

ИССЛЕДОВАНИЕ МЕЖМОЛЕКУЛЯРНЫХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ С ПОМОЩЬЮ ОПТИЧЕСКИХ БИОСЕНСОРОВ, РАБОТАЮЩИХ НА ЭФФЕКТЕ ПОВЕРХНОСТНОГО ПЛАЗМОННОГО РЕЗОНАНСА

УДК 621.383:53.082.9
Поступила 24.09.2012 г.



А.С. Иванов, д.б.н., профессор, зав. лабораторией межмолекулярных взаимодействий

Научно-исследовательский институт биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича РАМН,
Москва, 119121, ул. Погодинская, 10

Приведены современные сведения о технологии оптических биосенсоров, основанной на эффекте поверхностного плазмонного резонанса (SPR). SPR позволяет регистрировать практически любые межмолекулярные взаимодействия в реальном масштабе времени без использования каких-либо меток или сопряженных процессов. Рассмотрены основные технические характеристики SPR-биосенсоров и принципы определения кинетических, равновесных и термодинамических параметров межмолекулярных взаимодействий.

Приведен ряд примеров использования биосенсоров типа Biacore (GE Healthcare, США) в постгеномных исследованиях, выполненных в Институте биомедицинской химии (Москва, Россия): SPR-технология применялась при анализе межмолекулярных взаимодействий типа «белок–белок», «белок–низкомолекулярное соединение» и «белок–ДНК»; при анализе олигомеризации белков и поиске ингибиторов димеризации; при поиске прототипов лекарственных соединений, взаимодействующих с целевым белком-мишенью; при биосенсорном анализе биомаркеров заболеваний.

Технология оптических биосенсоров, работающих на эффекте поверхностного плазмонного резонанса, становится одним из основных подходов при исследовании разнообразных межмолекулярных взаимодействий. Она носит универсальный характер и позволяет регистрировать взаимодействия между практически любыми молекулярными объектами в широком диапазоне концентраций. SPR-биосенсоры имеют очень высокую точность, воспроизводимость и чувствительность, что и обуславливает их все нарастающее применение как в фундаментальных, так и в прикладных исследованиях.

Ключевые слова: оптический биосенсор; поверхностный плазмонный резонанс; межмолекулярные взаимодействия.

English

The Study of Intermolecular Interactions Using Optical Biosensors Operating on the Effect of Surface Plasmon Resonance

A.S. Ivanov, D.Bio.Sc., Professor, Head of the Laboratory of Intermolecular Interactions

Institute of Biomedical Chemistry of the Russian Academy of Medical Sciences, Pogodinskaya St., 10, Moscow,
Russian Federation, 119121

Present knowledge of the technology of optical biosensors based on the effect of surface plasmon resonance (SPR) is presented. SPR enables to register almost all molecular interactions in real time without any labels or associated processes. There are considered the main technical characteristics of SPR biosensors and the principles of analysis of kinetic, equilibrium and thermodynamic parameters of intermolecular interactions.

There are presented a number of examples of Biacore biosensors (GE Healthcare, USA) application in post-genomic researches carried out in the Institute of Biomedical Chemistry (Moscow, Russia): SPR technology has been used in the analysis of intermolecular interactions, like protein-protein, protein-low-molecular-weight compounds, protein-DNA; in the analysis of protein oligomerization and the search of dimerization inhibitors; in the search of drug prototype compounds interacting with a target protein; and in biosensor analysis of disease biomarkers.

The technology of optical biosensors operating on the effect of surface plasmon resonance is getting one of the approaches in researching various intermolecular interactions. It is of universal character and enables to record the interactions between almost any molecular objects in a wide range of concentrations. SPR-biosensors have very high accuracy, capability of reproducing and sensitivity; due to these characteristics their application is growing both in fundamental and applied researches.

Key words: optical biosensor; surface plasmon resonance; intermolecular interactions.

Для контактов: Иванов Алексей Сергеевич, тел. раб. 8(499)246-36-93; e-mail: alexei.ivanov@ibmc.msk.ru

Технология оптического биосенсора, которая основана на использовании эффекта поверхностного плазмонного резонанса (surface plasmon resonance, SPR), позволяет осуществлять прямую регистрацию практически любых межмолекулярных взаимодействий в реальном масштабе времени без использования каких-либо меток или сопряженных процессов [1–2].

Эффект SPR как физическое явление был открыт в 60-х гг. XX в и относится к области современной квантовой нанооптики [3-4]. Он наблюдается на границе раздела фаз при полном внутреннем отражении падающего луча света (рис. 1, а). Фотоны не пересекают преломляющую поверхность, но их электрическое поле выходит за границу раздела фаз примерно на $1/4$ длины волны света. Если отражающая поверхность покрыта тонким слоем золота, то при определенных условиях (резонанс) фотоны могут взаимодействовать со свободными электронами в металле и превращаться в плазмоны и свет в этом случае не отражается (рис. 1, б).

Поверхностный плазмон — это квантованная коллективная осцилляция электронов у поверхности материала, выражающаяся в возникновении флуктуаций плотности заряда. Электрическое (эванесцентное) поле плазмонов выходит за слой золота и взаимодействует с материалом двух фаз (рис. 1, в). Подвижность плазмонов, а следовательно, и величина резонансного угла, зависят от этих взаимодействий. Если одна фаза представляет собой стеклянную призму (нижняя фаза на рис. 1), а другая — жидкость (верхняя фаза на рис. 1), то величина резонансного угла будет пропорциональна коэффициенту преломления в тонком слое жидкой среды (~300 нм). Путем

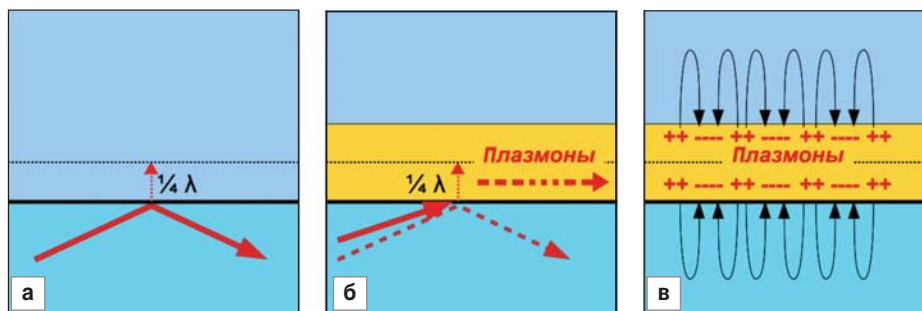


Рис. 1. Эффект поверхностного плазмонного резонанса (SPR): а — эффект полного внутреннего отражения света на границе раздела фаз; б — возникновение плазмонов при резонансе между квантами света и свободными электронами в металле; в — электростатическое (эванесцентное) поле плазмонов

слежения за изменением резонансного угла можно регистрировать массо-перенос любых веществ между свободной средой и этим слоем.

Принцип работы оптического биосенсора на эффекте SPR

Принцип работы SPR-биосенсора [5–7] довольно прост (рис. 2). На золотой поверхности оптического чипа, являющейся границей раздела фаз, закрепляется первый партнер межмолекулярного взаимодействия, и биосенсор регистрирует массо-перенос второго партнера между средой и зоной измерения (в обе стороны). В биосенсорной технологии используется химическая терминология, когда любой прикрепленный к носителю объект называется лигандом, а взаимодействующий с ним свободно плавающий объект называется аналитом. В качестве лиганда и аналита могут быть использованы любые молекулярные объекты — от низкомолекулярных веществ до биополимеров и даже более крупные объекты типа вирусов, бактерий и клеток.

Кривая записи сигнала биосенсора в зависимости от времени называется сенсограммой. На рис. 2, в показаны основные этапы классической сенсограммы: I — запись базового сигнала биосенсора до начала из-

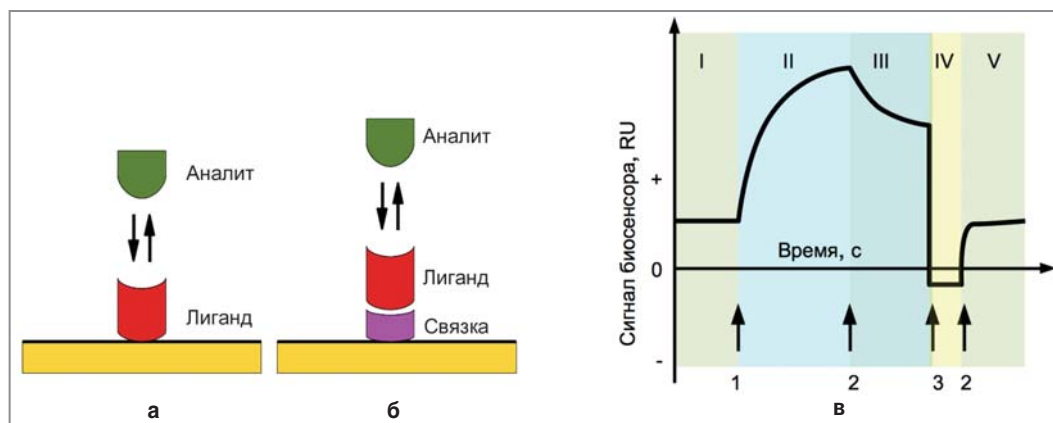


Рис. 2. Принцип работы оптического биосенсора: регистрация массо-переноса аналита при взаимодействии с лигандом, иммобилизованным непосредственно на поверхности оптического чипа (а) или через дополнительную связку (б); в — структура типичной сенсограммы

