

**КАЗАНСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
ИНСТИТУТ ФУНДАМЕНТАЛЬНОЙ МЕДИЦИНЫ И БИОЛОГИИ
Кафедра биохимии, биотехнологии и фармакологии**

В.В. ЧАСОВ, Э.Р. БУЛАТОВ, А.А. РИЗВАНОВ

**ПРИМЕНЕНИЕ БИОСЕНСОРА VIACORE T200
ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ МЕЖМОЛЕКУЛЯРНЫХ
ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ**

Учебно-методическое пособие

КАЗАНЬ

2019

УДК 621.383(075.8)

ББК 22.34я7

Ч24

*Печатается по рекомендации учебно-методической комиссии
Казанского (Приволжского) федерального университета
(протокол № 2 от 15.10.2018 г.)*

Рецензенты:

научный сотрудник ИОФХ ФИЦ КазНЦ РАН,
кандидат химических наук **А.А. Загидуллин**;
доцент кафедры генетики ИФМиБ КФУ,
кандидат биологических наук **А.Р. Каюмов**

Часов В.В.

Ч24 **Применение биосенсора Viacore T200 для исследования межмолекулярных взаимодействий:** учеб.-метод. пособие / В.В. Часов, Э.Р. Булатов, А.А. Ризванов. – Казань: Изд-во Казан. ун-та, 2019. – 28 с.

Технология оптических биосенсоров, работающих на эффекте поверхностного плазмонного резонанса (ППР), в настоящее время становится одним из основных подходов при исследовании разнообразных межмолекулярных взаимодействий как в фундаментальных, так и в прикладных работах, поскольку имеет очень высокую точность, воспроизводимость и чувствительность. Она носит универсальный характер и позволяет регистрировать взаимодействия между практически любыми молекулярными объектами в широком диапазоне концентраций без использования каких-либо меток или сопряженных процессов.

Настоящее учебно-методическое пособие адресовано, в первую очередь, студентам, аспирантам и преподавателям таких специальностей, как Б1.В.02 «Методы исследования в биологии и медицине», Б1.В.ДВ.2 «Методы клеточной и молекулярной биологии», а также широкому кругу читателей, интересующихся указанными дисциплинами.

УДК 621.383(075.8)

ББК 22.34я7

© Часов В.В., Булатов Э.Р., Ризванов А.А., 2019

© Издательство Казанского университета, 2019

СОДЕРЖАНИЕ

Введение.....	4
Физические основы явления поверхностного плазмонного резонанса (ППР), используемого для измерения межмолекулярных взаимодействий с помощью биосенсора Viacore T200.....	5
Технические возможности биосенсора Viacore T200.....	9
Стандартные модели, используемые при анализе кинетических данных, полученных на приборе Viacore T200.....	14
Сменные сенсорные чипы, используемые в Viacore T200.....	15
Источники возможных ошибок при использовании Viacore T200.....	18
Применение биосенсора Viacore T200 для исследования межмолекулярного взаимодействия мутантного онкосупрессора p53-Y220C с низкомолекулярным реактиватором MB725.....	20
Лабораторная инфраструктура, необходимая для экспериментов с использованием биосенсора Viacore T200.....	23
Литература.....	24

ВВЕДЕНИЕ

Явление поверхностного плазмонного резонанса (ППР) является базовым принципом, на котором основано действие оптических биосенсоров, в настоящее время находящих все более широкое применение для исследования разнообразных межмолекулярных взаимодействий. Этот подход отличается от многих обычных методов тем, что он может измерять взаимодействие за короткое время, имея небольшое количество образца, без использования каких-либо меток или сопряженных процессов. Метод позволяет определять не только аффинность в равновесных условиях (константа диссоциации K_d , константа сродства A), но также кинетические параметры, характеризующие скорость реакции, то есть константу скорости ассоциации k_{on} и скорость диссоциации k_{off} . Среди представителей серийно производимых биосенсоров наиболее успешными оказались приборы системы Biacore (Швеция), в настоящее время – подразделение GE Healthcare (США). Биосенсоры Biacore отличает очень высокая точность, воспроизводимость и чувствительность, что и обуславливает их все нарастающее применение, как в фундаментальных, так и в прикладных исследованиях. Настоящее учебно-методическое пособие представляет собой обзор физических основ метода, конструктивных особенностей и технических возможностей одного из новейших биосенсоров из линейки системы Biacore – Biacore T200, а также содержит пример практического использования прибора в биомедицинских исследованиях.

Издание адресовано студентам, аспирантам, научным сотрудникам, работающим или планирующим научную работу в области молекулярной биологии, биохимии, биофизики, занимающихся исследованиями межмолекулярных взаимодействий, а также широкому кругу специалистов, интересующихся данной проблемой.

Физические основы явления поверхностного плазмонного резонанса (ППР), используемого для измерения межмолекулярных взаимодействий

Віасоре T200 представляет собой высокочувствительную автоматическую систему для изучения межмолекулярных взаимодействий без применения каких-либо меток. Прибор использует явление поверхностного плазмонного резонанса (ППР), возникающего на границе раздела двух фаз с разными диэлектрическими свойствами. В физике поверхностный плазмон – это квантованная коллективная осцилляция электронов у поверхности материала, выражающаяся в возникновении флуктуаций плотности заряда. Плазму свободных электронов можно рассматривать как колебательную систему, свойства которой определяются концентрацией носителей заряда и их эффективной массой. Такая колебательная система может взаимодействовать с падающей на неё электромагнитной волной, переводя её энергию в энергию колебаний электронов плазмы, реализуя тем самым явление поверхностного плазмонного резонанса (ППР). Возникающие при этом волны электронной плотности называются поверхностными резонансными плазмонами.

