Биомедицинская химия, 2018 том 64, вып. 1, с. 5-9.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

©Коллектив авторов

ПРИМЕНЕНИЕ ДНК-АПТАМЕРОВ ДЛЯ ОБОГАЩЕНИЯ НИЗКОПРЕДСТАВЛЕННЫХ БЕЛКОВ В КЛЕТОЧНЫХ ЭКСТРАКТАХ ДЛЯ КОЛИЧЕСТВЕННОЙ ДЕТЕКЦИИ МЕТОДОМ МОНИТОРИНГА ВЫБРАННЫХ РЕАКЦИЙ

К.Г. Птицын[1], С.Е. Новикова[1], Я.Ю. Киселёва[2], А.А. Мойса[1], Л.К. Курбатов[1], Т.Е. Фарафонова[1], С.П. Радько[1]*, В.Г. Згода[1], А.И. Арчаков[1]

[1]Научно-исследовательский институт биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича, 119121, Москва, ул. Погодинская, 10; эл. почта: radkos@yandex.ru
[2]Российский научный центр рентгенорадиологии, Москва

В работе исследовано соотношение между количеством белковой мишени (таргетного белка) в сложном биологическом образце и его количеством, определяемым масс-спектрометрическим методом мониторинга выбранных реакций (МВР) при аффинном обогащении таргетного белка с использованием аптамеров, иммобилизованных на твёрдой фазе. Тромбин человека, добавленный в известных концентрациях к клеточным экстрактам, полученным из бактериальных клеток, был использован как модельный таргетный белок. Показано, что аффинное обогащение тромбина в клеточных экстрактах с помощью тромбин-связывающего аптамера, иммобилизованного на поверхности магнитных микросфер, приводит приблизительно к 10-кратному увеличению концентрации таргетного белка и 100-кратному снижению нижнего значения диапазона концентраций, в котором возможна его количественная детекция методом МВР без существенной интерференции со стороны других пептидов, присутствующих в триптическом гидролизате.

Ключевые слова: аптамеры, тромбин, обогащение, количественная детекция, мониторинг выбранных реакций

DOI: 10.18097/PBMC20186401005

ВВЕДЕНИЕ

Измерение абсолютного количества определённого белка или группы белков в биологических образцах (таргетные белки) с использованием масс-спектрометрии получает всё большее распространение по мере развития масс-спектрометрического метода, известного как “мониторинг выбранных реакций” (МВР) [1, 2]. В методе МВР измеряется не только масса пептида, специфичного для определённого белка (протеотипический пептид), но и его фрагментов, подтверждающих искомую аминокислотную последовательность [1]. В сочетании с использованием внутренних стандартов (синтетических изотопно-меченных пептидов) по селективности и точности количественной оценки белков МВР сопоставим с иммуноферментными методами [2]. Однако в случае количественной детекции белков, представленных в ультранизких концентрациях в плазме крови, а также низкокопийных белков (например, сигнальных белков или белковых изоформ с пост-трансляционными модификациями) в цитоплазме клеток, МВР часто не обеспечивает необходимую чувствительность детекции [3]. Как правило, для повышения чувствительности детекции в случае плазмы крови используется иммуноаффинное обеднение, состоящее в удалении наиболее представленных белков плазмы с использованием иммуноаффинных колонок [4]. В случае количественной детекции методом МВР низкокопийных белков в клеточных экстрактах, иммуноаффинное обогащение таргетных белков представляется более предпочтительным [3].

Для иммуноаффинного обогащения таргетных белков для целей МВР-анализа обычно используют моноклональные антитела (мАт), иммобилизованные на твёрдофазном носителе [3]. Для обогащения могут быть также использованы аффинные реагенты другого класса, а именно ДНК или РНК-аптамеры. Аптамеры представляют относительно короткие молекулы РНК или одноцепочечной ДНК (как правило, длиной 30-80 нуклеотидов), которые способны сворачиваться с формированием сложных пространственных структур, и, в среднем, имеют сродство к белковым мишеням, сопоставимое со сродством мАт [5]. Аптамеры обладают технологическим преимуществом перед мАт при иммобилизации на твёрдофазных носителях. В ходе химического синтеза аптамеров разнообразные функциональные группы могут быть достаточно легко присоединены к 3′- или 5′-концам нуклеотидной последовательности аптамера через различные линкеры как нуклеотидной, так и ненуклеотидной природы. Это обеспечивает простоту последующей ориентированной иммобилизации аптамеров на различных твёрдофазных носителях без существенной потери аффинности [5].

