

УДК 578.74; 578.85; 543.45

П.М. Болтовець², Н.В. Нестерова¹

¹Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України,
вул. Академіка Заболотного, 154, Київ, 03143, Україна

²Інститут фізики напівпровідників ім. В.Є. Лашкарьова НАН України,
просп. Науки, 41, Київ, 03127, Україна

ПОВЕРХНЕВИЙ ПЛАЗМОННИЙ РЕЗОНАНС: ПІДХОДИ І ПЕРСПЕКТИВИ ВИКОРИСТАННЯ ДЛЯ ДОСЛІДЖЕННЯ ВІРУС-СПЕЦИФІЧНИХ ВЗАЄМОДІЙ

*В огляді наведено літературні дані щодо застосування методу поверхневого плазмонного резонансу для дослідження як окремих вірусних білків, так і інтактних вірусів. Викладено принцип методу, розглянуто його переваги і особливості його використання для дослідження вірусів. Особливу увагу приділено вимогам до сенсорної поверхні і способам її модифікації, зокрема, формуванню самозбираних моношарів амфіфільних органічних молекул, що містять функціональні групи для приєднання до поверхні, створенню проміжного захисного шару тіоціанату між білком та металом, формуванню навколо біомолекул сприятливого мікрооточення за допомогою декстранових гідрогелів, іммобілізації білків на поверхні сенсору за допомогою стрептавідин-біотинової системи, застосуванню білка *A Staphylococcus aureus*, як елемента чутливої структури сенсорної системи. Розглянуто підходи до посилення сигналу, які застосовуються при вірусологічних дослідженнях, зокрема, застосування мічених антитіл, використання конкурентного аналізу для детекції малих молекул, утворення складних комплексів як безпосередньо на поверхні сенсору, так і іммобілізації на поверхні сенсора попередньо отриманого комплексу рецептор–аналіт. Робиться висновок про те, що метод ППР містить у собі багаті потенційні можливості для дослідження різних аспектів взаємодії вірусів зі специфічними агентами, а також змін структури вірусів, викликаних різними зовнішніми факторами.*

К л ю ч о в і с л о в а: поверхневий плазмонний резонанс, віруси, вірусні білки.

В останні роки, неруйнівні (зокрема, біосенсорні) методи для виявлення біоспецифічних (зокрема, вірус-специфічних) взаємодій знаходять все більш широке застосування. Одним з найбільш широко застосовуваних серед них є метод поверхневого плазмонного резонансу – ППР (Surface Plasmon Resonance, SPR), що широко використовується для вирішення різноманітних задач, що стоять перед різними галузями сучасної біології і медицини, зокрема, експресного скринінгу білків [50], діагностики онкологічних захворювань [37], нанотерапії [41], дослідження біологічної ролі малих молекул [42].

Переваги систем, що базуються на цьому явищі, обумовлені його фізичним механізмом, що забезпечує:

- можливість дослідження міжмолекулярних взаємодій в реальному часі;
- можливість аналізу кінетики процесу;
- відсутність необхідності у мічених реактивах.

Одним з найбільш перспективних напрямків використання методу ППР є дослідження вірус-специфічних взаємодій – як на рівні окремих макромолекул, так і на рівні інтактного вірусу. В огляді [5] нами було продемонстровано, що метод ППР застосовується досить широко для дослідження різних груп вірусів. У даній роботі буде розглянуто методи і підходи, які роблять ці дослідження більш ефективними і пристосованими до вирішення конкретних задач у вірусології.

1. Принцип методу

Поверхневі плазмони (плазмон-поляритони) являють собою поперечно-поперечні електромагнітні хвилі, що поширюються на межі між двома середовищами, одне з яких є металом, інше – діелектриком. Явище поверхневого плазмонного резонансу полягає у взаємодії фотонів світла з електронами в тонкій металевій плівці (як правило, золотій або срібній) на поверхні діелектрика (наприклад, скла). Промінь світла проходить через підкладку і відбивається від межі між підкладкою і зовнішнім середовищем. Залежно від типу спектрометра може використовуватись як монохроматичне світло (вимірюється залежність інтенсивності відбитого світла від величини кута), так і поліхроматичне (вимірюється залежність інтенсивності від довжини хвилі при фіксованому куті). В умовах повного внутрішнього відбиття світло, що падає на межу призми з нанесеною тонкою плівкою металу, збуджує поверхневі поляритони. Це спостерігається як різке зменшення інтенсивності відбитого світла з мінімумом при певному куті, що називається кутом поверхневого плазмонного резонансу, Q_{SPR} [28].

Позиція мінімуму на кривій відбиття залежить не лише від параметрів металу, але і, що більш важливо для використання цього явища в дослідницьких цілях, від діелектричних властивостей середовища поблизу межі, зокрема, показника заломлення n . У випадку фізичних перетворювачів, які використовують ефект поверхневого плазмонного резонансу, фізичними параметрами, вимірюваними при протіканні реакції рецептор-аналіт, є зміна коефіцієнта заломлення Δn і товщина реакційного шару d , знаючи які, можна визначити концентрацію речовини на поверхні за формулою:

$$\Gamma = d(n_a - n_0) \times (dn/dc)^{-1},$$

де Γ – концентрація речовини на поверхні; n_a і n_0 – ефективні коефіцієнти заломлення адсорбованого шару і розчину відповідно; d – товщина адсорбованого шару і інкремент dn / dc становить $\approx 0,19 \text{ см}^3/\text{г}$ для більшості шарів, утворених біологічними молекулами [5]. Така зміна коефіцієнта заломлення спричиняє зсув положення мінімуму кривої ППР Q_{SPR} , який відповідає найбільш повному перетворенню енергії падаючої хвилі в поверхневий поляритонний стан за даних умов.

Отже, кут мінімуму інтенсивності відбитого плоскополяризованого світла є функцією маси (кількості) молекул на поверхні. Таким чином, вимірюючи цей кут, можна досліджувати процеси адсорбції–десорбції молекул на поверхні металевої плівки (рис. 1).

