

УДК 57.088

## **Исследование связывания гликопротеинов ВИЧ с ДНК G-квадруплексами с помощью длиннопребжных поверхностных волн**

*К.А. Прусаков<sup>1,2</sup>, Д.В. Басманов<sup>2</sup>, Д.В. Клинов<sup>1,2,3</sup>*

<sup>1</sup>Московский физико-технический институт (государственный университет)

<sup>2</sup>ФГБУ Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины ФМБА

<sup>3</sup>ФГБУН Институт биоорганической химии РАН

В данной работе исследовались возможности метода детекции процессов адсорбции биомакромолекул с помощью длиннопребжных поверхностных электромагнитных волн оптического диапазона [1]. При этом была решена задача о нахождении константы диссоциации комплекса гликопротеина вируса иммунодефицита человека gp120 и олигонуклеотидной последовательности, образующей G-квадруплексы.

Поверхностные волны - это электромагнитные колебания, локализованные на границе раздела двух сред с различными показателями преломления, и распространяющиеся вдоль этой границы. Максимум напряженности электромагнитного поля такой волны находится вблизи поверхности раздела сред, поэтому поверхностные волны позволяют с высокой чувствительностью детектировать процессы адсорбции при которых возникают локальные изменения диэлектрической проницаемости одной из сред. Регистрация реакций адсорбции, таким образом, осуществляется при помощи детекции изменений волнового вектора поверхностной волны.

Длиннопребжные электромагнитные поверхностные волны оптического диапазона возбуждают на границе раздела между внешней жидкой или газообразной средой и твердой поверхностью одномерного фотонного кристалла. Одномерный фотонный кристалл – это многослойная структура с периодически чередующимися показателями преломления слоёв. Толщина слоёв при этом составляет величину порядка длины волны. В таких материалах существуют так называемые запрещенные энергетические зоны, подобные запрещенным энергетическим зонам для электронов, распространяющихся в обычном кристалле [2].

Длиннопребжные поверхностные электромагнитные волны оптического диапазона возбуждали и детектировали на установке, собранной на основе схемы Кречмана с цилиндрической линзой. Поверхностные волны возбуждали на границе раздела между поверхностью одномерного фотонного кристалла и раствором, содержащим тот или иной аналит [3, 4]. Одномерный фотонный кристалл состоял из полированной основы SiO<sub>2</sub> толщиной 1,5мм, 3-х слоёв, каждый из которых в свою очередь состоял из слоя SiO<sub>2</sub> толщиной 183,5нм и слоя Ta<sub>2</sub>O<sub>5</sub> толщиной 111,5нм, и завершающего слоя SiO<sub>2</sub> толщиной 346,2нм. Данный фотонный кристалл был создан в компании LAYERTEC при помощи магнетронного напыления диэлектрических покрытий. На поверхности данной многослойной структуры вследствие дисперсии могут распространяться две поверхностные моды с длинами волн в окрестности 659нм при условии, что показатель преломления внешней среды близок к 1,33 - т.е. внешняя среда является водой при комнатной температуре. Для возбуждения поверхностной волны в данной установке использовался fiber-coupled стабилизированный лазерный диод производства ThorLabs с длиной волны 660нм.

Были измерены константы диссоциации для комплексов гликопротеина вируса иммунодефицита человека gp120 и двух олигонуклеотидных цепочек, образующих G-квадруплексы d(GGGGGCCGTGGGGTGGGAGCTGGGGTTTTT)-Biot и d(GGGGGCCGTTTTTTGGGAGCTGGGGTTTTT)-Biot, которым присвоили шифры BclON и BclON- $\mu$  (мутантный) соответственно. Для этого биотинилированные олигонуклеотидные цепочки были иммобилизованы при помощи комплекса биотин-стрептавидин на предварительно модифицированной поверхности одномерного фотонного кристалла. Растворы, содержащие различные концентрации гликопротеина вируса иммунодефицита человека gp120 прокачивались над поверхностью одномерного фотонного кристалла и связывались с иммобилизованными на ней олигонуклеотидными цепочками. На рис. 1 изображены кривые кинетики адсорбции различных концентраций гликопротеина gp120 на поверхность одномерного фотонного кристалла с иммобилизованными на ней олигонуклеотидными цепочками двух типов. Здесь  $t$  – время в секундах,  $\Delta h$  – приращение толщины адсорбционного слоя на поверхности одномерного фотонного кристалла в нанометрах. На рис. 1 а) изображены кривые кинетики адсорбции на олигонуклеотидную последовательность BclON пяти различных концентраций гликопротеина gp120, которые на рисунке обозначены соответственно (1) - 2,5 мкМ, (2) - 0,42 мкМ, (3) - 0,33 мкМ, (4) - 0,21 мкМ, (5) - 0,08 мкМ. На рис. 1 б) изображены кривые кинетики адсорбции на олигонуклеотидную последовательность BclON- $\mu$  пяти различных концентраций гликопротеина gp120, которые на рисунке обозначены соответственно (1) - 2,5 мкМ, (2) - 0,83 мкМ, (3) - 0,42 мкМ, (4) - 0,21 мкМ, (5) - 0,08 мкМ. Концентрации приводятся в микромолях на литр.

