_2Cl^+
RGPRLGVR	Аптамер	910,5	40-47	–	2
ATRKTSER	Аптамер	948,5	48-55	–	4
	МКА**			2	–
GRRQPIPK	Аптамер	951,5	60-67	2	–
	МКА			4	–
TSERSQPR	Аптамер	960,4	52-59	–	5
RQPIPKAR	Аптамер	965,6	62-69	6	1
	МКА			6	5
KTNRNTNR	Аптамер	1003,6	42-47	5	
	МКА			–	6
MSTNPKPQK	Аптамер	1030,5	41-47	3	–
GPRLGVRATR	Аптамер	1082,6	41-50	5	–
	МКА			2	–
KTSERSQPR	Аптамер	1088,6	51-59	–	1
	МКА			–	1
MSTNPKPQKK	Аптамер	1158,6	41-48	1	–
	МКА			4	–
TSERSQPRGR	Аптамер	1173,6	52-61	4	19
	МКА			–	1
NTNRRPQDVK	МКА	1227,6	14-23	–	2
GSRPSWGPTDPR	Аптамер	1312,7	102-113	1	1
QPIPKARQPEGR	Аптамер	1376,7	63-74	–	5
GSRPSWGPTDPRR	Аптамер	1468,7	102-114	11	–
	МКА			3	–
MSTNPKPQKKTNR	Аптамер	1529,8	41-51	1	–
GSRPSWGPTDPRRR	Аптамер	1624,8	102-115	11	–
	МКА			2	4
FPGGGQIVGGVYLLPR	Аптамер	1629,9	24-39	3	2
	МКА			1	3
SQPRGRRQPIPKAR	МКА	1646,7	56-69	2	2
FPGGGQIVGGVYLLPRR	Аптамер	1786,0	24-40	12	2

Пептид кор-антигена* – UniProt AC Q8V7V3; МКА** – моноклональное антитело; Локус*** - диапазон порядковых номеров аминокислот, соответствующих пептиду в аминокислотной последовательности кор-антигена.

Обобщая вышесказанное, можно заключить, что комбинация биоспецифического фишинга белков с МС-анализом эффективна для выявления вирусного маркера HCVcoreAg в образцах сыворотки крови с использованием моноклональных антител и аптамеров в качестве молекулярных зондов. В образцах крови катионы взаимодействуют с циркулирующими в сыворотке

белками, в том числе с молекулами HCVcoreAg [9,315]*. Целесообразно учитывать данное явление формирования вариантов интактных пептидов, модифицированных катионами в масс-спектрометрическом эксперименте для повышения числа идентификаций.

Предложено применение АСМ/МС подхода для выявления вероятных вариантов аминокислотной последовательности целевого белка. Подход основан на комбинации биоспецифического фишинга с использованием моноклональных антител с целью концентрирования целевого белка на поверхности АСМ-чипа и ВЭЖХ-МС/МС (детектор типа ионная ловушка). Типичным для экспериментов с применением АСМ/МС подхода детектирование кор-антиген вируса гепатита С в образцах сыворотки крови по трем его протеотипическим пептидам: *RPQDVKFPTGGQIVGGVYLLPR* (m/z=799,7) и *RPQDVKFPSGGQIVGGVYLLPR* (m/z=795,0) и *FPCGGQIVGGVYLLPR* (m/z=559,3) [317]*.

Экспериментально нами было показано, что повышение достоверности идентификации белковых маркеров ВГС может быть достигнуто путем выявления возможных аминокислотных вариантов первичной последовательности белка. Такие варианты обусловлены, прежде всего, наличием неконсервативных участков в последовательности HCVcoreAg. К консервативному участку кор-антигена ВГС относят гидрофобный домен с локализацией в аминокислотной последовательности 2-74, и 101-121. Участок 75-100 а.о. может рассматриваться в качестве вариабельной части белка [318]. В базе знаний *UniProt KB* аннотированы, по меньшей мере, несколько сотен вариантов аминокислотной последовательности для кор-антигена, отличные по аминокислотной последовательности и длине первичной последовательности [316]*.

В нескольких случаях (n=3) в образцах сыворотки крови, положительных на наличие гепатита С, метод ВЭЖХ-МС/МС позволил выявить помимо «канонических» по аминокислотной последовательности кор-антигена пептиды RPQDVKFPGGGQIVGGVYLLPR (m/z=799,9) и CGSGPWMTPRCLVHYPYR (m/z=708,5) и QPIPKDR (m/z=427,3), пептид *T(A)*WAQPGYPWPLYGNEGLGWA

GWLLSPR, вероятно, содержащий аминокислотную замену в положении 75 треонин→аланин [317*]. Данный вариант пептида не характерен «канонической» форме белка Q8V7V3 (UniProt AC), которая наиболее часто идентифицирована в образцах сыворотки методами МАЛДИ-МС и ВЭЖХ-МС/МС. Вариант аминокислотной последовательности пептида «канонической» формы белка также превалирует среди аннотированных изолятов ВГС в базе знаний UniProt KB. Тем не менее, обнаруженный в экспериментах вариант аминокислотной последовательности пептида кор-антигена с заменой в положении T75A не является уникальным и встречается, по меньшей мере, в 10 изолятах ВГС, в том числе HC-J2 (P27959 UniProt AC), HCV-KF (Q01403 UniProt AC), HCV-476 (Q01404 UniProt AC) (рисунок 30).

Рисунок 30. – Выравнивание «неканонического» пептида, содержащего аланин в положении 75. Для выравнивания применялся метод Blast по базам данных UniProt KB и Swiss-Prot с матрицей для выравнивания pam70.

Таким образом, можно сделать вывод, что АСМ/МС подход с применением биоспецифического фишинга может успешно применяться для выявления кор-антигена ВГС в образцах сыворотки крови человека методами МАЛДИ-МС, так и ВЭЖХ-МС/МС. Учет возможных модификаций катионами натрия и калия пептидов кор-антигена, помимо их интактных форм, позволяет повысить число регистрируемых пептидов. Анализ возможных вариантов аминокислотных последовательностей пептидов также может быть использован в качестве дополнительного инструмента идентификации пептидов целевого белка.

6.2 АСМ/МС подход для обнаружения нуклеинопротеиновых комплексов в образцах сыворотки крови

Другим перспективным для медико-биологических исследований направлением применения АСМ/МС подхода является выявление возможных белков-партнеров для исследуемых биомолекул. Было проведено исследование, в котором поверхность АСМ-чипов содержала ковалентно иммобилизованные олигонуклеотиды, специфичные по отношению к микроРНК, ассоциированных с развитием расстройств аутистического спектра (РАС) у детей. В работе использовали семь типов молекулярных зондов, специфичные miR-106a [319–321], miR-19b-3p [322–325], miR-494 [323–325], miR-15b-5p [320,324], miR-320a [320], miR-195-5p [324].

Обоснование выбора микроРНК для АСМ/МС подхода в комбинации с биоспецифического фишингом

МикроРНК относятся к некодирующим РНК небольшой длины в среднем 17-25 нуклеотидных оснований, которые участвуют в регуляции трансляции кодирующей матричной РНК (мРНК). Зрелые микроРНК включаются в комплексе RISC (комплекс РНК-индуцированного сайленсинга), который содержит белки Dicer и Argonaute (AGO), для последующей деградации целевой мРНК либо супрессии/активации трансляции мРНК. МикроРНК могут преодолевать гематоэнцефалический барьер и могут быть зарегистрированы в сыворотке крови больных с нарушениями развития нервной системы и неврологическими расстройствами в составе микровезикул, высвобождаемых нейронами и глиальными клетками, макромолекулярных белковых и липопротеомных комплексов.

Исследователи обосновывают вовлеченность вышеуказанных типов микроРНК в патогенез РАС у детей. В работе Абу-Ильнила показано, что miR-106a дифференциально экспрессируется в коре мозжечка пациентов с РАС по сравнению с условно-здоровыми участниками исследования [320]. Наблюдается изменение содержания этой некодирующей РНК в сыворотке крови также у

больных астроцитомой, первичной опухолью головного мозга и в образцах цельной крови при болезни Альцгеймера, как было показано в работах Жи (2014) и Ильмаза и др. (2016), соответственно [321,326]. Повышение экспрессии miR-19b было показано в образцах сыворотки крови, ткани головного мозга (зона Бродмана) больных РАС детей [322–325], miR-320a в моноцитах периферической крови [320]. Понижение уровня экспрессии наблюдается для miR-15b в ткани мозжечка, образцах периферической крови, в моноцитах периферической крови [320,324], miR-195-5p в образцах периферической крови [324].

Результаты экспериментальных измерений

В нашей работе чипы с иммобилизованными олигонуклеотидами инкубировали в образцах сыворотки крови детей с РАС и условно-здоровых участников исследования, проводили визуализацию и детектирование сформированных объектов на поверхности чипа методом АСМ и масс-спектрометрическую идентификацию состава выявленных объектов [327]*.

В результате инкубации функционализированных чипов в образцах сыворотки крови двух групп сравнения наблюдали отличия в количестве и средних высотах объектов, сформированных на поверхности чипов. После инкубации в образцах крови детей с РАС были визуализированы объекты со средней высотой 10 нм, после инкубации в образцах крови условно-здоровых участников – около 6 нм [327]*.

Был проведен анализ белков в составе визуализированных объектов с применением метода МАЛДИ-МС. На функционализированной поверхности чипов после инкубации в образцах крови обеих групп сравнения были выявлены десять клеточных белков (рисунок 31).

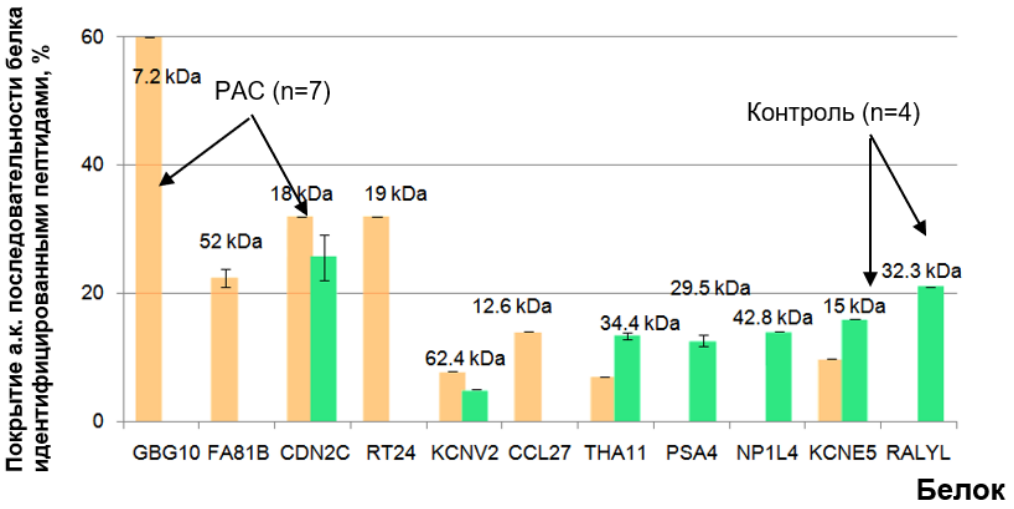


Рисунок 31. – ACM/MC подход и биоспецифический фишинг. Гистограмма покрытия аминокислотной последовательности белков, зарегистрированные на функционализированной олигонуклеотидами поверхности чипов после инкубации в образцах крови больных PAC (оранжевые столбцы, n=7) и здоровых участников (зеленый столбцы, n=4). Указаны значения стандартного отклонения для результатов измерений, молекулярный вес белков. Рисунок адаптирован из [327].*

На поверхности чипов, функционализированных олигонуклеотидами, специфичными микроРНК, могут быть выявлены белки в образцах крови детей с PAC в составе GBG10, FA81B, RT24, CCL27, белки в образцах крови условно-здоровых добровольцев представлены PSA4, NP1L4, RALYL (таблица 22). Также выявлены CDN2C, KCNV2, THA11 и KCNE5, которые были идентифицированы на поверхности обеих групп сравнения. Покрытие идентифицированными пептидами и их аддуктами, то есть модифицированными катионами калия и натрия пептидными фрагментами, составило от 10 до 60% (рисунок 31). Идентификация белков с учетом возможных пептидов-аддуктов повышает достоверность масс-спектрометрической детекции [315]*.

Таблица 22. АСМ/МС подход в случае применения биоспецифического фишинга: белки, выявленные на функционализированной олигонуклеотидами поверхности чипов после инкубации в образцах крови больных РАС. Адаптировано из [327].*

Белок	Число образцов	Биологическая активность (по данным UniProt KB)	Mw*, кДа	pI	Алифатический индекс
GBG10	4	Гуанидин-связывающий белок	7,2	7,7	95
FA81B	2	Нет данных	52	9,2	82
CDN2C	2	Репрессор клеточного роста и пролиферации	18,1	7,7	95
RT24	2	28S рибосомальный белок	19	9,5	90
KCNV2	2	Потенциал зависимый белок калиевого канала	62,4	6,1	84
CCL27	3	Хемотаксический фактор Т-лимфоцитов	12,6	9	100
THA11	3	Репрессор транскрипции	34,4	9,2	71
PSA4	2	Белок организации протеосом	29,6	7,6	87
NP1L4	2	Белок организации нуклеосом	42,8	4,6	65
KCNE5	3	Потенциал зависимый белок калиевого канала	15	5,9	91
RALYL	2	РНК-связывающий белок	32,3	7,7	73

Mw* – молекулярный вес белка

Как видно из таблицы 22, встречаемость белков в биологических образцах детей с РАС составила от 2 до 4. По функциональной активности выявленные белки участвуют в формировании нуклеопротеиновых комплексов - GBG10, RT24 и RALYL, организации протеосом и нуклеосом - PSA4, NP1L4, организации канала активного транспорта калия - KCNE5, KCNV2. По физико-химическим свойствам белки различны по молекулярному весу (от 7 до 62 кДа), изоэлектрической точке (от 4,6 до 9,5), алифатическому индексу (от 65 до 100). Белки со значениями pI менее 7,4 (физиологическое значение сыворотки крови) являются мембранными (KCNE5 и KCNV2) либо циркулируют в кровеносном русле составе везикул (PSA4, NP1L4). Выявленные белки характеризуются функциональной активностью и физико-химическими свойствами, которые, вероятно, обусловливают их участие в формировании макромолекулярных белково-нуклеотидных комплексов.

На рисунке 32 представлены спектры МАЛДИ, полученные для функционализированных поверхностей АСМ-чипов после инкубации в образцах крови обеих групп сравнения: в образцах крови детей с РАС (рисунок 32*а*) и в образцах крови условно-здоровых участников исследования (рисунок 32*б*).

На поверхности чипов для АСМ после инкубации в образцах крови больных РАС выявлены пептиды и соответствующие им аддукты для гуанидин-связывающего белка (GBG10), которые отмечены на рисунке 32*а* красными индикаторами, для белка FA81B, соответствующие пики отмечены синими индикаторами. На том же рисунке видно, что спектры, полученные с применением АСМ/МС подхода для элюатов с поверхностей АСМ-чипов после инкубации в образцах сыворотки крови детей с РАС схожи по составу наиболее интенсивных пиков в спектрах МАЛДИ.

На рисунке 32*б* представлены спектры МАЛДИ, полученные для элюатов с поверхностей АСМ-чипов после инкубации в образцах здоровых добровольцев. На спектрах синим маркером отмечены пики, соответствующие по *m/z* пептидам и пептидам-аддуктам белка PSA4, который является участником организации протеосом; розовым маркером отмечены пики, соответствующие пептидам РНК-связывающего белка RALYL; желтым маркером отмечены пики, соответствующие пептидам белка NP1L4, участвующему в организации нуклеосом. Спектры, полученные с применением АСМ/МС подхода для элюатов с поверхностей АСМ-чипов после инкубации в образцах сыворотки условно-здоровых участников схожи по составу наиболее интенсивных пиков в спектрах МАЛДИ.

В обеих группах образцов выявлены контаминантные пики, соответствующие по спектральным характеристикам пептидам сывороточного альбумина (зеленый индикатор на рисунках 32*а* и 32*б*), обусловленные неспецифической сорбцией сывороточных белков на поверхность АСМ-чипов.

Таким образом, наблюдается высокое сходство состава характеристик *m/z* для образцов каждой группы сравнения (внутригрупповое сходство), в то время как состав наиболее интенсивных пиков в спектрах, полученных для чипов двух групп сравнения, отличен.

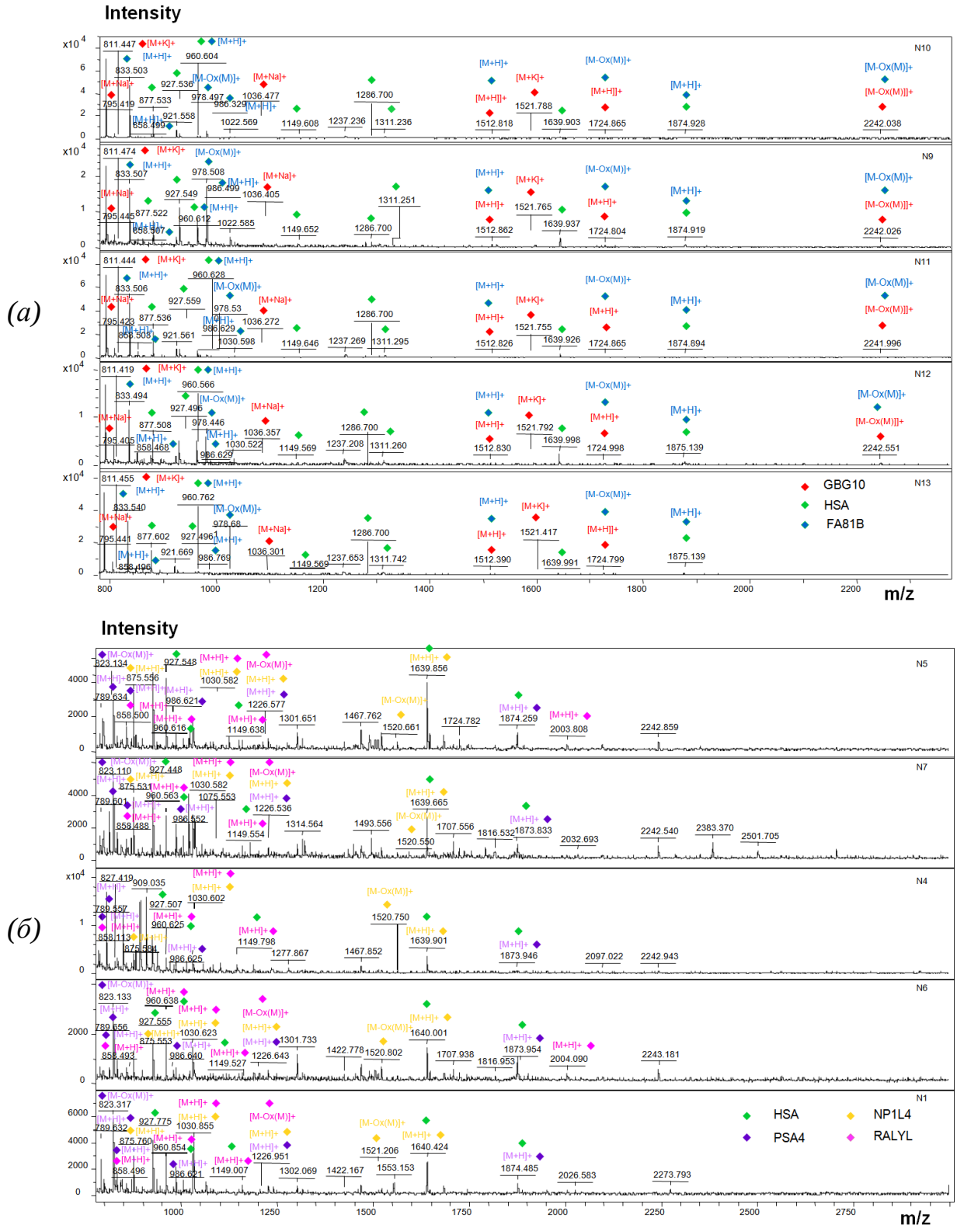


Рисунок 32. – АСМ/МС подход и биоспецифический фишинг: спектры МАЛДИ для чипов с функционализированной аптамерами поверхностью после инкубации в образцах (а) сыворотки крови детей с РАС; (б) сыворотки крови условно-здоровых участников исследования. Цветными индикаторами указаны идентифицированные белки, $[M+H]^+$ – интактный пептид белка, $[M+K]^+$ / $[M+Na]^+$ – аддукт интактного пептида с калием и натрием, $[M+Ox(M)]^+$ – интактный пептид с учетом модификации – окисленный метионин [327].*

В работе показана принципиальная возможность применения в качестве молекулярных зондов олигонуклеотидов, специфичных по отношению к микроРНК. На примере анализа образцов сывороток крови детей с РАС, показана возможность применения АСМ/МС подхода для выявления макромолекулярных комплексов, специфически или неспецифически сорбированных на функционализированной поверхности чипа для АСМ.

6.3 АСМ/МС подход в детектировании медицински значимых белков

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 физико-химические свойства, а также доступность молекулярных зондов (антитела или аптамеры). 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 из литературных источников, результаты масс-спектрометрических измерений позволяют дополнить состав кандидатных белков для АСМ/МС подхода.