Аффинное обогащение таргетного белка с применением ДНК-аптамеров для последующего масс-спектрометрического анализа было продемонстрированно в ряде публикаций [6-13]. Можно отметить, что использование аптамеров вместо мАт приводило к заметному уменьшению сложности триптических гидролизатов в силу отсутствия пептидов, образующихся при трипсинолизе мАт [7, 12, 13]. За исключением работы [8], масс-спектрометрический анализ проводили

* - адресат для переписки

с использованием тандемной масс-спектрометрии или MALDI-ToF-MS (matrix assisted laser desorption/ionization – time of flight – mass spectrometry) – масс-спектрометрических методов, которые значительно уступают MBP в селективности и чувствительности [1]. Это затрудняет определение абсолютного количества таргетного белка в сложных биологических образцах, особенно если он присутствует в низкой концентрации. Метод MBP в сочетании с аффинным обогащением с использованием аптамеров был применён Zhao и соавт. [8] для определения абсолютного числа копий фактора транскрипции NF-κB/RelA в цитоплазматическом и ядерном экстрактах TNFα-стимулированных и нестимулированных клеток. Однако вопрос о том, как количество таргетного белка в обогащенной фракции соотносится с его исходным количеством в клеточном экстракте в широком диапазоне концентраций при этом не изучался.

В данной работе, используя тромбин человека как модельный таргетный белок, добавленный в известных концентрациях к клеточным экстрактам, полученным из бактериальных клеток, мы исследовали зависимость между количеством таргетного белка в обогащённой фракции, определяемого методом MBP, и его количеством в сложном биологическом образце. Установлено, что в логарифмических координатах эта зависимость может быть представлена линейной функцией в широком диапазоне концентраций, при этом нижнее значение диапазона линейной зависимости уменьшается приблизительно в 100 раз по сравнению с определением количества таргетного белка методом MBP непосредственно в клеточном экстракте. Показано, что использование тромбин-узнающего ДНК-аптамера, иммобилизованного на магнитных микросферах, приводит к приблизительно 10-кратному обогащению тромбина в сравнении с его содержанием в клеточном экстракте.

МЕТОДИКА

В работе использовали тромбин человека (кат. №T7009, “Sigma-Aldrich”, США) и клеточные экстракты *E. coli* (штамм C41). Клетки *E. coli* осаждали центрифугированием и ресуспендировали в буфере А (50 мМ Трис-HCl, 100 мМ NaCl, 50 мМ KCl, 2 мМ $MgCl_2$, pH 7,5), после чего разрушали ультразвуком. Полученный гомогенат “осветляли” центрифугированием (10000 *g*, 40 мин, 4°C) и определяли концентрацию суммарного белка методом Бредфорда, используя коммерческий реагент (кат. №B6916, “Sigma-Aldrich”) и растворы бычьего сывороточного альбумина (БСА) как стандарт. Клеточный экстракт (КЭ) разводили до концентрации суммарного белка 5 мг/мл буфером А. Раствор тромбина (5 мг/мл) в буфере А готовили гравиметрически и добавляли к КЭ в конечной концентрации 5 мкМ, после проводили последовательное разведение исходным КЭ (не содержащим тромбин) для получения экстрактов с желаемым содержанием тромбина. Для определения количества тромбина в экстракте методом MBP, к 27 мкл КЭ, содержащего тромбин, добавляли 3 мкл 10-кратного денатурирующего раствора (20% Na-додецилсульфата, 0,5 М дитиотреитола), прогревали раствор 5 мин при 95°C и использовали для трипсинолиза белков или электрофоретического анализа.

