

УДК: 577-112

Плешакова Т.О.¹, Малсагова К.А.¹, Козлов А.Ф.¹, Канашенко С.Л.¹,
Иванова Н.Д.², Садовская Т.А.², Арчаков А.И.¹, Иванов Ю.Д.¹

Высококочувствительный АСМ-фишинг альбумина

¹ — Научно-исследовательский институт биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича, Москва, Российская Федерация

² — Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования
Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии — МВА им. К.И. Скрябина
(ФГБОУ ВО МГАВМиБ — МВА им. К.И. Скрябина), Москва, Россия

Цель исследования состояла в разработке высококочувствительного способа детекции белка с помощью комбинации метода фишинга белка из потока аналита и метода регистрации и подсчета единичных молекул с помощью атомно-силовой микроскопии. **Методы.** АСМ-фишинг белков проводился из водного раствора белка при разных гидродинамических режимах. Измерения электрического заряда, вносимого в измерительную ячейку в процессе ввода аналита, осуществлялись с помощью цилиндра Фарадея. **Результаты.** Показана возможность эффективного фишинга белка на поверхность атомарно-ровной поверхности высокоориентированного пиролитического графита (ВОПГ) в области концентрации 10^{-14} — 10^{-18} моль/л. Сделано предположение, что высокая эффективность фишинга обусловлена трибоэлектрическим эффектом, который возникает при инъекции воды или водного раствора белка в измерительную ячейку. Обнаружено, что инъекция жидкости со скоростью 1 мл/с сопровождается индуцированием заряда в ячейке со скоростью ~1 нКл/с. Уменьшение скорости инъекции водного раствора белка приводит к существенному снижению эффективности фишинга. Проведено сравнение скорости генерации заряда при трибоэлектрическом эффекте и в условиях поляризации жидкости во внешнем электрическом поле при прохождении раствора белка через проводящее кольцо, на которое подавался высоковольтный потенциал ~10 кВ. Показано, что заряд, генерируемый и в том и другом случае, по порядку величины сходен. **Заключение.** Была проведена высококочувствительная детекция биомолекул альбумина с помощью метода АСМ-фишинга в 10^{-18} М растворе. Разработанный подход на основе АСМ-фишинга для обнаружения белка в растворах со сверхнизкой концентрацией может быть использован для ранней диагностики заболеваний и патологий человека.

Ключевые слова: АСМ, детекция низкокопийных белков, фишинг белков.

Для цитирования: Плешакова Т.О., Малсагова К.А., Козлов А.Ф., Канашенко С.Л., Иванова Н.Д., Садовская Т.А., Арчаков А.И., Иванов Ю.Д. Высококочувствительный АСМ-фишинг альбумина. Патогенез. 2016; 14(3): 23-30.

Для корреспонденции: Иванов Юрий Дмитриевич (Ivanov Yu.D.) — доктор биологических наук, профессор, руководитель лаборатории нанобиотехнологии ИБМХ, Научно-исследовательский институт биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича (ИБМХ), Москва, ул. Погодинская, 10, 119121. e-mail: yurii.ivanov@rambler.ru

Финансирование. Работа была выполнена при поддержке Программы фундаментальных научных исследований государственных академий наук на 2013–2020 годы, и гранта РФФИ 15-04-08368а.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 22.07.2016

Pleshakova T.O.¹, Malsagova K.A.¹, Kozlov A.F.¹, Kanashenko S.L.,
Ivanova N.D.², Sadovskaya T.A.², Archakov A.I.¹, Ivanov Yu.D.¹

Highly sensitive AFM-fishing of albumin

¹ — Institute of Biomedical Chemistry, Moscow, Russia, Pogodinskaya st. 10, Moscow, 119121,

fax: (495) 245-08-57, e-mail: Yurii.Ivanov@rambler.ru

² — Moscow state academy of veterinary medicine and biotechnology named K.I., Moscow, Russia. Academician Skryabin st., 23, 109472

This paper proposes a method of highly sensitive atomic-force microscopy (AFM) detection of human serum albumin (HAS) molecules using AFM fishing with charge generation. Our results indicate that injection of water or protein solution with the rate of about 1 ml/sec causes charge generation within the measuring cell due to triboelectric effect with the rate of about 1 nC/sec. Moreover, it is connected with the effective protein fishing onto highly oriented pyrolytic graphite (HOPG) surface of the AFM chip with a limit of detection (LOD) of as low as 10^{-18} M. Decrease of solution injection rate leads to decrease of fishing effectiveness. It is also demonstrated that charge generation rates caused by triboelectric effect and by external voltage of 10kV are similar. The method of AFM fishing thus has demonstrated an immense potential as a method of creating medical diagnostic devices and instruments.

Key words: AFM, the detection of low-abundance proteins, fishing proteins.

For citation: Pleshakova T.O., Malsagova K.A., Kozlov A.F., Kanashenko S.L., Ivanova N.D., Sadovskaya T.A., Archakov A.I., Ivanov Yu.D. Highly sensitive AFM-fishing of albumin. Patogenez. 2016; 14(3): 23-30 (In Russian).

For correspondence: Dr. Yu.D. Ivanov, doctor of biological sciences, professor, head of the laboratory of nanobiotechnology. V.N. Orekhovich Institute of Biological and Medical Chemistry, Pogodinskaya st. 10, Moscow, 119121, Russia. e-mail: yurii.ivanov@rambler.ru

Funding. The work was supported by the Program of basic research of the state academies of sciences for 2013–2020 and the grant RFBR 15-04-08368a.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Received 22.07.2016

Введение

Актуальной задачей протеомики является создание новых высокочувствительных методов детекции ультранизкокопийных белков. Предел чувствительности аналитических систем на основе этих методов должен быть не менее 10^{-15} М [1]. Использование нанотехнологических регистрирующих устройств в качестве молекулярных детекторов, позволяет значительно увеличить чувствительность аналитической системы в целом [1]. Одним из таких молекулярных детекторов является атомно-силовой микроскоп (АСМ), который визуализирует объекты и может регистрировать отдельно расположенные белки на поверхности в режиме их счета [2, 3, 6].

