

На правах рукописи



ГНЕДЕНКО Оксана Валентиновна

**ОПТИКО-БИОСЕНСОРНЫЙ АНАЛИЗ БЕЛОК-БЕЛКОВЫХ, БЕЛОК-
ЛИПИДНЫХ И ОЛИГОНУКЛЕОТИДНЫХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ В РЕАЛЬНОМ
ВРЕМЕНИ.**

03.00.04.-биохимия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва, 2005

Работа выполнена в Государственном учреждении Научно-исследовательском институте биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича Российской академии медицинских наук

Научный руководитель:

доктор биологических наук
Иванов Юрий Дмитриевич

Официальные оппоненты:

доктор биологических наук,
академик РАМН
Егоров Алексей Михайлович

доктор биологических наук,
профессор
Соколов Николай Николаевич

Ведущая организация:

Московская Медицинская
Академия им. И. М. Сеченова

Защита состоится 30» мая 2005г. в 13 часов на заседании Диссертационного совета Д 001.010.01 при ГУ НИИ Биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича РАМН по адресу: 119121, Москва, ул. Погодинская, д. 10, корп. 1.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ГУ НИИ Биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича РАМН по адресу: 119121, Москва, ул. Погодинская, д.10, корп. 1.

Автореферат разослан 25» мая 2005г.

Ученый секретарь Диссертационного совета
кандидат биологических наук

 В.С. Былинкина

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Оптический биосенсор позволяет исследовать межмолекулярные взаимодействия в реальном времени без введения меток в анализируемые молекулы. Современные оптические биосенсоры характеризуются высокой чувствительностью, возможностью определять кинетические параметры образования и распада комплексов и быстротой анализа образца - несколько минут (Yeung et al., 1995). В настоящее время такие приборы нашли применение в фармакологических и протеомных исследованиях (Myszka and Rich, 2000; Natsume et al., 2000; Nelson et al., 2000), при эпитопном анализе антигенов (Novotny et al., 2000) и для детекции микробных антигенов (Nedelkov et al., 2000; Welschof et al., 1997). В качестве изучаемых объектов могут выступать различные пары: белок-белок, белок-липид, олигонуклеотид-олигонуклеотид, фермент-низкомолекулярный лиганд и т.д. В представленной работе оптический биосенсор использовался для изучения кинетических параметров взаимодействия антиген-антитело, взаимодействия белков цитохром Р450-содержащих монооксигеназных систем с фосфолипидными слоями, а также для изучения кинетических параметров гибридизации олигонуклеотидов и взаимодействия фермент-низкомолекулярный лиганд.

Актуальность данной работы определяется тем, что с помощью оптического биосенсора "резонансное зеркало" вычислены кинетические параметры образования межмолекулярных комплексов различных видов, и тем самым продемонстрированы возможности оптического биосенсора в экспериментальном исследовании межмолекулярных взаимодействий, а также возможности практического применения биосенсора при разработке биоаналитических методов, биотехнологических систем, в фармакологии и исследовании метаболических путей.

Целью настоящей работы явилось определение с помощью оптического биосенсора кинетических констант образования и распада белок-белковых, белок-липидных и олигонуклеотидных комплексов.

В соответствии с поставленной целью были сформулированы следующие **задачи**:

- определить кинетические константы образования и распада комплексов МКА/НВsAg и HCV-core-Ag/МКА;
- показать возможность обнаружения НВsAg и антител к нуклеокапсидному белку ВГС в сыворотке крови людей с помощью оптического биосенсора;
- разработать методику ковалентной иммобилизации фосфатидилэтаноламинов на поверхности кюветы оптического биосенсора для исследования белок-липидных взаимодействий;

- определить кинетические характеристики взаимодействия мембранных белков митохондриального цитохрома P450-содержащей монооксигеназной системы с дилауроилфосфатидилэтаноламином (ДЛФЭ) и дистеароилфосфатидилэтаноламином (ДСФЭ);
- вычислить с помощью оптического биосенсора кинетические параметры гибридизации олигонуклеотидов;
- провести мониторинг взаимодействия глицерол-3-фосфатдегидрогеназы и глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы с иммобилизованным 5-аминоизатином.

Научная новизна работы. В ходе выполнения работы определены константы скорости реакций образования и распада комплексов для следующих пар антиген-антитело: **NE3/HBsAg, CEN24/HBsAg, HCV-core-Ag/CE11, HCV-core-Ag/CE12, HCV-core-Ag/CD11, HCV-core-Ag/B-1.**

Путем ковалентной иммобилизации фосфолипидов на поверхности аминосилановой кюветы оптического биосенсора созданы стабильные фосфолипид-содержащие биочипы для исследования белок-липидных взаимодействий. Определены константы скорости ассоциации и скорости диссоциации белок-липидных комплексов: **ДЛФЭ/d-b5, ДСФЭ/d-b5, ДЛФЭ/d-Fp, ДЛФЭ/d-2B4, ДСФЭ/d-2B4.**

Установлено, что глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа и глицерол-3-фосфатдегидрогеназа являются изатин-связывающими белками. Определены константы скорости ассоциации и диссоциации комплекса 5-аминоизатин/ГФДГ. Показано, что лактатдегидрогеназа не взаимодействует с иммобилизованным аналогом изатина.

Научно-практическая ценность работы. Показана возможность выявления поверхностного антигена вируса гепатита В, а также антител к нуклеокапсидному белку вируса гепатита С в сыворотке крови людей с помощью оптического биосенсора. Это создает основы для разработки диагностических методов, позволяющих детектировать маркеры заболеваний в реальном времени с высокой специфичностью, при этом требуется малое количество анализируемой пробы (несколько микролитров) и короткое время измерения (несколько минут).

Разработана методика ковалентной иммобилизации фосфатидилэтаноламинов на поверхности кюветы оптического биосенсора. Создание фосфолипидных биочипов позволяет исследовать кинетические характеристики белок-липидных взаимодействий и моделировать мембранные P450-содержащие монооксигеназные системы.

Апробация работы. Основные положения диссертации были представлены на 12-ой международной конференции "Цитохром P450: биохимия, биофизика и молекулярная биология" (Франция, 2001), на 5-ом конгрессе "Современные проблемы аллергологии,

иммунологии и иммунофармакологии" (Москва, 2002), на 2-ом международном конгрессе "Биотехнология: состояние и перспективы развития. Биотехнология и медицина" (Москва, 2003), на 2-ой международной конференции "Геномика, протеомика и биоинформатика для медицины" (Москва - Плес - Москва, 2004). По материалам диссертации опубликовано 7 статей и 4 тезисов докладов.

Структура и объем диссертации. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, изложения результатов и их обсуждения, заключения, выводов и списка цитируемой литературы. Работа содержит страниц машинописного текста, 8 таблиц и 26 рисунков. Список литературы включает 207 источников.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Сывороточный очищенный HBsAg получен у "ИмБио" (Нижний Новгород, Россия). Моноклональные антитела (МКА) к HBsAg, 96% чистоты, были получены: NE3 в НИИ иммунологии МЗ РФ (Москва), CEN24 из Всесоюзного научного центра молекулярной диагностики и лечения (Москва). Иммуноферментный анализ сывороток выполняли, используя коммерческие тест-системы. Определение HBsAg проводили с помощью тест-систем: HBsAg ("Human", Германия), HBsAg (НПО "Диагностические системы", Нижний Новгород). На наличие HBsAg исследовали 68 образцов сывороток крови людей: из них 37 от пациентов с ВГВ-инфекцией, а также 31 сыворотка от пациентов без ВГВ-инфекции.

Рекомбинантный нуклеокапсидный антиген вируса гепатита С (HCV-core-Ag) генотип 1b, аффинно очищенный до 96%, любезно предоставлен фирмой ЗАО "Вектор-Бест" (Россия, Новосибирская область, пос. Кольцово). МКА к эпитопам нуклеокапсидного антигена, аффинно очищенные до 96%, получены из НИИ Вирусологии им. Д.И. Иванковского РАМН (Москва) и из Всесоюзного научного центра молекулярной диагностики и лечения (Москва).

В работе использовали 47 образцов сывороток крови людей для выявления антител к нуклеокапсидному белку (anti-core): из них 32 сыворотки, содержащие anti-core по данным ИФА, и 15 сывороток, не содержащих anti-core по данным ИФА. Иммуноферментный анализ сывороток и моноклональных антител выполняли, используя коммерческую тест-систему "Спектр" (ЗАО Вектор-Бест, Россия).

Полноразмерные формы цитохромов P450 2B4 и B5, NADPH-зависимой цитохром P450 редуктазы, а также укороченные формы t-b5 и t-Gr были выделены и любезно предоставлены к.б.н. Саменковой Н.Ф. и к.б.н. Кузнецовой Г.Л. (ГУ НИИ БМХ РАМН, Москва).