Аффинное обогащение тромбина проводили с помощью ДНК-аптамера G15 (5′-GGTTGGTGT-GGTTGG-3′) [14], содержащего на 3′-конце биотин, связанный с аптамерной последовательностью через поли $(dT)_5$-линкер. Аптамер G15 связывается с фибриноген-узнающим экзосайтом тромбина [14]. Биотинилированные ДНК-олигонуклеотиды синтезировали на ДНК-синтезаторе ASM-800 (“Биоссет”, Россия) в соответствии с протоколами производителя и очищали хроматографией на обращённой фазе. Аптамеры иммобилизовали на поверхности магнитных микросфер Dynabeads MyOne Streptavidin C1 (“Thermo Fisher Scientific”, США), покрытых стрептавидином, смешивая 75 пмоль аптамера с 300 мкг микросфер в буфере А, дополнительно содержащем 0,9 М NaCl. Соотношение между количеством биотинилированных олигонуклеотидов и количеством микросфер определялось рекомендациями производителя микросфер, исходя из максимального числа мест связывания биотина на поверхности магнитных микросфер. После 15 мин инкубации при комнатной температуре с постоянным перемешиванием микросферы отмывали буфером А и смешивали с 80 мкл КЭ, содержащего тромбин. Смесь инкубировали 15 мин при комнатной температуре, собирали микросферы с помощью магнитосепаратора и однократно отмывали буфером А. Связавшиеся белки элюировали, инкубируя микросферы 5 мин при 95°C в 30 мкл однократного денатурирующего раствора вышеупомянутого состава. После удаления микросфер раствор белков использовали для проведения трипсинолиза или электрофоретического анализа.

Трипсинолиз белков проводили на фильтрах методом FASP (Filter Aided Sample Preparation) [15, 16]. Использовался вариант протокола, предложенный в [16], за исключением того, что буфером для трипсинолиза служил 50 мМ раствор бикарбоната триэтиламмония (pH 8,5). После трипсинолиза каждую пробу делили на две части и высушивали под вакуумом. Одна часть пробы служила для MBP-анализа, другая – для определения суммарного количества пептидов методом ВЭЖХ после кислотного гидролиза пептидов с использованием стандартных растворов аминокислот известной концентрации. Аминокислотный анализ выполняли на хроматографе Agilent 1200 (“Agilent Technologies”, США). К пробе для MBP-анализа перед высушиванием добавляли стандарт – известное количество синтетического пептида ETAASLLQAGYK, лизин которого является изотопно-меченным ($6C^{13}2N^{15}$) аналогом природной аминокислоты. Пептид ETAASLLQAGYK

был выбран *in silico* как протеотипический пептид тромбина, руководствуясь правилами, изложенными в [17]. Синтез пептида осуществляли на автоматическом пептидном синтезаторе Overture ("Protein Technologies", США) в соответствии с протоколом, описанным ранее [18].

Для MBP-анализа пептиды растворяли в 0,1% растворе муравьиной кислоты. Масс-спектрометрический анализ проводили с использованием хроматографической системы Dionex UltiMate 3000 RSLCnano System, сопряжённой с тройным квадрупольным масс-спектрометром TSQ Vantage ("Thermo Scientific"). Образец, содержащий 1 мкг суммарного пептида, наносили на колонку Zorbax 300SB-C18 ("Agilent Technologies"), и выполняли MBP-анализ как описано ранее [17, 18], используя транзиции, приведённые в таблице. Молярное количество протеотипического пептида ETAASLLQAGYK (далее для простоты – "количество тромбина") в образце определяли на основе отношения площадей под пиками на хроматограммах для природного пептида и синтетического изотопно-меченного пептида, присутствующего в образце в известном количестве (как иллюстрировано рисунком 1).