6.3.1 Белки, кодируемые генами хромосомы 18 человека

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)[5]: GATA-связывающий фактор 6 (GATA-6), ядерный фактор активированных Т-клеток (NFATc1), транскрипционный фактор 4 (TCF4), белки, кодируемые генами TGIF1, Rax и серпин B3 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.

Уровень экспрессии белкового фактора TGIF1 (Q15583) повышается в клеточных линиях рака яичников. Ядерный фактор актированных Т-клеток, или NFATC1 (O95644) также является онкомаркером. NFATc1 по кальций-зависимому сигнальному пути активирует онкоген *c-myc* при раке поджелудочной железы. Транскрипционный фактор 4, или TCF 4 (P15884) участвует в развитии рака легких. Транскрипционный фактор GATA-6 (Q92908) является участником патогенеза рака желудка. Белок ZNF24 (P17028) является онкомаркером и участвует в развитии рака простаты. Антиген плоскоклеточной карциномы SerpinB3 (P29508) является кандидатным онкомаркером рака легких.

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 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

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

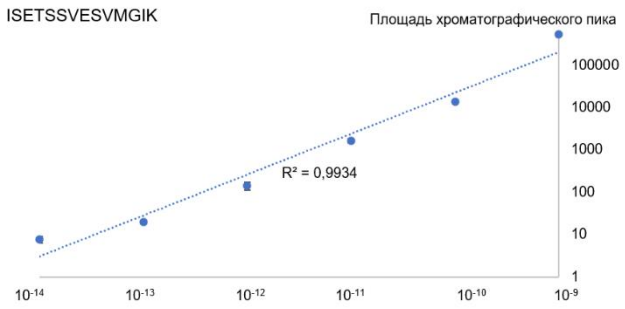
программного обеспечения SkyLine 1.4 (таблица 23). Проверку уникальности пептидных последовательностей осуществляли с использованием программы *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST, http://www.uniprot.org/blast).

Таблица 23. Перечень протеотипических пептидов для целевых белков.

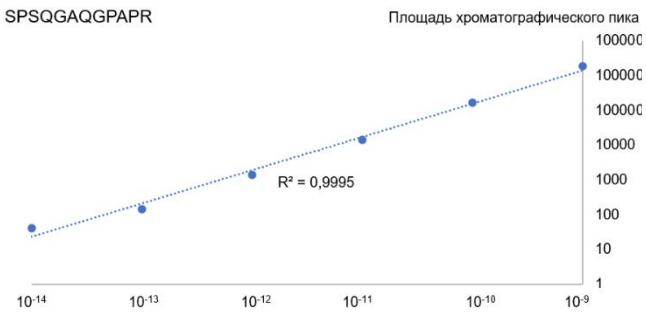
Белок	Название белка	Пептид	Длина аминокислотной последовательности	Мол. вес, Да	Коэффициент гидрофобности пептида
Q15583	TGIF1	ISETSSVESVMGIK	14	1466,6	23,11
		SPSQGAQGPAPR	12	1152,2	8,02
O95644	NFAT c1	MVLSGHNFLQDSK	13	1475,6	26,99
		LHDLSPAAYTK	11	1215,3	20,15
P15884	TCF4	MAALGTDK	8	805,9	11,38
		GSGAAGSSQTGDALGK	16	1363,4	10,26
Q92908	GATA 6	FGAAGADASDSR	12	1124,1	9,82
		GPSADLLEDLSESR	14	1488,5	33,75
P17028	ZNF24	YGETCFPK	8	944,0	17,68
		IHSGEKPYGCVECGK	15	1606,8	13,25
P29508	SerpinB3	GLVLSGVLHK	10	1022,2	28,41
		VLHFDQVTENTTGK	14	1588,7	21,90

Отобранные пептиды были синтезированы в качестве стандартов. 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 (рисунок 33).

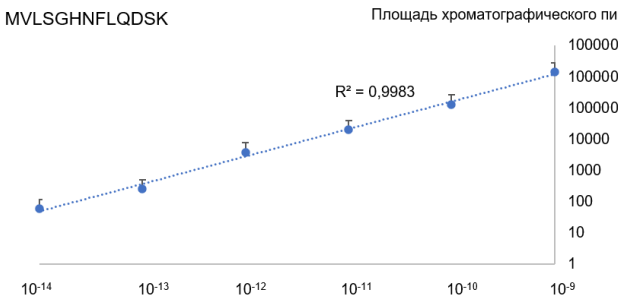
(а)


ISETSSVESVMGIK
Площадь хроматографического пика
R² = 0,9934

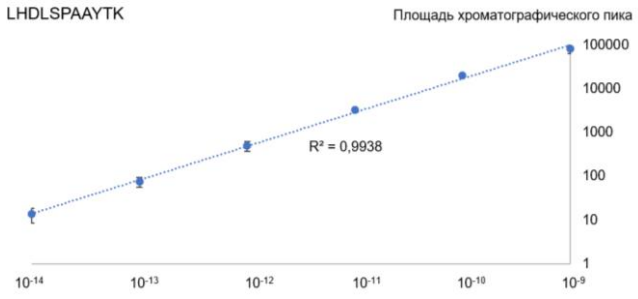
(б)


SPSQGAQGPAPR
Площадь хроматографического пика
R² = 0,9995

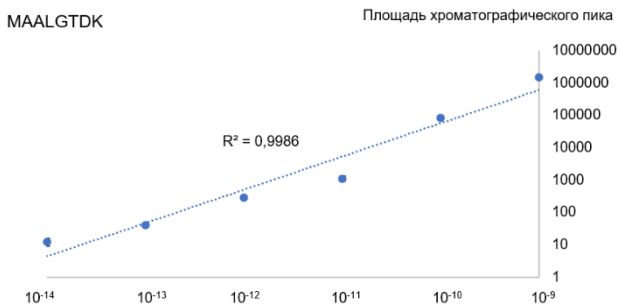
(в)


MVLSGHNFLQDSK
Площадь хроматографического пи
R² = 0,9983

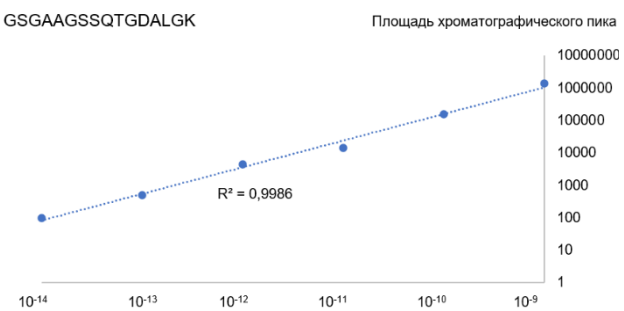
(г)


LHDLSPAAYTK
Площадь хроматографического пика
R² = 0,9938

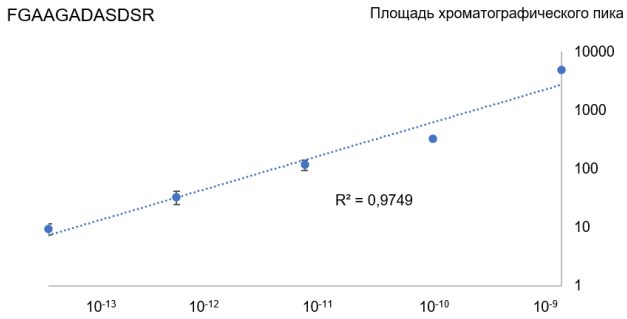
(д)


MAALGTDK
Площадь хроматографического пика
R² = 0,9986

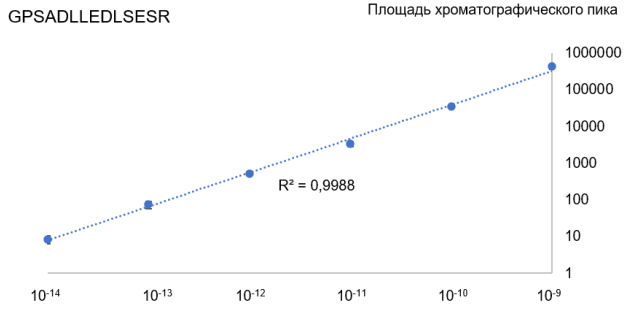
(е)


GSGAAGSSQTGDALGK
Площадь хроматографического пика
R² = 0,9986

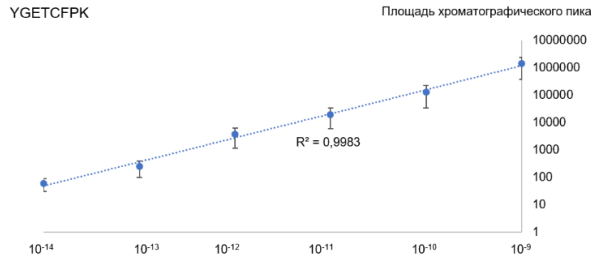
(ж)


FGAAGADASDSR
Площадь хроматографического пика
R² = 0,9749

(з)

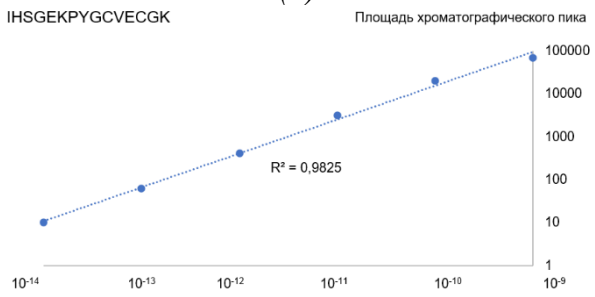

GPSADLLEDLSESR
Площадь хроматографического пика
R² = 0,9988

(и)

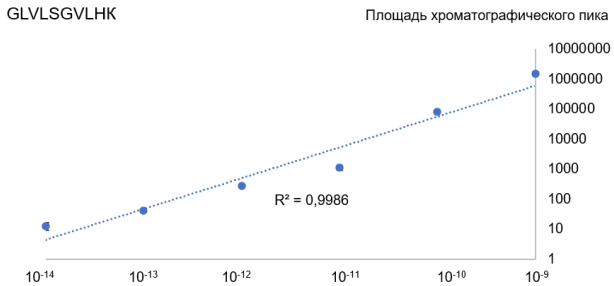

YGETCFPK
Площадь хроматографического пика
R² = 0,9983

(Продолжение рисунка 30)

(к)



(л)



(м)

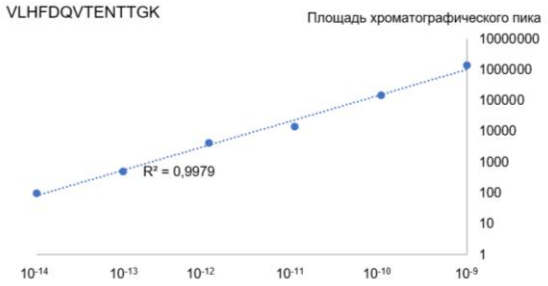


Рисунок 33. –Белки 18 хромосомы человека, ассоциированные с развитием онкологических патологий: калибровочные прямые, полученные для пептидов целевых белков методом ВЭЖХ-ММР в исследуемых растворах белок в диапазоне концентраций от 10^{-9} до 10^{-14} М (ось абсцисс на рисунках) белок TGIF1 (Q15583 UniProt AC) (а) ISETSSVESVMGIK и (б) SPSQGAQGPAPR; NFAT c1 (O95644 UniProt AC) (в) MVLSGHNFLQDSK и (г) LHDLSPAAYTK; TCF4 (P15884 UniProt AC) (д) MAALGTDK и (е) GSGAAGSSQTGDALGK; GATA 6 (Q92908 UniProt AC) (ж) FGAAGADASDSR и (з) GPSADLLEDLSESR; ZNF24 (P17028 UniProt AC) (и) YGETCFPK и (к) IHSGEKPYGCVECGK; SerpinB3 (P29508 UniProt AC) (л) GLVLSGVLHK и (м) VLHFDQVTENTTGK. Указаны величины стандартного отклонения для измерений по трем техническим повторениям. Приведены логарифмические значения для шкалы абсцисс и ординат.

Как видно из рисунка 33 выбранные пептиды целевых белков могут быть обнаружены в исследуемом диапазоне концентраций от 10^{-9} до 10^{-14} М. Калибровочные прямые, полученные методом ВЭЖХ-ММР для пептидов целевых белков, имеют вид прямых с линейным участком в выбранном диапазоне концентраций со значениями коэффициента корреляции R^2 >0,97. 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 штук. Поверхность чипов содержала массив сенсорных зон с иммобилизованными аптамерами (рисунок 34). На рисунке 34 показан дизайн поверхности чипов с 6 кластерами сенсорных зон для проведения многопараметрического детектирования белков.

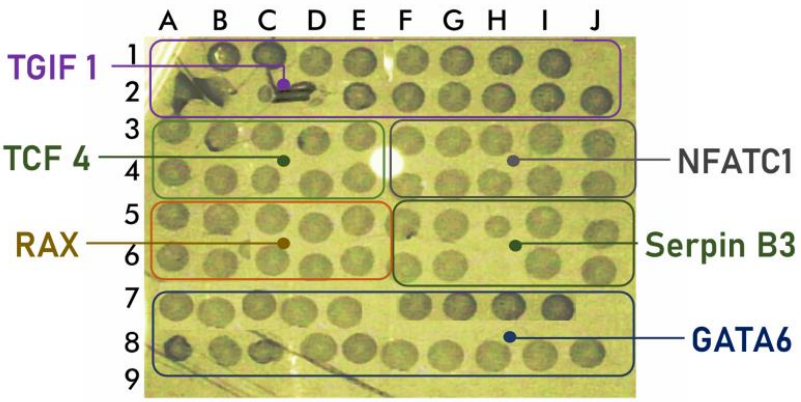


Рисунок 34. – Изображение массива сенсорных зон на поверхности чипа для проведения измерений с применением АСМ/МС подхода.

В таблице 24 обобщены результаты сравнительного анализа 25 образцов плазмы крови. В таблице указаны 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 случаях применения АСМ/МС подхода (столбец №4) и без

использования АСМ/МС подхода (столбец №5). В семи образцах плазмы крови успешно детектированы пептиды целевых белков в обеих экспериментальных сериях.

Таблица 24. Результаты мультипараметрического ВЭЖХ-ММР анализа белков, кодируемых генами хромосомы 18 для образцов плазмы крови.

1	2	3	4	5
Белок (UniProt ID)	Число образцов	Последовательность пептида	Концентрация, М	
			АСМ/МС	МС
TGIF1 (Q15583)	3	*ISETSSVESVMGIK* *SPSQGAQGPAPR*	10^{-12}	10^{-12}
NFATc1 (O95644)	2	*MVLSGHNFLQDSK* *LHDLSPAAYTK*	10^{-13}	Не обнаружен
TCF4 (P15884)	2	*MAALGTDK* *GSGAAGSSQTGDALGK*	10^{-12}	10^{-12}
GATA-6 (Q92908)	2	*FGAAGADASDSR* *GPSADLLEDLSESR*	10^{-12}	10^{-12}
Serpin B3 (P29508)	2	*GLVLSGVLHK* *VLHFDQVTENTTGK*	10^{-11}	10^{-12}

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 24 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. Содержание белков составило 10^{-11}-10^{-13}М, что соответствует диапазону низких концентраций (см. Глава 1, рисунок 1).

6.3.2 Белки, ассоциированные с развитием рака яичников

В данной части работы выполнено обоснование выбора целевых белков, ассоциированных с развитием рака яичников, для АСМ/МС подхода и конструирования чипов для АСМ с массивом сенсорных зон. Для этого, в первой части работы был проведен сравнительный сканирующий масс-спектрометрический анализ белкового состава образцов, полученных от пациенток с диагнозом рак яичников и условно-здоровых участниц исследования. Выявление белков осуществлялось методом масс-спектрометрического анализа с использованием детектора типа орбитальная ловушка ионов (ВЭЖХ-МС/МС)

путем категоризации качественного и полуколичественного состава белков в образцах крови. Масс-спектрометрический анализ позволил идентифицировать группу общих белков для обеих групп сравнения (n=97), а также белки (n=73), специфичные образцам крови больных раком яичников и белки (n=17), специфичные образцам крови условно-здоровых участниц (рисунок 35*а* и 35*б*).

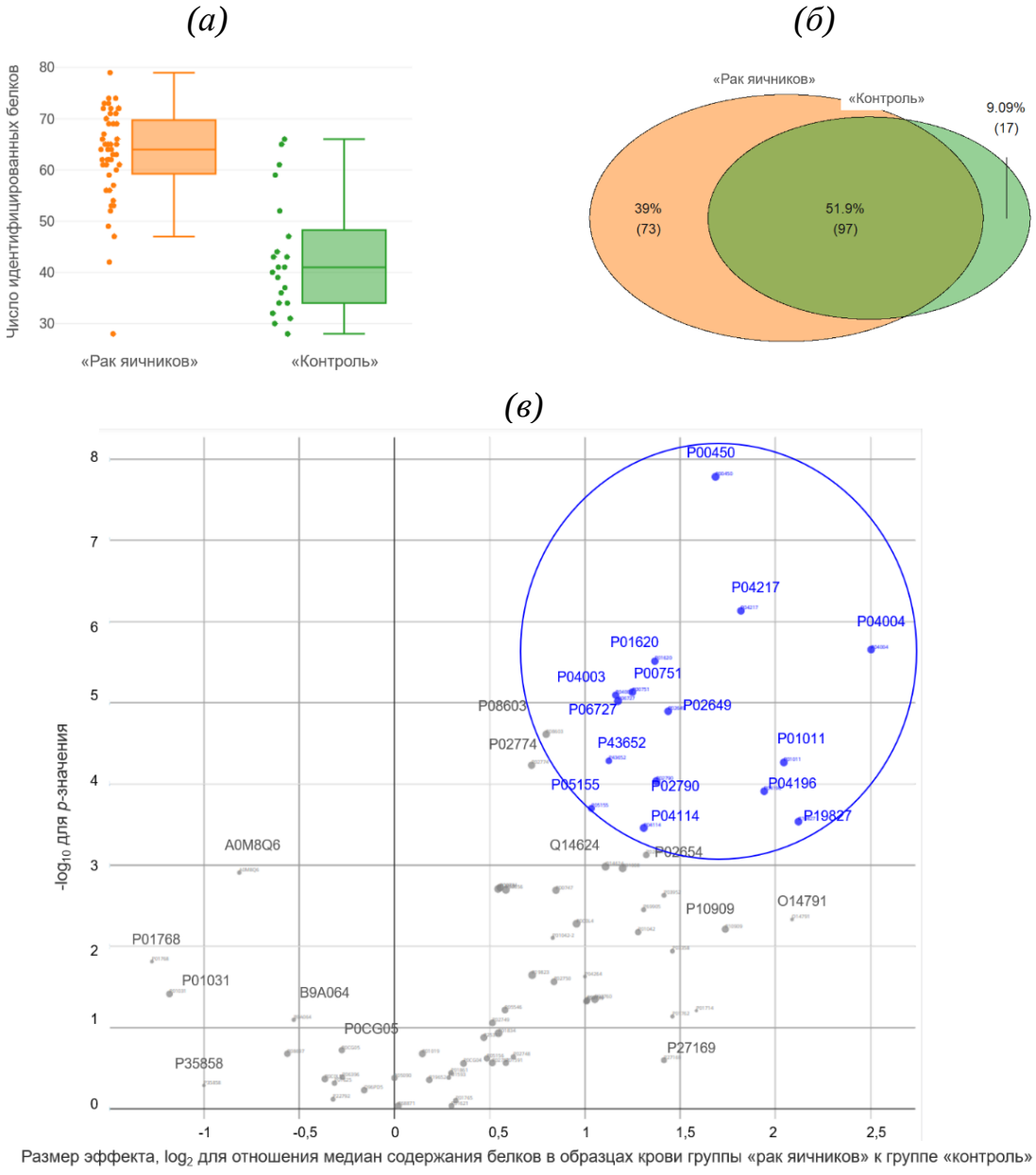


Рисунок 35. – Разработка дизайна чипов для АСМ: результаты ВЭЖХ-МС/МС измерений (а) диаграммы, характеризующие число идентифицированных белков в образцах плазмы крови для групп сравнения «рак яичников» и «контроль»; (б) диаграмма, отражающая размер пересечения идентифицированных белков между группами сравнения; (в) точечная диаграмма, характеризующая дифференциальное содержание белков в группах сравнения. Синей областью отмечены белки, содержание которых значимо повышено в два и более раз в образцах плазмы крови группы «рак яичников» по сравнению с группой «контроль».

В обеих группах сравнения были идентифицированы белки, участвующие в регуляции процессов повреждения (бета-2-гликопротен I, фактор коагуляции XII, каллекреин B, всего 27 белков), активации системы комплемента (компоненты комплемента 1,4,6,8,9, всего 15 белков), регуляции протеолиза (гельсонин, липопротеин, кининоген I, всего 31 белок), ответа на воспаление (ангиотензиноген, аполипопротеин D, сывороточный амилоид P, всего 21 белок) (по данным STRING 10, *http://string-db.org/*).

Точечная диаграмма, представленная на рисунке 35*в*, отражает количественные изменения содержания белковых компонентов в образцах крови двух групп сравнения. На оси абсцисс указан размер эффекта (логарифмическая шкала) и отражает изменение содержания белков в образцах крови группы «рак яичников» относительно группы «контроль». Значения меньше нуля ($x<0$) соответсвуют снижению содержания белка в группе «рак яичников» по сравнению с группой «контроль», значения больше нуля ($x>0$) указывают на повышение содержания белков в группе «рак яичников». На оси ординат указана статистическая значимость (логарифмическая шкала). В нашем исследовании изменение содержания белка между группами сравнения по модулю более чем в два раза при $p<0,05$ считалось значимым.