Другим важным фактором, также влияющим на чувствительность аналитической системы, является эффективность доставки белка к поверхности сенсора из объема раствора аналита. Применение фишинг-подхода с использованием турбулентного перемешивания позволяет значительно (на несколько порядков) повысить концентрацию белка на поверхности сенсора, и, следовательно, увеличить вероятность его обнаружения. Например, в работе [4, 5] продемонстрирована возможность количественного обнаружения белка с флуоресцентной меткой в растворе с молярной концентрацией при турбулентном перемешивании. Ранее мы показали эффективность применения АСМ-фишинга с интенсивным перемешиванием для детекции белка в растворе с концентрацией 10^{-17} М [4]. Однако метод турбулентного перемешивания трудно реализуем в некоторых аналитических системах, например при использовании микрофлюидных устройств [7].

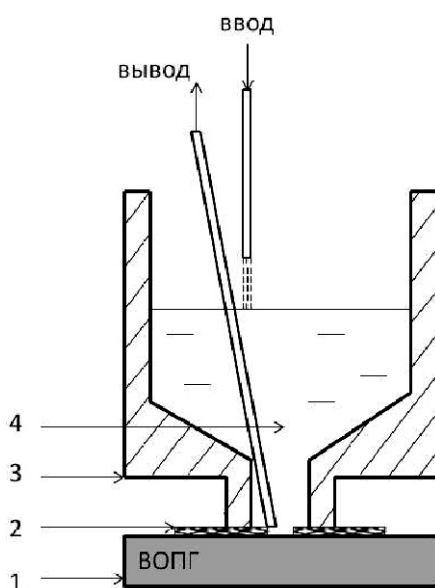


Рис. 1. Схема экспериментальной установки для проведения АСМ-фишинга белка.

1 — свежесколотый ВОПГ; 2 — PTFE пленка; 3 — тефлоновая измерительная кювета; 4 — Pt-электрод. Ввод и вывод белкового раствора в измерительную кювету отмечено на рисунке «ввод» и «вывод».

Альтернативным способом концентрирования белка на поверхности сенсора является метод с использованием электрического поля. Так в ряде исследований, посвященных разработке молекулярных детекторов на основе нанопроводов, было показано, что такие аналитические системы также позволяют регистрировать белок в растворах с диапазоном концентраций 10^{-14} – 10^{-16} М [8–10]. Авторы [9] показали, что в системах на основе нанопроводных сенсоров одним из определяющих факторов, обуславливающих такую высокую эффективность фишинга белков является комбинация электрокинетических процессов, включающих электрофорез и электроосмос.

Целью данной работы была разработка высокочувствительного способа детекции белка с помощью комбинации метода фишинга белка из раствора аналита и метода регистрации и подсчета единичных молекул с помощью АСМ.

Методика

Химические реактивы

Сывороточный человеческий альбумин (HSA) был получен из Agilent Technologies Inc., США. Анализируемые водные растворы белков готовились путем последовательного разбавления исходного раствора белка ($C = 10^{-9}$ М) до необходимой концентрации с интенсивным перемешиванием на шейкере промежуточных растворов в течение 30 мин. В работе были использованы водные растворы HSA с концентрацией 10^{-14} – 10^{-18} М и водные растворы цитохрома b5 с концентрацией 10^{-11} – 10^{-18} М.

Деионизованная вода была очищена с помощью дистиллятора Millipore Simplicity UV deionizer, Франция. Фосфат калия (КР) был из Sigma-Aldrich (США).

Высокоориентированный пиролитический графит (HOPG ZYN grade) получен из NT-MDT, Россия. Пленка ($\rho = 120$ г/см³, 0,1 мм x 12 мм x 20 м) получена из «Tevton», Россия.

Процедура проведения АСМ-фишинга и оценка эффективности фишинга

Процедура проведения АСМ-фишинга с медленным непрерывным и быстрым инжекторным способом ввода анализируемого раствора.

Схема установки для АСМ-фишинга приведена на рис. 1.

Пластина свежесколотого HOPG покрывалась пленкой из PTFE, в которой делалось отверстие диаметром ~100 мкм ($S \sim 8000$ мкм²). Таким образом, основная часть поверхности HOPG была изолирована, а в отверстии пленки формировалась маленькая сенсорная зона. Далее пластина прижималась фторопластовой кюветой ($V = 500$ мкл), таким образом, чтобы поверхность HOPG являлась дном измерительной ячейки. Диаметр нижнего отверстия кюветы составлял 2 мм и чувствительная зона центрировалась относительно этого отверстия.

АСМ-фишинг белков проводился из водного раствора белка объемом $V_0 = 100$ мл. В случае использования медленного непрерывного ввода, для подачи раствора в ячейку

ку использовался стандартный перистальтический насос, традиционно используемый в микрофлюидной технике для автоматизации экспериментов. Раствор в измерительную кювету подавался по стерильным силиконовым трубкам с внутренним диаметром ~8 мм. Скорость подачи раствора в таком случае составляла (~20 мкл/с). В случае использования быстрого инжекторного ввода, анализируемый раствор подавался в кювету с помощью пипетки с полипропиленовым наконечником. Внутренний диаметр наконечника 0,8 мм, скорость подачи раствора 1 мл/с.

Для отбора анализируемого раствора из измерительной системы, в кювету вводилась стерильная силиконовая трубка перистальтического насоса. Скорость отбора раствора подбиралась таким образом, чтобы кювета всегда оставалась заполненной анализируемым раствором. Скорость отбора составляла ~20 мкл/с. Общее время фишинга белка из раствора составляло 1,5 часа.

После проведения фишинга пластина НОРГ с выловленным белком удалялась из системы. Далее проводились АСМ-визуализация и подсчет выловленных объектов на поверхности НОРГ в сенсорной зоне.