Электрофоретический анализ проводили в трис-глициновой буферной системе в присутствии Na-додецилсульфата в 12% ПААГ. Гели окрашивали красителем Кумасси G-250.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На рисунке 2 представлены результаты электрофоретического анализа материала, связавшегося с магнитными микросферами, несущими на своей поверхности анти-тромбиновый аптамер G15 (электрофоретическая дорожка "Эл"). Микросферы инкубировали с КЭ, содержащим тромбин в концентрации 500 нМ. Видно, что элюат существенно обеднён бактериальными белками, в то время как тромбин присутствует в значительном относительном количестве (полоса с электрофоретической подвижностью, совпадающей с подвижностью тромбина в референсной смеси тромбина с БСА, дорожка "КС"). Таким образом, аптамер G15, иммобилизованный на поверхности магнитных микросфер, способен эффективно связывать тромбин и значительно увеличивать его относительную представленность в элюированном материале.

Таблица. Транзиции (специфические пары величин *m/z*, соответствующих родительскому иону и фрагментарным ионам), использованные для количественной детекции тромбина методом MBP. Величина заряда родительских и фрагментарных ионов указана в верхнем индексе соответствующих величин *m/z*. Величина энергии фрагментации родительских ионов рассчитывалась с помощью программного обеспечения Skyline

Тип пептида	Величина *m/z* родительского иона	Величина *m/z* фрагментарных ионов	Величина энергии фрагментации	Тип фрагмента
Протеотипический пептид ETAASLLQAGYK	$626{,}33261^{+2}$	950,530558	21,7	$y9^{+1}$
	$626{,}33261^{+2}$	679,377351	21,7	$y6^{+1}$
	$626{,}33261^{+2}$	566,293287	21,7	$y5^{+1}$
Изотопно-меченный стандарт ETAASLLQAGYK	$629{,}841192^{+2}$	957,547722	21,7	$y9^{+1}$
	$629{,}841192^{+2}$	686,394515	21,7	$y6^{+1}$
	$629{,}841192^{+2}$	566,293287	21,7	$y5^{+1}$

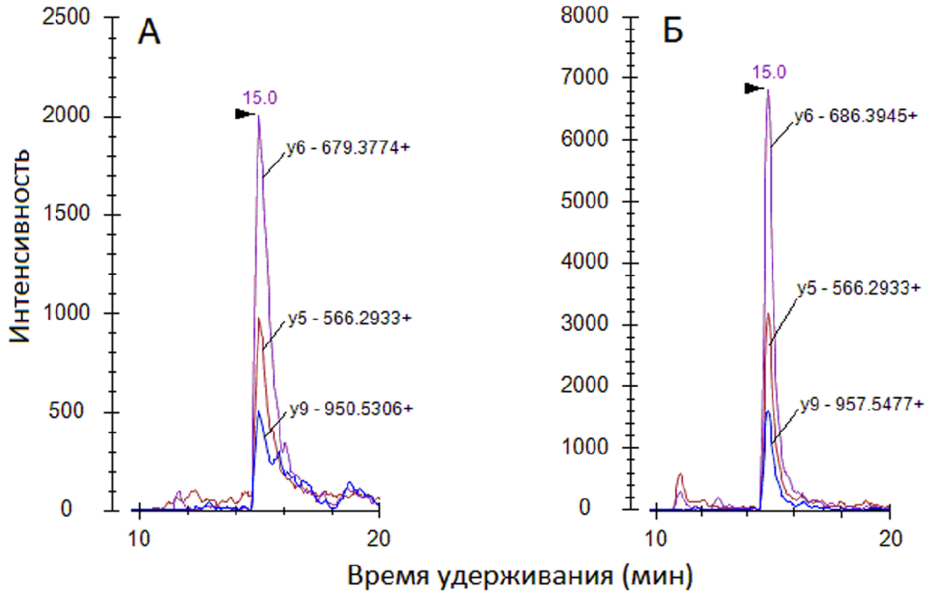

Рисунок 1. MBP хроматограммы природного (А) и синтетического изотопно-меченного (Б) пептида ETAASLLQAGYK. Показаны пики и величины отношения масса/заряд (*m/z*) для фрагментарных ионов. Величины m/z родительских ионов приведены в таблице. Природный пептид ETAASLLQAGYK является продуктом трипсинолиза клеточного экстракта, содержащего тромбин в концентрации 5 нМ.