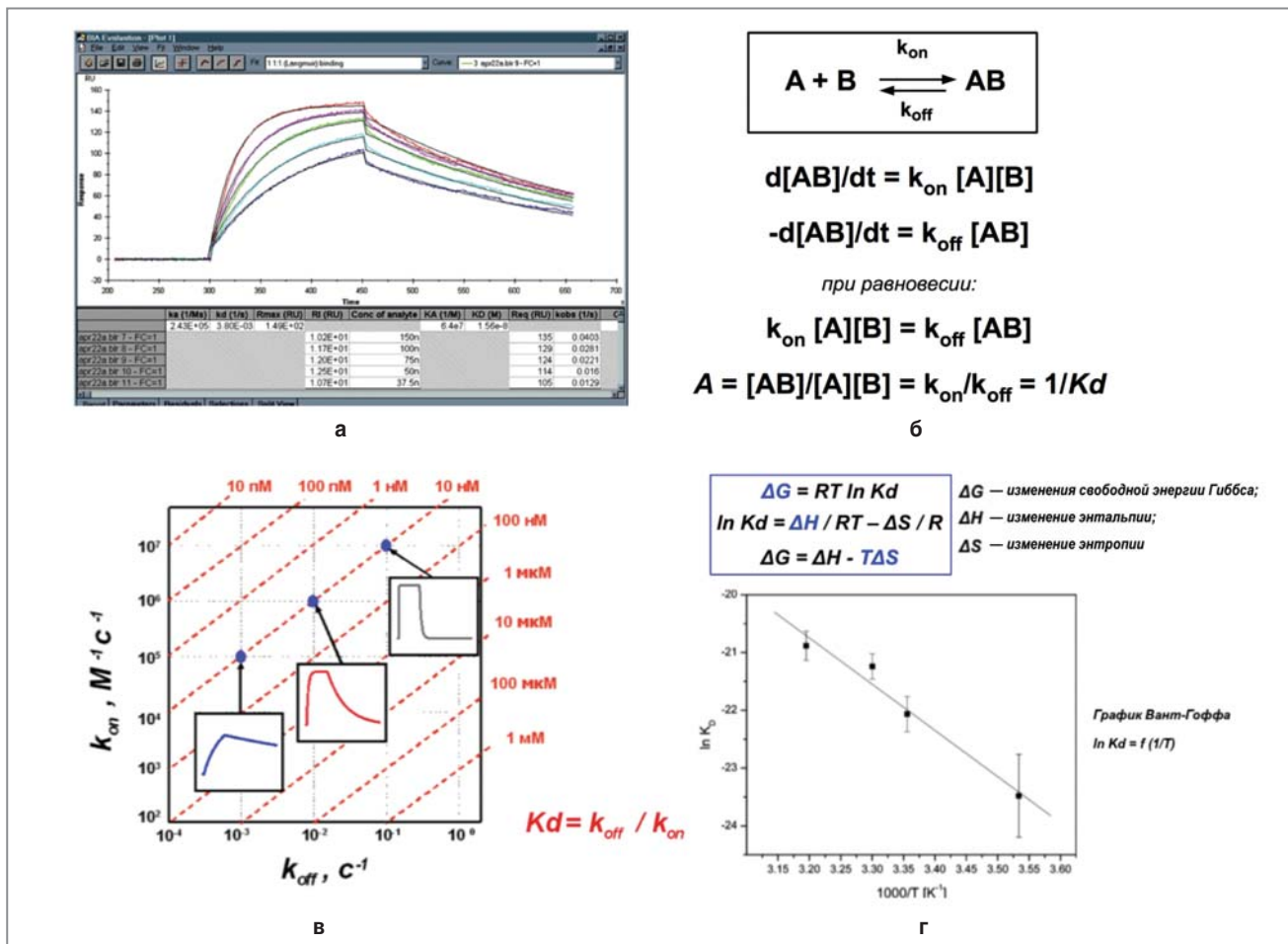


Рис. 3. Принципы расчета параметров межмолекулярных взаимодействий: а — серия сенсограмм, полученная при инъекции разных концентраций аналита; б — расчет параметров взаимодействия на основе уравнения реакции комплексообразования псевдопервого порядка; в — карта скоростей образования и распада комплексов; г — расчет термодинамических параметров; А — аффинность; [А], [В] — концентрация веществ А и В

мерения; II — кинетика образования комплексов «лиганд–аналит» при инъекции раствора аналита через измерительный канал (1); III — кинетика распада комплексов после окончания инъекции аналита и перехода на рабочий буфер (2); IV — быстрое разрушение комплексов и очистка поверхности чипа при инъекции регенерирующего раствора (3); V — запись базового сигнала биосенсора после цикла измерения по окончании инъекции регенерирующего раствора и переходе на рабочий буфер (2).

Путем математического анализа серии сенсограмм (рис. 3, а), полученных при разных концентрациях аналита, вычисляют равновесные характеристики межмолекулярных взаимодействий — константу диссоциации комплекса Kd и аффинность А, а также кинетические параметры — константы скоростей образования k_{on} и распада комплексов k_{off} (рис. 3, б).

Необходимо отметить, что по виду сенсограммы крайне трудно судить о прочности образующегося комплекса, так как это зависит от соотношения констант скоростей образования и распада комплексов, а не от их абсолютных значений. Это наглядно видно из карты скоростей, приведенной на рис. 3, в. Точки,

находящиеся на одной диагонали, соответствуют реакциям с равным значением Kd, в то время как абсолютные значения скоростей образования и распада комплексов и формы сенсограмм сильно отличаются, что обусловлено особенностями взаимодействующих молекул.

Из серий сенсограмм, полученных при разных температурах, могут быть вычислены термодинамические характеристики — изменение свободной энергии Гиббса (ΔG), изменение энтальпии (ΔH) и энтропии (ΔS) (рис. 3, г).

Принципы иммобилизации лигандов на поверхности оптических чипов

Методы иммобилизации лигандов на поверхности оптических чипов мало чем отличаются от аналогичных, применяемых для иммобилизации лигандов на других носителях (например, хроматографические сорбенты, твердые поверхности, нано- и микрочастицы) [7–8].

Принцип стандартной ковалентной иммобилизации лиганда показан на рис. 4, а. Для этого используется

так называемая карбодимидная реакция и стандартные оптические чипы, покрытые слоем карбоксилированного декстрана. Первоначально карбоксильные группы декстрана активируются с помощью смеси этилкарбодимид+гидроксисукцинимид (EDC+NHS) с образованием коротко живущих эфирных групп, которые далее реагируют с аминогруппами лиганда с образованием амидной связи. В случае белков-лигандов реакционно способными могут быть аминогруппы лизина и N-концевая аминогруппа, расположенные на поверхности белковой глобулы.

В ряде случаев используются модификации данной реакции с иммобилизацией лигандов за тиольные и альдегидные группы.

Методы нековалентной иммобилизации лигандов более разнообразны, однако все они базируются практически на одном принципе: на поверхности оптического чипа ковалентно закрепляется специфический аффинный реагент, на который нековалентно иммобилизуется лиганд (рис. 4, б). В качестве такой аффинной связки могут выступать специфические моно- или поликлональные антитела, стрептавидин (иммобилизация биотинилированных лигандов, Kd-комплекса $\sim 10^{-14}$ M). В ряде случаев используются более сложные связки, например ковалентно иммобилизованный белок А аффинно связывает специфическое антитело, на которое аффинно иммобилизуется белок-лиганд. Довольно популярен метод иммобилизации белков-лигандов, содержащих так называемый гистаг (метку в виде последовательности из 6 гистидинов, 6xHis). Данные белки иммобилизуются на оптическом чипе, поверхность которого модифицирована ионообменным соединением NTA (нитрилотриацетат), за счет образования трех хелатных комплексов, состоящих из двух остатков гистидина, одного иона никеля (Ni^{2+}) и одной молекулы NTA (рис. 4, в).

В отдельную группу можно выделить метод иммобилизации лигандов на немодифицированной поверхности золота [8] (рис. 4, г) за счет трех различных процессов: 1) формирования ковалентной связи между золотом и тиогруппами лиганда; 2) прочной адсорбции лиганда на поверхности золота; 3) электростатических взаимодействий.

Также отдельную группу представляют методы иммобилизации липидных монослоев (рис. 4, д), липидных мицелл, липосом и плоских бислоев (рис. 4, е) на оптическом чипе с гидрофобными ацильными «якорями» [7].

