

УДК 577.1, 557.152.3, 538.975, 621.382.3

©Коллектив авторов

АСМ-ТЕХНОЛОГИИ КАК ПУТЬ К ОБРАТНОМУ ЧИСЛУ АВОГАДРО

Т.О. Плешакова, И.Д. Шумов, Ю.Д. Иванов, К.А. Мальсагова,
А.Л. Кайшева, А.И. Арчаков*

Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича,
119121, г. Москва, ул. Погодинская, 10; тел.: (499)246-37-61; факс: (499)245-08-57;
эл. почта: shum230988@mail.ru

Достижение концентрационного предела детекции белков на уровне обратного числа Авогадро определяет современное развитие протеомики. В настоящей работе анализируются возможности приближения к достижению обратного числа Авогадро с помощью нанотехнологических методов: АСМ-фишинга с механическим и электрическим возбуждением среды, нанопроводных детекторов, и других методов. Продемонстрирована возможность АСМ-фишинга для выявления, подсчёта, визуализации и характеристики физико-химических свойств белков в концентрациях вплоть до 10^{-17} – 10^{-18} М. Комбинирование АСМ-фишинга с масс-спектрометрическими методами позволяет идентифицировать таким образом выявленные белки не только в чистых растворах, но и в многокомпонентной биологической жидкости (сыворотке крови). Анализируются возможности использования СОМ-амперов для повышения эффективности биоспецифического фишинга как в АСМ, так и в нанопроволочных системах.

В работе приводятся критерии оценки чувствительности детектирующих систем на основе фишинга. Дается оценка эффективности фишинга в зависимости от параметров детектирующей системы. Анализируются особенности практической реализации фишинга белков в зависимости от соотношения объема анализируемого раствора и поверхности детектирующей системы; обсуждаются преимущества и недостатки современных перспективных нанотехнологических методов обнаружения белков, реализуемых на базе этих схем.

Ключевые слова: атомно-силовая микроскопия, нанопроволоки, низкокopiesные белки, биосенсор.

DOI: 10.18097/PBMC20156102239

ВВЕДЕНИЕ

Детекция белков с высокой чувствительностью представляет собой важную биомедицинскую задачу. Это обусловлено тем, что в плазме крови человека основную долю белков составляют низкокopiesные белки, присутствующие в концентрациях ниже 10^{-15} М, и даже 10^{-18} М [1]. Такие белки могут служить потенциальными маркерами различных патологических состояний человека, в том числе социально-значимых заболеваний. Некоторые

из этих белков уже используются как онкомаркеры для диагностики. По оценке Rissin и соавторов [2], для диагностики онкологических [3] и вирусных заболеваний (таких, как ВИЧ и гепатит С [4]) 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 методы с использованием одномерного

Принятые сокращения: AFM-DPN – нанолитография с использованием зонда АСМ; AFP – α -фетопrotein; D-NFATc1 – ДНК-связывающий фрагмент ядерного фактора активированных Т-клеток; HBsAg – поверхностный антиген вируса гепатита В; HCVcoreAg – кор-антиген вируса гепатита С; HSA – сывороточный альбумин человека; 2DE – двумерный электрофорез; CRP – С-реактивный белок человека; IDE – одномерный электрофорез; IL – интерлейкин; LC – жидкостная хроматография; LSPR – локализованный поверхностный плазмонный резонанс; MRM – мониторинг множественных реакций; MS – масс-спектрометрия; PSA – простатоспецифический антиген; PSA-ACT – комплекс простатоспецифического антигена с α_1 -антихимотрипсином; S/N – соотношение сигнал/шум; TIRFM – флуоресцентная микроскопия в конфигурации полного внутреннего отражения; TNF α – фактор некроза опухоли человека; АСМ – атомно-силовая микроскопия; НП – нанопроволока (нанопровод); ELISA – иммуноферментный анализ; SPR – поверхностный плазмонный резонанс.

* – адресат для переписки

электрофореза (IDE), двумерного электрофореза (2DE-MS), жидкостной хроматографии (LC-MS) составляет $DL \leq 10^{-12}$ – 10^{-13} М [5]. Очевидно, что такой чувствительности недостаточно для детекции низкокопийных белков в биологическом материале. В связи с этим в последнее время были предприняты попытки повышения чувствительности МС-методов. Так, в ряде работ сообщается о возможности использования методов высокочувствительного МС-анализа для детекции белков с пределом чувствительности $\sim 10^{-14}$ – 10^{-16} М [6, 7]. Более того, в [8] был предложен оригинальный подход на основе модификации мониторинга множественных реакций (multiple reaction monitoring, MRM), заключающейся в комбинации необратимого фишинга белков на поверхность микрочастиц с последующим MRM-анализом. Это позволило авторам достичь $DL \sim 10^{-18}$ М при детекции СYP102 и BSA. В то же время, использование методов МС часто связано с определёнными трудностями, к числу которых относятся низкая эффективность ионизации белков или пептидов, а также потери части исследуемого образца в процессе его доставки в область детектора. Дальнейшее повышение чувствительности методов с использованием МС связано с преодолением этих трудностей.

Другие подходы к высокочувствительной детекции белков основаны на использовании аналитических микро(нано)технологических систем. В стандартных аналитических микросистемах, применяемых в протеомике, как правило, используются подходы на основе фишинга белков из объёма анализируемой пробы на поверхность детектирующей системы. К ним относятся, например, методы на основе микрополей, которые позволяют проводить детекцию белков с чувствительностью $\sim 10^{-12}$ – 10^{-13} М [9]. В то же время, в последние годы разработаны новые методы высокочувствительной детекции белков с помощью микро(нано)технологических аналитических систем для детекции белков с намного более высокой чувствительностью – $\sim 10^{-15}$ – 10^{-19} М, позволяющие, таким образом, приблизиться к значению обратного числа Авогадро, соответствующего $DL \sim 10^{-24}$ М [10]. В основном, данные методы также основаны на концентрировании этих белков с помощью фишинг-технологии с регистрацией их с более высокой чувствительностью – уже на уровне единичных молекул [4, 10–13], то есть в режиме счёта или в так называемом цифровом режиме. В этом случае используется схема регистрации на основе двоичной системы, где 0 – отсутствие, а 1 – присутствие белка. В литературе можно условно выделить две схемы фишинга. При реализации первой схемы фишинга – на малую поверхность из большого объёма – для повышения чувствительности системы вплоть до чувствительности на уровне единичных макромолекул используются биосенсоры с микро(нано)поверхностью. Счёт белков в этой схеме может производиться как в режиме прямой регистрации, без меток, при помощи молекулярных детекторов (то есть детекторов,

регистрирующих единичные молекулы белков), так и с использованием различных меток для усиления сигнала от выловленных белков. Чувствительность детекции белков при использовании этого типа схем фишинга очень высока и достигает в настоящее время 5×10^{-18} М в режиме прямой детекции белков [14], что сравнимо с чувствительностью МС-детекции, а в случае использования меток превышает предел МС-детекции на 1–2 порядка и составляет $\sim 10^{-20}$ М [15]. Во второй схеме, когда для фишинга используется большая поверхность микро(нано)частиц, регистрация сигнала от единичных белков проводится с использованием селективных схем усиления при помощи обычных детекторов. Использование второй схемы фишинга также позволяет проводить детекцию белков с исключительно высокой чувствительностью, достигающей $\sim 10^{-20}$ М [16]. Это указывает на большой потенциал использования микро(нано)технологических аналитических систем для детекции белков не только в субфемтомольных, но и в субаттомольных концентрациях, что важно для протеомных исследований и ранней диагностики.

В настоящем обзоре проводится анализ методов детекции белков с помощью микро(нано)технологических систем как в режиме прямой регистрации, так и с использованием меток. Описаны режимы цифровой регистрации и схемы их реализации.

1. ПРИНЦИПЫ МЕТОДОВ ВЫСОКОЧУВСТВИТЕЛЬНОЙ РЕГИСТРАЦИИ БЕЛКОВ

Существует два способа регистрации белков: она может проводиться как непосредственно в растворе по измерению его характеристик, так и на основе технологии фишинга, когда белок вылавливается на поверхность, концентрируется и регистрируется на этой поверхности. Наиболее распространены методы регистрации низкокопийных белков, основанные на использовании технологии фишинга. Данные по чувствительности, объёмам пробы, времени инкубации и другим параметрам таких высокочувствительных методов на основе технологии фишинга представлены в таблицах 1 и 2.

1.1. Основные подходы при реализации фишинга белков в сверхнизких концентрациях

При использовании технологии фишинга белок-мишень вылавливается из объёма анализируемого образца и локально концентрируется на твердой поверхности детектирующей системы, а регистрация выловленных молекул проводится за счёт использования либо молекулярных детекторов в цифровом режиме, то есть в режиме счёта единичных белковых молекул, либо при применении специальных схем усиления сигнала, позволяющих регистрировать единичные молекулы белков с использованием обычных детекторов.

Таблица 1. Основные характеристики чувствительности рассмотренных методов регистрации белков с вылавливанием из большого объема (V) на малую площадь (A).

