

УДК 577.1

©Коллектив авторов

## АСМ-ФИШИНГ БЕЛКА GP120 НА ИММОБИЛИЗОВАННЫЕ АПТАМЕРЫ И ЕГО МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКАЯ ИДЕНТИФИКАЦИЯ

*Н.С. Бухарина\*, Ю.Д. Иванов, Т.О. Плешакова, П.А. Французов,  
Е.Ю. Андреева, А.Л. Кайшева, А.А. Изотов, Т.И. Павлова, В.С. Зиборов,  
С.П. Радько, А.И. Арчаков*

Научно-исследовательский институт имени В.Н. Ореховича,  
119121, Москва, ул. Погодинская, 10; тел.: +7(499)2463761; факс: +7(495)2450857;  
эл. почта: natalie\_buharina@list.ru

Разработан метод фишинга на основе метода атомно-силовой микроскопии (АСМ-фишинг) для детекции белков в растворе анализата с использованием чипа с иммобилизованным аптамером. В основе метода лежит использование эффекта биоспецифического вылавливания целевого белка из большого объема раствора на небольшую поверхность АСМ-чипа с иммобилизованным аптамером к этому белку, используемого в качестве молекулярного зонда. Такой подход с использованием аптамеров позволяет повысить контрастность АСМ-изображения по сравнению с тем, когда в качестве молекулярных зондов используются антитела. Масс-спектрометрический (МС) анализ позволил достоверно идентифицировать целевой белок на поверхности чипа после биоспецифического фишинга, и, таким образом, доказать образование комплекса. Применение АСМ-чипа с иммобилизованным аптамером также позволяет избежать наложения пиков белка и антитела в масс-спектре.

**Ключевые слова:** gp120 HIV-1, аптамер, атомно-силовая микроскопия, фишинг, масс-спектрометрия.

**DOI:** 10.18097/PBMC20156103363

### ВВЕДЕНИЕ

Метод фишинга на основе атомно-силовой микроскопии (АСМ-фишинг) является одним из наиболее чувствительных методов детекции белков в растворе анализата [1]. Для проведения биоспецифического анализа эти чипы модифицируются макромолекулярными зондами, в качестве которых обычно используются антитела [2, 3]. В то же время, использование таких чипов для обнаружения широкого спектра белков в анализате сдерживается, во-первых, ограниченным классом макромолекулярных зондов, в качестве которых обычно применяются антитела, во-вторых, их невысокой стабильностью. Существенным прогрессом в области разработки новых зондов является создание синтетических структур – аптамеров. Аптамеры – это однонитевые ДНК- или РНК-структуры, получаемые *in vitro* с помощью SELEX (systematic evolution of ligands by exponential enrichment) из большой библиотеки случайных олигонуклеотидных последовательностей ( $>10^{13}$ ) [4, 5].

Молекулярные зонды на основе аптамеров обладают такими важными характеристиками, как повышенная по сравнению с антителами аффинность к белку-партнеру ( $K_d \sim 10^{-11}$  М) и высокая стабильность. Поэтому они широко используются в аналитических, диагностических и терапевтических приложениях [6]. Использование аптамеров в качестве аффинных реагентов было продемонстрировано в [7-12], где их взаимодействие с белками регистрировалось с помощью детекторов на основе флуоресцентного [7-9] и электрохимического анализов [10, 11], а также поверхностного плазмонного резонанса [12]. Во всех этих подходах анализ проводился на основе измерения свойств ансамбля большого количества молекул. В нашей работе в качестве детектора использовался АСМ, позволяющий регистрировать единичные биомолекулы на поверхности АСМ-чипа [13, 14].

Целью нашего исследования являлся анализ преимущества использования аптамера в качестве молекулярного зонда при биоспецифическом фишинге белка из объема раствора на поверхность АСМ-чипа. Для этого были выполнены следующие эксперименты:

\* - адресат для переписки

1) проведена ковалентная иммобилизация аптамеров на поверхность АСМ-чипа; 2) иммобилизованные аптамеры визуализированы на поверхности с помощью АСМ в двух режимах измерений – “топография” и “режим PicoTREC”; 2) проведён АСМ-биоспецифический фишинг белка-партнера с использованием двух типов АСМ-чипов в разными типами молекул-зондов – с иммобилизованными аптамерами или с иммобилизованными антителами; 3) определена контрастность АСМ-изображений комплексов аптамер/белок и антитело/белок; 4) проведена МС идентификация белка, выловленного из объёма аналита с помощью двух типов иммобилизованных молекул-зондов.

АСМ-чип представлял собой подложку с иммобилизованными аптамерами к белку gp120. Выбор белка gp120 обусловлен тем, что он является белком оболочки вируса иммунодефицита человека типа 1 (HIV-1), и, поэтому используется в качестве биомаркера в медицинской диагностике [15]. Нами было показано, что контрастность АСМ-изображения белка, выловленного на АСМ-чип с иммобилизованными аптамерами выше, чем контрастность белка, полученная для АСМ-чипа с иммобилизованными антителами к gp120.

## МЕТОДИКА

Фосфатный буфер Дульбекко (PBSD, 10 mM, pH 7,4), DSP (Dithiobis-[succinimidyl propionate]) кросс-линкер, ацетонитрил, трифторуксусная кислота, бикарбонат аммония были из “Pierce” (США). (3-Аминопропил)триэтоксисилан (APTES) и диметилсульфоксид (DMSO) – из “Sigma-Aldrich” (США);  $\alpha$ -циано-4-гидроксикоричная кислота (HCCA) и дигидроксibenзойная кислота (DHB) – из “Acros” (США). Ультрачистая деионизованная вода была получена на установке “Millipore” (“Milli-Q system”, США).

### Белки

Рекомбинантный белок gp120 вируса HIV-1 (115 кДа), полученный в бакуловиральной системе экспрессии, и моноклональные антитела к gp120 (murine mAb gp120, Mw $\approx$ 150 кДа), связывающиеся с петлей V3 белка gp120 HIV-1, были из “Immuno Diagnostics, Inc.” (США). Белковый стандарт I для калибровки – из “Bruker” (Германия); трипсин свиной – из “Promega” (США).

### Аптамер

Биотинилированный ДНК аптамер к gp120 (Mw $\approx$ 23 кДа), содержащий аминокислоты, был синтезирован группой транскриптомного анализа ИБМХ на ДНК-синтезаторе ASM-800 (“Biosset”, Новосибирск, Россия) на основе данных об этом аптамере, полученных в работе [16]. Аптамер был синтезирован в соответствии с инструкциями производителя, и очищен с помощью электрофореза в полиакриламидном геле (PAGE). Его последовательность была следующей: 5'-biotin-

GGG AGG ACG ATG CGG AAX GCG CGA GCX XCC GAA AAG GAA AXX ACG CAG ACG ACG AGC GGG A-poly(dT)<sub>10</sub>-NH<sub>2</sub>-3', где X – 5-бром-2'-дезоксириндин (BrdUrd) и poly(dT)<sub>10</sub> – 10 нуклеотидных вставок тимина. Десять нуклеотидов тимина были добавлены к аптамеру для улучшения эффективности его иммобилизации на поверхности чипа и для улучшения его взаимодействия с целевым белком.