Рассмотрим простейшую систему. Луч света преломляется при прохождении границы двух сред с разными оптическими свойствами (рис. 1а). В условиях, когда угол падения превышает некоторый критический угол, можно добиться эффекта полного внутреннего отражения (рис. 1б).

Условием возникновения полного внутреннего отражения является переход света из оптически более плотной среды в оптически менее плотную (например, стеклянная призма и жидкость). Проходящий через стеклянную призму свет становится монохроматическим и плоскополяризованным. Когда отражающая поверхность (граница раздела двух фаз) покрыта тонкой металлической пленкой (как правило, золотом) при полном внутреннем отражении падающего луча света вдоль отражающей поверхности распространяется электромагнитная волна, скорость которой зависит от угла падения. Если при определенном угле падения, большем, чем угол полного внутреннего отражения

(рис. 1в, сплошная линия стрелки), скорость этой волны совпадет со скоростью поверхностного плазмона на поверхности металла, условия полного внутреннего отражения нарушатся, и возникнет поверхностный плазмонный резонанс. Энергия фотонов в этом случае расходуется на создание этих волн, и поэтому интенсивность отраженного света будет резко уменьшена. Таким образом, резонансным углом называется угол отражения, при котором интенсивность света является минимальной.

Поскольку электрическое поле плазмонов выходит за границы раздела и взаимодействует с материалом двух фаз (рис. 1г), позволяя заглянуть в жидкую фазу, за «зеркало», подвижность плазмонов, а, следовательно, и величина резонансного угла, также зависят от этих взаимодействий.

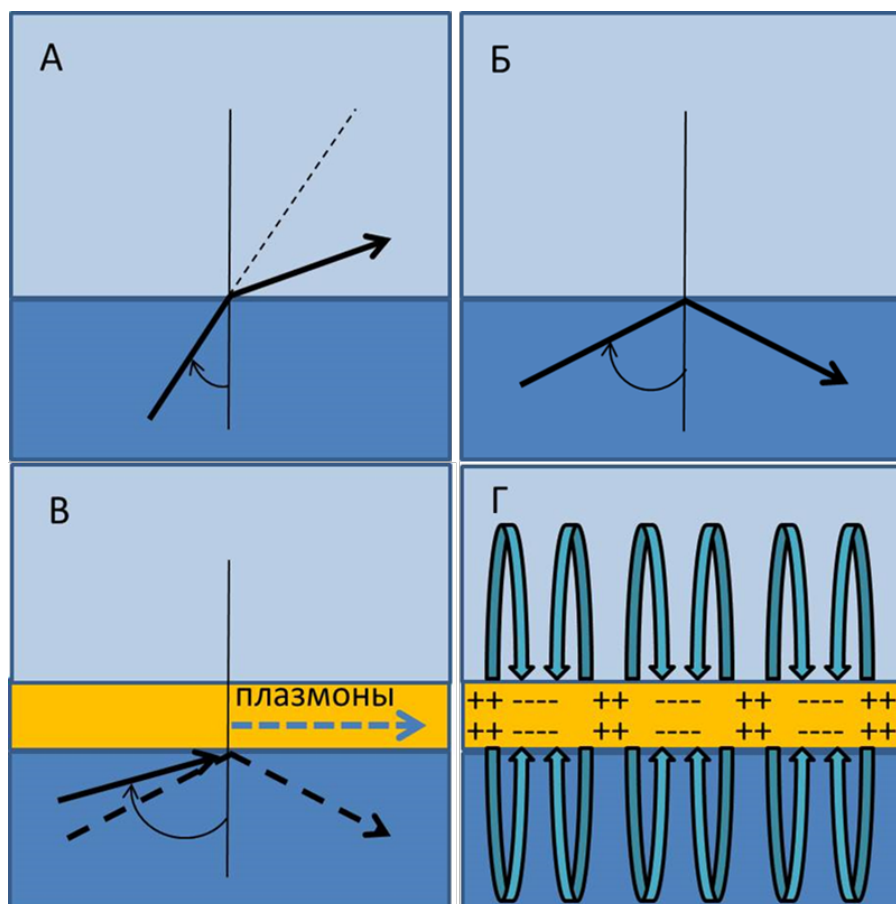


Рис. 1. Эффект поверхностного плазмонного резонанса (ППР): а – преломление луча света на границе раздела двух фаз; б – эффект полного внутреннего отражения света на границе раздела фаз; в – возникновение плазмонов при резонансе между квантами света и свободными электронами в металле; г – электростатическое (эванесцентное) поле плазмонов

Резонансный угол, при котором наблюдается нарушение полного внутреннего отражения, выражается в относительных величинах, «RU» (resonance unit, резонансная единица), а график зависимости этой величины от времени протекания процесса, называется «сенсограммой». Отслеживая изменение этого угла, можно регистрировать массоперенос любых веществ в тонком слое жидкой среды. Данный принцип и реализован в приборе Biacore T200, где диодная матрица непрерывно контролирует интенсивность отраженного света в широком диапазоне углов при неизменной длине волны испускаемого света (760 нм). Благодаря чувствительности к массопереносу веществ в тонком слое жидкой среды на границе раздела двух фаз, прибор Biacore T200 называют еще биосенсором. Производитель предлагает целую линейку приборов семейства Biacore, различающихся по производительности и чувствительности.

Значение угла ППР зависит от показателя преломления поверхности раздела и ее непосредственного окружения на расстоянии примерно в несколько сотен нанометров. Этот показатель преломления будет изменяться по мере того, как макромолекулы адсорбируются на поверхности, изменяя, в свою очередь, угол, при котором происходит ППР (рис. 2). Поскольку существует линейная зависимость между количеством материала, связанного с поверхностью, и изменением угла ППР, это можно использовать для расчета количества вещества, связанного с поверхностью. Например, связывание одного пикограмма белка с поверхностью в 1 мм^2 вызывает сдвиг в 1 RU на регистрируемой сенсограмме, что соответствует сдвигу угла, при котором наблюдается максимум плазмонного резонанса, на $0,0001^\circ$.