Тип метода регистрации	Метод регистрации	$K=V/A$, мм	DL (М)	V ; A ; $t_{инкуб}^I$	Число вылавливаемых молекул при DL	Белок/вирус	Лит.
Фишинг из раствора							
Наномеханический	Химический АСМ-фишинг	$1,25 \times 10^6$	10^{-17}	500 мл; $0,4 \text{ мм}^2$; 3 ч	3×10^6	HRP	[17]
	Биоспецифический необратимый АСМ-фишинг	$1,25 \times 10^6$	10^{-16}	50 мл; $0,4 \text{ мм}^2$; 1 ч	3×10^6	HCVcoreAg	[4]
	Биоспецифический АСМ-фишинг	-	10^{-16}	-	-	Парвовирус собаки	[12]
Электрический	АСМ-фишинг с электрической стимуляцией	$1,2 \times 10^7$	10^{-18}	100 мл; 8500 мкм^2 ; 100 с	6×10^4	HSA, цитохром b_5	[27]
	Нанопроводной (цифровой режим)	$>6 \times 10^6$	8×10^{-17}	~ 100 мкл; $<2 \text{ мкм}^2$; ~ 1000 с	$1,2 \times 10^6$	Вирус гриппа А	[13]
	Нанопроводной	$\sim 5 \times 10^7$	10^{-14}	100 мкл; $\sim 2 \text{ мкм}^2$; ~ 10 с	6×10^5	Стрептавидин	[36]
		$>2,5 \times 10^7$	3×10^{-14}	~ 25 мкл; $<1 \text{ мкм}^2$; ~ 500 с	$4,5 \times 10^5$	PSA	[31]
		$2,2 \times 10^8$	7×10^{-14}	200 мкл; $0,9 \text{ мкм}^2$; <20 мин	$8,4 \times 10^6$	HBsAg	[18]
			$3,5 \times 10^{-15}$		$4,2 \times 10^5$	AFP	
			$2,5 \times 10^{-15}$		3×10^5	D-NFATc1	[29]
		$3,5 \times 10^6$	10^{-16}	14 мкл; 4 мкм^2 ; ~ 10 с	842	BSA	[26]
	-	10^{-16}	$0,05 \text{ мкм}^2$; <100 с	-	PSA	[56]	
	Молекулярный импринт	113	$\sim 2 \times 10^{-17}$	50 мкл; $0,44 \text{ мм}^2$; 30 мин	150	Ферритин человека	[37]*
Оптический	Микротороидный	$3,17 \times 10^5$	5×10^{-18}	1 мл; 3158 мкм^2 ; 3-10 с	3010	Интерлейкин 2	[14]
	LSPR	-	$1,11 \times 10^{-16}$	~ 1 мл	6×10^4	PSA-ACT	[61]
		-	10^{-18}	1 мл; 1 ч	600		[62]
	LSPR ⁺	-	7×10^{-18}	1 ч	-	Лизоцим	[64]
	SPR ⁺	500	10^{-18}	600 мкл; $1,2 \text{ мм}^2$; 2 ч	361	IgE	[63]
	TIRFM ⁺	5×10^7	5×10^{-20}	100 мкл; $16 \times 0,125 \text{ мкм}^2$; 2,5 ч	3	CRP	[15]
		$2,5 \times 10^7$	6×10^{-19}	50 мкл; $16 \times 0,025 \text{ мкм}^2$; 1 ч	18	TNF α и IL-1 α	[65]
Фишинг из сыворотки крови							
Электрический	Нанопроводной	$>2,5 \times 10^7$	3×10^{-14}	~ 25 мкл; $<1 \text{ мкм}^2$; ~ 500 с	$4,5 \times 10^5$	PSA	[31]
		-	10^{-16}	30 мин	-	Тропонин Т	[57]
	Микротороидный	$3,17 \times 10^5$	3×10^{-16}	1 мл; 3-10 с	$1,8 \times 10^5$	Интерлейкин 2	[14]
Оптический	TIRFM ⁺	$2,5 \times 10^7$	$8,9 \times 10^{-19}$	50 мкл; $16 \times 0,025 \text{ мкм}^2$; 1 ч	18	TNF α и IL-1 α	[65]**

Примечание: $t_{инкуб}$ - время инкубации; + - использование меток для усиления сигнала; * - площадь поверхности детектора рассчитана, принимая поверхность нанотрубки плоской; площадь поверхности отпечатков молекул ферритина человека составляет $0,024 \text{ мм}^2$, при этом $V/A=2,1 \times 10^3 \text{ мм}$; ** - в образце слюны.

Таблица 2. Основные характеристики чувствительности рассмотренных методов регистрации белков с вылавливанием из малого объема (V) на большую площадь (A).

Тип метода регистрации	Метод регистрации	$K=V/A$, мм	DL (М)	V ; A ; $t_{инкуб}^I$	Число выявляемых молекул при DL	Белок/вирус	Лит.
Фишинг из раствора							
Оптический	Цифровой ELISA	10	6×10^{-19}	100 мкл; $9,2 \text{ мм}^2$; ~ 1 ч	36	Стрептавидин	[2]
		3,75	10^{-19}	1 мл; 227 мм^2 ; ~ 2 ч	60	Стрептавидин	[69]
Фишинг из сыворотки крови							
Оптический	Цифровой ELISA	-	$<10^{-15}$	150 мкл; 1 мин	$<9 \times 10^4$	Тропонин I	[67]
		20	$\sim 10^{-15}$	100 мкл; $4,6 \text{ мм}^2$; 2 ч	$\sim 6 \times 10^4$	PSA	[2, 70]
		-	3×10^{-16}	200 мкл; 1 ч	$3,6 \times 10^4$	Интерлейкин-6	[68]
		3,75	2×10^{-18}	1 мл; 227 мм^2 ; 30 мин	1204	PSA	[69]
	Иммуноанализ на микрочастицах	58	6×10^{-19}	5 мкл; 8616 мкм^2 ; 1 мин	200	TNF α	[71]
	Плазмонный иммуноанализ	0,4	4×10^{-20}	1 мл; 2590 мм^2 ; 2 ч	24	PSA	[16]
1,46		4×10^{-20}	100 мкл; $68,4 \text{ мм}^2$; 1 ч	2	PSA, p24	[19]	

Примечание: $t_{инкуб}^I$ - время инкубации.

1.1.1. Прямые и непрямые методы детекции

Прямая цифровая регистрация осуществляется при помощи молекулярных детекторов, к которым относятся наномеханические АСМ-детекторы [4, 5, 10, 12, 17], электронные нанопроводные детекторы [13, 18], оптические детекторы [14], позволяющие регистрировать отдельные молекулы на поверхности детектора. Второй путь заключается в регистрации единичных молекул белка при помощи обычных детекторов с использованием промежуточных схем усиления сигнала от выловленных молекул, таких, как использование реакции ферментативного катализа с наработкой продукта с характерным спектром поглощения [19], использование других меток, например, меченых наночастиц с большой поверхностью [20, 21] и т.д.

1.1.2. Критерии оценки чувствительности детектирующих систем на основе фишинга

При оценке чувствительности системы детекции с использованием фишинга необходимо анализировать три параметра: 1) число молекул белка-мишени в образце; 2) эффективное время фишинга; 3) эффективность фишинга.

1.1.2.1. Оценка числа молекул белка-мишени в пробе. Количество молекул аналита в пробе может быть оценено следующим образом:

$$n_0 = N_{Av} C_0 V \quad (1),$$

где n_0 – число молекул аналита, присутствующих в пробе до начала фишинга; N_{Av} – число Авогадро,

$N_{Av} = 6 \times 10^{23}$ частиц/моль; C_0 – начальная концентрация белка-мишени, V – объем пробы. В таблице 3 показано количество молекул белка-мишени, содержащееся в анализируемой пробе при различных значениях V и C_0 . Как видно из таблицы 3, для достижения $DL = 10^{-19}$ М необходимо проектировать детектирующую систему так, чтобы иметь возможность регистрировать 60-600 молекул белка-мишени в случае наиболее часто используемых объемов пробы $V = 100$ мкл – 1 мл соответственно. Для достижения $DL = 10^{-20}$ М при использовании $V = 1$ мл необходимо обеспечить регистрацию уже 6 молекул белка-мишени. Это возможно обеспечить в случае проведения регистрации уже в цифровом режиме с чувствительностью на уровне единичных молекул.

 Таблица 3. Зависимость количества молекул белка-мишени N_0 , присутствующих в пробе, от объема пробы V и концентрации белка-мишени C .

V	10^{-15}	10^{-16}	10^{-17}	10^{-18}	10^{-19}	10^{-20}
C , М						
1 мкл	600	60	6	-	-	-
10 мкл	6000	600	60	6	-	-
100 мкл	6×10^4	6000	600	60	6	-
1 мл	6×10^5	6×10^4	6000	600	60	6
10 мл	6×10^6	6×10^5	6×10^4	6000	600	60
100 мл	6×10^7	6×10^6	6×10^5	6×10^4	6000	600

1.1.2.2. Оценка времени фишинга. Для оценки времени фишинга белка из объёма необходимо принять во внимание то обстоятельство, что при отсутствии перемешивания время доставки белковых молекул на поверхность детектирующей системы лимитируется скоростью молекулярной диффузии белка к этой поверхности. Так, для $V=100$ мкл время диффузии белка к плоской поверхности составляет порядка нескольких часов [22]. Таким образом, для эффективной доставки белка из больших ($V>100$ мкл) объёмов, например, $V=1$ мл, с целью снижения длительности эксперимента необходимо ускорять доставку белка к поверхности детектирующей системы. Для ускорения доставки аналита наиболее часто используется принудительное перемешивание [15, 17, 22], наложение электрического поля либо генерация электрического заряда [18, 23-29] и другие методы.

1.1.2.3. Оценка эффективности фишинга. Для оценки эффективности фишинга из объёма на поверхность следует ввести понятие фактора концентрирования, представляющего собой отношение концентрации этого белка в приповерхностном слое поверхности чипа или детектора к концентрации белка в объёме анализируемого раствора. При условии, что все молекулы n_0 , присутствующие в объёме V , могут быть выловлены и ковалентно связаны с поверхностью аналитического чипа площадью A (при этом концентрация молекул белка на поверхности чипа будет равна C_s) фактор концентрирования F может быть представлен как:

$$F = \frac{C_s}{C_0} \quad (2),$$

где $C_0 = \frac{n_0}{VN_{Av}}$ – объёмная концентрация белка в растворе до начала фишинга; $C_s = \frac{n_0}{A \times h \times N_{Av}}$ – концентрация молекул белка в объёме приповерхностного слоя, A – площадь аналитического чипа, h – высота слоя молекул белка, выловленных на поверхность чипа.