Цитохром P450sat любезно предоставлен Dr. Hui Bon Hoa (Institute de Biologie Physico Chimique, Париж, Франция).

Адренодоксин любезно предоставлен проф. Усановым С.А. (Институт биоорганической химии, Минск, Беларусь).

Олигонуклеотиды p14, ODN-11, ODN-14 и ODN-23 любезно предоставлены Ковалем В.В. и Федоровой О.С. (Новосибирский институт биоорганической химии СО РАН, Новосибирск, Россия).

Глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа, глицерол-3-фосфатдегидрогеназа, лактатдегидрогеназа любезно предоставлены к.б.н. Медведевой М.В. (Биологический факультет МГУ).

Биосенсор "резонансное зеркало"

При выполнении работы использовали одноканальный и двухканальный оптические биосенсоры "резонансное зеркало" IAsys и IAsys plus компании Affinity Sensors (Кембридж, Англия). Объем реакционной смеси в кювете одноканального биосенсора - 200 мкл,

двухканального биосенсора - 60 мкл. Образцы вносили непосредственно в кювету. Постоянную температуру 25°C в кювете одноканального биосенсора IAsys поддерживали с помощью термостата (Haake, Mess-Technik, Карлсруэ, Германия). Скорость перемешивания раствора в кювете составляла 7200 оборотов в мин (60 единиц прибора). Постоянную температуру 25°C в кювете двухканального биосенсора IAsys *plus* поддерживали с помощью элемента Пельтье. Частота колебаний мешалки двухканального биосенсора - 98 Гц.

Связывание HBsAg с иммобилизованными МКА

Ассоциацию антигена с иммобилизованными МКА регистрировали после добавления антигена в большом избытке по отношению к иммобилизованному МКА (диапазон концентраций **HBsAg $1,0 \cdot 10^{-9}$ М – $1,1 \cdot 10^{-6}$ М**). В кювету с иммобилизованными антителами добавляли 180-199 мкл (в случае одноканального биосенсора) или 40-48 мкл (в случае двухканального биосенсора) PBS/t буфера и прописывали базовую линию не менее 5 мин. После этого в кювету добавляли 1-20 мкл (в случае одноканального биосенсора) или 2-10 мкл (в случае двухканального биосенсора) раствора антигена и регистрировали связывание в течение 5-10 мин. Процесс диссоциации комплексов антиген/антитело регистрировался в течение 5-15 мин после замены раствора, содержащего антиген, на 200 мкл или 60 мкл PBS/t. Кювету регенерировали инкубацией с 200 или 60 мкл 10 мМ HCl в течение 2 мин и последующей промывкой PBS/t. Для всех иммобилизованных антител регистрировали 4-7 кривых связывания с HBsAg при различных концентрациях антигена. Данные были обработаны с помощью программного обеспечения прибора (IAsys software, FASTfit).

Связывание МКА с иммобилизованным core антигеном ВГС

Ассоциацию антител с иммобилизованным антигеном регистрировали после добавления антител в большом избытке по отношению к иммобилизованному core белку (диапазон концентраций антител **$2,87 \cdot 10^{-4}$ М – $7,87 \cdot 10^{-6}$ М**). В кювету с иммобилизованным антигеном добавляли 48-59 мкл PBS/t буфера и прописывали базовую линию в течение не менее 5 мин. После этого в кювету добавляли 1-12 мкл раствора антител и регистрировали связывание в течение 5-10 мин. Процесс диссоциации комплексов антиген-антитело регистрировали в течение 5-15 мин после замены раствора, содержащего антиген, на 60 мкл PBS/t. Кювету регенерировали инкубацией с 60 мкл 10 мМ HCl в течение 2 мин и последующей промывкой PBS/t. Все антитела анализировали при 4-6 различных концентрациях. Полученные данные обрабатывали с помощью программного обеспечения прибора (IAsys software, FASTfit).

Иммобилизация ДЛФЭ и ДСФЭ на поверхности биосенсорной кюветы

Фосфолипиды иммобилизовали на аminosилановой (АС) поверхности кюветы одноканального оптического биосенсора с использованием янтарного ангидрида. Перед началом иммобилизации АС-кювету инкубировали в течение 10 мин в 10 мМ КФБ, pH 7,6, при температуре 25°C. Затем этот буфер заменяли на раствор янтарного ангидрида (310 г/л в смеси ацетонитрила и 10 мМ КФБ, pH 7,6 в соотношении 1:1), который инкубировали в кювете в течение 1 ч. В результате на модифицированной АС-поверхности сформировался карбоксильный слой. После промывки кюветы 10 мМ КФБ, pH 7,6, ДЛФЭ или ДСФЭ ковалентно иммобилизовывали на карбоксильном слое через аминогруппы по стандартной методике. Карбоксильную поверхность активировали смесью EDC/NHS (IAsys Manual, 1993). После 7 мин активации проводилась иммобилизация ДЛФЭ или ДСФЭ (20 г/л в диоксане) в течение 10 мин. Несвязанный фосфолипид удаляли PBS/t. Непрореагировавшие эфирные группы на поверхности кюветы блокировали 1 М этаноламином, pH 8,5. Затем кювету промывали 50 мМ КФБ, pH 7,4, содержащим 1 М NaCl и 20% холат Na.

Связывание белков с липидами регистрировали после добавления белка в кювету в диапазоне концентраций **$0,25 \cdot 10^{-6}$ М – $0,75 \cdot 10^{-6}$ М**.

Используя калибровочную кривую для АС - кюветы (IAsys Manual, 1993), поверхностную концентрацию связавшегося с иммобилизованным липидом белка (г/м^2 , молекул/ см^2) рассчитывали как $f = R \cdot 10^{14} / M_r$, где R - смещение резонансного угла, регистрируемое прибором, M_r - молекулярная масса белка.

В качестве контрольной поверхности использовали кювету без иммобилизованного липида.

Гибридизация олигонуклеотидов-мишеней с иммобилизованным олигонуклеотидным зондом

Ассоциацию олигонуклеотидов-мишеней с иммобилизованным зондом регистрировали после добавления олигонуклеотидов-мишеней в большом избытке по отношению к иммобилизованному зонду (диапазон концентраций олигонуклеотидов-мишеней $0,90 \cdot 10^{-5}$ М $1,04 \cdot 10^{-4}$ М). В кювету с иммобилизованным зондом добавляли 170 мкл гибридизационного буфера (20 mM Na_2HPO_4 , 160 mM NaCl , 1 mM EDTA, pH 7,5) и прописывали базовую линию не менее 5 мин. После этого в кювету вносили 30 мкл раствора олигонуклеотида-мишени и регистрировали изменение сигнала в течение 15 мин. Процесс диссоциации образовавшихся ДНК-ДНК дуплексов регистрировали в течение 5-15 мин после замены раствора олигонуклеотида-мишени на 200 мкл гибридизационного буфера. Для разделения цепей ДНК-ДНК дуплекса в кювету добавляли 200 мкл бидистиллированной воды и инкубировали в течение 2 мин. Для олигонуклеотидов-мишеней были получены 5-7 кривых связывания при различных концентрациях. Полученные данные обрабатывали с помощью программного обеспечения прибора (IASys software, FASTfit).

В качестве контрольной поверхности использовали кювету без иммобилизованного олигонуклеотида.

Иммобилизация 5-аминоизатина на КМД поверхности кюветы одноканального биосенсора IASys и связывание глицерол-3-фосфатдегидрогеназы и глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы с иммобилизованным лигандом

Карбоксиметилированный декстран активировали смесью 0,4М EDC/0,1М NHS в течение 7 мин и промывали 10 mM натрий-фосфатным буфером (pH 7,4), содержащим 138 mM NaCl , 2,7 mM KCl и 0,05 % Твин-20 (PBS/t). Затем добавляли раствор 5-аминоизатина (60 мкг/мл). Иммобилизацию проводили в течение 15 мин в 10 mM формиатном буфере, pH 3,0. Карбоксильные группы декстрана, активированные EDC/NHS, но не связавшиеся с 5-аминоизатином, блокировали 1 М раствором этаноламина (pH 8,5) в течение 2 мин. Кювету с иммобилизованным 5-аминоизатином промывали 50 mM КФБ, pH 7,4, содержащим 1 М NaCl для удаления неспецифически сорбированных молекул. Связывание с иммобилизованным лигандом регистрировали после добавления фермента в кювету в диапазоне концентраций $0,3 \cdot 10^{-6}$ М - $7,710^{-6}$ М. В кювету добавляли рабочий буфер и регистрировали базовую линию прибора в течение 5 мин, после чего добавляли фермент, за ассоциацией которого с 5-аминоизатином наблюдали около 5 мин. Процесс диссоциации комплексов фермент-низкомолекулярный лиганд регистрировали после замены раствора, содержащего фермент, на буфер. В качестве контрольной поверхности использовали кювету без иммобилизованного 5-аминоизатина.

