

©Коллектив авторов

ТЕХНОЛОГИЯ АСМ-ФИШИНГА ДЛЯ ОБНАРУЖЕНИЯ БЕЛКОВ В РАСТВОРАХ

Т.О. Плешакова, М.О. Ершова, А.А. Валугева, И.А. Иванова, Ю.Д. Иванов, А.И. Арчаков*

Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича,
119121, Москва, ул. Погодинская, 10; *эл. почта: i.a.ivanova@bk.ru

Рассмотрена возможность использования атомно-силовой микроскопии (АСМ) как базового метода для обнаружения белков в растворах с низкими концентрациями. Востребованность новых биоаналитических подходов обусловлена проблемой недостаточной чувствительности систем, используемых в рутинной практике для детекции белков. Приведены примеры использования в биоанализе комбинации методов АСМ и фишинга — способа концентрирования биомолекул из большого объема анализируемого раствора на небольшом участке поверхности.

Ключевые слова: атомно-силовая микроскопия; биоспецифический фишинг; детекция белков

DOI: 10.18097/PBMC20247005273

ВВЕДЕНИЕ

В пятидесятых годах прошлого столетия академик В.Н. Орехович в своём докладе предположил, что в крови может встречаться до сотен различных высокомолекулярных азотсодержащих соединений [1]. Согласно [2], все белки, упомянутые в этом докладе, на современном этапе развития медицины служат маркерами заболеваний, применяемыми для определения функционального статуса печени, поражения сердечно-сосудистой системы, нарушения работы почек, системы свертываемости крови, аутоиммунных патологий и др. Однако поиск новых маркеров заболеваний всё ещё остается актуальной задачей биомедицинских исследований. Но скромное количество тестов, нашедших практическое применение, резко контрастирует с десятками тысяч опубликованных за последние два десятилетия потенциальных биомаркеров. Одна из причин такой ситуации — ограниченная чувствительность аналитических методов при анализе молекулярного профиля [3, 4].

В геномике проблема не так остро выражена вследствие того, что единичная молекула нуклеиновой кислоты теоретически может быть бесконечно размножена методом полимеразной цепной реакции (ПЦР). На сегодняшний день успешно расшифрован геном, но надежды, возлагаемые учёными и медиками на медицинскую значимость полученных данных, не оправдались. Прогресс достигнут в диагностике редких заболеваний, что, возможно, связано не столько с развитием постгеномных технологий, сколько с изобретением ПЦР более 30 лет назад [2]. Одна из причин, как уже указывалось выше, связана с недостаточной чувствительностью аналитических методов. До уровня 10^{-10} М работают иммуноферментные методы, позволяющие регистрировать в биологических образцах высококопийные белки. “Аналитические методы работают до уровня 10^{-14} М; дальше начинается terra incognita” [2]. “Концентрация 10^{-12} М

является порогом, за которым содержание молекул целесообразно выражать не в концентрационных единицах, а в “штуках” — как результат “инвентаризации” молекулярного состава образца” [5]. С целью “инвентаризации” белков применяются молекулярные детекторы, основанные на сенсорных элементах, размеры которых сравнимы с размерами биомолекул, т.е. наносенсоры или молекулярные детекторы [6]. Разработка методов обнаружения с использованием молекулярных детекторов реализуется в рамках развития технологий, связанных с наномедициной: наноаналитическая геномика и протеомика в создании нанодиагностикумов. Использование молекулярных детекторов — это возможность увеличения чувствительности методов детектирования белков в глубинных низко- и ультранизкокопийных областях [7].

Основные измерительные методы в биологии позволяют регистрировать сигнал только от незначительной части молекул белков. При этом, “часть” является ансамблем молекул, в котором не учитывается “индивидуальность” каждой молекулы. Какая чувствительность аналитического метода необходима, чтобы выявить единичные предвестники, имеющие связь с молекулярной патологией до клинических проявлений [2]? При небольшой опухоли (менее 1 мм³ [8]), которая не наблюдается современными методами визуализации (магнитно-резонансной томографией), имеется несколько миллионов трансформированных клеток, но не ясно присутствуют ли в крови биомаркеры. Hori и Gambhir [8] выполнили расчёты на основе математической модели, которая описывает динамическую кинетику биомаркеров в плазме относительно роста опухоли, начиная с одной раковой клетки. Расчёты показали, что для опухоли диаметром около 1 мм единичный биомаркер будет иметь концентрацию в крови порядка 10^{-15} М. Таким образом, обнаружить в плазме крови маркеры патологического процесса сложно из-за их низкого содержания — примерно 1 молекула маркера в 1 мкл крови.

По оценке Rissin и соавт. [9], для диагностики онкологических и вирусных заболеваний концентрационный предел чувствительности (detection limit, DL) диагностических методов также должен быть ниже 10^{-15} М. Однако чувствительность большинства используемых в настоящее время высокопроизводительных стандартных методов протеомики таких, как масс-спектрометрические (МС) методы с использованием одномерного или двумерного электрофореза, жидкостной хроматографии, составляет $DL \leq 10^{-12} - 10^{-14}$ М [10, 11].

Необходимо повысить концентрационную чувствительность аналитических систем на несколько порядков, чтобы обнаружить большое разнообразие функциональных белков с низким содержанием, потенциально способных быть маркерами заболеваний [3, 12, 13].

Где искать низкокопийные белки? В протеомных исследованиях сыворотка крови представляет значительный интерес для поиска биомаркеров заболеваний. Изменения белка в ответ на патологические процессы в организме делают сыворотку привлекательным образцом для клинических исследований [14]. Несмотря на эти преимущества, анализ протеома сыворотки является весьма сложной задачей из-за широкого динамического диапазона белков. Затруднение также вызывает обнаружение целевых аналитов при низкой концентрации в связи с наличием высокопредставленных белков в сыворотке крови, высоких уровней солей и других интерферирующих соединений [3, 15, 16].

Ограниченный объем материала пробы (сыворотки или плазмы) — вторая причина необходимости повышения концентрационной

чувствительности биоаналитических методов. Расчёты показали, что объем образца должен быть около 1 мкл для идентификации белка при концентрации 10^{-8} М в сыворотке с помощью масс-спектрометра (МС). Для идентификации белка в концентрации 10^{-15} М он должен быть около 10 л, что в реальности, очевидно, невозможно [3].

1. МЕТОДЫ ВЫСОКОЧУВСТВИТЕЛЬНОГО ОБНАРУЖЕНИЯ БЕЛКОВ В РАСТВОРАХ

При рассмотрении методов, используемых для решения биологических задач, следует учитывать, что задача исследований свойств единичных биомолекул и задача обнаружения этих молекул в растворе лежат в разных плоскостях. Методы высокочувствительного обнаружения белков в растворах должны учитывать следующие факторы: возможность обнаружения белков в растворах при концентрациях ниже 10^{-12} М; возможность обнаружения белков в сложных биологических жидкостях — сыворотке крови и плазме; “технологичность” метода для анализа протеома сыворотки, включающую сложность процедуры подготовки образцов, так как различие в пробоподготовке в том числе необходимость введения меток, влияет на воспроизводимость результатов анализа протеома.

В учебном пособии Сердюка [17] указывается, что “о существовании макромолекул мы узнаём только благодаря методам, с помощью которых их можно наблюдать ... Не существует единого метода, обеспечивающего всю необходимую информацию о макромолекулах и их взаимодействиях”. Возможности некоторых биофизических методов представлены на рисунке 1. Как видно из рисунка 1,

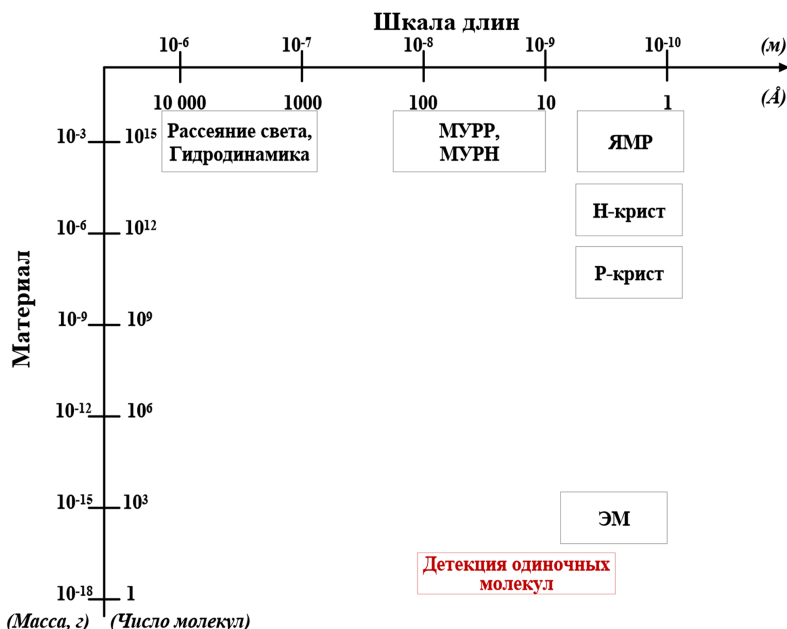


Рисунок 1. Характеристики некоторых биофизических методов при исследовании биомолекул: достигаемое пространственное разрешение (“Шкала длин”) и требуемая для применения масса образца (“Материал”). Сокращения: г – граммы; МУРР и МУРН – малоугловое рассеяние рентгеновских лучей и нейтронов, соответственно; ЯМР – ядерный магнитный резонанс в растворе; Н-крист – нейтронная кристаллография; Р-крист – рентгеновская кристаллография; ЭМ – электронная микроскопия. Число молекул рассчитано на основе допущения, что молекулярная масса материала около 10^5 г/моль. Адаптировано из [17].

