

УДК 577.29

©Коллектив авторов

## **ПРОТОКОЛЫ БЕЛКОВОЙ ИНТЕРАКТОМИКИ: МОЛЕКУЛЯРНЫЙ ФИШИНГ НА ОПТИЧЕСКИХ ЧИПАХ И МАГНИТНЫХ НАНОЧАСТИЦАХ**

*А.С. Иванов\*, П.В. Ершов, Ю.А. Мезенцев, Е.В. Поверенная,  
А.В. Лисица, А.И. Арчаков*

Учреждение Российской академии медицинских наук  
Научно-исследовательский институт биомедицинской химии  
имени В.Н. Ореховича РАМН, 119121, Москва, Погодинская ул., 10;  
тел.: +7-499-246-3693; эл. почта: alexei.ivanov@ibmc.msk.ru

В настоящее время совершенно ясно, что подавляющее большинство белков в живых системах функционируют за счет взаимодействия друг с другом в составе стабильных или динамических белковых комплексов. Поэтому необходимость более глубокого изучения функций белков обуславливает расширение исследований белок-белковых взаимодействий (ББВ). В представляемом обзоре дается краткое описание и сравнительная оценка методов и протоколов экспериментальной белковой интерактомики, основанных на технологии молекулярного фишинга на поверхности оптических чипов и парамагнитных наночастицах.

**Ключевые слова:** интерактомия, белок-белковые взаимодействия, протеомика, молекулярный фишинг, оптический биосенсор, магнитные частицы, белковая масс-спектрометрия.

**ВВЕДЕНИЕ.** Биологические процессы в живых системах в большинстве своем происходят с участием огромного количества различных белков. При этом подавляющее большинство белков в живых системах функционируют за счёт взаимодействия друг с другом в составе стабильных или динамических белковых комплексов. Число и разнообразие белок-белковых взаимодействий (ББВ) у высших организмов настолько велико, что их графическое представление имеет вид крайне сложных и запутанных сетей [1-4]. Данные сети приобретают еще большую сложность, когда привлекается дополнительная информация из геномных и протеомных исследований [5, 6].

В настоящее время происходит быстрый рост интереса к экспериментальным исследованиям ББВ, которые представляют новый раздел протеомики, получивший своё название - белковая интерактомия. В многоклеточных организмах может существовать большое число разных интерактомов в зависимости от типа ткани, биологического состояния и так далее. Поэтому информация о ББВ важна для понимания большинства

---

\* - адресат для переписки

сложных молекулярных механизмов функционирования живых систем. Интерактомные данные также необходимы для выяснения функции новых белков, которые идентифицируются геномными и/или протеомными методами, но не могут быть аннотированы из-за отсутствия известных белков-гомологов. Исследуя взаимодействие этих белков с другими белками, можно получить подсказку о функции неизвестного белка, так как высока вероятность того, что функции белков-партнеров по ББВ сходны. Консервативность определённых частей интерактома, наблюдающаяся у разных организмов, может также давать дополнительную информацию об эволюции живых систем.

Поскольку большинство клеточных процессов регулируется с помощью мультимерных белковых комплексов, то нарушение ББВ может лежать в основе развития многих заболеваний. В качестве примера можно привести тот факт, что онкогенные аденовирусы вызывают быструю безостановочную пролиферацию клетки хозяина за счёт нарушения взаимодействий между белками, регулирующими клеточный цикл [7]. Поэтому идентификация белков-партнеров по ББВ представляет большой интерес как потенциальных мишеней для создания инновационных типов лекарств, действующих через регуляцию ББВ [8-11].

В настоящее время существует большое разнообразие методических подходов, применяемых в экспериментальной интерактомике [12]. Это обусловлено тем, что данный раздел протеомики является междисциплинарным, где используются методы биохимии, геномики, клеточной и молекулярной биологии, биофизики, а также методы биоинформатики и компьютерного молекулярного моделирования.

Экспериментальные методы исследования ББВ базируются на одном общем принципе, который очень схож с принципом рыбной ловли, что нашло своё отражение в используемой терминологии: bait protein (белок-наживка), prey protein (белок-добыча), molecular fishing (молекулярный фишинг, рыбалка). Белком-наживкой называют известный белок, который экспериментатор использует для “вылавливания” из клеточного или тканевого лизата белков-партнёров по ББВ (белки-добыча) и их дальнейшей идентификации.

Чаще всего молекулярный фишинг выполняется с использованием методов твёрдофазной аффинной хроматографии по одному из двух вариантов - прямой и непрямой фишинг. При прямом молекулярном фишинге в качестве аффинного реагента используется непосредственно целевой белок-наживка, закреплённый на носителе (рис. 1А). Фишинг белков-партнеров по ББВ осуществляется в одну стадию при инкубации аффинного сорбента с биологическим лизатом. Непрямой молекулярный фишинг осуществляется в два этапа: 1) формирование целевого комплекса белка-наживки с одним или несколькими белками-добычей непосредственно в сложной биологической системе; 2) выделение целевого белкового комплекса с помощью аффинного к белку-наживке твердофазного сорбента. Для этих целей необходим высоко аффинный реагент, узнающий белок-наживку с высокой селективностью. В качестве такого реагента для выделения целевых белков в комплексе с белками-партнерами чаще всего используются антитела, узнающие определенные антигенные детерминанты целевого белка-наживки [13]. При этом антитело может быть использовано либо непосредственно как реагент, закреплённый на носителе (рис. 1Б), либо как промежуточный аффинный реагент, добавляемый в биологический лизат, а в качестве конечного аффинного реагента, закреплённого на носителе, выступает белок А или G (рис. 1В) селективно взаимодействующий с консервативной частью антител.

