

УДК 577.1

©Коллектив авторов

## ХИМИЧЕСКИЙ НЕОБРАТИМЫЙ ФИШИНГ НИЗКОКОПИЙНЫХ БЕЛКОВ

*Ю.Д. Иванов<sup>1</sup>, В.В. Даничев<sup>2</sup>, Т.О. Плевакова<sup>1</sup>, И.Д. Шумов<sup>1\*</sup>, В.С. Зиборов<sup>3</sup>,  
Н.В. Крохин<sup>1</sup>, М.Н. Загуменный<sup>2</sup>, В.С. Устинов<sup>2</sup>, Л.П. Смирнов<sup>2</sup>,  
А.В. Широин<sup>1</sup>, А.И. Арчаков<sup>1</sup>*

<sup>1</sup>Федеральное государственное бюджетное учреждение  
“Научно-исследовательский институт биомедицинской химии  
имени В.Н.Ореховича” Российской академии медицинских наук, Москва,  
119121, ул. Погодинская, 10; тел.: (7)(499)2463761; факс: (7)(499)2450857;  
эл. почта: shum230988@mail.ru

<sup>2</sup>НИЦ “Курчатовский институт”, Москва, 123182, пл. Академика Курчатова, 1

<sup>3</sup>Объединенный институт высоких температур РАН, Москва, 125412,  
ул. Ижорская, 13, стр. 2.

На основе атомно-силовой микроскопии (АСМ) разработан метод необратимого химического АСМ-фишинга (АСМ-НФ<sub>хим</sub>) для детекции белков в сверхнизких концентрациях в растворе. Используя этот метод, в растворе зарегистрирован белок пероксидаза хрена (HRP) с концентрацией  $10^{-17}$  М. Предложена теоретическая модель, которая позволяет описать полученные экспериментальные данные. Эта модель учитывает доставку белка из объема измерительной кюветы на поверхность АСМ-чипа и его необратимое связывание в зоне активации.

**Ключевые слова:** АСМ-фишинг, АСМ-чип, низкокопийные белки.

**ВВЕДЕНИЕ.** Развитие методов аналитической протеомики и высокочувствительной диагностики является важной задачей. Эти методы основаны на использовании различных способов регистрации белков: оптических [1-24], механических микроантислеверных [25], магнитоэлектрических [26] и т.д. Предел чувствительности большинства перечисленных выше методов составляет порядка  $10^{-12}$  М [27, 28]. Однако, такой чувствительности недостаточно для обнаружения низкокопийных

---

*Принятые сокращения:* d-b5 – цитохром b5; d-Fp – NADPH:цитохром P450 редуктаза; DL – нижний предел концентрационной чувствительности; DSP – дитиобис(сукцинимидил пропионат); DSC – дисукцинимидилкарбонат; HCVcoreAg – кор-антиген вируса гепатита С; HRP – пероксидаза хрена; PSA – простатоспецифический антиген; SMAD-2 – Mothers against decapentaplegic homolog 2; АСМ-НФ<sub>хим</sub> – необратимый химический АСМ-фишинг; ДМСО – диметилсульфоксид; ФСБ – фосфатно-солевой буферный раствор.

\* - адресат для переписки

## ХИМИЧЕСКИЙ НЕОБРАТИМЫЙ ФИШИНГ НИЗКОКОПИЙНЫХ БЕЛКОВ

белков, концентрация которых в биологическом материале ниже  $10^{-12}$  М. Согласно оценкам, в плазме крови человека может содержаться порядка 2 млн [27] – 5 млн [29] типов белков, основной вклад в которые вносят низкокопийные белки с концентрацией ниже  $10^{-12}$  М. Эти белки могут являться биомаркерами патологических состояний человека, например, гепатита С (HCVcore Ag) [30, 31], онкозаболеваний (SMAD-2) [32] и др. Таким образом, разработка новых подходов для регистрации белка с концентрационной чувствительностью ( $DL$ ) на уровне  $DL < 10^{-12}$  М [28, 33, 34] является актуальным направлением в области протеомного анализа и медицинской диагностики.

*Метод АСМ-НФ<sub>хим</sub>*. В настоящей работе использован подход, основанный на методе необратимого АСМ-фишинга. Этот метод заключается в концентрировании молекул белка (аналита), распределенных в большом объеме, на небольшой поверхности АСМ-чипа и их ковалентном (необратимом) связывании с поверхностью этого чипа. Регистрация связанных молекул осуществляется в режиме их счета при помощи АСМ [27, 28]. Высокая чувствительность такой аналитической системы обусловлена эффективным концентрированием белка и высокой чувствительностью регистрирующей системы на уровне отдельных молекул белка.

Фактор концентрирования ( $F$ ) вводится для оценки эффективности концентрирования белка в процессе необратимого фишинга [27]. При условии, что все молекулы ( $N_0$ ), присутствующие в объеме ( $V$ ), могут быть выловлены и ковалентно связаны с поверхностью АСМ-чипа площадью  $S$  (при этом концентрация молекул белка на поверхности АСМ-чипа будет равна  $C_s$ ) он может быть представлен как:

$$F = \frac{C_s}{C_0} \quad (1.1),$$

где  $C_0 = \frac{N_0}{VN_A}$  – начальная объемная концентрация белка в растворе до начала фишинга;  $C_s = \frac{N_0}{S \times h \times N_A}$  – концентрация молекул белка в объеме приповерхностного слоя,  $S$  и  $h$  – соответственно, площадь и высота слоя молекул белка, выловленных на поверхность АСМ-чипа,  $N_A$  – число Авогадро.

Уравнение (1.1) может быть представлено в более простом виде:

$$F = \frac{V}{S \times h} \quad (1.2).$$

Из уравнения 1.2 следует, что  $F$  может достигать величины порядка  $10^8$  при следующих условиях: высота слоя выловленных молекул  $h=5$  нм, что соответствует высоте молекулы белка [35]; объем раствора аналита  $V=1$  мл; площадь поверхности АСМ-чипа  $S=1$  мм<sup>2</sup>. Это означает, что в случае необратимого фишинга из 1 мл раствора аналита с концентрацией  $10^{-17}$  М концентрирование молекул с  $F=10^8$  приведет к увеличению объемной концентрации  $10^{-17}$  М до приповерхностной концентрации  $10^{-9}$  М, что значительно облегчит детекцию белков.

Чувствительность детектора также оказывает большое влияние на чувствительность протеомной аналитической системы [28]. Известно, что для схемы необратимого фишинга чувствительность  $DL$  аналитических систем определяется соотношением [27]:

$$DL = \frac{N_{AB}}{N_A V} \quad (1.3),$$

где  $N_{AB}$  – число белковых молекул или их комплексов на поверхности чипа, которое может зарегистрировать детектор. Например, если  $N_{AB} \sim 10^8$  белковых молекул ( $M_r \sim 50$  кДа), тогда  $DL \sim 10^{-12}$  М. Такое соотношение характерно, например, для коммерческого оптического биосенсора IAsys (“Affinity Sensors”, Великобритания). В предельном случае при повышении чувствительности детектора до  $N_{AB} \sim 1$ , при объеме раствора аналита  $V=1$  л, величина  $DL$  составит:

$$DL \approx \frac{1}{N_A V} \approx 10^{-24} \text{ М} \quad (1.4),$$

что является обратным числом Авогадро. Высокая чувствительность регистрации может быть достигнута при использовании зонда АСМ, имеющего размер, сопоставимый с размером биологической макромолекулы (1-10 нм). Было показано, что АСМ-зонд позволяет осуществлять регистрацию не только вирусных частиц [30], но и отдельных молекул белков [27, 28, 35-43].

*Модели вылавливания белков на поверхность чипов.* Теоретический анализ процесса связывания белковых молекул с поверхностью чипов основан на использовании различных моделей. Так, для описания подобного процесса использовалась диффузионно-кинетическая модель [44]. Эта модель предполагает, что скорость вылавливания белка на поверхность чипа определяется скоростями двух процессов: скоростью диффузии молекул белка к поверхности (уравнения 1.5; 1.6) и скоростью образования связи между белком и активным центром поверхности (уравнение 1.7):

$$\frac{\partial C}{\partial t} = D \nabla^2 C \quad (1.5),$$

$$D \frac{\partial C}{\partial n} = k_{on} C(r - C_s) - k_{off} C_s \quad (1.6),$$

$$\frac{dC_s}{dt} = k_{on} C(r - C_s) - k_{off} C_s \quad (1.7),$$

где  $C$  – концентрация белка в объеме анализируемого раствора;  $C_s$  – поверхностная концентрация выловленных молекул белка;  $D$  – коэффициент диффузии белка в растворе;  $n$  – нормаль к поверхности чипа;  $k_{on}$  – константа скорости реакции образования “комплекса” белка с активным центром поверхности чипа, а  $k_{off}$  – константа скорости диссоциации этого “комплекса”;  $r$  – поверхностная концентрация активных центров чипа. Для случая необратимого связывания белка  $k_{off}=0$ . После задания соответствующих начальных и граничных условий решение приведенной выше системы уравнений позволяет получить зависимость концентрации белка на поверхности чипа от времени вылавливания. Авторы [44] отмечают, что данная модель может быть применена лишь при отсутствии течения жидкости. Однако, как правило, для повышения эффективности процесса вылавливания используется перемешивание.

## ХИМИЧЕСКИЙ НЕОБРАТИМЫЙ ФИШИНГ НИЗКОКОПИЙНЫХ БЕЛКОВ

При наличии перемешивания в системе предлагается использовать модель идеального смешения, предполагающую равномерное распределение молекул белка по всему объёму раствора в любой момент времени [44]. В этом случае зависимость поверхностной концентрации белка от времени вылавливания описывается выражением:

$$C_s(t) = \frac{k_{on,r}(1 - \exp[-(k_{on,r}C + k_{off})t])}{k_{on,r}C + k_{off}} \quad (1.8).$$

Необратимое связывание белка и перевод концентрации белка из 3D- в 2D- измерение с учетом убыли количества белка в растворе за счёт его связывания с поверхностью было описано в [26] следующим соотношением:

$$C_s = C_{smax} \left[ \frac{1 - \exp[-k_{on}(C - C_{smax}S/V)t]}{1 - \frac{C_{smax}S}{CV} \exp[-k_{on}(C - C_{smax}S/V)t]} \right] \quad (1.9),$$

где  $C_{Smax}$  – максимально возможная поверхностная концентрация белка;  $S$  – площадь поверхности детектора, способной связывать белок;  $V$  – объём анализируемого раствора.

В этом уравнении авторами [26] выполнен перевод поверхностной концентрации белка в объёмную в виде:

$$C = \frac{C_s S}{V} \quad (1.10).$$

Аналогичный подход для перевода поверхностной концентрации в объёмную применялся нами ранее для оценки чувствительности нанотехнологических методов на базе оптического биосенсора и АСМ [28].

В литературе предложены также модели, учитывающие влияние на процесс вылавливания диффузионного пограничного слоя [45]. При построении этой модели авторы рассмотрели случай, когда обратимое связывание белка с поверхностью происходит параллельно с необратимым связыванием. Данная модель была описана в [45] следующими соотношениями:

- уравнение для скорости обратимого связывания:

$$\frac{dC_s}{dt} = k_{on,r} \phi C_n - k_{off} C_s \quad (1.11);$$

- уравнение для скорости необратимого связывания:

$$\frac{dC_{Si}}{dt} = k_i \phi C_n \quad (1.12);$$

- зависимость изменения концентрации белка  $C_n$  в приповерхностном слое от времени связывания:

$$\frac{dC_n}{dt} = (C - C_n) \frac{D}{\delta} + k_{off} C_s - (k_{on,r} + k_i) \phi C_n \quad (1.13).$$

Здесь  $C_{Sr}$  – поверхностная концентрация обратимо выловленного белка;  $C_{Si}$  – поверхностная концентрация необратимо выловленного белка;  $C_n$  – концентрация белка в приповерхностном слое;  $C$  – концентрация белка в объёме;  $k_{on,r}$  – константа скорости обратимого связывания белка;

$k_i$  - константа скорости необратимого связывания белка;  $\phi$  – доля поверхности, способной связывать белок и доступной для связывания белка;  $D$  – коэффициент диффузии белка в растворе;  $\delta$  – толщина диффузионного пограничного слоя на поверхности, определяющаяся исходя из скорости движения раствора относительно поверхности, коэффициента диффузии белка, вязкости раствора белка и геометрических параметров ячейки [46].

