

НАУЧНЫЙ ОБЗОР

УДК 543.94

**ФЕРМЕНТЫ В РАЗВИТИИ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИХ МЕТОДОВ
ДЛЯ БИМЕДИЦИНСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ**

**Илья Николаевич Курочкин^{1,2}, Александра Дмитриевна Васильева²,
Евгений Геннадиевич Евтушенко^{1,2}, Аркадий Вениаминович Еременко²,
Дмитрий Владимирович Пергушов³, Лариса Викторовна Сиголаева¹**

¹ Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,
химический факультет, кафедра химической энзимологии

² Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН

³ Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,
химический факультет, кафедра высокомолекулярных соединений

Автор, ответственный за переписку: Илья Николаевич Курочкин,
inkurochkin@gmail.com

Аннотация. Рассмотрены возможности, открывающиеся при использовании таких инструментальных методов, как вольтамперометрия, спектроскопия гигантского комбинационного рассеяния света (ГКР) и масс-спектрометрия в тандеме с ферментативным катализом. Описаны основные принципы работы электрохимических биосенсоров на основе оксидаз и дегидрогеназ. Показано, что биосенсоры, основанные на циклических ферментативных реакциях и рециркуляции субстрата, обладают наилучшей чувствительностью. Рассмотрены варианты существенного улучшения аналитических возможностей биосенсорного анализа за счет применения полимеров для эффективной модификации поверхности электродов и неструктурной иммобилизации ферментов. Приведены данные, демонстрирующие, как использование ферментных меток расширяет спектр биоаналитических применений спектроскопии ГКР. Возможность высокочувствительного измерения активности ферментных меток (пероксидазы, щелочной фосфатазы, β-галактозидазы) с помощью ГКР, по сути, открывает новую универсальную платформу для разработки методик определения различных антигенов. На примере наиболее часто используемых протеаз рассматриваются основные тенденции развития методологии протеомных исследований методом масс-спектрометрии, а также роль протеаз в дизайне масс-спектрометрических экспериментов.

Ключевые слова: ферментные биосенсоры, рециркуляция субстрата, модификация поверхности, полимеры, спектроскопия ГКР, тандемная масс-спектрометрия, ферментативный гидролиз

DOI: 10.55959/MSU0579-9384-2-2023-64-4-353-376

Финансирование. Приведенные результаты получены в рамках бюджетного финансирования по темам 122041400080-0, 121041500039-8 и при поддержке Российского научного фонда (проекты № 22-14-00213 и № 22-24-00424). Обсуждаемые в работе экспериментальные данные авторов были получены на оборудовании, приобретенном по Программе развития МГУ.

Для цитирования: Курочкин И.Н., Васильева А.Д., Евтушенко Е.Г., Еременко А.В., Пергушов Д.В., Сиголаева Л.В. Ферменты в развитии физико-химических методов для биомедицинских исследований // Вестн. Моск. ун-та. Сер. 2. Химия. Т. 64. № 4. С. 353–376.

SCIENTIFIC REVIEW

ENZYMES IN THE DEVELOPMENT OF PHYSICO-CHEMICAL METHODS FOR BIOMEDICAL RESEARCH

Ilya N. Kurochkin^{1,2}, Alexandra D. Vasilyeva², Evgeniy G. Evtushenko^{1,2}, Arkady V. Eremenko², Dmitry V. Pergushov³, Larisa V. Sigolaeva¹

¹ Division of Chemical Enzymology, Department of Chemistry, M.V. Lomonosov Moscow State University

² N.M. Emanuel Institute of Biochemical Physics, Russian Academy of Sciences

³ Division of Polymer Science, Department of Chemistry, M.V. Lomonosov Moscow State University