### Приготовление АСМ-чипа

Слюда (“SPI, Inc.”, США), используемая в дальнейшем в качестве АСМ-чипа, была модифицирована аминокислотными парах APTES согласно процедуре, описанной ранее [17, 18]. Слой APTES, сформированный таким образом, имел определённую толщину <0,7 нм.

На поверхности такого АСМ-чипа были сформированы 2 зоны – с иммобилизованными молекулярными зондами и без них, соответствующие рабочей зоне и контрольной. Для ковалентной иммобилизации молекулярных зондов через их аминокислотные группы в рабочей зоне, она активировалась в течение 10 мин 0,12 mM раствором DSP в 10 mM PBSD буфере, pH 7,4, в течение 10 мин, после чего чип отмывался в растворе (H<sub>2</sub>O: C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH = 1:1, v/v) в течение 10 мин, после этого чип высушивался в потоке азота и немедленно использовался для иммобилизации.

В качестве молекулярных зондов использовали аптамеры и антитела. Для иммобилизации аптамеров, 3 мкМ раствор (2 мкл) аптамера к gp120 в 10 mM PBSD буфере, pH 7,4, нагревали при t 95°C в течение 5 мин и затем проводили его охлаждение на льду в течение 3 мин. После этого его наносили на активированную зону АСМ-чипа, которую инкубировали в нём в течение 4 мин. Затем АСМ-чип промывали в ультрарасовой воде в течение 25 мин и высушивали в потоке азота для дальнейшей АСМ-визуализации и биоспецифического фишинга.

Для иммобилизации антител, 1 мкМ раствор (1 мкл) антител к gp120 в 10 mM PBSD буфере, pH 7,4, наносили на активированную зону АСМ-чипа, которую инкубировали в нём в течение 30 мин. Затем АСМ-чип промывали в ультрарасовой воде в течение 25 мин и высушивали в потоке азота для дальнейшей АСМ-визуализации и биоспецифического фишинга.

### Биоспецифический фишинг gp120 на АСМ-чип

Для проведения биоспецифического фишинга gp120, АСМ-чип с иммобилизованными аптамерами или антителами к gp120 инкубировали в течение 30 мин в 1 мл раствора gp120 в 10 mM PBSD буфере при интенсивном перемешивании (850 rpm) в шейкере Thermomixer comfort (“Eppendorf”, Германия) при 25°C. Затем чип промывали 3 раза водой в течение 30 мин при 37°C и высушивали в потоке азота. Фишинг gp120 на АСМ-чип проводился при концентрации аналита 0,8 $\times$ 10<sup>-9</sup> M при вылавливании на иммобилизованный аптамер и 1,0 $\times$ 10<sup>-8</sup> M при вылавливании на иммобилизованные антитела.

После проведения биоспецифического фишинга поверхность АСМ-чипа в рабочей зоне с иммобилизованными аптамерами и антителами и в контрольной зоне, не содержащих молекулярных зондов, были визуализированы на АСМ. Каждый эксперимент был проведён не менее 3 раз.

#### АСМ-измерения в полуконтактном режиме

АСМ-измерения проводили в полуконтактном режиме на АСМ NTEGRA Prima (“НТ-МДТ”, Россия) и на Dimension 3100 (“Bruker”, Германия) на воздухе стандартными кантилеверами PPP-NCH (“Nanosensors”, Швейцария) с константой жёсткости  $\sim 42$  Н·м<sup>-1</sup> и радиусом кривизны 10 нм. Скорость сканирования составляла 1 Гц. В каждом эксперименте было получено не менее 10 кадров размерами от 1 до 25 мкм<sup>2</sup>.

#### Модификация кантилевера gp120 для АСМ-измерения в режиме PicoTREC

В режиме PicoTREC применяли кантилеверы DNP-S10 (с константой жёсткости 0,32–0,58 Н·м<sup>-1</sup> и радиусом кривизны 10–20 нм, “Bruker”, Германия), они были функционализированы белком gp120 в несколько этапов. Сначала кантилевер поместили в озонатор на 60 мин. Затем кантилевер силанизировали и активировали DSP как АСМ-чип. Для иммобилизации gp120 активированный кантилевер инкубировали в 10<sup>-7</sup> М растворе gp120 в течение 10 мин при комнатной температуре, модифицированный кантилевер промывали PBSD буферным раствором в течение 20 мин.

#### АСМ-измерения в режиме PicoTREC

АСМ-измерения в режиме PicoTREC проводили на АСМ 5500 (“Agilent”, США), этот режим позволяет определять и отмечать события молекулярного взаимодействия при одновременном получении рисунка топографии [19]. При измерениях в режиме PicoTREC, наряду с топографией поверхности регистрируется сигнал молекулярного взаимодействия на том же участке поверхности, отражающий силовое взаимодействие кантилевера и сканируемой поверхности. Таким образом, при измерениях в режиме PicoTREC неровности на поверхности могут быть соотнесены с величиной силового взаимодействия.

Так как в наших экспериментах кантилевер был функционализирован белком gp120, а на поверхности иммобилизован аптамер, то при измерениях в режиме PicoTREC регистрировалось взаимодействие белок-аптамер и таким образом получалась карта молекулярного взаимодействия. Когда белок на АСМ-игле (AFM tip-tethered protein) связывается с аптамером на поверхности, происходит уменьшение амплитуды осцилляций кантилевера. Сервомеханизм восстанавливает сигнал амплитуды, но со сдвигом вниз сигнала пика, и этот сдвиг дает сигнал взаимодействия для события молекулярного взаимодействия аптамер – белок [20]. Таким образом,

карта молекулярного взаимодействия – это “карта”, которая отражает изменения сигнала пика, где события взаимодействия появляются как чёрные пятна.

Для измерений в PicoTREC подложку с иммобилизованным аптамером к gp120 помещали в жидкостную ячейку микроскопа. Использовали gp120-кантилевер в полуконтактном режиме с set-point амплитудой  $A \sim 5\text{--}8$  нм  $\sim 0,95\text{--}0,97 A_0$ . Скорость сканирования составляла 1 Гц. В каждом эксперименте было получено не менее 5 кадров размером 9 мкм<sup>2</sup>.

#### АСМ-измерения: контрольные эксперименты

Контрольные эксперименты заключались в АСМ-визуализации зоны АСМ-чипа, не содержащей молекулярных зондов, после проведения процедуры иммобилизации молекулярных зондов в рабочей зоне этого чипа и после биоспецифического фишинга белка из раствора аналита на этот АСМ-чип. Высоты неспецифических объектов на АСМ-чипе в этой зоне не превышали 0,7 нм.

#### Анализ АСМ-изображений

Высоты аптамеров, антител, белков и их комплексов на АСМ-изображениях были получены после обработки АСМ-данных с помощью AFM-dtpr ПО (<http://ibmcssoft.ru>, “ИБМХ”, Россия).