Рассмотренные выше модели вылавливания белков на поверхность были проверены в ряде экспериментальных работ при помощи различных методов, например, оптико-биосенсорных методов для растворов с концентрациями белка  $C \geq 10^{-10}$  М [5-24]. Однако для низких концентраций белка в диапазоне  $C < 10^{-12}$  М такие проверки не проводились в связи с ограниченной чувствительностью использованных оптических методов. Адекватной кинетической модели, описывающей вылавливание белка на поверхность при концентрациях ниже  $10^{-12}$  М, в доступной литературе нам найти не удалось. В то же время, если оценить время  $t$ , необходимое для необратимого вылавливания белков по модели, предложенной в [26], в случае начальной концентрации белка  $C_0 = 10^{-16}$  М для условий эксперимента, описанных в этой работе (объём  $V = 50$  мкл, размер активированной площади  $S = 5400$  мкм<sup>2</sup>), то это расчётное время должно составлять  $t \sim 10^8$  с. При этом будет выловлено 90% молекул, изначально находившихся в растворе. Таким образом, согласно этой модели при анализе раствора белков с концентрацией  $\sim 10^{-16}$  М практически невозможно зарегистрировать белки за реальное время эксперимента, которое обычно составляет  $t \sim 3$  ч  $\sim 10^4$  с. Однако, экспериментально показано, что время необратимого АСМ-фишинга HCVcoreAg из объёма  $V = 50$  мл при концентрации  $10^{-16}$  М составляет на несколько порядков меньше, порядка  $t = 4000$  с [28]. Как видно, имеется существенное расхождение результатов экспериментов с данными расчётов по вышеуказанным моделям, описывающим вылавливание белка на поверхность чипа. Известны и другие примеры [33, 47, 48], в которых сообщается о достижении  $DL = 2,8 \times 10^{-14}$  М для белка PSA при использовании нанопроводного детектора. Время регистрации белка на поверхности наноразмерного чипа при этом составило менее 20 мин. Авторы [49] приводят данные о достижении предела чувствительности детекции для белка ферритина человека (hFtn)  $2 \times 10^{-17}$  М при использовании метода специфического связывания (молекулярного импринта) на поверхности углеродных нанотрубок с покрытием из полифенола. Время, необходимое для регистрации белка в растворе этим методом, составило  $\sim 30$  мин. Однако, в указанных работах не приводилось теоретическое обоснование полученных данных с помощью теоретических моделей. Таким образом, к настоящему моменту опубликованы интересные экспериментальные данные о достижении низких значений  $DL$  белков, однако адекватной модели для описания таких систем в литературе не встречается.

В экспериментальной части представленной работы проведён необратимый АСМ-фишинг белков непосредственно на химически активированную зону АСМ-чипа. Такой процесс носит условное название химический АСМ-необратимый фишинг (АСМ-НФ<sub>хим</sub>) для того, чтобы отличать его от необратимого биоспецифического фишинга, когда определяемый белок из раствора вылавливается на иммобилизованные на поверхности чипа молекулы белка-партнера и образованные комплексы ковалентно перешиваются [28]. Преимущество АСМ-НФ<sub>хим</sub> заключается в том, что не требуется использование биоспецифических антител в качестве

## ХИМИЧЕСКИЙ НЕОБРАТИМЫЙ ФИШИНГ НИЗКОКОПИЙНЫХ БЕЛКОВ

зондов. Это позволяет вылавливать все белки, присутствующие в растворе анализата, а не только биоспецифические лигаты, что важно для решения задач протеомики [27]. АСМ-регистрация белков, выловленных в процессе АСМ-НФ<sub>ХИМ</sub>, проводилась в режиме счёта отдельных молекул. Использование АСМ в качестве молекулярного детектора позволило экспериментально достичь концентрационной чувствительности  $DL=10^{-17}$  М при объёме раствора анализата  $V=500$  мл.

Теоретическая модель, представленная в нашей работе, учитывает как динамику перемешивания белка в анализируемом растворе, так и диффузию белка вдоль поверхности АСМ-чипа. Такая модель позволила обосновать полученную экспериментально высокую чувствительность АСМ-НФ<sub>ХИМ</sub>, и определить возможные пути увеличения чувствительности предложенного подхода.

### МЕТОДИКА.

#### Реактивы.

*Кросслинкеры:* дисукцинимидилкарбонат (DSC) (“Sigma”, США), дитиобис(сукцинимидил пропионат) (DSP) (“Pierce”, США).

*Белки:* авидин яичного белка (“Sigma”) и пероксидаза хрена (“Sigma”).

*Прочие реактивы:* Диметилсульфоксид (ДМСО) (“Sigma”), этанол (“Реахим”, Россия), калия дигидрофосфат (“Sigma”), калия гидроокись (“Реахим”), эмульген 913 (“Kao Atlas”, Япония).

В качестве подложки для АСМ-чипа использовалась слюда (“SPI”, США). В работе использовали деионизованную воду, очищенную при помощи установки Millipore Simplicity UV (Франция).

#### Методика эксперимента.

*Активация поверхности АСМ-чипа.* Площадь АСМ-чипа, изготовленного из силанизированной в соответствии с [28] слюды, составляла  $112,5 \text{ мм}^2$  ( $7,5 \times 15 \text{ мм}$ ). Активированная зона АСМ-чипа площадью  $S=0,4 \text{ мм}^2$  (рисунок 1) была сформирована с помощью модификации поверхности этой зоны кросс-линкером, содержащим сукцинимидные группы [50].

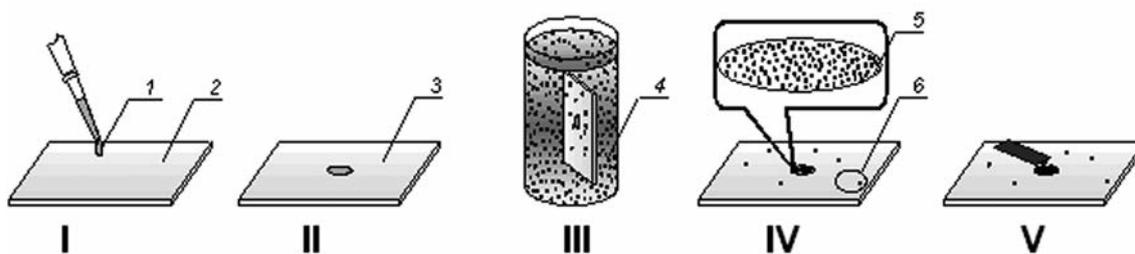


Рисунок 1.

Принципиальная схема необратимого АСМ-фишинга. I Активация поверхности АСМ-чипа: раствор кросс-линкера (1) наносится на поверхность АСМ-чипа (2). II АСМ-чип (3) с активированной зоной. Размеры чипа:  $7,5 \times 15 \times 0,25 \text{ мм}$ ; площадь активированной зоны  $S=0,4 \text{ мм}^2$ ; полная площадь чипа  $S_n=112,5 \text{ мм}^2$ . III Инкубация АСМ-чипа в растворе анализата (белка) (4). IV АСМ-чип с выловленными молекулами белка (5) в рабочей активированной зоне. Контрольная зона (6) - неактивированная зона на том же АСМ-чипе.

На вставке - схематическое изображение активированной рабочей и неактивированной контрольной зон АСМ-чипа.

В случае фишинга авидина в качестве кросс-линкера был использован дисукцинимидилкарбонат (DSP), а в случае фишинга HRP – дитиобис(сукцинимидил пропионат) (DSC). Для активации поверхности АСМ-чипа раствор кросс-линкера (1,2 мМ, в ДМСО:EtOH, 1:1) был смешан с фосфатно-солевым буферным раствором (ФСБ) (50 мМ, рН 7,4) в соотношении 1:1, после чего немедленно нанесен на поверхность АСМ-чипа. После инкубации раствора кросс-линкера на поверхности АСМ-чипа (RT, 10 мин), следовала однократная отмывка АСМ-чипа в 1 мл 50% этанола (10 мин). Далее АСМ-чип был высушен в потоке сухого азота и немедленно использован для фишинга белка.

*Процедура АСМ-НФ<sub>Хим</sub>* Принципиальная схема АСМ-НФ<sub>Хим</sub> представлена на рисунке 1. АСМ-чип с активированной зоной инкубировали в растворе белка (авидина или HRP) во вращающейся кювете при следующих условиях: объём раствора аналита 1 мл; концентрация раствора ( $C_0$ ) от  $10^{-9}$  до  $10^{-15}$  М; температура инкубации  $25^{\circ}\text{C}$ ; время инкубации ( $t$ ) от 20 до 180 мин; частота вращения кюветы 900 об/мин. Выбор минимального времени инкубации обусловлен следующим фактором – при времени инкубации менее 20 мин количество выловленных частиц было сравнимо с величиной относительной погрешности определения числа выловленных белков. Выбор максимального времени инкубации 180 мин обусловлен ограничением, связанным с побочной реакцией гидролиза сукцинимидных групп на активированной поверхности АСМ-чипа. Показано, что за 3 часа гидролизуеться ~50% сукцинимидных групп [51].

Фишинг HRP из раствора с концентрацией  $C_0=10^{-17}$  М был проведён в два этапа. На первом этапе исследуемый раствор ( $V=500$  мл) был высушен с помощью лиофильной сушки (Christ Alpha 1-4 LSC, Германия). Далее лиофилизированный образец был переведен в объём  $V^*=50$  мл. Таким образом анализируемый раствор белка был сконцентрирован до  $C_0^*=10^{-16}$  М. На втором этапе АСМ-чипы с активированной зоной инкубировались в 50 мл этого концентрированного раствора белка в течение  $t=3$  ч во вращающейся с частотой 750 об/мин кювете.

После инкубации АСМ-чип отмывали в растворе Emulgen 913 (1 мл 0,01% раствора,  $40^{\circ}\text{C}$ , 10 мин), далее следовала трёхкратная отмывка в деионизованной воде (1 мл,  $25^{\circ}\text{C}$ , 15 мин) и сушка.

Контрольные эксперименты проводили по процедуре, описанной выше, но для инкубации использовали раствор, не содержащий белок.

*АСМ-сканирование.* Сканирование проводилось при помощи АСМ Dimension 3100 (VEECO, США) и NTEGRA Prima (“NT-MDT”, Россия) на воздухе в полуконтактном режиме с использованием кантилеверов PPP-NCH (“Nanosensors Inc.”, США). Размер скана  $5\times 5$  мкм, число сканов в каждой зоне не менее 16, общая площадь сканирования каждой зоны не менее  $S_{scan}=400$  мкм<sup>2</sup>.

*Обработка АСМ-изображений.* Обработка данных производилась при помощи программного обеспечения обработки данных АСМ (ПО одАСМ, Роспатент, рег. номер №2010613458, 26 мая 2010), разработанное в ИБМХ РАН. Высота регистрируемых объектов служила основным критерием измерения размеров молекул [52-57]. Высоты белковых молекул определялись как высоты соответствующих максимумов распределения их изображений по размерам аналогично [41].