Таким образом, Biacore T200 позволяет изучать взаимодействие биологических молекул в реальном времени, предлагая полный набор инструментов для обработки и оценки полученных данных. В биосенсорной технологии используется химическая терминология, когда любой прикрепленный к поверхности объект называется лигандом, а взаимодействующий с ним свободно плавающий объект называется аналитом.

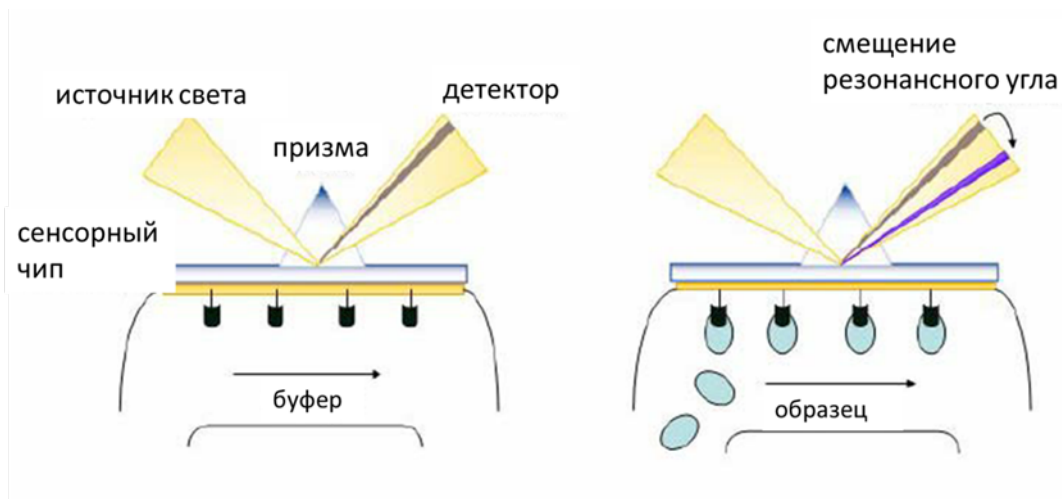


Рис. 2. Принцип измерения резонансного угла, реализованный на биосенсоре Biacore T200

В качестве лиганда и аналита могут быть использованы любые молекулярные объекты – от низкомолекулярных веществ до биополимеров и даже более крупные объекты типа вирусов, бактерий и клеток.

Уменьшение интенсивности отраженного света регистрируется линейкой фотодиодных детекторов прибора в реальном времени. Это позволяет исследовать быстропеременные процессы, в частности, кинетические реакции.

На рис. 3, в показаны основные этапы классической сенсограммы:

I – запись базового сигнала биосенсора до начала измерения; II – кинетика образования комплексов «лиганд–аналит» при инъекции раствора аналита через измерительный канал (1); III – кинетика распада комплексов после окончания инъекции аналита и перехода на рабочий буфер (2); IV – быстрое разрушение комплексов и очистка поверхности чипа при инъекции регенерирующего раствора (3); V – запись базового сигнала биосенсора после цикла измерения по окончании инъекции регенерирующего раствора и переходе на рабочий буфер (2)

Анализ сенсограмм, полученных в ходе регистрации сигнала ППР биосенсора в режиме реального времени, позволяет вычислить равновесные характеристики межмолекулярных взаимодействий: аффинность (A) и константу диссоциации (K_d) образующихся комплексов, а также кинетические параметры:

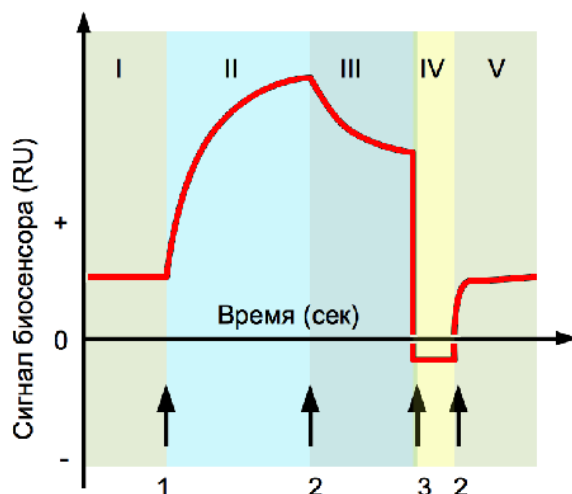


Рис. 3. Структура типичной сенсограммы

константы скоростей образования (k_{on}) и распада комплексов (k_{off}). Из серий сенсограмм, полученных при разных температурах, могут быть также вычислены термодинамические характеристики – изменение свободной энергии Гиббса (ΔG), изменение энтальпии (ΔH) и энтропии (ΔS).

Технические возможности биосенсора Biacore T200

Biacore T200 (Biacore, Швеция, в настоящее время – подразделение GE Healthcare, США) представляет собой автоматический прибор (рис. 4), содержащий в качестве основного модуля 4х-канальную микрожидкостную



Рис. 4. Биосенсор Biacore T200

систему, каналы которой могут быть использованы как по отдельности, так и совместно при параллельном или при последовательном прохождении раствора через них (рис. 5). Четыре детекторные проточные ячейки (кюветы) служат местом контакта со сменными сенсорными чипами (будут рассмотрены ниже), содержащими золотую пластинку, модифицированную таким образом, чтобы обеспечить иммобилизацию на поверхности пластинки лиганда с помощью той или иной химической группы в зависимости от типа чипа.