Как было показано ранее [21–24], стандартный АСМ-кантилевер позволяет получать высоту объекта с разрешением 0,1 нм. В нашем случае, для анализа высот изображений визуализированных объектов использовалась плотность распределения объектов по высотам  $\rho(h)$ :

$$\rho(h) = \frac{N_h}{N} * 100 \% \quad (1),$$

где  $N_h$  – это число визуализированных объектов с высотой  $h$ , а  $N$  – это общее число визуализированных объектов. Аппроксимацию экспериментальной зависимости (3) проводили с помощью Гауссовой функции:

$$\rho(h) = \sum \rho_i(h) = \sum_i \frac{Ae^{-4\ln(2)(h-h_{\max})^2/w^2}}{W\sqrt{\pi/4\ln(2)}} \quad (2),$$

где  $A$ ,  $w$  – варьируемые при аппроксимации параметры,  $h_{\max}$  – максимум высот распределений. Число экспонент  $i$ , по которому проводилась аппроксимация экспериментального распределения, определялось на основе критерия  $\chi^2$  [23, 24].

Контрастность ( $IC_{protein/apl}$ ) АСМ-изображения выловленного белка на фоне иммобилизованных аптамеров (на АСМ-чипе с иммобилизованными аптамерами) и контрастность ( $IC_{protein/ab}$ ) АСМ-изображения выловленного белка на фоне иммобилизованных антител (на АСМ-чипе с иммобилизованными антителами) оценивались как:



$$IC_{protein/ apt} = \frac{h_{max}(protein/ apt) - h_{max}(apt)}{h_{max}(apt)} \quad (3),$$

$$IC_{protein/ ab} = \frac{h_{max}(protein/ ab) - h_{max}(ab)}{h_{max}(ab)} \quad (4),$$

где  $h_{max}(protein/ apt)$  и  $h_{max}(protein/ ab)$  – максимумы высот комплексов белок/аптамер и белок/антитело на АСМ-чипах после проведения биоспецифического фишинга;  $h_{max}(apt)$  и  $h_{max}(ab)$  – максимумы высот аптамеров и антител на АСМ-чипе до проведения биоспецифического фишинга. Максимумы высот были получены аппроксимацией экспериментальных плотностей распределения изображений объектов по высотам функцией (2).

#### Трипсинолиз на поверхности АСМ-чипа

Трипсинолиз белков, выловленных с помощью биоспецифического АСМ-фишинга, проводили непосредственно на поверхности по стандартной схеме, при постоянных температуре 42°C и влажности около 100% [25]. Инкубационный раствор для трипсинолиза состоял из: 100 мМ бикарбонатного буфера (pH 7,4), 10% раствора ацетонитрила, 1% раствора глицерола, свиного трипсина в количественном соотношении к целевому белку 1:50. Трипсинолиз проводили 18 ч. После проведения трипсинолиза, трипсинолитическая смесь с пептидными фрагментами подавалась на масс-анализатор для проведения белковой идентификации.

#### MALDI-TOF-MS анализ

Идентификацию белков выполняли на времяпролетном масс-спектрометре Autoflex III MALDI-TOF/TOF (“Bruker”, Германия), оснащенным азотным лазером с длиной волны излучения  $\lambda=337$  нм. Калибровка масс-спектрометра проводилась с использованием стандарта калибровочных пептидов для положительных ионов в режиме рефлектора (напряжением на рефлекторе 5 кВ), диапазон регистрируемых масс составлял 800-3000  $m/z$ , время задержки импульса – 200 нс. Стандарт калибровочных пептидов был представлен следующими пептидами (моноизотопная однократно протонированная масса иона), брадикинин (757,3992 Да), ангиотензин II (1046,5420 Да), ангиотензин I (1296,6853 Да), пептид Р (1347,7361 Да), бомбезин (1619,8230 Да), ренин (1758,9326 Да), АКТГ фрагмент 1-17 (2093,0868 Да), АКТГ фрагмент 18-39 (2465,1990 Да) и соматостатин (3147,4714 Да). Пики матрицы и пики аутолиза трипсина при анализе спектров не учитывались. Накопление МС-спектра происходило в автоматическом режиме до 10000 выстрелов. Для получения масс-спектров анализируемых образцов трипсинолитическая смесь смешивалась с избытком матрицы (НССА в 50% ацетонитриле с 0,7% ТФУ) в соотношении от 1:1000 до 1:10,000, и полученную смесь наносили на мишень MTP AnchorChip 384.

Масс-спектры обрабатывались программой flexAnalysis версии 2.0 (“Bruker”). Идентификацию белков проводили с программного обеспечения Mascot (2.2.04, <http://www.matrixscience.com>) с использованием библиотеки данных белковых последовательностей NCBI. Были выбраны следующие параметры поиска: 1 пропущенный сайт гидролиза, точность измерения моноизотопных масс составляла  $\pm 50$  ppm, в качестве возможной модификации указывался окисленный метионин. Значения Mascot больше 72 были достаточны ( $p < 0,05$ ).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

#### АСМ-визуализация аптамера к gp120 в полуконтактном режиме.

Приготовление АСМ-чипа с ковалентно иммобилизованными аптамерами к gp120, было описано в разделе “Методика”.

Рисунок 1А представляет АСМ-изображение аптамеров к gp120, ковалентно иммобилизованных на АСМ-чипе, которое было получено в полуконтактном режиме на воздухе стандартным кантилевером. Контрольная зона без иммобилизованных аптамеров (рис. 1Б) не содержала объектов с высотой больше 0,7 нм. Рабочая зона АСМ-чипа (рис. 1А) содержала объекты с большей высотой, ~1 нм, которые были идентифицированы как аптамеры.