АСМ-сканирование АСМ-чипа в контрольных экспериментах показало, что содержание неспецифических объектов с высотой  $h>1$  нм

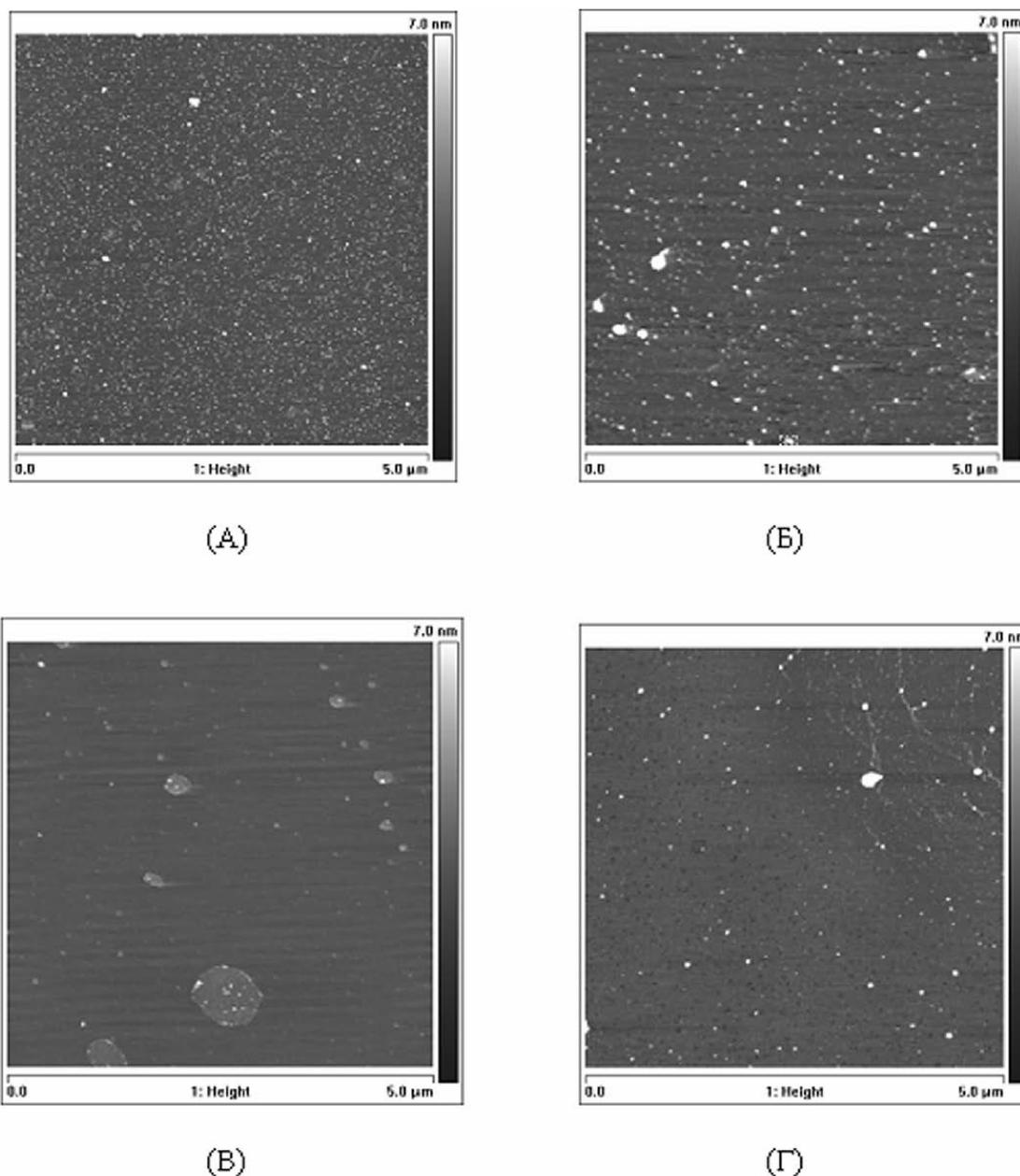
## ХИМИЧЕСКИЙ НЕОБРАТИМЫЙ ФИШИНГ НИЗКОКОПИЙНЫХ БЕЛКОВ

в активированной зоне не превышает  $N_s^{cat}=500$  объектов/400 мкм<sup>2</sup>. Далее в экспериментах в качестве контрольных зон были использованы участки неактивированной поверхности АСМ-чипа (см. рисунок 1). Каждое измерение проводили не менее трёх раз.

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.

*Экспериментальные результаты по АСМ-НФХим авидина и HRP.*  
В качестве модельных белков для проведения фишинга были выбраны два различных по физико-химическим свойствам белка: авидин и HRP. На рисунке 2А-Г представлены полученные АСМ-изображения чипа после инкубации в растворе авидина при концентрациях ( $C_0$ )  $10^{-9}$  и  $10^{-13}$  М. Было обнаружено, что количество зарегистрированных АСМ объектов остаётся на одном уровне с увеличением времени инкубации для всего исследуемого диапазона концентраций белка, что указывает на достижение насыщения поверхности активированной зоны выловленными молекулами белка за время  $t \leq 1$  часа. Это подтверждается теоретическими оценками времени выхода на насыщение, как обсуждено в следующем разделе. Количество авидина, выловленного из 1 мл раствора с  $C_0=10^{-9}$  М, достигает максимального значения  $\sim 2 \times 10^4$  молекул/400 мкм<sup>2</sup> (400 мкм<sup>2</sup> – это площадь АСМ-сканирования). Было также обнаружено, что с понижением концентрации раствора аналита изменяется характер распределения АСМ-зарегистрированных объектов по высотам. На рисунка 3 представлены распределения по высотам АСМ-изображений молекул авидина, выловленных в процессе АСМ-НФ<sub>ХИМ</sub> при  $C_0$   $10^{-9}$  и  $10^{-13}$  М. Из рисунка 3 видно, что в случае фишинга белка из раствора с  $C_0=10^{-9}$  М молекулы имели характеристическую высоту, соответствующую максимуму плотности распределения по высотам с величиной  $h_{max}=1,8 \pm 0,1$  нм. Эти результаты хорошо согласуются со значениями высот других белков со сходной молекулярной массой, таких, как d-b5 ( $M_r=50$  кДа [58];  $h_{max}=1,8 \pm 0,1$  нм [38]) и d-Fp ( $M_r=78$  кДа;  $h_{max}=2,3 \pm 0,2$  нм [38]). Из рисунка 3 видно, что при уменьшении  $C_0$  до  $10^{-13}$  М высота выловленных объектов становится меньше,  $h_{max}=1,2 \pm 0,1$  нм. Эти данные можно объяснить следующим образом. Известно, что в растворе авидин является тетрамером с молекулярной массой  $M_r=68$  кДа [59]. При снижении начальной концентрации раствора аналита часть тетрамеров авидина диссоциирует за счёт смещения динамического равновесия в сторону образования мономеров. Поэтому характеристическая высота полученных АСМ-изображений также уменьшается. Таким образом, корректный эксперимент по подсчёту частиц, выловленных на АСМ-чип, в случае анализа растворов авидина может проводиться в диапазоне объемных концентраций только при  $C_0 > 10^{-13}$  М. АСМ-НФ<sub>ХИМ</sub> белка в диапазоне более низких концентраций следует проводить с использованием белка, существующего в растворе в виде мономеров. С понижением концентрации авидина до  $10^{-13}$  М зарегистрированное количество белка, выловленного из того же объёма раствора за время инкубации от 1 до 3 часов не изменялось, то есть наблюдалось насыщение поверхности. Количество белковых молекул, выловленных при  $C_0=10^{-13}$  М, было меньше, чем в случае фишинга при  $C_0=10^{-9}$  М, и составляло  $3 \times 10^3$  молекул/400 мкм<sup>2</sup>, что может быть связано с тем, что при  $C_0=10^{-13}$  М молекулы авидина имели меньшую высоту и было сложно их обнаруживать. При этом в ряде случаев наблюдалось некоторое увеличение латеральных размеров АСМ-изображений при неизменной величине их высоты. Это увеличение латеральных размеров может быть связано с латеральным уширением при измерении стандартным АСМ-зондом,

а также с возможным влиянием погрешности, обусловленной влиянием поверхности на агрегацию белка. Отсутствие информации о конкретном вкладе этих явлений в увеличение латеральных размеров объектов не позволяло использовать эту информацию в оценке количества белка. Поэтому использовался общепринятый критерий оценки размеров белка на основании величин высот изображений.



**Рисунок 2.**

АСМ-изображения поверхности АСМ-чипа после инкубации в растворе авидина при различных значениях времени инкубации ( $t$ ) и концентраций раствора белка ( $C_0$ ): (А)  $t=10$  мин,  $C_0=10^{-9}$  М, (Б)  $t=60$  мин,  $C_0=10^{-9}$  М; (B)  $t=20$  мин,  $C_0=10^{-13}$  М, (Г)  $t=60$  мин,  $C_0=10^{-13}$  М (Г). Экспериментальные условия: объём раствора  $V=1$  мл, площадь активированной зоны  $S=0,4$  мм<sup>2</sup>, площадь скана 25 мкм<sup>2</sup>.

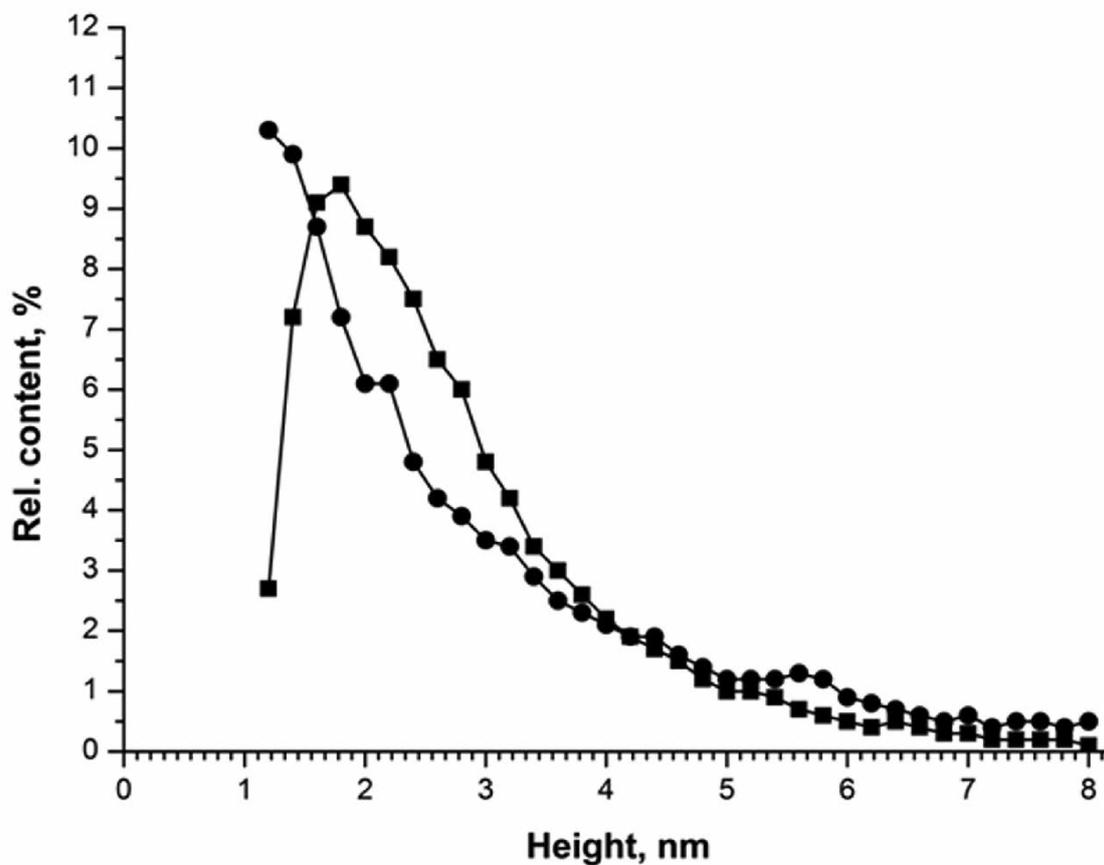


Рисунок 3.

Распределение  $\rho(h)$  АСМ-изображений выловленных молекул авидина по высотам при различных концентрациях белка в растворе ( $C_0$ ). Экспериментальные условия:  $C_0=10^{-9}$  М (■) и  $C_0=10^{-13}$  М (●), объём раствора  $V=1$  мл, площадь активированной зоны  $S=0,4$  мм<sup>2</sup>.

Так как диссоциация белка авидина в области низких концентраций является определяющим фактором чувствительности, необходимо выбрать такой белок, который был бы стабилен в области  $C_0=10^{-13}$  М.

