

УДК 578.74; 578.85; 543.45
PACS number(s): 42.81

АНАЛІЗ КІНЕТИКИ ВІРУС-СПЕЦИФІЧНИХ ВЗАЄМОДІЙ МЕТОДОМ ППР

П. Болтовець¹, В. Бойко², Б. Снопок¹

¹Інститут фізики напівпровідників ім.В.Є. Лашкарьова НАНУ
просп. Науки, 41, 03028 Київ
e-mail:pboltovec@mail.ru

²Київський Університет імені Тараса Шевченка
вул. Володимирська, 64, 01601 Київ
e-mail: victoria_boyko@univ.kiev.ua

Розглянуто чотири можливі підходи до іммобілізації імуноглобулінового компонента цільної антивірусної сироватки на поверхні сенсора ППР. Зокрема проведено іммобілізацію імуноглобулінів на (i) немодифікованій поверхні золота, (ii) поверхні золота, модифікованій пентаазомакроциклічним комплексом нікелю, (iii) поверхні золота, модифікованій тиоціанатом, (iv) поверхні золота, послідовно модифікованій тиоціанатом і білком А Staphylococcus aureus. Показано, що оптимальним варіантом у цьому випадку є послідовна обробка поверхні сенсора розчинами тиоціанату і білка А Staphylococcus aureus. Показано, що як іммобілізація антивірусних імуноглобулінів, так і зв'язування ними ВТМ відбувається за недифузно-обмеженою моделлю Лангмюра другого порядку. Це дає змогу характеризувати процес цієї взаємодії як поступовий, супроводжуваний реорганізацією компонентів моношару в процесі його формування.

Ключові слова: поверхневий плазмонний резонанс, кінетика, модель Лангмюра.

Хоча є велика кількість методів визначення окремо взятих білків і нуклеїнових кислот, методів визначення інтактних вірусних часток небагато. Традиційним методом дослідження взаємодій між вірусом і господарем є імуноферментний аналіз, що дає підстави отримувати точну і достовірну інформацію про таку взаємодію. Однак, для нього характерні певні обмеження, найбільш суттєвим з яких є важкодоступність інформації про кінетичні параметри протікання реакції. Для отримання такої інформації доцільно застосовувати оптоелектронні перетворювачі, зокрема, ті, що використовують ефект поверхневого плазмонного резонансу, ППР, який ґрунтується на взаємодії лазерного випромінення з тонкою металевою плівкою (Au, Ag і ін.), нанесеною на поверхню діелектрика. В умовах повного внутрішнього відбиття світло, що падає на границю призми з нанесеною тонкою плівкою металу, може збуджувати поверхневі поляритони, що простежується як різке зменшення інтенсивності відбитого світла з

мінімумом при певному куті, названому кутом поверхневого плазмонного резонансу (surface plasmon resonance, SPR), Q_{spr} [1].

Однак є певні особливості використання цього методу у вірусології. Оскільки здатність приладу до кількісного визначення молекул визначається глибиною проникнення загасаючої хвилі, яка утворюється у разі відбиття променя світла від межі шару золота у діелектричне середовище (близько 200 нм), характерний розмір досліджуваних поверхневих архітектур не повинен перевищувати 100 нм для забезпечення лінійної залежності зсуву Q_{spr} від ефективної маси на поверхні [2]. Незважаючи на те, що не всі віруси людини і тварин задовольняють цю вимогу, цей метод може бути застосований для дослідження вірусів рослин, більшість з яких мають невеликі розміри. ВТМ, діаметр якого не перевищує 18 нм, уявляється у цьому випадку дуже зручним об'єктом дослідження.

Дослідження проводили з допомогою ППР-спектрометра "ПЛАЗМОН" (джерело збудження GaAs лазер, $\lambda=670$ нм), розробленого в Інституті фізики напівпровідників НАН України [3]). Скляні пластинки $20 \times 20 \times 1$ мм ($n=1,61$) зі свіжонапиленням через проміжний адгезивний шар хрому (1–1,5 нм) шаром золота (50 нм), відпаленим при 120°C , попередньо оброблялися сумішшю "піранья" ($\text{H}_2\text{O}_2\text{-H}_2\text{SO}_4$ у співвідношенні 1:3) для видалення органічних забруднень. Оброблені в такий спосіб пластинки закріплювалися на обертовій підтримуючій скляній призмі ($n=1,61$) за допомогою імерсійної рідини (поліфеніловий ефір, $n=1,6$).

