



УКРАЇНА

(19) UA (11) 61564 (13) U  
(51) МПК (2011.01)  
G01N 35/00

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ  
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ

## ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

видається під  
відповідальність  
власника  
патенту

### (54) СПОСІБ ВИЗНАЧЕННЯ БІОМОЛЕКУЛ ШЛЯХОМ КОМПЛЕКСОУТВОРЕННЯ ЗІ СПЕЦИФІЧНИМИ ІМУНОГЛОБУЛІНАМИ

1

(21) u201015093

(22) 15.12.2010

(24) 25.07.2011

(46) 25.07.2011, Бюл.№ 14, 2011 р.

(72) БОЛТОВЕЦЬ ПРАСКОВІЯ МИКОЛАЇВНА, ПОЛІЩУК ОЛЕНА МИКОЛАЇВНА, КОВАЛЕНКО ОЛЕКСІЙ ГРИГОРОВИЧ, СНОПОК БОРИС АНАТОЛІЙОВИЧ

(73) ІНСТИТУТ ФІЗИКИ НАПІВПРОВІДНИКІВ ІМ. В.Є. ЛАШКАРЬОВА НАЦІОНАЛЬНОЇ АКАДЕМІЇ НАУК УКРАЇНИ

(57) Спосіб визначення біомолекул шляхом комплексоутворення зі специфічним імуноглобуліном, що включає модифікацію поверхні чутливого елемента сенсора поверхнево-плазмового резонансу (ППР), іммобілізацію на модифікованій поверхні

2

рецепторного білка, вимірювання величини сигналу ППР, нанесення специфічного для досліджуваних біомолекул імуноглобуліну на поверхню сенсора з іммобілізованим рецепторним білком, додавання досліджуваного зразка, вимірювання величини зміни сигналу ППР, по якій судять про наявність у зразку досліджуваних біомолекул, який відрізняється тим, що модифікацію поверхні чутливого елемента здійснюють розчином тіоціанату концентрації  $10^{-2}$ - $10^{-4}$ М, на поверхні іммобілізують рецепторний білок A Staphylococcus aureus концентрації 20-50 мкг/мл, а досліджуваний зразок перед нанесенням на модифіковану поверхню сенсора попередньо змішують зі специфічним імуноглобуліном.

Корисна модель має відношення до молекулярної біології, вірусології, біотехнології, аналітичної біохімії, медицини та вимірювальної техніки і може бути використана для експресної детекції біомолекул, аналізу багатокомпонентних біохімічних середовищ, вивчення біоспецифічних взаємодій.

Метод поверхневого плазмового резонансу (ППР) є одним з найбільш широко застосовуваних біосенсорних неінвазивних методів дослідження біоспецифічних взаємодій [1].

Традиційним для досліджень методом ППР є підхід, при якому рецептор, зокрема специфічні імуноглобуліни, іммобілізують на поверхні сенсора, а досліджувані біомолекули знаходяться у розчині; при цьому величина відгуку ППР залежить від ефективної товщини шару досліджуваних молекул, який специфічно зв'язався з іммобілізованим рецепторним шаром при умові постійності густини обох шарів, - тобто величина відгуку ППР обумовлена змінами оптичних параметрів молекулярного ансамблю взаємодіючих молекул у вертикальній площині [2].

В той же час, внаслідок того, що величина відгуку ППР залежить не тільки від товщини молекулярного шару, але і від зміни показника заломлення, щільність молекулярного шару також буде впливати на значення відгуку в результаті варіацій

показника заломлення. Якщо при цьому товщина поверхневої структури буде фіксованою за рахунок специфічності самого процесу взаємодії та сталої форми взаємодіючих компонент, то величина відгуку ППР буде однозначною функцією щільності біомолекулярного ансамблю.

За прототип вибраний спосіб детекції біомолекул методом ППР, описаний в [3], що включає модифікацію поверхні чутливого елемента сенсора за допомогою карбоксиметилдекстрану, іммобілізацію на модифікованій поверхні рецепторного білка - імуноглобуліну а-Fc, вимірювання величини сигналу ППР, нанесення досліджуваного зразка на поверхню сенсора з іммобілізованим рецепторним білком, додавання специфічного для досліджуваних молекул імуноглобуліну, повторне вимірювання сигналу ППР, по величині зміни якого судять про наявність у зразку досліджуваних біомолекул. Це показано на Додатку, де на осі абсцис позначено час вимірювання (Time, s), на осі ординат - відгук ППР (Resonance signal, kRU), іммобілізований рецепторний білок позначено як а-Fc, досліджувані молекули як unknown mAb, специфічні імуноглобуліни як а-G3, а-G2a, а-G2b, а-G1. Описаний спосіб робить можливою експресну детекцію біомолекул без застосування флуоресцентних та інших міток. Однак, таким чином неможливо напряму детектувати біомолекули невеликого ро-

UA (11) 61564 (13) U

зміру (менше 10 кДа), а також складні багатокомпонентні суміші. Це звужує область застосування прототипу.

