

УДК 557.152.3, 538.95, 621.382.3, 577.1

## Влияние остановленного потока жидкости на белок

Иванов Юрий Дмитриевич, доктор биологических наук, профессор,  
заведующий лабораторией

Плешакова Татьяна Олеговна, доктор биологических наук,  
главный научный сотрудник лаборатории нанобиотехнологии

Валуева Анастасия Андреевна, младший научный сотрудник  
лаборатории нанобиотехнологии

Ершова Мария Олеговна, лаборант лаборатории нанобиотехнологии

Иванова Ирина Александровна, младший научный сотрудник  
лаборатории нанобиотехнологии

Козлов Андрей Федорович, ведущий инженер лаборатории нанобиотехнологии

Зиборов Вадим Серафимович, кандидат физико-математических наук, ведущий инженер  
Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский  
институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича» (ИБМХ), РФ, Москва

Иванова Нина Дмитриевна, преподаватель

Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии –  
МВА имени К.И. Скрябина (МГАВМиБ – МВА имени К.И. Скрябина), РФ, Москва

Татур Вадим Юрьевич, исполнительный директор  
Фонд перспективных технологий и новаций, РФ, Москва

Лукьяница Андрей Александрович, доктор технических наук, старший научный сотрудник  
МГУ имени М.В. Ломоносова, РФ, Москва

**Аннотация.** В биосенсорных системах, а также в других аналитических системах часто используются системы остановленного потока. При этом, ранее влияние потока жидкости на свойства аналита после его остановки практически не изучено. Исследование посвящено влиянию остановленного потока жидкости на свойства белка. Такие системы часто используются в аналитических устройствах. Показано, что после выключения потока жидкости наблюдается существенное изменение свойств белка. Эти данные полезны для создания новых аналитических проточных систем, работающих с очень высокой концентрационной чувствительностью, вплоть до единичных молекул. Особенно важно это рассматривать при создании молекулярных детекторов, позволяющих регистрировать единичные молекулы. К таким системам относятся молекулярные детекторы, такие, как атомно-силовые детекторы, нанопроводные системы, нанопоровые системы.

**Ключевые слова:** атомно-силовая микроскопия, белок

## Effect of stopped flow of liquid on protein

Ivanov Yuri Dmitrievich, Doctor of Biological Sciences, Professor, Head of the Laboratory

Pleshakova Tatiana Olegovna, Doctor of Biological Sciences, Chief Researcher

Valueva Anastasia Andreevna, Junior Researcher

Ershova Maria Olegovna, laboratory assistant

Ivanova Irina Alexandrovna, Junior Researcher

Kozlov Andrey Fedorovich, Leading Engineer

Ziborov Vadim Serafimovich, Candidate of Physical and Mathematical Sciences,  
Leading Engineer

Laboratory of Nanobiotechnology of IBMC, Russia, Moscow

Ivanova Nina Dmitrievna, Lecturer

Moscow State Academy of Veterinary Medicine and Biotechnology - M.I. Skryabin, Russia, Moscow

Tatur Vadim Yurievich

Foundation of Perspective Technologies and Novations, Russia, Moscow

Lukyanitsa Andrei Alexandrovich, Doctor of Technical Sciences

Moscow State University M.V. Lomonosov, Russia, Moscow

**Abstract.** Stopped flow systems are often used in biosensor systems as well as other analytical systems. At the same time, previously the influence of the liquid flow on the properties of the analyte after its shutdown has practically not been studied. This study focuses on the effect of stopped fluid flow on protein properties. Such systems are often used in analytical devices. It was shown that after switching off the liquid flow, a significant change in the properties of the protein is observed. These data are useful for creating new analytical flow systems operating with very high concentration sensitivity, down to single molecules. It is especially important to consider this when creating molecular detectors that allow the registration of single molecules. Such systems include molecular detectors such as atomic force detectors, nanowire systems, nanopore systems.

**Keywords:** atomic force microscopy, protein

**DOI:** 10.5281/zenodo.5497538

### Введение

Ранее нами было показано, что, при размещении раствора белка (пероксидазы хрена, HRP) в подобной спиральной системе, но которая была заключена в заземленный металлический экран (для экранировки электрического поля от спиральной конструкции) в положении «вблизи линейной незаэкранированной незаземленной части, выходящей из спирали», наблюдается повышение адсорбционных свойств пероксидазы хрена на поверхности АСМ-чипа из слюды [1].

Для исследования влияния остановленного потока глицерина на адсорбцию и агрегацию HRP в нашей работе использовался метод атомно-силовой микроскопии (АСМ). Было показано, что после выключения потока глицерина наблюдается влияние на повышение агрегации белка пероксидазы хрена, расположенного вблизи линейной выходной части спиральной конструкции, к поверхности слюдяного АСМ-чипа. Эти данные полезны для моделирования гемодинамики в организме при изменениях, связанных с внезапной остановкой сердца и другими патологическими изменениями, связанными с кровообращениями в организме.