Уравнение (2) может быть представлено в более простом виде:

$$F = \frac{V}{A \times h} = \frac{V}{A} \left(\frac{1}{h} \right) \quad (3),$$

Из уравнения (3) видно, что F может достигать достаточно большой величины – порядка 10^8 при следующих условиях: высота слоя выловленных молекул $h=5$ нм, что соответствует высоте молекулы белка [30]; объём раствора аналита $V=1$ мл; площадь поверхности чипа $A=1$ мм². Это означает, что в случае необратимого фишинга из 1 мл раствора аналита с концентрацией 10^{-17} М концентрирование молекул с $F=10^8$ приведёт к увеличению объёмной концентрации 10^{-17} М до приповерхностной концентрации до 10^{-9} М, что значительно облегчает детекцию белков. Из уравнения (3) видно, что F прямо пропорционален объёму пробы

и обратно пропорционален площади чипа, поэтому эффективное концентрирование достигается за счёт вылавливания из большого объёма исследуемой пробы на малую площадь чипа. Этот подход использован, например, для систем на основе необратимого биоспецифического [4] и химического [17] АСМ-фишинга, когда вылавливаемые молекулы белка-мишени ковалентно связываются с иммобилизованными антителами или непосредственно с химически активированной поверхностью АСМ-чипа.

1.1.3. Соотношение объёма пробы (V) и площади поверхности детектирующей системы (A) в схемах фишинга

Условно в схемах реализации фишинга, описанных в литературе, можно выделить два принципиально различных подхода. При реализации первого подхода концентрирование белка-мишени за счёт фишинга производится из большого объёма пробы на малую поверхность микро(нано)биосенсора. При реализации второго подхода, наоборот, используется вылавливание из малого объёма на большую твёрдую поверхность микро(нано)частиц. Анализ литературных данных об используемых значениях объёма анализируемой пробы V и площади твёрдой поверхности детектирующей системы A даёт значения соотношения V/A , имеющего размерность длины, представленные в таблицах 1 и 2. Как следует из этой таблицы, при использовании первого подхода $V/A>100$ мм, в то время как во втором подходе $V/A<100$ мм. Таким образом, отношение V/A может быть использовано в качестве формального параметра отнесения схемы фишинга к тому или иному типу.

1.2. Особенности реализации схем фишинга

1.2.1. Особенности реализации схемы фишинга из большого объёма на малую поверхность

Первая особенность этого подхода, то есть регистрации на небольшой поверхности, заключается в следующем: высокая чувствительность регистрации достигается за счёт того, что чувствительный элемент детектора соизмерим с размером детектируемой молекулы белка, то есть детектор имеет линейные размеры ~ 10 нм. Это приводит к тому, что модификация малой поверхности детектора единичной молекулой аналита (белка, вируса и т.п.) вызывает существенное изменение свойств этой поверхности. К таким детектирующим системам можно отнести: нанопроводные детекторы, размер чувствительного элемента которых ~ 20 нм [31]; детектирующие системы на базе АСМ, размер чувствительного зонда АСМ в которых $\sim 1-10$ нм [32-34], и другие системы.

Следует учесть, что при таком подходе, несмотря на способность используемых детекторов регистрировать единичные молекулы белков, уровень шума в реальных экспериментах по фишингу в таких системах может быть гораздо выше. Так, в случае химического АСМ-фишинга с использованием в качестве детекторов

наномеханических систем уровень шума составляет ~ 500 частиц/400 мкм² [17], что обусловлено влиянием артефактов из-за неровностей поверхности чипа. Это приводит, во-первых, к тому, что для достижения $DL=10^{-17}$ М при таком уровне шума необходимо проводить фишинг из достаточно большого объема $V \sim 500$ мл [17]. Это повышение объема позволяет увеличить количество молекул аналита в пробе, и, соответственно, отношение S/N .

Вторая особенность подхода с использованием схемы фишинга из большого объема на малую площадь заключается в том, что для достижения субфемтомольной чувствительности необходимо принудительно ускорять доставку белка из объема образца к поверхности детектирующей системы. Это вытекает из следующих соображений. Поток молекул аналита на твердую поверхность детектирующей системы можно выразить как [35]:

$$G = \rho w A \quad (4),$$

где G – поток раствора аналита на твердую поверхность детектирующей системы площадью A ; ρ и w – соответственно плотность и скорость движения анализируемого раствора.

Из выражения (4) после несложных преобразований можно получить выражение для числа молекул n , доставляемых из раствора к поверхности A молекул аналита:

$$n = N_{Av} C w A \quad (5),$$

где C – концентрация молекул аналита.

Из выражения (5) следует, что число выловленных молекул составляет:

$$n_s = n_0 (1 - \exp[-wAt/V]) \quad (6).$$

Здесь n_0 – число молекул аналита в растворе до начала фишинга, n_s – число выловленных молекул аналита, t – эффективное время фишинга.

Как следует из уравнения (6), для вылавливания одного и того же количества молекул n_s при уменьшении площади поверхности детектирующей системы A скорость доставки w должна быть увеличена во столько же раз. Это реализуется за счёт использования гидродинамических [17, 22] или электромагнитных сил [23].

Третья особенность схем фишинга из большого объема на малую поверхность заключается в том, что необходимо обеспечить быструю регистрацию выловленных молекул аналита. Для регистрации молекул аналита используются сканирующие и матричные (панорамные) системы. В случае сканирующей системы, например, коммерческого стандартного АСМ за время сканирования 3 с возможно проанализировать всего лишь 400 мкм² поверхности АСМ-чипа. Поэтому для детекции белка при концентрациях $C_0 \leq 10^{-18}$ М необходимо использовать быстро сканирующие АСМ-системы. В случае использования матричных систем, например, нанопроводного детектора [31, 36], эта проблема решается проще, так как в этих системах молекулы аналита, приходящие на матрицу поверхностей нанопроводных детекторов, регистрируются в реальном времени.

Использование такого типа схем позволяет детектировать белки с очень высокой чувствительностью, достигающей 10^{-17} М в случае прямой детекции белков [17] и $\sim 10^{-20}$ М в случае использования меток [15].

1.2.2. Особенности реализации схемы фишинга из малого объема на большую поверхность

Другой подход базируется на вылавливании белка из малого объема образца на большую площадь твердой поверхности детектирующей системы, формируемую, как правило, за счёт использования большого количества микрочастиц, распределенных в анализируемой пробе. При таком подходе для достижения субфемтомольной чувствительности не требуется принудительно ускорять доставку белка, которая может осуществляться за счёт диффузии аналита к поверхности микрочастиц за счёт небольшого расстояния между ними [2]. Так, в объеме $V=100$ мкл при использовании 2×10^5 микрочастиц с иммобилизованными антителами это расстояние составляло ~ 80 мкм, при этом время доставки молекул аналита составляло $\sim 0,5$ ч [http://www.quanterix.com].

Вторая проблема связана с тем, что для достижения высокой чувствительности необходимо проводить регистрацию с высоким уровнем отношения S/N , позволяющим регистрировать сигнал от единичных молекул аналита с поверхности микро(нано)частицы. Проблема необходимости повышения отношения S/N решается, как правило, за счёт усиления полезного сигнала путём использования меток.

Использование второго типа схем фишинга позволяет детектировать белки с чувствительностью, достигающей $\sim 10^{-20}$ М [16].

Ниже рассмотрим конкретные методы детекции молекул-мишеней в субфемтомольных концентрациях более подробно.

2. ТЕХНИЧЕСКАЯ РЕАЛИЗАЦИЯ СХЕМ ВЫСОКОЧУВСТВИТЕЛЬНОЙ РЕГИСТРАЦИИ

2.1. Методы, основанные на вылавливании из большого объема на малую площадь

2.1.1. Прямые методы

Реализация фишинга из большого объема на малую поверхность с регистрацией выловленных молекул прямыми методами без использования меток позволяет детектировать белки с очень высокой чувствительностью, достигающей к настоящему времени 10^{-17} - 10^{-18} М [14, 17, 37].

2.1.1.1. Прямая наномеханическая детекция на базе АСМ. АСМ-детекция белков относится к нано-механическим методам прямой цифровой регистрации белков, то есть при подсчёте числа молекул белков на поверхности АСМ-чипа система генерирует сигнал 1, если находит молекулу белка, или 0, если молекулы нет. В этом методе чувствительный зонд АСМ сканирует поверхность чипа и способен регистрировать на ней индивидуальные молекулы белков, выловленные

из объёма, содержащего биологический материал [32, 33]. Ускорение фишинга может достигаться двумя путями: (1) за счёт принудительного механического перемешивания анализируемого образца (механическая стимуляция) [4, 17] и (2) за счёт дополнительной генерации заряда при инъекции раствора анализируемого белка в измерительную ячейку (электрическая стимуляция). Так, в [4] очищенный белок (кор-антиген вируса гепатита С, HCVcoreAg) биоспецифически вылавливался на антитела, модифицированные фотокросслинкером и иммобилизованные в небольшой ($A \sim 0,4 \text{ мм}^2$) зоне АСМ-чипа, в результате чего происходило биоспецифическое необратимое связывание белка-мишени. В этой работе белок-мишень был зарегистрирован при концентрации в пробе $C_0 = 10^{-16} \text{ М}$ при использовании $V = 50 \text{ мл}$ пробы и времени инкубации $t = 3 \text{ ч}$. В [17] производилось вылавливание пероксидазы хрена методом химического АСМ-фишинга. Белок-мишень вылавливался на небольшую ($A \sim 0,4 \text{ мм}^2$) поверхность АСМ-чипа, химически активированную дисукцинимидилкарбонатом (DSC), и ковалентно связывался с этой поверхностью. В этой работе использование для создания активированной зоны химического модификатора (DSC) вместо антител позволило повысить экспериментальную чувствительность АСМ-фишинга до 10^{-17} М при использовании 500 мл раствора пробы, сконцентрированного до 50 мл . На рисунке 1 показаны АСМ-изображения выловленных объектов в активированной и контрольной зонах чипа.