Контрольная серия экспериментов проводилась аналогично методике детекции белков, однако в измерительную кювету вместо раствора белка добавлялась вода, не содержащая белок. Также была выполнена контрольная серия экспериментов, в которых в качестве сенсорного элемента использовалась не проводящая пластина НОРГ, а непроводящая слюдяная подложка.

Методика измерения заряда, возникающего в измерительной ячейке при инъекции раствора

Измерения электрического заряда, переносимого в измерительную ячейку, в процессе ввода анализируемого раствора осуществлялись с помощью цилиндра Фарадея, изготовленного из двух коаксиальных алюминиевых цилиндров. Эксперименты проводились при непрерывной подаче анализируемого раствора и при инъекции раствора. Скорость подачи и отбора раствора были аналогичны условиям экспериментов по АСМ-фишингу белков.

Схема регистрации генерации заряда при прохождении анализируемого раствора через высоковольтное проводящее кольцо

На рис. 2 представлена схема установки непрерывного ввода анализируемого раствора, вносящего электрический заряд в ячейку. Для определения характеристик данного метода были измерены зависимости накопления заряда в ячейке от времени при различном напряжении, при различной скорости подачи аналита, зависимость от концентрации буфера и белка в растворе аналита, а также исследовано влияние геометрии расположения носика относительно кольца.

Принцип действия установки основан на явлении электрической поляризации струи водного раствора, протекающего по трубке (2). Металлическое кольцо, обхватывающее носик (6) находится под положительным потенциалом (напряжением) 7–9 кВ, который создается высоковольтным источником (5), кольцо (6) формирует электрическое поле, которое поляризует струю воды в носике. Положительные заряды устремляются обратно в емкость с анализируемым раствором (1) и стекают на землю.

Отрицательные заряды проходят по носику вместе с раствором, и в виде капель попадают в измерительную ячейку, которая находится в цилиндре Фарадея (4). Существенным условием накопления заряда является подача раствора в измерительную ячейку в виде капель: это прерывает омический контакт и препятствует стеканию заряда обратно в емкость (1); заряд, накопившийся в измерительной ячейке, измеряется электрометром (7).

АСМ-визуализация и подсчет молекул белка на поверхности НОРГ

АСМ-изображения чувствительной зоны на поверхности НОРГ после проведения фишинга белка были получены с помощью АСМ Dimension 3100 (VEECO Inc., США) на воздухе в полуконтактном режиме с использованием AFM-probes PPP-NCH (Nanosensors Inc., США), радиус кривизны зондов не превышал 10 нм. Размер скана составлял 5 x 5 мкм², число сканов в каждой зоне не менее 10, общая площадь сканирования каждой зоны $S_{scan} = 250 \text{ мкм}^2$, что составляло ~3% от всей площади чувствительной зоны НОРГ. Анализ изображений, подсчет количества объектов, их высот и объемов проводился с помощью программного обеспечения обработки данных АСМ (ПО ОД АСМ, свидетельство о Государственной регистрации программы для ЭВМ N 2010613458). Высоты белковых молекул (h_{max}), в случае латеральных размеров их АСМ-изображений менее 30 нм, определялись как высоты соответствующих максимумов распределения $\rho(h)$ их изображений по размерам аналогично:

$$r(h) = \frac{N_h}{N} 1100,$$

где N_h — число визуализированных объектов с высотой h , а N — это общее число визуализированных объектов.

Если латеральные размеры АСМ-изображений объектов превышали 30 нм, то визуализированные объекты относились к агрегатным структурам белка. В таких случаях их подсчет и определение характеристических высот по формуле (1) не проводились.

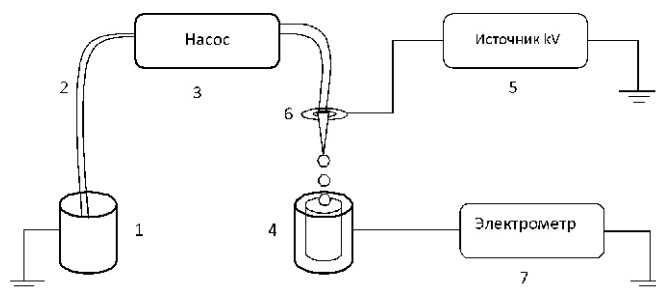


Рис. 2. Схема экспериментальной установки для измерения генерированного заряда с использованием проводящего кольца, к которому приложен высоковольтный потенциал.

1 — заземленная емкость, содержащая раствор аналита; 2 — силиконовая трубка; 3 — перистальтический насос; 4 — цилиндр Фарадея, содержащий измерительную ячейку; 5 — источник высокого напряжения; 6 — пластмассовый носик и обхватывающее его металлическое кольцо; 7 — электрометр Keithley 617.

Результаты

Результаты контрольных экспериментов при непрерывном и инъекторном способах ввода раствора в измерительную ячейку

В контрольных экспериментах, при условии замены проводящей подложки НОРГ на непроводящую слюдяную подложку не было зарегистрировано объектов на поверхности после фишинга белка из раствора, даже при максимальной концентрации HSA $C = 10^{-14}$ М (данные АСМ-сканирования не представлены).

Было обнаружено, что при условии непрерывной подачи очищенной воды на поверхности НОРГ сорбируется большое количество неспецифических объектов высотой 3–5 нм (данные не представлены). Можно сделать вывод, что появление этих объектов было связано с разрушением подводящей трубки перистальтического насоса из-за механического износа в течение времени эксперимента.

В контрольных экспериментах с использованием инъекторного способа ввода, не наблюдалось сорбции частиц на поверхности НОРГ из очищенной воды (данные АСМ-сканирования не представлены).

В контрольных экспериментах, при условии замены проводящей подложки НОРГ на непроводящую слюдяную подложку, также не было зарегистрировано объектов на поверхности после фишинга белка из раствора, даже при максимальной концентрации HSA $C = 10^{-14}$ М (данные АСМ-сканирования не представлены).

Детекция HSA с помощью АСМ-фишинга

Результаты детекции HSA при быстром инъекторном способе ввода раствора с помощью АСМ-фишинга представлены на рис. 3 (а–е). На этих рисунках изображены характерные АСМ-изображения поверхности НОРГ, полученные в процессе сканирования чувствительной зоны после проведения АСМ-фишинга при $U = 0$ В.