### Материалы и методы

Пероксидаза хрена была получена из Sigma, глицерин из Glauconchemic GmbH.

Проточную часть тремостабилизирующей системы имитировала спирально навитая полимерная трубка. Спиральная конструкция была экранирована металлическим заземленным экраном для экранировки электромагнитного поля, которое может возникать от спиральной конструкции. В качестве измерительной ячейки использовалась пробирка типа Эппендорф, в которую помещалось 1 мл раствора белка в буферном растворе ( $10^{-7}$  M in 2mM PBS pH 7.4), которая размещалась около выхода линейной части спиральной коммуникации.

Для исследования вначале в трубку подавался глицерин, объемным расходом 9 л/с при температуре  $T=65^{\circ}\text{C}$ . Трубка спиральной коммуникации была теплоизолирована полимерным экраном для того, чтобы измерения в кювете раствора проводились при комнатной температуре (RT). Вначале прокачивался глицерин по спиральной коммуникации в течение 40 мин. Далее, поток глицерина останавливался. Пробирка с раствором белка размещалась вблизи выхода линейной части коммуникации после остановки потока глицерина и выдерживалась в течение 40 мин (так называемый режим «остановленного потока»). Далее раствор передавался на АСМ-анализ. В контрольных измерениях пробирка с раствором белка помещалась вдали от установки (на расстоянии 10 м), выдерживалась в течение 40 мин. Далее следовали измерения, аналогичные рабочим.

АСМ и спектроскопические измерения были проведены в режиме tapping mode, аналогично описанию в [1].

### Результаты

Нами было получено, что в режиме постдвижения глицерина, то есть после выключения потока глицерина для раствора белка, размещенного на выходе линейной части

спиральной коммуникации наблюдалось изменение адсорбционных свойств этого белка к подложке слюды. Но уже для условий измерения адсорбционных свойств HRP в режиме «пост-движения» глицерина. Мы провели АСМ-измерения количества молекул адсорбционного белка в зависимости от размеров его высот свойств HRP для этого режима измерения и сравнили его с контролем. В качестве контроля использовался раствор молекул белка, расположенного далеко от коммуникаций, на расстоянии порядка 10 метров.

Для контрольных экспериментов наблюдались компактные объекты с высотой 1-1,2 нм, которые можно отнести к биомолекулам мономерной формы HRP. Для режима «пост-движения» глицерина, после инкубации раствора, также наблюдались объекты компактной формы, как и в случае контроля. Однако, для случая режима «пост-движения» глицерина наблюдались смещения максимума графика распределения количества адсорбированных молекул по высотам вправо ( $h_{\text{max}} \approx 1.3$  нм) с увеличением вклада частиц в правое крыло распределения. Следовательно, в режиме измерения остановленного потока выявлялись объекты с увеличенными высотами, которые могут быть отнесены к агрегатам белка.

### Дискуссия

Было показано, что для режима остановленного потока наблюдается повышение степени агрегации белка, на что указывало повышение вклада АСМ-изображений объектов с большими высотами в правом крыле распределения по сравнению с контролем. Эта картина была похожа на ту, что наблюдалась для режима движения глицерина [1]. Повышение агрегации белка в рабочих экспериментах указывает на возможное изменение структуры белка, раствор которого инкубировался вблизи выходной коммуникации, что могло приводить к перераспределению заряда белковой глобулы, что, в свою очередь, приводило к изменению взаимодействия белковой глобулы с отрицательно заряженной поверхностью слюды. Возможно, при движении глицерина возникает генерация заряда за счет трибоэлектрического эффекта [1] и, соответственно, возникает электрическое поле, которое может оказывать влияние на свойства белкового раствора.

Полученные результаты следует учитывать при создании новых высокочувствительных биосенсорных систем.

### Заключение

Показано, что после выключения потока глицерина повышается адсорбция белка к поверхности слюды.

Полученные результаты следует учитывать при разработке биосенсоров.

Работа в части АСМ-исследований выполнена в рамках Программы фундаментальных научных исследований в Российской Федерации на долгосрочный период (2021-2030); в части создания проточной системы выполнена при поддержке Фонда перспективных технологий и новаций

### Литература:

1. Ivanov Y.D., Pleshakova T.O., Shumov I.D., Kozlov A.F., Ivanova I.A., Ershova M.O., Tatur V.Y., Ziborov V.S. AFM Study of the Influence of Glycerol Flow on Horseradish Peroxidase near the in/out Linear Sections of a Coil. Applied Sciences. 2021; 11(4):1723. <https://doi.org/10.3390/app11041723>