Время инкубации чипа в растворе пробы составляло в этом случае 3 ч . Было показано, что скорость вылавливания молекул белка-мишени тем выше, чем меньше объём анализируемого раствора и чем больше площадь химически активированной зоны. В то же время, эффективное концентрирование молекул белка-мишени достигается путём увеличения объёма анализируемого раствора и уменьшения площади активной зоны в соответствии с уравнением (4). Ускорение доставки белка осуществлялось за счёт механического перемешивания в турбулентном режиме с $Re \sim 10^4$. В этой работе показана теоретическая возможность дальнейшего повышения чувствительности метода химического АСМ-фишинга до 10^{-18} М за счёт повышения отношения S/N при увеличении объёма пробы и повышении качества поверхности чипа.

Для повышения эффективности АСМ-фишинга была использована электрическая стимуляция за счёт генерации заряда при инъекционном вводе раствора аналита в измерительную ячейку [27]. Объектами исследования служили сывороточный альбумин человека и цитохром b_5 . Эти белки вылавливались на подложку из графита с площадью рабочей зоны $A = 8400 \text{ мкм}^2$ из $V = 100 \text{ мл}$ раствора при времени фишинга менее 2 мин (100 с). Раствор при этом подавали в измерительную ячейку со скоростью 1 мл/с через наконечник с отверстием диаметром $0,8 \text{ мм}$. Такой подход позволил авторам зарегистрировать с помощью АСМ анализируемые белки в сверхнизких концентрациях до 10^{-18} М включительно.

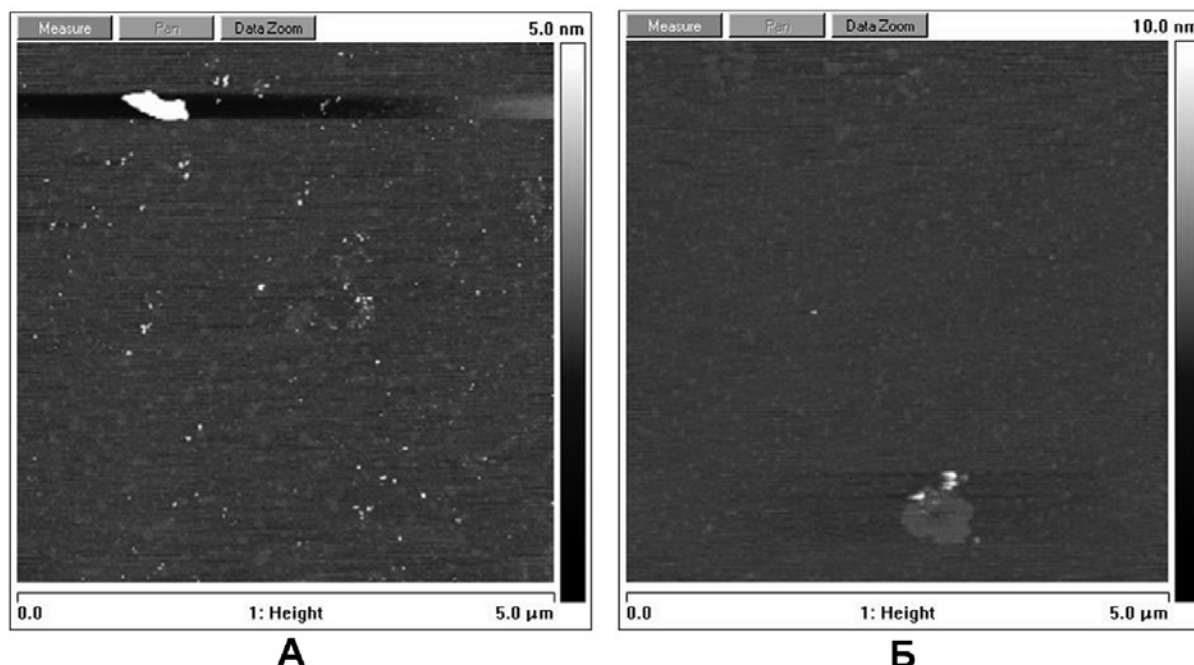


Рисунок 1. АСМ-изображения поверхности АСМ-чипа после инкубации в растворе пероксидазы хрена. (А) - рабочая зона АСМ-чипа, (Б) - контрольная зона АСМ-чипа. Начальная концентрация раствора белка $C_0 = 10^{-17} \text{ М}$, начальный объём $V = 500 \text{ мл}$; раствор сконцентрирован до 10^{-16} М лиофилизацией до конечного объёма раствора для фишинга 50 мл . Экспериментальные условия: площадь активированной зоны $A = 0,4 \text{ мм}^2$, время инкубации $t = 3 \text{ ч}$, площадь скана 25 мкм^2 .

В случае биоспецифического фишинга, в качестве молекул-зондов, иммобилизованных на АСМ-чипе, могут быть использованы не только антитела, но и аптамеры [38]. Аптамеры – одностранные ДНК или РНК, обычно размером от 30 до 80 нуклеотидов, обладающие способностью специфически связываться с определёнными молекулами-мишенями, в том числе и белками [39]. Они обладают рядом преимуществ по сравнению с антителами. В частности, в случае АСМ-фишинга, использование аптамеров позволяет существенно повысить контрастность АСМ-изображений выловленных белков по сравнению с использованием антител. Это достигается за счёт того, что высота молекул антител (1,5-2 нм [40]) сравнима с высотой молекул вылавливаемого белка, в то время как высота аптамеров существенно меньше (0,9 нм [41]). Более того, перспективным является дальнейший переход от аптамеров к СОМАмерам – модифицированным аптамерам, характеризующимся еще более высокой (по сравнению с аптамерами) аффинностью к определяемым белкам [42].

Однако, перечисленные методы на основе АСМ имеют ряд ограничений. Так, при использовании стандартного коммерческого АСМ скорость сканирования аналитического чипа невысока [4, 5, 43, 44], что не позволяет просканировать всю активированную поверхность чипа. Частично эта проблема может быть преодолена за счёт использования высокоскоростных АСМ [44, 45]. Однако, в настоящее время высокоскоростные АСМ (например, разработанные в [43]) позволяют сканировать поверхность чипа с высокой скоростью (превышающей скорость сканирования стандартного коммерческого АСМ в ~1000 раз) лишь очень малые локальные поля, $A \sim 1 \text{ мкм} \times 1 \text{ мкм}$, без возможности автоматического перевода сканера с площадки на площадку, что не приводит к значительному выигрышу во времени сканирования всей активированной площадки чипа. Это пока ограничивает использование АСМ в протеомике.

В то же время, большой интерес для протеомики и диагностики представляет метод комбинации АСМ-фишинга и МС-анализа, предложенный в [46]. Как отмечено выше, АСМ позволяет регистрировать белки с чувствительностью на уровне единичных молекул и проводить их подсчет, однако не позволяет идентифицировать эти молекулы. В свою очередь, МС позволяет проводить идентификацию молекул белков, выловленных на чип, но не позволяет проводить их подсчет. Комбинация АСМ и МС позволяет проводить высокочувствительную регистрацию белков и их идентификацию, что повышает надежность получаемых результатов. МС-идентификация, в частности, была использована для подтверждения АСМ-данных в выше описанных работах [27, 41]. При этом необходимо отметить, что в случае биоспецифического АСМ-фишинга полезно использование в качестве молекул-зондов аптамеров, не дающих вклад в масс-спектр определяемого белка, в отличие от антител [41].

Применительно к задачам диагностики, следует отметить, что метод комбинации АСМ с МС может быть использован для регистрации и идентификации белков не только в растворах [41], но и в сыворотке крови – в частности, для регистрации маркера гепатита С [47].

2.1.1.2. Прямая электрическая детекция.

В ряде работ показано, что использование нанопор для детекции белков с разностью потенциалов между разделяемыми ею *cis*- и *trans*-камерами позволяет регистрировать единичные белковые молекулы без использования меток [48, 49], то есть осуществлять их подсчет в цифровом режиме. При прохождении молекул белка через пору возникает блокада ионного тока через эту пору, что и регистрируется в реальном времени. Однако, концентрационная чувствительность большинства этих методов не превышает 10^{-8} М [50-52] вследствие низкой скорости доставки белка к поре. В работе Wei и соавт. [53] предложена схема биосенсора на базе нанопор, модифицированных специфическими рецепторами. Эти авторы использовали металлизированные титаном и золотом нанопоры (диаметром 20-50 нм и высотой 50 нм) из нитрида кремния, поверхность которых была модифицирована самоассоциированными монослоями этиленгликоль-трис-НТА тиола. Эта поверхность затем была функционализирована белком А с использованием Ni^{2+} -НТА. Сенсор на базе этих нанопор был использован для детекции IgG крысы и хомяка в объеме $V \sim 400 \text{ мкл}$ при концентрациях $\sim 10^{-9} \text{ М}$ в стохастическом режиме. В работе [54] для детекции белков использовали модифицированные золотом конические нанопоры из лавсана с диаметрами входного и выходного отверстий соответственно $\sim 600 \text{ нм}$ и $5-9 \text{ нм}$. Поверхность этих нанопор функционализировали молекулами-партнерами определяемых белков: биотином для детекции стрептавидина, белком G для детекции антител (IgG) и антителами против рицина для детекции рицина. Выходной диаметр модифицированных нанопор составлял 4-5 нм. В этой работе экспериментально показана принципиальная возможность регистрации белков в более низких концентрациях, $DL \sim 10^{-13} \text{ М}$, в объеме $V \sim 1,7 \text{ мл}$, однако при этом длительность анализа составляла $\sim 10 \text{ ч}$. Таким образом, к настоящему времени концентрационная чувствительность детекторов на базе нанопор невысока и не превышает 10^{-13} М .