несмотря на очень высокое разрешение методов ЯМР и кристаллографии (0,1–1 нм), требуется достаточное большое количество биологического материала (10^9 – 10^{15} усреднённых биомолекул) для проведения исследований. Указанные на рисунке 1 методы могут быть использованы для исследования свойств отдельных биомолекул, но не для их обнаружения.

В работе [18] резюмированы методы, принципиально регистрирующие сигнал от ансамбля молекул, с помощью которых экспериментально обнаружены белки в растворах при ультранизких концентрациях (ниже 10^{-16} М). С момента публикации обзора в 2015 году ситуация принципиально не изменилась. В работе Efimov [19] сравнили два метода на примере обнаружения нуклеокапсидного (N) белка коронавируса — метод DR LPG (double resonance long-period grating — поверхностный плазмонный резонанс решётки с большим периодом) и SPR (surface plasmon resonance — плазмонный резонанс). Показано преимущество метода DR LPG, т.к. с его помощью обнаружили концентрацию 13×10^{-15} М, а с помощью метода SPR обнаружили концентрацию 126×10^{-15} М N-белка. В работе [20] использован усовершенствованный метод SPR — плазмонный метасенсор. В качестве молекулярных зондов были использованы антитела к шиповидному белку коронавируса, в качестве контрольного белка использован бычий сывороточный альбумин (BSA). Усиление сигнала производили с помощью коллоидных частиц золота, конъюгированных с необходимыми антителами. Авторы утверждают, что с помощью данного метода возможна регистрация белка на уровне $4,2 \times 10^{-15}$ М. Также в работе [21] произведена детекция синтетических аналогов белков бета-амилоида (Аβ), тау-белка (τ) и α-синуклеина (αS), вовлечённых в развитие нейродегенеративных заболеваний. В качестве молекулярных зондов авторы использовали специфичные к исследуемым белкам ДНК-аптамеры Аβ7-92-1Н1 (Аβ), F5R1 (αS), IT2 (τ 441). С помощью биосенсора GFET была произведена детекция перечисленных выше белков на уровне фемтомольных концентраций, а именно 10×10^{-15} М Аβ, 1 – 10×10^{-12} М τ и 10 – 100×10^{-15} М αS [21].

Далее подробнее рассмотрим возможности использования атомно-силовой микроскопии (АСМ) как базового метода для обнаружения белков в растворах с низкими концентрациями.

2. КОМБИНАЦИЯ МЕТОДОВ АСМ И ФИШИНГА ДЛЯ ОБНАРУЖЕНИЯ БИОМАКРОМОЛЕКУЛ

АСМ имеет определённые преимущества перед другими методами изучения наноразмерных объектов: метод неdestructивен, имеет высокую разрешающую способность, не требует сложной подготовки препаратов, может быть использован как в воздушной, так и в жидкой фазах, обеспечивая при этом информацию о широком круге физических свойств образца. В то же время метод не позволяет анализировать химический состав изучаемого образца, и время анализа с использованием АСМ

весьма продолжительно. Необходимым условием использования АСМ является закрепление исследуемых объектов на поверхности [22].

АСМ позволяет провести измерения высоты и объёма глобулы белка, иммобилизованного на поверхности субстрата [23, 24]. Определение этих параметров позволяет регистрировать событие образования белковых комплексов на поверхности. Эта возможность — различить белок в свободном состоянии или в составе комплекса на поверхности субстрата — обосновывает использование АСМ как базового метода в биоаналитической системе, предназначенной для обнаружения белков в растворе. Но, как уже говорилось выше, необходимым условием для использования АСМ является закрепление (иммобилизация) исследуемых объектов на поверхности. Выполнение этого условия при обнаружении белков в растворе реализуется за счёт использования процедуры фишинга — концентрирования целевых белков на небольшом участке поверхности из большого объёма анализируемого раствора. Процесс обнаружения белков с помощью комбинации АСМ и фишинга (АСМ-фишинг) состоит из двух этапов [23]: (1) концентрирование биомолекул из большого объёма биологической жидкости на небольшую поверхность; (2) регистрация сигнала от молекул на поверхности с помощью АСМ (регистрация параметров и подсчёт одиночных молекул или комплексов).

Формат АСМ-чипов

Поверхность (её свойства и геометрия) является важным фактором для возможности проведения АСМ-фишинга. В терминологии АСМ-анализа, специальным образом подготовленный атомарно-ровный субстрат называется “АСМ-чип”. При разработке АСМ-чипа, предназначенного для обнаружения белков в растворах, необходимо учитывать перспективу использования АСМ-чипов для мультиплексного анализа. Наиболее ёмким термином, определяющим сущность биочипа, предназначенного как для решения протеомных задач, так и медицинской диагностики, является английский термин “microarrays” (микромассив), т.е. организованный массив молекул на платформе-подложке [25]. Слово “чип” (англ. “chip”), в данном контексте означает “кусочек”, “фрагмент” пластины из стекла, кремния, пластика. Традиционно чиповая диагностика основана на регистрации лиганд-рецепторного взаимодействия. Один из взаимодействующих партнеров — лиганд или рецептор (обобщённое название “молекулярный биологический зонд”) — иммобилизуется на небольшой, но строго определённой (заданной) поверхности чипа — сенсорной зоне, которую называют спот [25]. Каждый спот содержит на поверхности один тип молекулярных зондов. При АСМ-анализе на поверхности также может быть организован массив спотов, поверхность которых модифицирована кросс-линкером — реагентом, ориентированном на иммобилизацию биомолекул за счёт образования ковалентной связи между кросс-линкером и группами биомолекулы.

Примером биоанализа с помощью чипов на основе АСМ может быть система, реализованная в компании “BioForce” (США) для быстрого, чувствительного и неинвазивного обнаружения вирусов [26]. Разработанная платформа состоит из кремниевого чипа с нанесёнными ультрамикрочипами антител (20 полей на чип) и системы АСМ-регистрации.

В работе [27] приведён пример использования олигонуклеотидных микрочипов для решения задач генодиагностики. Использован потенциал АСМ для характеристики морфологии отдельных молекул на поверхности носителя — микрочипа, предназначенного для детекции нуклеиновых кислот. Предложен подход на основе АСМ-исследования поверхности для оценки результатов гибридизации нуклеиновых кислот, меченных золотыми наночастицами, на кремниевых микрочипах.

Белковые чипы менее распространены, чем ДНК-чипы, но представляют собой активно развивающуюся технологию, которая обещает стать мощным средством, в том числе для определения биомаркеров различных заболеваний [28, 29].

Кроме системы регистрации одним из факторов, влияющих на эффективность обнаружения белков с помощью чиповых технологий, является выбор субстрата (подложки) [28]. При выборе оптимальной подложки должны быть оценены такие параметры, как размер и морфология сенсорных зон (спотов), эффективность связывания с антителами (или другими молекулами-лигандами), фоновый сигнал, порог чувствительности, воспроизводимость результатов между разными чипами и экспериментами. Таким образом, подложка должна иметь высокую связывающую способность, способность сохранять активность молекул-лигандов, высокое соотношение сигнал/шум. Следует учитывать, что оптимальные условия могут варьировать для каждого конкретного чипа и задач, под которые он создан. Для обеспечения визуальной ориентации и точного позиционирования кантилевера над каждым спотом (рисунок 2 (III)) для дальнейшего АСМ-изображения нашей группой разработан метод поверхностной маркировки,

основанный на формировании оптически видимых металлических меток на АСМ-чипе с помощью устройства магнетронного распыления [30]. Пример поверхности АСМ-чипа с нанесёнными метками приведён на рисунке 2 (I).

Размеры сенсорной зоны на поверхности АСМ-чипа и расчётная оценка чувствительности анализа

Расчётное обоснование параметров фишинга и теоретическая оценка чувствительности проведена на основе следующих исходных данных. В таблице 1 приведено максимальное количество биомолекул, которое может быть выловлено из раствора с различным объёмом и концентрацией, обозначенное как N_V , т.е. это максимальное количество молекул в растворе, рассчитанное как:

$$N_V = N_A \times C_V \times V \quad (1),$$

где $N_A = 6,02 \times 10^{23}$ — число Авогадро, моль⁻¹; C_V — объёмная концентрация белка моль/л (М); V — объём пробы, л.

Другим фактором, который необходимо учитывать для оценки параметров измерения и параметров фишинга, является скорость сканирования и размер фрейма — единичного скана. На рисунке 3 приведён пример схемы сканирования поверхности чипа.

Размер площади сканирования — единичного фрейма, который является изображением топографии поверхности (S_{fr}) — составляет, как правило, не более 25 мкм². При такой площади и количестве строк сканирования 256 шаг сканирования составляет 20 нм, что позволяет зарегистрировать белок, линейные размеры условно усреднённой макромолекулы которого составляют ~5 нм. Суммарная площадь сканирования $S_{scan} = n \times S_{fr}$, где n — число фреймов, полученных при измерениях. В примере на рисунке 2, для сенсорной зоны в выноске $n = 20$, а $S_{scan} = 500$ мкм². Для нормировки полученных результатов АСМ-анализа и обеспечения возможности сравнения результатов, полученных в том или ином случае, все данные пересчитываются на одинаковую площадь сканирования (например, 400 мкм²).