Как видно из рисунка 35*в*, обширный кластер общих идентификаций между группами сравнения гетерогенен по количественному содержанию белков. Синей областью на том же рисунке обособлены белки, значимо отличающиеся по содержанию между группами сравнения, а именно белки с повышением содержания в группе «рак яичников» более чем в два раза по сравнению с группой «контроль».

В образцах плазмы крови группы «рак яичников» обнаружены белки, участвующие в метаболических превращениях (ретинол-связывающий белок 4, протромбин, гельзолин, калликреин, кластерин, центриолин и проч.), регуляции биологических процессов (кининоген-1, каллистатин, гемопексин, церулоплазмин, аполипопротеин B-100 и проч.), в ответе на стресс (гепарин кофактор 2, альфа-2-HS-гликопротеин, утрофин, бета-2-гликопротеин 1, альфа-1-кислый гликопротеин

1 и проч.) [287]*. В результате семантического анализа состава белковых идентификаций, специфичных только биообразцам больных раком яичников и не обнаруженных в группе сравнения, были определены белок-кодирующие гены, ассоциированные с развитием онкологических заболеваний, заболеваний с прямой коморбидностью, в том числе нарушения функций иммунной системы, эндокринные заболевания и нарушение обмена липидов. Был сформирован перечень белков, отличающий фенотип «онкология», который включает девять белков с повышенным содержанием в образцах крови и семь белков с пониженным содержанием в образцах по сравнению с группой «контроль» (p<0.05) (таблица 25).

Таблица 25. Перечень дифференциально экспрессируемых белков в образцах крови больных раком яичников по сравнению с группой сравнения.

UniProt AC	Название белка	*p-значение**	Изменения содержания
P20742	Белок PZP	0,0002	9,9
P04278	Белок, связывающий половые гормоны (SHBG)	0,0002	7,9
P22792	Карбоксипептидаза N субъединица 2	0,0001	7,2
P05543	Тироксин-связывающий белок (Serpin A7)	1,3E-06	6,7
P02775	Основной белок тромбоцитов (PBP)	3,6E-06	6,5
P05160	Фактор коагуляции XIII цепь B	0,003	5,6
P0DJI8	Сывороточный амилоид A-1 (SAA)	0,05	4,4
Q08380	Галектин-3-связывающий белок	0,0003	4,2
Q96KN2	Бета-аланин-гисдипептидаза	0,01	3,8
P03952	Кининоген	4,1E-07	-4,6
P08519	Тяжелая цепь ингибитора интер-альфа-трипсина H2	0,001	-5,3
Q03591	Фактор комплемента H-связанный белок 1 (FHR-1)	0,0002	-6,2
Q13790	Аполипопротеин F (Apo-F)	7,2E-09	-7,1
A8K855	EF-кальций связывающий белок 7	2,5E-11	-8,5
P0C0L4	Фактор комплемента C4-A	1,9E-07	-8,8
P02671	Фибриноген альфа цепь	2,0E-07	-9,8

p-значение* <0,05

Современные достижения в области системной биологии и протеомики повысили интерес к изучению роли посттрансляционной модификации (ПТМ) белка на механизмы развития онкопатологии. В связи с этим не прекращаются попытки разработать высокочувствительные и точные методы выявления ПТМ [328].

Был выполнен сравнительный ВЭЖХ-МС/МС анализ биологически значимых и наиболее популярных в медико-биологических исследованиях шести посттрансляционных модификаций (ПТМ) белков, выявленных в образцах плазмы крови женщин с установленным диагнозом рак яичников и условно-здоровых участниц исследования. С использованием поискового алгоритма Mascot выполнен анализ белкового состава образцов двух групп сравнения с учетом возможных модификаций: ацетилирование N-конца аминокислотной последовательности белка, ацетилирование лизина, фосфорилирование серина, треонина и тирозина, а также убиквитинирование лизина.

В серии образцов крови больных раком яичников выявлены белки и соответствующие им пептиды с посттрансляционным модифицированием. В результате сравнительного анализа обнаружены модификации аминокислотных остатков, специфичные группе «рак яичников». Результаты сравнительного анализа обобщены в таблице 26. Модифицирование выявлено в альбумине, альфа-2-макроглобулине, гаптоглобине, серотрансферрине, компонентах системы комплемента (всего 8 белков, таблица 26). Наиболее часто встречаемой модификацией стало убиквитинирование лизина, реже фосфорилирование серина, треонина и тирозина и ацетилирование лизина. Посттрансляционное убиквитинирование белков является важных биологическим механизмом, регуляции деградации белка, белок-белковых взаимодействий и субклеточной локализации белка. Фосфорилирование и ацетилирование белков играют важную роль в патогенезе широкого спектра заболеваний, в том числе онкологических.

Таблица 26. Белки с посттрансляционными модификациями, специфичные группе «рак яичников».

UniProt AC	Название белка	Число пептидов	Посттрансляционная модификация			
			Q(K)*	Ac(N)**	Ac(K)3*	P(Y, S, T)4*
P02768	Альбумин	33	12	–	17	–
P01023	α-2-макроглобулин	40	6	–	1	–
P02765	α-2-гликопротеин	2	3	–	–	–
P00738	Гаптоглобин	14	2	–	1	–
P02647	Аполипопротеин A-I	23	5	–	1	–
P19652	α-1-кислый гликопротеин 2	6	–	1	–	–
P02787	Серотрансферрин	19	–	11	–	–
P01834	IgG каппа цепь	4	–	1	2	1

Q(K)* – убиквитинирование лизина, Ac(N)**– ацетилирование N-конца полипептидной цепи, Ac(K)3* – ацетилирование лизина, P(Y, S, T)4* – фосфорилирование тирозина, серина, треонина, соответственно.

Картирование модифицированных аминокислотных остатков позволило определить, что ПТМ локализованы на поверхности белковых глобул, большей частью на концах альфа-спиралей и бета-тяжей, реже в неструктурированных петлях, соединяющих структурные домены или альфа-спирали и бета-тяжи (рисунок 36). Предполагается, что наличие ПТМ в элементах вторичной структуры оказывает локальное влияние на архитектуру белка, и как следствие, вероятно, могут модулировать биологическую активность белковой молекулы [24, 251, 329,330]*.

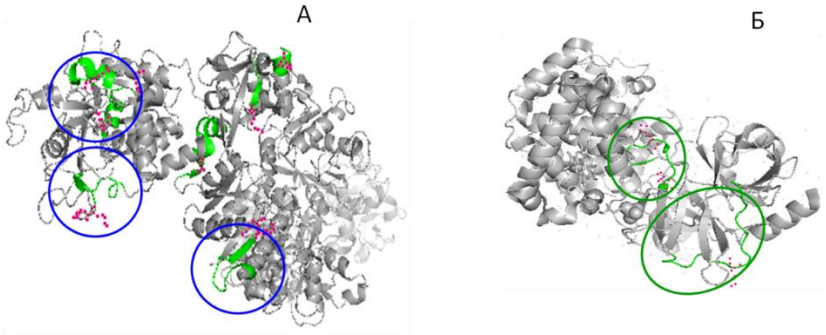


Рисунок 36. – Экспериментально определенные пространственные структуры белков серотрансферрина (а) и гаптоглобина (б), содержащие ПТМ из ресурса PDB. Зеленые участки структур соответствуют выявленным пептидам, содержащие ПТМ, красной индикацией обозначены боковые радикалы модифицированных аминокислотных остатков. Синими кружками отмечены участки белковой структуры, содержащие модифицированные аминокислотные остатки на концах альфа-спиралей и бета-тяжей, зелеными – в неструктурированных петлях (ресурс PyMOL) [331].*

Таким образом, анализ результатов масс-спектрометрических измерений сверхвысокого разрешения в режиме сканирования, полученных для образцов плазмы крови больных раком яичников и контрольной группы, позволил выявить белки, специфичные группе «рак яичников», дифференциально экспрессируемые белки и возможные посттрансляционные модификации белков. Данные о вероятном посттрансляционном модифицировании белка не могут быть использованы в АСМ/МС подходе, в связи с недоступностью аффинных реагентов. Тем не менее, полученные результаты важны для более полного понимания молекулярных механизмов патогенеза.

На втором этапе исследования была наработана партия чипов для АСМ с массивом сенсорных зон для детектирования 11 целевых белков, потенциально ассоциированных с развитием рака яичников. В состав перечня вошли продукты трансляции онкогенов – белок серпин b3, тимидилат-синтаза (TYMS), белок Bcl2, ядерный фактор активации Т-клеток (NFATc1) и транскрипционный фактор GATA6. На поверхности чипов были организованы 44 сенсорных зон, из которых 42 зоны содержали на поверхности иммобилизованные моноклональные антитела и аптамеры, специфичные целевым белкам и две контрольные зоны, на поверхности которой были иммобилизованы аптамеры и антитела против белка ПСА (простатический специфический антиген). Выбор анти-ПСА аптамеров и антител в качестве контрольных обусловлен ожидаемым отсутствием этого белка в образцах сывороток пациенток – женщин, больных раком яичников.

Результаты сканирования поверхности сенсорных зон методом атомно-силовой микроскопии подтвердили формирование на поверхности сенсорных зон объектов по высотам, превышающих объекты, зарегистрированные в двух контрольных зонах. Масс-спектрометрический анализ методом направленного мониторинга выбранных реакций (ММР) элюатов с поверхности функционализированных чипов позволил выявить в образцах целевые белки (таблица 27).

Таблица 27. Результаты мультипараметрического ВЭЖХ-ММР анализа белков, ассоциированных с раком яичников в образцах плазмы крови.

Зонд/целевой белок	**Название целевого белка**	**АСМ/МС подход****
МКА*/Серпин В3	белок, кодируемый геном SERPINB3	5
МКА/GATA 6	фактор транскрипции GATA-6	5
МКА/TYMS	тимидилатсинтаза	5
МКА/ десмоглеин 1	десмоглеин-1	6
МКА/N-кадгерин	N-кадгерин	6
МКА/CNDP2	неспецифическая цитозольная дипептидаза	6
МКА/Bcl2	белок регулятор апоптоза Bcl2	Не обнаружен
МКА/ПСА (контроль)	простатспецифический антиген	Не обнаружен
Аптамер/NFATc1	ядерный фактор активированных Т-клеток	4
Аптамер/TNFR	белок суперсемейства рецептора фактора некроза опухоли	Не обнаружен
Аптамер/YES	тирозин-протеинкиназа	6
Аптамер/TCF4	фактор транскрипции 4	6
Аптамер/GATA6	фактор транскрипции GATA-6	Не обнаружен
Аптамер/ПСА (контроль)	простатспецифический антиген	Не обнаружен
Аптамер/TGIF 1	белок, кодируемый геном TGIF1	5
Аптамер/Rax	белок, кодируемый геном Rax	6

МКА* – моноклональное антитело; АСМ/МС подход** – число образцов плазмы крови, в которых был детектирован белок.

Как видно из таблицы 27, в образцах плазмы крови больных раком яичников не были выявлены белок регулятор апоптоза Bcl2, белок суперсемейства рецептора фактора некроза опухоли, фактор транскрипции GATA-6 (в таблице отмечены, как «не обнаружен»). Применение АСМ/МС подхода позволило детектировать ядерный фактор активированных Т-клеток в четырех биологических образцах, белок, кодируемый геном SERPINB3, фактор транскрипции GATA-6 и тимидилатсинтаза в пяти биологических образцах. Десмоглеин-1, N-кадгерин, неспецифическая цитозольная дипептидаза, а также тирозин-протеинкиназа, фактор транскрипции 4, белок, кодируемый геном Rax были выявлены шести биологических образцах.

Таким образом, в настоящей главе представлены результаты экспериментальных исследований, которые обосновывают применимость АСМ/МС подхода и биоспецифического фишинга для детектирования белков в

образцах сыворотки и плазмы крови. Обоснована эффективность использования в АСМ/МС подходе в качестве молекулярных зондов моноклональных антител, аптамеров и олигонуклеотидов, специфичных по отношению к целевым биомолекулам. Показана возможность детектирования HCVcoreAg в образцах сыворотки крови больных вирусным гепатитом С и белков, кодируемых хромосомой 18 человека, в образцах плазмы крови больных онкологическими заболеваниями. Показана возможность применения АСМ/МС подхода для проведения количественного анализа содержания целевых белков в биологических образцах.

Повышение числа идентификаций достигается посредством детектирования наряду с интактными триптическими пептидами целевого белка, пептидов-аддуктов, модифицированных наиболее представленными в образцах крови катионами натрия и калия.

ГЛАВА 7. АСМ/МС подход для анализа биологической активности ферментов

Как было показано в предыдущих разделах, молекулы белков на поверхности чипов сохраняют 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.

7.1 Комбинация масс-спектрометра и оптического биосенсора для анализа биологической активности цитохром Р450-содержащих систем

Обоснование выбора объектов исследования

Ферменты семейства цитохром Р450 содержат гем, в котором происходит активация молекулярного кислорода. В результате активации реализуется реакция монооксигенации, в которой один атом кислорода участвует в окислении органического субстрата, второй атом кислорода восстанавливается до воды. Реакция осуществляется по общей схеме:

$R\text{-}H + O_2 + НАД(Ф)H + H^+ \rightarrow R\text{-}O\text{-}H + H_2O + НАД(Ф)^+$, где R-H субстрат [332,333].

Происходит последовательный перенос электронов от НАД(Ф)Н через белки-партнеры на цитохром Р450. В зависимости от типа системы переноса электронов белки семейства цитохром Р450 можно условно разделить на несколько классов [334]. Двух- и трехкомпонентные челночные системы содержат железосерный белок ферредоксин или адренодоксин, цитохромы Р450 бактериального или митохондриального происхождения, а также микросомальные цитохромы Р450 получают электроны от мембраносвязанного фермента дифлавинредуктазы [334].

В $P450_{cam}$-содержащей системе (от англ. «camphora», камфора) цитохром CYP101 (EC 1.14.15.1) бактериального происхождения *Pseudomonas putida* катализирует 5-экзогидроксилирование *D*-камфоры, что позволяет бактериям использовать *D*-камфору в качестве источника углерода (рисунок 37) [334,335].

Рисунок 37. – Схема ферментативного гидроксилирования D-камфоры до 5-экзогидроксикамфоры с участием цитохрома $P450_{cam}$ (CYP101).

У млекопитающих цитохромы Р450 митохондриального типа важны в биосинтезе холестерина, стероидных гормонов, витамина D и желчных кислот [334]. Так, в надпочечниках митохондриальный цитохром CYP11A1 (EC 1.14.15.6), известный как P450scc (от англ. «side chain cleavage», расщепление боковой цепи), осуществляет гидролиз боковой цепи холестерина с превращением субстрата в прегненолон. Данное превращение является начальной стадией синтеза стероидных гормонов (рисунок 38) [336].

Рисунок 38. – Схема ферментативного гидроксилирования холестерина до прегненолона с участием цитохрома $P450_{scc}$ (CYP11A1).

Экспериментальные результаты исследования

В исследовании проведен масс-спектрометрический анализ наработки продуктов для цитохромов $P450_{cam}$ и $P450_{scc}$ в чипах для оптического биосенсора [337*]. Проводилась масс-спектрометрическая регистрация содержания гидроксикамфоры и прегненолона с применением системы прямого ввода для трех серий экспериментов. В первой серии на поверхности чипа был иммобилизован белок адренодоксин (Ad-чип), наработка прегненолона осуществлялась в присутствии адренодоксин-редуктазы, цитохрома $P450_{scc}$, холестерина и НАДФН. Во второй серии на поверхности чипа был иммобилизован белок адренодоксин-

редуктаза (AdR-чип), наработка прегненолона осуществлялась в присутствии цитохрома $P450_{scc}$, адренодоксина, холестерина и НАДФН. В третьей серии на поверхности чипа был иммобилизован цитохром P450cam ($P450_{cam}$-чип), наработка гидроксикамфоры осуществлялась в присутствии путидаредоксин-редуктазы, камфоры и НАДН.

На первом этапе исследования для очищенных субстратов и продуктов камфоры и гидроксикамфоры, холестерина и прегненолона были получены библиотеки «референсных» спектров первого (МС) и второго (МС/МС) уровня. Характеристические пики в МС спектрах с наибольшей интенсивностью соответствовали *m/z*=152,9 для камфоры, *m/z*=168,9 для гидроксикамфоры, *m/z*=387,1 для холестерина и *m/z*=317,1 для прегненолона. Характеристические пики в МС/МС спектрах соответствовали значениям (*m/z*) 134,9, 108,9 и 94,9 для камфоры; 150,9 и 108,9 для гидроксикамфоры; 317,5 и 299,5 для холестерина и 281,1, 255,0 и 299,0 для прегненолона. Спектральные характеристики (*m/z*), зарегистрированные в «референсных» МС и МС/МС спектрах, использовались для регистрации субстратов и продуктов, экстрагированных из инкубационных смесей.

Для расчетных значений наработки продуктов в чипах для оптического биосенсора были получены градуировочные графики для гидроксикамфоры в диапазоне концентраций от 1 до 35 нМ (рисунок 39*а*) и прегненолона в диапазоне концентраций от 10 до 200 нМ (рисунок 39*б*). Определение содержания продукта оценивалось путем сравнения масс-спектрометрического сигнала целевого продукта к стандарту бетаин (*m/z*=117,2) для гидроксикамфоры (*m/z*=168,9) и гексаметоксифосфазен (*m/z*=321) для прегненолона (*m/z*=317,1) (рисунки 39*а* и 39*г*). Калибровочные зависимости детектирования гидроксикамфоры и прегненолона имели вид прямой с линейным участком в выбранных диапазонах концентраций.

На рисунке 39 представлены МС и МС/МС спектры, полученные для продуктов гидроксикамфоры (рисунки 39*б* и 39*в*) и прегненолона (рисунки 39*д* и

39*е*). На рисунках 39*б* и 39*д* указаны *m/z* характеристических пиков продуктов и калибрантов.

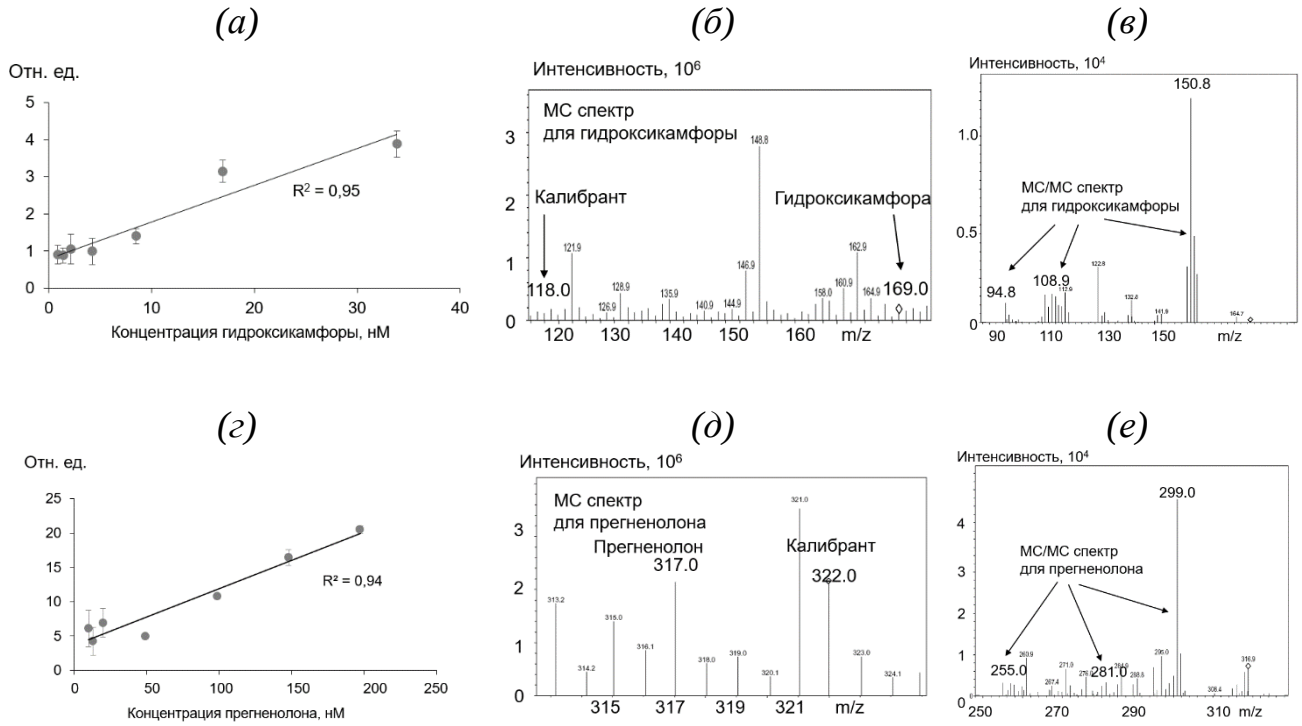


Рисунок 39. – Масс-спектрометрический анализ в комбинации с оптическим биосенсором для подтверждения сохранения функциональных свойств белков на поверхности: калибровочная прямая для (а) гидроксикамфоры в концентрационном диапазоне растворов аналита от 1 до 35 нм (R^2=0,95); (г) прегненолона в концентрационном диапазоне растворов аналита от 10 до 200 нМ (R^2=0,94); МС-спектры в присутствии калибрантов, полученные для (б) гидроксикамфоры и (д) прегненолона; спектры фрагментации МС/МС, полученные для (в) гидроксикамфоры и (е) прегненолона после .