Виміри зміни сигналу ППР, що відповідає зміні концентрації (маси) молекул на поверхні сенсорного елемента, здійснюються у кутових одини-

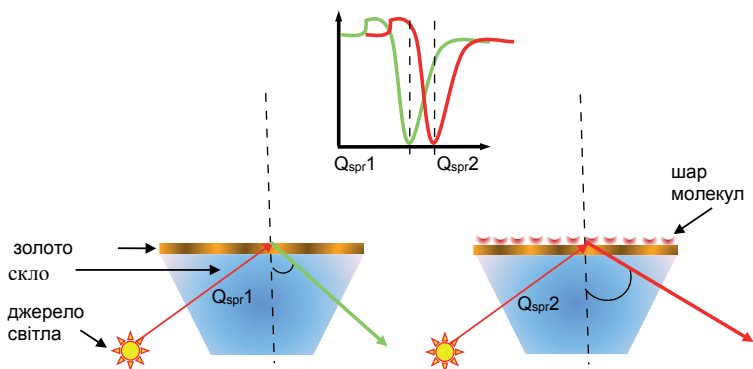


Рис. 1. Принцип детекції на основі поверхневого плазмонного резонансу

цях протягом певного проміжку часу і представляють як графік залежності інтенсивності сигналу від часу. Базовий рівень сигналу визначається оптичними властивостями середовища, і всі подальші виміри здійснюються відносно нього.

2. Способи модифікації поверхні сенсора

Надзвичайно важливим моментом при дослідженні вірусів і їх взаємодій з вірус-специфічними макромолекулами є коректна іммобілізація рецепторних центрів для подальшої детекції вірусів. Іммобілізації рецепторних центрів на чутливій поверхні сенсора може бути досягнуто різними методами, однак до всіх них висуваються певні вимоги:

(i) в результаті процесу іммобілізації повинен утворитись стабільний шар біомолекул;

(ii) біологічний компонент не повинен руйнуватись у процесі іммобілізації;

(iii) активність ферментів і зв'язуюча здатність антитіл не повинні істотно зменшуватись у результаті іммобілізації;

(iv) у випадку фермент-субстратної взаємодії не повинна змінюватись субстратна специфічність іммобілізованого компонента [30].

Звичайно, адсорбція на необробленій поверхні не є специфічною. Можна лише припускати, що більш високомолекулярні компоненти суміші білків будуть адсорбуватися більш повільно, але зв'язок при цьому утворюватиметься більш міцний, ніж у випадку низькомолекулярних сполук і для деяких білків адсорбція може бути вкрай низькою при наявності електростатичного бар'єра.

Практично для будь-якого застосування поверхня повинна бути модифікована певним чином для надання їй селективності до певного типу детектованих молекул. Модифікована поверхня може являти собою як дискретні іммобілізовані рецепторні молекули, так і моношар зі спеціальними селективними властивостями.

2.1. Самозбирані моношари

Багато які поверхні можуть бути модифіковані шляхом самозбірки на них амфіфільних органічних молекул, що містять функціональні групи для приєднання до поверхні. Найбільш широко застосовуваною системою

такого типу є тіоли на поверхні золота, що утворюють щільний упорядкований моношар на поверхні металу. Молекула, основою якої є ланцюжок SH-груп, прикріплюється до поверхні металу SH-кінцем (головою). Хвостові групи в різних тіолах різні. Використовуючи тіолові молекули з різними хвостовими групами, можна змінювати функціональні властивості поверхні в широких межах [13]. Хімічна модифікація хвостових груп тіолах може здійснюватись і після формування моношару. Можливе також створення змішаних моношарів з тіолах з різними хвостовими групами шляхом формування молекулярного градієнту. Таким чином створюються сприятливі умови для іммобілізації біомолекул, у тому числі, вірус-специфічних, на поверхні сенсора.

Зокрема, самозбирані моношари додекантіолу були використані в роботі [8] для розробки імуносенсора на основі ППР з використанням антигена вірусу лейкозу для експресної діагностики цього захворювання. Автори підкреслюють, що імуносенсорний аналіз є більш чутливим, швидким і простим порівняно з традиційним методом – реакцією імунодифузії, що дозволяє проводити скринінг лейкозу у тварин безпосередньо в господарствах при мінімальному розведенні сироваток крові 1:500.

Critchley and Dimmock [21] успішно застосували самозбирані моношари октадекантіолу (чип HPA, Biacore) для дослідження методом ППР взаємодії цільного вірусу грипу А з штучно створеною на поверхні сенсора ліпідною мембраною. Автори вважають, що застосування цього методу істотно допоможе при розробці моделі для дослідження ефективності інгібіторів, що діють на стадію зв'язування вірусу з рецепторами.

Змішані моношари тіолах з різною довжиною ланцюга (відповідно 11 і 16) і різними функціональними групами (відповідно етиленглікольна і карбоксильна) було застосовано в роботі [46] для детекції антитіл проти вірусу Епштейна-Бар, у тому числі, і в сироватці крові.

Цікавий варіант модифікації сенсорної поверхні за допомогою полі(олігоетиленгліколь)метакрилату для діагностики різних стадій інфекції вірусу Епштейна-Бар у клінічних зразках було запропоновано в роботі [38].

2.1. NCS (тіоціанат)

Оригінальним підходом до модифікації поверхні сенсора є створення проміжного захисного шару між білком та металом, що полягає в попередній обробці поверхні металу водним розчином солей тіоціанату (NCS⁻). Інтерес до цієї молекули викликаний з одного боку тим, що у водному розчині утворюється іон NCS⁻ здатний, завдяки наявності атома сірки, утворювати зв'язок із золотом, подібний до того, який утворюється при формуванні на поверхні самозбираного моношару тіолах. З іншого боку – при подібній обробці на поверхні золота формується заряджений шар з ефективним негативним зарядом, утворений CN⁻ угрупованнями, що дозволяє іммобілізувати білкові молекули на поверхні сенсора орієнтовано через позитивно заряджені амінокислотні угруповання за допомогою іонообміну з відповідними малими протийонами. Для досліджень в області вірусології цей підхід було апробовано в роботі [15], в якій він використовувався для дослідження інфікування вірусом тютюнової мозаїки не характерного для нього господаря – водорості *Bracteococcus minor*. У роботі [1] даний підхід було

застосовано для дослідження вірусної інфекції в динаміці на моделі вірусу тютюнової мозаїки – *Nicotiana tabacum*. Носач та ін. [6] іммобілізували на обробленій тиоціанатом поверхні аденовірусний гексон та деградований аденовірус для подальшої детекції антивірусних антитіл безпосередньо в клінічному матеріалі. В роботі [3] модифікація поверхні сенсора тиоціанатом була успішно застосована для детекції вірусомісного матеріалу в зразках уражених рослин за умов високого рівня неспецифічного зв'язування.

2.2. Декстрини

Для створення навколо біомолекул штучного мікрооточення, сприятливого для їх функціонування, застосовуються гідрофільні полімери, зокрема, карбоксиметилдекстрини. Іммобілізація відбувається за рахунок електростатичних сил притягання, що виникають між негативно зарядженим гідрогелем і позитивно зарядженими білковими молекулами, як показано на рис. 2.