В нанопроводных биосенсорах существенное увеличение скорости доставки молекул белка на поверхность сенсора, имеющую малую площадь $A \sim 1 \text{ мкм}^2$, и эффективное концентрирование достигается за счёт действия электрического поля НП, что позволяет регистрировать белки с высокой чувствительностью и при этом снизить объем пробы, необходимой для анализа [31, 36]. В случае детекции вирусных частиц этот НП-детектор производит подсчет этих частиц, то есть проводит регистрацию в цифровом режиме, как было показано при его использовании для регистрации единичных вирусных частиц гриппа А в растворах [13].

В случае детекции белков чувствительность НП-детектора пока ниже, поэтому проводится регистрация сигнала от небольшого ансамбля белковых молекул. Однако, теоретический предел чувствительности НП-детекторов может достигнуть единичных молекул белка при дальнейшем усовершенствовании технологии производства НП-сенсоров. Поэтому мы относим этот метод к условно-молекулярному детектированию. В большинстве работ чувствительность детекции белков при помощи нанопроводных биосенсоров достигала значений 10^{-14} – 10^{-15} М при использовании $V \sim 14$ – 200 мкл анализируемой жидкости [18, 31, 36, 55]. В нашей работе [18] была проведена детекция поверхностного антигена вируса гепатита В (HBsAg) в 200 мкл раствора очищенного белка в реальном времени на поверхности нанопровода (шириной $w=90$ нм, высотой $h=32$ нм и длиной $l=2$ мкм), модифицированного анти-HBsAg. При этом DL составил 7×10^{-14} М (рис. 2). Для другого очищенного белка, альфа-фетопротейна (AFP), DL в аналогичных условиях составил $3,5 \times 10^{-15}$ М [18].

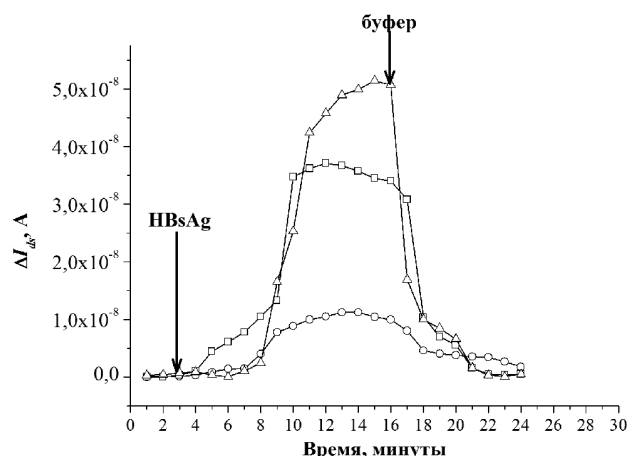


Рисунок 2. Зависимости разностного сигнала $D_{lds}(t)$ полученные при детекции очищенного HBsAg в растворах с помощью нанопроводного биосенсора. Концентрации HBsAg составляли 7×10^{-14} М (○), 7×10^{-11} М (□) и 7×10^{-10} М (△). Условия экспериментов: $w=90$ нм, $h=32$ нм, $l=2$ мкм, напряжение затвора +100 В, напряжение исток-сток 0,2 В, объем жидкости в кювете 200 мкл. Буферный раствор - 1 мМ К-фосфатный буфер, pH 7,4.

В другой работе биосенсор на базе аналогичных по характеристикам нанопроводов был использован для детекции онкомаркера D-NFATc1 с использованием двух типов молекул-зондов: антител и аптамеров [29]. Концентрационная чувствительность детекции составила $2,5 \times 10^{-15}$ М как при использовании аптамеров, так и при использовании антител. Учитывая тот факт, что аптамеры, в сравнении с антителами, обладают рядом преимуществ (более высокой химической и временной стабильностью, возможностью химической модификации концевых групп, а также более низкой стоимостью) они являются более привлекательным классом молекул для использования в качестве зондов в аналитической протеомике.

В нескольких недавно опубликованных работах сообщается о достижении более высокой чувствительности детекции белков при помощи НП-детекторов. Так, в [26, 56] сообщается о достижении $DL \sim 10^{-16}$ М в растворах очищенных белков бычьего сывороточного альбумина (BSA) и простатоспецифического антигена (PSA) соответственно. Объем пробы в [26] составлял $V=14$ мкл. Время установления сигнала при такой концентрации белка-мишени составляло в этих работах ~ 10 – 100 с. В то же время, использование НП-детекторов в протеомике и медицинской диагностике сопряжено с проблемами, связанными с сильным влиянием неспецифического связывания нецелевых белков с поверхностью сенсора [25]. Влияние неспецифического связывания снижают путём модификации поверхности НП слоями полимеров, например, аминополитиленгликоля [57] или силанов, молекулы которых содержат остатки этиленгликоля [24]. В [57] использование аминополитиленгликоля для модификации поверхности НП позволило регистрировать белки-мишени (тропонин Т, креатинкиназу ММ и креатинкиназу МВ) с $DL \sim 10^{-16}$ М в сыворотке крови. Тем не менее, сложность регенерации поверхности НП и, следовательно, проблематичность их повторного использования пока существенно ограничивают применение нанопроводных биосенсоров в протеомике и диагностике. При решении этих проблем возможность снижения чувствительности нанопроводных биосенсоров для осуществления регистрации единичных белковых молекул в цифровом режиме является достаточно привлекательной для детекции низкокопийных белков.

В [37] для прямой высокочувствительной регистрации очищенных белков в растворах без использования меток использовали метод молекулярного импринта в комбинации с электрохимическим детектором на основе углеродных нанотрубок. В этой работе авторы формировали отпечатки белков-мишеней в полифенольной матрице путём проведения осаждения покрытия на основе полифенола на массив углеродных нанотрубок с диаметром одной нанотрубки ~ 120 нм, выращенных на титановой подложке по методике, приведённой в [58]. Осаждение покрытия осуществлялось из раствора, содержащего очищенный белок-мишень (ферритин человека, онкопротеин E7 тип 16 или Са-кальмодулин) с последующей отмывкой белка из покрытия. В этой работе была достигнута высокая специфичность сенсора по отношению к белку-мишени. Предел чувствительности сенсора по отношению к ферритину, достигнутый в данной работе, составлял $\sim 2 \times 10^{-17}$ М при использовании $V \sim 50$ мкл пробы и времени инкубации 30 мин. Введение BSA в систему для определения ферритина практически не изменяло ответ сенсора относительно раствора без белка. Онкопротеин E7 регистрировали с $DL \sim 5,6 \times 10^{-17}$ М. Также отмечена высокая специфичность биосенсора на базе молекулярного импринта по отношению

к конформационным изменениям молекул белка-мишени. Так, при модификации сенсора в присутствии Са-кальмодулина не наблюдался ответ сенсора на введение кальмодулина, не связанного с Са.

2.1.1.3. Прямая оптическая детекция.

Биоспецифический фишинг белка-мишени из большого объема на малую поверхность детектора реализуется в оптических биосенсорах с повышенной чувствительностью. Обычно используемые структуры типа “поверхностный плазмонный резонанс” (SPR), волноводные структуры типа “резонансное зеркало” и структуры на базе локализованного поверхностного плазмонного резонанса (LSPR) дают чувствительность детекции на уровне $DL \sim 10^{-12} - 10^{-13}$ М [59, 60]. Однако, как отмечено в [14, 61], оптимальный подбор резонансных структур позволяет существенно повысить чувствительность детекции белков, поэтому эти структуры используются для регистрации белков в сверхнизких концентрациях.

Truong с соавторами удалось добиться субфемтомольной чувствительности детекции белка с использованием биосенсорного анализа на базе комбинации Рэлеевского светорассеяния и LSPR. В работе [61] высокая чувствительность LSPR достигалась за счёт использования несферических золотых наностержней (нанорезонаторов) размером $50 \times 18,2$ нм (с характеристическим соотношением $\sim 2,75$) вместо наносфер. В качестве белка-мишени использовали комплекс простатоспецифического антигена с α_1 -антихимотрипсином (PSA-ACT). Фишинг очищенного PSA производился из растворов на функционализированные антителами против PSA наностержни, иммобилизованные на поверхности силанизированного стекла. Наименьшая экспериментально зарегистрированная концентрация PSA составила $1,11 \times 10^{-16}$ М при использовании $V=1$ мл пробы [61]. Необходимо отметить, что геометрические характеристики нанорезонаторов существенно влияют на чувствительность анализа. Так, в другой работе [62] этими же авторами продемонстрирована возможность регистрации PSA-ACT в концентрации $\sim 10^{-18}$ М за время инкубации 1 ч при условии использования золотых наностержней с характеристическим соотношением (отношением длины к диаметру) 3,5. Таким образом, метод комбинации Рэлеевского светорассеяния и LSPR заслуживает большого внимания, так как позволяет регистрировать белки в сверхнизких концентрациях при достаточно небольших временах инкубации ~ 1 ч.

В [14] при помощи биосенсора на базе волноводных микротороидных структур был достигнут $DL=5 \times 10^{-18}$ М в цифровом режиме при вылавливании очищенного белка IL-2 на поверхность микротороидов площадью 3158 мкм², модифицированного поликлональными антителами против IL-2 при прокачке 1 мл раствора образца. Время, необходимое для детекции белка в такой концентрации, составляло ~ 10 с. В сыворотке крови детекция IL-2 проводилась с $DL \sim 3 \times 10^{-16}$ М. Высокая чувствительность такого биосенсора обусловлена очень высокой добротностью резонатора [14].