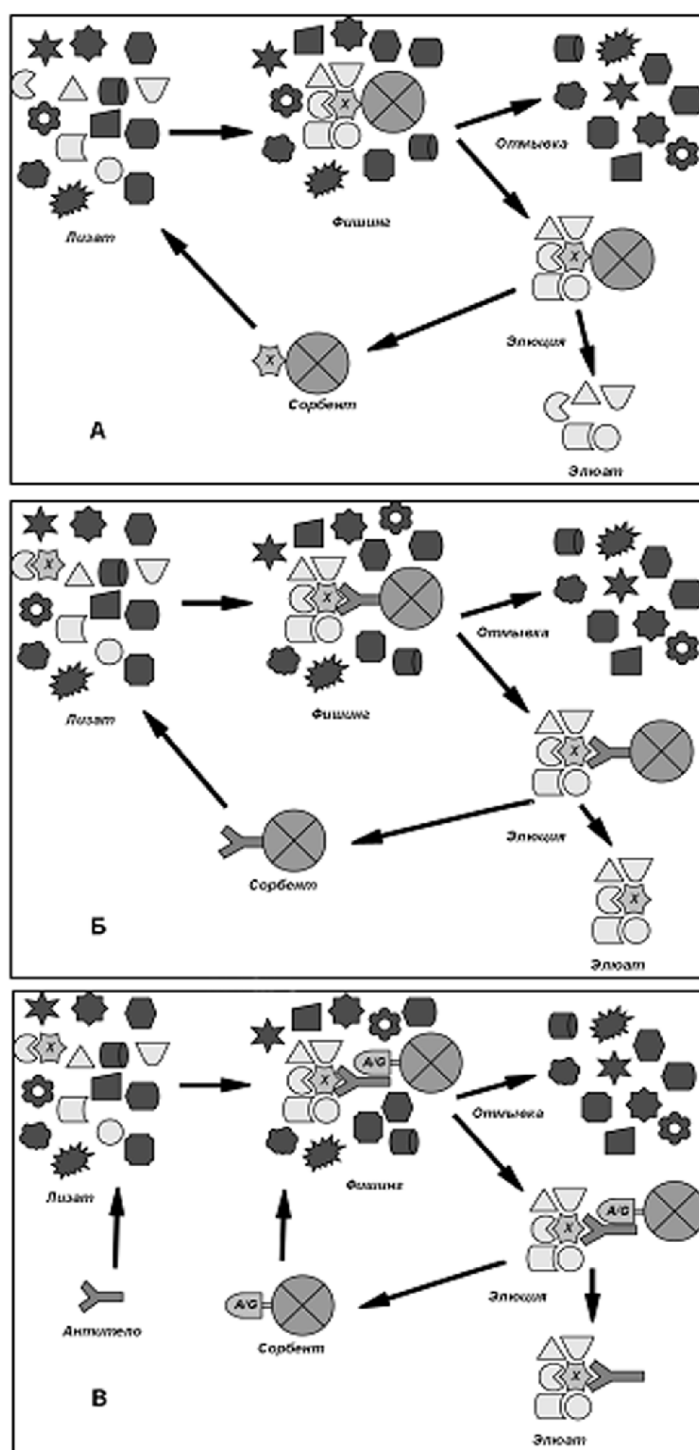


Рисунок 1.

Принцип прямого (А) и непрямого (Б, В) молекулярного фишинга белков-партнёров по БВВ с участием белка Х.

А - целевой белок-наживка (Х), иммобилизованный на носителе (на сорбенте), используется в качестве аффинного реагента в прямом молекулярном фишинге.

Б - не прямой молекулярный фишинг с использованием антитела в качестве аффинного реагента, закреплённого на носителе.

В - не прямой молекулярный фишинг с использованием антитела в качестве промежуточного аффинного реагента, добавляемого в биологический лизат, а в качестве конечного аффинного реагента, закреплённого на носителе, выступает белок А или G.

К сожалению, далеко не для всех целевых белков существуют коммерчески доступные высоко очищенные антитела, и это заставляет исследователей идти на модификацию целевых белков методами генной инженерии. Чаще всего это делается путём создания слитого белка (fusion protein), состоящего из целевого белка, объединенного с какой-либо специфической меткой типа пептидного эпитопа, на который имеются селективные антитела (например, Мус - пептидный эпитоп из фактора транскрипции с-Мус, FLAG - октапептид N-DYKDDDDK-C или гемагглютинин, НА).

Могут быть использованы и другие аффинные реагенты, например, хроматографическая смола с конъюгированным глутатионом для выделения белковых комплексов где в качестве белка-наживки выступает белок слияния с меткой в виде глутатион-S-трансферазы (glutathione S-transferase, GST) (рис. 2А). Использование GST-метки обеспечивает высоко специфическое и прочное связывание меченого белка на сорбенте с глутатионом [14-17]. Это обусловлено специфичностью и прочностью связывания субстрата (глутатион) в активном центре фермента (GST). Элюция комплексов белков-партнёров с белком X осуществляется путём вытеснения GST метки избытком свободного восстановленного глутатиона.