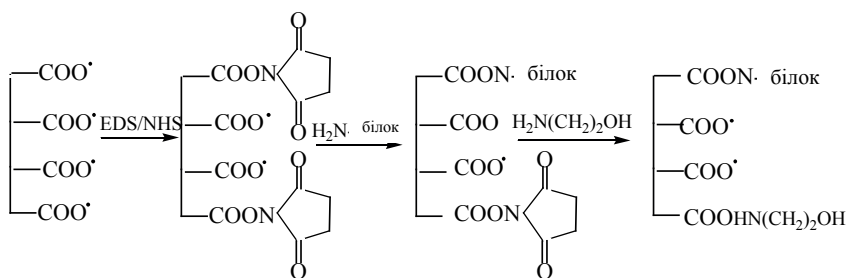


Рис. 2. Іммобілізація білка на карбоксиметилдекстрановому матриксі

Моношар декстрану складає приблизно 100–200 нм зі щільністю 0,1 мкг/см³. Ланцюги декстрану ковалентно зв'язуються через бар'єролінкерний шар, який разом з декстраном надає поверхні гідрофільного характеру. Одна з молекул, що беруть участь у біоспецифічній взаємодії, ковалентно приєднується до матриксу. Це забезпечує більш специфічне зв'язування порівняно зі зв'язуванням безпосередньо з металевою поверхнею і більшу іммобілізаційну здатність біомолекул. Крім того, іммобілізація біомолекул на гнучких декстранових ланцюгах сприяє більшій доступності біомолекул, які, до того ж, можуть іммобілізуватись і взаємодіяти по всій довжині декстранового ланцюга. Карбоксильні групи декстранів забезпечують стабільну хімічну іммобілізацію різних лігандів одним шляхом, а також можливість регенерації активної поверхні. Змінюючи рН розчинника, можна зробити їх зв'язування на негативно зарядженому матриксі більш стабільним, навіть при порівняно невисокій концентрації білка в розчині. Суттєвим також є те, що гідрофільна поверхня з високорозчинними полімерами декстранів робить умови для дослідження біоспецифічних взаємодій більш сприятливими [43].

Незважаючи на певні недоліки, згаданий спосіб модифікації поверхні є найбільш широковживаним, а отже і публікацій з його використанням для дослідження вірусі-специфічних взаємодій – найбільше, оскільки саме він був взятий на озброєння компанією Viacore, яка є безсумнівним лідером у галузі біосенсорних технологій.

Alam et al. [10] застосовували даний метод для дослідження властивостей синтетичних пептидів – можливих кандидатів для розробки вакцини проти СНІДу.

Важливим аспектом застосування декстранової поверхні для досліджень методом ППР у вірусології є також експрес-тестування ефективності і імуногенності вакцинних препаратів на стадії їх розробки. Зокрема, Verma et al. [49] за допомогою цього підходу показали, що олігомерні рекомбінантні гемаглютиніни HA1 продукують більше антитіл з перехресною нейтралізацією і більш високим рівнем зв'язування антитіл з вищою авідністю і кращим співвідношенням IgG/IgM, ніж мономерні HA1 і вакцини SU-H5N1. Дослідженню ефективності антивірусних препаратів присвячена і робота Rosenberg et al [40], в якій досліджується афінність амантадину та ремантадину щодо іонних каналів. Авторами показано, що цей клас речовин здатен зв'язуватись з каналами M2 з двома різними афінностями – 10^{-4} і 10^{-7} M, що свідчить про те, що для зв'язування доступні два сайти.

Цікавий варіант застосування декстарнової поверхні описано Critchley et al. в [22], де автори використали декстрановий шар, що містив ліпофільні молекули для формування подвійного ліпідного шару для дослідження взаємодій пріонів з ліпідними мембранами. Автори розглядають гіпотезу про можливу роль зв'язування з мембраною у трансформації нормальної клітинної форми PrP^C у патогенну PrP^{Sc} і можливості методу ППР для дослідження цього процесу.

2.3. Стрептавідин-біотин

Досить широко використовується для іммобілізації різних білків на поверхні сенсора і стрептавідин-біотинова система. Висока афінність авідину чи стрептавідину до біотину забезпечує специфічний зв'язок між реагентами. Хоча даний підхід і не позбавлений недоліків – зокрема, при використанні цієї системи може спостерігатися високий рівень неспецифічного зв'язування, а зв'язування з біотином може впливати на антигенну специфічність [35], він досить успішно використовується для дослідження вірус-специфічних взаємодій, зокрема, для іммобілізації аптамерів. Так, біотинильовані ДНК-аптамери, іммобілізовані на вкритій стрептавідином поверхні сенсора, були використані в [12] для експресної детекції високопатогенного штаму вірусу пташиного грипу H5N1 в зразках пташиної слини.

У роботі [44] на модифікованій стрептавідином поверхні сенсора іммобілізувався вкритий гепаріном біотинильований альбумін, тобто, система виконувала фактично дві функції – іммобілізацію рецептора на поверхні і посилення сигналу від нього, оскільки сама молекула гепарину занадто мала, щоб викликати достатню для достовірної детекції зміну сигналу. Цю процедуру було застосовано для картування ділянок білка контролю комплекменту вірусу вакцини (родина *Poxviridae*). Автори підкреслюють, що інформация щодо кінетичних параметрів взаємодії цього білка з компонентами системи комплекменту, отримана методом ППР, дозволяє краще зрозуміти динаміку вірусної реплікації.

Meng et al. [33], іммобілізувавши у такий спосіб інтерлейкін-зв'язуючий білок вірусу віспи, дослідили вплив точкової заміни певних амінокислот у людських інтерлейкінах на їхню здатність зв'язуватись з ним.

Шляхом аналізу кінетики взаємодії між нуклеокапсидним білком коронавірусу людини OC43 і його біотинильованою РНК, іммобілізованою на вкритій стрептавідином поверхні сенсора, Huang et al. [29] встано-

вили, що цей процес не лімітується масопереносом, оскільки кінетичні параметри цієї взаємодії (зокрема, константа асоціації) не залежать від швидкості потоку і щільності шару рецепторів на поверхні сенсора.

Fu et al. [23], іммобілізуючи на вкритій стрептавідином сенсорній поверхні біотинильовані молекули великого комплексу гістосумісності, за допомогою метода ППР досліджували механізми зв'язування аденовірусних білків різних серотипів і підгруп з молекулами великого комплексу гістосумісності. Ними було показано, що білки аденовірусу E3-19K демонструють алейну специфічність щодо HLA-A і -B молекул.