Corresponding author: Ilya N. Kurochkin, inkurochkin@gmail.com

Abstract. The paper addresses the possibilities of voltammetry, surface-enhanced Raman spectroscopy (SERS) and mass spectrometry in tandem with enzymatic catalysis. The basic principles of operation of electrochemical biosensors based on oxidases and dehydrogenases are described. It has been shown that biosensors using cyclic enzymatic reactions and substrate recycling have the best sensitivity. The variants of significant improvement of the analytical potential of biosensor analysis due to the use of polymers for effective modification of the electrode surface and non-destructive immobilization of enzymes are illustrated. The data demonstrating how the use of enzyme labels expands the range of bioanalytical applications of SERS are presented. The possibility of highly sensitive measurement of the activity of enzyme labels (peroxidase, alkaline phosphatase, β -galactosidase) using SERS, in fact, opens up a new universal platform for the development of methods for the determination of various antigens. By way of example of the most commonly used proteases, the main trends in the development of the methodology of proteomic studies by mass spectrometry, as well as the role of proteases in the design of mass spectrometric experiments, are considered.

Keywords: enzyme biosensors, substrate recirculation, surface modification, polymers, SERS ELISA, tandem mass spectrometry, enzymatic hydrolysis

Financing support. These results were obtained within the framework of budget financing on the topics 122041400080-0, 121041500039-8 and with the support of the Russian Science Foundation: project No. 22-14-00213 and project No. 22-24-00424. The experimental data of the authors discussed in the paper were obtained on equipment purchased under M.V. Lomonosov Moscow State University Program of Development.

For citation: Kurochkin I.N., Vasilyeva A.D., Evtushenko E.G., Eremenko A.V., Pergushov D.V., Sigolaeva L.V. Enzymes in the Development of Physico-Chemical Methods for Biomedical Research // Vestn. Mosk. un-ta. Ser. 2. Chemistry. 2023. T. 64. № 4. P. 353–376.

Базовый тезис, предложенный И.В. Березиным [1], «ферменты – химические катализаторы» открывает пути использования ферментов в разнообразных химических процессах, включая биоаналитические процедуры, основанные на применении физическо-химических методов определения характера перегруппировки атомных ядер и электронов при развитии химических процессов, молекулярной структуры и

свойств реагентов как в объеме, так и на поверхности. В рамках данной статьи рассматриваются дополнительные возможности, открывающиеся при использовании таких мощных инструментальных методов, как вольтамперометрия, спектроскопия гигантского комбинационного рассеяния света и масс-спектрометрия в тандеме с ферментативным катализом. Особенно ярко эти дополнительные возможности проявляются при

биомедицинских исследованиях и позволяют фактически создавать новые поколения молекулярно-диагностических систем.

Вольтамперометрический анализ с использованием ферментов: амперометрические биосенсоры

Уникальная способность ферментов специфически реагировать с химическими и биологическими соединениями привела к развитию высокочувствительных биосенсорных устройств. Современные требования к простоте и надежности анализа одновременно с быстротой, а также компактностью аналитического устройства и коммерческой доступностью расходных материалов привели к тому, что электрохимические биосенсоры заняли передовые позиции в области медико-биологических исследований.

Электрохимический биосенсор на основе ферментов представляет собой особый тип аналитического устройства, который состоит из иммобилизованного на преобразователе фермента (или ферментов) – «узнающего элемента». Специфические взаимодействия аналита с молекулами фермента преобразуются в электрический сигнал (напряжение, ток, импеданс и т.д.) [2, 3]. Генерируемые выходные сигналы пропорциональны концентрации аналита. Первый электрохимический биосенсор с использованием фермента глюкозооксидазы был продемонстрирован Кларком для мониторинга уровня глюкозы в сыворотке крови человека [4]. Кларком были предложены инновационные решения, связанные с объединением в одной конструкции электрода, измеряющего уровень кислорода в приэлектродном пространстве, и мембраны, содержащей фермент, катализирующий окисление соответствующего субстрата кислородом. Эти работы привели к созданию первого биосенсора для определения глюкозы, а также инициировали развитие целой области научных исследований связанной, в первую очередь, с разработками электрохимических биосенсоров (амперометрических, потенциометрических, кондуктометрических и др.). Электрохимические биосенсоры были разработаны для обнаружения различных биологических объектов, таких как субстраты ферментов и их ингибиторы, ферменты, антигены, комплементарные цепи ДНК/РНК [3] и т.д. Высокая чувствительность, селективность и специфичность к определяемым анализам служат ключевыми аналитическими характеристиками биосенсоров.