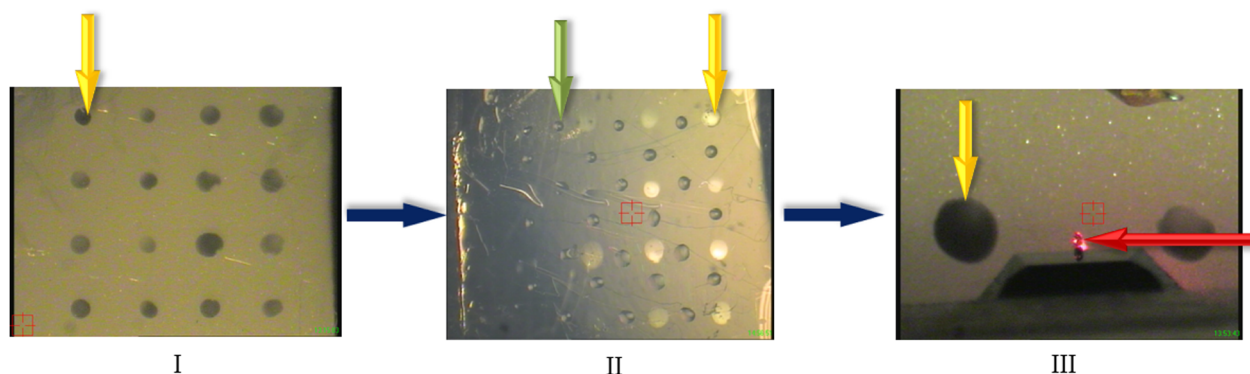


Рисунок 2. Формирование массива сенсорных зон. (I) АСМ-чип с металлическими метками (жёлтые стрелки); (II) На поверхность чипа с помощью робота-раскапывателя наносятся капли растворов (зелёная стрелка) между метками, которые образуют массив молекул на подложке; (III) После процедуры отмывки и инкубации, для сканирования поверхности, кантилевер (красная стрелка) позиционируется над заданной зоной (спот) с контролем по фотоизображению.

Таблица 1. Количество биомолекул в растворе с различными объёмом и концентрацией (N_V)

Концентрация раствора (М)	Объём раствора			
	1 мкл	1 мл	100 мл	500 мл
10^{-10}	60 200 000	60 200 000 000	6 020 000 000 000	30 100 000 000 000
10^{-11}	6 020 000	6 020 000 000	602 000 000 000	3 010 000 000 000
10^{-12}	602 000	602 000 000	60 200 000 000	301 000 000 000
10^{-13}	60 200	60 200 000	6 020 000 000	30 100 000 000
10^{-14}	6 020	6 020 000	602 000 000	3 010 000 000
10^{-15}	602	602 000	60 200 000	301 000 000
10^{-16}	60	60 200	6 020 000	30 100 000
10^{-17}	6	6 020	602 000	3 010 000
10^{-18}		602	60 200	301 000
10^{-19}		60	6 020	30 100
10^{-20}		6	602	3 010

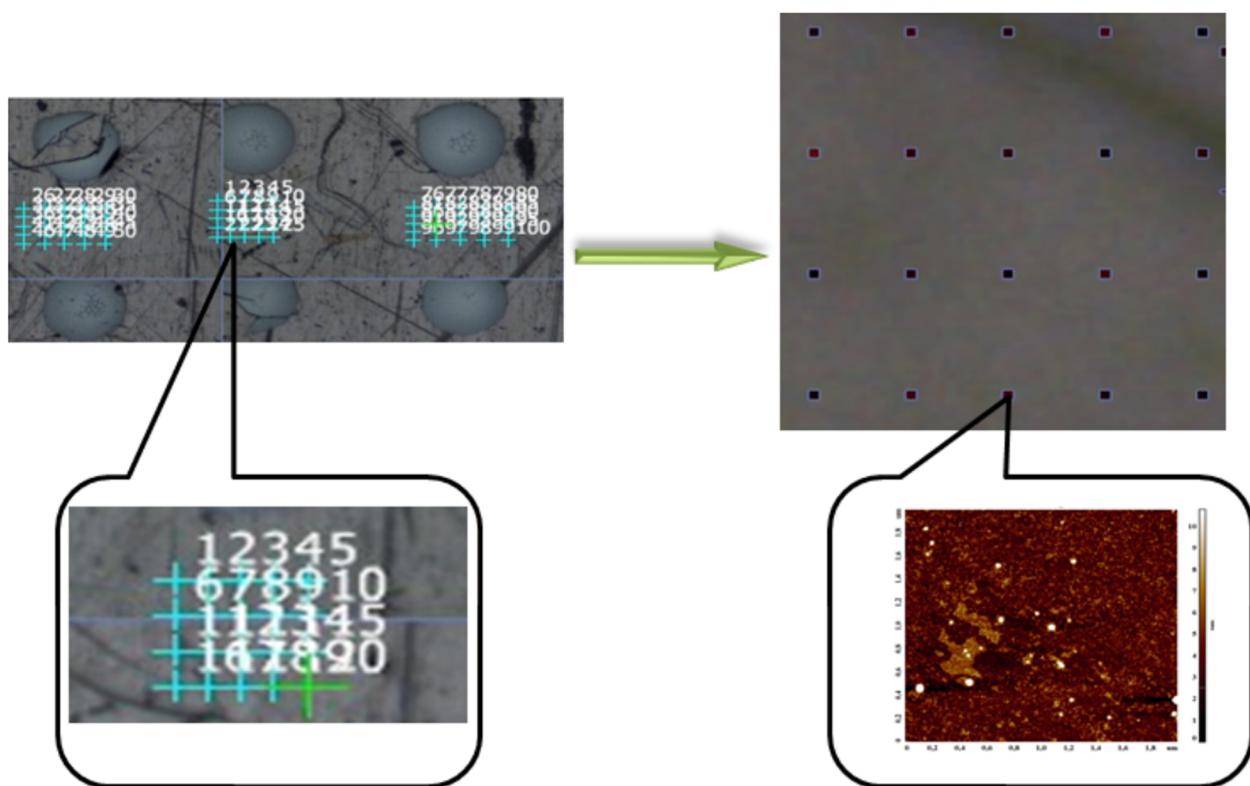


Рисунок 3. Пример схемы выбора точек сканирования на поверхности АСМ-чипа. Левая панель – назначение точек сканирования на видеоизображении поверхности чипа с метками (приведён пример для трёх сенсорных зон). Правая панель – результат сканирования – набор фреймов в заданных точках сканирования. В выносках – увеличенное изображение участка поверхности с массивом точек в пределах одной сенсорной зоны (левая панель); отдельный фрейм в массиве полученных данных сканирования (правая панель).

В работе нашей научной группы использованы АСМ-чипы с двумя основными размерами сенсорной зоны S_{area} . Для “маленькой” сенсорной зоны ($S_{area} = 17663 \text{ мкм}^2$ или $\sim 0,02 \text{ мм}^2$), сформированной при помощи робота-раскапывателя, и “большой”, сформированной при нанесении раствора с помощью лабораторной пипетки ($S_{area} = 1766250 \text{ мкм}^2$ или $\sim 1,8 \text{ мм}^2$), можно оценить время сканирования всей зоны. В таблице 2 приведены параметры расчёта и полученные значения, также приведено время сканирования площади 400 мкм^2 , выбранной как площадь для нормирования результатов.

Как видно из таблицы 2, стандартные приборы АСМ, позволяющие сканировать со скоростью 1 Гц (одна строка в секунду), позволяют визуализировать 400 мкм^2 за 1 ч., но если требуется отсканировать всю площадь сенсорной зоны, то время катастрофически увеличивается. В случае использования среднескоростного АСМ и увеличении скорости сканирования всего в 5 раз, можно получить информацию о поверхности “маленькой зоны” за 10 ч. При использовании стандартных АСМ $S_{scan} = 400 \text{ мкм}^2$ (обозначена S_{400}) обоснованно подходит для нормировки полученных

Таблица 2. Исходные данные и результаты расчёта полного времени сканирования сенсорной зоны на поверхности АСМ-чипа

	S_{area}	Количество фреймов на площади S_{area} , шт	Параметры сканирования				Время сканирования	
			S_{fr} , мкм ²	Частота сканирования, Гц	Количество точек на фрейм	Шаг сканирования, нм	Единичный фрейм	Полная площадь сенсорной зоны
Стандартный АСМ	400 мкм ²	16	25	1	256	20	4,3 мин	1 ч
	0,02 мм ²	707						50 ч
	1,8 мм ²	70650						5024 ч
Среднескоростной АСМ	400 мкм ²	16	25	5	256	20	0,9 мин	0,2 ч
	0,02 мм ²	707						10 ч
	1,8 мм ²	70650						1005 ч

результатов. Приведённое в таблице 2 время является расчётной величиной сканирования без учёта позиционирования, подвода и отвода зонда к поверхности и пр. Таким образом, реальное время измерений возрастает в 2–3 раза. Для оценки результатов эксперимента необходимо учитывать, что S_{400} составляет ~2,3% от площади “маленькой” сенсорной зоны или ~0,02% от “большой”.

Проблема длительного времени измерений на АСМ может быть решена за счёт увеличения скорости сканирования (как показано в таблице 2), а также за счёт автоматизации процесса. На сегодняшний день отечественный прибор АСМ Титаниум (“НТ-МДТ”, Россия), позволяет получить до 700–800 фреймов с поверхности одного образца в течение двух суток. Сканирование может осуществляться по заданным точкам, как показано на рисунке 3, что позволяет исследователю получить выборку фреймов, отражающих состояние поверхности различных участков сенсорной зоны.

В таблице 3 приведено расчётное количество биомолекул ($N_{400,theor}$), которое может быть зарегистрировано на поверхности площадью 400 мкм² в случае вылавливания всех молекул из объёма и их равномерного распределения на всей площади сенсорной зоны.