2.4. Білок A *Staphylococcus aureus*

Завдяки притаманній йому стереокомплементарності до Fc - фрагменту імуноглобулінів класу G людини і свавців, білок A *Staphylococcus aureus* широко застосовується в різних імунохімічних методиках. Застосування білка A, як елементу чутливої структури сенсорної системи, що використовує, зокрема, ефект поверхневого плазмонного резонансу, представляє великий інтерес, оскільки дозволяє забезпечити орієнтовану іммобілізацію рецепторних центрів на поверхні сенсора. Важливість правильного підбору специфічних імуноглобулінів для подальшої детекції вірус-специфічної реакції в такій системі підкреслюється в [2].

Так, у роботі [7] розглядаються перспективи експресного виявлення методом ППР-комплексу аденовірусного білка – гексона з моноспецифічними антитілами за допомогою орієнтованої іммобілізації останніх на поверхні золота шляхом застосування як орієнтуючого агента білка A *Staphylococcus aureus*. Автори підкреслюють важливість розвитку запропонованого підходу для подальшого виявлення аденовірусного антигена в неочищених матеріалах – культуральній рідині та у клінічних матеріалах, а також вивчення можливості виявлення методом ППР специфічних антитіл у сироватках крові хворих при іммобілізації на поверхні золота очищеного гексона аденовірусу.

У роботі [34] з використанням білка A розглянуто різні підходи до детекції антигену ВЕБ і відповідних специфічних антитіл. Було також здійснено виявлення специфічних до ВЕБ антитіл у сироватках хворих на інфекційний мононуклеоз, що є важливим для подальшого впровадження методу у клінічну практику.

Цікаве порівняння сенсорних поверхонь на основі білка A *Staphylococcus aureus* і стрептококового білка G для детекції вірусу пташиного лейкозу наведено в [20].

Таким чином, різні способи модифікації поверхні сенсора дають можливість ефективно розв'язувати різноманітні задачі дослідження вірус-специфічних взаємодій.

3. Посилення сигналу

Для посилення сигналу ППР можуть використовуватися ті ж підходи, що використовуються в імуноферментному аналізі, зокрема, застосування мічених антитіл. Крім того, комплексоутворення з різними мікро- і наночастинками часто слугує для посилення сигналу від біологічно важливих молекул малого розміру.

3.1. Мітки

Alterman et al. [11] за допомогою методу ППР провели порівняльне дослідження інгібіторів протеази ВІЛ. При цьому ними було розглянуто два можливі підходи до вирішення поставленої задачі. На першій стадії дослідження на поверхні сенсора іммобілізувались молекули протеази, після чого додавався зразок. Сайти зв'язування, що залишилися вільними, блокувались міченим біотином субстратом, з яким зв'язувались специфічні до біотину антитіла. Зміщення мінімуму ППР у відповідь на приєднання цих антитіл і слугувало кінцевим сигналом. Другий варіант полягав у іммобілізації власне інгібітора, після чого проводилась інкубація з ферментом. При цьому вдалося детектувати концентрації молекул у межах від 10^{-10} М до 10^{-5} М у першому випадку і від 10^{-9} М до 10^{-7} М – у другому.

Використовуючи мічений клітинний глікопротеїн ICAM-1 (intracellular adhesion molecule), який служить рецептором для риновірусів, Casanovas et al. [19] досліджували методом ППР взаємодію між риновірусом серотипу 3 і розчинною формою згаданого глікопротеїну. Вірусні частки були іммобілізовані безпосередньо на карбоксиметилдекстарновій поверхні, після чого через комірку пропускався розчин рецептора. Вірус залишався інтактним протягом 12 циклів асоціації-дисоціації при 20 °С, однак при підвищенні температури до 30 °С взаємодія з рецептором призводила до руйнування вірусу, що проявилось як зменшення сигналу. Було показано, що взаємодія між вірусом і рецептором є низькоафінною, з константою дисоціації мікромольного порядку. Авторами підкреслюється, що за допомогою даного методу можна детектувати зміни вірусної структури, що відбуваються у процесі взаємодії з рецептором. Це свідчить про те, що він може бути застосований для детекції зміни субодиничного складу макромолекулярних комплексів, яка відбувається в результаті біоспецифічних взаємодій.

Функціоналізація наночастинок, наприклад, магнітних, специфічними білковими молекулами з утворенням комплексу дозволяє використовувати їх і для очищення або екстракції біомолекул зі складних сумішей, як це було запропоновано в [32]. У даній роботі шляхом іммобілізації білка А *Staphylococcus aureus*, що селективно зв'язує Fc-фрагмент імуноглобулінів, був отриманий магнітний наносорбент (рис. 3), який селективно взаємодіє з імуноглобулінами.

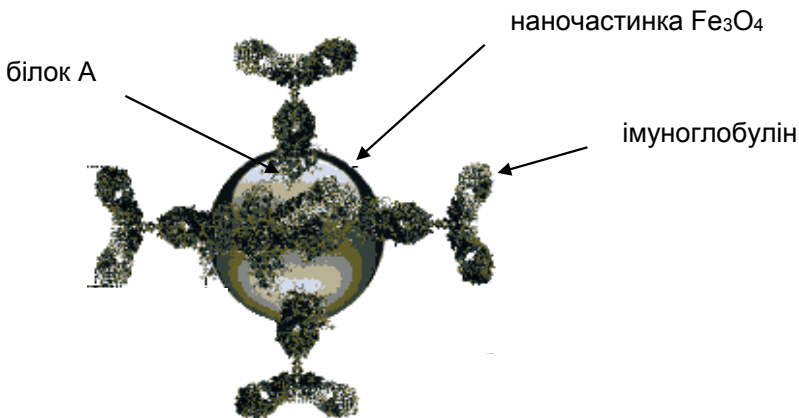


Рис. 3. Схематична будова нанорозмірного рецепторного блоку, отриманого шляхом іммобілізації білка А *Staphylococcus aureus* на магнітній наночастиці ([32])

Авторами продемонстровано можливість селективного вилучення імуноглобулінів з біологічних середовищ із застосуванням отриманого сорбенту з їх подальшим використанням, зокрема, для детекції специфічних антигенів (у даному випадку, вірусу тютюнової мозаїки) за допомогою методу поверхневого плазмонного резонансу.

Оригінальний підхід до посилення сигналу було продемонстровано в [4] при дослідженні малого за розміром капсидного білка Х-вірусу картоплі. Оскільки білок з малою молекулярною масою спричиняє занадто малу зміну сигналу ППР, його було посилено за рахунок тих самих специфічних антитіл, за допомогою яких було здійснено зв'язування білка з розчину на поверхні сенсора. Контрольний експеримент показав відсутність зміни сигналу у випадку відсутності цього білка в розчині.