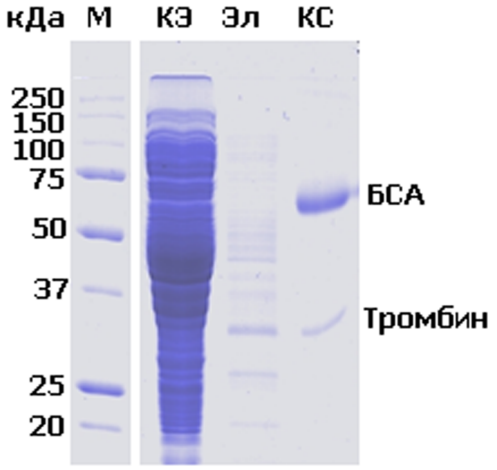

Рисунок 2. ПААГ-электрофорез: М - маркёры молекулярного веса; КЭ - клеточный экстракт, содержащий тромбин в концентрации 500 нМ; Эл - элюат материала, связавшегося с аптамерами, иммобилизованными на магнитных микросферах; КС - смесь тромбина и БСА.

Соотношение между количеством тромбина в образцах, измеренным методом МВР, и количеством тромбина, ожидаемым из разведения, представлены на рисунке 3. Пунктирной линией показана зависимость для случая, когда измеренное молярное количество тромбина в образце (далее C_m) равнялось бы количеству, ожидаемому из разведения (далее C_{ex}). В случае тромбин-содержащих КЭ экспериментальные точки в интервале 1 фемтомоль – 1 пикомоль систематически лежат ниже пунктирной линии и, в логарифмических координатах, могут быть хорошо аппроксимированы линейной функцией (с коэффициентом корреляции R=0,993): $\lg C_m = \lg C_{ex} - 0{,}26$. Данная зависимость может быть переписана в простой форме как $C_m \approx 0{,}55 \cdot C_{ex}$. Более низкие значения C_m в сравнении с Cex вероятнее всего связаны с различиями в методах их определения: C_m измеряли методом МВР, а C_{ex} рассчитывали на основе весового количества лиофилизата тромбина. Поскольку лиофилизаты белков гигроскопичны и могут содержать значительное количество воды, определяемая из “навески” концентрация белка может быть заметно завышена.

Когда количество тромбина в образце становится меньше ≈1 фемтомоля, экспериментальные точки начинают отклоняться от линейной зависимости (зависимость 1, рис. 3) из-за того, что вклад фона в регистрируемый сигнал становится более заметным. В отличие от образцов, полученных из КЭ, количество тромбина в образцах, полученных из обогащенной фракции (далее C^A_m), может быть хорошо аппроксимировано линейной функций $\lg C^A_m = 0{,}89 \cdot \lg C_{ex} - 0{,}57$ (с коэффициентом корреляции R=0,994) в более широком диапазоне, от 10 аттомоль до 1 пикомоль тромбина (рис. 3, зависимость 2). Таким образом, при построении калибровки в логарифмических координатах, использование аффинного обогащения позволяет существенно расширить линейный диапазон количественной детекции тромбина. Принимая, что количество