SPR-биосенсоры

Производители серийного научного оборудования предлагают на рынке более десятка SPR-биосенсоров, имеющих оригинальные конструктивные решения и различные функциональные характеристики. Наиболее известны биосенсоры от фирм GE Healthcare (США), Reichert Technologies (США), SensiQ (США), Bio-Rad (США), Horiba (Япония), BioNavis (Финляндия), Analytik Jena (Германия), MissionCouver Technologies (Китай), IBIS Technologies (Голландия),

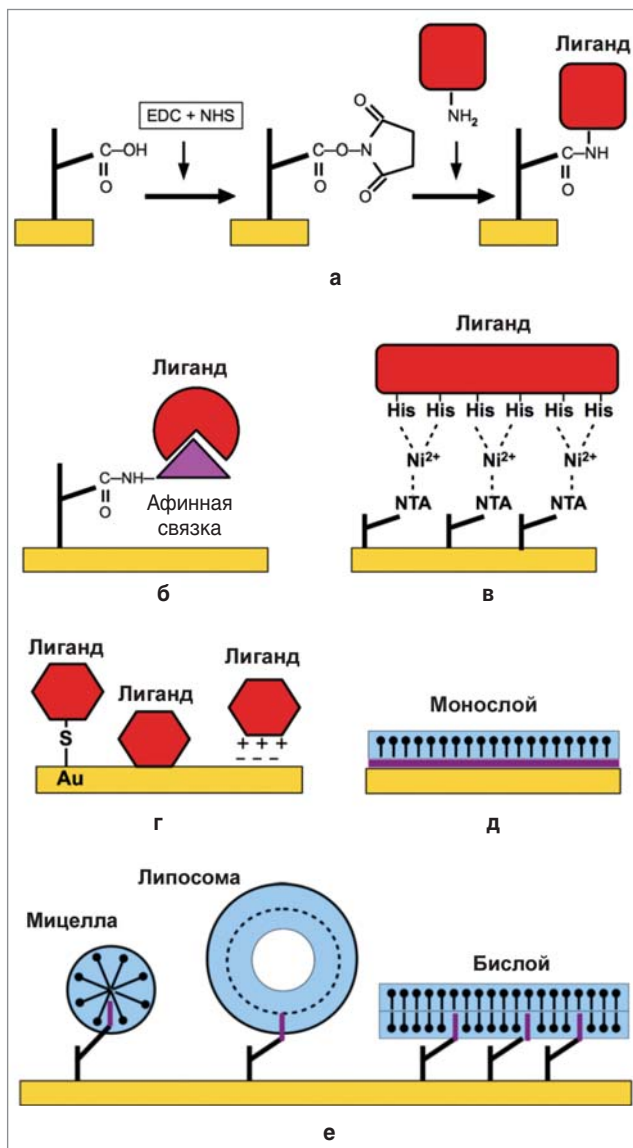


Рис. 4. Принципы иммобилизации лигандов на поверхности оптических чипов: а — ковалентная иммобилизация лиганда с образованием амидной связи между карбоксильной группой модифицированного декстрана и аминогруппой лиганда; б — нековалентная иммобилизация лигандов через аффинную связку; в — хелатная иммобилизация белка-лиганда с меткой 6xHis; г — ковалентная и нековалентная иммобилизация лигандов на поверхности золота; д — формирование липидных монослоев на поверхности чипа с гидрофобным покрытием; е — формирование липидных структур, моделирующих строение биологических мембран (мицелл, липосом и плоских бислоев)

GWC Technologies (США) и ряда других. Однако анализ научной литературы показывает, что подавляющее большинство биосенсорных исследований выполняется с использованием оптических биосенсоров типа Biacore (GE Healthcare), что обусловлено двумя причинами: 1) SPR-биосенсоры Biacore, оснащенные микрожидкостной проточной системой, были первыми серийными приборами данного типа и за последнее десятилетие получили наибольшее

распространение в различных научных и производственных сферах; 2) по ряду крайне важных функциональных параметров биосенсоры Biacore имеют наилучшие показатели. К таковым следует отнести: высокую чувствительность (порядка 10^{-11} М аналита); минимальный уровень шума (менее 0,01 RU, где RU — referens unit — резонансная единица); высокую стабильность базового сигнала (дрейф менее 1 RU/ч); регистрацию низкомолекулярного аналита практически без ограничения по минимальной молекулярной массе (менее 50 Да); экономный расход биоматериала (для иммобилизации достаточно 100 нг белка, объем проточных кювет — от 20 до 60 нл); наличие коммутируемой микрожидкостной системы с проточными нанокюветами, что обуславливает гибкость измерительных протоколов.

Практическое использование SPR-технологии

SPR-технология с успехом используется в разнообразных биомедицинских исследованиях:

1) при анализе в реальном масштабе времени взаимодействий различных молекулярных и надмолекулярных объектов (от низкомолекулярных соединений и

биополимеров до мицелл, липосом, вирусов, бактерий, клеток и внутриклеточных частиц);

2) при анализе аффинности, специфичности и термодинамики образования молекулярных комплексов;

3) при количественном анализе широкого круга биологически активных соединений, органических веществ и биомаркеров заболеваний;

4) при анализе различных характеристик антител и контроле качества препаратов антител;

5) в скрининге и тестировании прототипов лекарственных веществ на взаимодействие с целевым белком-мишенью;

6) при анализе активности и ингибирования ферментов;

7) в молекулярном фишинге («рыбалке») — прямом аффинном связывании целевых молекул из сложных биологических смесей на поверхности оптического чипа с последующей их элюцией для идентификации методами тандемной масс-спектрометрии LC-MS/MS.

Разнообразие применения SPR-биосенсоров может быть продемонстрировано на примерах исследований, выполненных в разное время в Институте биомедицинской химии РАН [9-21].

1. *Взаимодействие ингибитора трипсина из мор-*

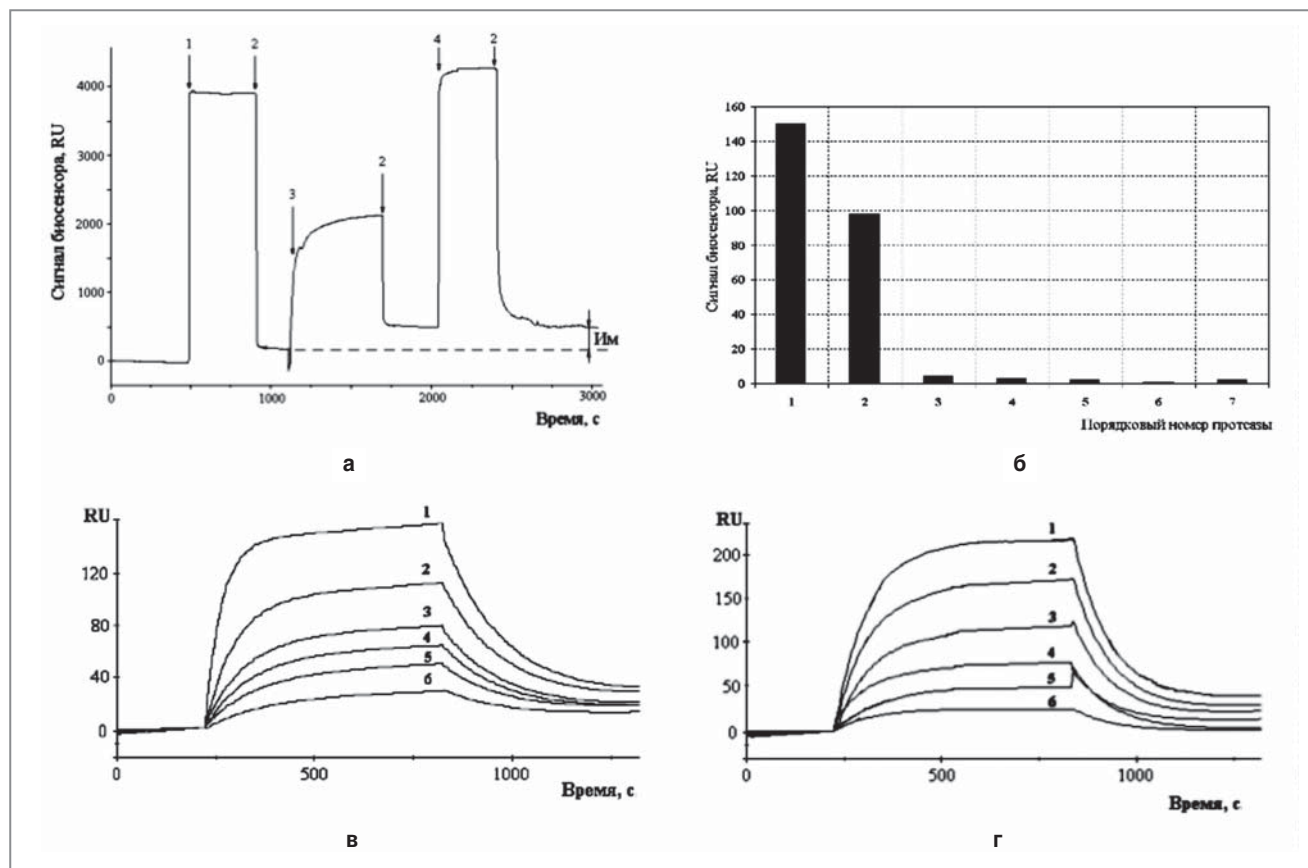


Рис. 5. Взаимодействие ингибитора InhVJ с различными протеиназами: а — типичная сенсограмма ковалентной иммобилизации InhVJ на оптическом чипе CM5 (1 — смесь EDC-NHS; 2 — HBS-буфер; 3 — раствор InhVJ; 4 — раствор этаноламина; Им — количество иммобилизованного белка); б — взаимодействие протеолитических ферментов (200 нМ) с иммобилизованным ингибитором InhVJ (1 — трипсин; 2 — α -химотрипсин; 3 — калликреин; 4 — плазмин; 5 — тромбин; 6 — папаин; 7 — пепсин); в, г — сенсограммы взаимодействия трипсина и химотрипсина с иммобилизованным InhVJim в диапазоне концентрации (1–6) от 10 до 200 нМ