Часто также используется металл-хелатный сорбент NTA (нитрилотриуксусная кислота), который в присутствии ионов никеля образует комплексы с белками с 6хHis меткой (гексапептид, состоящий из 6 остатков гистидина). Использование 6хHis-метки - очень популярный приём в силу своей простоты и надёжности, используемый для экспрессии и выделения целевых белков. Аффинное выделение 6хHis-меченых белков (в комплексе с белками-партнёрами) может быть осуществлено на аффинном сорбенте с NTA в присутствии ионов никеля (6хHis образует 3 хелатных комплекса с NTA при участии соответственно трёх ионов  $Ni^{2+}$ ) (рис. 2Б) [18-22] или на сорбенте со специфическими антителами на 6хHis эпитоп [23-24].

Любой аффинный сорбент представляет собой какой-либо твёрдый носитель с закрепленным на нем аффинным реагентом. Существует большое разнообразие носителей: сефароза, ионообменная смола, микро- или наночастицы, различные чипы и так далее.

Так как в одной работе невозможно описать все существующие варианты молекулярного фишинга, то конкретной целью данного обзора является краткое описание и оценка методов и протоколов экспериментальной белковой интерактомики, основанных на технологии молекулярного фишинга на поверхности оптических чипов и парамагнитных наночастиц.

### **1. МОЛЕКУЛЯРНЫЙ ФИШИНГ НА ЧИПЕ ОПТИЧЕСКОГО БИОСЕНСОРА.**

В настоящее время для количественных измерений ББВ, как правило, используется оптический биосенсор, работающий на эффекте поверхностного плазмонного резонанса (surface plasmon resonance, SPR) [25-26]. Данная технология позволяет регистрировать ББВ в реальном времени в виде сенсограммы (график зависимости сигнала биосенсора от времени). Принцип измерения состоит в том, что растворы белков-партнёров пропускаются через проточную систему биосенсора, где в измерительном канале на поверхности оптического чипа иммобилизован целевой белок. При протекании рабочего буфера записывается базовая линия, далее при прохождении раствора белка-партнёра происходит его связывание с целевым белком на поверхности чипа, что регистрируется в виде подъема уровня сигнала в сенсограмме.

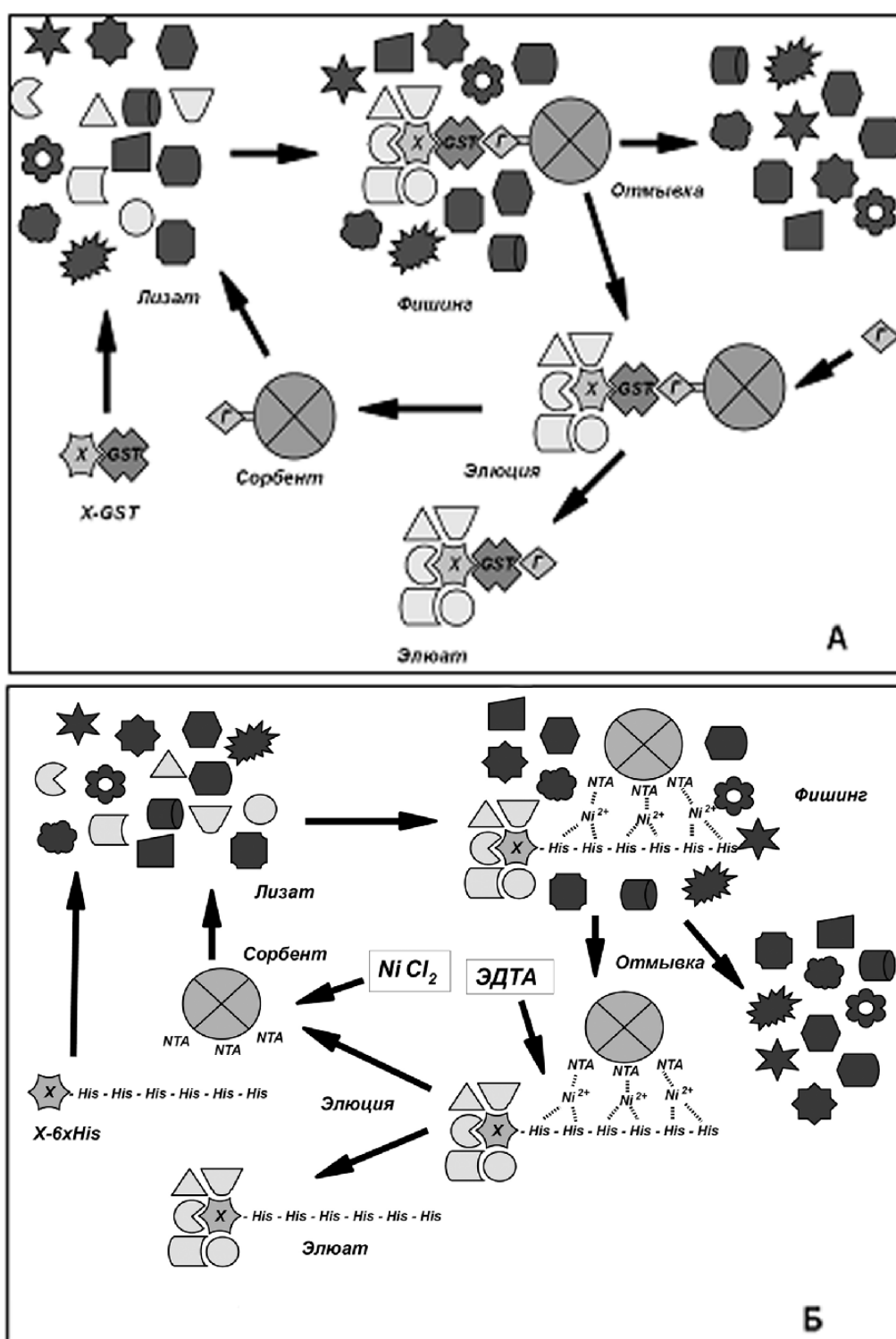


Рисунок 2.