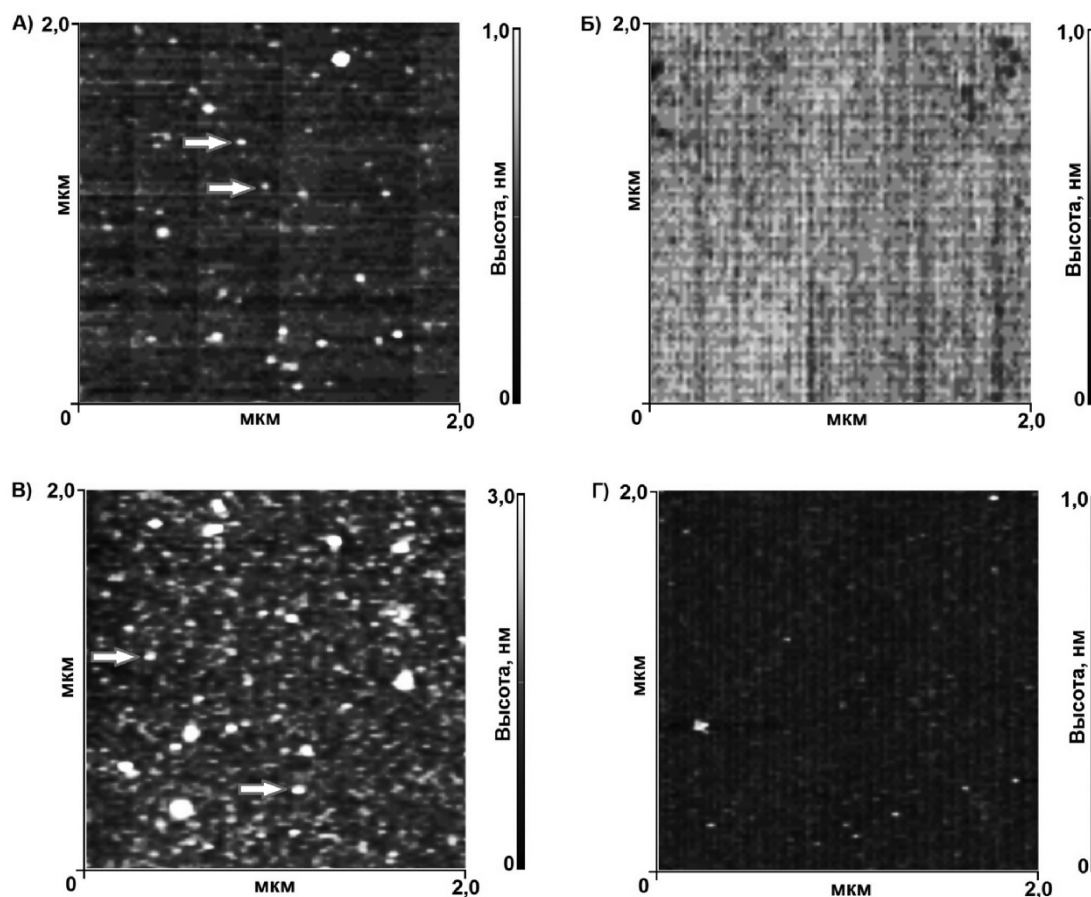
Экспериментальная зависимость плотности распределения АСМ-изображений аптамеров к gp120 по высотам  $\rho(h)$  была получена из обработки АСМ-данных (рис. 2). Она аппроксимировалась функцией (2), которая представляла в данном случае одноэкспоненциальную зависимость распределения высот аптамеров с максимумом  $h_{max}(apt) = (0,9 \pm 0,1)$  нм.

#### АСМ-визуализация аптамера против gp120 в режиме PicoTREC

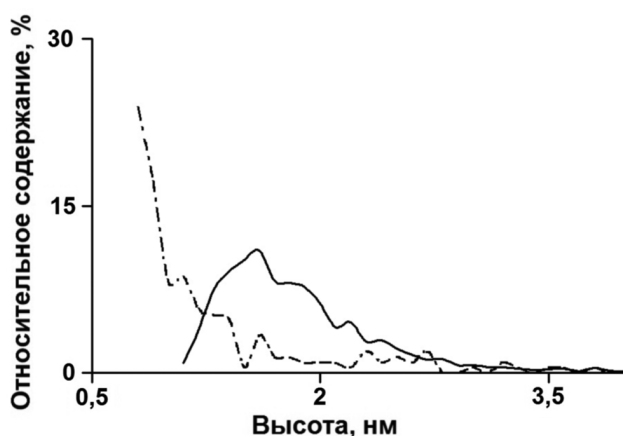
Для подтверждения того, что обнаруженные при АСМ-сканировании объекты, описанные в предыдущем разделе, являются аптамерами против gp120, была проведена визуализация этих объектов в режиме измерений PicoTREC, в котором одновременно регистрируется топография поверхности и карта молекулярных взаимодействий. Суть этого метода изложена в [26] и кратко – в разделе “Методика”.

На рисунке 3 представлены АСМ-изображения топографии поверхности (рис. 3А) и карта взаимодействий (рис. 3Б), полученные для АСМ-чипа с иммобилизованными аптамерами. Эти изображения получены кантилевером, функционализированным gp120, в жидкости в режиме PicoTREC. На АСМ-изображении топографии поверхности визуализируются объекты с высотами до 10 нм. Высота данных объектов выше, чем на АСМ-изображении топографии поверхности, полученном в полуконтактном режиме измерений на воздухе стандартным кантилевером (см. предыдущий раздел).





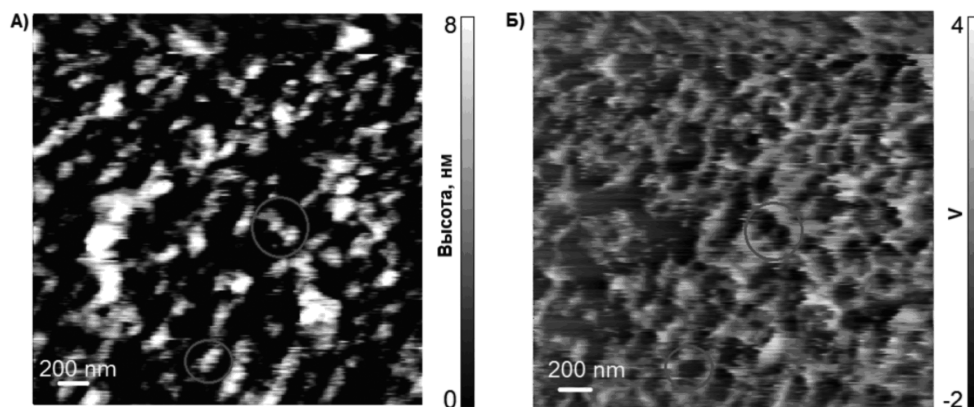
**Рисунок 1.** АСМ-чип с иммобилизованным аптамером к gp120 до (А,Б) и после (В,Г) проведения биоспецифического фишинга gp120. (А) АСМ-изображение рабочей зоны чипа с иммобилизованными аптамерами; (Б) АСМ-изображение контрольной зоны чипа без аптамеров - до проведения биоспецифического фишинга; (В) АСМ-изображение рабочей зоны чипа с иммобилизованными аптамерами; (Г) АСМ-изображение контрольной зоны чипа без аптамеров - после проведения биоспецифического фишинга. Экспериментальные условия: концентрация раствора аналита  $C_{gp120}=0,8 \times 10^{-9}$  М; полуконтактный режим на воздухе, относительная влажность (RH) 60%,  $t=22^{\circ}\text{C}$ , размер скана  $2,0 \times 2,0$  мкм<sup>2</sup>; NTEGRA Prima АСМ. (А) Стрелки указывают на несколько визуализированных аптамеров с высотой  $\sim 1$  нм. (В) Стрелками указаны несколько комплексов gp120/аптамер.



**Рисунок 2.** Плотность распределения визуализированных объектов по высотам  $\rho(h)$ , полученная в рабочей зоне АСМ-чипа с иммобилизованными аптамерами к gp120 до и после процедуры биоспецифического фишинга gp120.  $\rho(h)$  после фишинга gp120 (—) и до фишинга gp120 (---).