Определение констант скорости ассоциации и диссоциации методом оптического биосенсора

Программное обеспечение к прибору (IASys software, FASTfit) использует процедуру обработки экспериментальных кривых ассоциации и диссоциации для получения величин k_{on} и k_{off} из уравнений:

$$R=R_0+R_1(1-\exp(-ft)), \text{ где } f=k_{on}[B]+k_{off}, \quad (1)$$

$$R=R_1\exp(-k_{off}t), \quad (2)$$

где k_{on} - константа скорости ассоциации, k_{off} - константа скорости диссоциации, t - время; R_0 - величина сигнала биосенсора при t=0; R_1 сигнал биосенсора при t=∞ (равновесном состоянии); [B] - концентрация добавляемого партнера в растворе.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Исследование взаимодействия МКА с HBsAg

Поверхностный антиген вируса гепатита В является основным диагностическим маркером ВГВ - инфекции. Выбор в качестве объектов исследования пар МКА/HBsAg обусловлен большим интересом к разработке новых тест-систем для диагностики гепатита В.

Были проведены эксперименты по иммобилизации на поверхности карбоксилатных кювет одноканального оптического биосенсора моноклональных антител к общегрупповым эпитопам поверхностного антигена вируса гепатита В - NE3 и CEN24; в качестве блокирующего реагента использовали этаноламин. Для исключения вклада неспецифических взаимодействий применили дифференциальную схему регистрации в 2-х кюветах: 1) рабочая кювета с иммобилизованными на поверхности моноклональными антителами; 2) контрольная кювета, на которой повторяется вся процедура иммобилизации, за исключением добавления пробы, содержащей антитела. Не наблюдалось связывания HBsAg с поверхностью контрольной кюветы, в то время как в рабочей кювете регистрировали образование комплексов **МКА_{nm}/HBsAg**. Используя уравнения (1) и (2), из экспериментальных кривых вычислили кинетические параметры комплексообразования сывороточного очищенного HBsAg с иммобилизованными антителами (табл. 1). Минимальная концентрация HBsAg, определяемая с помощью карбоксилатной кюветы к одноканальному биосенсору с иммобилизованными МКА, составляет ОД мкг/мл.

Таблица 1. Параметры связывания HBsAg с МКА.

Тип кюветы	Исследуемые пары	$k_{on}, M^{-1}c^{-1}$	k_{off}, c^{-1}	K_A, M^{-1}
карбоксилатная	CEN24 _{nm} /HBsAg	$(1,37 \pm 0,05) \cdot 10^5$	$(3,4 \pm 0,6) \cdot 10^{-4}$	$(4,0 \pm 0,7) \cdot 10^8$
карбоксилатная	NE3 _{nm} /HBsAg	$(5,3 \pm 0,9) \cdot 10^4$	$(1,7 \pm 1,0) \cdot 10^{-3}$	$(3,0 \pm 2,0) \cdot 10^7$
аминосилановая	NE3 _{nm} /HBsAg	$(6,3 \pm 1,5) \cdot 10^3$	$(2,7 \pm 0,6) \cdot 10^{-4}$	$(2,3 \pm 0,7) \cdot 10^7$
карбоксилатная	HBsAg _{nm} /NE3	$(8,0 \pm 1,0) \cdot 10^4$	$(3,2 \pm 0,9) \cdot 10^{-3}$	$(2,5 \pm 0,8) \cdot 10^7$

Далее в работе использовали двухканальный биосенсор *IASys plus*, который позволяет проводить вычитание вклада неспецифического взаимодействия. В рабочем канале аминотиламовой двухканальной кюветы были иммобилизованы моноклональные антитела NE3, в контрольном канале их не было, в качестве блокирующего реагента использовали бычий сывороточный альбумин. Минимальная концентрация HBsAg, определяемая с помощью аминотиламовой кюветы с иммобилизованными NE3, составляет 0,4 мкг/мл. Константы скорости образования (k_{on}), распада комплексов (k_{off}) и равновесная константа ассоциации (K_A) HBsAg с NE3, иммобилизованными на аминотиламовой поверхности кюветы двухканального оптического биосенсора, представлены в таблице 1.

В эксперименте по изучению связывания МКА NE3 с иммобилизованным HBsAg сывороточный HBsAg был иммобилизован в рабочем канале карбоксилатной двухканальной кюветы, в качестве блокирующего реагента использовали β - казеин. Кинетические параметры комплексообразования NE3 с иммобилизованным HBsAg, вычисленные из экспериментальных кривых, представлены в таблице 1. Видно, что значение константы аффинности для NE3 не зависит от выбора поверхности кюветы, а также от порядка иммобилизации белков.

Полученные с помощью оптического биосенсора значения константы аффинности (равновесной константы ассоциации) моноклональных антител NE3 и CEN24 согласуются с описанными в литературе данными метода количественной преципитации: аффинность моноклональных anti-HBs к синтетическими линейным и циклическим пептидам, соответствующим аминокислотам 139-147 основного полипептида HBsAg, а также к полипептидному комплексу gp28/p23 из очищенного сывороточного HBsAg, составляла $2 \cdot 10^6 - 5 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}$ (Brown et al., 1984); аффинность поликлональных anti-HBs по отношению к этим же синтетическим пептидам и к полипептидному комплексу gp30/p25 составляла $5,9 \cdot 10^6 - 3,5 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1}$ (Thanavala et al., 1986). Таким образом, показано, что оптический биосенсор может быть корректно применен для анализа взаимодействий антиген-антитело.

Двухканальный биосенсор IAsys *plus* существенно облегчает тестирование сложных биологических жидкостей. Представляет интерес использование оптического биосенсора для селективного выявления маркеров инфекционных заболеваний, в частности HBsAg, в сыворотках крови людей. Далее представлены результаты, полученные на карбоксилатной двухканальной кювете. В рабочем канале иммобилизовали МКА NE3, в качестве блокирующего реагента использовали цитохром С.

При тестировании образцов сыворотки на наличие поверхностного антигена ВГВ в оба канала кюветы добавляли по 6 мкл сыворотки к 54 мкл PBS/t. Результирующая кривая, образующаяся при вычитании сигнала контрольного канала из сигнала рабочего канала, позволила выявить специфическое взаимодействие поверхностного антигена с иммобилизованными антителами. На рис. 1 приведены результирующие кривые взаимодействия компонентов сывороток №11 и №3 с NE3, иммобилизованными на карбоксилатной кювете. По данным иммуноферментного анализа, сыворотка №11 содержала HBsAg, а в сыворотке №3 HBsAg отсутствовал. При добавлении сыворотки №3 наблюдалось незначительное изменение результирующей базовой линии биосенсора. В случае сыворотки №11 было обнаружено образование комплексов антиген-антитело: после отмывки PBS/t уровень результирующего сигнала биосенсора был выше начального уровня на 20 арг сек. С помощью карбоксилатной двухканальной кюветы с иммобилизованными антителами NE3,

заблокированной цитохромом С, была протестирована 21 сыворотка (9 положительных и 12 отрицательных, по данным ИФА). Совпадение данных биосенсорного тестирования и ИФА составило 62%.

В качестве блокирующего реагента при иммобилизации МКА NE3 на карбоксилатной поверхности был использован также стрептавидин. С помощью такого биочипа было протестировано 52 сыворотки (33 положительных и 19 отрицательных, по данным ИФА). Совпадение данных биосенсорного тестирования и ИФА составило 69% (табл. 2).

Таблица 2. Сравнительные данные по детекции HBsAg в сыворотке крови с помощью оптического биосенсора и ИФА.

Кол-во сывороток	ИФА	Анализ с помощью оптического биосенсора
20	+	+
12	+	-
15	-	-
~ 4	-	+

Таким образом, нами была показана возможность использования оптического биосенсора для выявления поверхностного антигена ВГВ в сыворотках крови людей.

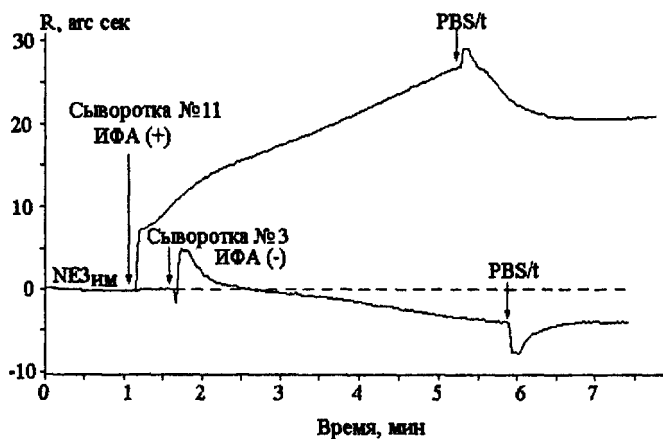


Рис. 1. Кривые связывания компонентов сывороток с антителами NE3, иммобилизованными на карбоксилатной кювете двухканального биосенсора IAsys plus. Стрелками обозначено добавление сывороток или буфера.