ской актинии *Radianthus macrodactylus* с различными протеазами [9]. Изучали взаимодействия ингибитора InhVJ, выделенного из морской актинии *Radianthus macrodactylus*, с сериновыми (трипсин, α -химотрипсин, плазмин, тромбин, калликреин), цистеиновой (папаин) и аспарагиновой (пепсин) протеиназами на оптическом биосенсоре Biacore 3000. Работа выполнена на стандартных оптических чипах типа CM5. На рис. 5, а показана типичная сенсограмма иммобилизации InhVJ. Обнаружено, что InhVJ взаимодействует только с трипсином и α -химотрипсином (рис. 5, б).

Для определения кинетических и термодинамических параметров реакции комплексообразования выполнен анализ серий сенсограмм взаимодействий трипсина и химотрипсина с InhVJ (рис. 5, в, г).

Значение Kd для пары InhVJ–трипсин составило $7 \cdot 10^{-8}$ М и для пары InhVJ– α -химотрипсин — $1 \cdot 10^{-7}$ М.

2. Поиск и анализ взаимодействия ингибиторов димеризации с мономером протеазы ВИЧ-1 [10–12]. Разработан подход к проведению скрининга потенциальных ингибиторов димеризации протеазы ВИЧ-1, функционирующей только в виде гомодимеров. В данном подходе использована оригинальная биосенсорная тест-система, основанная на дифференциальном анализе взаимодействия тестируемого соединения с мономерами и димерами протеазы ВИЧ (рис. 6, а, б). Выполнен анализ наиболее перспективных веществ-кандидатов, предсказанных методами виртуального скрининга химических баз данных (рис. 6, в, г). В результате найден один новый ингибитор димеризации протеазы ВИЧ с рекордно малой молекулярной массой. Далее выполнен биосенсорный анализ термодинамических параметров взаимодействия пептидного и непептидного ингибиторов димеризации с мономерами протеазы ВИЧ (рис. 6, д). Установлено, что ведущую роль в образовании комплексов играет энтропийный фактор.

3. Молекулярное узнавание при олигомеризации бактериальных L-аспарагиназ [13, 14]. Субстратная специфичность и активность бактериальной L-аспарагиназы напрямую связаны с процессом олигомеризации, поскольку фермент активен только в виде тетрамера и активные центры расположены в зоне контакта субъединиц. С целью изучения процесса олигомеризации фермента L-аспарагиназа была иммобилизована на поверхности оптического чипа CM5 (рис. 7, а) и с помощью метода поверхностного плазмонного резонанса зарегистрированы процессы распада тетрамерных комплексов фермента до мономерного состояния и последующего их восстановления (рис. 7, б). Изучена специфичность молекулярного узнавания при олигомеризации ряда бактериальных L-аспарагиназ, обнаружена практически абсолютная специфичность молекулярного узнавания: устойчивые тетрамерные комплексы образуются только из субъединиц одного вида (рис. 7, в). На примере двух мутантных вариантов L-аспарагиназы *Helicobacter pylori* обнаружено, что специфичность молекулярного узнавания заметно снижается при наличии даже одной точечной мутации в зоне контакта субъединиц

высоко гомологичных близкородственных ферментов (рис. 7, в).

4. Анализ взаимодействия второй молекулы флавиномононуклеотида (FMN) с цитохром-P450-редуктазой (CPR) [15]. Для доказательства того, что связывание второй молекулы FMN с CPR не является артефактом кристаллизации, выполнен SPR-анализ этого взаимодействия. Получена серия сенсограмм (рис. 8, а) взаимодействия разных концентраций FMN с иммобилизованной на оптическом чипе CPR. Установлено, что данное взаимодействие происходит с достаточно высокой аффинностью ($K_d \sim 10^{-7}$ М) и носит выраженный селективный характер: при проверке серии производных FMN с CPR взаимодействовали только FMN и флавиноадениндинуклеотид (FAD) (рис. 8, б).

5. Взаимодействие ДНК-аптамерных конструкций с тромбином [16, 17]. На модели ДНК-аптамеров, селективно взаимодействующих с двумя экзосайтами тромбина, показано, что их объединение в гетеродимерные аптамерные конструкции с помощью поли-(dT)-линкера длиной от 35 до 55 нуклеотидов (рис. 9, а) приводит к усилению аффинности примерно в 30 раз (рис. 9, б). В результате достигнуто значение Kd порядка 10^{-10} М.

Анализ термодинамических параметров взаимодействия аптамеров с тромбином показал, что комплексообразование характеризуется отрицательными значениями как ΔH , так и $T\Delta S$ (рис. 9, в). В случае гетеродимерной конструкции $A1(35)A2$ вклад энтропийного компонента ($-T\Delta S$) в изменение свободной энергии ΔG при комплексообразовании увеличивается, в то время как вклад энтальпийного компонента (ΔH) практически не меняется.

6. Протеомный анализ и SPR-валидация изатин-связывающих белков у мышей и крыс [18, 19]. Изатин (индол-2,3-дион) является эндогенным индолом, который присутствует в мозге и других тканях млекопитающих. Его содержание изменяется при стрессе и тревоге. Изатин и его производные демонстрируют широкий спектр фармакологической активности. Выполнен протеомный анализ изатин-связывающих белков, выделенных из тканей мышей и крыс с помощью аффинного молекулярного фишинга. В результате идентифицировано более 60 индивидуальных белков. Способность некоторых из них взаимодействовать с изатином была валидирована в биосенсорных экспериментах с иммобилизованным 5-аминоизатином на поверхности оптического чипа (рис. 10, а). Установлено, что исследуемые белки действительно взаимодействуют с изатином с достаточно высокой аффинностью — значения Kd находятся в диапазоне 10^{-6} – 10^{-7} М.

Проведено также биосенсорное исследование взаимодействия рекомбинантных цитокератинов человека с аналогами изатина (5-аминоизатин и 5-аминокапролизатин), иммобилизованными на оптическом чипе CM5. Выявлено, что взаимодействие в обоих случаях происходит с довольно высоким сродством, например для пары СК8-5-аминокапролизатин $K_d=1,7 \cdot 10^{-6}$ М (рис. 10, б).