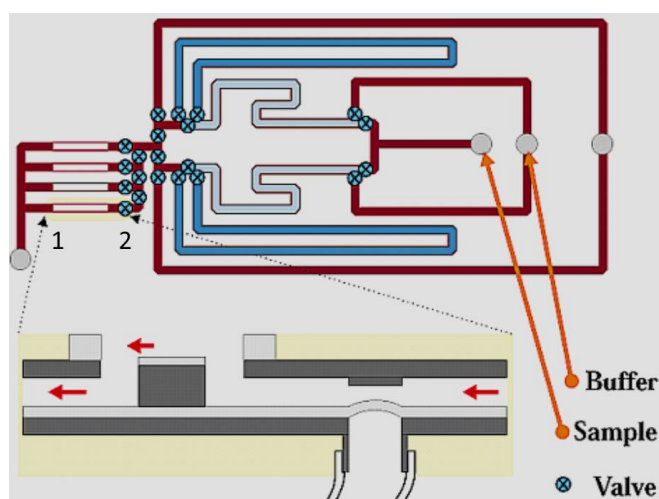


Рис. 5. Микрожидкостная система в приборе Biacore T200.

Стрелками обозначены: четыре проточные нанокюветы (по 60 нл) (1);
пневмо-гидравлические микроклапана (2)

Прибор также включает в себя насос для поддержания постоянной скорости протекания через чип, детекторный блок с оптическими и электронными компонентами для создания и измерения ППР, и микропроцессоры для считывания сигнала, управления насосом, клапанами, обеспечивая автоматическую работу прибора. Для введения образца имеется петля, вмещающая до 350 мкл раствора. Все основные технические характеристики прибора представлены ниже в таблице.

Технические возможности биосенсора Biacore T200

Технология	Поверхностный плазмонный резонанс
Определяемые параметры	Кинетика и аффинность (K_d , k_{on} , k_{off}) специфичность, селективность, концентрация, термодинамика
Способ представления данных	Таблицы, графики и сенсограммы в реальном времени
Продолжительность одного цикла анализа	От 2 до 15 минут
Автоматизация	48 часов работы в автономном режиме
Тип анализата	От низкомолекулярных веществ до высокомолекулярных белков, а также ДНК, РНК, полисахариды, липиды, клетки и вирусы в различном окружении (ДМСО содержащие буферы, а также плазма и сыворотка крови)
Объем петли автосамплера	От 2 до 350 мкл
Скорость потока	От 1 до 100 мкл/мин
Объем проточной ячейки	0,06 мкл
Высота проточной ячейки	40 мкм
Вместимость штатива с образцами	96 или 384-луночная микропланшета или 33 виалы
Температурный диапазон	От 4 °С до 45 °С (максимум 15 °С ниже температуры окружающей среды)
Диапазон показателя преломления света	От 1.33 до 1.40

Система подачи буферных растворов	Автоматическое переключение между 4 буферами
Константа ассоциации (k_{on})	белки: от 10^3 до $3 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ сек}^{-1}$ низкомолекулярные соединения: от 10^3 до $5 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ сек}^{-1}$
Константа диссоциации (k_{off})	От 10^{-5} до 1 сек^{-1}
Концентрация аналита	$\geq 10 \text{ пМ}$
Молекулярный вес аналита	Отсутствие нижнего предела для органических молекул
Количество проточных ячеек	4
Шум базовой линии	$< 0.03 \text{ RU (RMS)}$
Дрейф базовой линии	$< 0.3 \text{ RU/мин}$

Программное обеспечение прибора представлено тремя отдельными программами: программой для получения сенсограмм и обслуживания прибора «BIAControl Software», программой для обработки и обсчета данных в виде сенсограмм «BIAEvaluation Software» и программой для моделирования экспериментов с заданными параметрами взаимодействия веществ «BIASimulation Software».

Программа «BIAControl Software» обладает набором встроенных процедур для иммобилизации лигандов с возможностью сохранения пользовательских методов, набором стандартных операций для работы и обслуживания прибора, позволяющих управлять формированием сенсограмм, скоростью потока, температурой измерения, состоянием микрожидкостной системы и скоростью сбора данных в режиме реального времени, а также автоматически фиксировать начало и окончание инъекции, ставить отметки на сенсограммах и др.

Программа «BIAEvaluation Software» позволяет рассчитывать равновесные и кинетические параметры с помощью математической обработки серии сенсограмм, проводить концентрационные измерения.

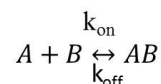
Программа «BIASimulation Software» создана для облегчения интерпретации получаемых данных, выбора моделей для оценки взаимодействия реагирующих веществ. Программа позволяет создавать ожидаемые сенсограммы в определенных экспериментальных условиях, проводить анализ кинетических параметров во время связывания и диссоциации аналита при гетерогенности лиганда и аналита, а также при наличии нескольких центров связывания на исследуемом лиганде.

Сенсограммы, полученные с помощью программы «BIAControl Software», по окончании эксперимента автоматически открываются в программе «BIAEvaluation Software» для их дальнейшей обработки и проведения расчётов. Каждая сенсограмма позволяет определить соответствующие кинетические константы образования комплекса (k_{on}) и его диссоциации (k_{off}). Однако в большинстве случаев, наибольший интерес для исследователя представляет отношение этих констант: равновесная константа сродства (аффинности) и обратная ей равновесная константа диссоциации, которые характеризуют прочность образуемого комплекса (рис. 6). Расчет этих величин на основе сенсограммы, полученной при единственной концентрации аналита, может дать недостаточно достоверные данные, особенно в тех случаях, когда используемая концентрация значительно отличается от равновесной константы диссоциации (K_d).