Это связано с тем, что визуализацию в режиме PicoTREC проводили модифицированным кантилевером. Во-первых, взаимодействие белка, иммобилизованного на зонде, с поверхностью и объектов на ней приводит к некорректному определению высоты визуализированных объектов. Во-вторых, модификация кантилевера ведёт к значительному увеличению радиуса кривизны зонда, следовательно, изображения объектов имеют искаженные латеральные размеры. Поэтому информация, полученная при АСМ-измерениях топографии в режиме PicoTREC, может быть оценена только на качественном уровне и обработка данных с целью построения визуализированных объектов по высотам в таком случае некорректна.

На карте взаимодействий (рис. 3Б) визуализируются темные пятна, которые возникают из-за уменьшения осцилляций кантилевера, что свидетельствует о взаимодействии аптамера против gp120 на подложке и gp120, иммобилизованного



**Рисунок 3.** АСМ-изображения поверхности АСМ-чипа (А) и карты взаимодействий (Б) в области с иммобилизованным аптамером к gp120 до проведения биоспецифического фишинга gp120. Экспериментальные условия: модифицированный gp120 кантилевер, режим PicoTREC, 10 mM PBSD буферный раствор, pH 7,4,  $t=22^{\circ}\text{C}$ ; размер скана  $3,0 \times 3,0$  мкм<sup>2</sup>, Agilent 5500 AFM. Темные области на карте взаимодействий (Б) - события взаимодействия аптамера на поверхности чипа с gp120 на кантилевере. На обоих изображениях, для примера, кругами указаны объекты и соответствующие им события связывания аптамера с белком.

на зонде. Тёмные пятна на карте взаимодействий в основном соответствуют объектам на изображении топографии поверхности (рис. 3Б, примеры обведены кругами).

#### *Биоспецифический фишинг gp120 на АСМ-чип с иммобилизованными аптамерами*

На рисунке 1В приведено АСМ-изображение поверхности рабочей зоны АСМ-чипа с иммобилизованными аптамерами после его инкубации в растворе, содержащем gp120 с концентрацией  $0,8 \times 10^{-9}$  М. Как видно, после инкубации в растворе аналита на поверхности рабочей зоны АСМ-чипа появляются объекты с высотами от 1 нм до 5 нм. Так как в контрольной зоне АСМ-чипа без иммобилизованных аптамеров объектов с высотами больше 1 нм не наблюдалось (рис. 1Г), то визуализированные объекты в рабочей зоне были идентифицированы как комплексы gp120/аптамер, сформированные в процессе фишинга gp120 из раствора на поверхности рабочей зоны АСМ-чипа.

Данные АСМ-сканирования были обработаны, и построено соответствующее распределение по высотам визуализированных объектов, которое представлено на рисунке 2. Проведённая аппроксимация полученной экспериментальной зависимости  $\rho(h)$  функцией (2) показала, что эта зависимость имеет в данном случае одноэкспоненциальный характер с максимумом распределения высот  $h_{\max}(\text{protein/apt}) = (1,6 \pm 0,1)$  нм.

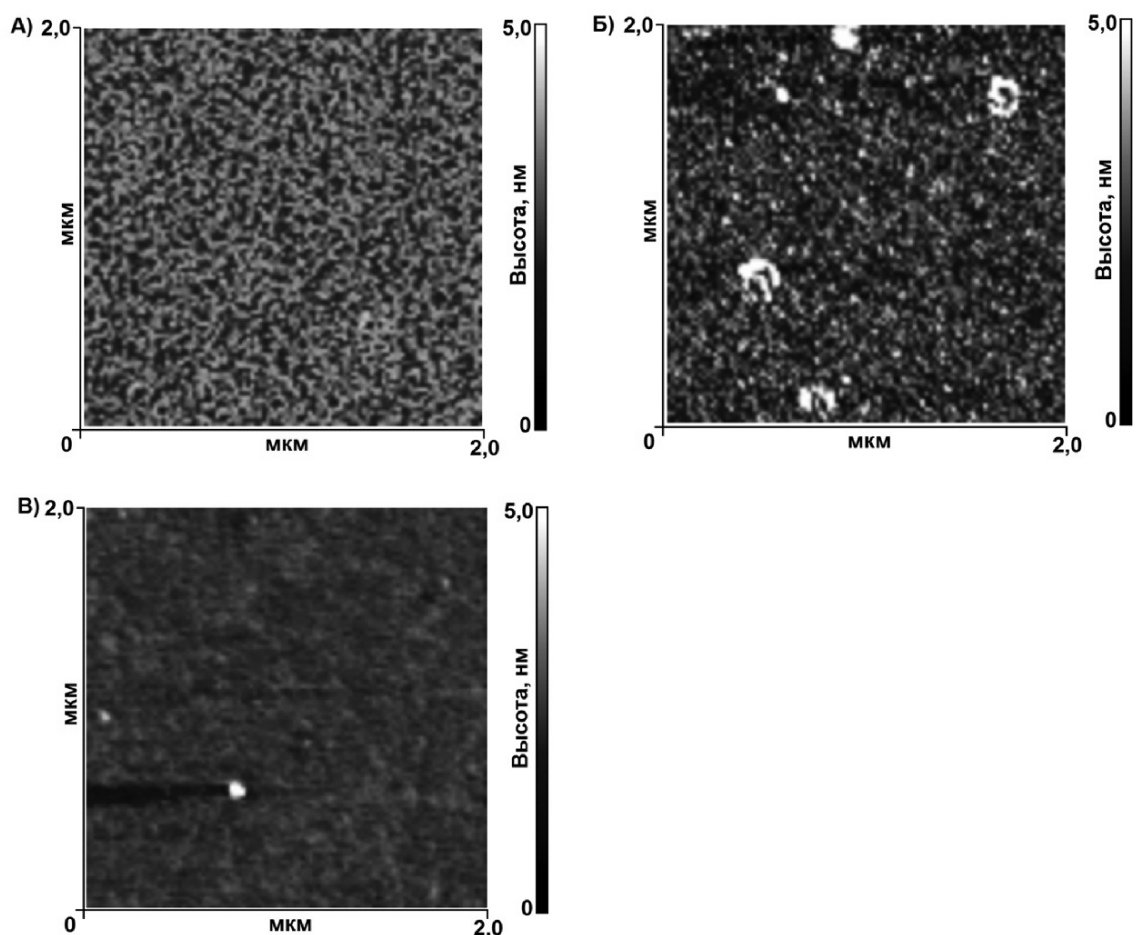
#### *АСМ-визуализация антител к gp120 в полуконтактном режиме.*

Приготовление АСМ-чипа с ковалентно иммобилизованными антителами к gp120, было описано в разделе “Методика”.