Исследование взаимодействия HCV-core-Ag/anti-core

С помощью оптического биосенсора были изучены кинетические параметры взаимодействия нуклеокапсидного белка вируса гепатита С с различными моноклональными антителами к нему. Нуклеокапсидный (core) белок является одним из структурных белков

ВГС. Антитела к core антигену появляются одними из первых при острой инфекции, титры антител нарастают при хронической инфекции и сохраняются пожизненно у большинства выздоровевших людей (Giuberti et al., 1992; Yamagushi et al., 2000; Nikolaeva et al., 2002). Выбор в качестве объектов исследования пар HCV-core-Ag/МКА был обусловлен большим интересом к разработке новых тест-систем для диагностики гепатита С.

Рекомбинантный нуклеокапсидный белок вируса гепатита С (аминокислотная последовательность 1-131) был иммобилизован в рабочем канале аминосилановой двухканальной кюветы, непрореагировавшие реакционные центры рабочего канала, а также аминокислотные группы контрольного канала были блокированы БСА. Была измерена зависимость сигнала биосенсора от времени для различных концентраций добавляемых моноклональных антител: CE1, CEH, CE12, CD11, B-1. Путем обработки экспериментальных кривых согласно уравнениям (1) и (2) были вычислены кинетические параметры взаимодействия различных моноклональных антител с иммобилизованным HCV-core-Ag (табл. 3). Минимальная концентрация МКА, определяемая с помощью аминосилановой двухканальной кюветы с иммобилизованным core белком ВГС, составляла 4 мкг/мл.

Оптический биосенсор использовался для выявления антител к нуклеокапсидному белку вируса гепатита С в сыворотках крови. При тестировании образцов сыворотки на наличие антител к core белку ВГС в оба канала кюветы добавляли по 6 мкл сыворотки к 54 мкл PBS/t. Результирующая кривая, образующаяся при вычитании сигнала контрольного канала из сигнала рабочего канала, выявила специфическое взаимодействие anti-core с иммобилизованным core белком ВГС.

Таблица 3. Параметры взаимодействия моноклональных антител с HCV-core-Ag.

МКА	Титр антител по данным ИФА	$k_{on},$ $M^{-1}c^{-1}$	$k_{off},$ c^{-1}	$K_A,$ M^{-1}
CE1	-	-	-	-
CE11	1/1000	$(1,1 \pm 0,2) \cdot 10^3$	$(3,8 \pm 0,8) \cdot 10^{-4}$	$(2,9 \pm 0,8) \cdot 10^6$
CE12	1/500	$(7,0 \pm 3,0) \cdot 10^2$	$(1,7 \pm 0,2) \cdot 10^{-3}$	$(4,0 \pm 2,0) \cdot 10^7$
CD11	1/500	$(4,3 \pm 0,2) \cdot 10^2$	$(3,0 \pm 1,0) \cdot 10^{-4}$	$(1,4 \pm 0,5) \cdot 10^6$
B-1	1/2000	$(8,0 \pm 2,0) \cdot 10^3$	$(2,9 \pm 0,2) \cdot 10^{-4}$	$(2,7 \pm 0,7) \cdot 10^7$

На рис. 2 приведены результирующие кривые взаимодействия сывороток №1 и №30 с HCV-core-Ag_m. По данным иммуноферментного анализа, сыворотка №30 содержала антитела к core белку ВГС, титр антител 1/2000, а в сыворотке №1 они отсутствовали. При

добавлении сыворотки №1 наблюдалось незначительное изменение результирующей базовой линии биосенсора. В случае сыворотки №30 было обнаружено образование комплексов антиген-антитело: после отмывки PBS/t уровень результирующего сигнала биосенсора выше начального уровня на 800 arc сек.

С помощью аминосилановой двухканальной кюветы с иммобилизованным сорбентом ВГС было протестировано 47 сывороток (32 положительные и 15 отрицательных, по данным ИФА). Совпадение данных биосенсорного тестирования и ИФА составило 74% (табл. 4).

Таблица 4. Сравнительные данные по детекции антител к нуклеокапсидному белку ВГС в сыворотке крови с помощью оптического биосенсора и ИФА.

Кол-во сывороток	ИФА	Анализ с помощью оптического биосенсора
20	+	+
12	+	-
15	-	-

Таким образом, нами показана возможность использования оптического биосенсора для выявления антител к нуклеокапсидному белку ВГС в сыворотках крови людей.

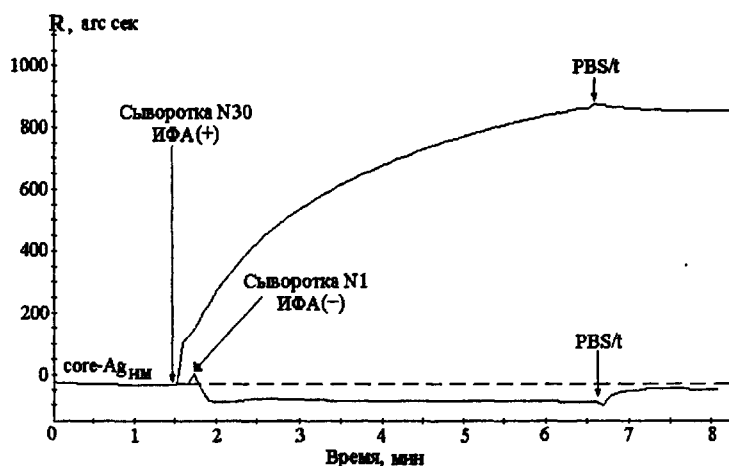


Рис. 2. Результирующие кривые связывания компонентов сывороток с сорбентом ВГС, иммобилизованным на аминосилановой кювете двухканального биосенсора IAsys plus. Стрелками обозначено добавление сывороток или буфера.

Исследование взаимодействия мембранных и водорастворимых белков из цитохром Р450-содержащих монооксигеназных систем с иммобилизованными фосфолипидными слоями

В данном разделе продемонстрировано применение оптического биосенсора для определения кинетических параметров взаимодействия мембранных белков цитохром Р450 2В4-содержащей монооксигеназной системы с иммобилизованным липидным слоем. Ранее предпринимались попытки применить этот метод для исследования белок-липидных взаимодействий (Ramsden et al., 1996), но созданные за счет адсорбции фосфолипидные слои были нестабильны. В настоящей работе был создан стабильный фосфолипид-содержащий биочип путем ковалентной иммобилизации фосфолипидов на поверхности аminosилановой кюветы оптического биосенсора (см. Материалы и методы исследования). Фосфолипидный слой был сформирован из насыщенных фосфолипидов: дилаурилфосфатидилэтаноламина (ДЛФЭ) и дистеарилфосфатидилэтаноламина (ДСФЭ), различающихся длиной остатков жирных кислот, при этом ДЛФЭ характеризовался более низкой температурой фазового перехода гель - жидкий кристалл (29°C), чем ДСФЭ (60°C) (Ивков и Берестовский, 1981). Роль гидрофобных мембранных фрагментов во встраивании белков была исследована путем сравнительного анализа взаимодействий с фосфолипидным слоем полноразмерных белков (d-b5 и d-Fp) и их лишенных трансмембранных доменов форм (t-b5 и t-Fp). Для выяснения влияния электростатических взаимодействий на встраивание мембранных белков в фосфолипидный слой использовали буферные растворы двух типов: 1) буфер высокой ионной силы (500 мМ КФБ), в котором электростатические взаимодействия слабые и основной вклад вносят гидрофобные взаимодействия; 2) буфер низкой ионной силы (25 мМ КФБ), в котором электростатические взаимодействия играют существенную роль.

Встраивание мономеров мембранных белков в фосфолипидный слой

Добавление растворов мембранных белков в измерительную кювету с иммобилизованным фосфолипидным слоем увеличивало амплитуду сигнала, что свидетельствовало о связывании соответствующего белка с фосфолипидным слоем (рис. 3 - 5). При связывании белков с липидными слоями на поверхности кюветы происходит ряд процессов; в результате общее количество связавшегося белка (I_t) состоит из белка, адсорбированного на поверхности (I_a), и белка, встроенного в фосфолипидный слой (I_l). Замена белкового раствора буфером приводила к диссоциации комплексов белок-липид. Белок, связанный за счет электростатических взаимодействий, удаляли добавлением 50 мМ КФБ, pH 7,4, содержащего 1 М Na⁺d (далее 1 М NaCl). Повторная промывка 1М NaCl не вызывала дальнейшей диссоциации (рис. 3). Белок, который не может быть удален КФБ/Е и 1М NaCl, рассматривался как встроенный в фосфолипидный слой за счет гидрофобных

взаимодействий (I_i). Удалялся он с поверхности биочипа только в результате обработки раствором детергента – холата Na в концентрации 20% в 50 мМ КФБ, содержащем 1 М NaCl, pH 7,4 (далее Ch).