Принцип непрямого молекулярного фишинга белков-партнеров по ББВ с участием генно-модифицированного белка-наживки X.

Генно-модифицированный белок X в виде белка слияния с GST (А) или белка с меткой 6xHis (Б) вводится в клеточный лизат и после формирования комплексов с белками-партнёрами выделяется на аффинном сорбенте с глутатионом (А) или с NTA (Б).

Элюция комплексов белков с белком X осуществляется избытком свободного восстановленного глутатиона (Г, рис. 2А) или ЭДТА (Б).



По окончании инъекции раствора белка-партнёра в измерительный канал подаётся рабочий буфер и регистрируется кинетика распада белкового комплекса. Простой анализ серии сенсограмм, полученных при инъекции растворов с разной концентрацией белка-партнёра, позволяет рассчитывать константы скоростей образования ( $k_{on}$ ) и распада ( $k_{off}$ ) белковых комплексов, а также равновесную константу диссоциации ( $K_D$ ) комплекса. Анализ нескольких серий таких сенсограмм, полученных при разной температуре, позволяет также рассчитать основные термодинамические параметры ББВ (изменения свободной энергии Гиббса, энтропии и энтальпии при образовании белкового комплекса).

Если на поверхности оптического чипа закреплен аффинный реагент для связывания целевого белка (например, антитела к целевому белку или к специфическому эпитопу; NTA для хелатного связывания белков с 6xHis-меткой в присутствии ионов никеля; глутатион для связывания белков с меткой GST), то данный белок может быть “пойман” непосредственно на оптическом чипе при пропускании клеточного лизата через измерительный канал биосенсора. Этот процесс очень похож на рыбную ловлю, когда в водном потоке на специфическую наживку ловится определённая рыба. Поэтому в научной литературе первоначально именно он получил название молекулярного фишинга.

Данный подход может быть также использован как для прямого, так и непрямого молекулярного фишинга непосредственно на поверхности оптического чипа путем аффинного выделения комплексов целевого белка-наживки с белками-партнерами при пропускании клеточного лизата через измерительный канал биосенсора [27-31]. При этом процесс связывания может контролироваться в реальном времени (регистрируется сколько и за какое время связывается аналита с иммобилизованным аффинным лигандом).

Однако, оптический биосенсор не осуществляет идентификацию выделенных белков-партнёров и поэтому для интерактомного анализа он используется совместно с технологией масс-спектрометрической идентификации белков [32-37]. Такой комбинированный подход состоит из четырёх основных этапов: 1) молекулярный фишинг - выделение белков-партнёров на оптическом чипе при инъекции клеточного лизата через проточную систему биосенсора; 2) элюция выделенных белков с поверхности оптического чипа; 3) масс-спектрометрический анализ элюата и идентификация белков-партнеров; 4) валидация и количественная оценка выявленных ББВ [38-41].

В ряде работ авторами был осуществлен прямой MS анализ “пойманного” белка-партнёра без его элюции с поверхности оптического чипа. Для этого была использована MALDI-TOF технология, где оптический чип выступал в качестве масс-спектрометрической мишени [42-44]. Однако есть ряд трудностей в использовании этого метода для идентификации белков-партнёров. Количество белка, захваченного на поверхности чипа, часто оказывается достаточным для обнаружения с помощью массово используемых спектрометров. Много этапов ручных процедур по подготовке чипа к MS анализу могут привести к появлению ошибочных пиков вследствие загрязнения пылью или другими частицами. Поэтому более широко используется подход с элюцией “пойманных” белков-партнёров с поверхности оптического чипа и дальнейшим их MS анализом [45].

Надо отметить, что все описанные в литературе работы по молекулярному фишингу белков на оптических чипах биосенсора выполнялись по индивидуальным нестандартизированным протоколам. Существуют примерные протоколы молекулярного фишинга на оптическом чипе фирмы GE Healthcare для оптических биосенсоров Biacore [46]. Для их выполнения фирма предусмотрела