3.2. Конкурентний аналіз

При дослідженні малих молекул методом ППР основною проблемою є недостатня зміна сигналу у відповідь на їх іммобілізацію на поверхні сенсора або взаємодію з іммобілізованими лігандами. Для детекції такого роду взаємодій використовується конкурентний аналіз, в якому два типи лігандів (антиген Ag, у даному випадку – вільний аналіт і його іммобілізований аналог), конкурують за зв'язування з однією і тією ж ділянкою на рецепторі (в імуноспецифічному аналізі це два епітопи антитіл, селективних щодо розглянутого антигена) [31].

Використання конкурентного аналізу для досліджень за допомогою методу ППР дозволило Urban et al. визначити роль окремих ділянок білка DrgеS вірусу гепатиту В качок у зв'язуванні з клітинним рецептором і запропонувати модель цього зв'язування [45]. Подібний підхід було застосовано в роботі [26] для дослідження взаємодії Y-вірусу картоплі зі специфічними моноклональними антитілами. Використовувався він і для розробки підходу до вирішення такої нагальної задачі, як експресний скринінг потенційних інгібіторів вірусу імунодефіциту людини [36]. У роботі [48], за допомогою конкурентного аналізу методом ППР, було показано перспективність використання клітинних рецепторів С-типу для профілактики вірусних інфекцій, зокрема, лихоманки Денге.

3.3. Комплексоутворення

Для посилення сигналу і підвищення експресності методу можливе як утворення складних комплексів безпосередньо на поверхні сенсора, так і іммобілізація на поверхні сенсора попередньо отриманого комплексу рецептор–аналіт [18] Кінетику іммобілізації такого комплексу докладно розглянуто в роботі [16].

Особливий інтерес представляють випадки, коли компоненти комплексу не просто слугують для посилення сигналу, а є елементами живої системи, які впливають один на одного в природних умовах. Зокрема, формування комплексів, що включають більше двох білків, є вкрай важливим для багатьох клітинних процесів, включаючи передачу сигналів, контроль транскрипції, формування цитоскелету. Не менш важливими є і дослідження комплексів нуклеїнова кислота–білок, які мають особливе значення у вірусології.

Так, у роботі [24] безпосередньо на поверхні сенсора формувалася комплекс з ДНК, комплементарної РНК вірусу тютюнової мозаїки, власне РНК і агрегатів вірусного капсидного білка. При цьому було зазначено, що для утворення комплексу необхідні виключно агрегати білка з константою седиментації 20S.

Beerheide et al. [14] попередньо інкубували вірусний білок з досліджуваними потенційними інгібіторами для скринінгових досліджень при визначенні терапевтично перспективних органічних (зокрема, сірковмісних) сполук, що інактивують онкопротеїн Е6 папіломавірусу 16 людини (родина *Papovaviridae*), асоційований з формуванням новоутворень, що дозволило не лише відібрати сполуки з найбільш високою реактивністю, а й встановити зв'язок між наявністю певних фрагментів у складі молекули і її інгібіторними властивостями.

У роботі [17] за допомогою утворення комплексу частинок вірусу тютюнової мозаїки і полісахариду глюкуроксиманнана методом поверхневого плазмонного резонансу досліджується інгібуєчий ефект останнього на біологічну активність вірусу. При цьому використовується оригінальний підхід, при якому основним параметром, що впливає на відповідь сенсора, є не товщина шару аналіту, специфічно зв'язаного з шаром іммобілізованого рецептора, а його щільність (рис. 4).

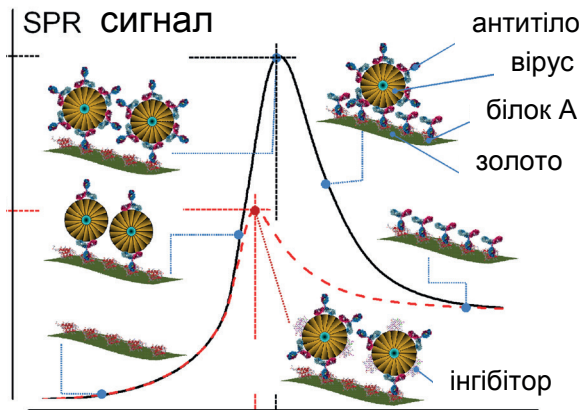


Рис. 4. Дослідження інгібуєчого ефекту малих молекул методом ППР шляхом іммобілізації на поверхні сенсора їх комплексів з досліджуваними макромолекулами ([17])

У згадуваній вище роботі [22] пропонується цікавий підхід, при якому на модифікованій стрептавідином поверхні сенсора ППР формується комплекс з іммобілізованого біотинильованого вірусу грипу, специфічних антитіл, валентність яких вивчається, і неміченого вірусу, що перебуває в розчині.

4. Сумісне використання та порівняння з іншими методами

Як метод відносно новий, поверхневий плазмонний резонанс досить часто порівнюється в дослідженнях з іншими методами. При цьому різні автори підкреслюють різні аспекти його використання, які допомагають отримати інформацію, недоступну іншими методами, а також важливість комбінованого використання різних методів дослідження.

Так, Van Cott et al. [47] вивчали взаємодії різних конформаційних форм оболонкового білка gp120 з моноклональними антитілами. Зокрема, їм вдалося розділити антитіла, що взаємодіють з двома формами згаданого білка: CD4-зв'язуючою і CD4-незв'язуючою. Авторами підкреслюється перевага даного методу перед традиційним методом ІФА, використовуючи який важко контролювати кількість адсорбованого на плашках білка і запобігти істотному руйнуванню структури білка в процесі адсорбції.

Rojo et al. [39], порівнюючи у своїй роботі методи ППР і ІФА щодо можливості застосування у клінічній практиці для тестування сироваток хворих на гепатит G, збудник якого також відноситься до флавівірусів, за допомогою синтетичних вірусних пептидів показали добре узгодження між методами.

Gruen et al. [25] у своїй роботі порівнювали можливості імуноферментного аналізу і ППР на прикладі нейрамінідази вірусу грипу. Автори досліджували здатність різних варіантів нейрамінідази вірусу грипу G70C з одиничними амінокислотними замінами зв'язуватися з моноклональними антитілами NC-10 і NC-41 і їх іммобілізованими Fab-фрагментами. Незважаючи на деякі розходження в результатах, у цілому було отримано гарну відповідність між методами. Авторами особливо підкреслюється той факт, що при використанні більш традиційного методу ІФА частина антигенів зв'язується з поверхнею таким чином, що їхні епітопи виявляються недоступними для антитіл, у той час як використання методу ППР дозволяє вирішити цю проблему.