На втором этапе данного исследования методом наноЭСИ-МС/МС был выполнен количественный анализ содержания продуктов ферментативного катализа Р450-содержащих систем *in vitro* для четырех временных точек при общей продолжительности наработки продуктов в течение 60 минут. Было показано, что содержание гидроксикамфоры в $P450_{cam}$-чипе возрастает в процессе инкубации и достигает около 100 нМ (рисунок 40).

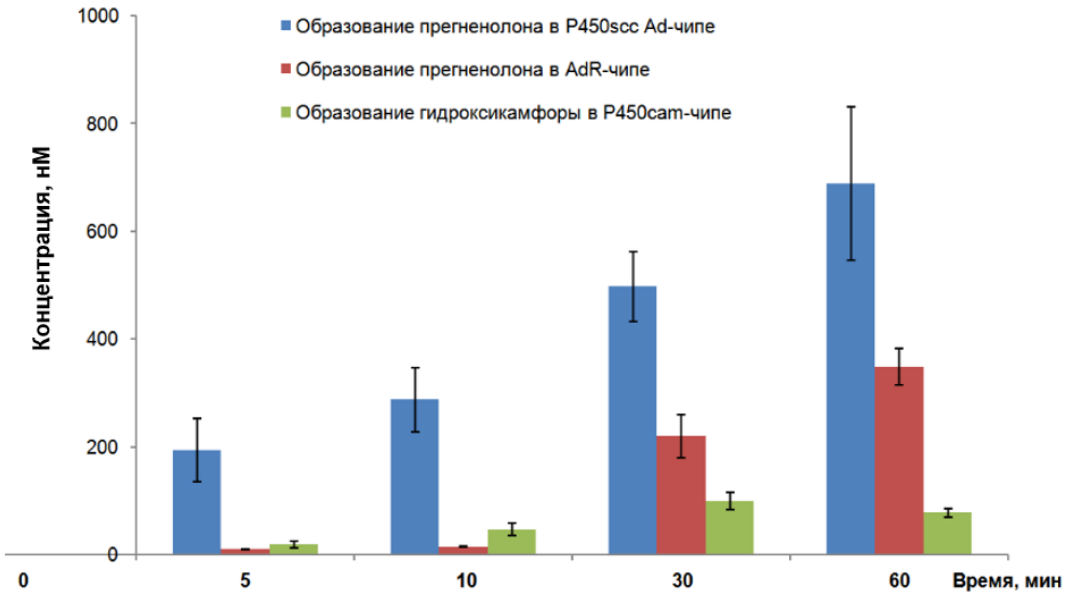


Рисунок 40. – Масс-спектрометрический анализ в комбинации с оптическим биосенсором для подтверждения сохранения функциональных свойств белков на поверхности: гистограммы наработки гидроксикамфоры и прегненолона в кювете оптического биосенсора при температуре 25°С. ■ *– наработка прегненолона в кювете с иммобилизованным адренодоксином (Ad-чип) в присутствии адренодоксин-редуктазы (AdR, 4 мкМ), цитохрома $P450_{scc}$ (4 мкМ) и холестерина (10 мкМ), НАДФН (5 мМ) и калий-фосфатного буфера (50 мМ, pH 7,4).* ■ *– наработка прегненолона в кювете с иммобилизованной адренодоксин-редуктазой (AdR-чип) в присутствии цитохрома $P450_{scc}$ (0,5 мкМ) и адренодоксина (5 мкМ), холестерина (10 мкМ), НАДФН (5 мМ) и калий-фосфатного буфера (50 мМ, pH 7,4).* ■ *– наработка гидроксикамфоры в кювете с иммобилизованным цитохромом $P450_{cam}$ ($P450_{cam}$-чип) в присутствии путидаредоксин-редуктазы (1,2 мкМ), камфоры (0,4 мМ), НАДН (0,25 мМ) и Трис-HCl (0,2 мМ, pH 7,4). Рисунок адаптирован из [337]*.*

В результате ферментативного катализа, осуществляемого белковым комплексом – P450scc, адренодоксин (иммобилизованная форма) и адренодоксин-редуктаза, осуществлялась реакция окисления холестерина в прегненолон. В процессе инкубации (60 минут) концентрация прегненолона в Ad-чипе возрастает до 700 нМ. В результате масс-спектрометрического анализа содержания прегненолона в чипах для оптического биосенсора, содержащих P450scc, адренодоксин-редуктазу (иммобилизованная форма) и адренодоксин, также было показано увеличение содержания продукта в процессе инкубации. В течение инкубации концентрация прегненолона в AdR-чипе увеличилась до 300 нМ.

Таким образом, в трех сериях экспериментах $P450_{scc}$- и $P450_{cam}$-содержащие ферментативные системы сохраняют свою биологическую активность, осуществляется реакции гидроксилирования субстратов.

7.2 АСМ/МС подход для анализа биологической активности цитохрома Р450 BM3

Обоснование выбора объектов исследования

С момента открытия в 1980-х годах флавоцитохрома Р450 BM3 (CYP102A1), который является гидроксилазой жирных кислот у *Bacillus megaterium*, белок был принят научным сообществом в качестве эталона для исследования структуры и понимания механизма функционирования ферментов суперсемейства Р450 [338]. Р450 BM3 стал первым обнаруженным бактериальным белком суперсемейства Р450, аналогичный по биологической активности дифлавинредуктазам эукариот. Этот факт вызвал интерес исследователей к растворимому Р450 BM3 в качестве модели печеночных ферментов Р450 млекопитающих [338], в том числе для изучения монооксигеназной активности для жирных кислот [339].

Третичная структура белка CYP102A1 содержит каталитический центр с протопорфирином IX, лигированный с цистеинилтиолатом [340]. Каталитический центр выступает в качестве акцептора электронов от НАДФН с участием оксидоредуктазы цитохрома Р450 для активации инертных углеводородных связей. В отличие от других ферментов суперсемейства Р450 бактерий и млекопитающих, гемовый домен и редуктазный домен CYP102A1 организованы в единую полипептидную цепь, что обеспечивает исключительную каталитическую способность фермента для гидроксилирования жирных кислот [340]. Фермент CYP102A1 гидроксилирует длинноцепочечные жирные кислоты со скоростью обмена около 3000 мин$^{-1}$ [341].

Экспериментальные результаты исследования

Далее представлены результаты, полученные с применением АСМ/МС подхода, подтверждающие сохранение монооксигеназной активности фермента CYP102A1, иммобилизованного на поверхности.

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-гироксилауриновой кислоты. Хроматограмма лауриновой кислоты для концентрации 2 мкМ, масс-спектрометрический пик и фрагменты диссоциации представлены на рисунке 41. Хроматографическое время удерживания для лауриновой кислоты составило 16,5 мин (рисунок 41*а*).

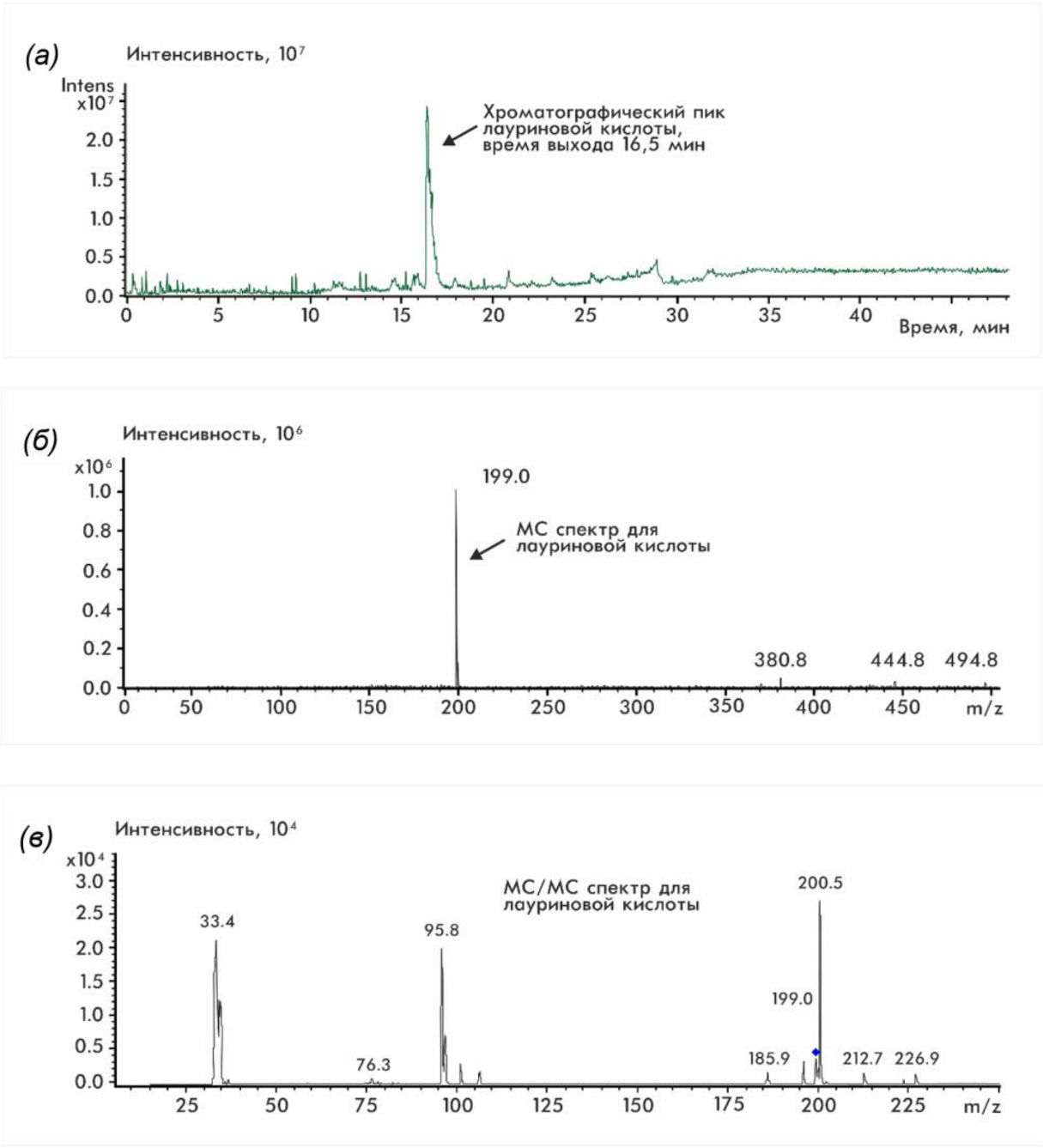


Рисунок 41. – АСМ/МС подход для подтверждения сохранения функциональных свойств белков на поверхности: подбор условий. (а) Хроматографическое время удерживания лауриновой кислоты (2 мкМ). (б) Вид наблюдаемого сигнала масс-спектрометрического пика для лауриновой кислоты. (в) Спектр фрагментации лауриновой 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 CYP102A1, сорбированный на поверхности чипов. На рисунке 42 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. На рисунке представлен результат достоверной идентификации белка CYP102A1 с применением поискового алгоритма Mascot.

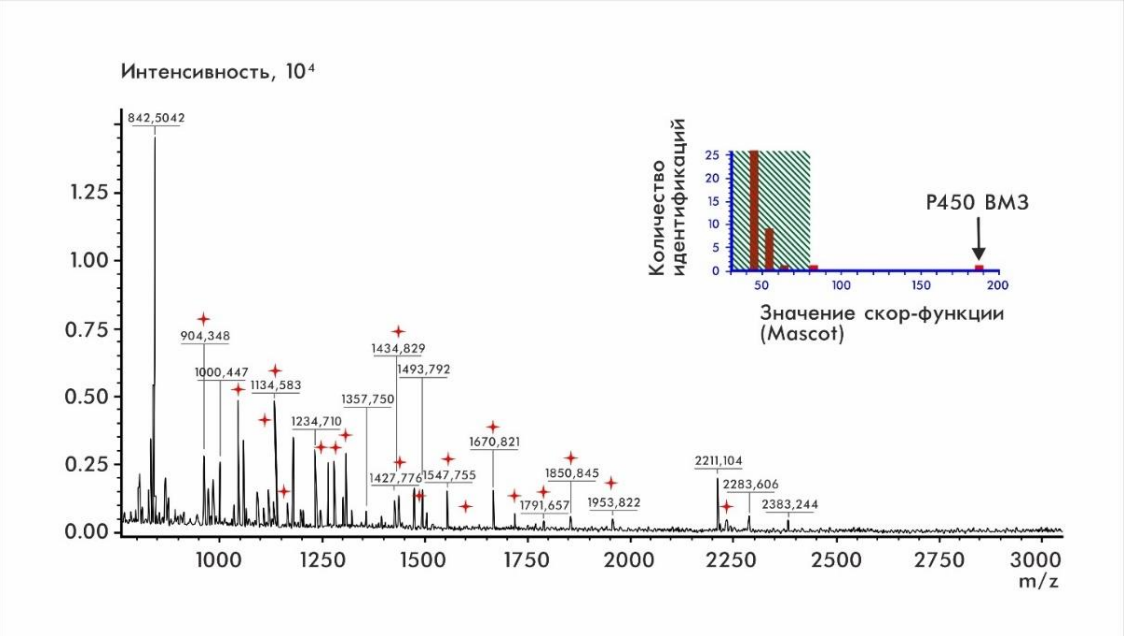


Рисунок 42. – АСМ/МС подход для подтверждения сохранения функциональных свойств белков на поверхности: идентификация белка. Красными маркерами отмечены пики целевого белка. Измерения выполнены на масс-спектрометре Autoflex III (Bruker, Германия).

На третьем этапе получена калибровочная прямая для очищенного препарата гидроксилауриновой кислоты (рисунок 43). 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).

Далее выполнены три серии экспериментов наработки гидроксилауриновой кислоты для АСМ-чипов. Напомним, что проводилась регистрация содержания 11-гидроксилауриновой кислоты 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 CYP102A1 (рисунок 43*а*). Предполагается, что на поверхности чипа содержится различное количество молекул фермента. Ожидаемое содержание продукта в трех экспериментальных сериях отражает количество белка на поверхности.

(а) *(б)*

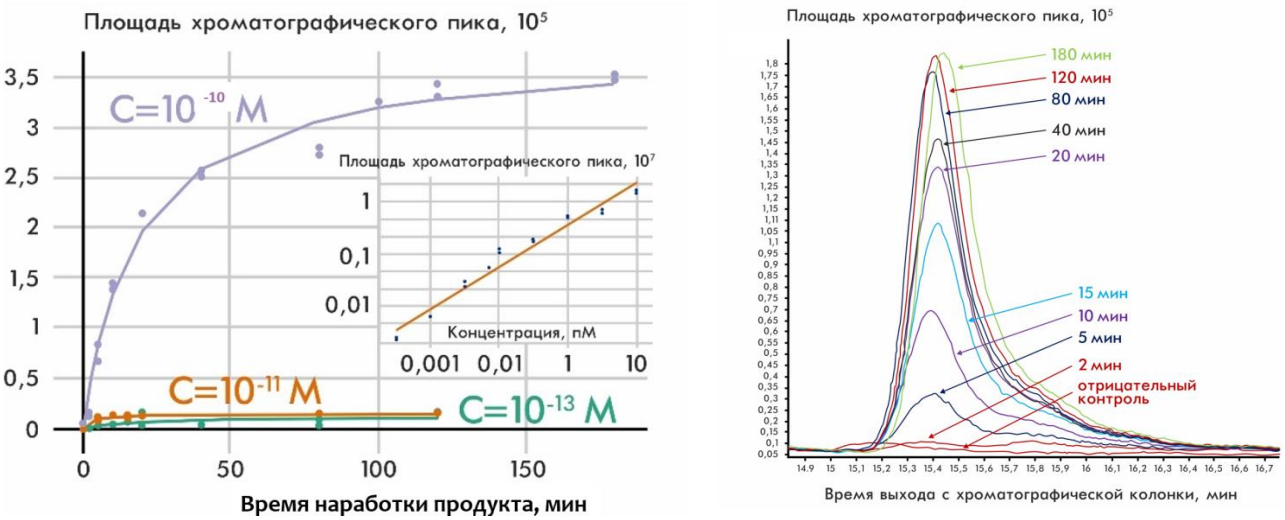


Рисунок 43. – АСМ/МС подход для подтверждения сохранения функциональных свойств белков на поверхности. (а) Кинетика наработки гидроксилауриновой кислоты на поверхности чипов для АСМ. Чипы содержат белки, сорбированные из растворов с концентрацией 10^{-10} М (серия №1, синяя кривая), 10^{-11} М (серия №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, pH 7,5, фаза Б – ацетат аммония 5 мМ, ацетонитрил 50%, изопропанол 45%, pH 7,5. (б) Хроматограммы наработки продукта для серии чипов, функционализированных цитохромом CYP102A1 из растворов с концентрацией 10^{-10} М. Отрицательный контроль: система CYP102A1 и НАДФН без субстрата. Количество технических повторов 2-4.

На рисунке 43 представлены результаты экспериментов, полученные для трех серий. Концентрация гидроксилауриновой кислоты возрастает в процессе инкубации для всех экспериментальных серий. Время выхода наработки продукта на плато для трех серий экспериментов составило 20 мин (рисунок 43*а*). Наиболее эффективная наработка продукта наблюдалась в серии №1 (раствор фермента с концентрацией 10^{-10} М). Сопоставимая продуктивность была показана 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, результаты выполненных исследований подтвердили сохранение активности ферментов на поверхности чипов для оптического биосенсора и атомно-силового микроскопа. На примере цитохром $P450_{scc}$- и $P450_{cam}$-содержащих систем в чипе для оптического биосенсора показана возможность масс-спектрометрического определения продуктов прегненолона и гидроксикамфоры. На примере цитохрома CYP102A1, сорбированного на поверхности чипа для АСМ, показана возможность количественного определения продукта гидроксилауриновой кислоты.

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 CYP102A1, сорбированного на поверхности чипа для АСМ, показана возможность количественного определения продуктов функциональной активности фермента.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ 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);

BM3 – флавоцитохром Р450 (*Bacillus megaterium*);

DHB – дигидроксибензойная кислота;

gp120 – гликопротеин 120 вируса иммунодефицита человека;

HCCA – α-циано-4-гидроксикоричная кислота;

HCVcoreAg – нуклеокапсидный белок вируса гепатита С;

m/z – отношение массы к заряду;

α-FP – альфа-фетопротеин;

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 точечно 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.

БИБЛИОГРАФИЯ

1. Funkhouser W.K. Pathology // Mol. Pathol. 2018. V.11. P. 217–229.

2. Archakov A.I., Ivanov Y.D., Lisitsa A.V., Zgoda V.G. AFM Fishing Nanotechnology Is the Way to Reverse the Avogadro Number in Proteomics // Proteomics. 2007. Vol. 7. №1. P. 4–9.

3. Zhang G.-J., Ning Y. Silicon nanowire biosensor and its applications in disease diagnostics: a review // Anal. Chim. Acta. 2012. Vol. 749. P. 1–15.

4. Liotta L.A., Petricoin E.F. -Omics and cancer biomarkers: link to the biological truth or bear the consequences // Cancer Epidemiol. Biomark. Prev. 2012. Vol. 21. № 8. P. 1229–1235.

5. Peng L., Zhong, X. Epigenetic regulation of drug metabolism and transport // Acta Pharm. Sin. B. 2015. Vol. 5. № 2. P. 106–112.

6. Pleshakova T.O., Shumov I.D., Ivanov Y.D., Malsagova K.A., Kaysheva A.L., Archakov A.I. AFM-Based technologies as the way towards the reverse avogadro number // Biochem. Mosc. Suppl. Ser. B Biomed. Chem. 2015. Vol. 9. № 3. P. 244–257.

7. 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 // Int. J. Mol. Sci. 2021. Vol. 22. № 1. P. 431.

8. 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. Vol. 7. № 8. P. 1186–1195.

9. 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 // Int. J. Nanomedicine. 2015. Vol. 10. P. 1597–1608.

10. 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. 2019. Vol. 10. № 129. P. 1–13.

11. Ivanov Yu.D., Frantsuzov P.A., Pleshakova T.O., Ziborov V.S., Svetlov S.K., Krohin N.V., Konev V.A., Kovalev O.B., Uchaikin V.F., Yastrebova O.N., Sveshnikov P.G., Archakov A.I. Atomic force microscopy detection of serological markers of viral hepatites B and C // Biochem. Mosc. Suppl. Ser. B Biomed. Chem. 2010. Vol. 4. № 2. P. 117–122.

12. Alharbi R.A. proteomics approach and techniques in identification of reliable biomarkers for diseases // Saudi J. Biol. Sci. 2020. Vol. 27. № 3. P. 968–974.

13. Hasin Y., Seldin M., Lusis A. Multi-omics approaches to disease // Genome Biol. 2017. V. 18. № 83. P. 1–15.

14. Harper J.W., Bennett E.J. Proteome complexity and the forces that drive proteome imbalance // Nature. 2016. Vol. 537. № 7620. P. 328–338.