Задачею корисної моделі є розширення області застосування методу поверхневого плазмового резонансу для більш складних багатокомпонентних сумішей, зокрема сумішей вірусів зі специфічними імуноглобулінами і молекулами невеликого розміру, що потенційно можуть мати антивірусний ефект, елементи яких можуть впливати один на одного, зокрема таких, компоненти яких істотно відрізняються між собою за молекулярною масою при суттєвому підвищенні експресності способу.

Поставлена задача вирішується тим, що здійснюють модифікацію поверхні чутливого елемента ППР сенсора, іммобілізацію на модифікованій поверхні рецепторного білка, вимірювання величини сигналу ППР, нанесення специфічного для досліджуваних біомолекул імуноглобуліну на поверхню сенсора з іммобілізованим рецепторним білком, додавання досліджуваного зразка, вимірювання величини зміни сигналу ППР, по якій судять про наявність у зразку досліджуваних біомолекул. Модифікацію поверхні чутливого елемента здійснюють розчином тіоціанату концентрації  $10^{-2}$ - $10^{-4}$ М, на поверхні іммобілізують білок A Staphylococcus aureus концентрації 20-50 мкг/мл, а досліджуваний зразок перед нанесенням на модифіковану поверхню сенсора попередньо змішують зі специфічним імуноглобуліном.

На Фіг. 1, де на осі абсцис позначено співвідношення специфічного імуноглобуліну і досліджуваного зразка, на осі ординат – відгук ППР, схематично зображено характерні особливості поверхневих комплексів різного складу за відсутності - структури b, c, d, і наявності - структури b", c", d" в системі додаткового чинника, здатного частково блокувати взаємодію між специфічним імуноглобуліном і досліджуваним зразком.

За відсутності молекул імуноглобуліну у досліджуваному розчині і у випадку, коли молекули зразка не взаємодіють з поверхнею, на поверхні відсутні будь-які структури (а), зміни сигналу ППР нема. Наявність невеликої кількості імуноглобуліну приводить до утворення структур типу (б), коли всього декілька молекул імуноглобуліну взаємодіють з поверхнею молекули зразка, що приводить до формування на поверхні структур малої щільності, оскільки загальна кількість молекул імуноглобуліну значно менша, ніж необхідно для максимально можливого покриття, спостерігається незначна зміна сигналу ППР. Збільшення співвідношення імуноглобулін/зразок приводить до зростання щільності структури при збереженні товщини і упаковки комплексів у поверхневій структурі аж до повного заповнення усіх можливих місць адсорбції молекул імуноглобуліну (в), зміна сигналу ППР сягає максимуму. Подальше збільшення співвідношення імуноглобулін/зразок призводить до конкуренції вільних молекул імуноглобуліну і комплексів імуноглобулін/зразок за місця зв'язування на поверхні (д) і, відповідно, зменшення величини зміни сигналу ППР аж до значення, характерного для поверхні, вкритої лише молекулами імуноглобуліну без молекул зразку. Таким чи-

ном, в координатах відгук ППР-імуноглобулін/зразок повинен спостерігатись максимум, що відповідає найбільш щільно упакованій структурі на поверхні чутливого елемента.

Для багатокомпонентної суміші, що включає в себе не лише молекули зразка та молекули імуноглобуліну, а й і молекули невеликого розміру, які потенційно можуть мати антивірусний ефект, зокрема частково блокувати рецепторні центри, що може впливати на щільність утвореної структури, а отже і на величину зміни сигналу ППР (Фіг.1 - структури b", c", d"), використання саме такого підходу є доцільним.

ПРИКЛАД. Як приклад конкретного виконання способу, що заявляється, розглянемо визначення вірусу тютюнової мозаїки (ВТМ) шляхом комплексоутворення зі специфічним імуноглобуліном за умов його попередньої обробки полісахаридом глюкуроноксилومانаном (GXM), що потенційно може мати антивірусний ефект за відсутності такої обробки. Вірус (100 мкг/мл), білок А (50 мкг/мл) та імуноглобулін (розведення від 1:25 до 1:1600) розчинялися у фосфатному буфері (PBS), ОХМ (300 мкг/мл) та тіоціанат калію (KNCS) ( $10^{-2}$ М) - у воді. Дослідження проводилися за допомогою скануючого SPR спектрометра "BioHelper-01" [4]. Скляні пластинки  $20 \times 20 \times 1$ мм з тонким (45-55 нм) шаром золота, нанесеним через адгезивний шар хрому (2нм), фіксувалися на підтримуючій скляній призмі за допомогою імерсійної рідини (поліфеніловий ефір), показник заломлення якої близький до показника заломлення скла (1,61) [5].

Попереднє змішування компонентів досліджуваної суміші здійснювалось за кімнатної температури ( $\sim +20^\circ$ ), вірус витримували з GXM протягом півгодини, після чого суміш змішували зі специфічним імуноглобуліном, і витримували ще півгодини.