Naro et al. [27] використовували метод ППР для розробки вакцини проти вірусу гепатиту А. Порівнюючи метод ППР з методом ІФА для визначення афінності антитіл проти вірусних білків, отриманих за допомогою введення ліпосом (на відміну від традиційного ад'юваната Фрейнда), автори відмічають добру кореляцію між результатами, отриманими цими двома методами і зазначають, що обидва методи придатні для оцінки авідності антисироваток, отриманих різними методами.

Важливою для подальшого застосування у клінічній практиці є робота [9], в якій вивчалась можливість використання в дослідженнях інтактних представників родини *Adenoviridae*. Автори застосували систему на основі ППР для детекції і ізолювання анти-аденовірусних антитіл у сироватці крові. При цьому на сенсорній поверхні іммобілізувались інтактні вірусні частки, цілісність яких було підтверджено даними електронної мікроскопії. При цьому іммобілізація інтактного вірусу створює сприятливі умови для взаємодії антитіл з усіма вірусними компонентами. Автори особливо підкреслюють піонерський характер роботи для клінічного моніторингу.

Таким чином, метод ППР дозволяє отримувати різноманітну інформацію про вірусні білки, їх структурні зміни, викликані впливом різних факторів, взаємодією зі специфічними агентами. При цьому дані, одержані методом ППР, добре погоджуються з даними, одержуваними за допомогою ІФА; метод не поступається традиційним методам у чутливості і експресності.

П.Н. Болтовец², Н.В. Нестерова¹

¹Институт микробиологии и вирусологии им. Д.К. Заболотного НАН Украины,
ул. Академика Заболотного, 154, Киев, 03143, Украина

²Институт физики полупроводников им. В.Е. Лашкарева НАН Украины,
просп. Науки, 41, Киев, 03127, Украина

ПОВЕРХНОСТНЫЙ ПЛАЗМОННЫЙ РЕЗОНАНС: ПОДХОДЫ И ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ ВИРУС-СПЕЦИФИЧЕСКИХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ

Резюме

В обзоре приведены литературные данные по применению метода поверхностно-го плазмонного резонанса для исследования как отдельных вирусных белков, так и интактных вирусов. Изложены принципы метода, рассмотрены его преимущества и особенности его использования для исследования вирусов. Особое внимание уделено требованиям к сенсорной поверхности и способам ее модификации, в частности, формированию самособирающихся монослоев амфифильных органических молекул, содержащих функциональные группы для присоединения к поверхности, созданию промежуточного защитного слоя тиоцианата между белком и металлом, формированию вокруг биомолекул благоприятного микроокружения с помощью декстрановых гидрогелей, иммобилизации белков на поверхности сенсора с помощью стрептавидин-биотиновой системы, применению белка *A Staphylococcus aureus*, как элемента чувствительной структуры сенсорной системы. Рассмотрены подходы к усилению сигнала, применяемые при вирусологических исследованиях, в частности, применение меченых антител, использование конкурентного анализа для детекции малых молекул, образование сложных комплексов как непосредственно на поверхности сенсора, так и иммобилизация на поверхности сенсора предварительно полученного комплекса рецептор–аналит. Делается вывод о том, что метод ППР содержит в себе богатые потенциальные возможности для исследования различных аспектов взаимодействия вирусов со специфическими агентами, а также изменений структуры вирусов, вызванных различными внешними факторами.

Ключевые слова: поверхностный плазмонный резонанс, вирусы, вирусные белки.

P.M. Boltovets², N.V. Nesterova¹

¹D.K. Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, NAS of Ukraine,
154 Acad. Zabolotnogo St., Kyiv, 03143, Ukraine

²V.Ye. Lashkaryov Institute of Semiconductor Physics, NAS of Ukraine,
41 Nauky Ave., Kyiv, 03127, Ukraine

SURFACE PLASMON RESONANCE : APPROACHES AND PERSPECTIVES OF APPLICATION FOR VIRUS-SPECIFIC INTERACTIONS INVESTIGATIONS

Summary

In the review the published data on the use of surface plasmon resonance methods for the study of individual viral proteins as well as intact viruses are reviewed. The principles of the method, its benefits and peculiarities of its use to study viruses are introduced. Particular attention is paid to the requirements to the sensor surface and the methods of its modification, including the formation self assembled monolayers of amphiphilic

organic molecules containing functional groups to connect to the surface, creating of the intermediate protective thiocyanate layer between protein and metal, forming of the favorable microenvironment using dextran hydrogels around biomolecules, immobilization of proteins on the surface of the sensor using streptavidin-biotin system, use of protein *A Staphylococcus aureus* as an sensitive element of the sensory system structure. The approaches to enhance the signal used in virological studies, including the use of labeled antibodies, using competitive analysis for the detection of small molecules, the formation of a complex directly on the sensor surface, and immobilization on the surface of the sensor previously obtained complex receptor–analyte are considered. The conclusion is that the SPR method contains many potential opportunities to study various aspects of the interaction of viruses with specific agents, and changes in the structure of viruses caused by various external factors.

К е у w o r d s: surface plasmon resonance, viruses, viral proteins.

1. Болтовец П.М., Снопок Б.А., Шевченко Т.П., Дяченко Н.С., Ширишов Ю.М. Оптоэлектронные преобразователи для детекции биологически опасных агентов // Петербургский журнал электроники. – 2004. – № 1. – С. 51–58.
2. Болтовец П.М., Бойко В.Р., Іве М., Снопок Б.А., Ширишов Ю.М., Дяченко Н.С. Дослідження взаємодії між імуноглобулінами та виявлення вірусних антигенів у клітинних гомогенатах методом поверхневого плазмонного резонансу // Мікробіологічний журнал. – 2003. – Т. 65, № 4. – С. 51–61.
3. Болтовец П.М., Бойко В.Р., Снопок Б.А. Детекція вірусних антигенів у рослинному матеріалі з симптомами вірусного ураження // Вісник Київського Університету. – 2011. – № 57. – С. 28–30.
4. Болтовец П.М., Дяченко Н.С., Діденко Л.Ф., Пархоменко Н.Й., Максименко Л.О., Мандріка Т.Ю., Снопок Б.А., Ширишов Ю.М. Імуноспецифічне визначення Х-вірусу картоплі з використанням поверхневого плазмонного резонансу // Мікробіол. журн. – 2005. – 67, № 5. – С. 58–63.
5. Болтовец П.М., Нестерова Н.В. Застосування методу поверхневого плазмонного резонансу у вірусологічних дослідженнях // Мікробіол. журн. – 2006. – 68, № 3. – С. 86–98.
6. Носач Л.М., Болтовец П.М., Загородня С.Д., Повниця О.Ю., Головань А.В., Нетреба Н.І., Добровичська Л.І. Виявлення антиаденовірусних антитіл методом поверхневого плазмонного резонансу Український біохімічний журнал. – 2009. – № 4. – С. 39–47.
7. Носач Л.М., Болтовец П.М., Повниця О.Ю., Жовновата В.Л., Захаренко О.М., Снопок Б.А., Ширишов Ю.М., Дяченко Н.С. Дослідження взаємодії антиген–анти-тіло аденовірусу людини методом поверхневого плазмонного резонансу // Мікробіол. журн. – 2005. – 67, № 4. – С. 58–64.
8. Пирогова Л.В., Стародуб М.Ф. Імобілізація антигену ретровірусу лейкозу великої рогатої худоби на поверхні імуного біосенсора // Біотехнологія. – 2008. – 1, № 2. – С. 52–58.
9. Abad L.W., Neumann M., Tobias L., Obenauer-Kutner L., Jacobs S., Cullen C. Development of a biosensor-based method for detection and isotyping of antibody responses to adenoviral-based gene therapy vectors // Analytical Biochemistry. – 2002. – 310, N 1. – P. 107–113.