Как видно из рис. 3 (а–е), при детекции HSA в растворах с концентрацией 10^{-14} – 10^{-18} М белок в основном сорбируется в виде компактных объектов высотой 3–10 нм. Протяженные агрегатные структуры и фрагменты слоя визуализировались редко. Качественное сравнение этих рисунков показало, что не наблюдается зависимости высоты зарегистрированных объектов от концентрации анализируемого раствора.

Зарегистрированные на поверхности НОРГ с помощью АСМ объекты были отнесены к выловленным молекулам HSA, так как в контрольных экспериментах сорбции никаких частиц не наблюдалось.

Результаты детекции HSA при непрерывном способе ввода раствора в ячейку были аналогичны результатам контрольных экспериментов в соответствующих условиях. А именно, при АСМ-сканировании на поверхности НОРГ визуализировалось большое количество объектов высотой 3–5 нм. Количество объектов не зависело от концентрации белка в растворе. Так как в контрольных экспериментах при непрерывном способе подачи раствора в ячейку были получены те же результаты, то появление этих объектов было связано с сорбцией загрязнений, вызванных разрушением подводящих трубок.

Далее был проведен анализ измеренного заряда, который индуцировался в водном растворе при его вводе в измерительную ячейку.

Индукция заряда в водном растворе при его инъекции в измерительную ячейку в отсутствие внешнего электрического поля

При быстром вводе анализируемого раствора в измерительную ячейку со скоростью 1 мл/с (ячейка объемом 1 мл) было обнаружено, что генерируется заряд 1 нК. При этом, как отмечалось выше, проводилось вылавливание белка с очень высокой эффективностью на уровне 10^{-18} М. При медленном вводе анализируемого раствора в измерительную ячейку со скоростью ~20 мкл/с (ячейка объемом 1 мл) с помощью перистальтического насоса было обнаружено, что скорость генерации заряда была более медленной.

Как отмечалось выше, при медленном вводе раствора белка в измерительную ячейку не наблюдалось высокоэффективного вылавливания белка.

На рис. 4 представлен график зависимости генерации заряда при медленном вводе раствора в измерительную ячейку без его вывода из нее и при медленном его вводе и одновременном его выводе из ячейки.

Как видно, при вводе водного раствора без его вывода (кривая 1) в течение 5 минут со скоростью 1 мл/мин. генерируется заряд величиной порядка 10 нК примерно с постоянной скоростью. При медленной скорости ввода и одновременно с ним его вывода (кривая 2) не наблюдается накопления заряда в ячейке. Это означает, что заряд, который был, генерировался в ячейке при вводе жидкости выводится из нее.

Были проведены эксперименты по исследованию скорости генерации и заряда в воде при разной скорости инъекции воды в измерительную ячейку (рис. 5). При этом скорость инъекции раствора менялась за счет изменения диаметра инъекционного канала (диаметр 0,8 мм — кри-

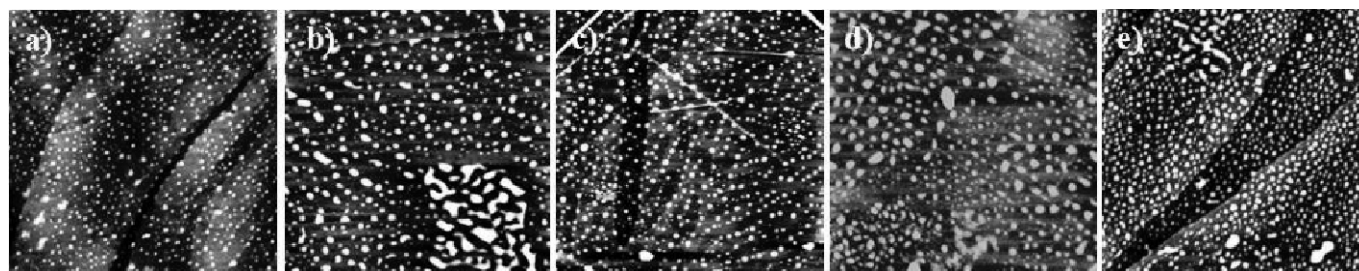


Рис. 3. АСМ — изображение HSA на поверхности НОРГ после проведения АСМ-фишинга в режиме инъекционного режима ввода раствора в измерительную ячейку.

Типичные экспериментальные условия получения АСМ-изображения: размер скана был $5,0 \times 5,0$ мкм²; масштаб по Z — 10 нм; концентрация белка: (а) 10^{-14} М, (b) 10^{-15} М, (c) 10^{-16} М, (d) 10^{-17} М, (e) 10^{-18} М. Белковые объекты были визуализированы в виде компактных объектов высотой 3–10 нм.

вая 1 и диаметр 2 мм — кривая 2) при одном скоростном режиме перистальтического насоса, подающего жидкость — с уменьшением диаметра увеличивалась скорость раствора.

В результате экспериментов (рис. 5) было обнаружено, что при внесении в цилиндр Фарадея воды с расходом ~20 мкл в секунду с помощью перистальтического насоса через суживающееся сопло-наконечник с внутренним диаметром на конце 0,8 мм, в нем индуцируется заряд со скоростью ~0,06 нК за секунду. На том же рисунке видно, что при внесении воды тем же способом с расходом со скоростью 20 мкл в секунду, но через подводящую трубку большего диаметра — 2 мм (без сопла), то есть с меньшей линейной скоростью в $(2:0.08)^2 = 6$ раз — наблюдается уменьшение скорости индуцирования заряда в 2 раза. То есть, с уменьшением скорости ввода воды в ячейку уменьшается скорость индуцирования заряда. (Во сколько раз происходит это уменьшение — зависит не только от скорости ввода воды, но и материала сопла и подводящей трубки).