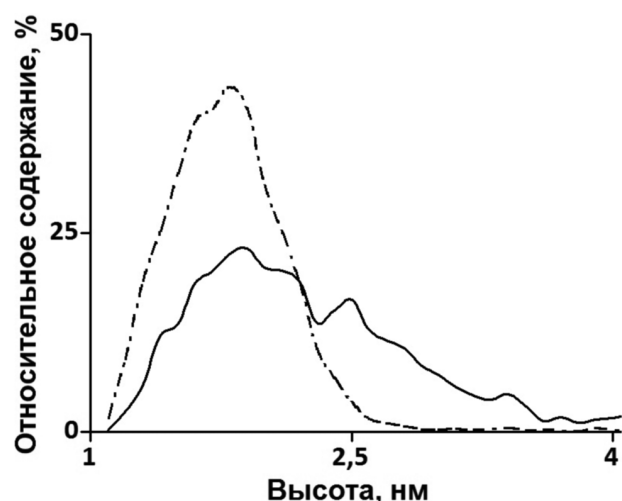
На рисунке 4А представлено АСМ-изображение поверхности рабочей зоны АСМ-чипа с ковалентно иммобилизованными антителами к gp120. В рабочей зоне АСМ-чипа визуализированы объекты с высотами от 1,2 нм до 2,5 нм, которые были идентифицированы как антитела. Экспериментальная зависимость плотности распределения АСМ-изображений антител к gp120 по высотам  $\rho(h)$  была получена из обработки АСМ-данных (рис. 4). Эта экспериментальная зависимость  $\rho(h)$  аппроксимировалась функцией (2), которая в данном случае представляла собой одноэкспоненциальную зависимость распределения высот антител с максимумом распределения  $h_{\max}(ab) = (1,8 \pm 0,1)$  нм, что соответствует высоте иммобилизованных антител класса IgG [1, 27-29], к которым относятся используемые в нашей работе антитела.

#### *Биоспецифический фишинг gp120 на АСМ-чип с иммобилизованными антителами*

На рисунке 4Б представлено изображение рабочей зоны АСМ-чипа с иммобилизованными антителами после его инкубации в растворе, содержащем gp120 с концентрацией  $10^{-8}$  М. Видно, что после биоспецифического фишинга в рабочей зоне АСМ-чипа появляются объекты с высотами от 1,2 нм до 4 нм (рис. 4Б). Соответствующая плотность распределения объектов по высотам  $\rho(h)$  представлена на рисунке 5. Аппроксимация полученной экспериментальной зависимости  $\rho(h)$  функцией (2) была проведена двухэкспоненциальной функцией, что позволило разделить визуализированные объекты на две группы, максимумы распределения высот объектов в этих группах составили:  $h_{\max 1} = 1,8 \pm 0,1$  нм и  $h_{\max 2} = 2,5 \pm 0,2$  нм (доля объектов – 47% и 53%, соответственно).



**Рисунок 4.** АСМ-чип с иммобилизованными антителами к gp120 (А) и после (Б,В) проведения биоспецифического фишинга gp120. (А) АСМ-изображение рабочей зоны чипа с иммобилизованными антителами; (Б) АСМ-изображение рабочей зоны чипа с иммобилизованными антителами и (В) АСМ-изображение контрольной зоны чипа без антител - после проведения биоспецифического фишинга. Экспериментальные условия: концентрация раствора аналита  $C_{gp120}=10^{-8}$  М; полуконтактный режим на воздухе, относительная влажность (RH) 60%,  $t=22^{\circ}\text{C}$ , размер скана  $2,0 \times 2,0$  мкм<sup>2</sup>; Dimension 3100 АСМ.



**Рисунок 5.** Плотность распределения визуализированных объектов по высотам  $\rho(h)$ , полученная в рабочей зоне АСМ-чипа с иммобилизованными антителами к gp120 до и после процедуры биоспецифического фишинга gp120.  $\rho(h)$  после фишинга gp120 (—) и до фишинга gp120 (-•-).

Максимум распределения высот объектов в первой группе соответствует максимуму высоты иммобилизованных антител  $h_{max}(ab)$ . Высота визуализированных объектов из второй группы с  $h_{max2}=2,5 \pm 0,2$  нм превышает размеры иммобилизованных антител, и таких объектов не наблюдалось в контрольной зоне АСМ-чипа без иммобилизованных антител (рис. 4В). Таким образом, объекты второй группы идентифицированы как комплексы gp120/антитело, сформированные в процессе фишинга на поверхности рабочей зоны АСМ-чипа с иммобилизованными антителами.

*Контрастность изображения молекул белка gp120, выловленного на АСМ-чип с иммобилизованными аптамерами и АСМ-чип с иммобилизованными антителами*

Для оценки значения контрастности АСМ-изображения  $IC_{gp120/apr}$  выловленного белка на фоне иммобилизованных аптамеров на поверхности АСМ-чипа использовали максимумы высот аптамеров и комплексов:  $h_{max}(apt)=0,9$  нм –



высоты иммобилизованных аптамеров к gp120, и  $h_{max}(protein/apr)=1,6$  нм – высоты комплексов gp120/аптамер. В этом случае контрастность АСМ-изображения  $IC_{gp120/apr}$  рассчитанная по формуле (3), составляла 0,8.

Для оценки значения контрастности АСМ-изображения  $IC_{gp120/ab}$  выловленного белка на фоне иммобилизованных антител использовались максимумы высот антител и комплексов:  $h_{max}(ab)=1,8$  нм – высоты иммобилизованных антител к gp120, и  $h_{max}(protein/ab)=2,5$  нм – высоты комплексов gp120/антитело. В этом случае контрастность АСМ-изображения  $IC_{gp120/ab}$  рассчитанная по формуле (3), составляла 0,4.

Таким образом, использование аптамеров в качестве молекулярных зондов, иммобилизованных на АСМ-чипе, позволило в 2 раза повысить контрастность изображения выловленного белка по сравнению с использованием антител.

#### *Масс-спектрометрическая идентификация gp120, биоспецифически выловленного на поверхность АСМ-чипа*

На рисунке 6(А,В) представлены характерные MALDI-TOF-MS контрольные спектры, полученные при анализе образцов с поверхности АСМ-чипов до их инкубации в растворе gp120. Спектр, полученный в случае использования в качестве молекул-зондов аптамеров (рис. 6А), содержит небольшое число пиков в пептидной области, которые соответствуют пикам аутолиза трипсина со значениями 842,509  $m/z$ , 1045,569  $m/z$ , 2211,104  $m/z$ . Контрольный спектр, полученный при анализе АСМ-чипа с иммобилизованными антителами к gp120 (рис. 6В), кроме трипсиновых пиков, содержит пики, соответствующие антителам. На всех полученных контрольных спектрах пептидные фрагменты целевого белка обнаружены не были.

На рисунке 6(Б,Г) представлены характерные MALDI-TOF-MS спектры, полученные при анализе образцов с поверхности АСМ-чипов после процедуры биоспецифического АСМ-фишинга. Как видно из рисунка 6Б, при использовании АСМ-чипа с иммобилизованными аптамерами, спектр содержит только две группы пиков – пики аутолиза трипсина и пики, соответствующие пептидам целевого белка gp120. На спектре образца, полученного в эксперименте с использованием АСМ-чипа с иммобилизованными антителами (рис. 6Г), кроме этих двух групп пиков присутствует третья группа пиков, соответствующая пептидам антител к gp120.

Таким образом, проведенный МС-анализ позволил достоверно идентифицировать целевой белок gp120, выловленный на поверхность АСМ-чипа с иммобилизованными молекулами-зондами.