В роботі використовувався очищений препарат типового штаму вірусу тютюнової мозаїки, люб'язно наданий Т.П. Шевенко (кафедра вірусології біологічного факультету Київського університету). Використовувалася в розведенні 1:10 кроляча сироватка до дикого штаму ВТМ (Український НДІ с/г мікробіології), яку люб'язно надав Т.А. Компанець (кафедра вірусології біологічного факультету Київського університету).

Білок A *Staphylococcus aureus* ("Sigma", США) використовували у вигляді водного розчину (50 мкг/мл). Розчини тиоціанату калію KNCS і пентаазамакроциклічного комплексу нікелю в концентрації 4×10^{-5} М готували безпосередньо перед експериментом. Гліциновий буфер (рН 2,2) карбонатний буфер (рН 9,6) і фосфатний буфер PBS (рН 7,3) готували за стандартною методикою [4].

На першому етапі роботи проводили перевірку ефективності зв'язування очищеного ВТМ, узятю у відомій концентрації з цільною антивірусною сироваткою залежно від попередньої модифікації поверхні сенсора. При цьому порівнювали ефективність зв'язування вірусу з антитілами, адсорбованими на чотири типи поверхні сенсора: (i) немодифіковане золото; (ii) золото, оброблене пентаазамакроциклічним комплексом нікелю; (iii) золото, оброблене KNCS; (iv) золото, оброблене KNCS з іммобілізованим на ньому білком A *Staphylococcus aureus*, що має високий ступінь афінності до IgG кроля [5]. Кількість іммобілізованого білка виражалася через ΔQ_{spr} – зсув мінімуму відбитого світла, вимірюваного в кутових секундах (к.с.) і через поверхневе покриття (Γ), що виражається в нг/мм².

Інтерес до пентаазамакроциклічного комплексу нікелю був зумовлений його потенційною можливістю утворювати на поверхні півки золота ефективний заряджений шар, подібний до того, який утворюється при модифікації поверхні золота KNCS, а також його здатністю до координації гістидинових залишків, якщо такі є на поверхні білка.

Як показано на рис.1, антитіла до ВТМ у складі цільної антивірусної сироватки адсорбуються на всі чотири типи поверхні, хоча у всіх випадках великий внесок неспецифічного компонента, що видаляється промиванням буфером.

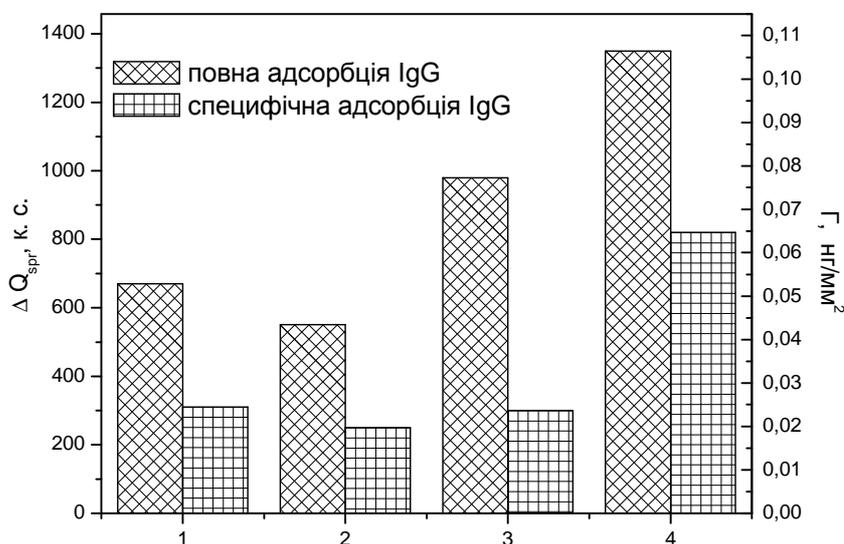


Рис. 1. Порівняння зсуву мінімуму відбитого світла у відповідь на загальну і специфічну адсорбцію IgG, ΔQ_{spr} – зсув мінімуму відбитого світла, к.с. – кутові секунди, Γ – поверхневе покриття; 1 – необроблена поверхня золота; 2 – поверхня золота, оброблена пентаазамакроциклічним комплексом нікелю; 3 – поверхня золота, оброблена KNCS; 4 – поверхня золота, оброблена KNCS з іммобілізованим на ньому білком А