Далее для сравнения скоростей наработки заряда при механической инъекции раствора в измерительную кювету и генерации заряда при вводе раствора, в котором этот раствор генерировался под влиянием электрического поля, были проведены эксперименты по измерению генерации заряда от времени при прохождении водного раствора через проводящее кольцо, на которое подавался высоковольтный потенциал.

Индукция заряда в растворе при его прохождении через электрическое поле проводящего кольца

Как видно из рис. 6, при прохождении водного раствора через проводящее кольцо, к которому был приложен высоковольтный потенциал, наблюдается линейное возрастание генерации заряда от времени ввода буферного 1 мМ раствора в ячейку.

Характерное значение генерации заряда за 1 минуту составляло порядка 6 нКл при потенциале 5 кВ при скорости раствора, проходящего через проводящее кольцо ~1 мл/мин. Это соответствует скорости генерации заряда ~0,1 нКл/с. При потенциале 10 кВ и скорости раствора, проходящего через проводящее кольцо ~2 мл/мин, скорость генерации заряда ~0,4 нКл/с. При оптимизации положения проводящего кольца относительно выходного среза носика инжектора можно повысить это значение еще порядка в несколько раз (таблица, для сравнения п.3 и п.7).

На рис. 7, где представлена зависимость тангенса угла наклона генерации заряда от напряжения, видно, что наблюдается линейная зависимость скорости генерации заряда от напряжения.

Для выяснения, зависит ли эффективность генерации заряда от ионной силы буфера были проведены эксперименты по измерению заряда, генерируемого при прохождении буферных растворов разной концентрации 1—50 мМ КР буфера через кольцо с высоковольтным потенциалом. Как видно из рис. 8а и 8б, где представлены соответствующие зависимости скорости генерации заряда от концентрации буфера, было получено, что скорость генерации заряда не зависит от концентрации буфера. В таблице приведены соответствующие значения.

Далее было проведено исследование: сказывается ли присутствие HSA в буферном растворе. На рис. 9а и 9б

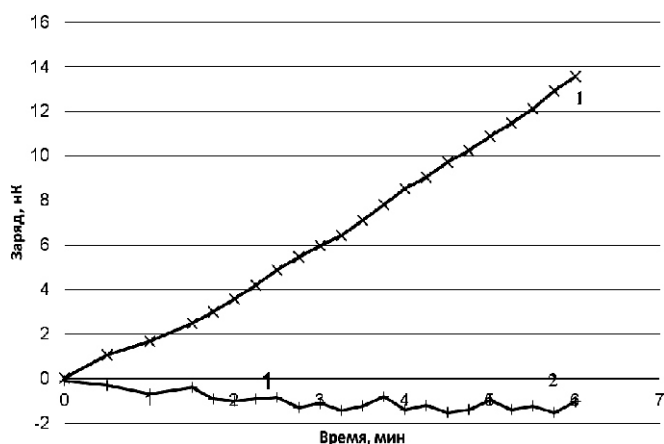


Рис. 4. Зависимость накопления заряда в измерительной ячейке при медленном вводе воды в измерительную ячейку со скоростью 20 мкл/с. Условия эксперимента: 1 — скорость ввода воды 1 мл/мин, вывода раствора нет; 2 — ввод и вывод воды со скоростью 1 мл/мин. По оси ординат — величина заряда в нК.

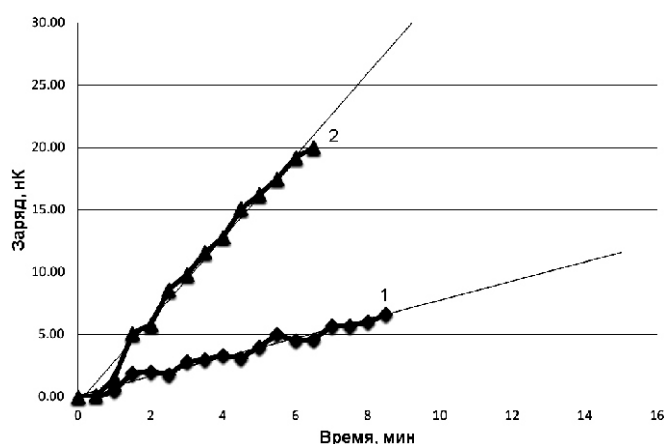


Рис. 5. Зависимость накопления заряда в измерительной ячейке при медленном вводе воды перистальтическим насосом со скоростью 20 мкл/с: (1) — диаметр инжектора 2 мм и (2) — диаметр 0,08 мм.

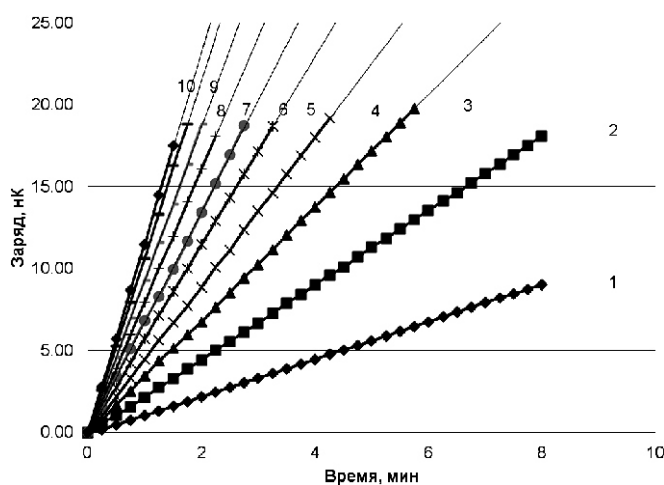


Рис. 6. Возрастание скорости генерации заряда от времени ввода раствора в измерительную кювету при разных электрических потенциалах на высоковольтном кольце. Условия эксперимента: 1 — 1 кВ, 2 — 2 кВ, 3 — 3 кВ, 4 — 4 кВ, 5 — 5 кВ, 6 — 6 кВ, 7 — 7 кВ, 8 — 8 кВ, 9 — 9 кВ, 10 — 10 кВ, раствор — 1 мМ КР буферный раствор, pH = 7,4