## ОБСУЖДЕНИЕ

В представленной работе АСМ был использован как молекулярный детектор для регистрации

и визуализации белка gp120, выловленного на поверхность АСМ-чипа с иммобилизованными аптамерами против этого белка. Иммобилизованные на поверхности аптамеры были визуализированы в режиме PicoTREC с помощью АСМ. Результаты сканирования в этом режиме показали, что иммобилизованные аптамеры сохраняют аффинные свойства и биоспецифически взаимодействуют с gp120, иммобилизованным на АСМ-кантилере. Следовательно, АСМ-чип с иммобилизованными аптамерами может быть использован для биоспецифического фишинга.

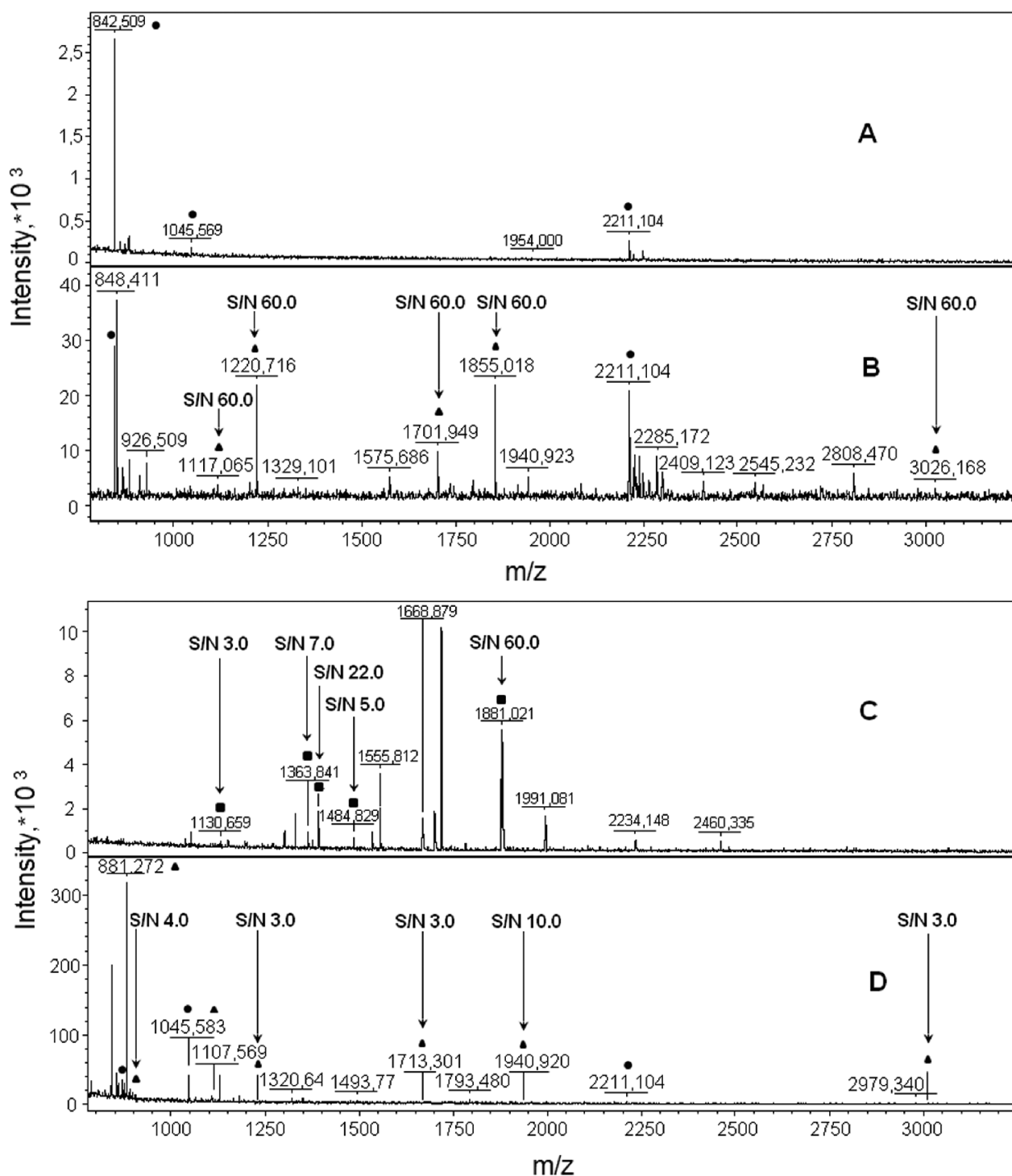
Полученные результаты показали, что аптамеры могут эффективно использоваться в качестве иммобилизованных молекул-зондов. Так, в результате биоспецифического фишинга gp120 из раствора (концентрация  $0,8 \times 10^{-9}$  М) на поверхности АСМ-чипа сформировались комплексы аптамер/gp120, которые были визуализированы с помощью АСМ (рис. 1В). Проведенный МС-анализ достоверно идентифицировал белок, биоспецифически выловленный на поверхность АСМ-чипа.

Данные АСМ-анализа также показали, что использование аптамеров в качестве зондов позволяет получить хорошую контрастность АСМ-изображений выловленных белков на фоне иммобилизованных аптамеров. Эта величина, рассчитанная на основе экспериментальных данных, составила  $IC_{gp120/apr}=0,8$ , что в 2 раза выше аналогичной величины, полученной в случае использования иммобилизованных антител ( $IC_{gp120/ab} \sim 0,4$ ).

Такое повышение контрастности ожидаемо и следует из того, что отношение молекулярных масс gp120 и аптамера больше, чем отношение молекулярных масс gp120 и антител к нему, а значит и высот изображений.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ВЫВОДЫ

Разработанный биоспецифический АСМ-фишинг, основанный на использовании АСМ-чипа с иммобилизованными аптамерами для детекции белка в сочетании с МС-анализом позволяет напрямую, без использования меток, обнаруживать и подсчитывать искомые белки, а МС – дополнительно подтверждать их наличие во избежание артефактов. Так как ранее было показано, что аптамеры проявляют высокую аффинность и высокую стабильность при биоспецифическом фишинге белков из раствора аналита, то они могут эффективно использоваться как молекулярные зонды на АСМ-чипах. Нами было продемонстрировано, что АСМ-подход, основанный на использовании аптамерных чипов, имеет значительные преимущества. Во-первых, он характеризуется повышенной контрастностью АСМ-изображения выловленного белка на АСМ-чип по сравнению с контрастностью, полученной для АСМ-чипа с иммобилизованными антителами. Ещё одним преимуществом использования аптамеров на АСМ-чипе, является то, что иммобилизованные



**Рисунок 6.** Масс-спектры образцов, полученных с поверхности АСМ-чипов до и после проведения биоспецифического фишинга gr120: до фишинга на АСМ-чип с иммобилизованными аптамерами (А) и антителами (С); после фишинга на АСМ-чип с иммобилизованными аптамерами (В) и антителами (D). Экспериментальные условия: концентрации растворов белка (В)  $C_{gr120}=0,8 \times 10^{-11}$  М и (D)  $C_{gr120}=10^{-8}$  М. Пики аутолиза трипсина отмечены (●), пики антител - (■), пики пептидов gr120 - (▲). Значения S/N соответствуют соотношениям сигнал/шум.