Зокрема, адсорбція імуноглобулінів на поверхні немодифікованого золота і золота, обробленого пентаазамакроциклічним комплексом нікелю, зумовлює відносно невеликий зсув мінімуму відбитого світла (670 і 550 к.с., відповідно), після промивання буфером кількість білка на поверхні зменшується більш ніж удвічі (310 і 250 к.с., відповідно). Обробка поверхні тиоціанатом призводить до значно більшого зсуву мінімуму ППР (980 к.с.), однак змивається він навіть більш активно, ніж у двох попередніх випадках, при цьому відгук ППР зменшується більш, ніж утричі (300 к.с.). Послідовна обробка поверхні KNCS і білком А спричинює найбільший зсув мінімуму ППР (1350 к.с.), і навіть після промивання буфером сигнал ППР залишається досить великим (820 к.с.).

При цьому залежно від способу обробки поверхні відрізняється і характер кінетики іммобілізаційного процесу (рис. 2). Зокрема, якщо для перших трьох типів обробки поверхні збільшення ΔQ_{SPR} з моменту різкого зсуву мінімуму відбитого світла, зумовленого додаванням реагенту і до виходу кривої на плато склало в середньому близько 160 к.с., то для поверхні, обробленої білком А – 360 к.с., що може свідчити про сприятливіші умови іммобілізації, хоча адсорбція самого білка А на обробленій KNCS поверхні у цьому випадку відбувається практично миттєво, що не завжди свідчить про задовільний стан білка на поверхні.