Скорость генерации заряда в растворе от напряжения на проводящем кольце

п/п	Концентрация КР буферного раствора/ скорость ввода раствора (v, мл/мин)	Скорость генерации заряда нК/мин при напряжении 5 кВ	Угол наклона (tg), генерируемого заряда от напряжения на кольце
1	1 мМ, v = 1 мл/мин	6	1
2	1 мМ, v = 2 мл/мин	10	2
3	10 мМ, v = 2 мл/мин	10	2
4	25 мМ, v = 2 мл/мин	10	2
5	50 мМ, v = 2 мл/мин	11	2
6	10 мМ, v = 2 мл/мин	16	4
7	10 мМ, v = 2 мл/мин, HSA (1E-4)	21	4
8	50 мМ, v = 2 мл/мин	20	4
9	50 мМ, v = 2 мл/мин, HSA (1E-4)	21	4
10	10 мМ, v = 2 мл/мин	10	2
11	10 мМ/l, v = 2 мл/мин, HSA (1E-4)	10	3

Примечание. * Строчки одинаковых цветов в таблице соответствуют одинаковому положению проводящего кольца относительно выходного отверстия инжектора.

представлена зависимость скорости генерации заряда в отсутствие и в присутствии HSA в КР-растворе. Было получено, что наличие HSA при концентрации $C = 10^{-14}$ М его в КР-буферном растворе 10–50 мМ, не приводит к изменению скорости генерации заряда.

В сводной таблице представлены результаты измерения скорости генерации заряда для исследуемых растворов при напряжении 5 кВ.

Как видно из таблицы и в соответствии с тем, что обсуждалось выше, нет зависимости скорости генерации заряда ни от присутствия белка, ни от концентрации буфера. Анализ данных таблицы и обсуждение, приведенное выше в тексте графиков, позволяют сделать следующие выводы:

1. Удвоение скорости подачи раствора вдвое увеличивает скорость накопления заряда (сравн. п.1 и п.2). Так как размер капли не зависит от скорости подачи раствора, эта скорость определяется количеством капель, падающих в цилиндр Фарадея в единицу времени. Следовательно, заряд капли не зависит от скорости подачи раствора;

2. Концентрация буферного раствора слабо влияет или совсем не влияет на генерацию заряда капли (сравн. пп. 2, 3, 4, 5), (пп. 6, 7, 8, 9) и (пп. 10, 11);

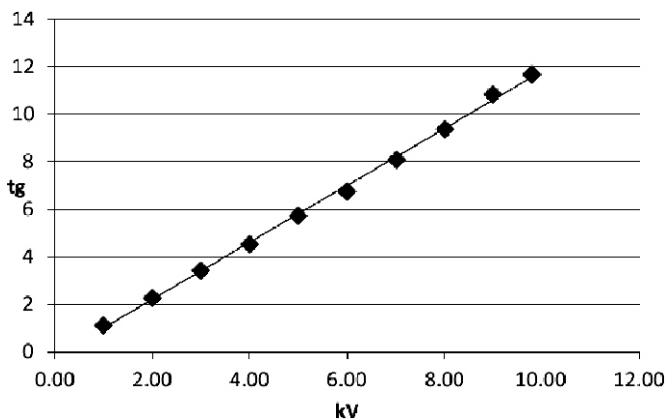


Рис. 7. Зависимость тангенса угла наклона генерации заряда от напряжения, вычисленного из рис. 6.

3. Наблюдается линейная зависимость скорости накопления заряда от приложенного напряжения (кВ), т.е. заряд капли пропорционален напряжению на проводящем кольце;

4. Заряд капли зависит от расположения проводящего кольца относительно инжектора: пп. 3,6, где каждый из этих п/п п. 3 или п.6 выполнен с разным положением носика относительно проводящего кольца.

Обсуждение

В представленной работе для регистрации белков сверхнизких концентраций предложен метод АСМ-фишинга с вводом анализируемого раствора, несущего электрический заряд. Заряд создавался инжектированием раствора, при котором проявлялся трибоэлектрический эффект. В работе проводилось сравнение этого заряда с зарядом, возникающим при поляризации раствора при помощи металлического кольца, находящегося под напряжением 1–9 кВ. Этот способ поляризации водяной струи лорд Кельвин изобрел в 1867 году.

В методе, используется основное достоинство метода фишинга — концентрирование молекул белка из большого объема раствора на маленькую поверхность сенсорного элемента. В качестве сенсорного элемента использовалась поверхность высокоориентированного пиролитического графита (НОРГ) с выделенной чувствительной областью диаметром ~100 мкм. С одной стороны, поверхность НОРГ имеет атомарно-ровную гладкость, поэтому подходит для визуализации и подсчета белков на этой поверхности с помощью метода АСМ. С другой стороны, НОРГ является проводящим материалом, поэтому может использоваться как электрод для формирования электрического поля в системе «анализируемый раствор — проводящая поверхность сенсора». Выловленные молекулы белка на поверхности чувствительной зоны НОРГ визуализировали и подсчитывали с помощью АСМ. Использование АСМ-фишинга позволило достоверно идентифицировать объекты, зарегистрированные с помощью АСМ.