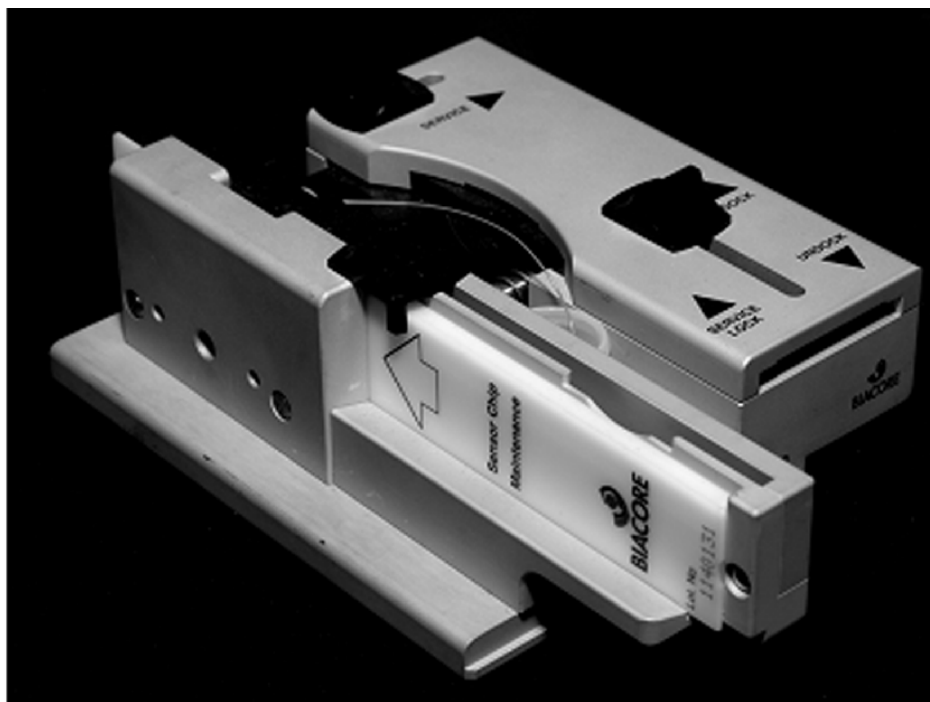
специальные программные модули в компьютерном обеспечении биосенсоров [47]. Однако данные протоколы также не стандартизированы по ряду процедур и требуют подбора и оптимизации параметров. Имеется более стандартизированный протокол, описывающий процедуру молекулярного фишинга белков с 6xHis-меткой на чипе NTA в оптических биосенсорах типа Biacore [48]. Однако необходимо отметить, что данный протокол был разработан на примере фишинга одного белка с 6xHis-меткой из лизата клеток *E. coli*, в которых он был экспрессирован. Пригодность данного протокола для фишинга других белков с 6xHis-меткой и их комплексов с белками-партнёрами авторами не проверялась.

Основной проблемой технологии молекулярного фишинга на оптическом чипе биосенсора является ничтожно малая площадь рабочей поверхности чипа в измерительном канале. Так в 4-х канальных оптических биосенсорах Biacore 3000, T100 и T200 площадь рабочей поверхности чипа в одном измерительном канале равна примерно 1,2 мм<sup>2</sup>. Даже при условии одновременного использования всех 4-х каналов биосенсора общая площадь будет не больше 5 мм<sup>2</sup>, что обеспечит максимальный уровень фишинга не более 0,25 нг белка-партнера. В тоже время для надежной идентификации белков многим стандартным LC-MS/MS системам требуются не менее 2-5 нг идентифицируемого белка в образце.

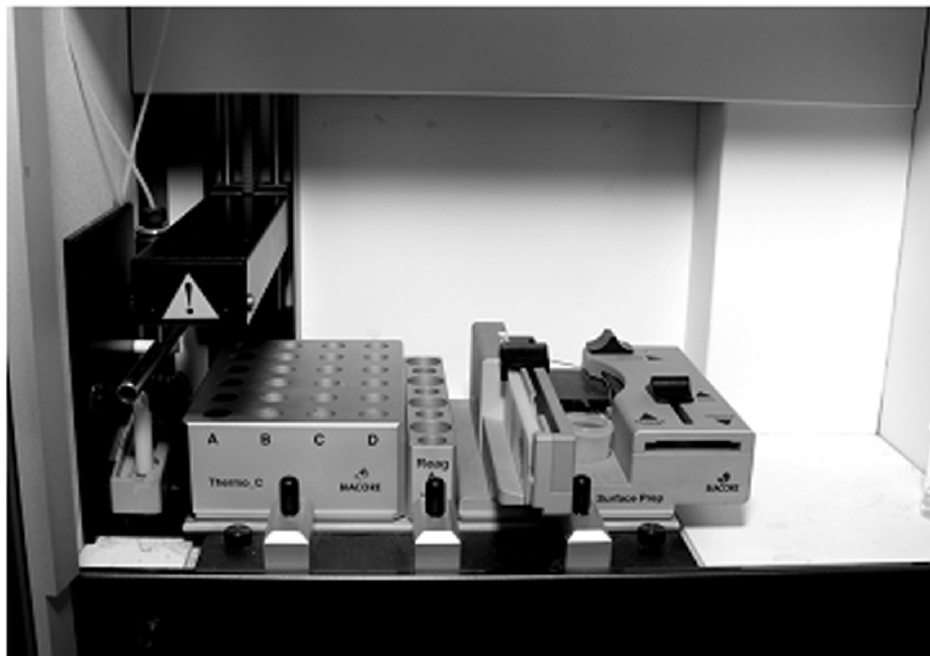
Данную проблему можно решать как путем накопления материала за счёт 10-20 кратного повтора процедуры фишинга, так и путём использования специального дополнительного модуля SurfacePrep, разработанного фирмой GE Healthcare для биосенсора Biacore 3000 (рис. 3). В данном устройстве предусмотрены два варианта проточной системы - конфигурация SP1 с 4-мя каналами (эквивалент измерительной проточной системы в биосенсоре) и конфигурация SP2 с одной проточной ячейкой. Площадь рабочей поверхности оптического чипа в 1-канальном варианте модуля SurfacePrep составляет 16 мм<sup>2</sup>, что превышает общую поверхность 4-х каналов биосенсора более чем в 3 раза, и позволяет “поймать” за одну процедуру фишинга до 0,8 нг белка. Следовательно, достаточное количество белка для идентификации по технологии LC-MS/MS может быть накоплено всего за 3-5 повторов процедуры фишинга.