Данные приведены для типов сенсорных зон, описанных выше в разделе “Формат АСМ-чипов”. Цветом в таблице 3 выделены $N_{400,theor}$, которые могут быть использованы как ориентировочные величины предела детекции $DL_{400,theor}$. Пределы выбраны на основе уровня шума (500 объектов/400 мкм²) — количества неспецифических объектов с высотой более 1 нм, присутствующих на поверхности силанизированной слюды [31]. Следует учесть, что данная оценка выполнена без учёта линейных размеров биомолекул.

Данные расчётов, приведенные в таблице 3, показали, что минимальный объём, из которого целесообразно вылавливать белок в случае применения АСМ-фишинга составляет 1 мл. Также очевидно, что минимальное значение $DL_{400,theor}$ 10³ может быть достигнуто при минимальной площади сенсорной зоны и максимальном объёме анализируемого раствора: $S_{area} = 0,02$ мм² и 100–500 мл.

3. ТИПЫ АСМ-ФИШИНГА

Многообразие типов АСМ-чипов, различающихся свойствами поверхности и геометрией сенсорных зон, обусловлено различными исследовательскими задачами, которые могут решаться с применением технологии АСМ-фишинга (табл. 4).

Для решения методических вопросов может быть использована группа “Неспецифического фишинга”. В схеме фишинга “Неспецифический необратимый (химический)” (табл. 4, строка 1) используется подложка из силанизированной слюды, активированная кросс-линкером. В случае использования метода химического АСМ-фишинга [31] молекулы аналита вылавливаются из раствора не на молекулы-лиганды, а непосредственно на поверхность химически активированной зоны, занимающей небольшую часть поверхности АСМ-чипа (сенсорной зоны). За счёт использования химически активированной зоны происходит неспецифическое необратимое вылавливание белковых молекул, находящихся в анализируемом растворе. В процессе инкубации в растворе белка на поверхности чипа формируется химическая связь между активными группами на поверхности и группами биомолекулы. Цель использования кросс-линкера вместо молекул лиганда — исключение процесса диссоциации комплекса лиганд-мишень. Образование химической связи позволяет необратимо зафиксировать биомолекулы на поверхности.

В схеме фишинга “Неспецифический обратимый” (табл. 4, строка 2) в качестве АСМ-чипа используется высокоориентированный пиролитический графит (ВОПГ). Графит — проводящий материал, поверхность которого обладает гидрофобными свойствами. Цель использования АСМ-чипа из ВОПГ — возможность использования электрических сил как фактора, влияющего на эффективность фишинга [32].

В случае использования чипов с иммобилизованными молекулами-лигандами (аптамерами или антителами), вылавливание целевых биомолекул происходит за счёт биоспецифического взаимодействия лиганд-мишень. Такой вид фишинга может быть обозначен как “Биоспецифический”. Взаимодействие лиганд-мишень является обратимым,

Таблица 3. Расчётная оценка ожидаемого количества биомолекул, которое может быть зарегистрировано на площади 400 мкм² после фишинга из растворов с различными объёмом и концентрацией ($N_{400,theor}$), при условии равномерного распределения всех биомолекул по поверхности сенсорной зоны S_{area}

Площадь сенсорной зоны	Концентрация раствора (М)	Объём раствора			
		1 мкл	1 мл	100 мл	500 мл
$S_{area} = 17663 \text{ мкм}^2$ $\approx 0,02 \text{ мм}^2$ («маленькая»)	10^{-10}	1 363 340	1 363 340 410	136 334 041 047	681 670 205 237
	10^{-11}	136 334	136 334 041	13 633 404 105	68 167 020 524
	10^{-12}	13 633	13 633 404	1 363 340 410	6 816 702 052
	10^{-13}	1 363	1 363 340	136 334 041	681 670 205
	10^{-14}	136	136 334	13 633 404	68 167 021
	10^{-15}	14	13 633	1 363 340	6 816 702
	10^{-16}	1	1 363	136 334	681 670
	10^{-17}		136	13 633	68 167
	10^{-18}		14	1 363	6 817
	10^{-19}		1	136	682
	10^{-20}			14	68
$S_{area} = 158963 \text{ мкм}^2$ $\approx 0,16 \text{ мм}^2$	10^{-10}	151 482	151 482 268	136 334 041 047	681 670 205 237
	10^{-11}	15 148	15 148 227	13 633 404 105	68 167 020 524
	10^{-12}	1 515	1 514 823	1 363 340 410	6 816 702 052
	10^{-13}	151	151 482	136 334 041	681 670 205
	10^{-14}	15	15 148	13 633 404	68 167 021
	10^{-15}	2	1 515	1 363 340	6 816 702
	10^{-16}		151	136 334	681 670
	10^{-17}		15	13 633	68 167
	10^{-18}		2	1 363	6 817
	10^{-19}			136	682
	10^{-20}			14	68
$S_{area} = 1766250 \text{ мкм}^2$ $\approx 1,8 \text{ мм}^2$ («большая»)	10^{-10}	13 633	13 633 404	1 363 340 410	6 816 702 052
	10^{-11}	1 363	1 363 340	136 334 041	681 670 205
	10^{-12}	136	136 334	13 633 404	68 167 021
	10^{-13}	14	13 633	1 363 340	6 816 702
	10^{-14}	1	1 363	136 334	681 670
	10^{-15}		136	13 633	68 167
	10^{-16}		14	1 363	6 817
	10^{-17}		1	136	682
	10^{-18}			14	68
	10^{-19}			1	7
	10^{-20}				1

Примечание. Цветом выделены ячейки с величинами $N_{400,theor}$, которые могут быть использованы как ориентировочные величины предела обнаружения $DL_{400,theor}$ белков при АСМ-фишинге.

но диссоциации комплекса лиганд-мишень можно избежать, если сформировать химическую связь между группами молекулы зонда и молекулы мишени. В таком случае связывание лиганд-мишень станет необратимым. В случае использования традиционной схемы биоспецифического взаимодействия между лигандом, иммобилизованным на поверхности чипа, фишинг обозначен как “Биоспецифический обратимый фишинг” (табл. 4, строка 3). При обратимом связывании количество образующихся на поверхности

комплексов определяется константой диссоциации K_d . При необратимом фишинге комплексы, образующиеся на поверхности, дополнительно ковалентно сшиваются, что переводит обратимую реакцию комплексообразования в необратимую и повышает концентрационную чувствительность обнаружения белковых комплексов за счёт снятия K_d -предела. Для достижения цели “необратимости” связывания биомолекул в комплексе может быть использована процедура модификации иммобилизованных

ТЕХНОЛОГИЯ АСМ-ФИШИНГА ДЛЯ ОБНАРУЖЕНИЯ БЕЛКОВ В РАСТВОРАХ

Таблица 4. Различные типы АСМ-фишинга

Группа	№ схемы	Обозначение	АСМ-чип	Фактор, обеспечивающий фиксацию целевых биомолекул на поверхности
Неспецифический	1	НЕСПЕЦИФИЧЕСКИЙ НЕОБРАТИМЫЙ (ХИМИЧЕСКИЙ)	силанизированная слюда с поверхностью, активированной кросс-линкером	химическая (ковалентная) связь между группами на поверхности чипа и группами мишени, сформированная посредством кросс-линкера
	2	НЕСПЕЦИФИЧЕСКИЙ ОБРАТИМЫЙ	пластина высокоориентированного пиролитического графита (ВОПГ)	физическая сорбция биомолекул мишени на поверхности чипа
Биоспецифический	3	БИОСПЕЦИФИЧЕСКИЙ ОБРАТИМЫЙ	силанизированная слюда с иммобилизованными молекулами лиганда	биоспецифическое взаимодействие лиганд-мишень
	4	БИОСПЕЦИФИЧЕСКИЙ НЕОБРАТИМЫЙ	силанизированная слюда с иммобилизованными молекулами лиганда, молекулы лиганда модифицированы кросс-линкером	биоспецифическое взаимодействие лиганд-мишень и химическая связь между группами лиганда и мишени, сформированная посредством кросс-линкера

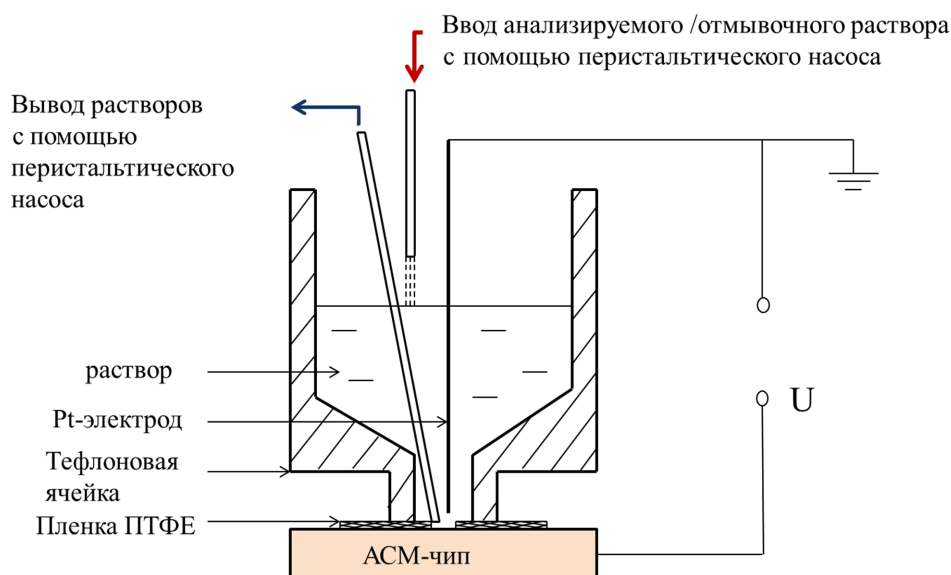


Рисунок 4. Схема установки для фишинга в проточном режиме, “Фишинг неспецифический необратимый”.