Далее по результатам этих данных были построены кривые адсорбции Ленгмюра и вычислены константы диссоциации соответствующих комплексов. На рис. 2 изображены кривые адсорбции Ленгмюра для гликопротеина gp120 и двух типов олигонуклеотидных цепочек BclON и BclON- $\mu$ , здесь  $C$  – концентрация гликопротеина в микромолях на литр,  $\Delta h$  – приращение толщины адсорбционного слоя на поверхности одномерного фотонного кристалла в нанометрах. Константа равновесия для взаимодействия гликопротеина gp120 с олигонуклеотидной цепочкой, под шифром BclON- $\mu$  составила  $K_D=0,143\text{мкМ}\pm 0,079\text{мкМ}$ , а с олигонуклеотидной цепочкой, под шифром BclON составила  $K_D=0,086\text{мкМ}\pm 0,017\text{мкМ}$ .

Таким образом, в данной работе продемонстрированы возможности безмаркерного метода определения констант диссоциации комплексов биомолекул, с помощью длиннопробежных электромагнитных поверхностных волн оптического диапазона. В основе данного метода лежит детекция приращений толщины адсорбционного слоя на поверхности одномерного фотонного кристалла. Данный метод обладает рядом преимуществ над классическим методом детекции адсорбции с помощью поверхностного плазмонного резонанса. Во-первых в данном методе отсутствует кювета сравнения, которая необходима в методе поверхностного плазмонного резонанса, для измерения показателя преломления раствора. Во-вторых поверхность одномерного фотонного кристалла позволяет адсорбировать на неё более широкий спектр соединений по сравнению с поверхностью наноплёнки металла, которая используется в методе поверхностного плазмонного резонанса.

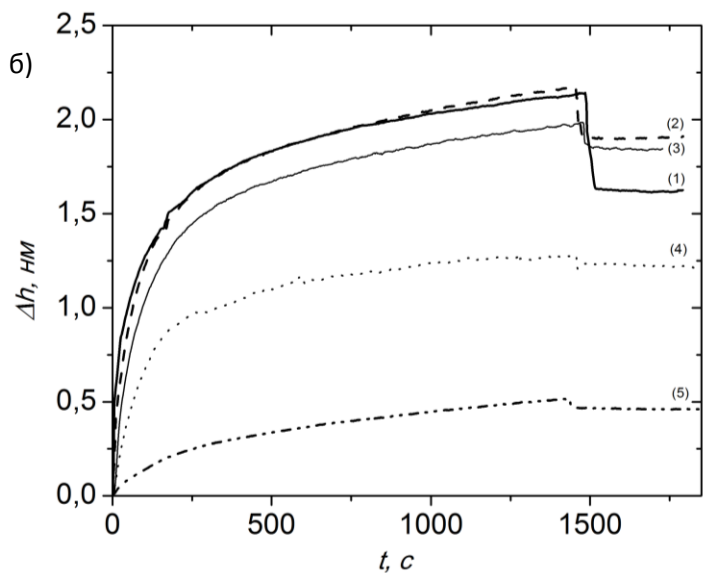
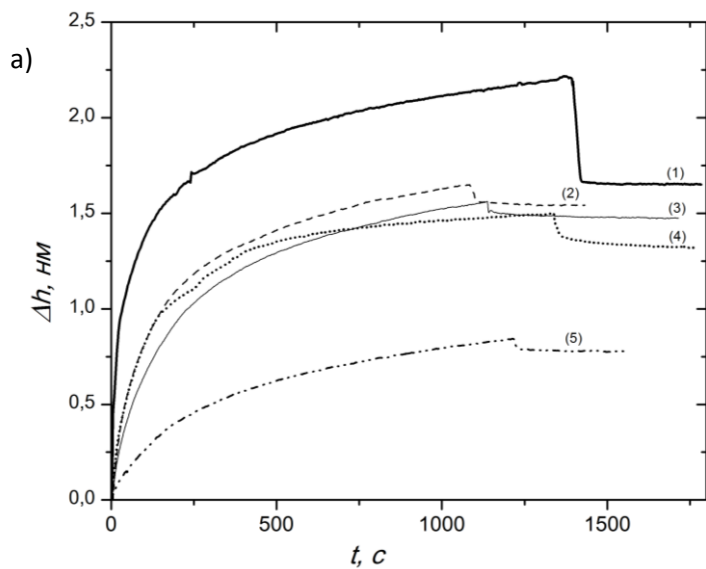


Рис. 1. а) Кривые кинетики адсорбции для гликопротеина gp120 на олигонуклеотидную цепочку BclON для разных концентраций gp120, которые обозначены соответственно (1) - 2,5 мкМ, (2) - 0,42 мкМ, (3) - 0,33 мкМ, (4) - 0,21 мкМ, (5) - 0,08мкМ.