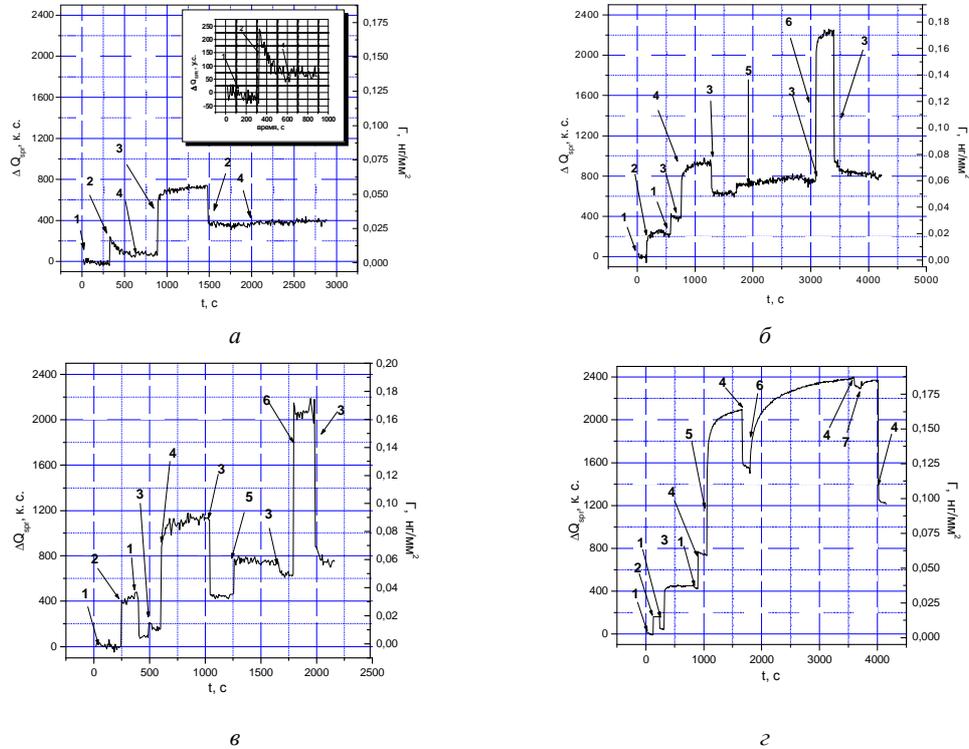


Рис. 2. Взаємодія між іммобілізованими антитілами і ВТМ на різних типах поверхні: ΔQ_{spr} – зсув мінімуму відбитого світла, к.с. – кутові секунди, t – час, с – секунди, Г – поверхневе покриття; а – необроблена поверхня золота: 1 – H₂O; 2 – карбонатний буфер рН 9,6; 3 – антивірусна сироватка; 4 – ВТМ, на врізці збільшений фрагмент графіка, що ілюструє спробу іммобілізації вірусу; б – поверхня золота, оброблена комплексною сполукою нікелю: 1 – H₂O; 2 – пентаазамакроциклічний комплекс нікелю; 3 – карбонатний буфер рН 9,6; 4 – антивірусна сироватка; 5 – ВТМ; 6 – гліциновий буфер рН 2,2; в – поверхня золота, оброблена KNCS: 1 – H₂O; 2 – KNCS; 3 – карбонатний буфер рН 9,6; 4 – антивірусна сироватка; 5 – ВТМ; 6 – гліциновий буфер рН 2,2; г – поверхня золота, послідовно оброблена KNCS і білком A Staphylococcus aureus: 1 – H₂O; 2 – KNCS; 3 – білок А, 4 – карбонатний буфер рН 9,6; 5 – антивірусна сироватка; 6 – ВТМ; 7 – гліциновий буфер рН 2,2

Аналіз наведених вище кінетичних залежностей дає підстави припустити, що у всіх чотирьох випадках процес іммобілізації імуноглобулінів на поверхні відбувається відповідно до недифузно-обмеженої моделі Лангмюра другого порядку (рис. 3).

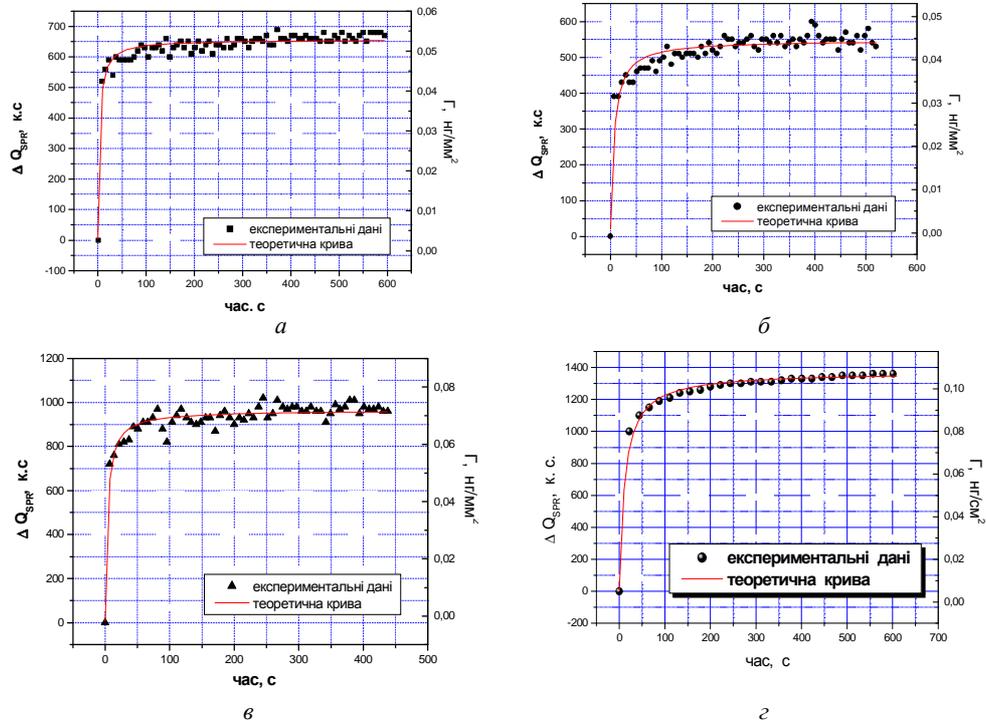


Рис. 3. Порівняння експериментальних даних з іммобілізації антивірусних імуноглобулінів з теоретичною кривою: а – необроблена поверхня золота; б – поверхня золота, оброблена комплексною сполукою нікелю; в – поверхня золота, оброблена KNCS; з – поверхня золота, послідовно оброблена KNCS і білком А; ΔQ_{SPR} – зсув мінімуму відбитого світла, к.с. – кутові секунди

Ця модель описує взаємодії на поверхні, що супроводжуються певною трансформацією самої поверхні адсорбованого шару в процесі формування. Ця модель описується рівнянням:

$$\Gamma = \Gamma_{\max} \times (1 - (1 + k_{\text{trans}} \times t)^{-1}),$$

де Γ – поверхневе покриття, Γ_{\max} – максимальне поверхневе покриття, k_{trans} – коефіцієнт трансформації, t – час [6].