Как известно, белок HRP в растворе существует только в виде мономера [60]. Поэтому он был использован для АСМ-НФ<sub>ХИМ</sub> при начальной концентрации раствора ( $C_0$ ) в диапазоне от  $10^{-13}$  до  $10^{-17}$  М. На рисунке 4 представлена зависимость плотности распределения АСМ-изображений выловленных белковых молекул по высотам  $\rho(h)$  для случаев фишинга HRP при  $C_0$   $10^{-13}$  и  $10^{-15}$  М. Из рисунка 4 видно, что максимум распределения  $\rho(h)$  не зависит от начальной концентрации раствора аналита, и составляет  $1,6\pm 0,1$  нм. Полученное значение несколько ниже размера молекулы белка HRP, приведенного в [61], что, по-видимому, связано с деформацией молекул белка под действием зонда. В то же время, данное значение высоты молекулы HRP ( $M_r=44$  кДа [60]) хорошо согласуется с величинами высот молекул мономеров других, сходных по молекулярной массе белков (СУР450 11A1,  $h_{max}=1,6\pm 0,2$  нм,  $M_r=46$  кДа [62]; аденодоксин редуктаза,  $h_{max}=1,8\pm 0,2$  нм [42],  $M_r=54$  кДа [63]; путидаредоксин редуктаза,  $h_{max}=1,8\pm 0,2$  нм [36],  $M_r=45,6$  кДа [64]).

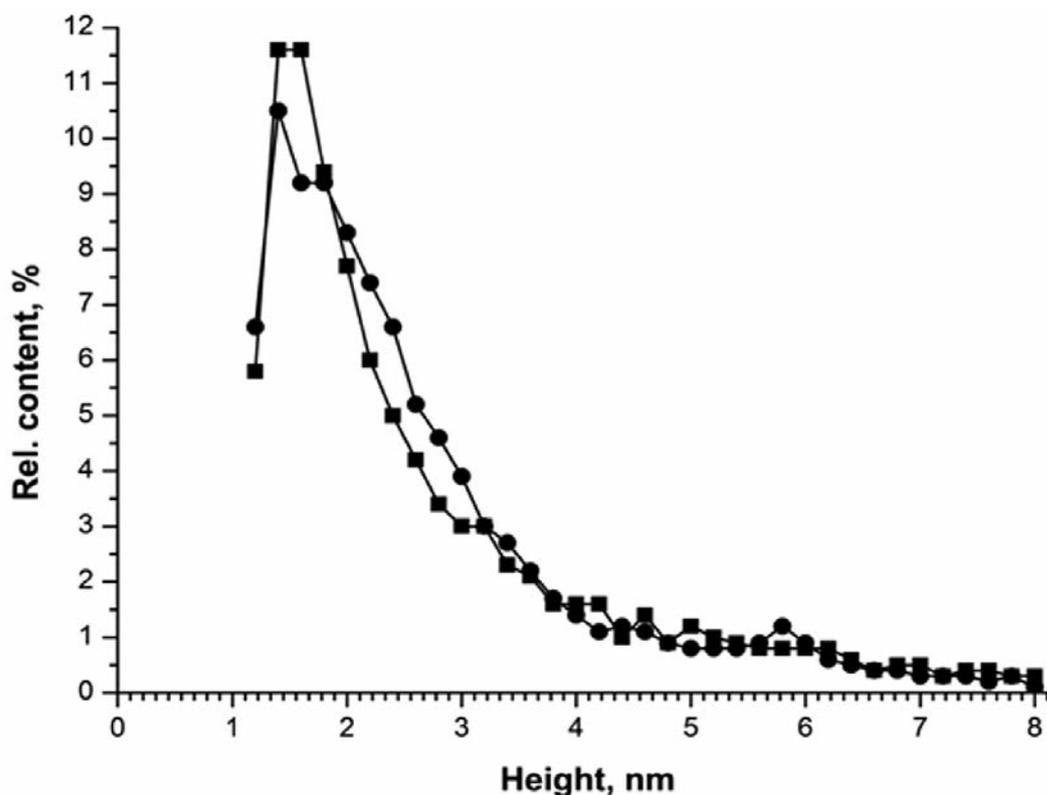


Рисунок 4.

Распределение  $\rho(h)$  АСМ-изображений выловленных молекул HRP по высотам при различных концентрациях белка в растворе ( $C_0$ ). Экспериментальные условия:  $C_0=10^{-13}$  М (■) и  $C_0=10^{-15}$  М (●), объём раствора  $V=1$  мл, площадь активированной зоны  $S=0,4$  мм<sup>2</sup>.

При фишинге HRP было обнаружено, что с уменьшением концентрации раствора аналита число выловленных объектов уменьшается. На рисунке 5 представлены АСМ-изображения чипа после инкубации в растворе HRP при  $C_0=10^{-13}$  М и временах инкубации ( $t$ ) 1, 2 и 3 ч. Обработка полученных данных АСМ-сканирования показала, что с увеличением времени инкубации от 1 до 3 ч число выловленных объектов в пределах погрешности не изменяется. В случае фишинга HRP из 1 мл раствора с  $C_0=10^{-13}$  М максимальное количество выловленного белка составляет  $\sim 4 \times 10^3$  молекул/400 мкм<sup>2</sup>. Это значение определяло емкость чипа для молекул HRP. Расхождение в насыщении поверхности АСМ-чипа для молекул двух типов белков, авидина и HRP, по-видимому, обусловлено различной эффективностью ковалентного связывания молекул с поверхностью АСМ-чипа при одинаковых экспериментальных условиях в связи с их различным зарядовым состоянием, определяемым  $pI$  белков. Эта величина составляет:  $pI(\text{авидина})=10$  [65] и  $pI(\text{HRP})=7,2$  [66]. Аналогично было получено, что в случае фишинга HRP из объёма 1 мл при  $C_0=10^{-15}$  М количество выловленного белка составляло  $\sim 10^3$  молекул/400 мкм<sup>2</sup>, то есть с понижением концентрации HRP количество выловленных молекул уменьшается. При АСМ-НФ<sub>хим</sub> из 1 мл раствора HRP с  $C_0=10^{-17}$  М, сконцентрированного до  $10^{-16}$  М, не удалось зарегистрировать белок, так как порог чувствительности АСМ-детекции в наших экспериментах составлял 500 частиц/400 мкм<sup>2</sup>. Это согласуется с тем фактом, что количество белка, выловленного

## ХИМИЧЕСКИЙ НЕОБРАТИМЫЙ ФИШИНГ НИЗКОКОПИЙНЫХ БЕЛКОВ

при АСМ-фишинге, должно быть прямо пропорционально объёму раствора аналита [27, 28]: с увеличением объёма раствора аналита количество выловленного белка увеличивается. Действительно, в результате фишинга HRP из 500 мл такого раствора аналита с  $C_0=10^{-17}$  М, сконцентрированного до  $10^{-16}$  М, при времени инкубации ( $t$ ) 3 ч по процедуре, описанной в разделе “Процедура АСМ-НФ<sub>Хим</sub>”, на площади 400 мкм<sup>2</sup> было зарегистрировано ~2600 молекул. Таким образом, увеличение объёма до 500 мл с концентрацией аналита  $C_0=10^{-17}$  М позволяет достоверно зарегистрировать белок (с использованием подхода предварительного 10-кратного концентрирования белка).

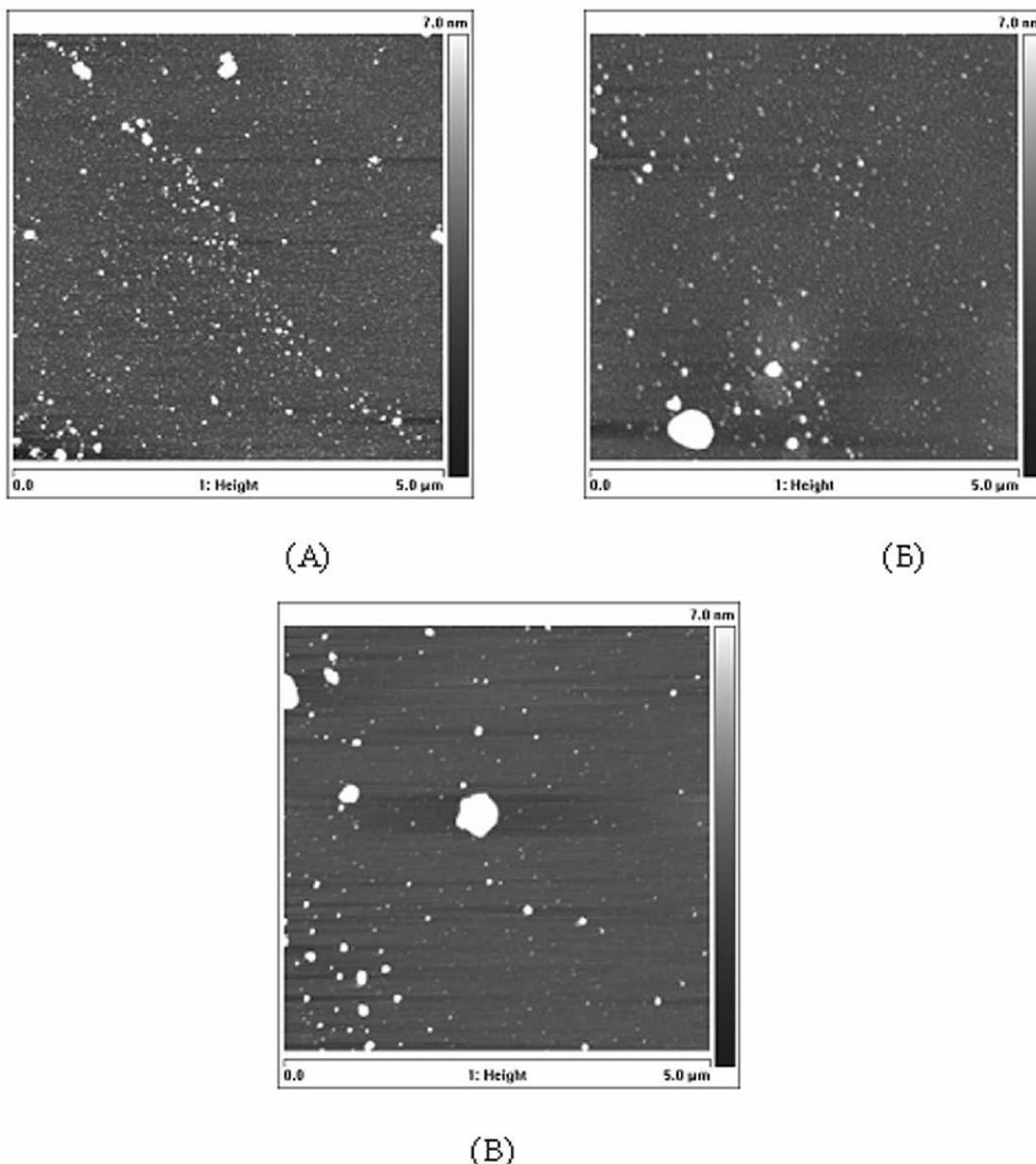


Рисунок 5.

АСМ-изображения поверхности АСМ-чипа после инкубации в растворе HRP при различных значениях времени инкубации ( $t$ ). (A)  $t=1$  ч, (Б)  $t=2$  ч и (В)  $t=3$  ч. Экспериментальные условия: начальная концентрация HRP  $C_0=10^{-13}$  М, объём раствора  $V=1$  мл, площадь активированной зоны  $S=0,4$  мм<sup>2</sup>, площадь сканирования  $S_{scan}=25$  мкм<sup>2</sup>.

## ТЕОРЕТИЧЕСКОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ ПРОЦЕССА АСМ-НФХИМ.

*Численное моделирование процесса АСМ-НФХим.*

Процесс АСМ-НФ<sub>ХИМ</sub> упрощённо был представлен следующим образом:

1. Молекулы белка доставляются на поверхность АСМ-чипа за счёт конвекции и диффузии в трехмерном пространстве, и адсорбируются на эту поверхность.