Виміри здійснювались в проточному режимі, швидкість потоку складала 50 мкл/хв. Загальний хід експерименту представлено на Фіг.2, де на осі абсцис позначено час вимірювання (Time, s), на осі ординат - відгук ППР (steps). Обробка поверхні сумішшю HCl/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/H<sub>2</sub>O (15/15/70 об'єму) для видалення можливих органічних забруднювачів здійснювалась безпосередньо перед експериментом, модифікацію поверхні чутливого елемента здійснювали розчином тіоціанату калію концентрації  $10^{-2}$ М. Після промивання поверхні сенсора буфером на поверхні іммобілізували білок A Staphylococcus aureus концентрації 50 мкг/мл, після чого - досліджуваний зразок, попередньо змішаний зі специфічним імуноглобуліном.

За різницею у величині зміни сигналу ППР при наявності у суміші GXM і за його відсутності робили висновок про його вплив на утворення комплексу між вірусом та імуноглобулінами. Було показано, що оскільки для зразків вірусу, що попередньо витримувались з GXM, величини зміни сигналу ППР були меншими, ніж для тих, що не були піддані такій обробці, обробка вірусу глюкуроноксилومانаном зменшує його здатність взаємодіяти зі специфічними імуноглобулінами в широкому діапазоні концентрацій специфічних імуноглобулінів.

Завдяки нанесенню на поверхню сенсора комплексу, утвореного досліджуваним зразком і специфічним імуноглобуліном, експресність способу істотно збільшується.

Таким чином, технічне рішення, що заявляється, повністю вирішує поставлену задачу.

1. Homola J, Surface Plasmon Resonance Sensors for Detection of Chemical and Biological Species, Chem. Rev., 108 (2008), 462-493.

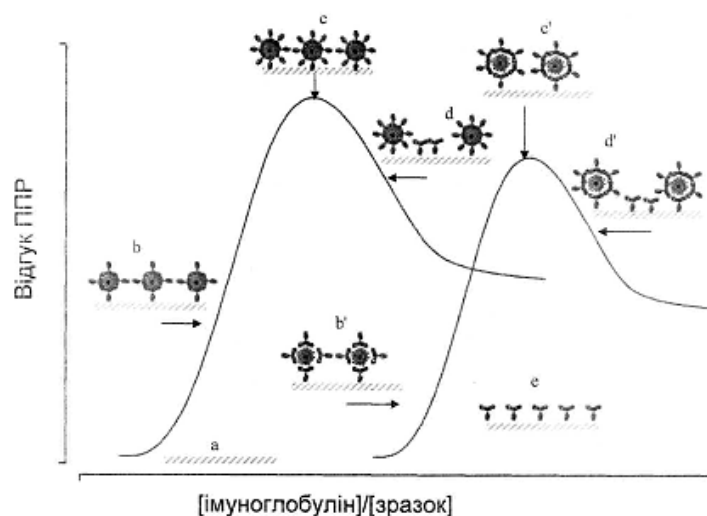
2. Lee HJ, Yan Y, Marriott G, Corn RM. Quantitative functional analysis of protein complexes on surfaces. J Physiol. 2005 Feb 15; 563 (Pt 1):61-71

3. Liedberg B., Lundström I., Stenberg E. Principles of biosensing with an extended coupling

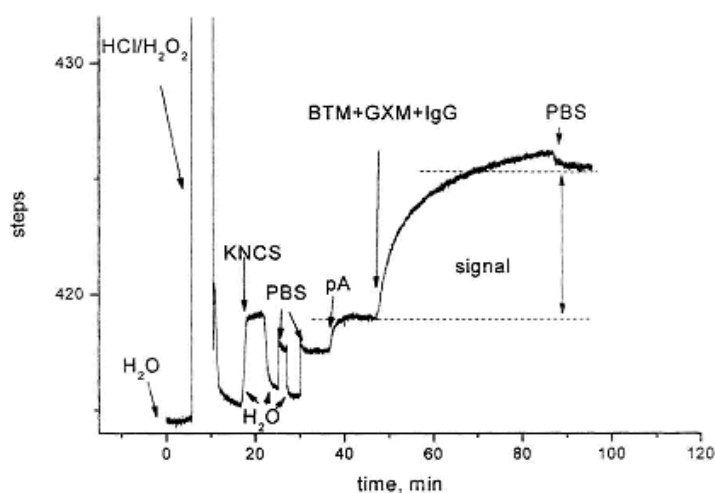
matrix and surface plasmon resonance // Sensors and Actuators B.-1993.-11. - P.63-72

4. B. Snopok, M. Yurchenko, L. Szekeley, G. Klein, E. Kasuba "SPR based immuno-capture approach for in vitro analysis of protein complex formation: mapping of MRS18-2 binding site on retinoblastoma protein", Anal. Bioanal Chem. 386, 2063-2073 (2006).

5. G.V. Beketov, Yu.M. Shirshov, O.V. Shynkarenko, V.L. Chegel "Surface plasmon resonance spectroscopy: prospects of superstate refractive index variation for separate extraction of molecular layer parameters" Sensors and Actuators B. 48, 432-438 (1998).



Фиг. 1



Фиг. 2