15. Ponomarenko E.A., Poverennaya E.V., Ilgisonis E.V., Pyatnitskiy M.A., Kopylov A.T., Zgoda V.G., Lisitsa A.V., Archakov A.I. The size of the human proteome: the width and depth // Int. J. Anal. Chem. 2016. Vol. 2016. № 7436849. P. 1–6.

16. 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. Vol. 25. № 3144. P. 1– 17.

17. Taldaev A., Rudnev V., Kulikova L., Nikolsky K., Efimov A., Malsagova K., Kaysheva A. Molecular dynamics study of citrullinated proteins associated with the development of rheumatoid arthritis // Proteomes. 2022. Vol. 10. № 8. P. 1–17.

18. Díaz-Fernández A., Miranda-Castro R., de-Los-Santos-Álvarez N., Lobo-Castañón M.J. Post-translational modifications in tumor biomarkers: the next challenge for aptamers? // Anal. Bioanal. Chem. 2018. Vol. 410. № 8. P. 2059–2065. 19. Heo K.-S. Regulation of post-translational modification in breast cancer treatment // BMB Rep. 2019. Vol. 52. № 2. P. 113–118.

20. Zou X., Blank M. Targeting P38 MAP kinase signaling in cancer through post-translational modifications // Cancer Lett. 2017. Vol 384. P. 19–26.

21. Celano M., Mio C., Sponziello M., Verrienti A., Bulotta S., Durante C., Damante G., Russo D. Targeting post-translational histone modifications for the treatment of non-medullary thyroid cancer // Mol. Cell. Endocrinol. 2018. Vol. 469. P. 38–47.

22. Shi A.-M., Tao Z.-Q., Li R., Wang Y.-Q., Wang X., Zhao J. Vimentin and post-translational modifications in cell motility during cancer - a review // Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci. 2016. Vol. 20. № 12. P. 2603–2606.

23. Perri A.M., Agosti V., Olivo E., Concolino A., Angelis M.D., Tammè L., Fiumara C.V., Cuda G., Scumaci D. Histone Proteomics reveals novel post-translational modifications in breast cancer // Aging. 2019. Vol. 11. № 23. P. 11722–11755.

24. 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.L. Proteomic and molecular dynamic investigations of ptm-induced structural fluctuations in breast and ovarian cancer // Sci. Rep. 2021. Vol. 11. № 19318. P. 1–18.

25. Cooper A., Woulfe D., Kilic F. Post-translational modifications of serotonin transporter // Pharmacol. Res. 2019. Vol. 140. P. 7–13.

26. Wende A.R. Post-translational modifications of the cardiac proteome in diabetes and heart failure // Proteomics Clin. Appl. 2016. Vol. 10. № 1. P. 25–38.

27. Buszczak M., Signe, R.A.J., Morrison S.J. Cellular differences in protein synthesis regulate tissue homeostasis // Cell. 2014. Vol. 159. № 2. P. 242–251.

28. Jovanovic M., Rooney M.S., Mertins P., Przybylski D., Chevrier N., Satija R., Rodriguez E.H., Fields A.P., Schwartz S., Raychowdhury R., Mumbach M.R., Eisenhaure T., Rabani M., Gennert D., Lu D., Delorey T., Weissman J.S., Carr S.A., Hacohen N., Regev A. Immunogenetics. Dynamic profiling of the protein life cycle in response to pathogens // Science. 2015. Vol. 347. № 6226. P. 1–16.

29. Anderson N.L., Anderson N.G. The human plasma proteome: history, character, and diagnostic prospects // Mol. Cell. Proteomics MCP. 2002. Vol. 1. № 11. P. 845–867.

30. Dey K.K., Wang H., Niu M. Deep undepleted human serum proteome profiling toward biomarker discovery for Alzheimer's disease // Clin Proteom. 2019. Vol. 16. № 16. P. 1–12.

31. Putnam F.W. The Plasma proteins (structure, function and genetic control) // Prep. Biochem. 1978. Vol. 8. № 2–3. P. 227–228.

32. Erickson B.K., Rose C.M., Braun C.R., Erickson A.R., Knott J., McAlister G.C. A strategy to combine sample multiplexing with targeted proteomics assays for high-throughput protein signature characterization // Mol Cell. 2017. Vol. 65. P. 361–70.

33. Anderson N.L. The Clinical Plasma Proteome: A survey of clinical assays for proteins in plasma and serum // Clin. Chem. 2010. Vol. 56. № 2. P. 177–185.

34. Fredolini C., Byström S., Sanchez-Rivera L., Ioannou M., Tamburro D., Pontén F., Branca R.M., Nilsson P., Lehtiö J., Schwenk J.M. Systematic assessment of antibody selectivity in plasma based on a resource of enrichment profiles // Sci. Rep. 2019. Vol. 9. № 8324. P. 1–13.

35. Tu C., Rudnick P.A., Martinez M.Y., Cheek K.L., Stein S.E., Slebos R.J.C., Liebler D.C. Depletion of abundant plasma proteins and limitations of plasma proteomics // J. Proteome Res. 2010. Vol. 9. № 10. P. 4982–4991.

36. Liu T., Qian W.-J., Mottaz H.M., Gritsenko M.A., Norbeck A.D., Moore R.J., Purvine S.O., Camp D.G., Smith R.D. Evaluation of multiprotein immunoaffinity subtraction for plasma proteomics and candidate biomarker discovery using mass spectrometry // Mol. Cell. Proteomics MCP. 2006. Vol. 5. № 11. P. 2167–2174.

37. Chandramouli K., Qian P.-Y. Proteomics: challenges, techniques and possibilities to overcome biological sample complexity // Hum. Genomics Proteomics HGP. 2009. Vol. 2009. № 239204. P. 1–22.

38. Shi T., Gaffrey M.J., Fillmore T.L., Nicora C.D., Yi L., Zhang P., Shukla A.K., Wiley H.S., Rodland K.D., Liu T., Smith R.D., Qian W.-J. Facile carrier-assisted targeted mass spectrometric approach for proteomic analysis of low numbers of mammalian cells // Commun. Biol. 2018. Vol. 1. № 1. P. 1–9.

39. Chen L., Fatima S., Peng J., Leng X. SELDI protein chip technology for the detection of serum biomarkers for liver disease // Protein Pept. Lett. 2009. Vol. 16. № 5. P. 467–472.

40. Léonard J.-F., Courcol M., Gautier J.-C. Optimization of SELDI for biomarker detection in plasma // Methods Mol. Biol. Clifton NJ. 2011. Vol. 691. P. 351–368.

41. Mauri P., Scigelova M. Multidimensional protein identification technology for clinical proteomic analysis // Clin. Chem. Lab. Med. 2009. Vol. 47. № 6. P. 636–646.

42. Morales-Cid G., Diez-Masa J.C., de Frutos M. On-line immunoaffinity capillary electrophoresis based on magnetic beads for the determination of alpha-1 acid glycoprotein isoforms profile to facilitate its use as biomarker // Anal. Chim. Acta. 2013. Vol. 773. P. 89–96.

43. Kopylov A.T., Zgoda V.G., Lisitsa A.V., Archakov A.I. Combined use of irreversible binding and MRM technology for low- and ultralow copy-number protein detection and quantitation // Proteomics. 2013. Vol. 13. № 5. P. 727–742.

44. Sandhu A., Handa H., Abe M. Synthesis and applications of magnetic nanoparticles for biorecognition and point of care medical diagnostics // Nanotechnology. 2010. Vol. 21. № 44. P. 442001.

45. Li H., Popp R., Frohlich B., Chen M. X., Borchers C. H. Peptide and protein quantification using automated immuno-MALDI (IMALDI) // J. Vis. Exp. JoVE. 2017. Vol. 126. P. e55933.

46. Rubina A.Y., Dyukova V.I., Dementieva E.I., Stomakhin A.A., Nesmeyanov V.A., Grishin E.V., Zasedatelev A.S. Quantitative immunoassay of biotoxins on hydrogel-based protein microchips // Anal. Biochem. 2005. Vol. 340. № 2. P. 317–329.

47. Poon T. Opportunities and Limitations of SELDI-TOF-MS in biomedical research: practical advices // Expert Rev. Proteomics. 2007. Vol. 4. P. 51–65.

48. Патент РФ RU2003104673/15A. 20.06. 1997. Хатчинс У.С., Хатчинс Т.У, Йир Т.Т. Способы ретентатной хроматографии для разделения аналитов в образце // Патент России RU2253116C2.

49. Petricoin E.F., Ardekani A.M., Hitt B.A., Levine P.J., Fusaro V.A., Steinberg S.M., Mills G.B., Simone C., Fishman D.A., Kohn E.C., Liotta L.A. Use of Proteomic patterns in serum to identify ovarian cancer // The Lancet. 2002. Vol. 359. № 9306. P. 572–577.

50. Baggerly K.A., Morris J.S., Coombes K.R. Reproducibility of SELDI-TOF protein patterns in serum: comparing datasets from different experiments // Bioinforma. Oxf. Engl. 2004. Vol. 20. № 5. P. 777–785.

51. Baggerly K.A., Morris J.S., Edmonson S.R., Coombes K.R. Signal in Noise: Evaluating reported reproducibility of serum proteomic tests for ovarian cancer // J. Natl. Cancer Inst. 2005. Vol. 97. № 4. P. 307–309.

52. Magdeldin S., Enany S., Yoshida Y., Xu B., Zhang Y., Zureena Z., Lokamani I., Yaoita E., Yamamoto T. Basics and recent advances of two dimensional-polyacrylamide gel electrophoresis // Clin. Proteomics. 2014. Vol. 11. № 1. № 16. P. 1–10.

53. Popp R., Li H., Borchers C. Immuno-MALDI mass spectrometry for the analysis of proteins in signaling pathways // Expert Rev. Proteomics. 2018. Vol. 15. № 9. P. 701–708.

54. Reid J.D., Holmes D.T., Mason D.R., Shah B., Borchers C.H. Towards the Development of an Immuno MALDI mass spectrometry assay for the diagnosis of hypertension // J. Am. Soc. Mass Spectrom. 2010. Vol. 21. № 10. P. 1680–1686.

55. Froehlich B.C., Popp R., Sobsey C.A., Ibrahim S., LeBlanc A.M., Mohammed Y., Aguilar-Mahecha A., Poetz O., Chen M.X., Spatz A., Basik M., Batist G., Zahedi R.P., Borchers C.H. Systematic optimization of the IMALDI workflow for the robust and straightforward quantification of signaling proteins in cancer cells // Proteomics Clin. Appl. 2020. Vol. 14. № 5. P. e2000034.

56. Trenchevska O., Yassine H.N., Borges C.R., Nelson R.W., Nedelkov D. Development of quantitative mass spectrometric immunoassay for serum amyloid A // Biomark. Biochem. 2016. Vol. 21. № 8. P. 743–751.

57. Trenchevska O., Phillips D.A., Nelson R.W., Nedelkov D. Delineation of concentration ranges and longitudinal changes of human plasma protein variants // PLoS One. 2014. Vol. 9. № 6. P. 1–8.

58. Schoenherr R.M., Saul R.G., Whiteaker J.R., Yan P., Whiteley G.R., Paulovich A.G. Anti-peptide monoclonal antibodies generated for immuno-multiple reaction monitoring-mass spectrometry assays have a high probability of supporting western blot and ELISA // Mol. Cell. Proteomics MCP. 2015. Vol. 14. № 2. P. 382–398.

59. Kopylov A.T., Zgoda V.G., Lisitsa A.V., Archakov A.I. Combined use of irreversible binding and mrm technology for low- and ultralow copy-number protein detection and quantitation // Proteomics. 2013. Vol. 13, № 5. P. 727–742.

60. Rubina A.Y., Kolchinsky A., Makarov A.A., Zasedatelev A.S. Why 3-D? Gel-based microarrays in proteomics // Proteomics. 2008. Vol. 8. № 4. P. 817–831.

61. Naulin P.A., Alveal N.A., Barrera N.P. Toward atomic force microscopy and mass spectrometry to visualize and identify lipid rafts in plasmodesmata // Front. Plant Sci. 2014. Vol. 5. № 234. P. 1–9.

62. Simons K., Toomre D. Lipid rafts and signal transduction // Nat Rev Mol Cell Biol. 2000. Vol. 1. P. 31–39.

63. Whited A.M., Park P.S.-H. Atomic Force Microscopy: A multifaceted tool to study membrane proteins and their interactions with ligands // Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr. 2014. Vol. 1838. P. 56–68.

64. Hussain M.A., Agnihotri A., Siedlecki C.A. AFM imaging of ligand binding to platelet integrin αiibβ3 receptors reconstituted into planar lipid bilayers // Langmuir. 2005. Vol. 21. № 15. P. 6979–6986.

65. Shinozaki Y., Sumitomo K., Tsuda M., Koizumi S., Inoue K., Torimitsu K. Direct observation of atp-induced conformational changes in single P2X4 receptors // Plos Biol. 2009. Vol. 7. № 5. P.1–12.

66. Müller D.J., Engel A. Voltage and ph-induced channel closure of porin OMPF visualized by atomic force microscopy // J. Mol. Biol. 1999. Vol. 285. № 4. P. 1347–1351.

67. Raman P.S., Alves C.S., Wirtz D., Konstantopoulos K. Single-molecule binding of cd44 to Fibrin versus P-Selectin Predicts Their Distinct Shear-Dependent Interactions in Cancer // J. Cell Sci. 2011. Vol. 124. № 11. P. 1903–1910.

68. Yu J., Wang Q., Shi X., Ma X., Yang H., Chen Y.-G., Fang X. Single-molecule force spectroscopy study of interaction between transforming growth factor beta1 and its receptor in living cells // J. Phys. Chem. B. 2007. Vol. 111. № 48. P. 13619–13625.

69. Zocher M., Fung J.J., Kobilka B.K., Müller D.J. Ligand-specific interactions modulate kinetic, energetic, and mechanical properties of the human β2 adrenergic receptor // Structure. 2012. Vol. 20. № 8. P. 1391–1402.

70. Kawamura S., Gerstung M., Colozo A.T., Helenius J., Maeda A., Beerenwinkel N., Park P.S.-H., Müller D.J. Kinetic, energetic, and mechanical differences between dark-state rhodopsin and opsin // Struct. Lond. Engl. 2003. Vol. 21. № 3. P. 426–437.

71. Liu Z., Li Z., Zhou H., Wei G., Song Y., Wang L. Observation of the mica surface by atomic force microscopy // Micron. 2005. Vol. 36. № 6. P. 525–531.

72. Shlyakhtenko L.S., Gall A.A., Lyubchenko Y.L. Mica functionalization for imaging of dna and protein-dna complexes with atomic force microscopy. Methods Mol. Biol. Clifton NJ. 2013. Vol. 931 P. 1–20.

73. Bustamante C., Vesenka J., Tang C.L., Rees W., Guthold M., Keller R. Circular DNA molecules imaged in air by scanning force microscopy // Biochemistry 1992. Vol. 31. № 1. P. 22–26.

74. García R., Yuqiu J., Schabtach E., Bustamante C. Deposition and imaging of metal-coated biomolecules with the STM // Ultramicroscopy. 1992. Vol. 42. P. 1250–1254.

75. Vesenka J., Guthold M., Tang C.L., Keller D., Delaine E., Bustamante C. Substrate preparation for reliable imaging of dna molecules with the scanning force microscope // Ultramicroscopy. 1992. Vol. 42-44. P. 1243–1249.

76. Lyubchenko Y.L., Gall A.A., Shlyakhtenko L.S. Atomic force microscopy of dna and protein-dna complexes using functionalized mica substrates // Methods Mol. Biol. 2001. Vol. 148. P. 569–578.

77. Shlyakhtenko L.S., Gall A.A., Filonov A., Cerovac Z., Lushnikov A., Lyubchenko Y.L. Silatrane-based surface chemistry for immobilization of dna, protein-dna complexes and other biological materials // Ultramicroscopy. 2003. Vol. 97. № 1–4. P. 279–287.

78. Kung L.A. Proteome chips: a future perspective // Expert Rev. Proteomics. 2006. Vol. 3. № 6. P. 565–567.

79. Heath G.R., Kots E., Robertson J.L., Lansky S., Khelashvili G., Weinstein H., Scheuring S. Localization atomic force microscopy // Nature. 2021. Vol. 594. № 7863. P. 385–390.

80. Leitner M., Brummeir J., Plaimer G.O., Kefer I., Poturnayova A., Hianik T., Ebner A. DNA building blocks for afm tip functionalization: an easy, fast and stable strategy // Methods. 2022. Vol. 197. P. 54–62.

81. Ivanov Y.D., Bukharina N.S., Pleshakova T.O., Frantsuzov P.A., Andreeva E.Y., Kaysheva A.L., Zgoda V.G., Izotov A.A., Pavlova 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 // Int. J. Nanomedicine. 2014. Vol. 9. № 1. P. 4659–4670.

82. Kuznetsov V.Y., Ivanov Y.D., Bykov V.A., Saunin S.A., Fedorov I.A., Lemeshko S.V., Hoa H.B., Archakov A.I. Atomic force microscopy detection of molecular complexes in multiprotein p450cam containing monooxygenase system // Proteomics. 2002. Vol. 2. № 12. P. 1699–1705.

83. Ivanov Y.D., Bukharina N.S., Frantsuzov P.A., Pleshakova T.O., Kanashenko S.L., Medvedeva N.V., Argentova V.V., Zgoda V.G., Munro A.W., Archakov A.I. AFM study of cytochrome cyp102a1 oligomeric state // Soft Matter. 2012. Vol. 8. № 17. P. 4602–4608.

84. Chiang Y.-L., Chang Y.-C., Chiang, I.-C., Mak, H.-M., Hwang, I.-S., Shih, Y.-L. Atomic force microscopy characterization of protein fibrils formed by the

amyloidogenic region of the bacterial protein mine on mica and a supported lipid bilayer // PLos One. 2015. Vol. 10. № 11. P. e0142506.

85. Adamcik J., Jung J.-M., Flakowski J., De Los Rios P., Dietler G., Mezzenga R. Understanding amyloid aggregation by statistical analysis of atomic force microscopy images // Nat. Nanotechnol. 2010. Vol. 5. № 6. P. 423–428.

86. Watanabe-Nakayama T., Ono K., Itami M., Takahashi R., Teplow D.B., Yamada M. High-speed atomic force microscopy reveals structural dynamics of amyloid β1–42 aggregates // Proc. Natl. Acad. Sci. 2016. Vol. 113. № 21. P. 5835–5840.

87. Raaij M.E., van Segers-Nolten I.M.J., Subramaniam V. Quantitative morphological analysis reveals ultrastructural diversity of amyloid fibrils from α-synuclein mutants // Biophys. J. 2006. Vol. 91. № 11. P. 96–98.

88. Dixit C.K., Aguirre G.R. Protein microarrays with novel microfluidic methods: current advances // Microarrays. 2014. Vol. 3. № 3. P. 180–202.

89. Lee J.-R., Magee D.M., Gaster R.S., LaBaer J., Wang S.X. Emerging protein array technologies for proteomics // Expert Rev. Proteomics. 2013. Vol. 10. № 1. P. 65–75.

90. Furlan C., Dirks R.A.M., Thomas P.C., Jones R.C., Wang J., Lynch M., Marks H., Vermeulen M. Miniaturised interaction proteomics on a microfluidic platform with ultra-low input requirements // Nat. Commun. 2019. Vol. 10. № 1. P. 1525.

91. Archakov A., Ivanov Y., Lisitsa A., Zgoda V. Biospecific irreversible fishing coupled with atomic force microscopy for detection of extremely low-abundant proteins // Proteomics. 2009. Vol. 9. № 5. P. 1326–1343.

92. Clair J.J.L., Burkart M.D. Molecular screening on a compact disc // Org. Biomol. Chem. 2003. Vol. 1. № 18. P. 3244–3249.

93. Sigmundsson K., Másson G., Rice R., Beauchemin N., Obrink B. Determination of active concentrations and association and dissociation rate constants of interacting biomolecules: an analytical solution to the theory for kinetic and mass transport limitations in biosensor technology and its experimental verification // Biochemistry. 2002. Vol. 41. № 26. P. 8263–8276.

94. Rich R.L., Myszka D.G. Survey of the Year 2006 Commercial optical biosensor literature // J. Mol. Recognit. JMR. 2007. Vol. 20. № 5. P. 300–366.

95. Kim M.-G., Shin Y.-B., Jung J.-M., Ro H.-S., Chung B. H. Enhanced sensitivity of surface plasmon resonance spr, immunoassays using a peroxidase-catalyzed precipitation reaction and its application to a protein microarray // J. Immunol. Methods. 2005. Vol. 297. № 1. P. 125–132.

96. Rich R.L., Myszka D.G. Survey of the year 2001 commercial optical biosensor literature // J. Mol. Recognit. 2002. Vol. 15. P. 352-376.

97. Chung J.W., Kim S.D., Bernhardt R., Pyun J.C. Application of SPR biosensor for medical diagnostics of human hepatitis B virus HHBV // Sens. Actuators B Chem. 2005. Vol. 111–112. P. 416–422.

98. Williams C., Addona T.A. The Integration of SPR biosensors with mass spectrometry: possible applications for proteome analysis // Trends Biotechnol. 2000. Vol. 18. № 2. P. 45–48.

99. Buijs J., Franklin G.C. SPR-MS in functional proteomics // Brief. Funct. Genomic. Proteomic. 2005. Vol. 4. № 1. P. 39–47.

100. Erickson J.S., Ligler F.S. Analytical chemistry: home diagnostics to music // Nature. 2008. Vol. 456. № 7219. P.178-189.