Полученные данные по АСМ-фишингу белка показали, что HSA может быть выловлен на ультранизкой кон-

центрации вплоть до $C = 10^{-18}$ М из 100 мл раствора движущегося в импульсно-периодическом режиме. В 100 мл раствора содержится 6×10^5 молекул белка. С учетом того, что доставка белка может осуществляться за счет броуновского движения, количество белков, молекулы которых могут достигнуть поверхности чипа, становится слишком малым, чтобы их можно было зарегистрировать при концентрации $C = 10^{-14}$ М, а тем более при $C = 10^{-18}$ М. Однако экспериментальные данные показывают, что белок может быть зарегистрирован при сверхнизких концентрациях (10^{-14} – 10^{-18} М). Одной из причин эффективности фишинга сверхнизких концентраций может быть то, что в процессе быстрого импульсного ввода белка происходит генерация заряда порядка 1 нКл, что соответствует 10^{10} электронов. Эти электроны могут быть захвачены неоднородностями наноразмеров, такими, как белки, что приведет к их повышенной подвижности по направлению к проводящей АСМ-подложке. Заряд, вводимый в измерительную ячейку в быстром импульсном режиме, находится в кювете. Характерное время его жизни составляет несколько минут, поэтому при добавлении к каждой порции с белком каждую минуту после медленной откачки будет поддерживать наработанный заряд практически на

одном и том же уровне. Следует отметить, что при повышении концентрации белка количество электронов, приходящееся на одну молекулу белка, будет уменьшаться, поэтому чувствительность детектирующей системы будет увеличиваться с уменьшением концентрации белка. Этот парадоксальный вывод и подтверждается нашими экспериментами. Действительно, при уменьшении концентрации белка в растворе, количество выловленных на АСМ-поверхности белковых молекул сохраняется примерно на одном уровне. В случае медленного ввода с одновременным медленным выводом белкового раствора в измерительной кювете, результаты показали, что заряд, генерируемый при вводе очень мал. Кроме того, заряд не сохраняется (график временной зависимости зарядов в кювете при работе двух насосов). Следует отметить, что генерация заряда за счет движения жидкости через носик инжектора по порядку величины сходна с величиной заряда, генерируемого в жидкости, проходящей во внешнем электрическом поле, образованном проводящим кольцом, к которому приложен высоковольтный потенциал 10 кВ. Поэтому можно предположить, что в дальнейшем при создании детектирующих систем со сверхвысокой чувствительностью можно использовать не только меха-

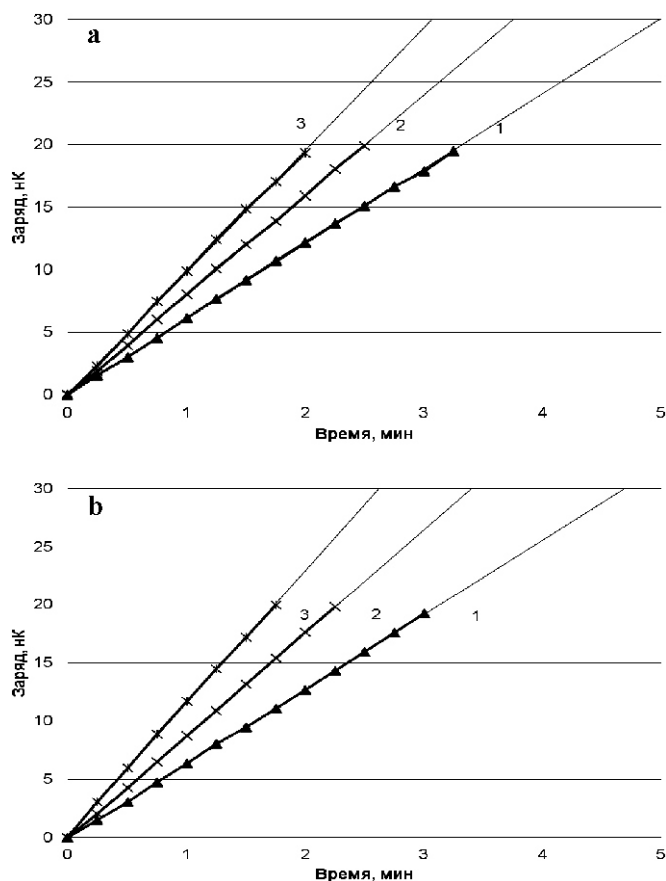


Рис. 8. Зависимость скорости генерации заряда от концентрации буфера.
Условия эксперимента: концентрация КР буфера (pH = 7,4): а 10 мМ, 1 – 3 кВ, 2 – 4 кВ, 3 – 5 кВ; б 50 мМ, напряжение генерации заряда 1 – 3 кВ, 2 – 4 кВ, 3 – 5 кВ.

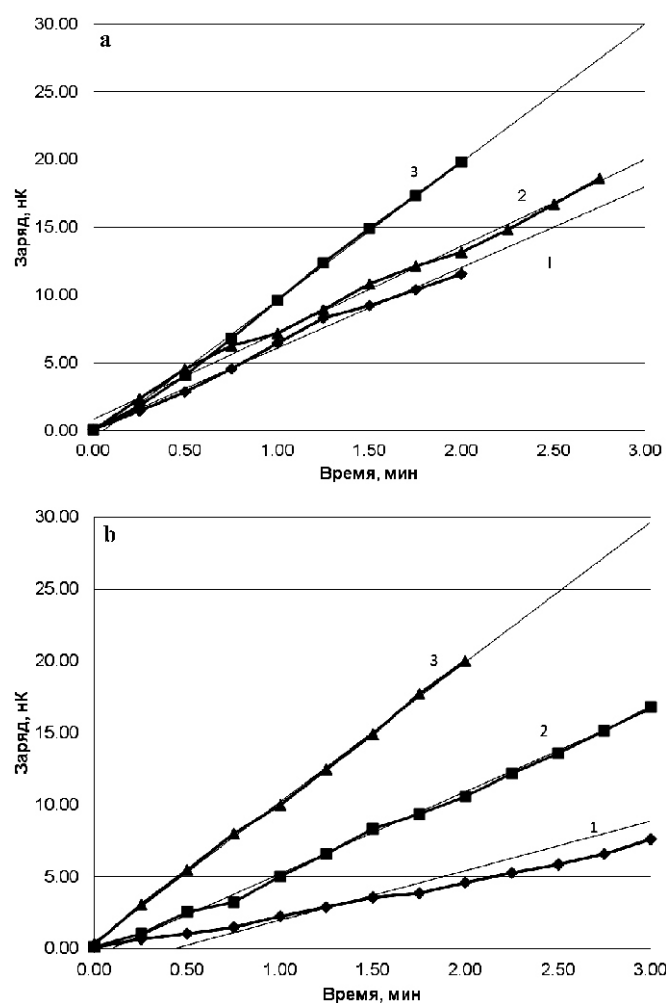


Рис. 9. Зависимость скорости генерации заряда в растворе от присутствия белка. Условия для кривых: 1 – 3 кВ, 2 – 4 кВ, 3 – 5 кВ; (а) концентрация белка $C = 0$ М. (б) в присутствии белка с концентрацией $C = 10^{-14}$ М. Условия эксперимента: раствор 10 мМ КР – буфер, pH = 7,4.