Значення константи трансформації, показані на рис. 4, також свідчать про те, що найбільш поступово процес іммобілізації імуноглобулінів відбувається на обробленій тіоціанатом і білком А поверхні золота, оскільки k_{trans} у цьому випадку мінімальний. Це може свідчити про формування більш упорядкованої структури шару антитіл на поверхні.

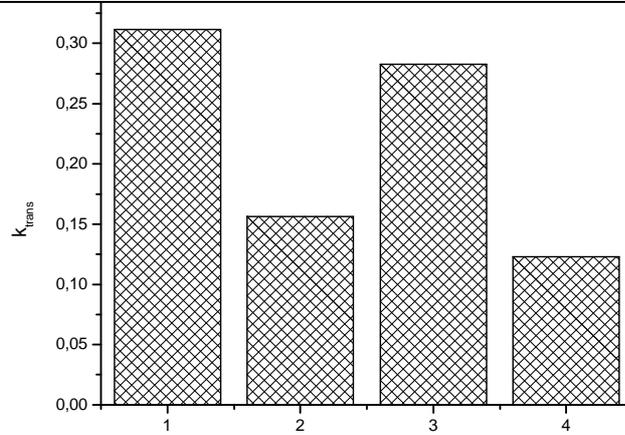


Рис. 4. Розраховані значення константи трансформації для іммобілізації специфічних IgG з антивірусної сироватки на різних типах поверхні, k_{trans} – константа трансформації: 1 – необроблена поверхня золота, 2 – поверхня золота, оброблена пентаазамакросциклічним комплексом нікелю, 3 – поверхня золота, оброблена KNCS, 4 – поверхня золота, оброблена KNCS з іммобілізованим на ньому білком А

Однак найбільш важливою характеристикою іммобілізованих на поверхні імуноглобулінів є їх здатність специфічно зв'язувати вірусний антиген (Рис.5). Імуноглобуліни, іммобілізовані на немодифікованій поверхні золота, зв'язують вкрай незначну кількість вірусного антигену (ΔQ_{SPR} 30 к.с.). Кількості імуноглобуліну і вірусу в цьому випадку непорівнянні, що не дає змоги говорити про специфічність зв'язування.

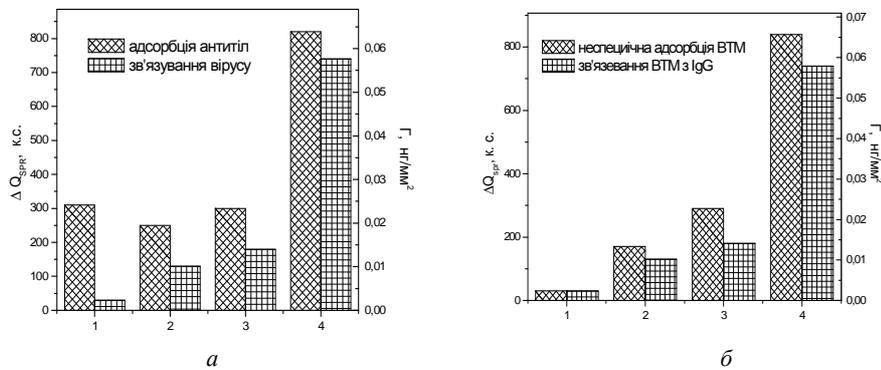


Рис. 5. Зв'язування ВТМ антитілами залежно від способу їх іммобілізації: ΔQ_{SPR} – зсув мінімуму відбитого світла, к.с. – кутові секунди, Γ – поверхневе покриття; а – порівняння зсуву мінімуму відбитого світла у відповідь на іммобілізацію антитіл і зв'язування вірусу; б – порівняння зсуву мінімуму відбитого світла у відповідь на неспецифічну адсорбцію вірусу і зв'язування вірусу антитілами. 1 – необроблена поверхня золота, 2 – поверхня золота, оброблена пентаазамакросциклічним комплексом нікелю, 3 – поверхня золота, оброблена KNCS, 4 – поверхня золота, оброблена KNCS з іммобілізованим на ньому білком А *Staphylococcus aureus*