101. Varma M.M., Inerowicz H.D., Regnier F.E., Nolte D.D. High-speed label-free detection by spinning-disk micro-interferometry // Biosens. Bioelectron. 2004. Vol. 19. № 11. P. 1371–1376.

102. La Clair J.J., Burkart M.D. Geometry in digital molecular arrays // Org. Biomol. Chem. 2006. Vol. 4. № 16. P. 3052–3055.

103. Li Y., Ou L.M.L., Yu H.-Z. Digitized Molecular diagnostics: reading disk-based bioassays with standard computer drives // Anal. Chem. 2008. Vol. 80. № 21. P. 8216–8223.

104. Li Y., Lee H.J., Corn R.M. Detection of protein biomarkers using rna aptamer microarrays and enzymatically amplified spr imaging // Anal. Chem. 2007. Vol. 79. № 3. P. 1082–1088.

105. Sano T., Cantor C.R. Cooperative biotin binding by streptavidin. electrophoretic behavior and subunit association of streptavidin in the presence of 6 M urea // J. Biol. Chem. 1990. Vol. 265. № 6. P. 3369–3373.

106. Ivanov Y.D., Pleshakova T.O., Malsagova K.A., Kaysheva A.L., Kopylov A.T., Izotov A.A., Tatur V.Y., Vesnin S.G., Ivanova N.D., Ziborov V.S., Archakov A.I. AFM-based protein fishing in the pulsed electric field // Biochem. Mosc. Suppl. Ser. B Biomed. Chem. 2015. Vol. 9. № 2. P. 121–129.

107. Hwu E.E.-T., Boisen A. Hacking CD/DVD/Blu-Ray for biosensing // ACS Sens. 2018. Vol. 3. № 7. P. 1222–1232.

108. Kong L.X., Perebikovsky A., Moebius J., Kulinsky L., Madou M. Lab-on-a-CD: A fully integrated molecular diagnostic system // J. Lab. Autom. 2016. Vol. 21. № 3. P. 323–355.

109. Erickson J., Ligler F. Home diagnostics to music // Nature. 2008. Vol. 456. P. 178–179.

110. Miyazaki C.M., Carthy E., Kinahan D.J. Biosensing on the centrifugal microfluidic lab-on-a-disc platform // Processes. 2020. Vol. 8. № 11. P. 1360.

111. Antunes P., Watterson D., Parmvi M., Burger R., Boisen A., Young P., Cooper M.A., Hansen M.F., Ranzoni A., Donolato M. Quantification of NS1 dengue biomarker in serum via optomagnetic nanocluster detection // Sci. Rep. 2015. Vol. 5. № 1. P. 16145.

112. Uddin R., Burger R., Donolato M., Fock J., Creagh M., Hansen M.F., Boisen A. Lab-on-a-Disc Agglutination assay for protein detection by optomagnetic readout and optical imaging using nano- and micro-sized magnetic beads // Biosens. Bioelectron. 2016. Vol. 85. P. 351–357.

113. Uddin R., Donolato M., Hwu E.-T., Hansen M.F., Boisen A. Combined detection of c-reactive protein and pbmc quantification from whole blood in an integrated lab-on-a-disc microfluidic platform // Sens. Actuators B Chem. 2018. Vol. 272. P. 634–642.

114. Miyazaki C.M., Kinahan D.J., Mishra R., Mangwanya F., Kilcawley N., Ferreira M., Ducrée J. Label-Free, Spatially multiplexed SPR detection of immunoassays

on a highly integrated centrifugal lab-on-a-disc platform // Biosens. Bioelectron. 2018. Vol. 119. P. 86–93.

115. Chen Y.-F., Serey X., Sarkar R., Chen P., Erickson D. Controlled photonic manipulation of proteins and other nanomaterials // Nano Lett. 2012. Vol. 12. № 3. P. 1633–1637.

116. Tian R., Regonda S., Gao J., Liu Y., Hu W. Ultrasensitive protein detection using lithographically defined si multi-nanowire field effect transistors // Lab. Chip. 2011. Vol. 11. № 11. P. 1952–1961.

117. Ivanov Yu.D., Pleshakova T.O., Malsagova K.A., Kozlov A.F., Kaysheva A.L., Shumov I.D., Galiullin R.A., Kurbatov L.K., Popov V.P., Naumova O.V., Fomin B.I., Nasimov D.A., Aseev A.L., Alferov A.A., Kushlinsky N.E., Lisitsa A.V., Archakov A.I. Detection of marker mirnas in plasma using soi-nw biosensor // Sens. Actuators B Chem. 2018. Vol. 261. P. 566–571.

118. Elfström N., Juhasz R., Sychugov I., Engfeldt T., Karlström A.E., Linnros J. Surface charge sensitivity of silicon nanowires: size dependence // Nano Lett. 2007/ Vol. 7. № 9. P. 2608–2612.

119. Zheng G., Lieber C.M. Nanowire biosensors for label-free, real-time, ultrasensitive protein detection // Methods Mol. Biol. Clifton NJ. 2011. Vol. 790. P. 223–237.

120. Ambhorkar P., Wang Z., Ko H., Lee S., Koo K., Kim K., Cho D.D. Nanowire-based biosensors: from growth to applications // Micromachines. 2018. Vol. 9. № 679. P. 1–19.

121. Sze S.M., Ng, K.K. Physics of semiconductor devices / Wiley & Sons. – 2021, 763 p.

122. Bergveld P. Development, Operation, and application of the ion-sensitive field-effect transistor as a tool for electrophysiology // IEEE Trans. Biomed. Eng. 1972. Vol. 19. № 5. P. 342–351.

123. Lin C.-H., Hung C.-H., Hsiao C.-Y., Lin H.-C., Ko F.-H., Yang Y.-S. Poly-silicon nanowire field-effect transistor for ultrasensitive and label-free detection of

pathogenic avian influenza DNA // Biosens. Bioelectron. 2009. Vol. 24. № 10. P 3019–3024.

124. Wenga G., Jacques E., Salaün A.-C., Rogel R., Pichon L., Geneste F. Bottom-gate and step-gate polysilicon nanowires field effect transistors for ultrasensitive label-free biosensing application // Procedia Eng. 2012. Vol. 47. P. 414–417.

125. Namdari P., Daraee H., Eatemadi A. Recent advances in silicon nanowire biosensors: synthesis methods, properties, and applications // Nanoscale Res. Lett. 2016. Vol. 11. № 406. P. 1–16.

126. Manole E., Bastian A.E., Popescu I.D., Constantin C., Mihai S., Gaina G.F., Codrici E., Neagu M.T. Immunoassay techniques highlighting biomarkers in immunogenetic diseases / Immunogenetics. – 2018, 233 p.

127. Zhang S., Garcia-D'Angeli A., Brennan J., Huo Q. Predicting detection limits of enzyme-linked immunosorbent assay ELISA, and bioanalytical techniques in general // The Analyst. 2013. Vol. 139. P. 439–445.

128. Lilja H., Ulmert D., Vickers A.J. Prostate-specific antigen and prostate cancer: prediction, detection and monitoring // Nat. Rev. Cancer. 2008. Vol. 8. № 4. P. 268–278.

129. Kingsmore S.F. Multiplexed protein measurement: technologies and applications of protein and antibody arrays // Nat. Rev. Drug Discov. 2006. Vol. 5. № 4. P. 310–320.

130. Williams T.I., Toups K.L., Saggese D.A., Kalli K.R., Cliby W.A., Muddiman D.C. Epithelial ovarian cancer: disease etiology, treatment, detection, and investigational gene, metabolite, and protein biomarkers // J. Proteome Res. 2007. Vol. 6. № 8. P. 2936–2962.

131. Fortin T., Salvador A., Charrier J.P., Lenz C., Lacoux X., Morla A., Choquet-Kastylevsky G., Lemoine J. Clinical quantitation of prostate-specific antigen biomarker in the low nanogram/milliliter range by conventional bore liquid chromatography-tandem mass spectrometry multiple reaction monitoring, coupling and correlation with ELISA tests // Mol. Cell. Proteomics MCP. 2009. Vol. 8. № 5. P. 1006–1015.

132. Van den Hoogen L.L., Présumé J., Romilus I., Mondélus G., Elismé T., Sepúlveda N., Stresman G., Druetz T., Ashton R.A., Joseph V., Eisele T.P., Hamre K.E.S., Chang M.A., Lemoine J.F., Tetteh K.K.A., Boncy J., Existe A., Drakeley C., Rogier E. Quality Control of multiplex antibody detection in samples from large-scale surveys: the example of malaria in Haiti // Sci. Rep. 2020. Vol. 10. № 1. №. 1135. P. 1–10.

133. Wang P., Whiteaker J.R., Paulovich A.G. The evolving role of mass spectrometry in cancer biomarker discovery // Cancer Biol. Ther. 2009. Vol. 8. № 12. P. 1083–1094.

134. Luminex™ bead-based immunoassays drive immunoassays towards higher-content biomarker discovery. Behind the Bench / Thermo Fisher Scientific. 2021. URL: https://www.thermofisher.com/blog/behindthebench/luminex-bead-based-immunoassays-drive-immunoassays-towards-higher-content-biomarker-discovery (дата обращения 10.02.2021).

135. Rusling J.F., Kumar C.V., Gutkind J.S., Patel V. Measurement of biomarker proteins for point-of-care early detection and monitoring of cancer // The Analyst. 2010. Vol. 135. № 10. P. 2496–2511.

136. Kulasingam V., Diamandis E.P. Strategies for discovering novel cancer biomarkers through utilization of emerging technologies // Nat. Clin. Pract. Oncol. 2008. Vol. 5. № 10. P. 588–599.

137. Hawkridge A.M., Muddiman D.C. Mass spectrometry–based biomarker discovery: toward a global proteome index of individuality // Annu. Rev. Anal. Chem. 2009. Vol. 2. P. 265–277.

138. Hanash S.M., Pitteri S.J., Faca V.M. Mining the plasma proteome for cancer biomarkers // Nature. 2008. Vol. 452. № 7187. P. 571–579.

139. Wulfkuhle J.D., Liotta L.A., Petricoin E.F. Proteomic applications for the early detection of cancer // Nat. Rev. Cancer. 2003. Vol. 3. № 4. P. 267–275.

140. Wilson D.S., Nock S. Recent developments in protein microarray technology // Angew. Chem. Int. Ed Engl. 2003. Vol. 42. № 5. P. 494–500.

141. Lee H.J., Wark A.W., Corn R.M. Microarray methods for protein biomarker detection // The Analyst. 2008. Vol. 133. № 8. P. 975–983.

142. Bensmail H., Haoudi A. Postgenomics: Proteomics and bioinformatics in cancer research // J. Biomed. Biotechnol. 2003. Vol. 2003. № 4. P. 217–230.

143. Orchekowski R., Hamelinck D., Li L., Gliwa E., van Brocklin M., Marrero J.A., Vande Woude G.F., Feng Z., Brand R., Haab B.B. Antibody microarray profiling reveals individual and combined serum proteins associated with pancreatic cancer // Cancer Res. 2005. Vol. 65. № 23. P. 11193–11202.

144. Zhou H., Bouwman K., Schotanus M., Verweij C., Marrero J.A., Dillon D., Costa J., Lizardi P., Haab B.B. Two-Color, Rolling-circle amplification on antibody microarrays for sensitive, multiplexed serum-protein measurements // Genome Biol. 2004. Vol. 5. № 4. P. 1–12.

145. Stoeva S.I., Lee J.-S., Smith J.E., Rosen S.T., Mirkin C.A. Multiplexed detection of protein cancer markers with biobarcoded nanoparticle probes // J. Am. Chem. Soc. 2006. Vol. 128. № 26. P. 8378–8379.

146. Zheng G., Patolsky F., Cui Y., Wang W.U., Lieber C.M. Multiplexed electrical detection of cancer markers with nanowire sensor arrays // Nat. Biotechnol. 2005. Vol. 23. № 10. P. 1294–1301.

147. Konry T., Hayman R.B., Walt D.R. Microsphere-based rolling circle amplification microarray for the detection of dna and proteins in a single assay // Anal. Chem. 2009. Vol. 81. № 14. P. 5777–5782.

148. Gervais L., Delamarche E. Toward one-step point-of-care immunodiagnostics using capillary-driven microfluidics and PDMS substrates // Lab. Chip. 2009. Vol. 9. № 23. P. 3330–3337.

149. Kim D., Daniel W.L., Mirkin C.A. Microarray-based multiplexed scanometric immunoassay for protein cancer markers using gold nanoparticle probes // Anal. Chem. 2009. Vol. 81. № 21. P. 9183–9187.

150. Schweitzer B., Roberts S., Grimwade B., Shao W., Wang M., Fu Q., Shu Q., Laroche I., Zhou Z., Tchernev V.T., Christiansen J., Velleca M., Kingsmore S.F.

Multiplexed protein profiling on microarrays by rolling-circle amplification // Nat. Biotechnol. 2002. Vol. 20. № 4. P. 359–365.

151. Haab B.B., Dunham M.J., Brown P.O. Protein microarrays for highly parallel detection and quantitation of specific proteins and antibodies in complex solutions // Genome Biol. 2001. Vol. 2. P. 2.

152. Teramura Y., Arima Y., Iwata H. Surface Plasmon Resonance-Based Highly sensitive immunosensing for brain natriuretic peptide using nanobeads for signal amplification // Anal. Biochem. 2006. Vol. 357. № 2. P. 208–215.

153. Ro H.-S., Koh B.H., Jung S.O., Park H.K., Shin Y.-B., Kim M.-G., Chung, B.H. Surface plasmon resonance imaging protein arrays for analysis of triple protein interactions of HPV, E6, E6AP, and P53 // Proteomics. 2006. Vol. 6. № 7. P. 2108–2111.

154. Coon J.J., Syka J.E.P., Shabanowitz J., Hunt D.F. Tandem mass spectrometry for peptide and protein sequence analysis // BioTechniques. 2005. Vol. 38. № 4. P. 519–523.

155. Miller I., Crawford J., Gianazza E. Protein stains for proteomic applications: which, when, why? // Proteomics. 2006. Vol. 6. № 20. P. 5385–5408.

156. Fenn J.B., Mann M., Meng C.K., Wong S.F., Whitehouse C.M. Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules // Science. 1989. Vol. 246. № 4926. P. 64–71.

157. Karas M., Hillenkamp F. Laser Desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 Daltons // Anal. Chem. 1988. Vol. 60. № 20. P. 2299–2301.

158. Brüchert S., Joest E.F., Gatterdam K., Tampé R. Ultrafast in-gel detection by fluorescent super-chelator probes with hisquick-PAGE // Commun. Biol. 2020. Vol. 3. № 1. P. 1–7.

159. Koch R.J., Barrette A.M., Stern A.D., Hu B., Bouhaddou M., Azeloglu E.U., Iyengar R., Birtwistle M.R. Validating antibodies for quantitative western blot measurements with microwestern array // Sci. Rep. 2018. Vol. 8. № 11329. P. 1–10.

160. Sano S., Tagami S., Hashimoto Y., Yoshizawa-Kumagaye K., Tsunemi M., Okochi M., Tomonaga T. Absolute quantitation of low abundance plasma APL1β

peptides at sub-fmol/mL Level by SRM/MRM without immunoaffinity enrichment // Journal of proteome research. 2014. Vol. 13. № 2. P. 1012–1020.

161. Kalčáková L., Pospiech M., Tremlová B., Javůrková Z., Chernukha I. Development of immunohistochemical methods for casein detection in meat products // Foods. 2021. Vol. 10. № 28. P. 1–14.

162. Xu H., Wang Y., Lin S., Deng W., Peng D., Cui Q., Xue Y. PTMD: a database of human disease-associated post-translational modifications // Genomics Proteomics Bioinformatics. 2018. Vol. 16. № 4. P. 244–251.

163. Watanabe H., Imafuku T., Otagiri M., Maruyama T. Clinical implications associated with the posttranslational modification-induced functional impairment of albumin in oxidative stress-related diseases // J. Pharm. Sci. 2017. Vol. 106. № 9. P. 2195–2203.

164. Xu Y., Yang Y., Wang Z., Li C., Shao Y.A Systematic review on posttranslational modification in proteins: feature construction, algorithm and webserver // Protein Pept. Lett. 2018. Vol. 25. № 9. P. 807–814.

165. Mordret E., Dahan O., Asraf O., Rak R., Yehonadav A., Barnabas G.D., Cox J., Geiger T., Lindner A.B., Pilpel Y. Systematic detection of amino acid substitutions in proteomes reveals mechanistic basis of ribosome errors and selection for translation fidelity // Mol. Cell. 2019. Vol. 75. № 3. P. 427–441.

166. Malsagova K., Kopylov A., Stepanov A., Butkova T., Sinitsyna A., Izotov A., Kaysheva A. Biobanks—a platform for scientific and biomedical research // Diagnostics. 2020. Vol. 10. № 485. P. 1–21.

167. Wang W.-Q., Jensen O.N., Møller I.M., Hebelstrup K.H., Rogowska-Wrzesinska A. Evaluation of sample preparation methods for mass spectrometry-based proteomic analysis of barley leaves // Plant Methods. 2018. Vol. 14. № 72. P. 1–13.

168. León I.R., Schwämmle V., Jensen O.N., Sprenger R.R. Quantitative assessment of in-solution digestion efficiency identifies optimal protocols for unbiased protein analysis // Mol. Cell. Proteomics MCP. 2013. Vol. 12. № 10. P. 2992–3005.

169. SPIDIA and SPIDIA4P homepage / 2021. URL: https://www.spidia.eu/ (дата обращения 27.01.2021).

170. Faktor J., Goodlett D.R., Dapic I. Trends in sample preparation for proteome analysis / IntechOpen. – 2021, 154 p.

171. Switzar L., Giera M., Niessen W.M.A. Protein digestion: an overview of the available techniques and recent developments // J. Proteome Res. 2013. Vol. 12. № 3. P. 1067–1077.

172. Walmsley S.J., Rudnick P.A., Liang Y., Dong Q., Stein S.E., Nesvizhskii A.I. Comprehensive analysis of protein digestion using six trypsins reveals the origin of trypsin as a significant source of variability in proteomics // J. Proteome Res. 2013. Vol. 12. № 12. P. 5666–5680.

173. Apweiler R., Biswas M., Fleischmann W., Kanapin A., Karavidopoulou Y., Kersey P., Kriventseva E.V., Mittard V., Mulder N., Phan I., Zdobnov E. Proteome Analysis Database: Online application of interpro and clustr for the functional classification of proteins in whole genomes // Nucleic Acids Res. 2001. Vol. 29. № 1. P. 44–48.

174. Sipos T., Merkel J.R. An effect of calcium ions on the activity, heat stability, and structure of trypsin // Biochemistry. 1970. Vol. 9. № 14. P. 2766–2775.

175. Suttapitugsakul S., Xiao H., Smeekens J., Wu R. Evaluation and optimization of reduction and alkylation methods to maximize peptide identification with MS-based proteomics // Mol. Biosyst. 2017. Vol. 13. № 12. P. 2574–2582.

176. Müller T., Winter D. Systematic evaluation of protein reduction and alkylation reveals massive unspecific side effects by iodine-containing reagents // Mol. Cell. Proteomics MCP. 2017. Vol. 16. № 7. P. 1173–1187.

177. Saveliev S., Bratz M., Zubarev R., Szapacs M., Budamgunta H., Urh M. Trypsin/Lys-C protease mix for enhanced protein mass spectrometry analysis // Nat. Methods. 2013. Vol. 10. № 11. P. 1–2.

178. Kotormán M., Laczkó I., Szabó A., Simon L.M. Effects of Ca2+ on catalytic activity and conformation of trypsin and alpha-chymotrypsin in aqueous ethanol // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2003. Vol. 304. № 1. P. 18–21.

179. Wiśniewski J.R., Wegler C., Artursson P. Multiple-enzyme-digestion strategy improves accuracy and sensitivity of label- and standard-free absolute

quantification to a level that is achievable by analysis with stable isotope-labeled standard spiking // J. Proteome Res. 2019. Vol. 18. № 1. P. 217–224.

180. Biringer R.G., Amato H., Harrington M.G., Fonteh A.N., Riggins J.N., Hühmer A.F.R. Enhanced sequence coverage of proteins in human cerebrospinal fluid using multiple enzymatic digestion and linear ion trap LC-MS/MS // Brief. Funct. Genomic. Proteomic. 2006. Vol. 5. № 2. P. 144–153.

181. Gross E., Witkop B. Nonenzymatic cleavage of peptide bonds: the methionine residues in bovine pancreatic ribonuclease // J. Biol. Chem. 1962. Vol. 237. P. 1856–1860.

182. Chevallet M., Santoni V., Poinas A., Rouquié D., Fuchs A., Kieffer S., Rossignol M., Lunardi J., Garin J., Rabilloud T. New zwitterionic detergents improve the analysis of membrane proteins by two-dimensional electrophoresis // Electrophoresis. 1998. Vol. 19. № 11. P. 1901–1909.

183. Wu C.C., Yates J.R. The application of mass spectrometry to membrane proteomics // Nat. Biotechnol. 2003. Vol. 21. № 3. P. 262–267.

184. Ye X., Johann D.J., Hakami R.M., Xiao Z., Meng Z., Ulrich R.G., Issaq, H. J., Veenstra, T. D., Blonder, J. Optimization of protein solubilization for the analysis of the cd14 human monocyte membrane proteome using LC-MS/MS // J. Proteomics. 2009. Vol. 73. № 1. P. 112–122.