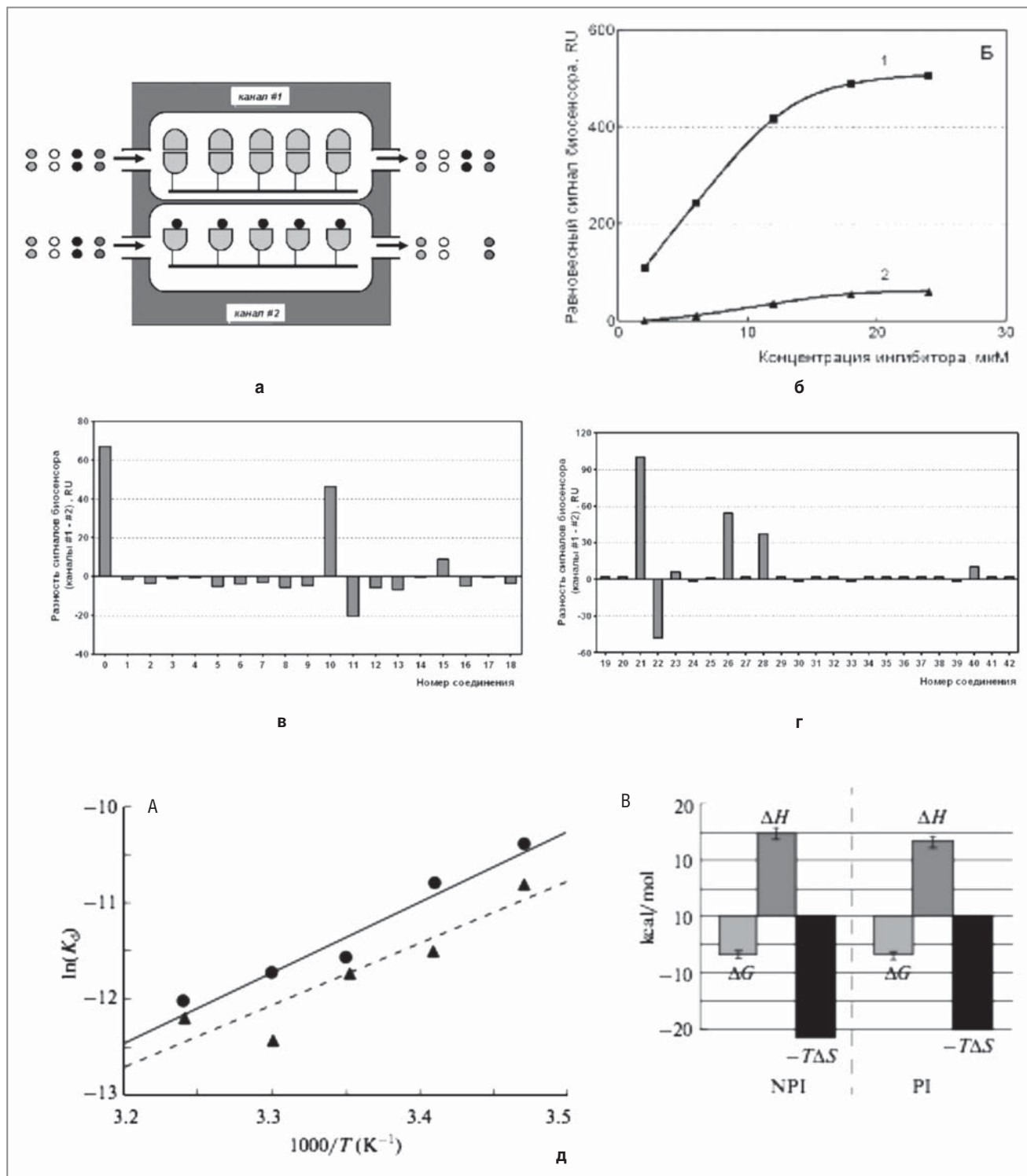


Рис. 6. Дифференциальная биосенсорная тест-система потенциальных ингибиторов димеризации протеазы ВИЧ: *а* — схема дифференциальной биосенсорной тест-системы анализа взаимодействия потенциальных ингибиторов димеризации с димерами и мономерами протеазы ВИЧ (в канале #1 иммобилизована и стабилизирована димерная форма протеазы, в канале #2 — мономерная форма протеазы; позитивным результатом считается связывание тестируемого соединения только с мономерами в канале #2); *б* — валидация дифференциальной биосенсорной тест-системы с помощью ингибитора Шрамма — известного пептидного ингибитора димеризации протеазы ВИЧ; *в, г* — результаты скрининга 42 потенциальных ингибиторов димеризации протеазы ВИЧ (0 — известный пептидный ингибитор Шрамма — позитивный контроль); *д* — анализ термодинамических параметров взаимодействия пептидного и непептидного ингибиторов димеризации с мономерами протеазы ВИЧ: *А* — графики Вант-Гоффа для определения термодинамических параметров взаимодействия пептидного (PI, пунктирная линия) и непептидного (NPI, сплошная линия) ингибиторов димеризации с мономером протеазы ВИЧ; *В* — сравнение термодинамических параметров взаимодействия PI и NPI с мономером протеазы ВИЧ

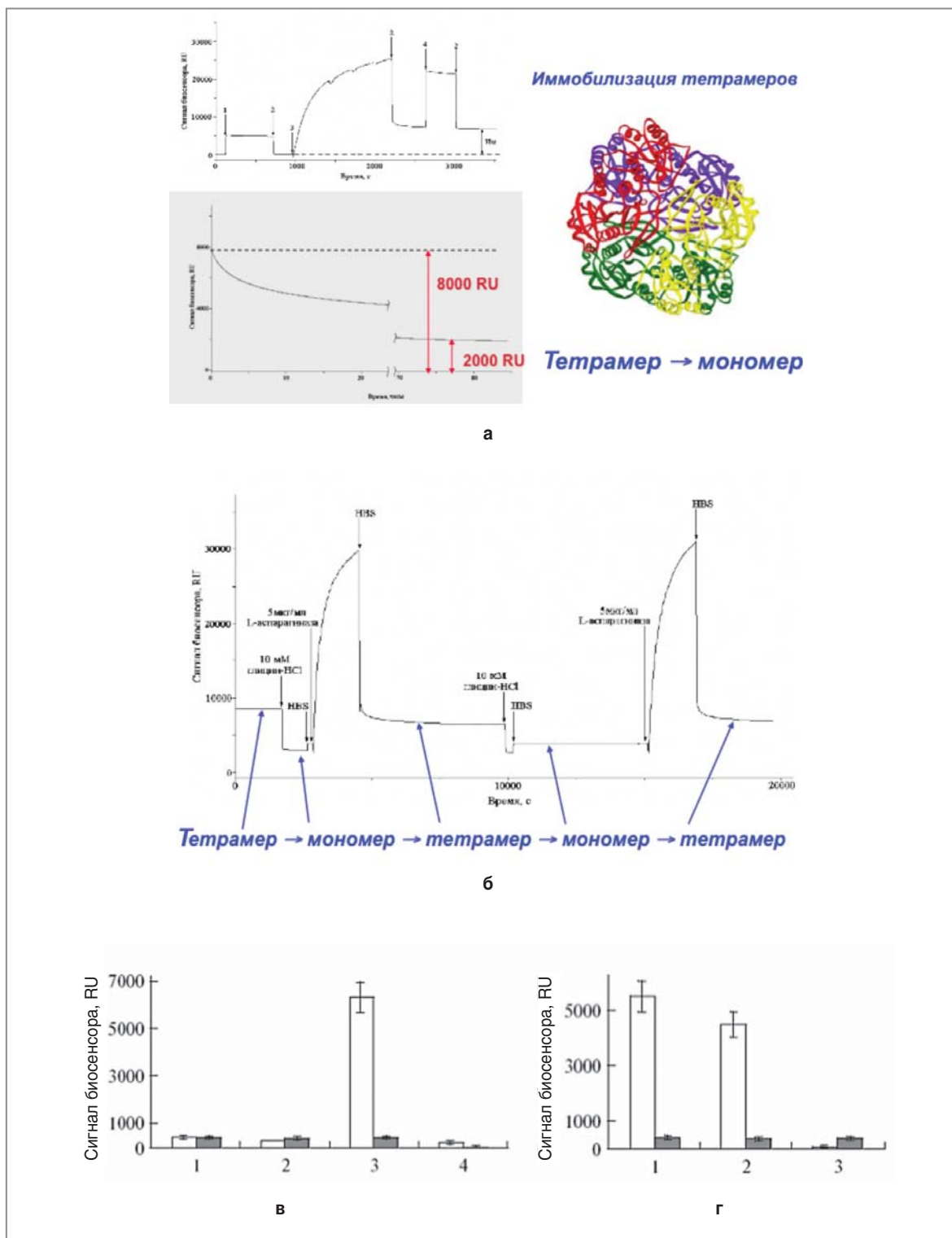


Рис. 7. Молекулярное узнавание при олигомеризации бактериальных L-аспарагиназ: *а* — структура тетрамера L-аспарагиназы, схема иммобилизации L-аспарагиназы *E. carotovora* на оптическом чипе CM5 и самопроизвольный распад тетрамеров белка при длительном пропускании рабочего буфера; обозначения инъекций: 1 — смесь EDC-NHS; 2 — HBS-буфер; 3 — L-аспарагиназа; 4 — этаноламин; Им — количество иммобилизованного белка; *б* — распад тетрамеров L-аспарагиназы при пропускании раствора глицин-HCl (pH=2,5) и последующее восстановление тетрамеров фермента при пропускании раствора L-аспарагиназы; *в* — олигомеризация L-аспарагиназ в канале оптического биосенсора с иммобилизованными мономерами L-аспарагиназы из *E. coli* (белый цвет) и в пустом канале (контроль, серый цвет); обозначения инъекций растворов аспарагиназ: 1 — *H. pylori* J99; 2 — *H. pylori* 26695; 3 — *E. coli*; 4 — *Erw. chrysanthemi*; *г* — олигомеризация L-аспарагиназ в канале оптического биосенсора с иммобилизованными мономерами L-аспарагиназы из *H. pylori* J99 (белый цвет) и в пустом канале (контроль, серый цвет); обозначения инъекций растворов аспарагиназ: 1 — *H. pylori* J99; 2 — *H. pylori* 26695; 3 — *E. coli*