Обратимая реакция комплексообразования:

Константа скорости ассоциации – K_{on} ($M^{-1} \cdot c^{-1}$)

Константа скорости диссоциации – K_{off} (c^{-1})



Скорость ассоциации:

$$\frac{d[AB]}{dt} = k_{on} \cdot [A] \cdot [B]$$

Скорость диссоциации:

$$-\frac{d[AB]}{dt} = k_{off} \cdot [AB]$$

Равновесие:

$$k_{on} \cdot [A] \cdot [B] = k_{off} \cdot [AB]$$

Равновесная константа диссоциации:

$$K_d = \frac{[A] \cdot [B]}{[AB]} = k_{off} / k_{on} \cdot [AB] \quad (M)$$

Аффинность:

$$A = 1 / K_d = \frac{[AB]}{[A] \cdot [B]} = \quad (M^{-1})$$

Рис. 6. Кинетические параметры взаимодействия лиганда и аналита, определяемые с помощью программного обеспечения прибора Biacore T200

На результат также может повлиять наличие некоторых примесей в исследуемом образце, дрейф базовой линии и различные неспецифические взаимодействия. Исходя из этого, при расчете кинетических и равновесных параметров необходимо использовать сразу несколько сенсограмм, полученных при различных концентрациях аналита. Как правило, для этого бывает достаточно обчислить 5–6 сенсограмм с концентрациями, лежащими в диапазоне $\pm 10K_d$ (рис. 7).

Стандартные модели, используемые при анализе данных, полученных с помощью биосенсора Biacore T200

При математической обработке сенсограмм с помощью программы «BIAEvaluation Software» можно использовать несколько стандартных моделей:

- простое взаимодействие: $A + V = AV$ (A – аналит, V – лиганд) (наиболее часто используемая модель)

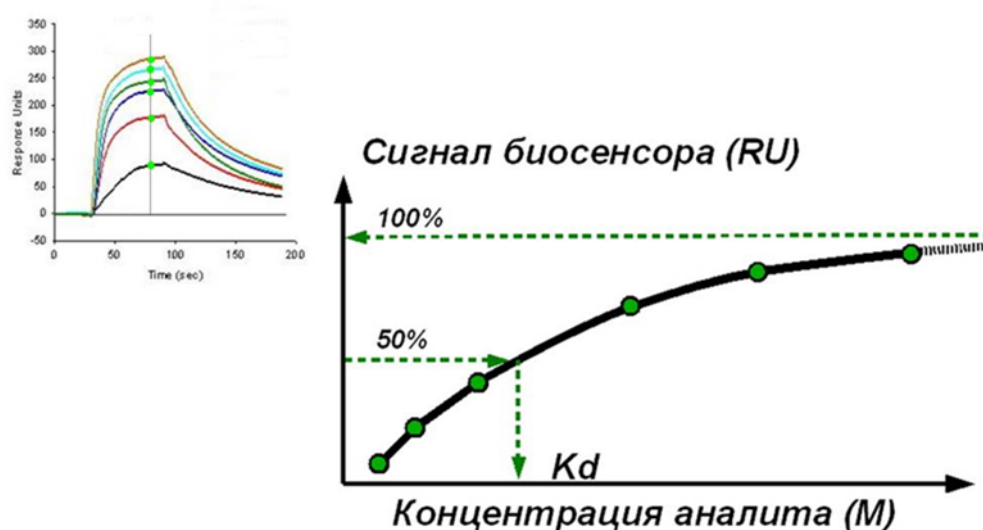


Рис. 7. Принцип определения K_d (равновесная модель) с помощью нескольких сенсограмм, полученных при различных концентрациях аналита

- бивалентный аналит: $A + V = AV$, $AV + V = AV_2$ (первоначально полученный комплекс взаимодействует далее со второй молекулой лиганда, образуя комплекс AV_2);

- гетерогенный аналит (конкурирующие реакции): $A1 + B = A1B$; $A2 + B = A2B$ ($A1$ и $A2$ – два разных аналита) (используется для анализа конкурентного взаимодействия двух разных веществ, различающихся по молекулярной массе)
- гетерогенный лиганд – параллельные реакции: $A + B1 = AB1$; $A + B2 = AB2$ ($B1$ и $B2$ – разные лиганды, присоединенные к поверхности чипа) (иммобилизованный лиганд, чаще всего белок, содержит примеси)
- двустадийная модель или модель с конформационной перестройкой комплекса: $A + B = AB = AB^*$

Согласно последней модели, которая часто лучше других описывает экспериментальные данные, образовавшийся комплекс претерпевает конформационные изменения, влияющие на параметры записываемой сенсограммы. Для простоты расчета модель предполагает, что диссоциация аналита может происходить только из комплекса AB , что может являться в ряде случаев чрезмерным упрощением. Необходимо понимать, что соответствие данных этой модели само по себе не является доказательством конформационных изменений, поэтому необходимо подтверждение таких изменений другими методами.

Сменные сенсорные чипы, используемые в Biacore T200

Для реализации конкретной экспериментальной задачи производитель прибора разработал ряд стандартных оптических чипов с разной модификацией золотого слоя, адаптированного для присоединения разнообразных групп исследуемых лигандов. Краткая характеристика чипов, включая их применение, приведена ниже в таблице.