2.1.2. Методы с использованием меток для усиления сигнала

Для повышения чувствительности детекции белков необходимо повышать отношение S/N , для чего обычно используются метки. Использование меток для усиления сигнала ответа сенсора при реализации фишинга из большого объема на малую поверхность позволяет повысить чувствительность детекции белков на 1-3 порядка относительно прямых методов регистрации вплоть до $\sim 10^{-20}$ М [15].

Рассмотрим подробнее эти подходы.

2.1.2.1. SPR-детекция с усилением сигнала при помощи магнитных и золотых микрочастиц.

В [63] авторы детектировали очищенный иммуноглобулин Е (IgE) в растворе с $DL \sim 10^{-18}$ М методом SPR на поверхности золотого чипа (Biacore 3000), модифицированной специфическим аптамером к IgE. При этом время инкубации составляло как минимум 2 ч, а объем пробы, прокачиваемой со скоростью 5 мкл/мин, составил $V=600$ мкл. Для усиления сигнала ответа сенсора при проведении процедуры иммуноанализа в качестве меток вторичных антител использовали золотые наностержни размером 40×10 нм.

2.1.2.2. LSPR-детекция с усилением сигнала при помощи золотых наночастиц.

Truong с соавторами показали возможность сверхвысокочувствительной регистрации белка в растворе методом комбинации Рэлеевского светорассеяния и LSPR при использовании в качестве молекул-зондов аптамеров против определяемого белка и дополнительных меток для усиления сигнала [64]. Эти авторы показали возможность регистрации лизоцима в концентрации 7×10^{-15} М за время 1 ч с использованием 50 нм золотых наночастиц в качестве нанорезонаторов [64]. В указанных условиях концентрационная чувствительность регистрации белка существенно ниже, чем в случае использования наностержней в качестве нанорезонаторов. Однако, введение в систему дополнительных меток (в качестве которых использовались 12 нм золотые наночастицы, модифицированные поликлональными антителами против определяемого белка) позволила повысить чувствительность регистрации определяемого белка на 3 порядка, до 7×10^{-18} М. Учитывая ряд преимуществ использования аптамеров перед антителами, предложенная в работе [64] методика представляет большой интерес для протеомики.

2.1.2.3. Цифровые флуоресцентные методы.

Для достижения высокой чувствительности в схемах с флуоресцентной цифровой детекцией белков обычно проводятся измерения в конфигурации полного внутреннего отражения.

Для реализации схем флуоресцентной детекции нефлуоресцирующих молекул обычно используют 2 подхода. Первый подход основан на сшивании флуоресцирующих меток с молекулами аналита. Второй подход основан на добавлении к регистрируемому белку антител с флуоресцирующей меткой.

В работе [15] методом флуоресцентной микроскопии в конфигурации полного внутреннего отражения (TIRFM) проводилась детекция С-реактивного белка человека (CRP) в растворах очищенного рекомбинантного CRP и в сыворотке крови с использованием моноклональных анти-CRP в качестве первичных и биотинилированных поликлональных анти-CRP в качестве вторичных антител. В качестве флуоресцентной метки использовали конъюгат стрептавидина с AlexaFluor 488. Первичные антитела были иммобилизованы на поверхности силанизированного стекла в виде сформированного методом AFM-DPN или SPT-DPN массива пятен диаметром 360–400 нм. Детекцию белка-мишени производили в диапазоне концентраций 10^{-15} – 5×10^{-20} М. При этом объём пробы составлял 25–100 мкл, время инкубации – 2,5 ч при перемешивании. В этой работе DL для CRP составил 5×10^{-20} М в растворе очищенного белка и $8,9 \times 10^{-19}$ М в сыворотке крови. Авторы показали, что при концентрации аналита 5×10^{-20} М в каждой флуоресцирующей точке находилась одна молекула белка-мишени [15].

В работе [65] аналогичным методом проводили детекцию фактора некроза опухоли человека (TNF α) в растворах и клинических образцах слюны. Первичные антитела были иммобилизованы на поверхности силанизированного стекла в виде сформированного методом AFM-DPN массива пятен диаметра 179 нм. Объём анализируемой пробы составлял 50 мкл при времени инкубации 1 ч при перемешивании. В этой работе предел чувствительности для TNF α составил 6×10^{-19} М.

Таким образом, при использовании методов фишинга на малую площадь поверхности детектирующей системы достигнутые пределы чувствительности детекции белков составляют на настоящее время до 5×10^{-20} М в модельных растворах и до $8,9 \times 10^{-19}$ М в биологическом материале.

2.2. Методы с большой площадью и малым объёмом образца

Обычно в этих методах вылавливание белков проводится на поверхность микрочастиц с их последующим концентрированием. Регистрация выловленных молекул аналита проводится при помощи стандартных оптических устройств с использованием схем усиления сигнала для повышения отношения S/N .

2.2.1. Цифровой ELISA с использованием микрочастиц

Метод иммуноферментного анализа (ELISA) широко используется в протеомном анализе. Чувствительность стандартного метода ELISA с использованием микрочастиц составляет $\sim 10^{-12}$ М [66]. Это ограничение обусловлено тем, что в случае стандартного варианта ELISA флуоресцирующие молекулы, генерируемые каждой молекулой фермента, диффундируют в большой объём исследуемого раствора (обычно 0,1–1 мл), и для получения флуоресцентного сигнала выше фонового шума необходимо высвобождение $\sim 10^5$ ферментных меток.

Однако, было показано, что чувствительность метода ELISA может быть существенно повышена в случае использования приёмов, позволяющих регистрировать отдельные флуоресцирующие молекулы. Так, в работе [67] для этого использовался молекулярный оптический (фотонный) детектор. В этой работе был реализован иммуноанализ с использованием магнитных микрочастиц для вылавливания белка. Авторы зарегистрировали белок тропонин I в плазме крови при его концентрации менее 10^{-15} М в 150 мкл пробы и времени инкубации ~ 1 мин с использованием проточной микрокапиллярной системы и фотонного детектора в режиме счёта отдельных флуоресцирующих частиц в цифровом режиме. Авторы объясняют высокую чувствительность разработанного метода тем, что сконструированная ими система позволила отсеять фоновый шум, а также тем, что неспецифическое связывание с поверхностью микрочастиц было минимизировано.

В методе цифрового ELISA с использованием микрочастиц, разработанном Rissin и соавторами [2], был достигнут предел чувствительности $DL \sim 10^{-16}$ М [68] при использовании объёма пробы $V < 1$ мл. В методе цифрового ELISA реализован принцип иммуноанализа, в котором первичные антитела иммобилизованы на поверхность микрочастиц [2, 68–70]. Количество микрочастиц, вводимых в пробу, при этом должно превышать количество молекул аналита. После вылавливания аналита из раствора пробы микрочастицы с выловленными молекулами обрабатывали растворами вторичных антител и флуорофора. Далее микрочастицы подавали в матрицу с ячейками так, что каждая микрочастица попадала в отдельную ячейку объёмом 50 фл, в которой и происходила ферментативная реакция для регистрации и подсчёта отдельных флуоресцирующих микрочастиц. Метод цифрового ELISA позволяет определять белки в растворах и в сыворотке крови. Очищенный стрептавидин, меченный β -галактозидазой, был зарегистрирован в растворе объёмом 100 мкл при концентрации $\sim 10^{-19}$ М [2]. Хотя авторы и приводят такое значение DL , экспериментальные данные, приведённые в этой работе, показывают, что сигнал в пределах погрешности не отличался от сигнала при концентрации $\sim 10^{-18}$ М. Поэтому в таблице 1 мы привели $DL \sim 10^{-18}$ М. В случае анализа сыворотки крови концентрационная чувствительность такого метода по отношению к белку PSA, достигнутая этими авторами, была ещё ниже и составляла $\sim 10^{-15}$ М, что подтверждается дальнейшими исследованиями [70]. Использование метода цифрового ELISA позволило зарегистрировать TNF α и IL-6 в 200 мкл плазмы крови в концентрациях $\sim 10^{-16}$ М [68]. Другие авторы [69] показали, что увеличение числа изолированных микрочастиц в 20 раз по сравнению с использованным в [2] при увеличении объёма пробы до $V = 1$ мл позволяет повысить чувствительность детекции стрептавидин-меченой β -галактозидазы также в 20 раз до $DL \sim 10^{-20}$ М при использовании 1 мл пробы и времени инкубации 30 мин [69]. Быстрота

вылавливания белка и снижение времени инкубации достигаются в методе цифрового ELISA за счёт введения большого ($\sim 10^5$ – 10^6) количества активных микрочастиц в малый ($V \sim 100$ мкл – 1 мл) объём пробы.

В работе [71] белок TNF α вылавливали на поверхность больших магнитных микрочастиц диаметром 2,8 мкм, функционализированных поликлональными антителами против TNF α . Суспензию, содержащую ~ 3500 этих микрочастиц, смешивали с 5 мкл исследуемой сыворотки крови и инкубировали в течение 1 мин при перемешивании в магнитном поле с индукцией 82 мТ. Далее микрочастицы с выловленными молекулами TNF α дополнительно вылавливали в магнитном поле с индукцией 27 мТ на малые магнитные микрочастицы диаметром 1 мкм, иммобилизованные на поверхности стеклянного чипа, модифицированного APTES. Поверхность малых микрочастиц была также функционализирована антителами к TNF α . Выловленные большие микрочастицы, содержащие TNF α , детектировали с помощью оптического микроскопа. Предел чувствительности этого метода по отношению к TNF α составил 6×10^{-17} М. Исследуемый объём пробы (5 мкл) содержал в условиях эксперимента ~ 200 молекул белка-мишени.