Фирма GE Healthcare предоставляет примерный протокол и соответствующие компьютерные программные процедуры для молекулярного фишинга на оптическом чипе с использованием модуля SurfacePrep для оптического биосенсора Biacore 3000 [47]. Данный протокол также требует оптимизации параметров и стандартизации процедур.

Применение всех вышеизложенных вариантов молекулярного фишинга на поверхности оптических чипов сильно ограничено крайне малым количеством “вылавливаемых” белков-партнеров, что обусловлено небольшой площадью рабочей поверхности чипов. Это создает значительные трудности в получении достаточного количества белков-партнёров для их масс-спектрометрической идентификации. С нашей точки зрения, данные технологии незаменимы на первых этапах исследований ББВ, когда необходим прямой аналитический метод контроля и оптимизации всех этапов молекулярного фишинга. В то же время, выполнение препаративного варианта молекулярного фишинга лучше проводить с помощью других технологий, где используются носители с гораздо большей рабочей поверхностью, например, сорбенты типа сефарозы или микро- и нано-частицы. Среди последних наиболее перспективными нам кажутся парамагнитные наночастицы, все манипуляции с которыми (концентрирование, перенос из одной среды в другую, отмывки и так далее) можно осуществлять с помощью внешнего магнитного поля.



А



Б

Рисунок 3.

Общий вид дополнительного модуля SurfacePrep (А) и его размещение в рабочей зоне автоматического загрузчика проб биосенсора Biacore 3000 (Б).



## 2. МОЛЕКУЛЯРНЫЙ ФИШИНГ НА ПОВЕРХНОСТИ ПАРАМАГНИТНЫХ НАНОЧАСТИЦ.

Технология магнитного разделения (сепарации) биологических молекул основана на связывании целевых молекул на поверхности магнитных или парамагнитных частиц, манипуляции с которыми осуществляются с помощью внешнего магнитного поля.

Магнитные частицы, созданные из оксида железа, являются биологически совместимыми и широко применяются в биомедицинских исследованиях от контрастных агентов для ЯМР изображений до молекулярного разделения [49-51].

Для использования магнитных частиц в протоколах аффинной очистки биомолекул крайне важно, чтобы их размер был в микронном или субмикронном диапазоне (от 100 до 2000 нм) [52-54]. Как правило, это достигается при их изготовлении путем включения более мелких магнитных наночастиц в полимерный или иной матрикс. Данное требование обусловлено необходимостью оптимизации двух очень важных параметров - максимальная площадь поверхности и быстрая магнитная седиментация во внешнем магнитном поле. Дело в том, что удельная площадь поверхности частиц растет при уменьшении размера, в то время как магнитная седиментация при этом уменьшается. При уменьшении диаметра магнитных частиц до 10 нм, такие частицы слабо и неодинаково реагируют на магнитное поле, так как имеют большой разброс по плотности и ориентации суперпарамагнитных частиц, включенных в полимерный матрикс [55, 56]. При крайне малых размерах магнитных частиц их практически невозможно сконцентрировать и отделить от жидкой среды. Такая суспензия магнитных наночастиц ведет себя как магнитная жидкость. Таким образом, магнитные наночастицы для аффинного разделения биологических молекул должны удовлетворять следующим требованиям: 1) быстро перемещаться в градиенте внешнего магнитного поля; 2) быть однородными по размеру и иметь сферическую форму; 3) иметь высокую дисперсионную устойчивость в широком диапазоне растворителей; 4) низкий уровень не специфической сорбции биомолекул [57-59].

Применение парамагнитных наночастиц для аффинного разделения биологических макромолекул имеет несколько неоспоримых преимуществ, главными из которых являются: (а) универсальность использования внешнего магнитного поля для концентрирования, сбора и переноса частиц из жидкости в жидкость, и (б) быстрота процесса магнитного разделения, осуществляемого за 30-60 с, в то время как обычные методы типа хроматографии и центрифугирования требуют от десятков минут до часов [60].

В настоящее время в научных исследованиях используются как самодельные, так и коммерчески доступные магнитные наночастицы. Способы иммобилизации лигандов на поверхности частиц принципиально ничем не отличаются от таковых для аффинных сорбентов и оптических чипов. Существуют коммерческие наборы для связывания целевых белков на поверхности частиц, а также готовые наночастицы с уже иммобилизованными аффинными реагентами типа NTA или белка А для связывания 6xHis меченных белков или антител, соответственно [61, 62].

Для манипуляции магнитными наночастицами с помощью внешнего магнитного поля разработан различный лабораторный инструментарий. В большинстве моделей используются постоянные магниты для осаждения магнитных наночастиц на стенку или дно ёмкости (пробирки или лунки

планшета). Наиболее инновационным является магнитная пипетка PickPen 1-M [63] фирмы Bio-Nobile (Финляндия). В данном устройстве использован миниатюрный (2×20 мм) супермагнит из неодима, что обеспечивает быстрое вылавливание и перенос магнитных наночастиц из жидкости в жидкость при объёмах менее 1 мл.

**ЗАКЛЮЧЕНИЕ.** В настоящее время большое разнообразие подходов в белковой интерактомике позволяет осуществлять активное изучение ББВ, дополняя наши знания в области протеомики и системной биологии. Наиболее перспективными направлениями в последние годы стали новые экспериментальные подходы, интегрирующие методы молекулярного фишинга целевых комплексов белков с их последующей идентификацией с помощью масс-спектрометрии и валидации найденных белковых пар методом SPR.