нические инжекторы, но и инжекторы с дополнительным электрическим полем для индукции заряда в жидкости. Данный подход по детектированию белка со сверхнизкой концентрацией может быть использован для ранней диагностики заболеваний и патологий человека. Также отметим, что описанный выше эффект интересен с точки зрения движения крови в кровяном русле. При движении крови в сосудах с различной скоростью (обусловленной разными патологическими причинами, например, патологическим сужением сосудов и т.д.) может генерироваться существенный заряд, причем, зависящий по величине от этой скорости движения.

Заключение

Была проведена высокочувствительная детекция биомолекул альбумина с помощью метода АСМ-фишинга в растворе при концентрации от 10^{-14} до 10^{-18} М. Высокая эффективность вылавливания биомолекул из раствора с низкой концентрацией, предположительно, связана с трибоэлектрическим эффектом, так как при инъекции аналита в измерительную кювету со скоростью 1 мл/с индуцируется заряд ~ 1 нКл/с. Уменьшение скорости инъекции водного раствора белка приводит к снижению скорости индуцирования заряда и, как следствие, к снижению эффективности фишинга биомолекул.

Разработанный способ детекции биомолекул в растворах при низких концентрациях может быть использован при разработке систем для ранней диагностики заболеваний. При этом, для повышения эффективности вылавливания может быть использован не только быстрый инжекторный ввод аналита в измерительную ячейку, который был использован в данной работе. Также возможно применение традиционной системы доставки аналита на основе перистальтического насоса, с медленным вводом потока аналита, но в таком случае необходимо организовать прохождение водного раствора белка через внешнее электрическое поле, образованное проводящим кольцом,

к которому приложен высоковольтный потенциал. Показано, что в таком поле также наблюдается генерация заряда, которая способствует эффективному обнаружению белка.

References

1. Archakov A.I., Ivanov Y.D., Lisitsa A.V., Zgoda V.G. AFM fishing nanotechnology is the way to reverse the Avogadro number in proteomics. *Proteomics*. 2007; 7: 4-9.
2. Archakov A.I., Ivanov Y.D., Lisitsa A.V., Zgoda V. G. Biospecific irreversible fishing coupled with atomic forcemicroscopy for detection of extremely low-abundant proteins. *Proteomics*. 2009; 9: 1326-43.
3. Haas P., Then P., Wild A., Grange W., Zorman S., Hegner M., Calame M., Aebi U., Flammer J., Hecht B. Fast quantitative single-molecule detection at ultralow concentrations. *Anal Chem*. 2010; 82: 6299-302.
4. Ivanov Y.D., Danichev V., Pleshakova T.O., Shumov I., Ziborov V., Krokhin N., Zagumennyi M., Ustinov V., Smirnov L., Shirovin A. et al. Irreversible chemical AFM based fishing for detection of low-copied proteins. *Biochemistry (Moscow) Suppl Series B: Biomedical Chemistry*. 2013; 7: 46-61.
5. Kasas S., Thomson H., Smith B., Hansma P., Miklossy J., Hansma H. Biological applications of the AFM: from single molecules to organs. *Int J Imaging Syst Technol*. 1997; 8: 151.
6. Kiselyova O., Yaminsky I. Atomic forcemicroscopy of protein complexes. In *Atomic Force Microscopy: Biomedical Methods and Applications, Methods in Molecular Biology Series*. 2003; 242: 217-30.
7. Morozov V., Groves S., Turell M., Bailey C. Three minutes-long electrophoretically assisted zeptomolar microfluidic immunoassay with magnetic-beads detection. *J Am Chem Soc*. 2007; 129: 12628-9.
8. Pui T.S., Agarwal A., Ye F., Tou Z.Q., Huang Y., Chen P. Ultra-sensitive detection of adipocytokines secreted from adipocytes with CMOS-compatible silicon nanowire arrays. *Nanoscale*. 2009; 1: 159-63.
9. Tian R., Regonda S., Gao J., Liu Y., Hu W. Ultrasensitive protein detection using lithographically defined Si multianowire field effect transistors. *LabChip*. 2011; 11: 1952-61.
10. Wu C.C., Pan T.M., Wu C.S., Yen L.C., Chuang C.K., Pang S.T., Yang Y.S., Ko F.H. Label-free detection of prostate specific antigen using a silicon nanobelt field-effect transistor. *Int J Electrochem Sci*. 2012; 7: 4432-42.

Сведения об авторах:

Плешакова Татьяна Олеговна (Pleshakova T.O.), кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории нанобиотехнологии ИБМХ

Мальсагова Кристина Ахмедовна (Malsagova K.A.), младший научный сотрудник лаборатории нанобиотехнологии ИБМХ

Козлов Андрей Федорович (Kozlov A.F.), ведущий инженер лаборатории нанобиотехнологии ИБМХ

Канашенко Сергей Леонидович (Kanashenko S.L.), ведущий инженер лаборатории нанобиотехнологии ИБМХ

Иванова Нина Дмитриевна (Ivanova N.D.), преподаватель ФГБОУ ВО МГАВМиБ

Галиуллин Р.А. (Galiullin R.A.), ведущий программист, ИБМХ

Садовская Татьяна Александровна (Sadovskaya T.A.), ст. преподаватель ФГБОУ ВО МГАВМиБ

Арчаков Александр Иванович (Archakov A.I.), научный руководитель ИБМХ

Иванов Юрий Дмитриевич (Ivanov Yu.D.), доктор биологических наук, профессор, руководитель лаборатории нанобиотехнологии ИБМХ, e-mail: yurii.ivanov@rambler.ru