2.2.2. Иммуноанализ с использованием плазмонного резонанса на золотых наночастицах в растворе

Методы на основе плазмонного резонанса могут быть реализованы не только в конфигурациях, при которых резонансные структуры располагаются на твердой поверхности, но и когда эти структуры распределены в коллоидном растворе. Примерами использования метода плазмонного резонанса на золотых наночастицах в коллоидном растворе является работа [19].

В работе [16] предложена схема на базе LSPR с дополнительным усилением сигнала за счёт использования оседания серебряных наночастиц на коллоидном растворе золотых нанорезонаторов. В этой работе белок PSA вылавливали на поверхность золотых нанорезонаторов размером 60 ± 8 нм, модифицированных поликлональными антителами против PSA. Выловленные из сыворотки крови молекулы PSA детектировали при помощи вторичных моноклональных анти-PSA и анти-антител, меченных глюкозооксидазой. Глюкозооксидаза вызывала образование в пробе H_2O_2 и восстановление введённых в систему ионов серебра до металлического серебра, которое оседало на поверхности золотых нанорезонаторов. Это вызывало смещение максимума спектра поглощения в синюю область, что и регистрировалось детектором. В этой работе был достигнут $DL \sim 4 \times 10^{-20}$ М для PSA при использовании 1 мл пробы и времени инкубации пробы 2 ч.

В другой работе [19] фишинг белка-мишени (PSA и капсид антигена ВИЧ – p24) из сыворотки крови производили на поверхность лунок стандартных планшетов, функционализированную моноклональными антителами против белка-мишени. В качестве вторичных антител использовали

поликлональные антитела, к которым добавляли анти-антитела, меченные каталазой. После завершения реакций антиген/антитело/анти-антитело в планшеты вводили смесь растворов H_2O_2 , морфолиноэтансульфоновой кислоты и трихлорида золота для проведения колориметрической реакции. В случае отсутствия в пробе белка-мишени раствор имел малиновую окраску вследствие образования коллоидного раствора золотых наночастиц. В присутствии белка-мишени происходило изменение цвета раствора с малинового на голубой вследствие образования агрегатов золотых наночастиц при ускорении разложения H_2O_2 каталазой. Для PSA и p24 в образцах сыворотки крови при использовании 100 мкл пробы и времени инкубации пробы 1 ч был достигнут $DL \sim 4 \times 10^{-20}$ М.

Таким образом, в схемах фишинга с малым отношением $V/A < 100$ мм увеличение площади поверхности, на которую вылавливается белок, позволяет существенно уменьшить время инкубации и при этом снизить объём пробы. Для успешного использования таких методик необходимо, однако, максимально повысить S/N , для чего в описанных методах использовали специфические способы усиления полезного сигнала за счёт введения дополнительных реакций. При использовании таких схем предел концентрационной чувствительности детекции белков достигает 10^{-16} – 4×10^{-20} М как в модельных растворах, так и в биоматериале.

Высокочувствительная детекция белков не ограничивается рассмотренными выше методами. Как показано выше, в большинстве методов регистрации белков используется технология фишинга. Однако, существуют также высокочувствительные методы регистрации белков непосредственно в растворе. Эти методы пока, в отличие от методов на основе фишинга, не нашли широкого применения. Так, Lopez и соавторы проводили детекцию белков методом волнового смещения лазерного излучения в микрокапиллярной системе. Регистрируемый сигнал волнового смещения пропорционален квадрату концентрации аналита, поэтому метод волнового смещения более чувствителен при измерении изменений свойств раствора аналита по сравнению со стандартными абсорбционными и флуоресцентными методами [72]. С помощью этого метода очищенный BSA, меченный красителем Кумасси бриллиантовым голубым, был зарегистрирован с $DL \sim 3,4 \times 10^{-19}$ М при прокачке 500 мкл раствора через капилляр. Однако, существенным недостатком этого метода является то, что его чувствительность существенно зависит от типа белка-мишени. Так, в той же работе чувствительность этого метода по отношению к очищенным мышинным антителам против вируса папилломы человека в растворе при использовании того же красителя была существенно ниже, $DL \sim 6,4 \times 10^{-14}$ М. Такое расхождение в значениях предела чувствительности для разных белков может быть связано с различием числа молекул красителя, связывающегося с одной молекулой каждого из этих белков и рядом других факторов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, для достижения сверхвысокой чувствительности на уровне 10^{-16} – 10^{-20} М и приближения к обратному числу Авогадро с помощью микро(нано)технологий, в основном, используются два типа схем регистрации: фишинг из большого объема пробы на малую поверхность и наоборот. Преимуществом обоих типов схем является высокая чувствительность детекции аналита. К преимуществам схем фишинга с использованием поверхности детектирующей системы малой площади является возможность детекции единичных макромолекул с помощью молекулярных детекторов. Недостатком таких схем является необходимость решения проблем с эффективностью доставки молекул аналита на поверхность детектора. Преимуществами схем фишинга на большую твердую поверхность детектирующей системы являются небольшой объем анализируемой пробы и отсутствие необходимости ускорения доставки молекул аналита к этой поверхности. Недостатком второго типа схем является сложность организации стабильного режима работы схем усиления сигнала, что усложняет процедуру анализа. Развитие технологической базы позволит в будущем преодолевать недостатки этих схем и создавать диагностические системы на их основе.

Работа выполнена в рамках Программы фундаментальных научных исследований государственных академий наук на 2013–2020 годы при поддержке ГК № 14.576.21.0074 и гранта РФФИ № 15-04-08368 А.

ЛИТЕРАТУРА

- Snyder M. (2011) HUPO-2011 Congress, Oral Presentation.
- Rissin D.M., Kan C.W., Campbell T.G., Howes S.C., Fournier D.R., Song L. et al. (2010) Nature Biotech., **28**, 595–599.
- Dexlin-Melby L., Sandstrom A., Antberg L., Gunnarsson J., Hansson S.R., Borrebaeck C.A.K., Wingren Ch. (2011) Proteomics, **11**, 1550–1554.
- Archakov A.I., Ivanov Yu.D., Lisitsa A.V., Zgoda V.G. (2009) Proteomics, **9**, 1326–1343.
- Ivanov Yu.D., Govorun V.M., Bykov V.A., Archakov A.I. (2006) Proteomics, **6**, 1399–1414.
- Wu S.L., Amato H., Biringer R., Choudhary G., Shieh P., Hancock W.S. (2002) J. Proteome Res., **1**, 459–465.
- Forsgard N., Salehpour M., Possnert G. (2009) J. Anal. At. Spectrom., **25**, 74–78.
- Kopylov A.T., Zgoda V.G., Lisitsa A.V., Archakov A.I. (2013) Proteomics, **13**, 727–742.
- Lian W., Wu D., Lim D.V., Jin S. (2010) Anal. Biochem., **401**, 271–279.
- Archakov A.I., Ivanov Yu.D., Lisitsa A.V., Zgoda V.G. (2007) Proteomics, **7**, 1–4.
- Malkin A.J., McPherson A., Gershon P.D. (2003) J. Virol., **77**, 6332–6340.
- Huff J.L., Lynch M.P., Nettikadan S., Johnson J., Vengasandra S., Henderson E. (2004) J. Biomol. Screening, **9**, 491–497.
- Patolsky F., Zheng G., Hayden O., Lakadamyali M., Zhuang X. (2004) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **101**, 14017–14022.
- Armani A., Kulkarni R.P., Fraser S.E., Flagan R.C., Vahala K.J. (2007) Science, **317**, 783–787.
- Islam Md.Sh., Lee H.G., Choo J., Song J.M., Kang S.H. (2010) Talanta, **81**, 1402–1408.
- Rodriguez-Lorenzo L., de la Rica R., Alvarez-Puebla R.A., Liz-Marzan L.M., Stevens M.M. (2012) Nature Materials, **11**, 604–607.
- 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) Биомед. химия, **60**, 28–50.
- Ivanov Y.D., Pleshakova T.O., Kozlov A.F., Malsagova K.A., Krohin N.V., Shumyantseva V.V., Shumov I.D., Popov V.P., Naumova O.V., Fomin B.I., Nasimov D.A., Aseev A.L., Archakov A.I. (2012) Lab Chip, **12**, 5104–5111.
- de la Rica R., Stevens M.M. (2012) Nature Nanotech., **7**, 821–824.
- Krishnan S., Mani V., Wasalathanthri Dh., Kumar Ch.V., Rusling J.F. (2011) Angew. Chem. Int. Ed., **50**, 1175–1178.
- Munge B.S., Coffey A.L., Doucette J.M., Somba B.K., Malhotra R., Patel V., Gutkind J.S., Rusling J.S. (2011) Angew. Chem. Int. Ed., **50**, 7915–7918.
- Haas P., Then P., Wild A., Grange W., Zorman S., Hegner M., Calame M., Aepli U., Flammer J., Hecht B. (2010) Anal. Chem., **82**, 6299–6302.
- Sigurdsson M., Wang D., Meinhart C.D. (2005) Lab Chip, **5**, 1366–1373.
- Carrara S., Cavallini A., Maruyama Y., Charbon E., De Micheli G. (2010) Surf. Sci., **604**, L71–L74.
- Carrara S., Sacchetto D., Doucey M.A., Baj-Rossi C., De Micheli G., Leblebici Y. (2012) Sens. Actuat. B, **171–172**, 449–457.
- Tian R., Regonda S., Gao J., Liu Y., Hu W. (2011) Lab Chip, **11**, 1952–1961.
- Ivanov Yu.D., Pleshakova T., Malsagova K., Kozlov A., Kaysheva A., Kopylov A., Izotov A., Andreeva E., Kanashenko S., Usanov S., Archakov A. (2014) FEBS J., **281**, 4705–4717.
- Ivanov Y.D., Pleshakova T.O., Kozlov A.F., Malsagova K.A., Krohin N.V., Kaysheva A.L., Shumov I.D., Popov V.P., Naumova O.V., Fomin B.I., Nasimov D.A., Aseev A.L., Archakov A.I. (2013) Optoelectronics, Instrumentation and Data Processing, **49**, 520–525.
- Malsagova K.A., Ivanov Y.D., Pleshakova T.O., Kozlov A.F., Krokhin N.V., Kaysheva A.L., Shumov I.D., Popov V.P., Naumova O.V., Fomin B.I., Nasimov D.A. (2014) Biochemistry (Moscow) Suppl. Series B: Biomedical Chemistry, **8**, 220–225.
- Kiselyova O.I., Yaminsky I.V., Ivanov Yu.D., Kanaeva I.P., Kuznetsov V.Yu., Archakov A.I. (1999) Arch. Biochem. Biophys., **371**, 1–7.
- Zheng G., Patolsky F., Cui Yi, Wang W.U., Lieber C.M. (2005) Nature Biotech., **23**, 1294–1301.
- Binnig G., Quate C.F., Gerber Ch. (1986) Phys. Rev. Lett., **56**, 930–933.
- Braga P.C., Ricci D. (2003) Methods in Molecular Biology, **242**, Atomic Force Microscopy. Biomedical Methods and Applications. Humana Press, NJ, 382 p.
- Ivanov Y.D., Frantsuzov P.A., Zöllner A., Medvedeva N.V., Archakov A.I., Reinle W., Bernhardt R. (2010) Nanoscale Res. Lett., **6**, 54.
- Лойцянский Л.Г. (1978) Механика жидкости и газа, Наука, М.