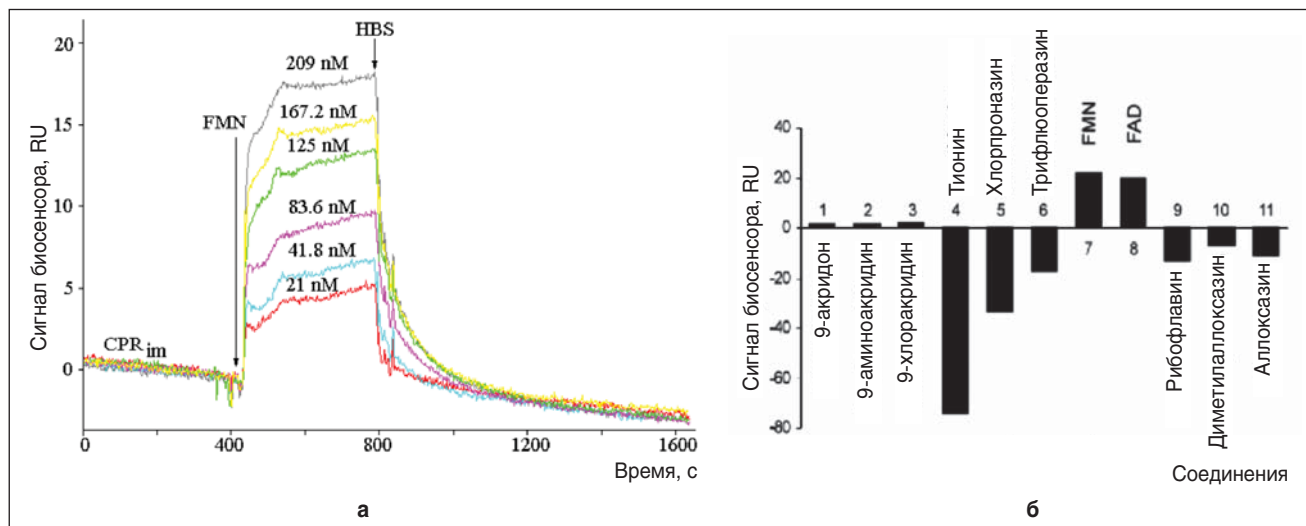


Рис. 8. Анализ взаимодействия FMN с CPR: а — набор сенсограмм взаимодействия при разных концентрациях FMN; б — SPR-анализ селективности взаимодействия

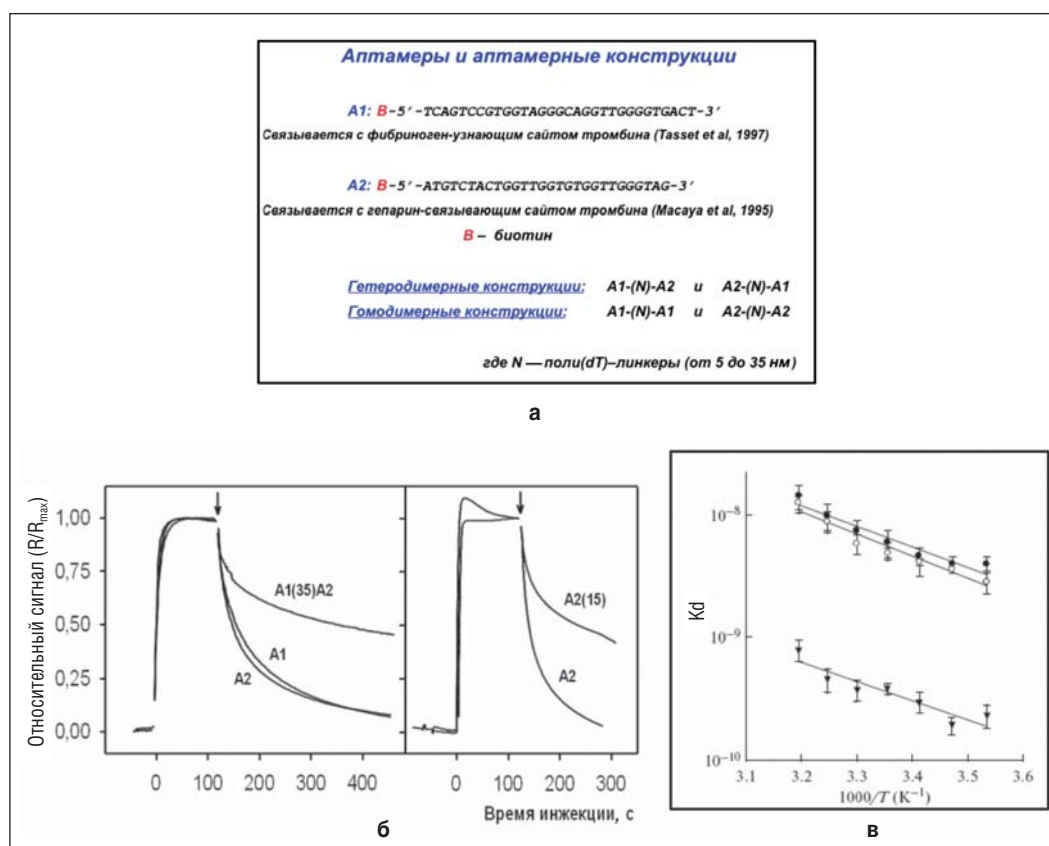


Рис. 9. Взаимодействие ДНК-аптамерных конструкций с целевым белком — тромбином: а — первичные структуры двух аптамеров к тромбину и их димерные конструкции; б — сенсограммы взаимодействия аптамеров и димерных конструкций с тромбином; в — графики Вант-Гоффа для определения термодинамических параметров взаимодействия аптамерных конструкций с тромбином

7. Усиление сигнала биосенсора с помощью золотых наночастиц при регистрации теломерных повторов [20]. На оптическом чипе, модифицированном стрептавидином, иммобилизован биотинилированный олигонуклеотид (сенс), комплементарно взаимодействующий с олигонуклеотидом, состоящим

из антисенса и нескольких теломерных повторов (рис. 11, а). Далее в канал биосенсора была инжектирована суспензия золотых наночастиц, модифицированных антисенсами к теломерным повторам. В результате достигнуто усиление сигнала биосенсора примерно в 600 раз по сравнению с регистрацией

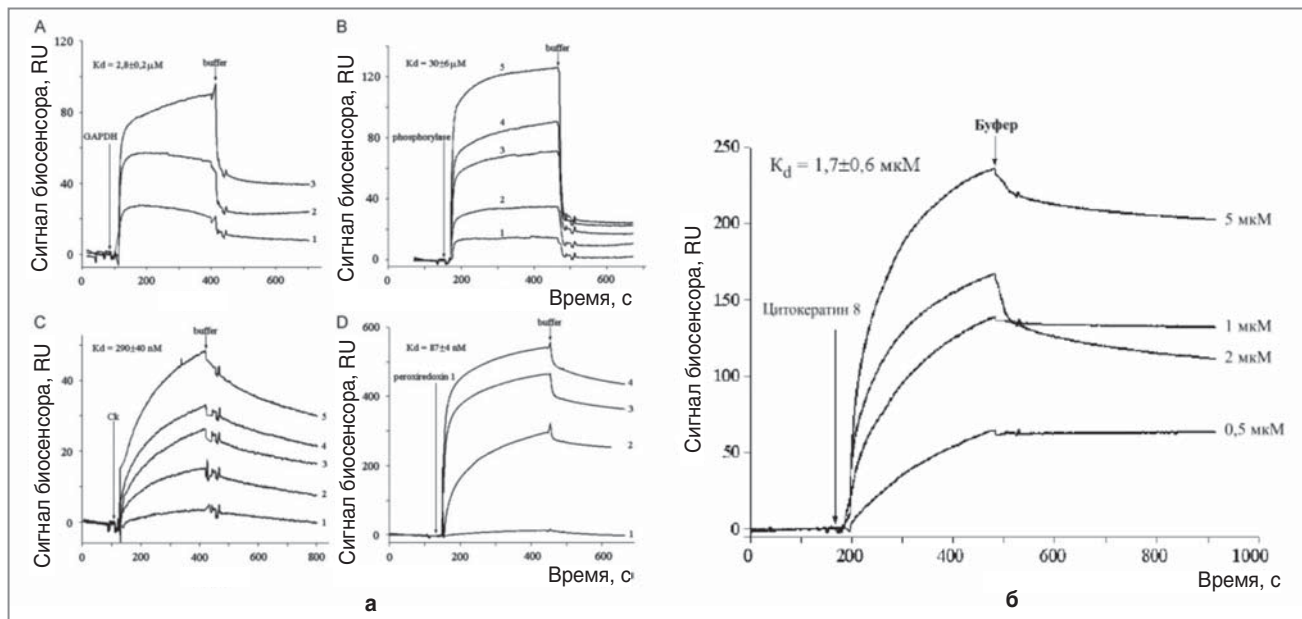


Рис. 10. SPR-валидация взаимодействия изатин-связывающих белков с изатином: а — взаимодействие с иммобилизованным 5-аминоизатином индивидуальных ферментов: GAPDH (А), фосфорилаза (В), креатинкиназа (С), пероксиредоксин (D); б — сенсограммы взаимодействия цитокератина СК8 с иммобилизованным на оптическом чипе 5-аминоизатином