молекул лигандов (например антител) с помощью кросс-линкеров, как это описано в [3], или могут быть использованы аптамеры, содержащие активную группу, способную образовывать ковалентную связь с целевой молекулой белка, по аналогии с соматерами [33, 34]. В таком случае, в процессе инкубации на поверхности чипа формируются комплексы лиганд-мишень за счёт биоспецифического взаимодействия. Далее следует образование химической связи между группами биомолекул в комплексе посредством кросс-линкера. В таком случае фишинг может быть обозначен как “Биоспецифический необратимый фишинг” (табл. 4, строка 4).

Возможность использования группы “Биоспецифического фишинга” определяет потенциал практического применения технологии АСМ-фишинга для обнаружения белков в растворах, так как биоспецифическое взаимодействие определяет специфичность анализа в рутинной медицинской диагностике и протеомике.

При реализации вышеуказанных схем фишинга может быть использован один из следующих приёмов: инкубация в объёме или в потоке анализируемого раствора белка. При инкубации “в объёме” АСМ чип целиком погружают в пробирку, проводят инкубацию, далее переносят чип в другую пробирку, содержащую отмывочный раствор. После инкубации и отмывки следует сушка АСМ-чипа, который далее передают для сканирования поверхности.

При “инкубации в потоке” собирается проточная система [35], основными элементами которой являются перистальтический насос (или автоматическая пипетка) для подачи анализируемого потока и инкубационная ячейка (рис. 4).

В таком случае АСМ-чип является дном ячейки, в которую с помощью перистальтического насоса или автоматической пипетки подают анализируемый раствор белка. Поверхность АСМ-чипа покрыта политетрафторэтиленовой (ПТФЭ) плёнкой с отверстием. Далее на поверхность чипа помещают

ячейку из фторопласта. При проведении фишинга анализируемый раствор подают в ячейку с помощью перистальтического насоса (или автоматической пипетки). Забор жидкости из ячейки проводят с помощью перистальтического насоса через откачную трубку. Скорость подачи и отбора раствора подбирается таким образом, чтобы ячейка всегда оставалась заполненной. После пропускания всего анализируемого раствора следует процедура отмычки поверхности также с использованием проточной системы. Далее АСМ-чип извлекают из системы, высушивают и передают на сканирование. Преимуществом такого способа подачи образцов является возможность использования большого объема образца. Подробно приём “инкубации в потоке” описан в работе [35].

4. ПРИМЕРЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ АСМ-ФИШИНГА ДЛЯ ОБНАРУЖЕНИЯ БЕЛКОВ

В работе [36] показана принципиальная возможность обнаружения белка пероксидазы хрена (ПХ) с помощью необратимого фишинга. Показано влияние на эффективность обнаружения исследуемых белков ПХ таких параметров фишинга, как время инкубации, объём и концентрация анализируемого раствора. С понижением концентрации белка в анализируемом растворе количество выловленных за одно и то же время инкубации молекул снижается. Количество белка, выловленного при химическом фишинге, прямо пропорционально объёму анализируемого раствора: с увеличением объёма количество выловленного белка увеличивается. Увеличение объёма анализируемого 10^{-17} М раствора позволило достоверно зарегистрировать белок (с использованием подхода предварительного 10-кратного концентрирования белка). Также экспериментально показано, что при уменьшении концентрации анализируемого раствора целесообразно повышать площадь сканирования поверхности и уменьшать площадь сенсорной зоны для повышения достоверности получаемых данных.

В работе [35] приведён пример использования неспецифического обратимого АСМ-фишинга для обнаружения белков в растворах при низкой концентрации. Проведён фишинг двух белков — человеческого сывороточного альбумина (ЧСА) и цитохрома b_5 на поверхность проводящего материала ВОПГ. Фишинг проводили в двух режимах ввода растворов: (1) быстрый ввод раствора с помощью автоматической пипетки — инжекторный ввод; (2) медленный ввод раствора с помощью перистальтического насоса. Фишинг с инжекторным вводом проводили в присутствии или отсутствии приложенного внешнего напряжения к поверхности ВОПГ. Объём анализируемого раствора был одинаковый во всех случаях и составлял 100 мл. В экспериментальной серии показано, что эффективный фишинг белка протекает в условиях быстрого инжекторного ввода раствора белка. Два белка — ЧСА и цитохром b_5 — были зарегистрированы в растворах с минимальной концентрацией 10^{-17} М. При медленном вводе

раствора с помощью перистальтического насоса фишинг не происходило и белок не сорбировался на поверхность чипа из ВОПГ. Как показали Ivanov и соавт. [35], одним из определяющих факторов для эффективной доставки белка в процессе фишинга на поверхность чипа из ВОПГ является инжекторный способ ввода раствора аналита в измерительную кювету. При таком способе ввода раствора возникает дополнительный электрический заряд в системе, что способствует быстрой сорбции молекул на поверхности сенсора. Наличие дополнительного заряда приводит к эффективному фишингу белка даже без приложенного электрического поля. В режиме инжекторного ввода раствора подача внешнего положительного напряжения не влияет на количество сорбированного белка, в то время как прикладывание отрицательного напряжения приводит к уменьшению эффективности фишинга.

Биоспецифический АСМ-фишинг был применён для обнаружения серологического маркера — корового антигена вируса гепатита С (HCVcoreAg) в буферном растворе с использованием антител против корового антигена вируса гепатита С (anti-HCVcoreAg) в качестве молекулярного зонда [37]. После инкубации АСМ-чипа, функционализированного молекулами anti-HCVcoreAg, в анализируемом растворе, содержащем HCVcoreAg, размер объектов на поверхности увеличился за счёт образования комплекса антиген-антитело. Показано, что высота anti-HCVcoreAg находится в диапазоне 1–1,5 нм, высота HCVcoreAg — в диапазоне 1,5–2 нм, высота их комплексов — в диапазоне 3–7 нм. Высоты молекулярных зондов и белков-мишеней оказались меньше высоты комплекса антитело-антиген, как и предполагалось. Результаты работы [16] показали, что использование обратимого биоспецифического фишинга позволяет обнаружить белок в 1 мл раствора при минимальной концентрации 10^{-11} М. HCVcoreAg был сконцентрирован на поверхности за счёт обратимого связывания антиген/антитело. В случае перехода в режим “необратимого” связывания [16], то есть при дополнительной перешивке комплекса антитело/антиген за счёт фотокросс-линкера, белок зарегистрирован в 1 мл раствора при минимальной концентрации 10^{-15} М. Перевод обратимого взаимодействия антиген/антитело в составе комплекса в необратимое позволяет увеличить чувствительность анализа на 4 порядка. Модификация иммобилизованных anti-HCVcoreAg фотокросс-линкером не нарушает их аффинности. Так, в процессе инкубации в анализируемом растворе на поверхности контрольной зоны присутствовали антитела такого же класса и также они были модифицированы фотокросс-линкером (anti-HBsAg). Однако на поверхности рабочей зоны в процессе необратимого фишинга сформировались целевые комплексы anti-HCVcoreAg/HCVcoreAg, которые далее были зарегистрированы с помощью АСМ.

Биоспецифический фишинг может быть использован для обнаружения белков в биологическом образце. Этот метод применялся для обнаружения

частиц вирусов гепатита С и гепатита В в сыворотке крови [38–40]. В работе [40] после инкубации чипа, функционализированного антителами, в сыворотке крови, содержащей вирус гепатита С, с помощью АСМ были визуализированы новые объекты высотой в диапазоне 10–35 нм, в то время как в контрольной отрицательной сыворотке таких объектов не было. Типичные объекты в контрольном эксперименте имели высоту менее 5 нм. Аналогичная схема регистрации применялась и для выявления вирусов гепатита В. При этом объекты высотой в диапазоне 10–40 нм наблюдались после инкубации АСМ-чипа с иммобилизованными антителами к антигену вируса гепатита В (HBsAg) в сыворотке. МС анализ подтвердил селективность предложенной аналитической системы для обнаружения маркерных белков вируса гепатита С с использованием АСМ-чипов, функционализированных антителами [41, 42].

Показана возможность использования биоспецифического фишинга для обнаружения гликопротеина оболочки gp120 вируса иммунодефицита человека (ВИЧ-1), используемого в качестве биомаркера в диагностике [43]. В данном случае в качестве молекулярных зондов на поверхности были иммобилизованы аптамеры — аминокислотомодифицированные биотинилированные ДНК олигонуклеотиды ($M_w \approx 23$ кДа), содержащие т-аминогруппы в качестве концевой терминальной вставки для облегчения как иммобилизации аптамера на поверхности чипа, так и его взаимодействия с целевым белком. Использование аптамеров позволило добиться увеличения контраста АСМ-изображения по сравнению с подходом, основанном на использовании антител [43–45]. Величина контрастности, определённая на основе экспериментальных данных, составила в случае использования аптамеров 0,8, что в 2 раза выше аналогичной величины, полученной в случае использования иммобилизованных антител ($IC_{gp120/ab} \sim 0,4$). Такое повышение контрастности ожидаемо и следует из того, что отношение молекулярных масс gp120 и аптамера больше, чем отношение молекулярных масс gp120 и антител к нему, а значит и высот изображений.