Данная работа была частично поддержана Министерством образования и науки РФ (гос. контракт № 16.552.11.7001) и РФФИ (гранты 11-04-01163-а и 10-04-90026-Бел\_а).

Авторы благодарят фирму “GE Healthcare” (Россия) за научную и техническую поддержку.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Claverie J.M. (2001) *Science*, **291**, 1255-1257.
2. Alm E., Arkin A.P. (2003) *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **13**, 193-202.
3. Cesareni G., Ceol A., Gavrilu C., Palazzi L.M., Persico M., Schneider M.V. (2005) *FEBS Lett.*, **579**, 1828-1833.
4. Pieroni E., de la Fuente van Bentem S., Mancosu G., Capobianco E., Hirt H., de la Fuente A. (2008) *Proteomics*, **8**, 799-816.
5. Kandpal R., Saviola B., Felton J. (2009) *Biotechniques*, **46**, 351-355.
6. Zhang W., Li F., Nie L. (2010) *Microbiology*, **156**, 287-301.
7. Vidal M., Endoh H. (1999) *Trends Biotechnol.*, **17**, 374-381.
8. Veselovsky A.V., Ivanov Y.D., Ivanov A.S., Archakov A.I., Lewi P., Janssen P. (2002) *J. Mol. Recognit.*, **15**, 405-422.
9. Ivanov A.S., Gnedenko O.V., Molnar A.A., Mezentsev Y.V., Lisitsa A.V., Archakov A.I. (2007) *J. Bioinform. Comput. Biol.*, **5**, 579-592.
10. Fletcher S., Hamilton A.D. (2007) *Curr. Top. Med. Chem.*, **7**, 922-927.
11. Ershov P., Gnedenko O., Molnar A., Lisitsa A., Ivanov A., Archakov A. (2009) *Biochemistry (Moscow). Supplemental Series B: Biomedical Chemistry*, **3**, 272-288.
12. Ivanov A.S., Zgoda V.G., Archakov A.I. (2011) *Russ. J. Bioorg. Chem.*, **37**, 4-16.
13. Park H.R., Cockrell L.M., Du Y., Kasinski A., Havel J., Zhao J., Reyes-Turcu F., Wilkinson K.D., Fu H. (2008) *Molecular Biomethods Handbook*, Humana Press, Totowa, NJ, 463-494.
14. Chatton B., Bahr A., Acker J., Keding C. (1995) *Biotechniques*, **18**, 142-145.
15. Forde G.M. (2008) *Methods Mol. Biol.*, **421**, 125-136.
16. Viljanen J., Larsson J., Broo K.S. (2008) *Protein Expr. Purif.*, **57**, 17-26.
17. Jung J.W., Jung S.H., Kim H.S., Yuk J.S., Park J.B., Kim Y.M., Han J.A., Kim P.H., Ha K.S. (2006) *Proteomics*, **6**, 1110-1120.
18. Schmitt J., Hess H., Stunnenberg H.G. (1993) *Molecular Biology Reports*, **18**, 223-230.

19. Crowe J., Döbeli H., Gentz R., Hochuli E., Stüber D., Henco K. (1994) *Methods Mol. Biol.*, **31**, 371-387.
20. Scheich C., Sievert V., Büssow K. (2003) *BMC Biotechnology*, **3**, 12-20.
21. Suter B., Fetchko M.J., Imhof R., Graham C.I., Stoffel-Studer I., Zbinden C., Raghavan M., Lopez L., Beneti L., Hort J., Fillingham J., Greenblatt J.F., Giaever G., Nislow C., Stagljar I. (2007) *Genome Res.*, **17**, 1774-1782.
22. Shen A., Lupardus P.J., Morell M., Ponder E.L., Sadaghiani A.M., Garcia K.C., Bogyo M. (2009) *PLoS ONE*, **4**, e8119.
23. Debeljak N., Feldman L., Davis K.L., Komel R., Sytkowski A.J. (2006) *Anal. Biochem.*, **359**, 216-223.
24. Brizzard B. (2008) *BioTechniques*, **44**, 693-695.
25. Rich R.L., Myszka D.G. (2000) *Curr. Opin. Biotechnol.*, **11**, 54-61.
26. de Mol N.J., Fischer M.J.E. (eds.) (2010) *Surface Plasmon Resonance. Methods in Molecular Biology*, **627**, Springer, New York.
27. Nelson R.W., Jarvik J.W., Taillon B.E., Tubbs K.A. (1999) *Anal. Chem.*, **71**, 2858-2865.
28. Nedelkov D., Nelson R.W. (2001) *Proteomics*, **1**, 1441-1446.
29. Nedelkov D., Nelson R.W. (2003) *J. Mol. Recognit.*, **16**, 15-19.
30. Bartley T.D., Hunt R.W., Welcher A.A., Boyle W.J., Parker V.P., Lindberg R.A., Lu H.S., Colombero A.M., Elliott R.L., Guthrie B.A., Hoist P.L., Skrine J.D., Toso R., Zhang M., Fernandez E., Trail G., Varnum B., Yarden Y., Hunter T., Fox G.M. (1994) *Nature*, **368**, 558-560.
31. Nelson R.W., Nedelkov D., Tubbs K.A. (2000) *BIAJournal*, **1**, 25-26.
32. Zhukov A., Schurenberg M., Jansson O., Areskoug D., Buijs J. (2004) *J. Biomol. Tech.*, **15**, 112-119.
33. Grote J., Dankbar N., Gedig E., Koenig S. (2005) *Anal. Chem.*, **77**, 1157-1162.
34. Larsericsdotter H., Jansson O., Zhukov A., Areskoug D., Oscarsson S., Buijs J. (2006) *Proteomics*, **6**, 2355-2364.
35. Bouffartigues E., Leh H., Anger-Leroy M., Rimsky S., Buckle M. (2007) *Nucleic Acids Res.*, **35**, e39.
36. Visser N.F.C., Heck A.J.R. (2008) *Expert Rev. Proteomics*, **5**, 425-433.
37. Borch J., Roepstorff P. (2006) *Mol. Biotechnol.*, **33**, 179-190.
38. Nedelkov D., Nelson R.W. (2003) *J. Mol. Recognit.*, **16**, 9-14.
39. Berggerd T., Linse S., James P. (2007) *Proteomics*, **7**, 2833-2842.
40. Jecklin M.C., Schauer S., Dumelin C.E., Zenobi R. (2009) *J. Mol. Recognit.*, **22**, 319-329.
41. Buneeva O., Gnedenko O., Zgoda V., Kopylov A., Glover V., Ivanov A., Medvedev A., Archakov A. (2010) *Proteomics*, **10**, 23-37.
42. Nelson R.W., Krone J.R., Jansson O. (1997) *Anal. Chem.*, **69**, 4363-4368.
43. Williams C., Addona T.A. (2000) *Trends Biotechnol.*, **18**, 45-48.
44. Nedelkov D. (2010) In: *Surface Plasmon Resonance: Methods and Protocols*, (de Mol N.J., Fischer M.J.E., eds.) Humana Press, London, 261-268.
45. Roepstorff P. (1997) *Curr. Opin. Biotechnol.*, **8**, 6-13.
46. Technology Note 18 "Analyte recovery in Biacore 3000: optimized functions for SPR-MS applications" (2007) GE Healthcare, Sweden.
47. *Biacore 3000 Instrument Handbook BR-1003-81 Edition AG* (2007) GE Healthcare, Sweden.
48. Borch J., Roepstorff P. (2010) In: *Surface Plasmon Resonance: Methods and Protocols*, eds. N.J. de Mol, M.J.E. Fischer, Humana Press, London, 269-281.
49. Weissleder R., Elizondo G., Wittenberg J., Rabito C.A., Bengel H.H., Josephson L. (1990) *Radiology* **175**, 489-493.