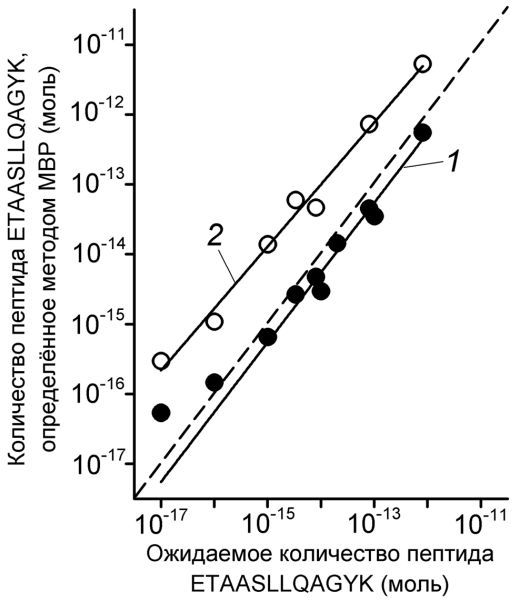

Рисунок 3. Соотношение между молярным количеством протеотипического пептида тромбина ETAASLLQAGYK в триптическом гидролизате, определённое методом МВР, и его количеством, ожидаемым из разведения стокового раствора тромбина клеточным экстрактом. 1 - триптические гидролизаты тромбин-содержащих КЭ; 2 - триптические гидролизаты фракции, обогащённой тромбином с помощью аптамера G15. Зависимости, показанные непрерывными прямыми, получены методом линейной регрессии. Пунктирная линия - теоретическая зависимость, когда измеренное количество равняется ожидаемому. Экспериментальные точки представляют средние арифметические пяти технических повторов; коэффициент вариации во всех случаях не превышал 25%.

тромбина, определённое методом МВР, является более верным, чем рассчитанное, основываясь на гравиметрическом методе, зависимость может быть переписана как $\lg C_m = 1{,}12 \cdot \lg C^A_m + 0{,}9$ и использована для расчёта количества тромбина в концентрационной области, где влияние фона на регистрируемый сигнал становиться существенным (10 – 100 аттомоль, рис. 3). Количество тромбина после аффинного обогащения приблизительно в 10 раз выше, чем в исходных экстрактах (рис. 3, зависимость 1 *vs.* зависимости 2). Следует также отметить, что в рамках данного исследования не был определён предел чувствительности детекции, так как целью данной работы было установление соотношения между количеством таргетного белка в обогащённой фракции с его количеством в сложном биологическом образце.

Стрептавидин, используемый в данной работе для иммобилизации аптамера G15 на магнитных микросферах, является тетрамером, который распадается на мономеры при денатурации, и не все мономеры стрептавидина ковалентно связаны с поверхностью микросфер. Это приводит к тому, что до трёх четвертей мономеров стрептавидина (молекулярная масса 15 кДа) может попадать в раствор при элюции белков с магнитных микросфер денатурирующим раствором, что может

дать значительное количество дополнительных пептидов при трипсинолизе. Использование коммерческих магнитных микрочастиц, покрытых авидином, или несущих карбоксильные группы, позволяющие иммобилизовать аптамеры с концевыми аминогруппами, должно привести к уменьшению сложности триптических гидролизатов и, как следствие, дальнейшему снижению нижней границы диапазона МВР-детекции, где фон не влияет на величину измеряемого сигнала.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На примере тромбина человека показано, что аффинное обогащение таргетного белка в клеточных экстрактах с помощью аптамеров, иммобилизованных на твёрдой фазе, приводит к приблизительно 10-кратному увеличению его концентрации и значительному (приблизительно 100-кратному) снижению нижнего значения диапазона концентраций белка, в котором возможна его количественная детекция методом МВР без существенной интерференции со стороны других пептидов, присутствующих в триптических гидролизатах. Данное исследование представляет первый шаг в разработке метода количественной детекции таргетных белков методом МВР с использованием аффинного обогащения на основе ДНК-аптамеров.

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа выполнена в рамках Программы фундаментальных научных исследований государственных академий наук на 2013-2020 годы. Масс-спектрометрические данные были получены в ИБМХ на оборудовании ЦКП “Протеом человека”, поддержанного Минобрнауки России в рамках выполнения соглашения №14.621.21.0017 (уникальный идентификатор работ RFMEFI62117X0017).