б) Кривые кинетики адсорбции для гликопротеина gp120 на олигонуклеотидную цепочку BclON-mi для разных концентраций gp120, которые обозначены соответственно (1) - 2,5 мкМ, (2) - 0,83 мкМ, (3) - 0,42 мкМ, (4) - 0,21 мкМ, (5) - 0,08 мкМ.

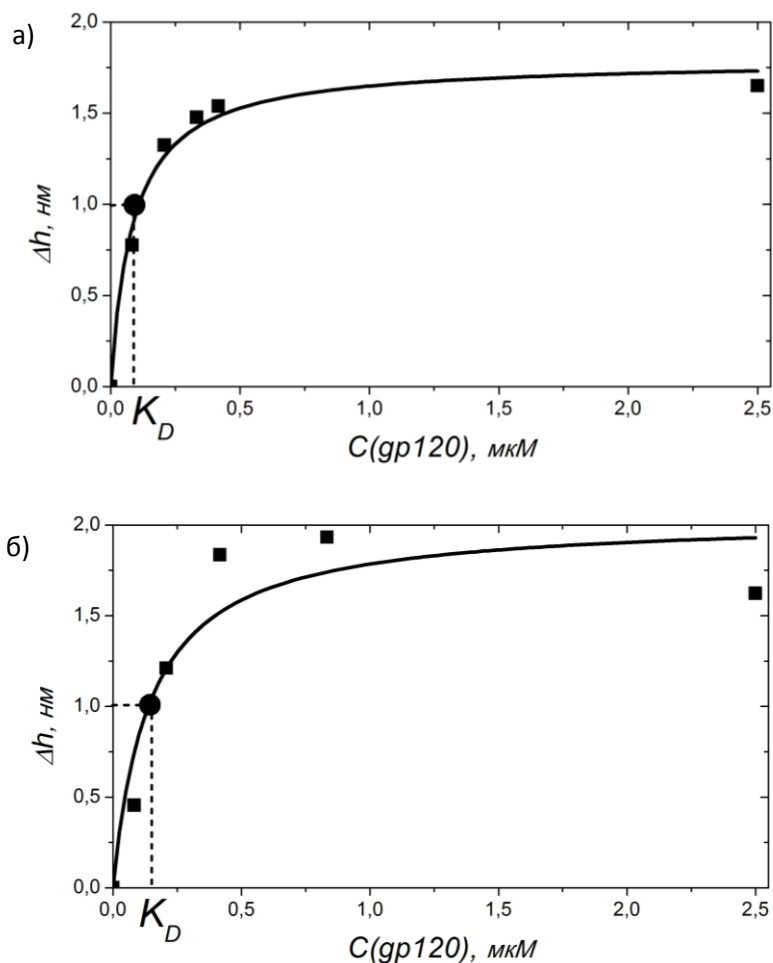


Рис. 2. а) Кривая адсорбции Ленгмюра для гликопротеина gp120 и олигонуклеотидной цепочки BclON.

б) Кривая адсорбции Ленгмюра для гликопротеина gp120 и олигонуклеотидной цепочки BclON-му.

### Литература

1. Konopsky V.N., Alieva E.V. Photonic crystal surface waves for optical biosensors // Analytical chemistry 2007. V 79 (12). P 4729-4735.
2. Yablonovitch E. Photonic band-gap Structures // J. Opt. Soc. Am. B. 1993, V. 10(2). P. 83–95.
3. Konopsky V.N., Karakouz T., Alieva E.V., Vicario C., Sekatskii S.K., Dietler G. Photonic crystal biosensor based on optical surface waves // Sensors 2013. V 13(2). P 2566-2578.
4. Tatarinova O., Tsvetkov V., Basmanov D., Barinov N., Timofeev E., Kaluzhny D., Chuvilin A., Varizhuk A., Klinov D., Pozmogova G. Comparison of the ‘Chemical’ and ‘Structural’ Approaches to the Optimization of the Thrombin-Binding Aptamer // PLoS ONE. 2014. V 9(2): e89383.