10. *Alam S.M., Paleos C.A., Liao H.X., Scarce R., Robinson J., Haynes B.F.* An Inducible HIV Type 1 gp41 HR-2 Peptide-Binding Site on HIV Type 1 Envelope gp120 // *AIDS Res. Hum. Retrovir.* – 2004. – 20, N 8. – P. 836–845.
11. *Alterman M., Sjöbom H., Säfsten P., Markgren P.-O., Danielson U.H., Hämäläinen M., Löfås S., Hultén J., Classon B., Samuelsson B., Hallberg A.* P1/P1' modified HIV protease inhibitors as tools in two new sensitive surface plasmon resonance biosensor screening assays // *European Journal of Pharmaceutical Sciences.* – 2001. – 13, N 2. – P. 203–212.
12. *Bai H., Wang R., Hargis B., Lu H., Li Y.* A SPR aptasensor for detection of avian influenza virus H5N1 // *Sensors.* – 2012. – 12, N 9. – P. 12506–12518.
13. *Bain C.D., Troughton E.B., Tao Y.-T., Evall J., Whitesides G.M., Nuzzo R.* Formation of monolayer films by the spontaneous assembly of organic thiols from solution onto gold // *J. Am. Chem. Soc.* – 1989. – 111, N 1. – P. 321–335.
14. *Berheide W., Sim M.M., Tan Y.J., Bernard H.U., Ting A.E.* Inactivation of the human papillomavirus-16 E6 oncoprotein by organic disulfides // *Bioorg. Med. Chem.* – 2000. – 8, N 11. – P. 2549–2560.
15. *Boltovets P.M., Boyko V.R., Kostikov I.Yu., Dyachenko N.S., Snopok B.A., Shirshov Y.M.* Simple method for plant virus detection: Effect of antibody immobilization technique // *J. Virol. Meth.* – 2002. – 105, N 1. – P. 141–146.
16. *Boltovets P.M., Boyko V.R., Snopok B.A.* Surface capturing of virion-antibody complexes: kinetic study // *Materialwissenschaft und Werkstofftechnik.* – 2013. – 44, N 1–2. – P. 112–118.
17. *Boltovets P.M., Polischuk O.M., Kovalenko O.G., Snopok B.A.* A simple SPR-based method for the quantification of the effect of potential virus inhibitors // *Analyst.* – 2013. – 138, N 2. – P. 480–486.
18. *Boltovets P.M., Snopok B.A., Boyko V.R., Shevchenko T.P., Dyachenko N.S., Shirshov Y.M.* Detection of plant viruses using a surface plasmon resonance via complexing with specific antibodies // *J. Virol. Meth.* – 2004. – 121, N 1. – P. 101–106.
19. *Casanovas J.M., Bickford J.K., Springer T.A.* The domain structure of ICAM-1 and the kinetics of binding to rhinovirus // *J. Virol.* – 1998. – 72, N 7. – P. 6244–62446.
20. *Chang C.-C., Chuang T.-L., Wang D.-S., Wang C.-H., Lin C.-W.* Comparative Assessment of Oriented Antibody Immobilization on Surface Plasmon Resonance Biosensing // *J. Chin. Chem. Soc.* – 2013. – 60, N 12. – P. 1449–145.
21. *Critchley P., Dimmock N.J.* Binding of an influenza A virus to a neomembrane measured by surface plasmon resonance // *Bioorg. Med. Chem.* – 2004. – 12, N 10. – P. 2773–2780.
22. *Critchley P., Kazlauskaitė J., Eason R., Pinheiro T.J.* Binding of prion proteins to lipid membranes // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2004. – 313, N 3. – P. 559–567.
23. *Fu J., Li L., Bouvier M.* Adenovirus E3-19K proteins of different serotypes and subgroups have similar, yet distinct, immunomodulatory functions toward major histocompatibility class I molecules // *J. Biol. Chem.* – 2011. – 286, N 20. – P. 17631–17639.
24. *Garcia B.H., Goodman R.M.* Use of surface plasmon resonance imaging to study viral RNA: protein interactions. – *J. Virol. Methods.* – 2008. – 147, N 1, P. 18–25.
25. *Gruen L.C., McKimm-Breschkin J.L., Coldwell J.B., Nice E.C.* Affinity ranking of influenza neuraminidase mutants with monoclonal antibodies using an optical