Встраивание белка моделировалось системой уравнений:

$$1/A(dI_a/dt) = k_{on}^a f C - (k_{off}^a I_a/A) \quad (3)$$

$$1/A(dI_i/dt) = k_{on}^i f C \quad (4)$$

$$I_i = I_a + I_i \quad (5)$$

$$f = S/S_0, \quad (6)$$

где A – число Авогадро; I_i (молекул белка/см²) – общее количество адсорбированного на поверхности (I_a) и встроеного в фосфолипидный слой (I_i) белка ($I_i = I_a + I_i$); k_{on}^a и k_{on}^i – константы скорости ассоциации для процессов адсорбции и встраивания, обусловленного гидрофобными взаимодействиями; k_{off} – константа скорости диссоциации белок-липидных комплексов; C – концентрация белка, добавляемого в измерительную кювету; S_0 и S – поверхности, доступные для связывания белка в начальный момент времени и в момент измерения.

Данные по взаимодействию d-b5 и t-b5 с ДЛФЭ и ДСФЭ, а также с немодифицированной поверхностью кюветы в 500 и 25 мМ КФБ/Е представлены на рис. 3. Видно, что, как в условиях высокой, так и в условиях низкой ионной силы, d-b5 встраивался в ДЛФЭ с близкими значениями k_{on}^i (рис. 3, табл. 5), в то время как встраивание этого белка в ДСФЭ происходило лишь в буфере с высокой ионной силой. Встраивание d-b5 в фосфолипидный слой в 25 мМ КФБ/Е было полным ($P=1$), тогда как в 500 мМ КФБ/Е доля встроеного белка была значительно меньше ($P=0,4$). В условиях высокой ионной силы наблюдалось взаимодействие d-b5 с немодифицированной АС-поверхностью, однако адсорбированный белок полностью отмывался КФБ/Е. В буфере низкой ионной силы взаимодействие между d-b5 и АС-поверхностью не наблюдалось. Таким образом, электростатические взаимодействия существенно влияют на связывание белка с фосфолипидными слоями: препятствуя обратимой адсорбции d-b5, они не влияют на его встраивание в ДЛФЭ и полностью ингибируют его встраивание в ДСФЭ. Причем, нельзя полностью исключить влияние степени агрегации d-b5 на его способность встраиваться в фосфолипидный слой в буфере низкой ионной силы. Укороченный b5 не взаимодействует с фосфолипидным слоем ни в 500 мМ КФБ/Е, ни в 25 мМ КФБ/Е (рис. 3). Отсутствие взаимодействия t-b5 с фосфолипидами указывает на то, что гидрофобный мембранный фрагмент этого белка играет решающую роль в его встраивании.

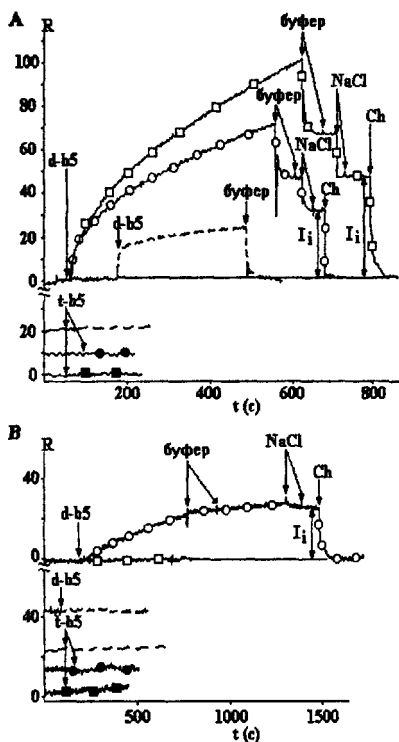


Рис. 3. Связывание d-(-o-) или t-b5 (•-) с ДЛФЭ и d-(-□-) или t-b5 (■-) с ДСФЭ. Инкубационная смесь содержала 500 мМ (А), 25 мМ (В) КФБ/Е. Стрелками указано добавление 0,5 мкМ d-, t-b5 в соответствующем буфере. Здесь и на рис. 4-6 - пунктир обозначает адсорбцию исследуемого белка на немодифицированной АС-поверхности; NaCl – 1М NaCl; Ch – 20% раствор холата натрия + 1М NaCl; I₁ – количество белка, встроенного в липидный слой.

В отличие от d-b5, d-Fp не встраивался в фосфолипидные слои в буфере высокой ионной силы, но встраивался (только в ДЛФЭ) в буфере низкой ионной силы; доля встроенного в ДЛФЭ белка $P=1$ (рис. 4). В условиях высокой ионной силы **d-Fp** адсорбировался как на ДЛФЭ, так и на ДСФЭ, а также на немодифицированной АС-поверхности, и полностью отмывался или КФБ/Е, или 1 М NaCl, что указывает на отсутствие встраивания. Таким образом, наличие обратимой адсорбции белка не является обязательным фактором для его встраивания. В отличие от d-b5, электростатические силы способствуют встраиванию d-Fp в ДЛФЭ. Усеченный Fp не взаимодействует с фосфолипидными слоями ни в условиях низкой, ни в условиях высокой ионной силы, из чего следует, что гидрофобный мембранный

фрагмент флавопротеина (также как и в случае цитохрома b5) необходим для встраивания белка.

Таблица 5. Параметры связывания белков с ДЛФЭ и ДСФЭ на АС- поверхности.

Буфер	Белок	Слой	$k_{on}^a \times 10^{-5}$, см/с	$k_{on}^i \times 10^{-6}$, см/с	$k_{off} \times 10^{-4}$, с ⁻¹	P	$I_i \times 10^{11}$, молекул/с м ²	$I_i \times 10^{11}$, молекул/с м ²
500 мМ КФБ/Е	d-b5	ДЛФЭ	1,0±0,2	6,3±1,2	25,0±6,2	0,45±0,06	14±1	6,4±0,7
		ДСФЭ	2,0±0,4	10,0±2,3	25,0±4,8	0,43±0,06	19±2	8,2±0,8
	d-2B4	ДЛФЭ	2,8±0,6	2,3±0,5	50±12	0,33±0,05	9,0±0,8	2,9±0,3
		ДСФЭ	5,0±1,0	4,0±0,7	50±11	0,28±0,04	11,0±1,2	3,1±0,3
25 мМ КФБ/Е	d-b5	ДЛФЭ	0	3,6±0,8	0	1,00±0,14	4,2±0,4	4,2±0,5
		ДСФЭ	0	0	0	0	0	0
	d-Fp	ДЛФЭ	0	0,4±0,1	0	1,00±0,13	0,54±0,05	0,54±0,06
		ДСФЭ	0	0	0	0	0	0

Примечание. $P = I_i / I_t$ - доля встроеного в фосфолипидный слой мембранного белка; a и i - реакция адсорбции и гидрофобного встраивания белка в фосфолипидные слои, соответственно.

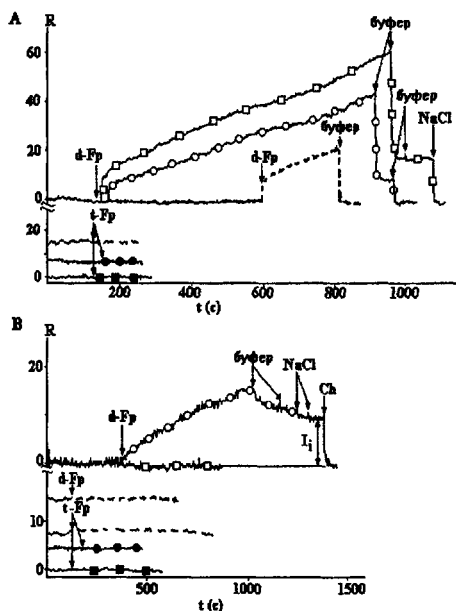


Рис. 4. Связывание d-(-○-) или t-Fp (-●-) с ДЛФЭ и d-(-□-) или t-Fp (-■-) с ДСФЭ.

Инкубационная смесь содержала 500 мМ (А), 25 мМ (В) КФБ/Е. Стрелками указано добавление 0,25 мкМ d-, t-Fp (А) и 0,75 мкМ d-, t-Fp (В) в соответствующем буфере. Другие обозначения такие же, как на рис. 3.