2. Белковые молекулы, адсорбированные на поверхности чипа из трёхмерного пространства, поступают в активированную зону чипа за счёт диффузии вблизи поверхности чипа.

3. По достижении молекулой белка поверхности активированной зоны АСМ-чипа происходит её необратимое химическое связывание с этой поверхностью.

Для теоретического описания процесса необратимого АСМ-фишинга белковых молекул на поверхность активированной зоны АСМ-чипа нами составлена численная модель на основе следующей системы уравнений Навье-Стокса (2.1 – 2.4):

1. Уравнение неразрывности потока [67]:

$$\frac{\partial \rho(v_x - u_x)}{\partial x} + \frac{\partial \rho(v_y - u_y)}{\partial y} + \frac{\partial \rho v_z}{\partial z} = 0 \quad (2.1),$$

где  $\rho$  – плотность раствора белка, принятая равной 1000 кг/м<sup>3</sup>;  $v_x, v_y, v_z$  – проекции скорости  $\vec{v}$  потока жидкости на координатные оси  $x, y, z$ ;  $u_x, u_y$  – проекции вектора скорости  $\vec{u}$ , связанной с вращением кюветы, на координатные оси  $x$  и  $y$ .

2. Уравнение кинетики переноса белковых молекул [68, 69]:

$$\frac{\partial \rho C}{\partial t} + \text{div}[\rho C(\vec{v} - \vec{u})] - \text{div}[\rho D_{\text{eff}} \text{grad} C] = 0 \quad (2.2),$$

где  $C$  – концентрация раствора белка;  $t$  – время инкубации;  $D_{\text{eff}}$  – эффективный коэффициент диффузии белка, определяемый по формуле  $D_{\text{eff}} = D + D_t$ . Здесь  $D$  – коэффициент молекулярной диффузии белка в растворе,  $D_t$  – турбулентный коэффициент диффузии, принятый численно равным турбулентной вязкости из следующих соображений. В условиях эксперимента (кинематическая вязкость раствора  $\nu = 10^{-6}$  м<sup>2</sup>/с, скорость перемешивания ( $\omega$ ) 900 и 750 об/мин) значение числа Рейнольдса для системы, определяемое из соотношения  $\text{Re} = nd^2/\nu$  [70, 71], составило  $\text{Re} = 1300$  и  $\text{Re} = 8000$  для кювет с диаметром ( $d$ ) 9 мм (для кюветы объёмом 1 мл) и 27 мм (для кюветы объёмом 50 мл) соответственно. При таких значениях числа Рейнольдса величина турбулентной вязкости среды  $\nu_t$  в системе сравнима с величиной кинематической вязкости  $\nu$  [72]. Так как турбулентный коэффициент диффузии и турбулентная вязкость являются величинами одного порядка [46], значение  $D_t$  было принято равным  $D_t \approx \nu_t \approx 10^{-6}$  м<sup>2</sup>/с.

3. Уравнения Эйлера–Стокса (аналогично [68]):

$$\frac{\partial \rho v_x}{\partial t} + \frac{\partial \rho(v_x - u_x)v_x}{\partial x} + \frac{\partial \rho(v_y - u_y)v_x}{\partial y} + \frac{\partial \rho v_x v_z}{\partial z} = \text{div}(\mu \nabla v_x) - \frac{\partial P}{\partial x}; \quad (2.3.1),$$

$$\frac{\partial \rho v_y}{\partial t} + \frac{\partial \rho(v_x - u_x)v_y}{\partial x} + \frac{\partial \rho(v_y - u_y)v_y}{\partial y} + \frac{\partial \rho v_y v_z}{\partial z} = \text{div}(\mu \nabla v_y) - \frac{\partial P}{\partial y}; \quad (2.3.2),$$

$$\frac{\partial \rho v_z}{\partial t} + \frac{\partial \rho(v_x - u_x)v_z}{\partial x} + \frac{\partial \rho(v_y - u_y)v_z}{\partial y} + \frac{\partial \rho v_z^2}{\partial z} = \text{div}(\mu \nabla v_z) - \frac{\partial P}{\partial z}, \quad (2.3.3),$$

## ХИМИЧЕСКИЙ НЕОБРАТИМЫЙ ФИШИНГ НИЗКОКОПИЙНЫХ БЕЛКОВ

где  $P$  – поле давления потока в рассматриваемой точке;  $\mu$  – динамическая вязкость раствора белка, принятая равной  $10^{-3}$  кг/(м×с).

4. Уравнение сохранения числа белковых молекул, составленное на основе [73]:

$$N_5(t) = N_A [C_0 V - \int_V C(t) dV] \quad (2.4),$$

где  $C_0$  – начальная концентрация раствора анализата;  $N_A$  – число Авогадро,  $N_A = 6,02 \times 10^{23}$  1/моль;  $V$  – объём раствора белка.

При построении модели приняты следующие допущения:

1. Связывание молекулы белка с поверхностью активированной зоны АСМ-чипа происходит необратимо.

2. Молекулы белка не связываются со стенками кюветы.

3. Отсутствует энергетический барьер реакции необратимого ковалентного связывания белка с активными группами поверхности в активированной зоне АСМ-чипа.

4. В связи с низкой концентрацией раствора его вязкость не меняется с уменьшением количества белка в процессе необратимого фишинга.

Для моделирования процесса АСМ-НФ<sub>ХИМ</sub> белка система уравнений Навье-Стокса (2.1 – 2.5) была решена со следующими граничными условиями:

1. Конвективная составляющая скорости потока на всех твёрдых поверхностях, включая стенки кюветы, равна нулю:

$$\vec{v} - \vec{u} = 0 \quad (2.5.1),$$

где  $\vec{u}$  – скорость движения стенок кюветы.

2. В соответствии с принятыми допущениями молекулы белка не связываются со стенками кюветы и с поверхностью АСМ-чипа за исключением активированной зоны:

$$\frac{\partial C}{\partial n} = 0 \quad (2.5.2).$$

3. В приповерхностном слое активированной зоны АСМ-чипа выловленные молекулы не мешают вылавливанию следующих:

$$C = 0 \quad (2.5.3).$$

При этом было также введено начальное условие:

$$C(t = 0) = C_0 \quad (2.5.4).$$

Дискретизация моделируемой области производилась с помощью контрольных объемов, полученных на основе конечно-элементного разбиения [69]. Расчетные параметры моделируемых систем приведены в таблице. Типовая расчётная сетка представлена на рисунке 6.

Таблица. Расчётные параметры моделируемых систем.

№ п.п.	Объём кюветы $V$ , мл	Диаметр кюветы $d$ , мм	Высота кюветы, мм	Частота вращения кюветы, об/мин	Площадь активированной зоны чипа $S$ , мм <sup>2</sup>	Число узлов сетки	Число конечных элементов
1	1	9	1,6	900	0,4 мм <sup>2</sup>	3570	2848
2	50	27,1	86	750	0,4 мм <sup>2</sup>	6990	6088
3	1	9	1,6	900	1000 мкм <sup>2</sup>	3570	2848
4	50	27,1	86	750	1000 мкм <sup>2</sup>	16010	14480

Примечание. Размеры АСМ-чипа во всех четырёх случаях были одинаковы и составляли  $7,5 \times 15 \times 0,25$  мм, при этом площадь наибольшей грани чипа составляла  $S_{\text{полн}} = 112,5$  мм<sup>2</sup>.

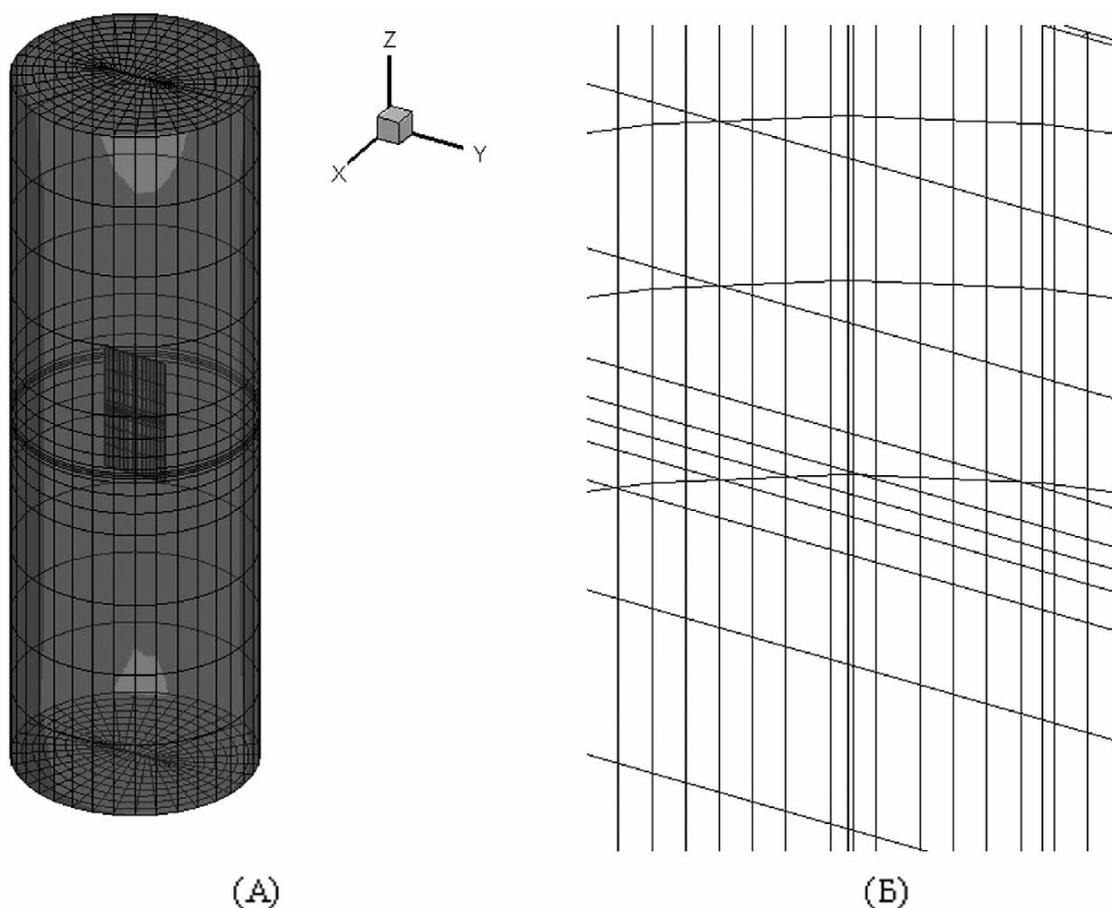


Рисунок 6.

Типовая расчётная сетка для кюветы объёма  $V = 50$  мл при площади активированной зоны АСМ-чипа  $0,4 \text{ мм}^2$  (таблица, случай 2). Геометрические параметры системы: диаметр кюветы  $d=27 \text{ мм}$ , высота кюветы  $86 \text{ мм}$ , размеры АСМ-чипа  $7,5 \times 15 \times 0,25 \text{ мм}$ .

(А) Изображение моделируемой области. (Б) Увеличенное изображение фрагмента поверхности АСМ-чипа, содержащего активированную зону.

По предложенной модели были проведены расчёты числа молекул, выловленных на поверхность активированной зоны при АСМ-НФ<sub>ХИМ</sub>, от времени фишинга АСМ-чипа при параметрах: начальная концентрация белка от  $10^{-9}$  до  $10^{-17} \text{ М}$ , максимальное время фишинга  $t=3 \text{ ч}$ , объём раствора образца  $1 \text{ мл}$  и  $50 \text{ мл}$ . При расчётах скорость вращения измерительной кюветы, принималась  $900 \text{ об/мин}$  или  $750 \text{ об/мин}$  в случае фишинга из  $1 \text{ мл}$  или  $50 \text{ мл}$  соответственно (таблица).