Чипы, используемые в биосенсоре Biacore T200

Чип	Тип поверхности	Применение
CM5	Карбоксиметил-декстран (CM-декстран)	Присоединение различных лигандов, используя их аминогруппы
CM4	Низкий уровень карбоксилирования декстрана, чем CM5	Для уменьшения неспецифического связывания
CM3	Укороченный карбоксилированный декстран, чем CM5	Присоединение больших молекул и частиц
CM7	Более высокий уровень карбоксилирования декстрана по сравнению с CM5	Для повышения уровня иммобилизации
C1	Плоская карбоксилированная поверхность без декстранового матрикса	Для тех случаев, когда декстран участвует в неспецифическом взаимодействии с аналитом
SA	CM-декстран с иммобилизованным стрептавидином	Для иммобилизации любых биотинилированных лигандов (ДНК, белков, липидов)
CAP	Поверхность, покрытая ДНК-олигонуклеотидами, способными связываться с антисенс-олигонуклеотидами, модифицированными стрептавидином	Для обратимой иммобилизации биотинилированных лигандов
NTA	CM-декстран с иммобилизованной нитрилоуксусной кислотой (NTA)	Присоединение лигандов с his-tag
L1	Липофильно модифицированный (гидрофобизированный) CM-декстран	Присоединение липосом, мицелл, внутриклеточных частиц и поддерживаемых липидных бислоев
HRA	Плоская гидрофобная поверхность	Получение липидных монослоев
Au	Плоская золотая поверхность	Иммобилизация лиганда на поверхности золота; создание химических покрытий собственного дизайна

Наибольшую популярность приобрели чипы с декстрановым покрытием, модифицированным для взаимодействия с различными химическими группами. Толщина декстранового слоя для большинства чипов составляет около 100 нм, что эквивалентно расстоянию, на которое распространяется затухающее поле поверхностных плазмонов (рис. 8). Наличие декстранового слоя с гибкими цепочками полисахаридов, обеспечивает пространственный объем для иммобилизации лиганда, поскольку молекулы, присоединенные к декстрану на разном расстоянии от поверхности, сохраняют достаточную степень подвижности. К недостаткам карбоксилированного декстрана относится его заряженность, что может препятствовать присоединению многих лигандов, а также служить объектом для неспецифического связывания. Поэтому необходимым этапом работы является проверка связывания аналита с поверхностью декстранового слоя, свободного от лиганда, а также с иммобилизованным лигандом, заведомо не взаимодействующим с этим аналитом в качестве контрольных экспериментов.

В процессе иммобилизации используются ковалентные реакции (чипы CM3, CM4, CM5, CM7, C1), нековалентное взаимодействие (чипы SA, NTA), а также липофильное взаимодействие (чипы L1, HPA).

Для иммобилизации белков удобнее всего использовать чипы группы CM. При этом аминогруппа белков взаимодействует с карбоксильной группой декстрана в ходе карбодиимидной реакции. Данная реакция требует соблюдения определенных условий:

- буфер, в котором находится раствор белка-лиганда, не должен содержать соединений с открытой аминогруппой (примесные белки в большом количестве, органические соединения, например Tris), поскольку аминогруппы будут конкурировать с белком за места связывания на поверхности чипа
- буфер, используемый для иммобилизации белка-лиганда, должен иметь pH ниже изоэлектрической точки белка (pI), что обеспечит ему положительный заряд и электростатическое взаимодействие с карбоксилированной поверхностью чипа, поскольку она имеет отрицательный заряд, тем самым создав высокую концентрацию белка у поверхности чипа

- раствор белка-лиганда в иммобилизационном буфере должен иметь достаточно низкую ионную силу

Чип SA обеспечивает прочное присоединение лиганда за счет крайне высокой константы связывания биотина к стрептавидину, в то время как нековалентная иммобилизация с помощью NTA намного менее стабильна. Достаточно часто при использовании NTA-чипа в процессе исследования происходит медленное отсоединения лиганда от поверхности чипа, что вызывает заметный дрейф базовой линии. Особого внимания также заслуживает работа с чипом L1, требующим независимого контроля за образованием липидного бислоя.

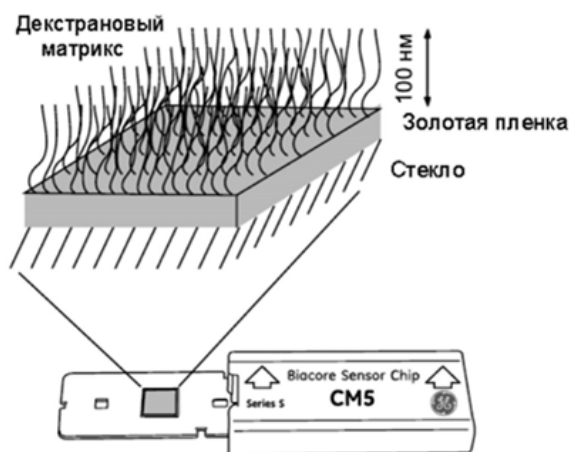


Рис. 8. Схема оптических сенсорных чипов с декстрановым слоем, применяемых в биосенсоре Biacore T200

Условия технического обслуживания и корректной работы биосенсора Biacore T200

Так как исследование межмолекулярных взаимодействий подразумевает введение в микрожидкостную систему биосенсора биологических молекул, прежде всего, белков, ДНК, в широком диапазоне концентраций, разработчиками рекомендовано использование рабочего буфера, в состав которого входит детергент – 0,005 % сурфактант P20 (Tween-20) для предотвращения неспецифического связывания исследуемых веществ с рабочей поверхностью капилля-

ров. Для безотказной работы прибора также необходимо проведение определенного технического обслуживания, которое включает процедуру десорбции, заключающуюся в периодической очистке поверхности капилляров системы от поверхностно активных молекул, а также дезинфекции системы для очистки от возможного микробиологического загрязнения. В программе «VIAControl Software» заложена функция периодического напоминания о необходимости провести ту или иную процедуру обслуживания прибора.