Более сложная картина наблюдалась при изучении взаимодействия d-2B4 с фосфолипидными слоями. Способность мембранных белков встраиваться в биомембрану определяется их гидрофобностью. Согласно шкале Эйзенберга (Eisenberg et al, 1982) гидрофобность d-2B4 составляет -8,15, что выше, чем гидрофобность d-b5 и d-Fp (-12,65 и -40,33, соответственно). Данные по встраиванию d-2B4 представлены на рис. 5. Видно, что в 500 мМ КФБ/Е d-2B4 встраивается как в ДЛФЭ, так и в ДСФЭ. Встраивание белка сопровождается его адсорбцией. Доля встроеного как в ДЛФЭ, так и в ДСФЭ белка составляла около 30% (табл. 5). При взаимодействии с немодифицированной АС-поверхностью d-2B4 адсорбируется на ней за счет электростатических сил и может быть полностью удален с поверхности путем инкубации в 1 М NaCl. В буфере низкой ионной силы наблюдалась сильная адсорбция d-2B4 на немодифицированную АС-подложку, обусловленная как электростатическими, так и гидрофобными взаимодействиями, и белок был удален с АС-поверхности только с помощью 2% Ch.

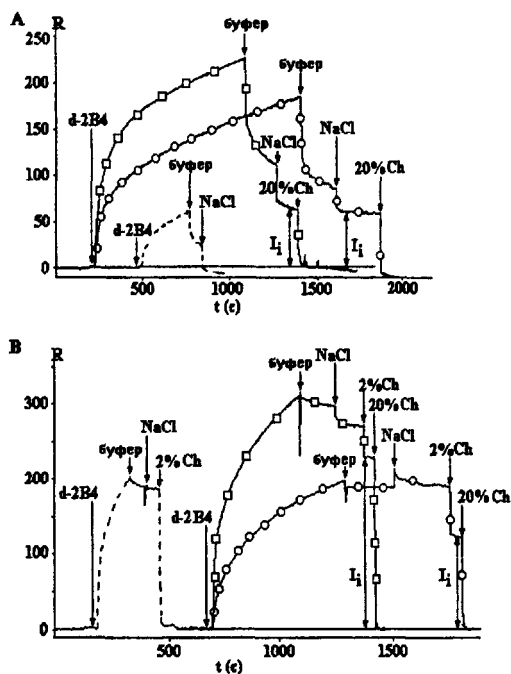


Рис. 5. Связывание d-2B4 с ДЛФЭ (-○-) и ДСФЭ (-□-). Инкубационная смесь содержала 500 мМ (А), 25 мМ (В) КФБ/Е. Стрелками указано добавление 0,25 мкМ d-2B4 в соответствующем буфере. Другие обозначения такие же, как на рис. 3.

Такое поведение d-2B4 существенно отличается от поведения двух других изученных белков, которые легко десорбировались с АС-поверхности при инкубации либо в КФБ/Е, либо в 1 М NaCl. Если для удаления 2B4, встроенного в ДЛФЭ или в ДСФЭ, использовать 2% Ch (т. е. такую концентрацию холата натрия, которая позволяет удалить весь белок с немодифицированной подложки), то с фосфолипидной поверхности удалялось не более 30% белка. Весь белок удалялся только при концентрации холата натрия 20%. Это означает, что гидрофобные взаимодействия d-2B4 с фосфолипидным слоем гораздо сильнее, чем его адсорбция на немодифицированной поверхности, и, следовательно, происходит встраивание 2B4 в фосфолипидный слой.

Взаимодействие водорастворимых белков с фосфолипидными слоями

Водорастворимые белки обладают меньшей гидрофобностью, чем мембранные, и поэтому можно предположить, что их взаимодействие с гидрофобными фосфолипидными слоями будет слабее, чем взаимодействие мембранных белков. Изучено взаимодействие с фосфолипидными слоями трех водорастворимых белков: Ad, P450_{cat} и альбумина. Известно, что адренодоксин - отрицательно заряженный белок, взаимодействующий со своими редокс-партнерами, включая P450_{scs}, путем электростатических взаимодействий (Coghlan and Vickery, 1991). На рис. 6 показано отсутствие связывания Ad с ДЛФЭ и с ДСФЭ как в 500 мМ, так и в 25 мМ КФБ.

Взаимодействие P450_{cat} с немодифицированной АС-подложкой и с липидными слоями представлено на рис. 6. После адсорбции на немодифицированную АС-поверхность в 500 мМ КФБ белок десорбировался 1 М NaCl, в то время как в 25 мМ КФБ он десорбировался только 2% Ch. В 500 мМ КФБ, P450_{cat} адсорбировался на ДЛФЭ и ДСФЭ слоях и его полная десорбция наблюдалась лишь в 2% Ch. В буфере низкой ионной силы десорбция этого белка с ДЛФЭ слоя и с немодифицированной АС-поверхности достигалась с помощью 2% Ch, а на ДСФЭ (фосфолипид с более длинными ацильными цепями) P450_{cat} не адсорбировался. Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что связывание P450_{cat} с липидными слоями зависит от типа используемого фосфолипида и определяется не только электростатическими, но и гидрофобными взаимодействиями.

Альбумин - водорастворимый белок, способный связываться со многими гидрофобными соединениями (Jakoby et al., 1995). Этот белок связывался с ДЛФЭ и в 500 мМ, и в 25 мМ КФБ. Связывание было обратимым - белок легко десорбировался при инкубации в 1 М NaCl. Связывания альбумина с ДСФЭ не наблюдалось. Хотя альбумин является водорастворимым белком, его связывание с фосфолипидным слоем зависело от длины ацильных цепей фосфолипида; оно наблюдалось для фосфолипида с более короткими ацильными цепями. Взаимодействие альбумина с немодифицированной АС-подложкой

существенно зависело от ионной силы буфера. В условиях высокой ионной силы белок десорбировался буфером, тогда как в 25 мМ КФБ его взаимодействие имело гидрофобную природу, так как отсутствовала десорбция альбумина при инкубации в 1 М NaCl, полная десорбция наблюдалась только в 2% Ch.

Таким образом, водорастворимые белки или не адсорбировались на поверхности фосфолипида (Ad), или адсорбировались только за счет электростатических взаимодействий (альбумин), или за счет электростатических и гидрофобных взаимодействий (P450сат). Причем адсорбция водорастворимых белков была больше в случае фосфолипида с меньшей длиной ацильной цепи.

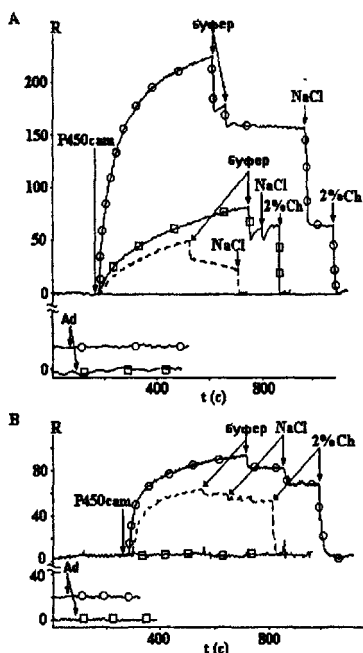


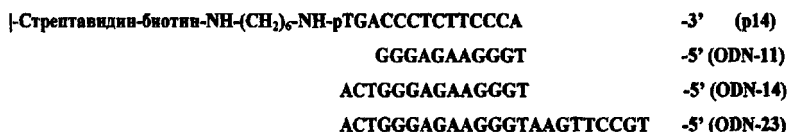
Рис. 6. Связывание водорастворимых Ad и P450сат с иммобилизованными на АС-поверхности ДЛФЭ (-o-) и ДСФЭ (-□-). Инкубационная смесь содержала 500 мМ (А), 25 мМ (В) КФБ. Стрелками указано добавление 0,25 мкМ Ad и 0,25 мкМ P450сат в соответствующем буфере. Другие обозначения такие же, как на рис. 3.

Исследование кинетики образования и распада олигонуклеотидных дуплексов

(p14)-(ODN-11) и (p14)-(ODN-14)

В данном разделе продемонстрировано применение оптического биосенсора для определения кинетических параметров взаимодействия олигонуклеотид-олигонуклеотид. Специфичная к последовательности модификация одно- и двухцепочечных нуклеиновых кислот реакционноспособными производными олигонуклеотидов, способными образовывать соответствующие дуплексы и триплексы, - один из наиболее перспективных вариантов антисмыслового подхода к регуляции экспрессии генов (Кнопте and Vlassov, 1985). Олигонуклеотиды и их производные могут быть направлены на матричные РНК с целью ингибирования процесса трансляции, а также на вирусные РНК или одноцепочечные ДНК для контроля процессов репликации или транскрипции.