На поверхні, модифікованій пентаазамакроциклічним комплексом нікелю, імуноглобуліни зв'язують незначну кількість вірусного антигену (ΔQ_{SPR} 170 к.с. до промивання буфером і 130 к.с. після), при цьому співвідношення між імуноглобулінами і вірусом становить 1,92:1, однак цей зв'язок не є специфічним, оскільки не розривається гліциновим буфером (рН 2,2). Імуноглобуліни, іммобілізовані на модифікованій NCS-поверхні золота, зв'язують більшу кількість вірусного антигену (ΔQ_{SPR} 290 к.с.), однак значна його частина видаляється простим промиванням буфером (ΔQ_{SPR} після промивання 180 к.с.). Співвідношення між імуноглобулінами і вірусом становить у цьому випадку 1,66:1. Щоправда, як і в попередньому випадку, зв'язок між імуноглобуліном і антигеном не розривається гліциновим буфером з низьким значенням рН, що також не дає змоги вважати цей зв'язок специфічним. Лише послідовна обробка поверхні тіоціанатом і білком А дає змогу іммобілізувати антитіла на поверхні золота так, що вони повною мірою зберігають здатність зв'язувати вірусний антиген, оскільки тільки в цьому випадку зв'язок між імуноглобуліном і вірусним антигеном розривається гліциновим буфером. При цьому зсув мінімуму відбитого світла у відповідь на додавання вірусного антигену сягає 740 к.с. Співвідношення між імуноглобулінами і вірусом у цьому випадку становить 1,1:1.

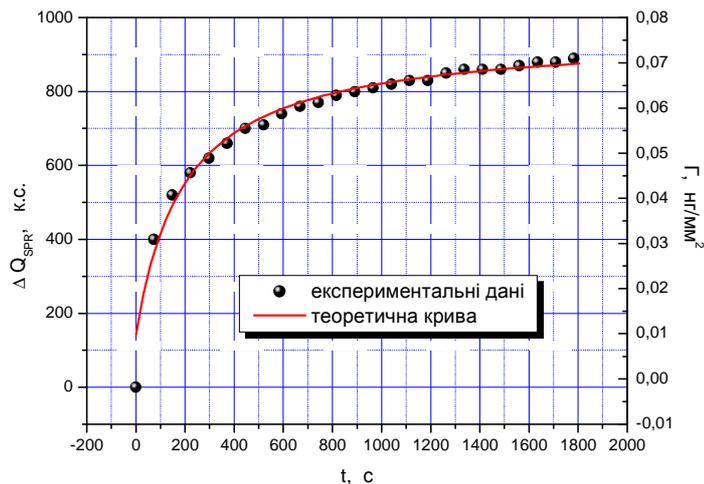


Рис. 6. Порівняння експериментальних даних із зв'язування ВТМ імуноглобулінами з теоретичною кривою, ΔQ_{SPR} – зсув мінімуму відбитого світла, к.с. – кутові секунди, t – час, s – секунди, Γ – поверхнєве покриття, k_{trans} – константа трансформації

Зазначимо, що взаємодія між іммобілізованими в такий спосіб імуноглобулінами і вірусними частками відбувається за недифузно-обмеженою моделлю Лангмюра другого порядку (рис. 6), при цьому $k_{trans} = 0,00608$, що характеризує процес цієї взаємодії як поступовий, що супроводжується перекомпонуванням компонентів моношару.

Отож, було розроблено загальний підхід до виявлення і кількісного визначення вірусів методом ППР з допомогою специфічних антитіл, іммобілізованих на модифікованій KNCS і білком A St. aureus поверхні сенсора і визначені оптимальні умови для подальшого виявлення вірусного антигену в клітинних гомогенатах.

Робота була виконана за фінансової підтримки Міністерства Освіти і Науки (проект ДЗ/479-2009).