185. Alfonso-Garrido J., Garcia-Calvo E., Luque-Garcia J.L. Sample Preparation Strategies for Improving the Identification of Membrane Proteins by Mass Spectrometry // Anal. Bioanal. Chem. 2015. Vol. 407. № 17. P. 4893–4905.

186. Lin Y., Huo L., Liu Z., Li J., Liu Y., He Q., Wang X., Liang S. Sodium laurate, a novel protease- and mass spectrometry-compatible detergent for mass spectrometry-based membrane proteomics // PloS One. 2013. Vol. 8. № 3. P. e59779.

187. Perchey R.T., Tonini L., Tosolini M., Fournié J.-J., Lopez F., Besson A., Pont F. PTMselect: optimization of protein modifications discovery by mass spectrometry // Sci. Rep. 2019. Vol. 9. № 4181. P. 1–7.

188. Boehmer J.L., DeGrasse J.A., McFarland M.A., Tall E.A., Shefcheck K.J., Ward J.L., Bannerman D.D. The proteomic advantage: label-free quantification of

proteins expressed in bovine milk during experimentally induced coliform mastitis // Vet. Immunol. Immunopathol. 2010. Vol. 138. № 4. P. 252–266.

189. Dunphy K., Dowling P., Bazou D., O'Gorman P. Current methods of post-translational modification analysis and their applications in blood cancers // Cancers. 2021. Vol. 13. № 8. P. 1930.

190. Fleszar M.G., Fortuna P., Zawadzki M., Kosyk B., Krzystek-Korpacka M. Simultaneous LC-MS/MS-based quantification of free 3-nitro-l-tyrosine, 3-chloro-l-tyrosine, and 3-bromo-l-tyrosine in plasma of colorectal cancer patients during early postoperative period // Molecules. 2020. Vol. 25. № 21. № 5158. P. 1–40.

191. Liu Y., Yi F., Kumar A.B., Kumar Chennamaneni N., Hong X., Scott C.R., Gelb M.H., Turecek F. Multiplex tandem mass spectrometry enzymatic activity assay for newborn screening of the mucopolysaccharidoses and type 2 neuronal ceroid lipofuscinosis // Clin. Chem. 2017. Vol. 63. № 6. P. 1118–1126.

192. Nesvizhskii A.I. A Survey of computational methods and error rate estimation procedures for peptide and protein identification in shotgun proteomics // J. Proteomics. 2010. Vol. 73. № 11. P. 2092–2123.

193. Steen H., Mann M. The ABC's and XYZ's. of peptide sequencing // Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 2004. Vol. 5. № 9. P. 699–711.

194. Kim M.-S., Kandasamy K., Chaerkady R., Pandey A. Assessment of resolution parameters for cid-based shotgun proteomic experiments on the ltq-orbitrap mass spectrometer // J. Am. Soc. Mass Spectrom. 2010. Vol. 21. № 9. P. 1606–1611.

195. Syka J.E.P., Coon J.J., Schroeder M.J., Shabanowitz J., Hunt D.F. Peptide and protein sequence analysis by electron transfer dissociation mass spectrometry // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 2004. Vol. 101. № 26. P. 9528–9533.

196. Griffin T.J., Xie H., Bandhakavi S., Popko J., Mohan A., Carlis J.V., Higgins L. ITRAQ reagent-based quantitative proteomic analysis on a linear ion trap mass spectrometer // J. Proteome Res. 2007. Vol. 6. № 11. P. 4200–4209.

197. Olsen J.V., Macek B., Lange O., Makarov A., Horning S., Mann M. Higher-energy c-trap dissociation for peptide modification analysis // Nat. Methods. 2007. Vol. 4. № 9. P. 709–712.

198. Hunt D.F., Shabanowitz J., Bai D.L. Peptide sequence analysis by electron transfer dissociation mass spectrometry: a web-based tutorial // J. Am. Soc. Mass Spectrom. 2015. Vol. 26. № 7. P. 1256–1258.

199. Sobott F., Watt s.j., smith j., edelmann m.j., kramer h.b., kessler b.m. comparison of cid versus etd based ms/ms fragmentation for the analysis of protein ubiquitination // J. Am. Soc. Mass Spectrom. 2009. Vol. 20. № 9. P. 1652–1659.

200. Clark A.E., Kaleta E.J., Arora A., Wolk D.M. Matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry: a fundamental shift in the routine practice of clinical microbiology // Clin. Microbiol. Rev. 2013. Vol. 26. № 3. P. 547–603.

201. Boesl U. Time-of-flight mass spectrometry: introduction to the basics // Mass Spectrom. Rev. 2017. Vol. 36. № 1. P. 86–109.

202. Gross J H. Mass spectrometry: a textbook. / Springer Science & Business Media. – 2006, 773 p.

203. Guerrera I.C., Kleiner O. Application of mass spectrometry in proteomics // Biosci. Rep. 2005. Vol. 25. № 1–2. P. 71–93.

204. fuchs b., schiller j. application of maldi-tof Mass Spectrometry in Lipidomics // Eur. J. Lipid Sci. Technol. 2009. Vol. 111. № 1. P. 83–98.

205. Patel R. MALDI-TOF MS for the diagnosis of infectious diseases // Clin Chem. 2015. Vol. 61. № 1. P. 100–111.

206. Wang H., Zhao Z., Guo Y. Chemical and biochemical applications of MALDI TOF-MS based on analyzing the small organic compounds // Top. Curr. Chem. 2013. Vol. 331. P. 165–192.

207. Breitkreutz A., Choi H., Sharom J.R., Boucher L., Neduva V., Larsen B., Lin Z.-Y., Breitkreutz B.-J., Stark C., Liu G., Ahn J., Dewar-Darch D., Reguly T., Tang X., Almeida R., Qin Z.S., Pawson T., Gingras A.-C., Nesvizhskii A.I., Tyers M. A Global protein kinase and phosphatase interaction network in yeast // Science. 2010. Vol. 328. № 5981. P. 1043–1046.

208. Bąchor R., Waliczek M., Stefanowicz P., Szewczuk Z. Trends in the Design of New Isobaric Labeling Reagents for Quantitative Proteomics // Molecules. 2019. Vol. 24. № 701. P. 1–19.

209. Zhao Y., Brasier A.R. Applications of selected reaction monitoring srm. Mass spectrometry for quantitative measurement of signaling pathways // Methods San Diego Calif. 2013. Vol. 61. № 3. P. 313–322.

210. Shi T., Su D., Liu T., Tang K., Camp D.G., Qian W.-J., Smith R.D. Advancing the sensitivity of selected reaction monitoring-based targeted quantitative proteomics // Proteomics. 2012. Vol. 12. № 8. P. 1074–1092.

211. Aichler M., Walch A. MALDI imaging mass spectrometry: current frontiers and perspectives in pathology research and practice // Lab. Invest. 2015. Vol. 95. № 4. P. 422–431.

212. Stoeckli M., Chaurand P., Hallahan D.E., Caprioli R.M. Imaging mass spectrometry: a new technology for the analysis of protein expression in mammalian tissues // Nat. Med. 2001. Vol. 7. № 4. P. 493–496.

213. Poté N., Alexandrov T., Le Faouder J., Laouirem S., Léger T., Mebarki M., Belghit, J., Camadro J.-M., Bedossa P., Paradis V. Imaging mass spectrometry reveals modified forms of histone h4 as new biomarkers of microvascular invasion in hepatocellular carcinomas: hepatology // Hepatology. 2013. Vol. 58. № 3. P. 983–994.

214. Norris J.L., Caprioli R.M. Analysis of tissue specimens by matrix-assisted laser desorption/ionization imaging mass spectrometry in biological and clinical research // Chem. Rev. 2013. Vol. 113. № 4. P. 2309–2342.

215. Steurer S., Borkowski C., Odinga S., Buchholz M., Koop C., Huland H., Becker M., Witt M., Trede D., Omidi M., Kraus O., Bahar A.S., Seddiqi A.S., Singer J.M., Kwiatkowski M., Trusch M., Simon R., Wurlitzer M., Minner S., Schlomm T., Sauter G., Schlüter H. MALDI mass spectrometric imaging based identification of clinically relevant signals in prostate cancer using large-scale tissue microarrays // Int. J. Cancer. 2013. Vol. 133. № 4. P. 920–928.

216. Quaas A., Bahar A.S., von Loga K., Seddiqi A.S., Singer J.M., Omidi M., Kraus O., Kwiatkowski M., Trusch M., Minner S., Burandt E., Stahl P., Wilczak W., Wurlitzer M., Simon R., Sauter G., Marx A., Schlüter H. MALDI imaging on large-scale tissue microarrays identifies molecular features associated with tumour phenotype in oesophageal cancer // Histopathology. 2013. Vol. 63. № 4. P. 455–462.

217. Steurer S., Seddiqi A.S., Singer J.M., Bahar A.S., Eichelberg C., Rink M., Dahlem R., Huland H., Sauter G., Simon R., Minner S., Burandt E., Stahl P.R., Schlomm T., Wurlitzer M., Schlüter H. MALDI imaging on tissue microarrays identifies molecular features associated with renal cell cancer phenotype // Anticancer Res. 2014. Vol. 34. № 5. P. 2255–2261.

218. Johnson R.S., Taylor J.A. Searching Sequence Databases via De Novo peptide sequencing by tandem mass spectrometry // Mol. Biotechnol. 2002. Vol. 22. № 3. P. 301–315.

219. Ma Z.-Q., Dasari S., Chambers M.C., Litton M.D., Sobecki S.M., Zimmerman L.J., Halvey P.J., Schilling B., Drake P.M., Gibson B.W., Tabb D.L. IDPicker 2.0: improved protein assembly with high discrimination peptide identification filtering // J. Proteome Res. 2009. Vol. 8. № 8. P. 3872–3881.

220. Eng J.K., McCormack A.L., Yates J.R. An Approach to Correlate Tandem Mass spectral data of peptides with amino acid sequences in a protein database // J. Am. Soc. Mass Spectrom. 1994. Vol. 5. № 11. P. 976–989.

221. Perkins D.N., Pappin D.J., Creasy D.M., Cottrell J.S. Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data // Electrophoresis. 1999. Vol. 20. № 18. P. 3551–3567.

222. Craig R., Beavis R.C. TANDEM: Matching proteins with tandem mass spectra // Bioinforma. Oxf. Engl. 2004. Vol. 20. № 9. P. 1466–1467.

223. Geer L.Y., Markey S.P., Kowalak J.A., Wagner L., Xu M., Maynard D.M., Yang X., Shi W., Bryant S.H. Open mass spectrometry search algorithm // J. Proteome Res. 2004. Vol. 3. № 5. P. 958–964.

224. Tanner S., Shu H., Frank A., Wang L.-C., Zandi E., Mumby M., Pevzner P.A., Bafna V. InsPecT: Identification of posttranslationally modified peptides from tandem mass spectra // Anal. Chem. 2005. Vol. 77. № 14. P. 4626–4639.

225. Dasari S., Chambers M.C., Slebos R.J., Zimmerman L.J., Ham A.-J.L., Tabb D.L. TagRecon: High-throughput mutation identification through sequence tagging // J. Proteome Res. 2010. Vol. 9. № 4. P. 1716–1726.

226. Bandeira N. Protein identification by spectral networks analysis // Methods Mol. Biol. Clifton NJ. 2011. Vol. 694. P. 151–168.

227. Lam H., Deutsch E.W., Eddes J.S., Eng J.K., King N., Stein S.E., Aebersold R. Development and validation of a spectral library searching method for peptide identification from MS/MS // Proteomics. 2007. Vol. 7. № 5. P. 655–667.

228. Craig R., Cortens J.P., Beavis R.C. The use of proteotypic peptide libraries for protein identification // Rapid Commun. Mass Spectrom. RCM. 2005. Vol. 19. № 13. P. 1844–1850.

229. Frewen B.E., Merrihew G.E., Wu C.C., Noble W.S., MacCoss M.J. Analysis of peptide MS/MS spectra from large-scale proteomics experiments using spectrum libraries // Anal. Chem. 2006. Vol. 78. № 16. P. 5678–5684.

230. Desiere F., Deutsch E.W., Nesvizhskii A.I., Mallick P., King N.L., Eng J.K., Aderem A., Boyle R., Brunner E., Donohoe S., Fausto N., Hafen E., Hood L., Katze M.G., Kennedy K.A., Kregenow F., Lee H., Lin B., Martin D., Ranish J.A., Rawlings D.J., Samelson L.E., Shiio Y., Watts J.D., Wollscheid B., Wright M.E., Yan W., Yang L., Yi E.C., Zhang H., Aebersold R. Integration with the human genome of peptide sequences obtained by high-throughput mass spectrometry // Genome Biol. 2005. Vol. 6. № R9. P. 1–12.

231. Marcotte E.M. How do shotgun proteomics algorithms identify proteins? // Nat. Biotechnol. 2007. Vol. 25. № 7. P. 755–757.

232. Slotta D.J., Barrett T., Edgar R. NCBI Peptidome: A new public repository for mass spectrometry peptide identifications // Nat. Biotechnol. 2009. Vol. 27. № 7. P. 600–601.

233. Mascot database search help index. / 2021. URL: http://www.matrixscience.com/help.html (дата обращения 11.02.2021).

234. Fenyö D., Eriksson J., Beavis R. Mass spectrometric protein identification using the global proteome machine // Methods Mol. Biol. Clifton NJ. 2010. Vol. 673. № 189–202. https://doi.org/10.1007/978-1-60761-842-3_11.

235. Kapp E.A., Schütz F., Connolly L.M., Chakel J.A., Meza J.E., Miller C.A., Fenyo D., Eng J.K., Adkins J.N., Omenn G.S., Simpson R.J. An evaluation, comparison,

and accurate benchmarking of several publicly available ms/ms search algorithms: sensitivity and specificity analysis // Proteomics. 2005. Vol. 5. № 13. P. 3475–3490.

236. Elias J.E., Haas W., Faherty B.K., Gygi S.P. Comparative evaluation of mass spectrometry platforms used in large-scale proteomics investigations // Nat. Methods. 2005. Vol. 2. № 9. P. 667–675.

237. Kandasamy K., Pandey A., Molina H. Evaluation of several MS/MS search algorithms for analysis of spectra derived from electron transfer dissociation experiments // Anal. Chem. 2009. Vol. 81. № 17. P. 7170–7180.

238. Keller A., Nesvizhskii A.I., Kolker E., Aebersold R. Empirical statistical model to estimate the accuracy of peptide identifications made by MS/MS and database search // Anal. Chem. 2002. Vol. 74. № 20. P. 5383–5392.

239. Sadygov R.G., Hao Z., Huhmer A.F.R. Charger: combination of signal processing and statistical learning algorithms for precursor charge-state determination from electron-transfer dissociation spectra // Anal. Chem. 2008. Vol. 80. № 2. P. 376–386.

240. Baker P.R., Medzihradszky K.F., Chalkley R.J. Improving software performance for peptide electron transfer dissociation data analysis by implementation of charge state- and sequence-dependent scoring // Mol. Cell. Proteomics MCP. 2010. Vol. 9. № 9. P. 1795–1803.

241. Zhou C., Bowler L.D., Feng J.A Machine learning approach to explore the spectra intensity pattern of peptides using tandem mass spectrometry data // BMC Bioinformatics. 2008. Vol. 9. № 325. P. 1–17.

242. Zhang X.K., Elbin C.S., Turecek F., Scott R., Chuang W.-L., Keutzer J.M., Gelb M. Multiplex lysosomal enzyme activity assay on dried blood spots using tandem mass spectrometry. in clinical applications of mass spectrometry: methods and protocols / Methods in Molecular Biology, Humana Press: Totowa. – 2010, 350 p.

243. Edwards N.J. Novel peptide identification from tandem mass spectra using ESTS and sequence database compression // Mol. Syst. Biol. 2007. Vol. 3. № 102. P. 1–7.

244. Chen Y., Zhang J., Xing G., Zhao Y. Mascot-derived false positive peptide identifications revealed by manual analysis of tandem mass spectra // J. Proteome Res. 2009. Vol. 8. № 6. P. 3141–3147.

245. Alves G., Ogurtsov A.Y., Yu Y.-K. RAId_DbS: peptide identification using database searches with realistic statistics // Biol. Direct. 2007. Vol. 2. P. 25.

246. Kim S., Gupta N., Pevzner P. A. Spectral probabilities and generating functions of tandem mass spectra: a strike against decoy databases // J. Proteome Res. 2008. Vol. 7. № 8. P. 3354–3363.

247. Benjamini Y., Hochberg Y. Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing // J. R. Stat. Soc. Ser. B Methodol. 1995. Vol. 57. № 1. P. 289–300.

248. Choi H., Nesvizhskii A.I. False discovery rates and related statistical concepts in mass spectrometry-based proteomics // J. Proteome Res. 2008. Vol. 7 № 1. P. 47–50.

249. Blanco L., Mead J.A., Bessant C. Comparison of novel decoy database designs for optimizing protein identification searches using ABRF SPRG2006 standard MS/MS data sets // J. Proteome Res. 2009. Vol. 8. № 4. P. 1782–1791.

250. Feng J., Naiman D.Q., Cooper B. Probability-based pattern recognition and statistical framework for randomization: modeling tandem mass spectrum/peptide sequence false match frequencies // Bioinforma. Oxf. Engl. 2007. Vol. 23. № 17. P. 2210–2217.

251. 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.

252. Aussel C., Masseyeff R. Human alpha-fetoprotein-fatty acid interaction // Biochem. Biophys. Res. Commun. 1983. Vol. 115. № 1. P. 38–45.

253. Lu J., Stewart A.J., Sadler P.J., Pinheiro T.J.T., Blindauer C.A. Albumin as a zinc carrier: properties of its high-affinity zinc-binding site // Biochem. Soc. Trans. 2008. Vol. 36. № 6. P. 1317–1321.

254. Fujiwara S., Amisaki T. Identification of high affinity fatty acid binding sites on human serum albumin by MM-PBSA method // Biophys. J. 2008. Vol. 94. № 1. P. 95–103.

255. Majorek K.A., Porebski P.J., Dayal A., Zimmerman M.D., Jablonska K., Stewart A.J., Chruszcz M., Minor W. Structural and immunologic characterization of bovine, horse, and rabbit serum albumins // Mol. Immunol. 2012. Vol. 52. № 3–4. P. 174–182.

256. Konopka K., Neilands J.B. Effect of serum albumin on siderophore-mediated utilization of transferrin iron // Biochemistry. 1984. Vol. 23. № 10. P. 2122–2127.

257. Perret A., Pompon D. Electron shuttle between membrane-bound cytochrome P450 3A4 and B5 rules uncoupling mechanisms // Biochemistry. 1998. Vol. 37. № 33. P. 11412–11424.

258. Strushkevich N., MacKenzie F., Cherkesova T., Grabovec I., Usanov S., Park H.-W. Structural basis for pregnenolone biosynthesis by the mitochondrial monooxygenase system // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 2011. Vol. 108. № 25. P. 10139–10143.

259. Wen L.P., Fulco A.J. Cloning of the gene encoding a catalytically self-sufficient cytochrome p-450 fatty acid monooxygenase induced by barbiturates in bacillus megaterium and its functional expression and regulation in heterologous escherichia coli. and homologous bacillus megaterium. // J. Biol. Chem. 1987. Vol. 262. № 14. P. 6676–6682.

260. Anderson D.D., Quintero C.M., Stover P.J. Identification of a de novo thymidylate biosynthesis pathway in mammalian mitochondria / Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 2011. Vol. 108. № 37. P. 15163–15168.

261. Peters G.J., Backus H.H.J., Freemantle S., van Triest B., Codacci-Pisanelli G., van der Wilt C.L., Smid K., Lunec J., Calvert A.H., Marsh S., McLeod H.L., Bloemena E., Meijer S., Jansen G., van Groeningen C.J., Pinedo H.M. Induction of thymidylate synthase as a 5-fluorouracil resistance mechanism // Biochim. Biophys. Acta BBA. 2002. Vol. 1587. № 2. P. 194–205.

262. Hermanson G.T. (Strept)avidin–biotin systems // Bioconjugate Techniques. 2013. V.3. P. 465–505.

263. Huberman T., Eisenberg-Domovich Y., Gitlin G., Kulik T., Bayer E.A., Wilchek M., Livnah O. Chicken avidin exhibits pseudo-catalytic properties: biochemical, structural, and electrostatic consequences // J. Biol. Chem. 2001. Vol. 276. № 34. P. 32031–32039.

264. Macian F. NFAT proteins: key regulators of t-cell development and function // Nat. Rev. Immunol. 2005. Vol. 5. № 6. P. 472–484.

265. Pan M.-G., Xiong Y., Chen F. NFAT gene family in inflammation and cancer. Curr // Mol. Med. 2013. Vol. 13. № 4. P. 543–554.

266. Irving J.A., Pike R.N., Dai W., Brömme D., Worrall D.M., Silverman G.A., Coetzer T.H.T., Dennison C., Bottomley S.P., Whisstock J.C. Evidence that serpin architecture intrinsically supports papain-like cysteine protease inhibition: engineering alpha-antitrypsin to inhibit cathepsin proteases // Biochemistry. 2002. Vol. 41. № 15. P. 4998–5004.