Биотинилированный 14-мерный дезоксирибонуклеотид **p14**, имеющий ту же нуклеотидную последовательность, что и антисмысловый реагент, использованный ранее (Fedorova et al., 1992), был иммобилизован через стрептавидин на КМД поверхности кюветы одноканального оптического биосенсора, как описано выше. Олигонуклеотиды ODN-11, ODN-14 и ODN-23 комплементарны олигонуклеотиду **p14** и представляют собой регионы ДНК-мишени.



Типичные кривые связывания для дуплексов (p14)-(ODN-14) и (p14)-(ODN-11) представлены на рис. 7. Путем обработки экспериментальных кривых согласно уравнениям (1) и (2) были вычислены кинетические характеристики реакции гибридизации (табл. 6).

Таблица 6. Кинетические константы образования и распада олигонуклеотидных дуплексов.

Комплекс	$k_{on}, M^{-1} \cdot c^{-1}$	k_{off}, c^{-1}
(p14)(ODN-14)	183±162	(4±1)·10 ⁻⁴
(P14)(ODN-11)	219±39	(2,0±0,4)·10 ⁻³

Диссоциация дуплексов (p14)-(ODN-11) характеризуется более высокой константой скорости, чем диссоциация дуплексов (p14)-(ODN-14), что согласуется с относительной стабильностью комплексов. Для ODN-23 не наблюдалось увеличения интенсивности сигнала оптического биосенсора, что свидетельствует об отсутствии ассоциации данного олигонуклеотида с иммобилизованным p14. Этот результат согласуется со способностью нуклеотидной последовательности ODN-23 образовывать стабильную шпильку с выступающим Т и дефектной парой TG в ножке.

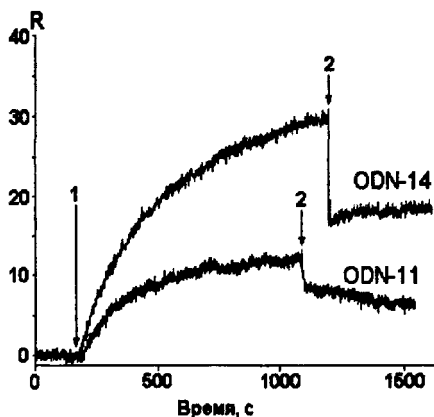


Рис. 7. Типичные кривые связывания для дуплексов (p14)-(ODN-14) и (p14)-(ODN-11). Стрелками обозначены добавки: 1 - $1,81 \cdot 10^{-5}$ М олигонуклеотида ODN-14, $6,91 \cdot 10^{-5}$ М олигонуклеотида ODN-11; 2 - 20 мМ Na_2HPO_4 , 160 мМ NaCl , 1 мМ EDTA, pH 7,5.

Исследование взаимодействия NAD-зависимых дегидрогеназ цитозоля с иммобилизованным 5-аминоизатином

В этом разделе показано применение оптического биосенсора для изучения взаимодействия фермент-низкомолекулярный лиганд. Изатин (индолдион-2,3) - низкомолекулярный эндогенный непептидный регулятор, обнаруженный практически во всех органах, тканях и биологических жидкостях животных и человека (Medvedev et al., 1996; Гловер и др., 1997; Sandier et al., 2000). В данной работе с помощью оптического биосенсора было изучено взаимодействие иммобилизованного 5-аминоизатина с NAD-зависимыми дегидрогеназами цитозоля: глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназой (ГАФД), глицерол-3-фосфатдегидрогеназой (ГФДГ) и лактатдегидрогеназой (ЛДГ).

5-аминоизатин (аналог изатина, сохраняющий биологическую активность в отношении внутриклеточных мишеней: моноаминоксидазы и ANP-стимулируемой гуанилатциклазы (Medvedev et al., 1999)) был иммобилизован на КМД поверхности кюветы одноканального оптического биосенсора (см. Материалы и методы исследования). Для оценки вклада неспецифического связывания были также проведены контрольные эксперименты с КМД кюветой оптического биосенсора без иммобилизованного 5-аминоизатина.

Добавление раствора ГАФД увеличивало амплитуду сигнала биосенсора как в измерительной кювете с иммобилизованным аналогом изатина (рабочая кювета), так и в

контрольной кюветы. Однако уровень сигнала был существенно выше в случае рабочей кюветы. Результирующая кривая, полученная при вычитании сигнала контрольной кюветы из сигнала рабочей кюветы, выявляла специфическое взаимодействие 5-аминоизатиним/ГАФД (рис. 8, кривая 1). В присутствии NAD^+ в концентрации от 1 до 100 мкМ наблюдалось уменьшение интенсивности сигнала (рис. 8). Это свидетельствует о том, что изатин взаимодействует с NAD -связывающим участком фермента.

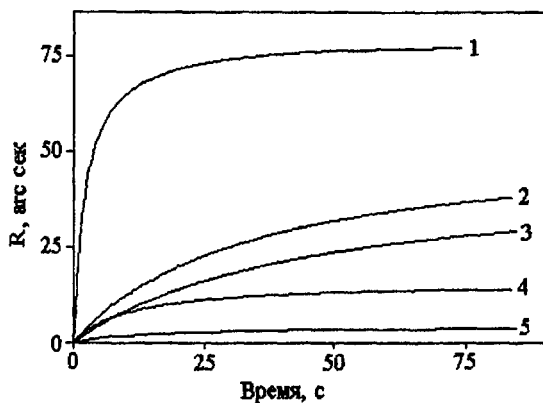


Рис. 8. Ассоциация ГАФД с 5-аминоизатином, иммобилизованным на КМД поверхности кюветы оптического биосенсора, в отсутствие и в присутствии NAD^+ . Кривая 1 соответствует взаимодействию в отсутствие NAD^+ ; кривая 2 соответствует взаимодействию в присутствии 1 мкМ NAD^+ ; 3 – 5 мкМ NAD^+ ; 4 – 50 мкМ NAD^+ ; 5 – 100 мкМ NAD^+ . NAD^+ содержался в рабочем буфере (0,1 М глициновый буфер, pH 8,9) и в добавляемом образце фермента. Концентрация ГАФД во всех случаях составляла 0,3 мкМ. Молярную концентрацию фермента рассчитывали исходя из того, что ГАФД - тетрамер.

Добавление раствора ГФДГ в измерительную кювету с иммобилизованным 5-аминоизатином приводило к появлению характерного ответа, что свидетельствовало о комплексообразовании между ферментом и 5-аминоизатином. При этом величина сигнала биосенсора возрастала с увеличением концентрации добавленного фермента. Взаимодействие ГФДГ с поверхностью контрольной кюветы без иммобилизованного 5-аминоизатина не наблюдалось, что свидетельствует об отсутствии неспецифического связывания в измеряемом диапазоне концентраций фермента. Путем обработки экспериментальных кривых связывания ГФДГ с иммобилизованным 5-аминоизатином

согласно уравнениям (1), (2) были вычислены кинетические параметры образования и распада комплекса 5-аминоизатин_{ин}/ГФДГ. Константы скорости ассоциации (k_{on}) и диссоциации (k_{off}) имели следующие значения: $k_{on}=(6,6\pm0,3)\cdot10^2\text{ M}^{-1}\text{ c}^{-1}$ и $k_{off}=(4,2\pm0,1)\cdot10^{-3}\text{ c}^{-1}$. Величина константы диссоциации $K_D=(6,4\pm0,3)\cdot10^{-6}\text{ M}$ согласуется с литературными данными о взаимодействии других ферментов с низкомолекулярными лигандами (Shaw et al., 2003; Koh et al., 2003). Еще один NAD-зависимый фермент цитозоля скелетных мышц - ЛДГ - не взаимодействует с иммобилизованным аналогом изатина. Это позволяет предположить, что далеко не все растворимые ферменты цитозоля связываются с изатином.