Повышенная контрастность АСМ-изображения комплексов аптамер/белок может позволить достичь более высокой чувствительности анализа [38, 46, 47]. В работе [38] показано, что: АСМ-чипы с иммобилизованными аптамерами могут быть использованы для обнаружения HCVcoreAg в буферном растворе и в присутствии белковой матрицы при концентрации 10^{-12} М; антиген может быть обнаружен в составе конъюгата; при использовании АСМ-чипов с иммобилизованными аптамерами для оценки результатов фишинга могут быть использованы два критерия — качественный и количественный. В работе [46] показано, что белковый маркер вирусного гепатита С HCVcoreAg может быть обнаружен в растворах с концентрациями от 10^{-10} М до 10^{-13} М. При этом в качестве аффинного реагента может быть использован АСМ-чип с иммобилизованными аптамерами, различающимися

последовательностью, но содержащих одинаковое количество оснований. Для одного из аптамеров показана возможность анализа в указанном выше диапазоне концентраций. Следует отметить, что в качестве молекулярных зондов на поверхности использовали модифицированные аптамеры против HCVcoreAg, разработанные для терапевтических целей. Достигнутая чувствительность анализа на два порядка лучше, чем в случае использования антител, иммобилизованных на поверхности АСМ-чипа.

Показана возможность обнаружения маркерного белка HCVcoreAg в сыворотке крови человека при использовании АСМ-чипов с иммобилизованными аптамерами против HCVcoreAg, последовательность которых представлена в [47]. Было отмечено удовлетворительное совпадение данных АСМ-анализа с данными ИФА: совпадение составило 100% и 80% в случае анализа положительных сывороток и отрицательных соответственно. Корректно установить специфичность и чувствительность АСМ-анализа не представилось возможным из-за малой выборки образцов. Показано, что все используемые типы аптамеров могут быть использованы в качестве молекулярных зондов, но перспективным является использование матрицы сенсорных зон, содержащих различные типы аптамеров. Такой массив может содержать аптамеры против других маркерных белков вирусного гепатита С. В таком случае будет обеспечена мультиплексность анализа, что, безусловно, повысит достоверность получаемых данных.

Высокая чувствительность аналитической системы на основе АСМ-фишинга обусловлена эффективным концентрированием белка и высокой чувствительностью регистрирующей системы на уровне отдельных молекул белка.

В работе [3] для оценки эффективности концентрирования белка в процессе необратимого фишинга предложено ввести фактор концентрирования (F). При определённых условиях F может достигать величины порядка 10^8 . Это означает, что в случае необратимого фишинга из 1 мл раствора аналита с концентрацией 10^{-17} М концентрирование молекул приведёт к увеличению объёмной концентрации 10^{-17} М до приповерхностной концентрации 10^{-9} М, что значительно облегчит детекцию белков.

Чувствительность детектора оказывает большое влияние на чувствительность аналитической системы, предназначенной для обнаружения белков [3, 16]:

$$DL = \frac{N_{AB}}{N_A V} \quad (2),$$

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. В предельном случае при повышении чувствительности детектора до $N_{AB} \sim 1$, при объёме раствора аналита $V = 1$ л, величина DL составит:

$$DL = \frac{1}{N_{AV}} \approx 10^{-24} \text{ М} \quad (3),$$

что является обратным числом Авогадро. Высокая чувствительность регистрации может быть достигнута при использовании зонда АСМ, имеющего размер порядка размера биологической макромолекулы (1–10 нм).

Из приведённых уравнений (2) и (3) следует:

(1) чувствительность фишинга может быть повышена при увеличении объёма раствора аналита как вследствие увеличения общего числа молекул, доступных для вылавливания, так и вследствие увеличения F ;

(2) чувствительность фишинга возрастает при уменьшении площади поверхности чипа S .

С целью уменьшения площади поверхности S и увеличения фактора F оправдано использование малой сенсорной зоны. Эффективность такого способа показана в данной работе и в других работах, например [48, 49], в которых показана возможность снижения DL для белков до 10^{-19} – 10^{-20} М при использовании активированной зоны площадью $S < 0,1 \text{ мкм}^2$. Но, с другой стороны, использование малой сенсорной зоны ограничивает ёмкость чипа.

Для оценки теоретически возможной ёмкости на основе экспериментальных данных можно использовать величину $N_{400,ab} \approx 14500$ — количество антител на площади 400 мкм^2 при условии иммобилизации в виде монослоя. Так, если принять, что целевые биомолекулы соответствуют линейным размерам антитела ($\sim 5 \text{ нм}$), то максимальное число биомолекул на поверхности всей сенсорной зоны $S_{area} = 1,8 \text{ мм}^2$ (1766250 мкм^2) составило бы:

$$(N_{400,ab} \times S_{area} / S_{400}) \approx 6,4 \times 10^7 \quad (4).$$

Следовательно, теоретически могут быть выловлены и размещены на поверхности сенсорной зоны все биомолекулы, например,

из $1 \text{ мл } 10^{-13} \text{ М}$ раствора (табл. 5). Но, если необходимо сконцентрировать большее количество биомолекул, то необходимо увеличивать площадь сенсорной зоны. Максимально возможная S_{area} соответствует площади всего чипа ($\sim 1 \text{ см}^2$ или 100 мм^2), в случае использования АСМ-чипа на основе слюды. В таком случае может быть максимально выловлено $\sim 3,5 \times 10^9$ биомолекул.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Принципиальная возможность регистрации сигнала от единичных биомолекул обуславливает использование АСМ как основы новой биоаналитической системы для обнаружения белков. Но для реализации подобной системы необходима комбинация АСМ с методами фишинга, позволяющим сконцентрировать целевые молекулы на поверхности за счёт неспецифического или биоспецифического взаимодействия. В настоящее время параметрами целевых биомолекул на поверхности, используемыми для анализа, являются их высота и количество. Но разработка новых поколений приборов, например BioScope Resolve™ BioAFM [50], позволяющих одновременно регистрировать несколько сигналов по независимым каналам, определяет перспективу применения АСМ как основы новой нанотехнологической платформы, которая позволит расширить перечень регистрируемых параметров для биомacroмолекул. Внедрение серийных высокоскоростных приборов позволит использовать АСМ для решения задач медицинской диагностики, а также внедрить в широкую практику метод АСМ-фишинга для обнаружения медицински значимых белков. Сочетание высокоскоростного сканирования и многозондового прибора [51] будет перспективным для использования в протеомном скрининге. АСМ имеет большой потенциал в сочетании с другими подходами к исследованию. Для визуализации и дальнейшей идентификации белка и белково-белковых комплексов объединены

Таблица 5. Экспериментальные значения $DL(DL_{exp})$, достигнутые при использовании различных типов АСМ-фишинга

Тип фишинга	Лиганд	Целевой белок	Условия фишинга			Оценочное количество биомолекул, выловленное на чипе, N_{area}	$DL_{exp}, \text{ М}$
			Объём раствора, V	Площадь сенсорной зоны, S_{area}	Время фишинга		
Биоспецифический обратимый	антитело	HCVcoreAg	1 мл	1,8 мм ²	60 мин	—	10^{-11}
			50 мл			—	10^{-11}
	аптамер (A15)		1 мл			$4,4 \times 10^5$	10^{-13}
Биоспецифический необратимый	модифицированные антитела	HCVcoreAg	1 мл	1,8 мм ²	60 мин	—	10^{-15}
			50 мл			—	10^{-16}
Неспецифический обратимый	—	Цитохром b_5	100 мл	0,07 мм ²	90 мин	$2,0 \times 10^5$	10^{-17}
Неспецифический необратимый (химический)	(химически активированная поверхность)	Пероксидаза хрена	1 мл	0,03 мм ²	180 мин	$3,7 \times 10^4$	10^{-15}
			500 мл (лиоф.)	1,8 мм ²	—	$1,3 \times 10^5$	10^{-17}

методы анализа АСМ и МС. АСМ-фишинг позволяет обнаруживать белки с низким содержанием и охарактеризовать их свойства. Такие комбинации особенно полезны для решения задач протеомики и медицинской диагностики.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена в рамках Программы фундаментальных научных исследований в Российской Федерации на долгосрочный период (2021–2030 годы) (№ 122030100168-2).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей или с использованием животных в качестве объектов.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА

- Орехович В.Н. (1952) Современные представления о белках и их значение в биологии и медицине, Всесоюзное общество по распространению политических и научных знаний, Москва, 2(60), 22 с. [Orehovich V.N. (1952) Sovremennyye predstavleniya o belkakh i ikh znachenie v biologii i meditsine, Znanie, Moscow, 2(60), 22 p.]
- Лисица А.В., Пономаренко Е.А., Лохов П.Г., Арчаков А.И. (2016) Постгеномная медицина: альтернатива биомаркерам. Вестник российской академии медицинских наук, 71(3), 255–260. [Lisitsa A.V., Ponomarenko E.A., Lokhov P.G., Archakov A.A. (2016) Postgenomic medicine: Alternative to biomarkers. Annals of the Russian Academy of Medical Sciences, 71(3), 255–260.] DOI: 10.15690/vramn647
- Archakov A.I., Ivanov Y.D., Lisitsa A.V., Zgoda V.G. (2007) AFM fishing nanotechnology is the way to reverse the Avogadro number in proteomics. Proteomics, 7(1), 4–9. DOI: 10.1002/pmic.200600467
- Pleshakova T.O., Ivanov Y.D., Valueva A.A., Shumyantseva V.V., Ilgisonis E.V., Ponomarenko E.A., Lisitsa A.V., Chekhonin V.P., Archakov A.I. (2023) Analysis of single biomacromolecules and viruses: Is it a myth or reality? Int. J. Mol. Sci., 24(3), 1877. DOI: 10.3390/ijms24031877
- Lisitsa A., Poverennaya E., Ponomarenko E., Archakov A. (2015) The width of the human plasma proteome compared with a cancer cell line and bacteria. J. Biomol. Res. Ther., 4(3), 132. DOI: 10.4172/2167-7956.1000132
- Медведева Н.В., Ипатова О.М., Иванов Ю.Д., Дрозжжин А.И., Арчаков А.И. (2006) Нанобиотехнология и наномедицина. Биомедицинская химия, 52(6), 529–546. [Medvedeva N.V., Ipatova O.M., Ivanov Yu.D., Drozhzhin A.I., Archakov A.I. (2006) Nanobiotechnology and nanomedicine. Biomeditsinskaya Khimiya, 52(6), 529–546.]
- Ponomarenko E., Baranova A., Lisitsa A., Albar J.P., Archakov A. (2014) The chromosome-centric human proteome project at FEBS congress. Proteomics, 14(2–3), 147–152. DOI: 10.1002/pmic.201300373
- Hori S.S., Gambhir S.S. (2011) Mathematical model identifies blood biomarker-based early cancer detection strategies and limitations. Sci. Transl. Med., 3(109), 109ra116. DOI: 10.1126/scitranslmed.3003110
- Rissin D.M., Kan C.W., Campbell T.G., Howes S.C., Fournier D.R., Song L., Piech T., Patel P.P., Chang L., Rivnak A.J., Ferrell E.P., Randall J.D., Provuncher G.K., Walt D.R., Duffy D.C. (2010) Single-molecule enzyme-linked immunosorbent assay detects serum proteins at subfemtomolar concentrations. Nat. Biotechnol., 28(6), 595–599. DOI: 10.1038/nbt.1641
- Брюховецкий А.С., Шевченко В.Е., Чехонин В.П., Брюховецкий И.С., Ковалев С.В., Баклаушев В.П., Давыдов М.И. (2013) Сравнительное протеомное картирование опухолевых стволовых клеток, выделенных из глиобластомы линии U87, нейрональных стволовых и мультипотентных мезенхимных стромальных клеток человека: от каталогизации клеточных белков к инновационной парадигме протеом-основанной клеточной терапии опухолей. Гены и клетки, 8(2), 85–92. [Bryukhovetskiy A.S., Shevchenko V.E., Chekhonin V.P., Bryukhovetskiy I.S., Kovalev S.V., Baklaushiev V.P., Davydov M.I. (2013) Comparative proteome mapping of tumor stem cells isolated from U87 glioblastoma, neural stem and multipotent mesenchymal stromal cells of a human: From cataloguing of cell proteins to novel paradigm of proteome-based cell therapy of tumors. Genes & Cells, 8(2), 85–92.] DOI: 10.23868/gc121626
- Пономаренко Е.А., Згода В.Г., Копылов А.Т., Поверенная Е.В., Ильгисонис Е.В., Лисица А.В., Арчаков А.И. (2015) Россия в международном проекте “Протеом человека”: первые итоги и перспективы. Биомедицинская химия, 61(2), 169–175. [Ponomarenko E.A., Zgoda V.G., Kopylov A.T., Poverennaya E.V., Ilgisonis E.V., Lisitsa A.V., Archakov A.I. (2015) The Russian part of the human proteome project: First results and prospects. Biomeditsinskaya Khimiya, 61(2), 169–175.] DOI: 10.18097/PBMC20156102169
- Archakov A.I., Ivanov Yu.D. (2007) Analytical nanobiotechnology for medicine diagnostics. Mol. Biosyst., 3, 336–342. DOI: 10.1039/b618285b
- Anderson N.L. (2010) The clinical plasma proteome: A survey of clinical assays for proteins in plasma and serum. Clin. Chem., 56(2), 177–185. DOI: 10.1373/clinchem.2009.126706
- Geyer P.E., Holdt L.M., Teupser D., Mann M. (2017) Revisiting biomarker discovery by plasma proteomics. Mol. Syst. Biol., 13(9), 942. DOI: 10.15252/msb.20156297
- Нарыжный С.Н., Згода В.Г., Майнскова М.А., Ронжина Н.Л., Белякова Н.В., Легина О.К., Арчаков А.И. (2015) Экспериментальная оценка размера протеомов клеток и плазмы крови человека. Биомедицинская химия, 61(2), 279–285. [Naryzhny S.N., Zgoda V.G., Maynskova M.A., Ronzhina N.L., Belyakova N.V., Legina O.K., Archakov A.I. (2015) Experimental estimation of proteome size for cells and human plasma. Biomeditsinskaya Khimiya, 61(2), 279–285.] DOI: 10.18097/PBMC20156102279
- Archakov A., Ivanov Y., Lisitsa A., Zgoda V. (2009) Biospecific irreversible fishing coupled with atomic force microscopy for detection of extremely low-abundant proteins. Proteomics, 9(5), 1326–1343. DOI: 10.1002/pmic.200800598
- Сердюк И., Заккай И., Заккай Д. (2009) Методы в молекулярной биофизике. Структура. Функция. Динамика, КДУ, Москва 568 с. [Serdyuk I., Zaccai N., Zaccai J. (2009) Metody v molekulyarnoi biofizike: struktura, funktsiya, dinamika [Methods in molecular biophysics: Structure, Function, Dynamics]. KDU, Moscow 568 p.]

18. Плешакова Т.О., Шумов И.Д., Иванов Ю.Д., Мальсагова К.А., Кайшева А.Л., Арчаков А.И. (2015) АСМ-технологии как путь к обратному числу Авогадро. Биомедицинская химия, **61**(2), 239–253. [Pleshakova T.O., Shumov I.D., Ivanov Yu.D., Malsagova K.A., Kaysheva A.L., Archakov A.I. (2015) AFM-based technologies as the way towards the reverse Avogadro number. Biomeditsinskaya Khimiya, **61**(2), 239–253.] DOI: 10.18097/PBMC20156102239
19. Eftimov T., Genova-Kalou P., Dyankov G., Bock W.J., Mankov V., Shoar Ghaffari S., Veselinov P., Arapova A., Makouei S. (2023) Capabilities of double-resonance LPG and SPR methods for hypersensitive detection of SARS-CoV-2 structural proteins: A comparative study. Biosensors, **13**(3), 318. DOI: 10.3390/bios13030318
20. Ahmadivand A., Gerislioglu B., Ramezani Z., Kaushik A., Manickam P., Ghoreishi S.A. (2021) Functionalized terahertz plasmonic metasensors: Femtomolar-level detection of SARS-CoV-2 spike proteins. Biosens. Bioelectron., **177**, 112971. DOI: 10.1016/j.bios.2021.112971
21. Bodily T.A., Ramanathan A., Wei S., Karkisaval A., Bhatt N., Jerez C., Haque M.A., Ramil A., Heda P., Wang Y., Kumar S., Leite M., Li T., Zhao J., Lal R. (2023) In pursuit of degenerative disease diagnosis: Dementia biomarkers detected by DNA aptamer-attached portable graphene biosensor. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **120**(47), e2311565120. DOI: 10.1073/pnas.2311565120
22. Allison D.P., Mortensen N.P., Sullivan C.J., Doktycz M.J. (2010) Atomic force microscopy of biological samples. Wiley Interdiscip. Rev. Nanomed. Nanobiotechnol., **2**(6), 618–634. DOI: 10.1002/wnan.104
23. Pleshakova T., Bukharina N., Archakov A., Ivanov Y. (2018) Atomic force microscopy for protein detection and their physicochemical characterization. Int. J. Mol. Sci., **19**(4), 1142. DOI: 10.3390/ijms19041142
24. Sheiko S.S., da Silva M., Shirvanians D., LaRu, I., Prokhorova S., Moeller M., Matyjaszewski K. (2003) Measuring molecular weight by atomic force microscopy. J. Am. Chem. Soc., **125**(22), 6725–6728. DOI: 10.1021/ja0346779
25. Синяков А.Н. (2007) Биочипы: диагноз — дело техники! Наука из первых рук, **5**(17), 40–49. [Sinyakov A.N. (2007) Biochips: Diagnosis is a matter of technique! Science First Hand, **5**(17), 40–49.]
26. Nettikadan S.R., Johnson J.C., Vengasandra S.G., Muys J., Henderson E. (2004) ViriChip: A solid phase assay for detection and identification of viruses by atomic force microscopy. Nanotechnology, **15**, 383. DOI: 10.1088/0957-4484/15/3/027
27. Дубровин Е.В., Преснова Г.В., Рубцова М.Ю., Егоров А.М., Григоренко В.Г., Яминский И.В. (2015) Применение атомно-силовой микроскопии для 3D-анализа результатов гибридизации нуклеиновых кислот на микрочипах. Acta Naturae (русскоязычная версия), **7**(2), 108–114. [Dubrovin E.V., Yaminsky I.V., Presnova G.V., Rubtsova M.Y., Egorov A.M., Grigorenko V.G. (2015) The use of atomic force microscopy for 3D analysis of nucleic acid hybridization on microarrays. Acta Naturae, **7**(2), 108–114.] DOI: 10.32607/20758251-2015-7-2-108-114
28. Talapatra A., Rouse R., Hardiman G. (2002) Protein microarrays: Challenges and promises. Pharmacogenomics, **3**(4), 527–536. DOI: 10.1517/14622416.3.4.527
29. Maercker C. (2005) Protein arrays in functional genome research. Biosci. Rep., **25**(1-2), 57–70. DOI: 10.1007/s10540-005-2848-y
30. Janovjak H., Kessler M., Oesterheld D., Gaub H., Müller D.J. (2003) Unfolding pathways of native bacteriorhodopsin depend on temperature. EMBO J., **22**(19), 5220–5229. DOI: 10.1093/emboj/cdg509
31. Valueva A.A., Shumov I.D., Kaysheva A.L., Ivanova I.A., Ziborov V.S., Ivanov Y.D., Pleshakova T.O. (2020) Covalent protein immobilization onto muscovite mica surface with a photocrosslinker. Minerals, **10**(5), 464. DOI: 10.3390/min10050464
32. Иванов Ю.Д., Плешакова Т.О., Мальсагова К.А., Кайшева А.Л., Копылов А.Т., Изотов А.А., Татур В.Ю., Веснин С.Г., Иванова Н.Д., Зиборов В.С., Арчаков А.И. (2016) АСМ-фишинг белка в импульсном электрическом поле. Биомедицинская химия, **62**(4), 439–446. [Ivanov Yu.D., Pleshakova T.O., Malsagova K.A., Kaysheva A.L., Kopylov A.T., Izotov A.A., Tatur V.Yu., Vesnin S.G., Ivanova N.D., Ziborov V.S., Archakov A.I. (2016) AFM fishing of proteins under impulse electric field. Biomeditsinskaya Khimiya, **62**(4), 439–446.] DOI: 10.18097/PBMC20166204439
33. Gold L., Walker J.J., Wilcox S.K., Williams S. (2012) Advances in human proteomics at high scale with the SOMAscan proteomics platform. New Biotechnol., **29**(5), 543–549. DOI: 10.1016/j.nbt.2011.11.016
34. Rohloff J.C., Gelinas A.D., Jarvis T.C., Ochsner U.A., Schneider D.J., Gold L., Janjic N. (2014) Nucleic acid ligands with protein-like side chains: Modified aptamers and their use as diagnostic and therapeutic agents. Mol. Ther. Nucleic Acids, **3**(10), e201. DOI: 10.1038/mtna.2014.49
35. Ivanov Y.D., Pleshakova T., Malsagova K., Kozlov A., Kaysheva A., Kopylov A., Izotov A., Andreeva E., Kanashenko S., Usanov S., Archakov A. (2014) Highly sensitive protein detection by combination of atomic force microscopy fishing with charge generation and mass spectrometry analysis. FEBS J., **281**(20), 4705–4717. DOI: 10.1111/febs.13011
36. Иванов Ю.Д., Даничев В.В., Плешакова Т.О., Шумов И.Д., Зиборов В.С., Крохин Н.В., Загуменный М.Н., Устинов В.С., Смирнов Л.П., Широнин А.В., Арчаков А.И. (2014) Химический необратимый фишинг низкокопийных белков. Биомедицинская химия, **60**(1), 28–50. [Ivanov Yu.D., Danichev V.V., Pleshakova T.O., Shumov I.D., Ziborov V.S., Krokhin N.V., Zagumenniy M.N., Ustinov V.S., Smirnov L.P., Shironin A.V., Archakov A.I. (2014) Irreversible chemical afm-fishing for the detection of low-copied proteins. Biomeditsinskaya Khimiya, **60**(1), 28–50.] DOI: 10.18097/PBMC20146001028
37. Французов П.А. (2010) Атомно-силовые чипы для выявления маркеров заболеваний вирусными гепатитами В и С. Дисс. канд. наук, НИИ биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича, Москва. [Frantsuzov P.A. (2010) Atomic force microscopy chips for the revelation of markers of viral hepatitis B and C diseases. Diss. kand. nauk, Institute of Biomedical Chemistry, Moscow.]
38. Pleshakova T.O., Kaysheva A.L., Bayzyanova J.M., Anashkina A.S., Uchaikin V.F., Shumov I.D., Ziborov V.S., Konev V.A., Archakov A.I., Ivanov Yu.D. (2017) Advantages of aptamers as ligands upon protein detection by AFM-based fishing. Anal. Methods, **9**, 6049–6060. DOI: 10.1039/c7ay01216k
39. Guo L., Kim D.-H. (2012) LSPR biomolecular assay with high sensitivity induced by aptamer-antigen-antibody sandwich complex. Biosens. Bioelectron., **31**(1), 567–570. DOI: 10.1016/j.bios.2011.10.047