#### ПРОТОКОЛЫ БЕЛКОВОЙ ИНТЕРАКТОМИКИ: МОЛЕКУЛЯРНЫЙ ФИШИНГ

50. *Zabow G., Dodd S., Moreland J., Koretsky A.* (2008) *Nature*, **453**, 1058-1063.
51. Invitrogen Corporation website: <http://www.invitrogen.com>
52. *Safarik I., Safarikova M.* (2004) *Biomagn. Res. Technol.*, **2**, 7-24.
53. *Berensmeier S.* (2006) *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **73**, 495-504.
54. *Tamura T., Terada T., Tanaka A.* (2003) *Bioconjug. Chem.*, **14**, 1222-1230.
55. *Wormuth K.* (2001) *J. Colloid Interface Sci.*, **241**, 366-377.
56. *Zheng W., Gao F., Gu H.* (2005) *J. Magn. Magn. Mater.*, **293**, 199-205.
57. *Liu X., Guan Y., Liu H., Ma Z., Yang Y., Wu X.* (2005) *J. Magn. Magn. Mater.*, **293**, 111-118.
58. *Franzreb M., Siemann-Herzberg M., Hogley T.J., Thomas O.R.* (2006) *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **70**, 505-516.
59. *Dresco P.A., Zaitsev V.S., Gambino R.J., Chu B.* (1999) *Langmuir*, **15**, 1945-1951.
60. *Sandhu A., Handa H., Abe M.* (2010) *Nanotechnology*, **21**, 442001, 22 pp.
61. *Khng H.P., Cunliffe D., Davies S., Turner N.A., Vulfson E.N.* (1998) *Biotechnol. Bioeng.*, **60**, 419-424.
62. *Abudiab T., Beitle R.R.* (1998) *J Chromatogr A*, **795**, 211-217.
63. *PickPen 1-M*, Instruction for use ([www.bio-nobile.com](http://www.bio-nobile.com)).

Поступила: 14. 09. 2011.

#### PROTOCOLS OF PROTEINS INTERACTOMICS: MOLECULAR FISHING ON OPTICAL CHIPS AND MAGNETIC NANOPARTICLES

*A.S. Ivanov, P.V. Ershov, Yu.V. Mezentsev, E.V. Poverennaya, A.V. Lisitsa, A.I. Archakov*

Institute of Biomedical Chemistry, Russian Academy of Medical Sciences, ul. Pogodinskaya, 10,  
Moscow, 119121 Russia; tel.: +7-499-246-3693; e-mail: [alexei.ivanov@ibmc.msk.ru](mailto:alexei.ivanov@ibmc.msk.ru)

Now it is absolutely clear, that the majority of proteins in living systems function due to interaction with each other in stable or dynamic proteins complexes. Therefore necessity of deeper studies of proteins functions causes expansion of protein-protein interaction research. In the present review the brief description and comparative estimation of experimental methods and protocols of protein interactomics, based on technology of molecular fishing on an optical chips and paramagnetic nanoparticles is given.

**Key words:** interactomics, protein-protein interaction, proteomics, molecular fishing, optical biosensor, magnetic particles, protein mass-spectrometry.