ВЫВОДЫ

1. Определены кинетические константы образования и распада комплексов МКА/HBsAg и HCV-core-Ag/МКА с помощью оптического биосенсора.
2. Оптический биосенсор может быть использован для выявления поверхностного антигена вируса гепатита В и антител к нуклеокапсидному белку вируса гепатита С в сыворотке крови людей.
3. Разработана методика ковалентной иммобилизации фосфатидилэтаноламинов на поверхности кюветы оптического биосенсора.
4. Полноразмерные мембранные белки - цитохром Р450 2В4, цитохром Ы5 и NADPH-цитохром Р450 редуктаза - встраиваются в созданные фосфолипидные слои. Определены константы скорости ассоциации для процессов адсорбции и встраивания, обусловленного гидрофобными взаимодействиями, а также константы скорости диссоциации белок-липидных комплексов: ДЛФЕ_{ин}/d-b5, ДСФЕ_{ин}/ d-b5, ДЛФЕ_{ин}/d-Fp, ДЛФЕ_{ин}/d-2В4, ДСФЕ_{ин}/d-2В4.
5. Оптический биосенсор применен для определения кинетических параметров взаимодействия олигонуклеотид-олигонуклеотид. Вычислены кинетические параметры гибридизации 11-мера TGGGAAGAGGG (ODN-11) и 14-мера TGGGAAGAGGGTCA (ODN-14) с 14-мерным биотинилированным олигонуклеотидом pTGACCTCTTCCCA (p14), иммобилизованным на поверхность декстрановой кюветы через стрептавидин.
6. Глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа и глицерол-3-фосфатдегидрогеназа являются изатин-связывающими белками. Это взаимодействие специфическое, поскольку лактатдегидрогеназа, также NAD-зависимый фермент цитозоля, не взаимодействует с иммобилизованным аналогом изатина. Определены кинетические константы образования и распада комплекса 5-аминоизатин_{ин}/ГФДГ.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО МАТЕРИАЛАМ ДИССЕРТАЦИИ

1. Koval V.V., Gnedenko O.V., Ivanov Yu.D., Fedorova O.S., Archakov A.I., Knorre D.G. Real - time oligonucleotide hybridization kinetics monitored by resonant mirror technique. IUBMB Life, 1999, v. 48, p. 317-320.
2. Archakov A.I., Ivanov Yu.D., Kanaeva I.P., Gnedenko O.V., Kuznetsova G.P., Samenkova N.F. Interactions of membrane-bound and water-soluble proteins of P450-containing systems with phospholipid layers immobilized on the optical biosensor cuvette. 12* International conference on cytochrome P450. Biochemistry, Biophysics and Molecular Biology. September 11-15, 2001. La Grande Motte-France, P 416.
3. Ivanov Y.D., Kanaeva I.P., Gnedenko O.V., Pozdnev V.F., Shumyantseva V.V., Samenkova N.F., Kuznetsova G.P., Tereza A.M., Schmid R.D., Archakov A.I. Optical biosensor investigation of interactions of biomembrane and water-soluble cytochromes P450 and their redox partners with covalently immobilized phosphatidylethanolamine layers. J. Mol. Recognit. 2001, v. 14, p. 185-196.
4. Семенова Н.В., Иванов Ю.Д., Гнеденко О.В., Конев В.А., Ковалев О.Б., Учайкин В.Ф., Морозов С.Г., Арчаков А.И. Диагностика инфекционных заболеваний с помощью оптического биосенсора. Выявление поверхностного антигена вируса гепатита В (HBsAg) методом оптического биосенсора. Новости науки и техники. Аллергия, астма и клиническая иммунология. 2001, № 1, с. 183-185.
5. Иванов Ю.Д., Гнеденко О.В., Конев В.А., Ковалев О.Б., Николаева Л.И., Семенова Н.В., Учайкин В.Ф., Арчаков А.И. Детекция поверхностного антигена вируса гепатита В с помощью оптического биосенсора. Вопросы мед. химии, 2001, т. 47, №4, с. 419-425.
6. Гнеденко О.В., Иванов Ю.Д., Николаева Л.И., Константинова Н.И., Конев В.А., Ковалев О.Б., Говорун В.М., Учайкин В.Ф., Арчаков А.И. Возможности определения поверхностного антигена вируса гепатита В и антител к нуклеокапсидному белку вируса гепатита С с помощью оптического биосенсора. 5-й Конгресс. Современные проблемы аллергологии, иммунологии и иммунофармакологии. 12-14 ноября, 2002, Москва, Россия, с. 334.
7. Иванов Ю.Д., Панова Н.Г., Гнеденко О.В., Бунеева О.А., Медведев А.Е., Арчаков А.И. Исследование тканевого и субклеточного распределения изатин-связывающих белков при помощи оптического биосенсора. Вопросы мед. химии, 2002, т. 48, № 1, с. 73-83.
8. Иванов Ю.Д., Гнеденко О.В., Николаева Л.И., Конев В.А., Ковалев О.Б., Учайкин В.Ф., Говорун В.М., Покровский В.И., Арчаков А.И. Определение поверхностного антигена вируса гепатита В с помощью оптического биосенсора. Журн. микробиол., 2003, №2, с. 58-62.

9. Иванов Ю.Д., Николаева Л.И., Гнеденко О.В., Константинова Н.И., Кузнецов В.Ю., Светлов С.А., Ковалев О.Б., Конев В.А., Говорун В.М., Учайкин В.Ф., Арчаков А.И. Выявление комплексов антиген/антитело методом оптического биосенсора и атомно-силовой микроскопии. П Московский Международный Конгресс. Биотехнология: Состояние и перспективы развития. Биотехнология и медицина. 2003, Москва, Россия, с. 8.
10. Бунеева О.А., Гнеденко О.В., Панова Н.Г., Медведева М.В., Иванов Ю.Д., Медведев А.Е. Глицерол-3-фосфатдегидрогеназа - изатип-связывающий белок цитозоля. Биомедицинская химия, 2003, т. 49, № 6, с. 627-631.
11. Ivanov Yu.D., Gnedenko O.V., Lipov P.A., Moshkovskiy S., Serebryakova M., Archakov A.I. Optical biosensor study of protein complex formation in *proteomics*. 2nd International Conference. Genomics, Proteomics and Bioinformatics for Medicine. 14-19 July, 2004. Moscow - Pies - Moscow, Russia, Abstr. 1.1.4.

Автор признателен сотрудникам лабораторий нанобиотехнологии и митохондриального окисления ГУ НИИ БМХ РАМН за поддержку при выполнении данной работы. Автор благодарен сотрудникам кафедры детских инфекционных болезней РГМУ к.м.н. В.А. Коневу и к.м.н. О.Б. Ковалеву, а также сотруднику Института полимиелита и вирусных энцефалитов РАМН к.б.н. Л.И. Николаевой за большую помощь в проведении экспериментов с сыворотками крови людей. Автор благодарен зав. лабораторией биохимии аминов и циклических нуклеотидов ГУ НИИ Биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича РАМН д.б.н. А.Е. Медведеву и сотруднику этой лаборатории к.б.н. О.А. Бунеевой за большую помощь в проведении экспериментов с NAD-зависимыми дегидрогеназами цитозоля.

Проведенные исследования поддержаны Межведомственной научно-технической программой "Вакцины нового поколения и медицинские диагностические системы будущего", грантами РФФИ №99-04-48081, №01-04-48245, №03-0448244.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

k_{on} - константа скорости ассоциации

k_{off} - константа скорости диссоциации

K_A - константа ассоциации (константа аффинности)

K_D - константа диссоциации

КМД - (карбоксиметил)декстран

БСА - бычий сывороточный альбумин

HBsAg - поверхностный антиген вируса гепатита В

HCV-core-Ag - нуклеокапсидный белок вируса гепатита С

anti-HBs - антитела к поверхностному антигену вируса гепатита В

anti-core - антитела к нуклеокапсидному белку вируса гепатита С

МКА - моноклональные антитела

ВГВ - вирус гепатита В

ВГС - вирус гепатита С

d-2B4 - полноразмерный цитохром P450 2B4

d-Fp - полноразмерная NADPH- зависимая цитохром P450 редуктаза

t-Fp - лишенная трансмембранного сегмента (укороченная) NADPH- зависимая цитохром P450 редуктаза

d-b5 - полноразмерный цитохром b5

t-b5 - лишенный трансмембранного сегмента (укороченный) цитохром b5

Ad - адренодоксин

P450саш - цитохром P450саш

ДЛФЭ - дилауроилфосфатидилэтаноламин

ДСФЭ - дистеароилфосфатидилэтаноламин

NADPH - никотинамидадениндинуклеотидфосфат восстановленный

NAD - никотинамидадениндинуклеотид

ГАФД - глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа

ГФДГ - глицерол-3-фосфатдегидрогеназа

ЛДГ - лактатдегидрогеназа

NHS - N-гидроксисукцинимид

EDC - 1-этил-3[(3-диметиламино)пропил]карбодимид

КФБ - К-фосфатный буфер

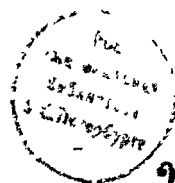
КФБ/Е - К-фосфатный буфер, содержащий 0,25 г/л Эмульгена 913

Принято к исполнению 20/05/2005
Исполнено 23/05/2005

Заказ № 893
Тираж 100 экз

0 0 0 «11-й ФОРМАТ» ИНН 7726330900
Москва, Балаклавский пр-т, 20-2-93
(095)747-64-70
www.autoreferat.ru

15 MAR 2005



274