40. Horton M., Charras G., Lehenkari P. (2002) Analysis of ligand-receptor interactions in cells by atomic force microscopy. *J. Recept. Signal Transduct. Res.*, **22**(1–4), 169–190. DOI: 10.1081/RRS-120014594
41. Chtcheglova L.A., Shubeita G.T., Sekatskii S.K., Dietler G. (2004) Force spectroscopy with a small dithering of AFM tip: A method of direct and continuous measurement of the spring constant of single molecules and molecular complexes. *Biophys. J.*, **86**(2), 1177–1184. DOI: 10.1016/S0006-3495(04)74192-2
42. Zapotoczny S., Auletta T., de Jong M.R., Schönherr H., Huskens J., van Veggel F.C.J.M., Reinhoudt D.N., Vancso G.J. (2002) Chain length and concentration dependence of β -cyclodextrin-ferrocene host-guest complex rupture forces probed by dynamic force spectroscopy. *Langmuir*, **18**(18), 6988–6994. DOI: 10.1021/la0259095
43. Ivanov Y.D., Bukharina N.S., Pleshakova T.O., Frantsuzov P.A., Andreeva E.Y., Kaysheva A.L., Zgoda V.G., Izotov A.A., Pavlova T.I., Ziborov V.S., Radko S.P., Moshkovskii S.A., Archakov A.I. (2014) Atomic force microscopy fishing and mass spectrometry identification of gp120 on immobilized aptamers. *Int. J. Nanomedicine*, **9**, 4659–4670. DOI: 10.2147/IJN.S66946
44. Allen S., Chen X., Davies J., Davies M.C., Dawkes A.C., Edwards J.C., Roberts C.J., Sefton J., Tendler S.J.B., Williams P.M. (1997) Detection of antigen-antibody binding events with the atomic force microscope. *Biochemistry*, **36**(24), 7457–7463. DOI: 10.1021/bi962531z
45. Бухарина Н.С., Иванов Ю.Д., Пешакова Т.О., Французов П.А., Андреева Е.Ю., Кайшева А.Л., Изотов А.А., Павлова Т.И., Зиборов В.С., Радько С.П., Арчаков А.И. (2015) АСМ-фишинг белка gp120 на иммобилизованные аптамеры и его масс-спектрометрическая идентификация. *Биомедицинская химия*, **61**(3), 363–372. [Bukharina N.S., Ivanov Yu.D., Pleshakova T.O., Frantsuzov P.A., Andreeva E.Yu., Kaysheva A.L., Izotov A.A., Pavlova T.I., Ziborov V.S., Radko S.P., Archakov A.I. (2014) Atomic force microscopy fishing of gp120 on immobilized aptamers and its mass spectrometry identification. *Biomeditsinskaya Khimiya*, **61**(3), 363–372.] DOI: 10.18097/PBMC20156103363
46. Pleshakova T.O., Kaysheva A.L., Bayzyanova J.M., Anashkina A.S., Uchaikin V.F., Ziborov V.S., Konev V.A., Archakov A.I., Ivanov Y.D. (2018) The detection of hepatitis C virus core antigen using AFM chips with immobilized aptamers. *J. Virol. Methods*, **251**, 99–105. DOI: 10.1016/j.jviromet.2017.10.015
47. Pleshakova T., Kaysheva A., Shumov I., Ziborov V., Bayzyanova J., Konev V., Uchaikin V., Archakov A., Ivanov Y. (2019) Detection of hepatitis C virus core protein in serum using aptamer-functionalized AFM chips. *Micromachines*, **10**(2), 129. DOI: 10.3390/mi10020129
48. Islam M.S., Lee H.G., Choo J., Song J.M., Kang S.H. (2010) High sensitive detection of C-reactive protein by total internal reflection fluorescence microscopy on rapidly making nanoarray protein chip. *Talanta*, **81**(4–5), 1402–1408. DOI: 10.1016/j.talanta.2010.02.042
49. Lee S., Cho N.-P., Kim J.D., Jung H., Kang S.H. (2009) An ultra-sensitive nanoarray chip based on single-molecule sandwich immunoassay and TIRFM for protein detection in biologic fluids. *Analyst*, **134**(5), 933–938. DOI: 10.1039/B822094H
50. Zhang B., Xu G., Evans J.S. (1999) A kinetic molecular model of the reversible unfolding and refolding of titin under force extension. *Biophys. J.*, **77**(3), 1306–1315. DOI: 10.1016/S0006-3495(99)76980-8
51. Choi H.S., Huh J., Jo W.H. (2003) Similarity of force-induced unfolding of apomyoglobin to its chemical-induced unfolding: An atomistic molecular dynamics simulation approach. *Biophys. J.*, **85**(3), 1492–1502. DOI: 10.1016/S0006-3495(03)74582-2

Поступила в редакцию: 04. 07. 2024.
После доработки: 26. 07. 2024.
Принята к печати: 27. 07. 2024.

AFM-FISHING TECHNOLOGY FOR PROTEIN DETECTION IN SOLUTIONS

T.O. Pleshakova, M.O. Ershova, A.A. Valueva, I.A. Ivanova, Yu.D. Ivanov, A.I. Archakov*

Institute of Biomedical Chemistry,
10 Pogodinskaya str., Moscow, 119121 Russia; *e-mail: i.a.ivanova@bk.ru

The review considers the possibility of using atomic force microscopy (AFM) as a basic method for protein detection in solutions with low protein concentrations. The demand for new bioanalytical approaches is determined by the problem of insufficient sensitivity of systems used in routine practice for protein detection. Special attention is paid to demonstration of the use in bioanalysis of a combination of AFM and fishing methods as an approach of concentrating biomolecules from a large volume of the analyzed solution on a small surface area.

The whole English version is available at <http://pbmc.ibmc.msk.ru>.

Key words: atomic force microscopy; biospecific fishing; protein detection

Funding. The work was performed within the framework of the Program for Basic Research in the Russian Federation for a long-term period (2021–2030) (No. 122030100168-2).

Received: 04.07.2024; revised: 26.07.2024; accepted: 27.07.2024.