- biosensor. Comparison with ELISA and slot blot assay // *Journal of Immunol. Meth.* – 1994. – 168, N 1. – P. 91–100.
26. *Gutiérrez-Aguirre I., Hodnik V., Glais L., Rupar M., Jacquot E., Anderluh G., Ravnik M.* Surface plasmon resonance for monitoring the interaction of Potato virus Y with monoclonal antibodies // *Anal. Biochem.* – 2014. – 447. – P. 74–81.
 27. *Haro I., Perez S., Garcia M., Chan W.C., Ercilla G.* Liposome entrapment and immunogenic studies of a synthetic lipophilic multiple antigenic peptide bearing VP1 and VP3 domains of the hepatitis A virus: a robust method for vaccine design // *FEBS Lett.* 2003. – 540, N 1–3. – P. 133–140.
 28. *Homola J.* Surface plasmon resonance sensors for detection of chemical and biological species // *Chem Rev.* – 2008. – 108, N 2. – P. 462–493.
 29. *Huang C.Y., Hsu Y.L., Chiang W.L., Hou M.H.* Elucidation of the stability and functional regions of the human coronavirus OC43 nucleocapsid protein // *Protein Sci.* – 2009. – 18, N 11. – P. 2209–2218.
 30. *Keusgen M.* Biosensors: new approaches in drug discovery // *Naturwissenschaften.* – 2002. – 89, N 10. – P. 433–444.
 31. *Kobayashi N., Oyama H.* Antibody engineering toward high-sensitivity high-throughput immunosensing of small molecules // *Analyst.* – 2011. – 136, N 4. – P. 642–51.
 32. *Kolotilov S.V., Boltovets P.N., Snopok B.A., Pavlishchuk V.V.* Nanosized magnetic composite for extraction of gamma-immunoglobulins from biological media // *Theoretical and Experimental Chemistry.* – 2006. – 42, N 4. – P. 211–216.
 33. *Meng X., Leman M., Xiang Y.* Variola virus IL-18 binding protein interacts with three human IL-18 residues that are part of a binding site for human IL-18 receptor alpha subunit // *Virology.* – 2007. – 358, N 1. – P. 211–220.
 34. *Nesterova N.V., Nosach L.M., Zagorodnya S.D., Povnitsa O.Y., Boltovets P.M., Baranova G.V., Golovan A.V.* Elaboration of optical immunosensors based on the surface plasmon resonance for detecting specific antibodies and antigens of Epstein-Barr virus and human adenovirus // *Mikrobiol Z.* – 2008. – 70, N 6. – P. 67–73.
 35. *Peter J.C., Briand J.P., Hoebcke J.* How biotinylation can interfere with recognition: a surface plasmon resonance study of peptide-antibody interactions // *J Immunol Methods.* – 2003. – 274, N 1–2. – P. 149–158.
 36. *Pustynnikov S., Dave R.S., Khan Z.K., Porkolab V., Rashad A.A., Hutchinson M., Fieschi F., Chaiken I., Jain P.* Inhibition of DC-SIGN-Mediated HIV-1 Infection by Complementary Actions of Dendritic Cell Receptor Antagonists and Env-Targeting Virus Inactivators // *AIDS Res Hum Retroviruses.* 2016. – 32, N 1. – P. 93–100.
 37. *Ribaut C., Voisin V., Malachovská V., Dubois V., Mégret P., Wattiez R., Caucheteur C.* Small biomolecule immunosensing with plasmonic optical fiber grating sensor // *Biosens Bioelectron.* – 2015. – 77. – P. 315–322.
 38. *Riedel T., Rodriguez-Emmenegger C., Santos Pereira A., Bědajánková A., Jinoch P., Boltovets P.M., Brynda E.* Diagnosis of Epstein–Barr virus infection in clinical serum samples by an SPR biosensor assay // *Biosensors and Bioelectronics.* – 2014. – 55. – P. 278–284.
 39. *Rojo N., Ercilla G., Haro I.* GB virus C (GBV-C) / hepatitis G virus (HGV): towards the design of synthetic peptides-based biosensors for immunodiagnosis of GBV-C/HGV infection // *Curr. Protein Pept. Sci.* – 2003. – 4, N 4. – P. 291–298.

40. *Rosenberg M.R., Casarotto M.G.* Coexistence of two adamantane binding sites in the influenza A M2 ion channel // PNAS. – 2010. – 107, N 31. – P. 13866–13871.
41. *Schneider C.S., Bhargav A.G., Perez J.G., Wadajkar A.S., Winkles J.A., Woodworth G.F., Kim A.J.* Surface plasmon resonance as a high throughput method to evaluate specific and non-specific binding of nanotherapeutics // J Control Release. – 2015. – 219. – P. 331–44.
42. *Sheffield K.S., Kennedy A.E., Scott J.A., Ross G.M.* Characterizing nerve growth factor-p75NTR interactions and small molecule inhibition using surface plasmon resonance spectroscopy // Anal Biochem. – 2015. – pii: S0003–2697(15)00461–3 [Epub ahead of print]
43. *Sjölander S., Urbaniczky C.* Integrated fluid handling system for biomolecular interaction analysis // Anal.Chem. – 1991. – 63, N 20. – P. 2338–2345.
44. *Smith S.A., Sreenivasan R., Krishnasamy G., Judge K.W., Murthy K.H., Arjunwadkar S.J., Pugh D.R., Kotwal G.J.* Mapping of regions within the vaccinia virus complement control protein involved in dose-dependent binding to key complement components and heparin using surface plasmon resonance // Biochim. Biophys. Acta. – 2003. – 1650, N 1–2. – P. 30–39.
45. *Urban S., Schwarz C., Marx U.C., Zentgraf H., Schaller H., Multhaup G.* Receptor recognition by a hepatitis B virus reveals a novel mode of high affinity virus-receptor interaction // EMBO J. – 2000. – 19, N 6. – P. 1217–1227.
46. *Vaisocherová H., Mrkvová K., Piliarik M., Jinoch P., Steinbachová M., Homola J.* Surface plasmon resonance biosensor for direct detection of antibody against Epstein-Barr virus // Biosens Bioelectron. – 2007. – 22, P. 6. – P. 1020–1026.
47. *Van Cott T.C., Bethke F.R., Kalyanaraman V., Burke D.S., Redfield R.R., Birx D.L.* Preferal antibody recognition of structurally distinct HIV-1 gp120 molecules // J. Acquired Immune Deficiency Syndromes. – 1994. – 7. – P. 1103–1115.
48. *Varga N., Sutkeviciute I., Ribeiro-Viana R., Berzi A., Ramdasi R., Daggetti A., Vettoretti G., Amara A., Clerici M., Rojo J., Fieschi F., Bernardi A.* A multivalent inhibitor of the DC-SIGN dependent uptake of HIV-1 and Dengue virus // Biomaterials. – 2014. – 35, N 13. – P. 4175–4184.
49. *Verma S., Dimitrova M., Munjal A., Fontana J., Crevar C.J., Carter D.M., Ross T.M., Khurana S., Golding H.* Oligomeric recombinant H5 HA1 vaccine produced in bacteria protects ferrets from homologous and heterologous wild-type H5N1 influenza challenge and controls viral loads better than subunit H5N1 vaccine by eliciting high-affinity antibodies // J Virol. – 2012. – 86, N 22. – P. 12283–12293.
50. *Wang W., Fang Q., Hu Z.* High-Throughput Peptide Screening on a Bimodal Imprinting Chip Through MS-SPRi Integration // Methods Mol. Biol. – 2016. – 1352:111–25.

Отримано 05.04.2016