267. Weisel J.W., Litvinov R.I. Fibrin formation, structure and properties // Subcell. Biochem. 2017. Vol. 82. P. 405–456.

268. Gawlik K., Gallay P.A. HCV core protein and virus assembly: what we know without structures // Immunol. Res. 2014. Vol. 60. № 1. P. 1–10.

269. Jürgens K.D., Papadopoulos S., Peters T., Gros G. Myoglobin: just an oxygen store or also an oxygen transporter? // Physiology. 2000. Vol. 15, № 50. P. 269–274.

270. Rosenstein Y., Burakoff S.J., Herrmann S.H. HIV-gp120 can block cd4-class ii mhc-mediated adhesion // J. Immunol. Baltim. 1990. Vol. 144. № 2. P. 526–531.

271. Sheftel A.D., Stehling O., Pierik A.J., Elsässer H.-P., Mühlenhoff U., Webert H., Hobler A., Hannemann F., Bernhardt R., Lill R. Humans possess two mitochondrial ferredoxins, FDX1 and FDX2, with distinct roles in steroidogenesis, heme, and FE/S cluster biosynthesis // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 2010. Vol. 107. № 26. P. 11775–11780.

272. Ziegler G.A., Vonrhein C., Hanukoglu I., Schulz G.E. The structure of adrenodoxin reductase of mitochondrial P450 systems: electron transfer for steroid biosynthesis // J. Mol. Biol. 1999. Vol. 289. № 4. P. 981–990.

273. El-Jaick K.B., Powers S.E., Bartholin L., Myers K.R., Hahn J., Orioli I.M., Ouspenskaia M., Lacbawan F., Roessler E., Wotton D., Muenke M. Functional analysis of mutations in TGIF associated with holoprosencephaly // Mol. Genet. Metab. 2007. Vol. 90. № 1. P. 97–111.

274. Mokry M., Hatzis P., de Bruijn E., Koster J., Versteeg R., Schuijers J., van de Wetering M., Guryev V., Clevers H., Cuppen E. Efficient double fragmentation chip-seq provides nucleotide resolution protein-DNA binding profiles // PloS One. 2010. Vol. 5. № 11. P.e15092.

275. Sakai Y., Nakagawa R., Sato R., Maeda M. Selection of DNA binding sites for human transcriptional regulator GATA-6 // Biochem. Biophys. Res. Commun. 1998. Vol. 250. № 3. P. 682–688.

276. Jolma A., Kivioja T., Toivonen J., Cheng L., Wei G., Enge M., Taipale M., Vaquerizas J.M., Yan J., Sillanpää M.J., Bonke M., Palin K., Talukder S., Hughes T.R., Luscombe N.M., Ukkonen E., Taipale J. Multiplexed massively parallel SELEX for characterization of human transcription factor binding specificities // Genome Res. 2010. Vol. 20. № 6. P. 861–873.

277. Iyaguchi D., Yao M., Watanabe N., Nishihira J., Tanaka I. Crystallization and preliminary X-Ray studies of the DNA-binding domain of hepatocyte nuclear factor-6alpha complexed with DNA // Protein Pept. Lett. 2006. Vol. 13. № 5. P. 531–533.

278. Lee K.-H., Kwak Y.-D., Kim D.-H., Chang M.-Y., Lee Y.-S. Human zinc finger protein 161, a novel transcriptional activator of the dopamine transporter // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2004. Vol. 313. № 4. P. 969–976.

279. Zawel L., Dai J.L., Buckhaults P., Zhou S., Kinzler K.W., Vogelstein B., Kern S.E. Human smad3 and smad4 are sequence-specific transcription activators // Mol. Cell. 1998. Vol. 1. № 4. P. 611–617.

280. Wang H., Sun R., Liu G., Yao M., Fei J., Shen H. Characterization of the target DNA sequence for the dna-binding domain of zinc finger protein 191 // Acta Biochim. Biophys. Sin. 2008. Vol. 40. № 8. P. 704–710.

281. Кайшева А.Л., Копылов А.Т., Кушлинский Н.Е., Герштейн Е.С., Алферов А.А., Морозов А.А., Казанцева И.А., Плешакова Т.О., Арчаков А.И., Иванов Ю.Д. Сравнительный анализ протеома плазмы крови больных почечно-клеточным раком // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2019. Т. 167. № 1. С. 99–104.

282. Kaysheva A.L., Kopylov A., Galiullin R.A., Anashkina A.S., Archakov A.I., Ivanov Y.D., Yurov I.Y., Vorsanova S.G., Yurov Y.B. Протеомный анализ белкового профиля сывороток крови больных аутизмом детей. Вопросы Практической Педиатрии. 2016. Т. 11. № 5. С. 12–17.

283. Ivanov Yu.D., Ivanov A.V., Kaysheva A.L., Zgoda V.G., Usanov S.A., Hui-Bon-Hoa G., Archakov A.I. Productive and non-productive complexes in cytochrome P450-containing systems // Biochem. Mosc. Suppl. Ser. B Biomed. Chem. 2009. Vol. 3. № 2. P. 183–197.

284. Vermeulen G.J., Lambert J.G., Lenczowski M.J., Goos H.J. Steroid hormone secretion by testicular tissue from african catfish, clarias gariepinus, in primary culture: identification and quantification by gas chromatography - mass spectrometry // Fish Physiol. Biochem. 1993. Vol. 12. № 1. P. 21–30.

285. Schiesel S., Lämmerhofer M., Lindner W. Quantitative LC-ESI-MS/MS metabolic profiling method for fatty acids and lipophilic metabolites in fermentation broths from beta-lactam antibiotics production // Anal. Bioanal. Chem. 2010. Vol. 397. № 1. P. 147–160.

286. Кайшева А.Л., Копылов А.Т., Плешакова Т.О., Кушлинский Н.Е., Никитаев В.Г., Дружинина Е.А., Арчаков А.И., Иванов Ю.Д. Масс-спектрометрическое профилирование белкового состава плазмы крови больных раком толстого кишечника // Краткие Сообщения по физике ФИАН. 2018. Т. 45. № 9. С. 34–38.

287. 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.

288. Ivanov Y.D., Pleshakova T.O., Shumov I.D., Kozlov A.F., Ivanova I.A., Valueva A.A., Tatur V.Y., Smelov M.V., Ivanova N.D., Ziborov V.S. AFM Imaging of protein aggregation in studying the impact of knotted electromagnetic field on a peroxidase // Sci. Rep. 2020. Vol. 10. № 1. P. 9022–9031.

289. Плешакова Т.О. Высокочувствительная детекция белков на чипах к атомно-силовому микроскопу: Диссертация на соискание ученой степени доктора биологических наук: 03.01.04. – М., 2019. – 214 с.

290. 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. Vol. 10. № 464. P. 1–19.

291. Borovok N., Iram N., Zikich D., Ghabboun J., Livshits G. I., Porath D., Kotlyar A.B. Assembling of G-strands into novel tetra-molecular parallel G4-DNA nanostructures using avidin–biotin recognition // Nucleic Acids Res. 2008. Vol. 36. № 15. P. 5050–5060.

292. Gundry R.L., White M.Y., Murray C.I., Kane L.A., Fu Q., Stanley B.A., Van Eyk J.E. Preparation of proteins and peptides for mass spectrometry analysis in a bottom-up proteomics workflow: current protocols in molecular biology. Chapter 10: Wiley Brand. 2009. 29 p.

293. Constantopoulos T.L., Jackson G.S., Enke C.G. Effects of salt concentration on analyte response using electrospray ionization mass spectrometry // J. Am. Soc. Mass Spectrom. 1999. Vol. 10. № 7. P. 625–634.

294. Takamura K., Fischer H., Morrow N.R. Physical properties of aqueous glycerol solutions // J. Pet. Sci. Eng. 2012. Vol. 98–99. P. 50–60.

295. Schmelter C., Funke S., Treml J., Beschnitt A., Perumal N., Manicam C., Pfeiffer N., Grus F.H. Comparison of two solid-phase extraction (SPE) methods for the

identification and quantification of porcine retinal protein markers by LC-MS/MS // Int. J. Mol. Sci. 2018. Vol. 19. P. 1–16.

296. 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. Vol. 8. № 1500. P. 1–8.

297. Шаповалова Е.Н., Пирогов А.В. Хроматографические методы анализа: Методическое пособие для специального курса. М.: Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, 2010. 211 с.

298. Kountouras J., Zavos Ch., Deretzi G., Giartza-Taxidou E., Gavalas E., Chatzigeorgiou S. Immunomodulation by alpha-fetoprotein in neurological disorders may involve oncogenic dilemmas // Hippokratia. 2010. Vol. 14. № 1. P. 63.

299. Montal R., Andreu-Oller C., Bassaganyas L., Esteban-Fabró R., Moran S., Montironi C., Moeini A., Pinyol R., Peix J., Cabellos L., Villanueva A., Sia D., Mazzaferro V., Esteller M., Llovet J.M. Molecular portrait of high alpha-fetoprotein in hepatocellular carcinoma: implications for biomarker-driven clinical trials // Br. J. Cancer. 2019. Vol. 121. № 4. P. 340–343.

300. Murugavel K.G., Mathews S., Jayanthi V., Shankar E.M., Hari R., Surendran R., Vengatesan A., Raghuram K., Rajasambandam P., Murali A., Srinivas U., Palaniswamy K.R., Pugazhendhi T., Thyagarajan S.P. Alpha-fetoprotein as a tumor marker in hepatocellular carcinoma: investigations in south indian subjects with hepatotropic virus and aflatoxin etiologies // Int. J. Infect. Dis. 2008. Vol. 12 . № 6. P. e71–e76.

301. Rahman L., Voeller D., Rahman M., Lipkowitz S., Allegra C., Barrett J.C., Kaye F.J., Zajac-Kaye M. Thymidylate synthase as an oncogene: a novel role for an essential DNA synthesis enzyme // Cancer Cell. 2004. Vol. 5. № 4. P. 341–351.

302. Bertino J.R., Banerjee D. Thymidylate synthase as an oncogene? // Cancer Cell. 2004., Vol. 5. № 4. P. 301–302.

303. Mancini M., Toker A. NFAT proteins: emerging roles in cancer progression // Nat Rev Cancer. 2009. Vol. 9. P. 810–820.

304. Müller M.R., Rao A. NFAT, immunity and cancer: a transcription factor comes of age // Nat. Rev. Immunol. 2010. Vol. 10. №9. P. 645–656.

305. Shou J., Jing J., Xie J., You L., Jing Z., Yao J., Han W., Pan H. Nuclear factor of activated t cells in cancer development and treatment // Cancer Lett. 2015. Vol. 361. № 2. P. 174–184.

306. Sun Y., Sheshadri N., Zong W.-X. SerpinB3 and B4: from biochemistry to biology. Semin // Cell Dev. Biol. 2017. Vol. 62. P. 170–177.

307. Scambia G., Panici P.B., Baiocchi G., Amoroso M., Foti E., Greggi S., Mancuso S. The value of squamous cell carcinoma antigen in patients with locally advanced cervical cancer undergoing neoadjuvant chemotherapy // Am. J. Obstet. Gynecol. 1991. Vol. 164. №2. P. 631–636.

308. Ngan H.Y., Chan S.Y., Wong L.C., Choy D.T., Ma H.K. Serum squamous cell carcinoma antigen in the monitoring of radiotherapy treatment response in carcinoma of the cervix // Gynecol. Oncol. 1990. Vol. 37. №2. P. 260–263.

309. Cataltepe S., Gornstein E.R., Schick C., Kamachi Y., Chatson K., Fries J., Silverman G.A., Upton M.P. Co-Expression of the squamous cell carcinoma antigens 1 and 2 in normal adult human tissues and squamous cell carcinomas // J. Histochem. Cytochem. Off. J. Histochem. Soc. 2000. Vol. 48. № 1. P. 113–122.

310. Mino-Miyagawa N., Kimura Y., Hamamoto K. Tumor-Antigen 4. Its Immunohistochemical distribution and tissue and serum concentrations in squamous cell carcinoma of the lung and esophagus // Cancer. 1990. Vol. 66. № 7. P. 1505–1512.

311. Kato H. Expression and function of squamous cell carcinoma antigen // Anticancer Res. 1996. Vol. 16. № 4B. P. 2149–2153.

312. Ivanov Y.D., Pleshakova T.O., Kozlov A.F., Malsagova K.A., Krohin N.V., Shumyantseva V.V., Shumov I.D., Popov V.P., Naumova O.V., Fomin B.I., Nasimov D.A., Aseev A.L., Archakov A.I. SOI nanowire for the high-sensitive detection of HBsAg and α-fetoprotein // Lab. Chip. 2012. Vol. 12. № 23. P. 5104–5111.

313. 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 // Anal. Methods. 2018. Vol. 10. № 23. P. 2740–2749.

314. 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 // Biosens. Bioelectron. 2013. Vol. 43. № 1. P. 384–390.

315 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 Brief. 2019. Vol. 25, № 104240. P. 1–6.

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

317. Kaysheva A.L., Ivanov Y.D., Frantsuzov P.A., Krohin N.V., Pavlova T.I., Uchaikin V.F., Konev V.A., Kovalev O.B., Ziborov V.S., Archakov A.I. Mass Spectrometric detection of the amino acid sequence polymorphism of the hepatitis C virus antigen // J. Virol. Methods. 2016. Vol. 229. P. 86–90.

318. Yan B.S., Tam M.H., Syu W.J. Self-association of the c-terminal domain of the hepatitis-C virus core protein // Eur. J. Biochem. 1998. Vol. 258. № 1. P. 100–106.

319. Hicks S.D., Middleton F.A. A Comparative Review of MicroRNA Expression patterns in autism spectrum disorder // Front. Psychiatry. 2016. Vol. 7. № 176. P. 1–10.

320. Abu-Elneel K., Liu T., Gazzaniga F.S., Nishimura Y., Wall D.P., Geschwind D.H., Lao K., Kosik K.S. Heterogeneous dysregulation of microrнas across the autism spectrum // Neurogenetics. 2008. Vol. 9. № 3. P. 153–161.

321. Zhi F., Shao N., Wang R., Deng D., Xue L., Wang Q., Zhang Y., Shi Y., Xia X., Wang S., Lan Q., Yang Y. Identification of 9 serum microRNAs as potential noninvasive biomarkers of human astrocytoma // Neuro-Oncol. 2015. Vol. 17. № 3. P. 383–391.

322. Mundalil Vasu M., Anitha A., Thanseem I., Suzuki K., Yamada K., Takahashi T., Wakuda T., Iwata K., Tsujii M., Sugiyama T., Mori N. Serum microRNA profiles in children with autism // Mol. Autism. 2014. Vol. 5. № 40. P. 1–9.

323. Mor M., Nardone S., Sams D.S., Elliott E. Hypomethylation of MiR-142 promoter and upregulation of microRNAs That target the oxytocin receptor gene in the autism prefrontal cortex // Mol. Autism. 2015. Vol. 6. № 46. P. 1–11.

324. Huang F., Long Z., Chen Z., Li J., Hu Z., Qiu R., Zhuang W., Tang B., Xia K., Jiang H. Investigation of gene regulatory networks associated with autism spectrum disorder based on miRNA expression in China // Plos One. 2015. Vol. 10. № 6. P.1–14.

325. Jyonouchi H., Geng L., Streck D.L., Dermody J.J., Toruner G.A. MicroRNA expression changes in association with changes in interleukin-1ß/interleukin10 ratios produced by monocytes in autism spectrum disorders: their association with neuropsychiatric symptoms and comorbid conditions (Observational Study) // J. Neuroinflammation. 2017. Vol. 14. № 229. P. 1–14.

326. Yılmaz Ş.G., Erdal M.E., Özge A.A., Sungur M.A. Can peripheral microRNA expression data serve as epigenomic (upstream) biomarkers of Alzheimer's Disease? // Omics J. Integr. Biol. 2016. Vol. 20. № 8. P. 456–461.

327. 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. Mol. Basel Switz. 2021. Vol. 26. № 5979. P. 1–19.

328. Karve T., Cheema A. Small Changes Huge Impact: The role of protein posttranslational modifications in cellular homeostasis and disease // J. Amino Acids. 2011. Vol. 2011. № 207691. P. 1–13.

329. Rudnev V.R., Kulikova L.I., Nikolsky K.S., Malsagova K.A., Kopylov A.T., Kaysheva A.L. Current approaches in supersecondary structures investigation // Int. J. Mol. Sci. 2021. Vol. 22. № 11879. P. 1–23.

330. Tikhonov D., Kulikova L., Rudnev V., Kopylov A.T., Taldaev A., Stepanov A., Malsagova K., Izotov A., Enikeev D., Potoldykova N., Kaysheva A. Changes in

protein structural motifs upon post-translational modification in kidney cancer // Diagnostics. 2021. Vol. 11. № 1836. P. 1–16.

331. Кушлинский Н.Е., Гуляева Л.Ф., Огнерубова Н.А., Стилиди И.С. и соавт. Рак яичников: фундаментальные и клинические исследования: монография. М.: Проспект, 2021. 747 с.

332. Paine M.J.I., Scrutton N.S., Munro A.W., Gutierrez A., Roberts G.C.K., Wolf C.R. Electron transfer partners of cytochrome p450. in cytochrome p450: structure, mechanism, and biochemistry: Boston, MA, 2005. 148 p.

333. Hamdane D., Zhang H., Hollenberg P. Oxygen activation by cytochrome P450 monooxygenase // Photosynth. Res. 2008. Vol. 98. № 1–3. P. 657–666.

334. Hannemann F., Bichet A., Ewen K.M., Bernhardt R. Cytochrome P450 systems-biological variations of electron transport chains // Biochim. Biophys Acta. 2007. Vol. 1770. № 3. P. 330–344.

335. Harford-Cross C.F., Carmichael A.B., Allan F.K., England P.A., Rouch D.A., Wong L.L. Protein engineering of cytochrome p450(cam) (cyp101) for the oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons // Protein Eng. 2000. Vol. 13. № 2. P. 121–128.

336. Su H., Wang B., Shaik S. Quantum-mechanical/molecular-mechanical studies of CYP11A1-catalyzed biosynthesis of pregnenolone from cholesterol reveal a C–C bond cleavage reaction that occurs by a compound I-mediated electron transfer // J. Am. Chem. Soc. 2019. Vol. 141. № 51. P. 20079–20088.

337. Ivanov Y.D., Ivanov A.K., Kaysheva A.L., Zgoda K.G., Hui-Bon-Hoa G., Usanov S.A., Archakov A.I. Productive and non-productive complexes in cytochrome P450-containing system // Biomeditsinskaya Khimiya. 2009. Vol. 55. № 3. P. 310–330.

338. Warman A.J., Roitel O., Neeli R., Girvan H.M., Seward H.E., Murray S.A., McLean K.J., Joyce M.G., Toogood H., Holt R.A., Leys D., Scrutton N.S., Munro A.W. Flavocytochrome P450 BM3: an update on structure and mechanism of a biotechnologically important enzyme // Biochem. Soc. Trans. 2005. Vol. 33. P. 747–753.

339. Boddupalli S.S., Pramanik B.C., Slaughter C.A., Estabrook R.W., Peterson J.A. Fatty acid monooxygenation by P450BM-3: product identification and proposed

mechanisms for the sequential hydroxylation reactions // Arch. Biochem. Biophys. 1992. Vol. 292. № 1. P. 20–28.

340. Zhang H., Yokom A.L., Cheng S., Su M., Hollenberg P.F., Southworth D.R., Osawa Y. The Full-Length Cytochrome P450 enzyme CYP102A1 dimerizes at its reductase domains and has flexible heme domains for efficient catalysis // J. Biol. Chem. 2018. Vol. 293. № 20. P. 7727–7736.

341. Narhi L.O., Fulco A.J. Characterization of a catalytically self-sufficient 119,000-dalton cytochrome P-450 monooxygenase induced by barbiturates in Bacillus Megaterium // J. Biol. Chem. 1986. Vol. 261. № 16. P. 7160–7169.

БЛАГОДАРНОСТИ

Автор выражает глубокую благодарность заведующему лаборатории нанобиотехнологии ИБМХ, профессору, доктору биологических наук Иванову Юрию Дмитриевичу за предоставление возможности выполнения работы и научное наставничество.

Автор выражает искреннюю признательность научному руководителю ИБМХ академику РАН Александру Ивановичу Арчакову за определение области исследования и внимание к работе. Глубокая благодарность академику РАН Лисице Андрею Валерьевичу за участие в обсуждении полученных результатов и способов их представления.

Автор выражает искреннюю благодарность профессору РАН, доктору биологических наук Згоде Виктору Гавриловичу и кандидату биологических наук Копылову Артуру Тиграновичу за сотрудничество при проведении исследований с использованием масс-спектрометрического детектора типа тройной квадруполь, за помощь в регистрации масс-спектров и анализе полученных данных.

Коллективу лаборатории нанобиотехнологии ИБМХ за научное сотрудничество и поддержку на всем периоде выполнения исследований в рамках диссертационной работы с 2010 по 2021 годы, за подготовку и предоставление функционализированных поверхностей чипов для нанотехнологических устройств.

Хочу поблагодарить научный коллектив ИБМХ за обсуждение работы в рамках научных семинаров и внимание к работе.

Особую благодарность и искреннюю признательность выражаю своим научным консультантам доктору биологических наук Пономаренко Елене Александровне и доктору биологических наук Плешаковой Татьяне Олеговне за ценные советы при планировании исследований, помощь в анализе полученных результатов, за поддержку и внимание к работе.