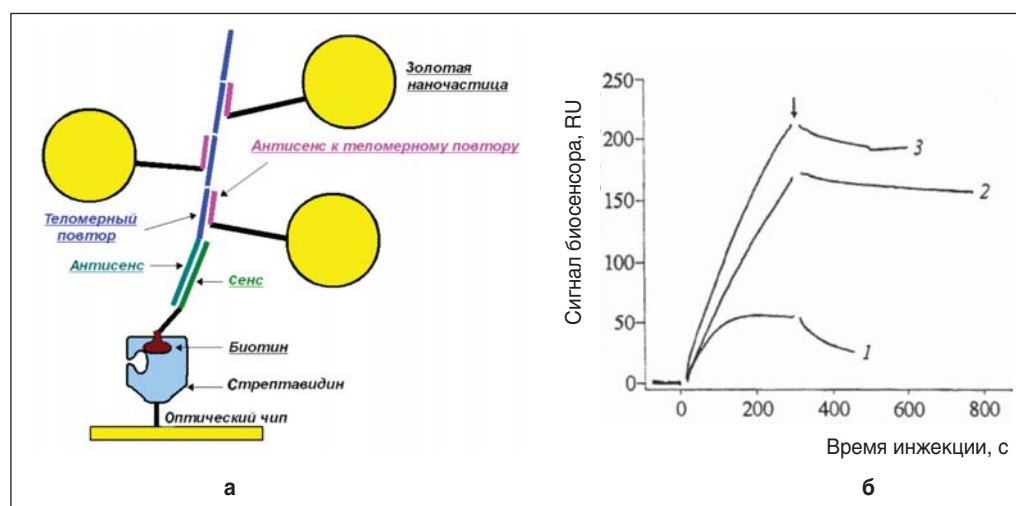


Рис. 11. Принцип усиления сигнала биосенсора с помощью модифицированных наночастиц золота (а) и биосенсорный анализ теломерных повторов с усилением сигнала (б); инъекции: 1 — зонда CX (20 нМ); 2 — конъюгата зонда CX со стрептавидином (10 нМ); 3 — конъюгата зонда CX с золотыми наночастицами (0,13 нМ)

взаимодействия антисенса к теломерам без золотых наночастиц (рис. 11, б).

8. *SPR-детекция кардиомиоглобина в плазме крови* [21, 22]. Повышение чувствительности биосенсоров для разработки новых методов диагностики является актуальной задачей, так как содержание детектируемых биомаркеров в плазме крови, как правило, крайне низкое. Разработана технология усиления сигнала оптического биосенсора с помощью конъюгатов антител с наночастицами золота для детекции кардиомиоглобина в плазме крови, для диагностики, оценки степени тяжести и мониторинга лечения инфаркта миокарда.

Наименьшая концентрация маркера, которая была определена в прямом анализе, составила $4 \cdot 10^{-9}$ М, в то время как в анализе с использованием конъюгатов антител с наночастицами золота — $2 \cdot 10^{-11}$ М (рис. 12), т.е. было достигнуто усиление сигнала биосенсора более чем на два порядка.

Закключение. Технология оптических биосенсоров, работающих на эффекте поверхностного плазмонного резонанса, становится одним из основных подходов при исследовании разнообразных межмолекулярных взаимодействий. Она носит универсальный характер и позволяет регистрировать взаимодействия между практически любыми молекулярными объектами в

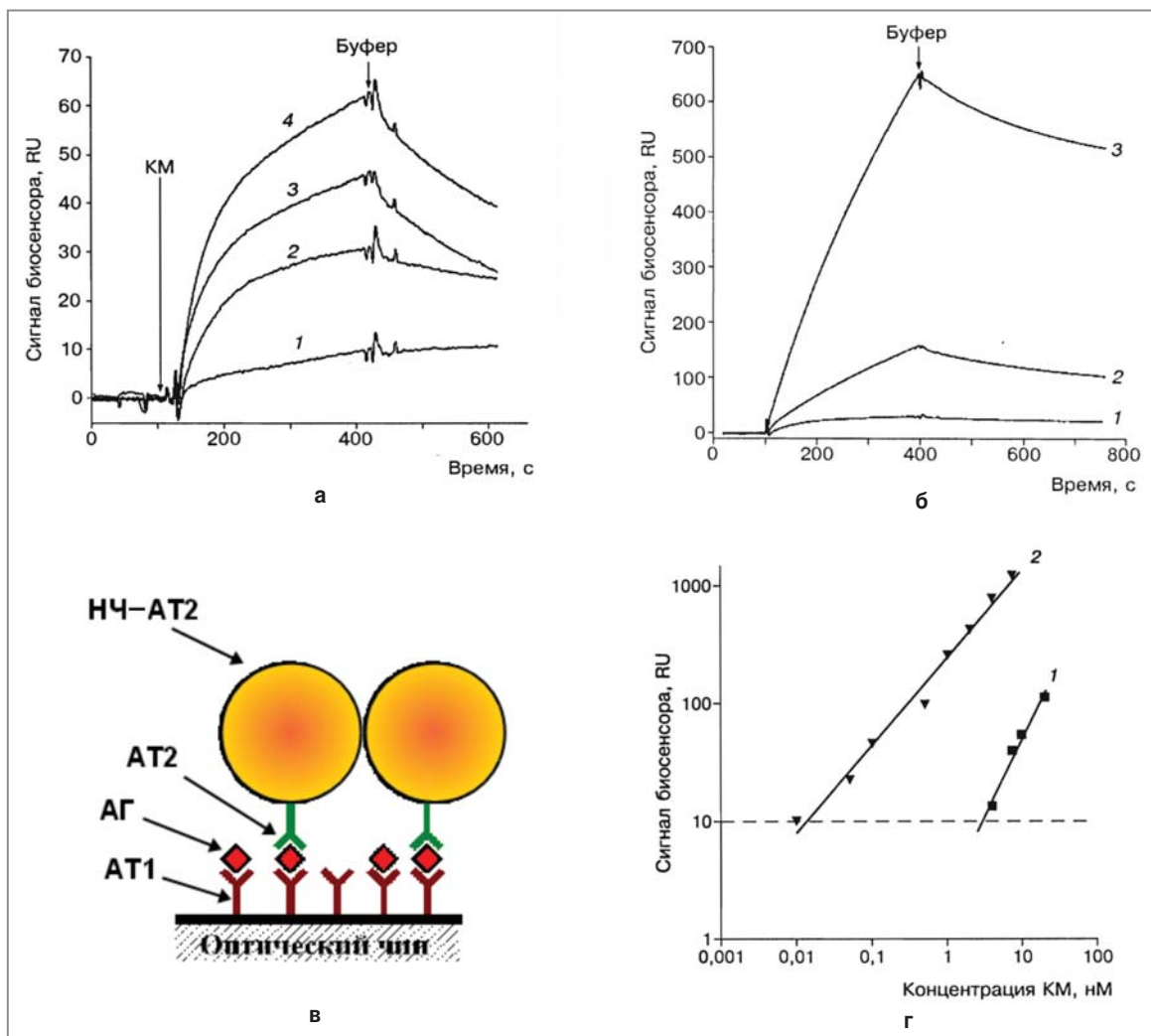


Рис. 12. Использование наночастиц золота (НЧ) для усиления сигнала оптического биосенсора при детекции кардиомиоглобина в сыворотке крови: *а* — взаимодействие кардиомиоглобина (КМ) в концентрациях 1 нМ (1); 4 нМ (2); 7,5 нМ (3) и 10 нМ (4) с иммобилизованными антителами АТ1; *б* — взаимодействие образцов КМ (1); КМ-АТ2 (2); КМ-АТ2-НЧ (3) с иммобилизованными АТ1; *в* — принцип формирования сэндвича из антигена (АГ), двух антител (АТ1 и АТ2) и золотых наночастиц (НЧ) на поверхности оптического чипа; *г* — зависимости сигнала биосенсора от концентрации КМ в модельных образцах сыворотки крови: 1 — прямой анализ; 2 — анализ с использованием конъюгатов антител с наночастицами золота

широком диапазоне концентраций. SPR-биосенсоры имеют очень высокую точность, воспроизводимость и чувствительность, что и обуславливает их все нарастающее применение как в фундаментальных, так и в прикладных исследованиях.

Данная работа была поддержана Министерством образования и науки РФ (госконтракт 16.552.11.7001) и РФФИ (грант 11-04-01163).

Литература

1. Surface plasmon resonance. Methods and protocols. De Mol N.J., Fischer M.J.E. (editors). New York: Springer Science; 2010; 286 p.
2. Surface plasmon resonance based sensors. Springer series on chemical sensors and biosensors. Homola J. (editor). Series 4. Berlin: Springer Science 2006; 252 p.
3. Handbook of nanoscale optics and electronics. Wiederrecht G. (editor). Academic Press; 2010; 560 p.

4. Surface plasmon nanophotonics. Springer series in optical sciences. Brongersma M.L., Kik P.G. (editors). Vol. 131. Berlin: Springer Science, 2007; VIII, 268 p.
5. Daghestani H.N., Day B.W. Theory and applications of surface plasmon resonance, resonant mirror, resonant waveguide grating, and dual polarization interferometry biosensors. Sensors 2010; 10: 9630–9646.
6. Englebienne P., Van Hoonacker A., Verhas M. Surface plasmon resonance: principles, methods and applications in biomedical sciences. Spectroscopy 2003; 17: 255–273.
7. Real-time analysis of biomolecular interactions: applications of BIACORE. Nagata K., Handa H. (editors). Tokyo: Springer Science, 2000; 256 p.
8. Hermanson G.T. Bioconjugate techniques. San Diego: Academic Press; 1996; 786 p.
9. Sokotun I.N., Gnedenko O.V., Leychenko A.V., Monastyrnaya M.M., et al. Study of the interaction of trypsin inhibitor from the sea anemone radianthus macrodactylus with proteases. Biochemistry (Moscow) Supplemental Series B: Biomedical Chemistry 2007; 1(2): 139–142.
10. Ivanov A.S., Gnedenko O.V., Molnar A.A., Mezentshev Y.V., et

al. Protein-protein interactions as new targets for drug design: virtual and experimental approaches. *J Bioinform Comput Biol* 2007; 5(2b): 579–592.