ЛИТЕРАТУРА

1. *Rauniyar N.* (2015) Int. J. Mol. Sci., **16**, 28566-28581.
2. *Aebersold R., Burlingame A.L., Bradshaw R.A.* (2013) Mol. Cell. Proteomics, **12**, 2381-2382.
3. *Shi T., Su D., Liu T., Tang K., Camp D.G., Qian W.J., Smith R.D.* (2012) Proteomics, **12**, 1074-1092.
4. *Wu C., Duan J., Liu T., Smith R.D., Qian W.J.* (2016) J. Chromatogr. B, **1021**, 57-68.
5. *Радько С.П., Рахметова С.Ю., Бодоев Н.В., Арчаков А.И.* (2007) Биомед. химия, **53**, 4-24. DOI: 10.18097/pbmc20075301004
6. *Dick L.W. Jr., McGown L.B.* (2004) Anal. Chem., **76**, 3037-3041.
7. *Ahn J.Y., Lee S.W., Kang H.S., Jo M., Lee D.K., Laurell T., Kim S.* (2010) J. Proteome Res., **9**, 5568-5573.
8. *Zhao Y., Widen S.G., Jamaluddin M., Tian B., Wood T.G., Edeh C.B., Brasier A.R.* (2011) Mol. Cell. Proteomics, **10**, M111.008771.
9. *Zhang X., Zhu S., Xiong Y., Deng C., Zhang X.* (2013) Angew. Chem. Int. Ed., **52**, 6055-6058.
10. *Xiong Y., Deng C., Zhang X.* (2014) Talanta, **129**, 282-289.
11. *Du F., Alam M.N., Pawliszyn J.* (2014) Anal. Chim. Acta, **845**, 45-52.
12. *Lee S.J., Adler B., Ekstrom S., Rezeli M., Vegvari A., Park J.W., Malm J., Laurell T.* (2014) Anal. Chem., **86**, 7627-7634.
13. *Gupta V., Lassman M.E., McAvoy T., Lee A.Y., Chappell D.L., Laterza O.F.* (2016) Bioanalysis, **8**, 1557-1564.
14. *Bock L.C., Griffin L.C., Latham J.A., Vermaas E.H., Toole J.J.* (1992) Nature, **355**, 564-566.
15. *Wisniewski J.R., Zougman A., Nagaraj N., Mann M.* (2009) Nat. Methods, **6**, 359-362.
16. *Wisniewski J.R.* (2016) Anal. Chem., **88**, 5438-5443.
17. *Zgoda V.G., Kopylov A.T., Tikhonova O.V., Moisa A.A., Pyndyk N.V., Farafonova T.E., Novikova S.E., Lisitsa A.V., Ponomarenko E.A., Poverennaya E.V., Radko S.P. et al.* (2013) J. Proteome Res., **12**, 123-134.
18. *Kopylov A.T., Ilgisonis E.V., Moysa A.A., Tikhonova O.V., Zavialova M.G, Novikova S.E., Lisitsa A.V., Ponomarenko E.A., Moshkovskii S.A., Markin A.A., Grigoriev A.I., Zgoda V.G., Archakov A.I.* (2016) J. Proteome Res., **15**, 4039-4046.

Поступила: 05. 12. 2017.
Принята к печати: 29. 12. 2017.

USE OF DNA-APTAMERS FOR ENRICHMENT OF LOW ABUNDANT PROTEINS IN CELLULAR EXTRACTS FOR QUANTITATIVE DETECTION BY SELECTED REACTION MONITORING

K.G. Ptitsyn[1], S.E. Novikova[1], Y.Y. Kiseleva[2], A.A. Moysa[1], L.K. Kurbatov[1], T.E. Farafonova[1], S.P. Radko[1], V.G. Zgoda[1], A.I. Archakov[1]

[1]Institute of Biomedical Chemistry,
10 Pogodinskaya str., Moscow 119121, Russia; e-mail: radkos@yandex.ru
[2]Russian Scientific Center of Roentgenoradiology, Moscow, Russia

The relationship between the amount of a target protein in a complex biological sample and its amount measured by selected reaction monitoring (SRM) mass spectrometry upon the affinity enrichment of target protein with aptamers immobilized on a solid phase was studied. Human thrombin added in known concentrations to cellular extracts derived from bacterial cells was used as a model target protein. It has been demonstrated that the affinity enrichment of thrombin in cellular extracts by means of the thrombin-binding aptamer immobilized on the surface of magnetic microbeads results in an approximately 10-fold increase of the concentration of target protein and a 100-fold decrease of the low limit of a target protein concentration range where its quantitative detection by SRM is possible without an interference from other peptides present in a tryptic digest.

Key words: aptamers, thrombin, enrichment, quantitative detection, selected reaction monitoring