36. Stern E., Klemic J.F., Routenberg D.A., Wyrembak P.N., Turner-Evans D.B., Hamilton A.D., LaVan D.A., Fahmy T.M., Reed M.A. (2007) *Nature*, **445**, 519-522.
37. Cai D., Ren L., Zhao H., Xu Ch., Zhang L., Yu Y. et al. (2010) *Nature Nanotech.*, **5**, 597-601.
38. Ivanov Yu.D., Bukharina N.S., Pleshakova T.O., Frantsuzov P.A., Andreeva E.Yu., 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) *Int. J. Nanomedicine*, **9**, 4659-4670.
39. Радько С.П., Рахметова С.Ю., Бодоев Н.В., Арчаков А.И. (2007) *Биомед. химия*, **53**, 5-24.
40. Иванов Ю.Д., Французов П.А., Плешакова Т.О., Зиборов В.С., Светлов С.К., Крохин Н.В., Конев В.А., Ковалев О.Б., Учайкин В.Ф., Ястребова О.Н., Свеишников П.Г., Арчаков А.И. (2009) *Биомед химия*, **55**, 689-701.
41. 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) *Biochemistry (Moscow) Suppl. Series B: Biomedical Chemistry*, **8**, 115-124.
42. Gold L., Ayers D., Bertino J., Bock C., Bock A., Brody E.N., Carter J. et al. (2010) *PlosOne*, **5**(12), e15004.
43. Ando T., Kodera N., Maruyama D., Takai E., Saito K., Toda A. (2002) *Jpn. J. Appl. Phys.*, **41**, 4851-4856.
44. Yamamoto D., Uchihashi T., Kodera N., Yamashita H., Nishikori Sh., Ogura T., Shibata M., Ando T. (2010) *Meth. Enzymol.*, **475**, 541-564.
45. Casuso I., Khao J., Chami M., Paul-Gilloteaux P., Husain M., Duneau J.-P., Stahlberg H., Sturgis J.N., Scheuring S. (2012) *Nature Nanotech.*, **7**, 525-529.
46. Кайшева А.Л., Иванов Ю.Д., Згода В.Г., Французов П.А., Плешакова Т.О., Крохин Н.В., Зиборов В.С., Арчаков А.И. (2010) *Биомед. химия*, **56**, 26-39.
47. Ivanov Yu.D., Kaysheva A.L., Frantsuzov P.A., Pleshakova T.O., Krohin N.V., Izotov A.A., Shumov I.D., Uchaikin V.F., Konev V.A., Ziborov V.S., Archakov A.I. (2015) *Int. J. Nanomedicine*, **10**, 1597-1608.
48. Fologea D., Ledden B., McNabb D.S., Li J. (2007) *Appl. Phys. Lett.*, **91**, 053901.
49. Kowalczyk S.W., Kapinos L., Blosser T.R., Magalhaes T., van Nies P., Lim R.Y.H., Dekker C. (2011) *Nature Nanotech.*, **6**, 433-438.
50. Freedman K.J., Bastian A.R., Chaiken I., Kim M.J. (2013) *Small*, **9**, 750-759.
51. Rotem D., Jayasinghe L., Salichou M., Bayley H. (2012) *J. Am. Chem. Soc.*, **134**, 2781-2787.
52. Soskine M., Biesemans A., Moeyaert B., Cheley S., Bayley H., Maglia G. (2012) *Nano Lett.*, **12**, 4895-4900.
53. Wei R., Gatterdam V., Wieneke R., Tampe R., Rant U. (2012) *Nature Nanotech.*, **7**, 257-263.
54. Siwy Z., Trofin L., Kohli P., Baker L.A., Trautmann Ch., Martin Ch.M. (2005) *J. Am. Chem. Soc.*, **127**, 5000-5001.
55. Pui T.-S., Agarwal A., Ye F., Tou Z.Q., Huang Y., Chen P. (2009) *Nanoscale*, **1**, 159-163.
56. Vu C.C., Pan T.M., Wu C.S., Yen Li-Ch., Chuang Ch.K., Pang S.T., Yang Y.Sh., Ko Fu-H. (2012) *Int. J. Electrochem. Sci.*, **7**, 4432-4442.
57. Zhang G.-J., Chai K.T.Ch., Luo H.Zh.H., Huang J.M., Tay I.G.K., Lim A.E.J., Je M. (2012) *Biosens. Bioelectron.*, **35**, 218-223.
58. Yu Y., Cimen A., Lan Y.C., Rybczynski J., Wang D.Z., Paudel T., Ren Z.F. et al. (2009) *Micro&Nano Lett.*, **4**, 27-33.
59. Ferreira J., Santos M.J.L., Rahman M.M., Brolo A.G., Gordon R., Sinton D., Girotto E.M. (2009) *J. Am. Chem. Soc.*, **131**, 436-437.
60. Guo L., Kim D.-H. (2012) *Biosens Bioelectron.*, **31**, 567-570.
61. Truong P.T., Cao C., Park S., Kim M., Sim S.J. (2011) *Lab Chip*, **11**, 2591-2597.
62. Truong P.T., Kim B.W., Sim S.J. (2012) *Lab Chip*, **12**, 1102-1109.
63. Sim H.R., Wark A.W., Lee H.J. (2010) *Analyst*, **135**, 2528-2532.
64. Truong P.T., Choi S.P., Sim S.J. (2013) *Small*, **9**, 3485-3492.
65. Lee S., Cho N.P., Kim J.D., Jung H., Kang S.H. (2009) *Analyst*, **134**, 933-938.
66. Siawaya D.J.F., Roberts T., Babb Ch., Black G., Golakai H.J., Stantey K. et al. (2008) *PlosOne*, **3**, e2535.
67. Todd J., Freese B., Lu A., Held D., Morey J., Livingston R., Goix P. (2007) *Clin. Chem.*, **53**, 1990-1995.
68. Song L., Hanlon D.W., Chang L., Provuncher G.K., Kan C.W., Campbell T.G., et al. (2011) *J. Immunol. Methods*, **372**, 177-186.
69. Kim S.H., Iwai Sh., Araki S., Sakakihara Sh., Iino R., Noji H. (2012) *Lab Chip*, **12**, 4986-4991.
70. Lepor H., Cheli D.C., Thiel R.P., Taneja S.S., Laze J., Chan D.W., Sokoll L.J., Mangold L., Partin A.W. (2011) *BJU Int.*, **109**, 1770-1775.
71. Tekin H.C., Cornaglia M., Gijs M.A.M. (2013) *Lab Chip*, **13**, 1053-1059.
72. Lopez M.M., Atherton A.A., Tong W.G. (2010) *Anal. Biochem.*, **399**, 147-151.

Поступила: 16. 02. 2015.

AFM-BASED TECHNOLOGIES AS THE WAY TOWARDS THE REVERSE AVOGADRO NUMBER

T.O. Pleshakova, I.D. Shumov, Yu.D. Ivanov, K.A. Malsagova, A.L. Kaysheva, A.I. Archakov

Institute of Biomedical Chemistry,
10 Pogodinskaya str., Moscow, 119121 Russia; tel.: (499)246-37-61; fax: (499)245-08-57;
e-mail: shum230988@mail.ru

Achievement of the concentration detection limit for proteins at the level of the reverse Avogadro number determines the modern development of proteomics. In this review, the possibility of approximating the reverse Avogadro number by using nanotechnological methods (AFM-based fishing with mechanical and electrical stimulation, nanowire detectors, and other methods) are discussed. The ability of AFM to detect, count, visualize and characterize physico-chemical properties of proteins at concentrations up to 10^{-17} - 10^{-18} M is demonstrated. The combination of AFM-fishing with mass-spectrometry allows the identification of proteins not only in pure solutions, but also in multi-component biological fluids (serum). The possibilities to improve the biospecific fishing efficiency by use of SOMAmers in both AFM and nanowire systems are discussed.

The paper also provides criteria for evaluation of the sensitivity of fishing-based detection systems. The fishing efficiency depending on the detection system parameters is estimated. The practical implementation of protein fishing depending on the ratio of the sample solution volume and the surface of the detection system is discussed. The advantages and disadvantages of today's promising nanotechnological protein detection methods implemented on the basis of these schemes.

Key words: atomic force microscopy, nanowires, low-abundant proteins, biosensor.