Несмотря на высокую точность и чувствительность биосенсора при соблюдении всех рекомендаций и процедур обслуживания, тем не менее, не всегда удается достичь высокого качества экспериментальных данных. Источником возможных ошибок может служить скорость перемещения аналита вдоль поверхности связывания с лигандом в том случае, если она значительно медленнее скорости связывания. Этот эффект приводит к замедлению нарастания сигнала от взаимодействия лиганда с аналитом за счет быстрого связывания первых порций аналита, поступающего в чип, и к дальнейшему уменьшению концентрации протекающего аналита. Данный эффект может сказаться и на стадии диссоциации комплекса лиганд-аналит, приводя к повторному связыванию аналита. Решением этой проблемы является увеличение скорости потока. Кроме того, скорость связывания может быть уменьшена путем изменения связывающей способности поверхности чипа. В целом, проблемы связанные с массопереносом, наиболее значительны в начале фазы ассоциации и в конце фазы диссоциации, когда увеличивается количество свободных мест связывания для аналита.

Еще одним возможным источником ошибок при получении сенсограмм является разница в концентрациях определенных веществ в рабочем буфере (running buffer) и вводимом образце аналита, растворенном в этом буфере. Эта разница приводит к различиям в коэффициенте преломления растворов, к чему метод очень чувствителен по определению. Наиболее выраженный эффект связан с присутствием растворителя диметилсульфоксида (ДМСО) в растворах аналитов. Для решения этой проблемы в программном обеспечении биосенсора

Віасоре T200 существует функция «коррекция растворителя», подразумевающая использование специальных калибровочных сенсограмм, однако она требует все-таки достаточно низкой концентрации вещества, приносящего помехи, в растворе аналита, в противном случае достичь достоверности в определении кинетических параметров не удастся.

Применение биосенсора Віасоре T200 для исследования межмолекулярного взаимодействия мутантного онкосупрессора p53-Y220C с низкомолекулярным соединением MB725

Онкосупрессор p53 играет ключевую роль в ряде важнейших клеточных процессов, таких как регуляция клеточного цикла, репарация ДНК и апоптоз. При этом в большинстве опухолевых клеток наблюдается нарушение либо дезактивация функций p53, происходящая, в том числе примерно в 50 % случаев вследствие мутаций, приводящих к термической дестабилизации белка, которые негативно сказываются на его транскрипционной активности. Мутация p53-Y220C является девятой наиболее распространенной для белка p53 и наблюдается примерно в 100 тысячах новых случаев диагностированных раковых заболеваний в мире ежегодно. Замена тирозина 220 на цистеин приводит к появлению узкой гидрофобной полости на поверхности белка и сопровождается снижением термической стабильности и потерей структурной организации белка с частичным разворачиванием его молекулы. Восстановление функциональной активности p53-Y220C возможно путем воздействия низкомолекулярных реактиваторов, из которых одним из наиболее перспективных является аминобензотиазол MB725, способный связываться с гидрофобной полостью мутантного белка.

Задачей эксперимента, проведенного в лаборатории генных и клеточных технологий ИФМиБ КФУ, было исследование взаимодействия мутантного белка p53-Y220C с реактиватором MB725 с помощью биосенсора Віасоре T200.

Эксперимент позволил достоверно определить равновесную константу диссоциации MB725 – K_d , которая составила 73 μM (рис. 9). Эта величина мо-

жет служить ориентиром для разработки новых низкомолекулярных реактивов р53-Y220C для того, чтобы они имели более высокое сродство к белку с улучшенными функциями его реактивации.

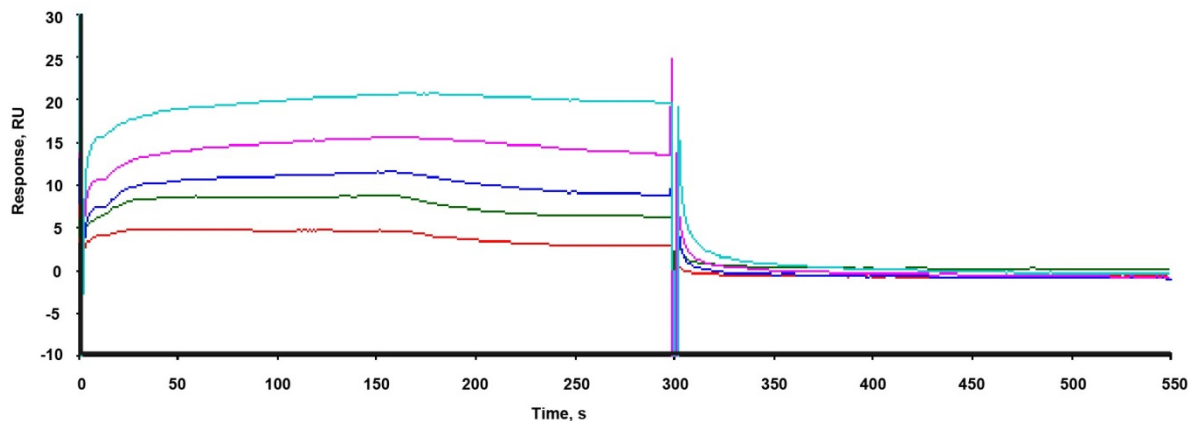


Рис. 9. Сенсограммы взаимодействия P53 (Y220C), иммобилизованного на поверхности чипа CM5, с MB725 в качестве аналита, полученные для исследования кинетических параметров взаимодействия. Аналит использовался в концентрациях 6,25; 12,5; 25; 50 и 100 μM

Состав рабочих растворов:

1. 0.1 М N-hydroxysuccinimide (NHS).
2. 0.4 М N-ethyl-N'-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimide (EDC).
3. Буфер для иммобилизации: 10 мМ ацетат натрия, pH 4.0–5.5
4. Раствор для остановки реакции: 1М ethanolamine, pH 8.5.
5. Рабочий буфер (Running buffer) (HBS-EP): 10 мМ HEPES, pH 7.4, 150 мМ NaCl, 3 мМ EDTA, 0.005% surfactant P-20
6. Раствор для регенерации лиганда: 10 мМ glycine/HCl, pH 2.0–3.0 в зависимости от типа взаимодействия

Подготовка прибора и проведение эксперимента

1. Включить прибор и компьютер и запустить программу Biacore Control Software. Дождаться, когда рабочая температура стабилизируется
2. Приготовить и профильтровать растворы с помощью 0.2- μm фильтра

3. Поместить чип в специальное гнездо на корпусе прибора и следовать интерактивным подсказкам меню программы BiaControl Software для дальнейших действий
4. Чтобы начать процесс иммобилизации белка на чипе CM5 необходимо выбрать в меню команды:
Run → Run Application Wizard → Surface preparation → Start → Immobilization
5. Для активации поверхности чипа при проведении иммобилизации готовится необходимое количество смеси 1:1 (v/v) 0.1 М NHS: 0.4 М EDC. Обработка проводится 7 минут при скорости потока 10 мл/мин
6. При иммобилизации разбавить белок в 10 мМ растворе ацетата натрия pH 5.0 (или другой подходящий pH, который должен быть ниже изоэлектрической точки белка) до концентрации 10-50 мкг/мл
7. Инъекцию проводить при скорости потока 10 мл/мин, остановить инъекцию, когда необходимый уровень иммобилизации будет достигнут
8. Остановить реакцию и промыть оставшиеся в системе ингредиенты, используя этаноламин (7 минут; 10 мл/мин)
9. Начать исследование взаимодействия лиганда и аналита, используя команды:
Run → Run Application Wizard → Binding analysis → Start
10. Для исследования кинетических параметров приготовить серию разведений аналита в рабочем буфере, используя стоковый раствор с наибольшей из возможных концентраций (100-300 мМ)
11. Провести инъекцию растворов аналита, используя индивидуально подобранное время инъекции и скорость потока (см. текст выше)
12. Провести расчет кинетических параметров используя программу BIAEvaluation Software

Лабораторная инфраструктура, необходимая для экспериментов с использованием биосенсора BiacoreT200

Оборудование для приготовления буферных растворов:

- аналитические весы
- системы очистки воды
- магнитные мешалки
- рН-метр
- системы стерильной фильтрации (0,2 мкм) (вакуум или давление)

Оборудование для подготовки препаратов лигандов и аналитов:

- системы для замены состава буфера (удаление лишних солей, буферных соединений, консервантов)

прецизионный рефрактометр для выравнивания коэффициента преломления растворов аналитов и рабочего буфера

Литература

1. Brongersma M.L., Kik P.G. (editors). Surface plasmon nanophotonics. Springer series in optical sciences. Vol. 131. Berlin: Springer Science, 2007; VIII, 268 p.
2. De Mol N. J., Fischer M.J.E. (editors). Surface plasmon resonance. Methods and protocols. New York: Springer Science; 2010; 286 p.
3. Homola J. (editor). Surface plasmon resonance based sensors. Springer series on chemical sensors and biosensors. Series 4. Berlin: Springer Science 2006; 252 p.
4. Daghestani H.N. and Day B.W. Theory and applications of surface plasmon resonance, resonant mirror, resonant waveguide grating, and dual polarization interferometry biosensors. // *Sensors (Basel)*. 2010. V. 10. P. 9630–9646
5. Englebienne P., Van Hoonacker A., Verhas M. Surface plasmon resonance: principles, methods and applications in biomedical sciences. *Spectroscopy* 2003; 17: 255–273.
6. Nagata K., Handa H. (editors). Real-time analysis of biomolecular interactions: applications of BIACORE. Tokio: Springer Science, 2000; 256 p.
7. Davis T.M. and Wilson W.D. Determination of the Refractive Index Increments of Small Molecules for Correction of Surface Plasmon Resonance Data. // *Analytical Biochem.* 2000. V. 284. P. 348–353.
8. Markey F. What is SPR anyway? *Bia Journal*. // 1999. V. 1. P. 14–17.
9. Quinn J.G., O'Neill S., Doyle A, McAtamney C., Diamond D., Mac-Craith B.D., and O'Kennedy R. Development and application of surface plasmon resonance based biosensors for the detection of cell-ligand interactions. // *Anal. Biochem.* 2000. V. 281. P. 135–143.
10. Rich R.L. and Myszka D.G. Survey of the year 2006 commercial optical biosensor literature. // *J. Mol. Recognit.* 2007. V. 20. P. 300–366.
11. Rich R.L., Myszka D.G. Grading the commercial optical biosensor literature Class of 2008: 'The Mighty Binders'. // *J. Mol. Recognit.* 2010. V. 23. P. 1–64.

Учебное издание

Часов Виталий Васильевич
Булатов Эмиль Рафаэлевич
Ризванов Альберт Анатольевич

**ПРИМЕНЕНИЕ БИОСЕНСОРА VIACORE T200
ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ МЕЖМОЛЕКУЛЯРНЫХ
ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ**

Учебно-методическое пособие

Подписано в печать 14.01.2019.

Бумага офсетная. Печать цифровая.

Формат 60x84 1/16. Гарнитура «Times New Roman». Усл. печ. л. 1,4.

Уч.-изд. л. 0,82. Тираж 100 экз. Заказ 20/1

Отпечатано в типографии

Издательства Казанского университета

420008, г. Казань, ул. Профессора Нужи́на, 1/37

тел. (843) 233-73-59, 233-73-28