1. *Homola J.* Surface plasmon resonance sensors for detection of chemical and biological species / J. Homola // *Chem Rev.* – 2008. – Vol. 108, N 2. – P. 462–93.
2. *Löfäs S.* Bioanalysis with surface plasmon resonance / S. Löfäs, M. Malmqvist, I. Rönneberg, E. Stenberg, B. Liedberg, I. Lundström // *Sensors and Actuators B.* – 1991. – Vol. 5, N 1–4. – P. 79–84.
3. *Beketov G.V.* Surface plasmon resonance spectroscopy: prospects of superstrate refractive index variation for separate extraction of molecular layer parameters / G.V. Beketov, Yu.M. Shirshov, O.V. Shynkarenko, V.I. Chegel // *Sensors and Actuators B.* – 1998. – Vol. 48, N 1–3. – P. 432–438.
4. *Досон Р.* Справочник биохимика / Р. Досон, Д. Эллиот, У. Эллиот, К. Джонс. – М. : Мир, 1991. – 544 с.
5. *Romano E.L.* Historical aspects / E.L. Romano, M. Romano // *Immunolabeling for electron microscopy.* – New York: Elsevier, 1984. – P. 3–17.
6. *Peterlinz K.A.* In situ kinetics of self-assembly by surface plasmon resonance spectroscopy / K.A. Peterlinz, R. Georgiadis // *Langmuir.* – 1996. – Vol. 12, N 20. – P. 4731–474.

ANALYSIS OF THE VIRUS-SPECIFIC INTERACTIONS KINETICS BY SPR METHOD

P. Boltovets¹, V. Boyko², B. Snopok¹

¹*V. Lashkaryov Institute of Semiconductor Physics, National Academy of Sciences
Prospect Nauki, 41, 03028 Kyiv, Ukraine
e-mail:pboltovec@mail.ru*

²*Taras Shevchenko National University of Kyiv
Volodymyrs'ka Str., 64, 01601 Kyiv, Ukraine
e-mail: victoria_boyko@univ.kiev.ua*

4 possible approaches to the immobilization of the immunoglobulin component of the whole antiviral serum at the SPR sensor surface were considered: (i) unmodified Au surface, (ii) pentaazomacrocyclic-modified Au surface, (iii) thiocyanate-modified Au surface, (iv) thiocyanate and protein A *Staphylococcus aureus* modified Au surface. It was demonstrated, that optimal way for this case is thiocyanate and protein A *Staphylococcus aureus* modified Au surface. It was also shown, that the immobilization of immunoglobulins and TMV binding realize by the undiffused-limited Langmuir model second order, which characterize his process as gradual following by the reorganization of the monolayer components.

Key words: surface plasmon resonance, kinetics, Langmuir model.

**АНАЛИЗ КИНЕТИКИ ВИРУС-СПЕЦИФИЧЕСКИХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ
МЕТОДОМ ППР****П. Болтовец¹, В. Бойко², Б. Снопок¹**

¹*Институт физики полупроводников им. В.Е. Лашкарева НАНУ
просп. Науки, 41, 03028 Київ
e-mail: pboltovec@mail.ru*

²*Київський Університет імені Тараса Шевченка
ул. Владимирская, 64, 01601 Киев
e-mail: victoria_boyko@univ.kiev.ua*

Рассмотрены четыре возможных подхода к иммобилизации иммуноглобулинового компонента цельной антивирусной сыворотки на поверхности сенсора ППР. В частности проведена иммобилизация иммуноглобулинов на (i) немодифицированной поверхности золота, (ii) поверхности золота, модифицированной пентаазомакроциклическим комплексом никеля, (iii) поверхности золота, модифицированной тиоцианатом, (iv) поверхности золота, последовательно модифицированной тиоцианатом и белком A *Staphylococcus aureus*. Показано, что оптимальным вариантом в данном случае является последовательная обработка поверхности сенсора растворами тиоцианата и белка A *Staphylococcus aureus*. Показано, что как иммобилизация антивирусных иммуноглобулинов, так и связывание ими ВТМ происходит по недиффузно-ограниченной модели Лангмюра второго порядка. Это позволяет характеризовать процесс данного взаимодействия как постепенный, сопровождаемый реорганизацией компонентов монослоя в процессе его формирования.

Ключевые слова: поверхностный плазмонный резонанс, кинетика, модель Лангмюра.

Стаття надійшла до редколегії 02.02.2010

Прийнята до друку 07.06.2010