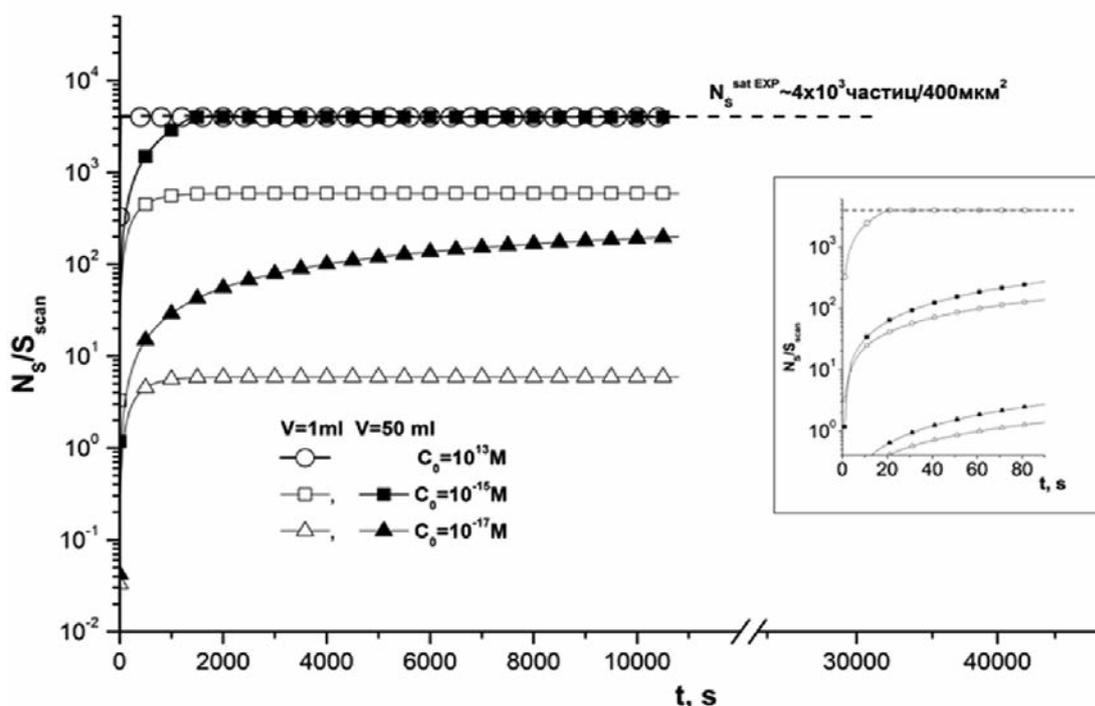
Общая площадь чипа при расчётах соответствовала экспериментальной и составляла  $112,5 \text{ мм}^2$  ( $7,5 \times 15 \text{ мм}$ ). Площадь активированной зоны  $S=0,4 \text{ мм}^2$  чипа также соответствовала экспериментальной. Выбор для расчётов площади активированной зоны  $S=1000 \text{ мкм}^2$  обусловлен тем, что это минимальное значение площади активированной зоны, которое можно получить с использованием робота Bioforce Nano Arrayer (“Bioforce Nanosciences”, США).

Выбор для расчётов параметра величины объёма  $50 \text{ мл}$  обусловлен тем, что такой объём биоматериала обычно используется для проведения АСМ-фишинга в случае анализа белков с концентрацией  $C_0 < 10^{-16} \text{ М}$ .

Расчёты проведены с использованием пакета GIDR-3M (атт. пасп. №271 Ростехнадзора ФГУ НТЦ по ЯРБ от 18.02.2010).

## ХИМИЧЕСКИЙ НЕОБРАТИМЫЙ ФИШИНГ НИЗКОКОПИЙНЫХ БЕЛКОВ

На рисунке 7 приведены расчётные зависимости числа выловленных молекул на поверхность активированной зоны АСМ-чипа от времени инкубации при различных концентрациях раствора аналита. Теоретический расчет показал, что существует прямая пропорциональная зависимость между количеством выловленных молекул белка и концентрацией раствора аналита.



**Рисунок 7.**

Расчётные зависимости числа выловленных молекул белка  $N_s(t)/S_{scan}$  на поверхность активированной зоны АСМ-чипа при различных значениях объема раствора аналита ( $V$ ) и концентраций раствора аналита ( $C_0$ ). Расчётные параметры:  $V=1$  мл,  $V=50$  мл; начальная концентрация раствора белка  $10^{-13}$  М,  $10^{-15}$  М,  $10^{-17}$  М; площадь активированной зоны  $S=0,4$  мкм<sup>2</sup>, площадь сканирования  $S_{scan}=400$  мкм<sup>2</sup>.

На вставке показано увеличенное изображение начального участка зависимостей.

Емкость поверхности соответствует экспериментальной,  $N_s^{sat EXP}=2 \times 10^4$  частиц/400 мкм<sup>2</sup>.

Теоретически рассчитанное число выловленных молекул на площади сканирования составляет 1/1000 всех выловленных молекул.

Следует отметить, что, по данным расчётов, при объёме раствора аналита  $V=1$  мл, более 90% белковых молекул вылавливается на начальном этапе фишинга, за время менее 1 ч после начала фишинга ( $t \approx 1000$  с = 17 мин), по прошествии которого число выловленных молекул изменяется незначительно. Как показали экспериментальные данные, зарегистрированное число выловленных белковых молекул мало изменяется в течение промежутка времени от 1 до 3 ч. Этот факт подтверждает вывод предложенной модели химического АСМ-фишинга о том, что время эффективного фишинга достаточно небольшое,  $t \leq 1$  часа.

Сравнение расчётных и экспериментальных данных для количества выловленных молекул HRP при различных концентрациях показало, что при  $C_0=10^{-13}$  М,  $C_0=10^{-15}$  М и  $C_0=10^{-17}$  М, количество выловленного белка уменьшалось с уменьшением концентрации, как и предсказывалось теоретическими расчетами. Отметим при этом, что экспериментально

измеренное количество выловленного белка HRP при  $C_0=10^{-13}$  М меньше рассчитанного. Это можно объяснить тем, что поверхность используемого нами АСМ-чипа имеет ограниченную ёмкость, то есть в активированной зоне может разместиться конечное число молекул белка  $N_S^{maxEXP}=4 \times 10^3$  молекул/400 мкм<sup>2</sup> (как было показано в эксперименте с HRP при  $C_0=10^{-13}$  М). Поэтому при фишинге белков из раствора высокой концентрации происходит насыщение по количеству выловленных молекул на поверхности активированной зоны чипа, что и наблюдается в эксперименте для концентрации  $10^{-13}$  М, как отмечалось выше. В случае фишинга авидина при  $C_0=10^{-13}$  М уменьшение числа зарегистрированных выловленных молекул белка связано с уменьшением высоты их АСМ-изображений из-за диссоциации авидина при этой концентрации, в результате чего было затруднительно зарегистрировать все выловленные молекулы этого белка.

Результаты расчета числа выловленных молекул от времени проведения фишинга при варьировании параметра объема раствора аналита представлены на рисунке 7. Как видно из рисунка 7, в случае объема аналита  $V=1$  мл на поверхность активированной зоны (площадью  $S=0,4$  мм<sup>2</sup>) за время фишинга  $t=3$  ч должны вылавливаться практически все молекулы, присутствующие в растворе  $N_S \sim N_S^{lim}$ . Величина  $N_S^{lim}=N_A \times C_0 \times V$  при объеме раствора белка  $V=1$  мл составляет  $6 \times 10^5$  молекул при  $C_0=10^{-15}$  М и  $6 \times 10^3$  молекул при  $C_0=10^{-17}$  М. Однако в случае фишинга из объема  $V=50$  мл при тех же условиях вылавливается лишь  $N_S=0,66 \times N_S^{lim}$  молекул,  $N_S^{lim}$  при  $V=50$  мл и  $C_0=10^{-17}$  М составляет  $3 \times 10^5$  молекул. Таким образом, использование большего объема раствора аналита ( $V=50$  мл) приводит к увеличению общего числа выловленных молекул вследствие увеличения числа молекул, присутствующих в системе [27], что и было получено в наших экспериментах.

Таким образом, предложенная модель, учитывающая высокоэффективное перемешивание белка в растворе при АСМ-НФ<sub>Хим</sub>, удовлетворительно описывает результаты экспериментов.

*Анализ возможностей понижения DL метода АСМ-НФ<sub>Хим</sub>.* Одним из важных является вопрос повышения чувствительности метода АСМ-НФ<sub>Хим</sub>. Как отмечалось выше, это возможно за счёт увеличения эффективности концентрирования и за счёт повышения чувствительности детектирующей системы.

Рассмотрим вначале возможность повышения фактора концентрирования  $F$ , то есть возможность увеличения количества молекул, выловленных на поверхность активированной зоны АСМ-чипа. Как следует из уравнения (1.2), значение  $F$  обратно пропорционально площади активации  $S$  и прямо пропорционально объёму раствора аналита. Следовательно, эффективность концентрирования повысится с уменьшением площади активации. Теоретические расчёты были проведены для разных площадей активации –  $S=1000$  мкм<sup>2</sup> и  $S=0,4$  мм<sup>2</sup>. Выбор минимальной площади 1000 мкм<sup>2</sup> обусловлен тем, что это минимально возможная площадь активации, которую можно экспериментально сформировать при помощи коммерческого робота-раскапывателя, например, NanoArrayer (“Bioforce Nanosciences”). Этот робот позволяет наносить растворы на поверхность с минимальным объёмом 0,5 пл, при этом площадь пятна, образующегося при нанесении такого объема раствора белка на силанизированную поверхность, составляет ~1000 мкм<sup>2</sup>. На рисунке 8 представлены расчетные зависимости числа выловленных молекул от времени фишинга для площади активированной зоны как 1000 мкм<sup>2</sup>, так и 0,4 мм<sup>2</sup>, отражающие влияние размера активированной зоны на эффективность фишинга. Из рисунка 8 видно, что в случае

## ХИМИЧЕСКИЙ НЕОБРАТИМЫЙ ФИШИНГ НИЗКОКОПИЙНЫХ БЕЛКОВ

фишинга с использованием активированной зоны меньшей площади (1000 мкм<sup>2</sup>) существенно, на 3 порядка, возрастает число молекул, зарегистрированных на общей площади АСМ-сканирования ( $S_{scan}=400$  мкм<sup>2</sup>), что и следует из уравнения (1.2).

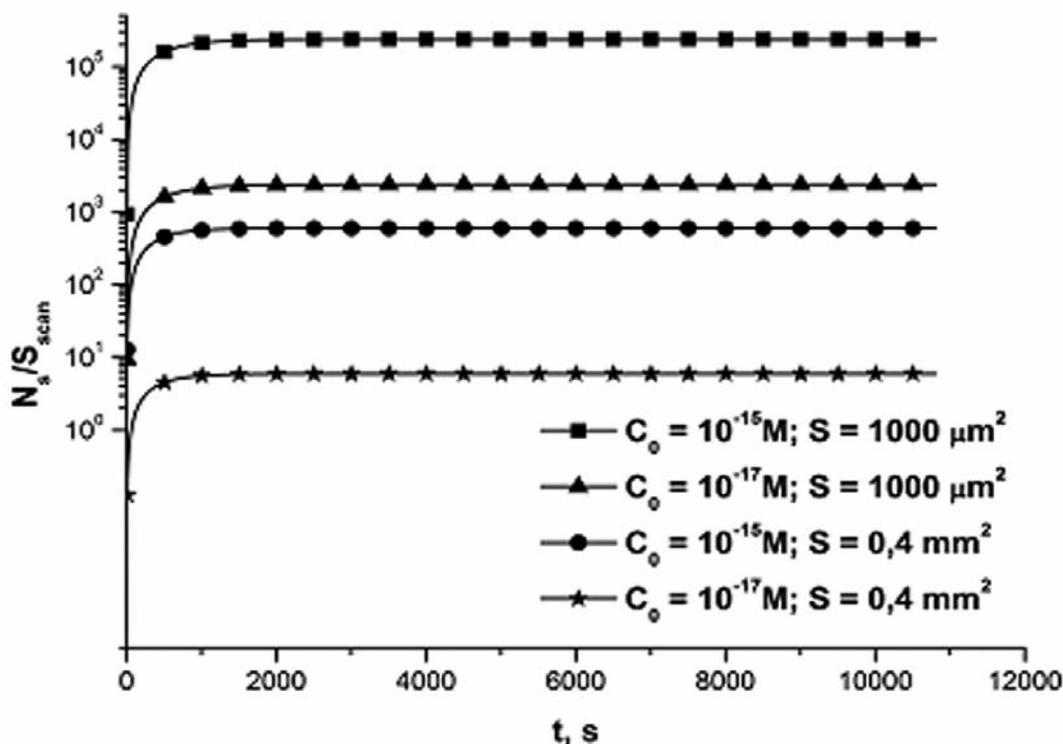


Рисунок 8.