11. Ershov P., Gnedenko O., Molnar A., Lisitsa A., Ivanov A., Archakov A. Biosensor analysis of the interaction of potential dimerization inhibitors with HIV-1 protease. *Biochemistry (Moscow) Supplemental Series B: Biomedical Chemistry* 2009; 3(3): 272–288.

12. Ershov P.V., Gnedenko O.V., Molnar A.A., et al. Kinetic and thermodynamic analysis of dimerization inhibitors binding to HIV protease monomers by surface plasmon resonance. *Biochemistry (Moscow) Supplement Series B: Biomedical Chemistry* 2012; 6(1): 94–97.

13. Mezentsev Yu.V., Molnar A.A., Gnedenko O.V., et al. Oligomerization of L-asparaginase from *Erwinia carotovora*. *Biochemistry (Moscow) Supplemental Series B: Biomedical Chemistry*; 2007; 1(1): 58–67.

14. Mezentsev Yu.V., Molnar A.A., Sokolov N.N., et al. Specificity of molecular recognition in oligomerization of bacterial L-asparaginases. *Biochemistry (Moscow) Supplement Series B: Biomedical Chemistry* 2011; 5(2): 124–134.

15. Ivanov A.S., Gnedenko O.V., Molnar A.A., et al. The second FMN binding site of yeast NADPH-cytochrome P450 reductase is highly specific. *ACS Chemical Biology* 2010; 5(8): 767–776.

16. Rakhmetova S.Yu., Radko S.P., Gnedenko O.V., et al. Photoameric heterodimeric constructs as a new approach to enhance the efficiency of formation of photocrosslinks with a target protein. *Biochemistry (Moscow) Supplement Series B: Biomedical Chemistry* 2010; 4(1): 68–74.

17. Rakhmetova S.Yu., Radko S.P., Gnedenko O.V., et al. Comparative thermodynamic analysis of thrombin interaction with anti-thrombin aptamers and their heterodimeric construct. *Biochemistry (Moscow) Supplemental Series B: Biomedical Chemistry* 2010; 5(2): 139–143.

18. Buneeva O.A., Gnedenko O.V., Fedchenko V.I., et al. The interaction of human cyokeratins with isatin analogues. *Biochemistry (Moscow) Supplemental Series B: Biomedical Chemistry* 2010; 4(1): 107–111.

19. Buneeva O., Gnedenko O., Zgoda V., Kopylov A., et al. Isatin binding proteins of rat and mouse brain: proteomic identification and optical biosensor validation. *Proteomics* 2010; 10: 23–37.

20. Rad'ko S.P., Voronina S.A., Gromov A.V., Gnedenko O.V., et al. Use of oligonucleotides conjugated to gold nanoparticles and streptavidin for amplification of optical biosensor signal during detection of telomeric repeats. *Bull Exp Biol Med* 2009; 147(6): 746–749.

21. Гнеденко О.В., Мезенцев Ю.В., Мольнар А.А. и др. Использование наночастиц золота для усиления сигнала оптического биосенсора при детекции кардиомиоглобина в сыворотке крови. *Молекулярная медицина* 2010; 4: 52–54.

22. Gnedenko O.V., Mezentsev Yu.V., Molnar A.A., et al. Highly sensitive detection of human cardiac myoglobin using a reverse sandwich immunoassay with a gold nanoparticle-enhanced surface plasmon resonance biosensor. *Analytica Chimica Acta* 2012 (in press).

References

1. *Surface plasmon resonance. Methods and protocols*. De Mol N.J., Fischer M.J.E. (editors). New York: Springer Science; 2010; 286 p.

2. *Surface plasmon resonance based sensors. Springer series on chemical sensors and biosensors*. Homola J. (editor). Series 4. Berlin: Springer Science, 2006; 252 p.

3. *Handbook of nanoscale optics and electronics*. Wiederrecht G. (editor). Academic Press; 2010; 560 p.

4. *Surface plasmon nanophotonics. Springer series in optical sciences*. Brongersma M.L., Kik P.G. (editors). Vol. 131. Berlin: Springer Science 2007; VIII, 268 p.

5. Daghestani H.N., Day B.W. Theory and applications of surface plasmon resonance, resonant mirror, resonant waveguide grating, and dual polarization interferometry biosensors. *Sensors* 2010; 10: 9630–9646.

6. Englebienne P., Van Hoonacker A., Verhas M. Surface plasmon resonance: principles, methods and applications in biomedical sciences. *Spectroscopy* 2003; 17: 255–273.

7. *Real-time analysis of biomolecular interactions: applications of BIACORE*. Nagata K., Handa H. (editors). Tokio: Springer Science, 2000; 256 p.

8. Hermanson G.T. *Bioconjugate techniques*. San Diego: Academic Press; 1996; 786 p.

9. Sokotun I.N., Gnedenko O.V., Leychenko A.V., Monastymaya M.M., et al. Study of the interaction of trypsin inhibitor from the sea anemone *radianthus macrodactylus* with proteases. *Biochemistry (Moscow) Supplemental Series B: Biomedical Chemistry* 2007; 1(2): 139–142.

10. Ivanov A.S., Gnedenko O.V., Molnar A.A., Mezentsev Y.V., et al. Protein-protein interactions as new targets for drug design: virtual and experimental approaches. *J Bioinform Comput Biol* 2007; 5(2b): 579–592.

11. Ershov P., Gnedenko O., Molnar A., Lisitsa A., Ivanov A., Archakov A. Biosensor analysis of the interaction of potential dimerization inhibitors with HIV-1 protease. *Biochemistry (Moscow) Supplemental Series B: Biomedical Chemistry* 2009; 3(3): 272–288.

12. Ershov P.V., Gnedenko O.V., Molnar A.A., et al. Kinetic and thermodynamic analysis of dimerization inhibitors binding to HIV protease monomers by surface plasmon resonance. *Biochemistry (Moscow) Supplement Series B: Biomedical Chemistry* 2012; 6(1): 94–97.

13. Mezentsev Yu.V., Molnar A.A., Gnedenko O.V., et al. Oligomerization of L-asparaginase from *Erwinia carotovora*. *Biochemistry (Moscow) Supplemental Series B: Biomedical Chemistry* 2007; 1(1): 58–67.

14. Mezentsev Yu.V., Molnar A.A., Sokolov N.N., et al. Specificity of molecular recognition in oligomerization of bacterial L-asparaginases. *Biochemistry (Moscow) Supplement Series B: Biomedical Chemistry* 2011; 5(2): 124–134.

15. Ivanov A.S., Gnedenko O.V., Molnar A.A., et al. The second FMN binding site of yeast NADPH-cytochrome P450 reductase is highly specific. *ACS Chemical Biology* 2010; 5(8): 767–776.

16. Rakhmetova S.Yu., Radko S.P., Gnedenko O.V., et al. Photoameric heterodimeric constructs as a new approach to enhance the efficiency of formation of photocrosslinks with a target protein. *Biochemistry (Moscow) Supplement Series B: Biomedical Chemistry* 2010; 4(1): 68–74.

17. Rakhmetova S.Yu., Radko S.P., Gnedenko O.V., et al. Comparative thermodynamic analysis of thrombin interaction with anti-thrombin aptamers and their heterodimeric construct. *Biochemistry (Moscow) Supplemental Series B: Biomedical Chemistry* 2010; 5(2): 139–143.

18. Buneeva O.A., Gnedenko O.V., Fedchenko V.I., et al. The interaction of human cyokeratins with isatin analogues. *Biochemistry (Moscow) Supplemental Series B: Biomedical Chemistry* 2010; 4(1): 107–111.

19. Buneeva O., Gnedenko O., Zgoda V., Kopylov A., et al. Isatin binding proteins of rat and mouse brain: proteomic identification and optical biosensor validation. *Proteomics* 2010; 10: 23–37.

20. Rad'ko S.P., Voronina S.A., Gromov A.V., Gnedenko O.V., et al. Use of oligonucleotides conjugated to gold nanoparticles and streptavidin for amplification of optical biosensor signal during detection of telomeric repeats. *Bull Exp Biol Med* 2009; 147(6): 746–749.

21. Gnedenko O.V., Mezentsev Yu.V., Molnar A.A., et al. *Molekulyarnaya meditsina — Molecular Medicine* 2010; 4: 52–54.

22. Gnedenko O.V., Mezentsev Yu.V., Molnar A.A., et al. Highly sensitive detection of human cardiac myoglobin using a reverse sandwich immunoassay with a gold nanoparticle-enhanced surface plasmon resonance biosensor. *Analytica Chimica Acta* 2012 (in press).