аптамеры на АСМ-чипе не дают вклад в масс-спектр пептидных фрагментов белка (в том числе gr120) в отличие от возможного вклада пептидных фрагментов антител.

Мы выражаем благодарность проф. В.Г. Згоде за ценные советы по данной работе. Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки РФ (государственные контракты №14.512.11.0018 и №8717).

## ЛИТЕРАТУРА

1. Archakov A.I., Ivanov Y.D., Lisitsa A.V., Zgoda V.G. (2009) *Proteomics*, **9**, 1326-1343.
2. Chang T.W. (1983) *J. Immunol. Methods*, **65**, 217-223.
3. Haab B.B., Dunham M.J., Brown P.O. (2001) *Genome Biol.*, **2**, RESEARCH0004.1-4.13.
4. Tuerk C., Gold L. (1990) *Science*, **249**, 505-510.
5. Рахметова С.Ю., Радько С.П., Гнеденко О.В., Бодоев Н.В., Иванов А.С., Арчаков А.И. (2010) *Биомед. химия*, **56**, 72-81.
6. Yoshida Y., Waga I., Horii K. (2012) *Proteomics Clin. Appl.*, **6**, 574-580.
7. Wang W., Chen Ch., Qian M., Zhao X.Sh. (2008) *Anal. Biochem.*, **373**, 213-219.
8. Zeng X., Zhang X., Yang W., Jia H., Li Y. (2012) *Anal. Biochem.*, **424**, 8-11.
9. Huang D.W., Niu Ch.G., Qin P.Z., Ruan M., Zeng G.M. (2010) *Talanta*, **83**, 185-189.
10. Queirós R.B., de-los-Santos-Álvarez N., Noronha J.P., Sales M.G.F. (2013) *Sensors and Actuators B: Chemical*, **181**, 766-772.
11. Wu Z.Sh., Zheng F., Shen G.L., Yu R.Q. (2009) *Biomaterials*, **30**, 2950-2955.
12. Kim D.K., Kerman K., Hiep H.M., Saito M., Yamamura Sh., Takamura Y., Kwon Y.S., Tamiya E. (2008) *Anal. Biochem.*, **379**, 1-7.
13. Archakov A.I., Ivanov Y.D., Lisitsa A.V., Zgoda V.G. (2007) *Proteomics*, **7**, 4-9.
14. Archakov A.I., Ivanov Yu.D. (2007) *Mol. Biosyst.*, **3**, 336-342.
15. Barbas C.F., Björling E., Chiodi F., Dunlop N., Cababa D., Jones T.M., Zebedee S.L., Persson M.A., Nara P.L., Norrby E. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**, 9339-9343.
16. Smith D., Collins B.D., Heil J., Koch T.H. (2003) *Mol. Cell Proteomics*, **2**, 11-18.
17. Yamada K., Yoshii S., Kumagai S., Fujiwara I., Nishio K., Okuda M., Matsukawa N., Yamashita I. (2006) *Jpn. J. Appl. Phys.*, **45**, 4259-4264.
18. Ivanov Yu.D., Danichev V.V., Pleshakova T.O., Shumov I.D., Ziborov V.S., Krokhin N.V., Zagumenniy M.N., Ustinov V.S., Smirnov L.P., Shironin A.V., Archakov A.I. (2013) *Biochemistry (Moscow) Suppl. Ser. B: Biomed. Chem.*, **7**, 46-61.
19. Kada G., Kienberger F., Hinterdorfer P. (2008) *Nanotoday*, **3**, 12-19.
20. Stroh C., Wang H., Bash R., Ashcroft B., Nelson J., Gruber H., Lohr D., Lindsay S.M., Hinterdorfer P. (2004) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 12503-12507.
21. Thomson N. (2005) *J. Microscopy*, **217**, 193-199.
22. Müller D.J., Engel A. (2007) *Nat. Protoc.*, **2**, 2191-2197.
23. Ivanov Yu., Frantsuzov P., Ivanov A., Bykov V., Besedin S., Hui Bon Hoa G., Archakov A. (2010) *Anal. Methods*, **2**, 688-693.
24. Ivanov Yu.D., Bukharina N.S., Frantsuzov P.A., Pleshakova T.O., Kanashenko S.L., Medvedeva N.V., Argentova V.V., Zgoda V.G., Munro A.W., Archakov A.I. (2012) *Soft Matter*, **8**, 4602-4608.
25. Kaysheva A.L., Ivanov Yu.D., Zgoda V.G., Frantsuzov P.A., Pleshakova T.O., Krokhin N.V., Ziborov V.S., Archakov A.I. (2010) *Biochemistry (Moscow) Suppl. Ser. B: Biomed. Chem.*, **4**, 16-25.
26. [www.agilent.com/](http://www.agilent.com/)
27. Ivanov Yu.D., Frantsuzov P.A., Pleshakova T.O., Ziborov V.S., Svetlov S.K., Krohin N.V., Konev V.A., Kovalev O.B., Uchaikin V.F., Yastrebova O.N., Sveshnikov P.G., Archakov A.I. (2010) *Biochemistry (Moscow) Suppl. Ser. B: Biomed. Chem.*, **4**, 117-122.
28. Ivanov Yu.D., Bukharina N.S., Frantsuzov P.A., Pleshakova T.O., Krohin N.V., Kanashenko S.L., Archakov A.I. (2012) *Biochemistry (Moscow) Suppl. Ser. B: Biomed. Chem.*, **6**, 218-224.
29. Ivanov Yu.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 on a Chip*, **12**, 5104-5111.

Поступила: 10. 07. 2013.

## ATOMIC FORCE MICROSCOPY FISHING OF GP120 ON IMMOBILIZED APTAMER AND ITS MASS SPECTROMETRY IDENTIFICATION

N.S. Bukharina, Yu.D. Ivanov, T.O. Pleshakova, P.A. Frantsuzov, E.Yu. Andreeva, A.L. Kaysheva, A.A. Izotov, T.I. Pavlova, V.S. Ziborov, S.P. Radko, A.I. Archakov

Institute of Biomedical Chemistry,  
10 Pogodinskaya str., Moscow, 119121 Russia; tel.: +7(499)2463761; fax: +7(495)2450857;  
e-mail: natalie\_buharina@list.ru

A method of atomic force microscopy-based fishing (AFM fishing) has been developed for protein detection in the analyte solution using a chip with an immobilized aptamer. This method is based on the biospecific fishing of a target protein from a bulk solution onto the small AFM chip area with the immobilized aptamer to this protein used as the molecular probe. Such aptamer-based approach allows to increase an AFM image contrast compared to the antibody-based approach. Mass spectrometry analysis used after the biospecific fishing to identify the target protein on the AFM chip has proved complex formation. Use of the AFM chip with the immobilized aptamer avoids interference of the antibody and target protein peaks in a mass spectrum.

**Key words:** gp120 HIV-1, aptamer, atomic force microscopy, fishing, mass spectrometry.