Расчётные зависимости числа выловленных молекул белка  $N_s(t)/S_{scan}$  на поверхность активированной зоны АСМ-чипа при различных значениях площади активированной зоны ( $S$ ) и концентраций раствора аналита ( $C_0$ ). Расчётные  $S=0,4$  мм<sup>2</sup>,  $S=1000$  мкм<sup>2</sup>;  $C_0=10^{-15}$  М,  $C_0=10^{-17}$  М; объём раствора  $V=1$  мл, площадь сканирования  $S_{scan}=400$  мкм<sup>2</sup>.

Прямая пропорциональная зависимость фактора концентрирования  $F$  и объёма раствора аналита может следующим образом влиять на чувствительность метода АСМ-НФХим. С одной стороны, как следует из рисунка 7, при постоянной площади активированной зоны увеличение объёма раствора аналита приводит к снижению скорости фишинга белка. С другой стороны, очевидно, что при одинаковой начальной концентрации аналита  $C_0$  больший объём раствора содержит большее число молекул, что приведет к увеличению общего числа выловленных молекул.

Повышение чувствительности детектирующей системы, то есть АСМ-регистрации, возможно за счёт понижения количества АСМ-изображений артефактных объектов.

При рассмотрении возможных путей увеличения чувствительности метода АСМ-НФХим необходимо, также учитывать свойства поверхности, на которую происходит вылавливание белков. В идеальном случае плотность посадки выловленных в результате АСМ-НФХим молекул такова, что последние могут располагаться на поверхности активированной зоны АСМ-чипа в виде монослоя. Это соответствует расчётному значению поверхностной концентрации белка  $N_s^{sat THEOR}$ , равному  $8 \times 10^7$  молекул/1000 мкм<sup>2</sup> для НРР и  $3,5 \times 10^7$  молекул/1000 мкм<sup>2</sup> для авидина. В то же время экспериментальные

данные показали, что наблюдается меньшая насыщаемость поверхности активированной зоны молекулами белка (названная нами ранее как ёмкость АСМ-чипа). В условиях проведенных нами экспериментов верхний предел поверхностной концентрации составил  $4 \times 10^3$  молекул/400 мкм<sup>2</sup> (что соответствует  $1,25 \times 10^4$  молекул/1000 мкм<sup>2</sup>) для HRP, что на 3 порядка ниже расчётного значения. Это может быть обусловлено влиянием различных факторов: характером распределения поверхностных зарядов белков; электростатическим взаимодействием белковых молекул с поверхностью АСМ-чипа; различными стерическими факторами; деградацией (деактивацией) активных групп поверхности АСМ-чипа под действием среды и т.д.

Предложенная в настоящей работе теоретическая модель позволяет выполнить теоретическую оценку  $DL$  метода АСМ-НФ<sub>ХИМ</sub> для минимальной площади активированной зоны 1000 мкм<sup>2</sup>, реализуемую с помощью робота-раскапывателя. На рисунке 9 представлены зависимости числа выловленных молекул белка от времени фишинга при различных концентрациях раствора аналита и следующих условиях: объём раствора аналита 50 мл, площадь активированной зоны 1000 мкм<sup>2</sup>. На этом же графике показано предельное теоретически возможное число выловленных молекул, равное  $N_s^{sat THEOR} = 7,8 \times 10^7$  молекул/1000 мкм<sup>2</sup>. Как видно из рисунка 9, при указанных выше условиях, фишинг белка из раствора с  $C_0 = 10^{-18}$  М позволит за время  $t = 3$  ч выловить  $N_s = 7,8 \times 10^3$  молекул/1000 мкм<sup>2</sup>, что в 6,24 раза превышает порог чувствительности АСМ-детекции, достигнутый в нашем эксперименте:  $N_s^{cat} = 500$  молекул/400 мкм<sup>2</sup> =  $1,25 \times 10^3$  молекул/1000 мкм<sup>2</sup>.

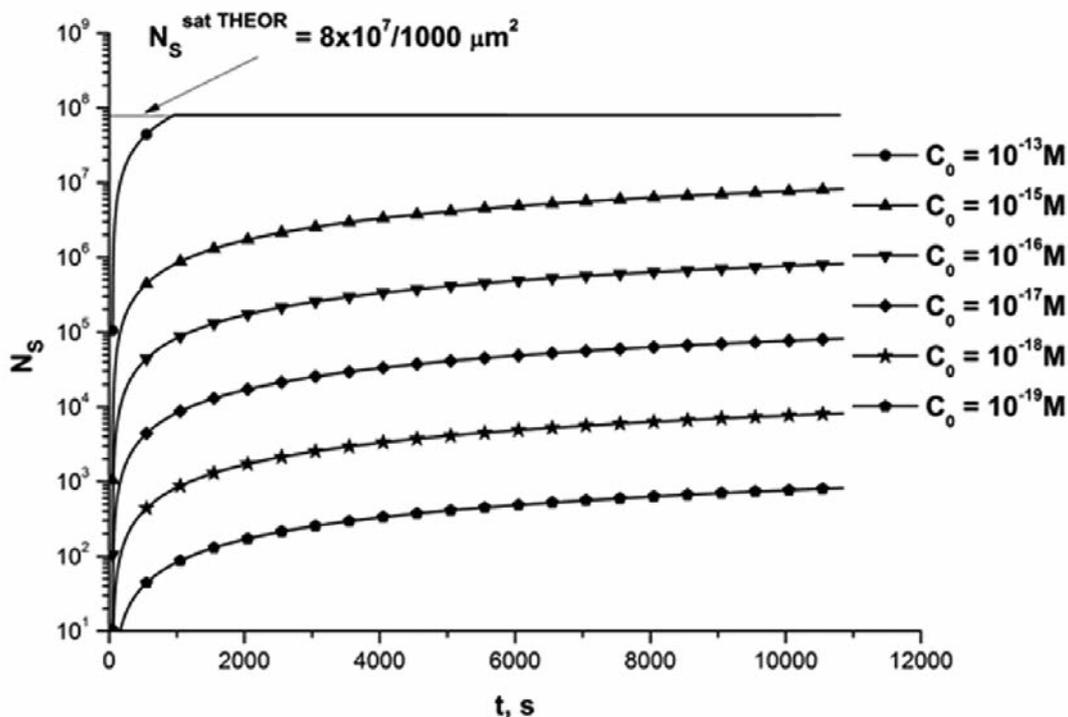


Рисунок 9.

Расчётные зависимости числа выловленных молекул белка ( $N_s$ ) на поверхность активированной зоны АСМ-чипа от времени инкубации ( $t$ ) при различных значениях концентраций раствора аналита ( $C_0$ ). Расчётные параметры: площадь активированной зоны  $S = 1000$  мкм<sup>2</sup>;  $C_0 = 10^{-13}$  М –  $10^{-19}$  М; объём раствора  $V = 50$  мл. Предельное теоретически возможное число выловленных молекул принято равным  $N_s^{sat THEOR} = 7,8 \times 10^7$  молекул/1000 мкм<sup>2</sup>.

**ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ВЫВОДЫ.** Проведена регистрация НРР в растворе с помощью химического АСМ-фишинга. Экспериментально достигнут концентрационный предел чувствительности  $DL=10^{-17}$  М при времени фишинга 3 ч. Для описания процесса АСМ-НФ<sub>ХИМ</sub> предложена теоретическая модель, учитывающая вклад концентрирования белка на АСМ-подложке. Показано, что для проведения АСМ-НФ<sub>ХИМ</sub> достаточно времени инкубации  $t < 1$  часа, что согласуется с данными экспериментов по фишингу НРР. Оценены перспективы дальнейшего снижения  $DL$  метода АСМ-НФ<sub>ХИМ</sub> и повышения его чувствительности. Показано, что теоретически возможный предел АСМ-детекции составляет  $DL \sim 10^{-18}$  М при пороге чувствительности АСМ-детекции 500 частиц на площадь сканирования 400 мкм<sup>2</sup>.

Работа была выполнена при поддержке ФЦП “Научные и научно-педагогические кадры инновационной России” ГК № 02740.11.0791, РФФИ № 11-04-12018-офи\_м.

### ЛИТЕРАТУРА

1. Myszka D.G., He X., Dembo M., Morton Th.A., Goldstein B. (1998) *Biophys. J.*, **75**, 583-594.
2. Schuck P. (1996) *Biophys. J.*, **70**, 1230-1249.
3. Goyal D.K., Subramanian A. (2010) *Thin Solid Films*, **518**, 2186-2193.
4. Zubitsov D.A., Savvateeva E.N., Rubina A.Yu., Pun'kov S.V., Konovalova E.V., Moiseeva O.V., Chechetkin V.R., Zasedatelev A.S. (2007) *Anal. Biochem.*, **368**, 205-213.
5. Ivanov Yu.D., Kanaeva I.P., Eldarov M.A., Skryabin K.G., Lehnerer M., Schulze J., Hlavica P., Archakov A.I. (1997) *Biochem. Mol. Biol. Int.*, **42**, 731-737.
6. Archakov A.I., Ivanov Yu.D. (1998) in: *Biophysics of Electron Transfer and Molecular Bioelectronics*. Plenum Press, USA, 173-196.
7. Ivanov Yu.D., Kanaeva I.P., Kuznetsov V.Yu., Lehnerer M., Schulze J., Hlavica P., Archakov A.I. (1999) *Arch. Biochem. Biophys.*, **362**(1), 87-93.
8. Ivanov Yu.D., Usanov S.A., Archakov A.I. (1999) *Biochem. Mol. Biol. Int.*, **47**, 327-336.
9. Koval V.V., Gnedenko O.V., Ivanov Yu.D., Fedorova O.S., Archakov A.I., Knorre D.G. (1999) *IUBMB LIFE*, **48**, 317-320.
10. Морозов С.Г., Иванов Ю.Д., Учайкин В.Ф., Каражас Н.В., Вахрушина С.В., Гнеденко О.В., Конев В.А., Ковалев О.Б., Арчаков А.И. (1999) *Аллергия, астма и клиническая иммунология*, **9**, 187-189.
11. Ivanov Yu.D., Kanaeva I.P., Archakov A.I. (2000) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **273**, 750-752.
12. Ivanov Yu.D., Kanaeva I.P., Karuzina I.P., Archakov A.I., Hui Bon Hoa G., Sligar S.G. (2001) *J. of Inorg. Biochem.*, **391**, 255-264.
13. Ivanov Yu.D., Kanaeva I.P., Karuzina I.P., Usanov S.A., Hui Bon Hoa G., Sligar S.G., Archakov A.I. (2001) *J. of Inorg. Biochem.*, **87**, 175-184.
14. Ivanov Yu.D., Kanaeva I.P., Gnedenko O.V., Pozdnev V.F., Shumyantseva V.V., Samenkova N.F., Kuznetsova G.P., Tereza A.M., Schmid R.D., Archakov A.I. (2001) *J. Mol. Recognit.*, **14**, 185-196.
15. Семенова Н.В., Иванов Ю.Д., Гнеденко О.В., Конев В.А., Ковалев О.Б., Учайкин В.Ф., Морозов С.Г., Арчаков А.И. (2001) *Новости науки и техники. Аллергия, астма и клиническая иммунология*, **1**, 183-185.

16. Иванов Ю.Д., Гнеденко О.В., Конев В.А., Ковалев О.Б., Николаева Л.И., Семенова Н.В., Учайкин В.Ф., Арчаков А.И. (2001) *Вопр. мед. химии*, **47**, 419-425.
17. Иванов Ю.Д., Панова Н.Г., Гнеденко О.В., Бунеева О.А., Медведев А.Е., Арчаков А.И. (2002) *Вопр. мед. химии*, **48**, 73-83.
18. Дмитриев Д.А., Массино Ю.С., Сегал О.Л., Смирнова М.Б., Павлова Е.В., Коляскина Г.И., Гуревич К.Г., Гнеденко О.В., Иванов Ю.Д., Арчаков А.И. Осипов А.П., Дмитриев А.Д., Егоров А.М. (2002) *Биохимия*, **67**, 1643-1654.
19. Dmitriev D.A., Massino Y.S., Segal O.L., Smirnova M.B., Pavlova E.V., Gurevich K.G., Gnedenko O.V., Ivanov Y.D., Kolyaskina G.I., Archakov A.I., Osipov A.P., Dmitriev A.D., Egorov A.M. (2002) *J. Immunol. Methods*, **261**, 103-118.
20. Иванов Ю.Д., Гнеденко О.В., Николаева Л.И., Конев В.А., Ковалев О.Б., Учайкин В.Ф., Говорун В.М., Покровский В.И., Арчаков А.И. (2003) *Журн. Микробиол.*, №2, 58-62.
21. Motunaliyev K.T., Govorun V.M., Gnedenko O.V., Ivanov Yu.D., Archakov A.I. (2003) *J. Mol. Recognit.*, **16**, 1-8.
22. Раченкова Н.И., Иванов Ю.Д., Скворцов В.С., Иванов А.С., Молнар А.А., Уи Бон Ва Г., Арчаков А.И. (2005) *Биомед. химия*, **51**, 501-512.
23. Раченкова Н.И., Иванов Ю.Д., Молнар А.А., Арчаков А.И. (2005) *Биомед. химия*, **51**(6), 614-623.
24. Иванов Ю.Д., Иванов А.В., Петушкова Н.А., Гара О.Г., Кузнецов В.Ю., Подоппелов А.В., Арчаков А.И. (2008) *Биомед. химия*, **54**, 435-444.
25. Ivanov Yu.D., Govorun V.M., Bykov V.A., Archakov A.I. (2006) *Proteomics*, **6**, 1399-1414.
26. Gaster R.S., Xu L., Han S.-J., Wilson R.J., Hall D.A., Osterfeld S.J., Yu H., Wang S.X. (2011) *Nat. Nanotechnol.*, **6**, 314-320.
27. Archakov A.I., Ivanov Y.D., Lisitsa A.V., Zgoda V.G. (2007) *Proteomics*, **7**, 4-9.
28. Archakov A.I., Ivanov Y.D., Lisitsa A.V., Zgoda V.G. (2009) *Proteomics*, **9**, 1326-1343.
29. Snyder M. (2011) Encode the Human Parts List, in: HUPPO 2011 – 10<sup>th</sup> World Congress. HPP Plenary Session.
30. Иванов Ю.Д., Учайкин В.Ф., Плевакова Т.О., Французов П.А., Светлов С.К., Конев В.А., Ковалев О.Б., Ястребова О.Н., Свешников П.Г., Уланова Т.И., Арчаков А.И. (2006) *Физиол. и патол. иммун. сист.*, **10**, №12, 11-14.
31. Кайшева А.Л., Иванов Ю.Д., Згода В.Г., Французов П.А., Плевакова Т.О., Крохин Н.В., Зиборов В.С., Арчаков А.И. (2010) *Биомед. химия*, **56**, 26-39.
32. Dexlin-Melby L., Sandstrom A., Antberg L., Gumarsson J., Hansson S.R., Borrebaeck C.A.K., Wingren C. (2011) *Proteomics*, **11**, 1550-1554.
33. Stern E., Vacic A., Rajan N.K., Criccione J.M., Park J., Ilic B.R., Mooney D.J., Reed M.A., Fahmy T.M. (2010) *Nat. Nanotechnol.*, **5**, 138-142.
34. Zheng G., Gao X.P.A., Lieber C.M. (2010) *Nano Lett.*, **10**, 3179-3183.
35. Kiselyova O.I., Yaminsky I.V., Ivanov Yu.D., Kanaeva I.P., Kuznetsov V.Yu., Archakov A.I. (1999) *Arch. Biochem. Biophys*, **371**, 1-7.
36. Kuznetsov V.Yu., Ivanov Yu.D., Bykov V.A., Saunin S.A., Fedorov I.A., Lemeshko S.V., Hui Bon Hoa, Archakov A.I. (2002) *Proteomics*, **2**, 1699-1705.
37. Archakov A.I., Ivanov Y.D. (2002) *Methods Enzymol.*, **357**, 94-103.
38. Kuznetsov V.Yu., Ivanov Yu.D., Archakov A.I. (2004) *Proteomics*, **4**, 2390-2396.
39. Archakov A.I., Ivanov Yu.D. (2007) *Mol. Biosyst.*, **3**, 336-342.
40. Medvedeva N.V., Ipatova O.M., Ivanov Yu.D., Drozhzhin A.I., Archakov A.I. (2007) *Biochemistry (Moscow) Suppl. Series B: Biomedical Chemistry*, **1**, 114-124.

41. *Ivanov Y.D., Frantsuzov P.A., Ivanov A.V., Bykov V.A., Besedin S., Hui Bon Hoa, Archakov A.I.* (2010) *Anal. Methods*, **2**, 688-693.
42. *Ivanov Y.D., Frantsuzov P.A., Zullner A, Medvedeva N.V., Archakov A.I., Reinle W., Bernhardt R.* (2011) *Nanoscale Res. Lett.*, **6**, 54.
43. *Лиманская Л.А., Лиманский А.П.* (2006) *Биоорган. химия*, **32**, 1-17.
44. *Vijayendran R.A., Ligler F.S., Leckband D.E.* (1999) *Anal. Chem.*, **71**, 5405-5412.
45. *Ramsden J.J., Vachmanova G.I., Archakov A.I.* (1996) *Biosens. Bioelectron.*, **11**(5), 523-528.
46. *Левич В.Г.* (1959) *Физико-химическая гидродинамика*, Гос. Изд-во физико-математической литературы, М.
47. *Zheng G., Patolsky F., Cui Y., Wang W.U., Lieber C.M.* (2005) *Nature Biotechnol.*, **23**, 1294-1301.
48. *Kim A. et al.* (2007) *Appl. Phys. Lett.*, **91**, 103901.
49. *Cai D., Ren L., Zhao H., Xu C., Zhang L., Yu Y., Wang H., Lan Y., Roberts M.F., Chuang J.H., Naughton M.J., Ren Z., Chiles T.C.* (2010) *Nat. Nanotechnol.*, **5**, 597-601.
50. *Hermanson G.T.* (2008) *Bioconjugate Techniques*, Acad. Press, 2008, 1060 p.
51. *Mattson G., Conklin E., Desai S., Nielander G.* (1993) *Mol. Biol. Reports*, **17**, 167-183.
52. *Иванов Ю.Д., Бухарина Н.С., Французов П.А., Плешакова Т.О., Мунро А.В., Хуэй Бон Хоа Г., Арчаков А.И.* (2010) *Нанотехнологии и охрана здоровья*, **II**(1), 30-35.
53. *Braga P.C., Ricci D.* (2003) *Methods in Molecular Biology*, **242**, Atomic Force Microscopy. *BiologyBiomedical Methods and Applications*. Humana Press, NJ, 382 p.
54. *Huff J., Lynch M.P., Nettikadan S., Johnson J.C.* (2004) *J. Biol. Screening*, **9**, 491-497.
55. *Ramacviciene A., Snitka V., Mieliauskiene R., Ramanavicius A.* (2006) *Cent. Eur. J. Chem.*, **4**(1), 194-206.
56. *Медведева Н.В., Ипатов О.М., Иванов Ю.Д., Дрожжин А.И., Арчаков А.И.* (2006) *Биомед. химия*, **52**, 529-546.
57. *Archakov A.I., Ivanov Yu.D.* (2011) *Biochim. Biophys. Acta*, **1814**, 102-110.
58. *Calabro M.A., Katz J.T., Holloway P.W.* (1976) *J. Biol. Chem.*, **251**, 2113-2118.
59. *Green N.M.* (1964) *Biochem. J.*, **92**, 16C-17C.
60. *Hai Feng L., Yuwen L., Xiaomin C., Zhiyong W., Cunxin W.* (2008) *J. Therm. Anal. Calorim.*, **93**, 569-574.
61. *Davies P.S., Rennke H.G., Cotran R.S.* (1981) *J. Cell. Sci.*, **49**, 69-86.
62. *Haniu M., Armes L.G., Yasunobu K.T., Shastry B.A., Gunsalus I.C.* (1982) *J. Biol. Chem.*, **257**, 12664-12671.
63. *Chu J.-W., Kimura T.* (1973) *J. Biol. Chem.*, **248**, 2089-2094.
64. *Unger B.P., Gunsalus I.C., Sligar S.G.* (1986) *J. Biol. Chem.*, **261**, 1158-1163.
65. *Bussolati G., Gugliotta P.* (1983) *J. Histochem. Cytochem.*, **31**, 1419-1421.
66. *Xialing C., Lin M.* (2009) *J. Biochem. Tech.*, **1**, 92-95.
67. *Лойцянский Л.Г.* (1978) *Механика жидкости и газа*, Наука, М.
68. *Даничев В.В., Загуменный М.Н., Смирнов Л.П.* (2006) *Труды Четвёртой Российской национальной конференции по теплообмену*, **3**, Издательский дом МЭИ, М., с. 219-222.
69. *Патанкар С.* (1984) *Численные методы решения задач теплообмена и динамики жидкости*, Энергоатомиздат, М.
70. *Wu H., Patterson G.K.* (1989) *Chem. Eng. Sci.*, **44**, 2207-2221.

71. Даничев В.В., Загуменный М.Н., Карташева Е.Л., Федюшкин А.И. (2005) Труды Второй Российской конференции “Тепломассообмен и гидродинамика в закрученных потоках”, 15-17 марта 2005 г. Москва, МЭИ (электронный ресурс).
72. Лапин Ю.В., Гарбарук А.В., Стрелец М.Х. (2004) Научно-технические ведомости, **2**, 1-31.
73. Пригожин И., Дефэй Р. (1966) Химическая термодинамика (пер. с англ.), Наука, Новосибирск.

Поступила: 20. 01. 2012.

#### IRREVERSIBLE CHEMICAL AFM-FISHING FOR THE DETECTION OF LOW-COPIED PROTEINS

*Yu.D. Ivanov<sup>1</sup>, V.V. Danichev<sup>2</sup>, T.O. Pleshakova<sup>1</sup>, I.D. Shumov<sup>1</sup>, V.S. Ziborov<sup>3</sup>, N.V. Krokhin<sup>1</sup>, M.N. Zagumenny<sup>2</sup>, V.S. Ustinov<sup>2</sup>, L.P. Smirnov<sup>2</sup>, A.V. Shironin<sup>1</sup>, A.I. Archakov<sup>1</sup>*

<sup>1</sup>Orekhovich institute of biomedical chemistry of the Russian academy of medical sciences, Pogodinskaya ul., 10, Moscow, 119121 Russia; tel.: (7)(499)2463761; fax: (7)(499)2450857; e-mail: shum230988@mail.ru

<sup>2</sup>NRC “Kurchatov institute”, Acad. Kurchatova pl., 1, Moscow, 123182 Russia

<sup>3</sup>Joint Institute for High Temperatures of Russian Academy of Sciences, Izhorskaya ul., 13, bld. 2., Moscow, 125412 Russia.

The atomic-force microscopy-based method of irreversible chemical AFM-fishing (AFM-IF<sub>Ch</sub>) has been developed for the detection of proteins at ultra-low concentrations in solution. Using this method, a very low concentration of horseradish peroxidase (HRP) protein (10<sup>-17</sup> M) was detected in solution. A theoretical model that allows the description of obtained experimental data, is proposed. This model takes into consideration both the transport of the protein from the bulk solution onto the AFM-chip surface and its irreversible binding to the activated area.

**Key words:** AFM-fishing, AFM-chip, low-copied proteins.