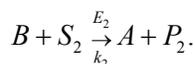
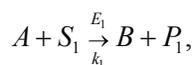
Амперометрические (в общем случае вольтамперометрические) биосенсоры можно считать коммерчески успешными разработками и безусловными лидерами в плане скорости проведения анализа, а также чувствительности и воспроизводимости измерений.

На рис. 1 представлены глюкозооксидаза (ГОД), глюкозодегидрогеназа (ГДГ), пероксидаза (ПО), тирозиназа (Тир) – ферменты, наиболее часто используемые в амперометрических биосенсорах. В этих биосенсорах используют ферменты класса оксидаз и дегидрогеназ, принцип работы которых основан на электрокаталитической регистрации потребления субстрата или образования продукта (рис. 1, А). Например, глюкозооксидаза может восстанавливать субстрат O_2 с образованием продукта H_2O_2 , который при разных потенциалах регистрируется электрохимически на поверхности электрода. Кроме того, эти ферменты работают и с окислительно-восстановительными медиаторами (рис. 1, Б), транспортирующими электроны от активных центров фермента к электродам, что исключает необходимость присутствия кислорода. Медиатор циклически переключается между восстановленным и окисленным состояниями ($Med_{ок}$ и $Med_{вос}$), вследствие чего происходит обмен электронами с ферментом и электродом. Прямой перенос электронов (рис. 1, В) лежит в основе биосенсоров [5], использующих способность иммобилизованного редокс-активного белка обмениваться электронами с электродом при непосредственном контакте. Это явление было впервые продемонстрировано советскими учеными в 1978 г. на примере электровосстановления кислорода с участием лакказы [6]. В дальнейшем явление прямого переноса было показано для пероксидазы [7], гидрогеназ [8] и ряда PQQ-зависимых дегидрогеназ [9].

Повышение чувствительности является одной из основных задач при создании биосенсоров на основе ферментов. Это связано с очень малой (субмикромольной) концентрацией многих важных измеряемых аналитов, в то время как предел обнаружения обычных биосенсоров на основе ферментов (рис. 1, А, Б, В) находится в диапазоне от 1 до 100 мкМ. Существенное повышение чувствительности аналитических систем может быть достигнуто при использовании принципа циклического превращения общего субстрата с участием двух ферментов [10, 11]. Такие биосенсоры интенсивно изучались группой Фридера Шеллера в 1980–1990-е годы. В ос-

нове данного подхода к измерению более низких концентраций аналита лежит принцип рециркуляции субстрата посредством циклических ферментативных реакций, в которых субстрат рециркулируется и регенерируется (рис. 1, Г).

Схема такой рециклической реакции, содержащей два фермента (E_1 и E_2) представлена ниже:



При высокой концентрации ко-субстратов (S_1 и S_2) и обоих ферментов (E_1 и E_2) относительно низкие значения концентрации A или B за счет циклического превращения могут инициировать образование большого количества ко-продуктов (P_1 и P_2), накопление которых (равно как и убыль ко-субстратов) может быть интегрировано в аналитический сигнал.

Если предположить, что стационарная скорость образования B равна скорости регенерации A , т.е. $k_1[A] = k_2[B]$, то общая скорость цикла: $v = k([A] + [B])$.

Константа скорости биферментного цикла (k) может быть рассчитана по константам k_1 и k_2 :

$$k([A] + [B]) = k_1[A],$$

$$k = \frac{k_1[A]}{[A] + [B]}.$$

Подставляя $[B] = (k_1/k_2)[A]$, получаем:

$$k = \frac{k_1[A]}{[A] + (k_1/k_2)[A]} = \frac{k_1 k_2}{k_1 + k_2}.$$

Из этого уравнения можно получить коэффициент усиления аналитического сигнала (α), который будет пропорционален общей константе скорости (k) цикла и времени наблюдения (t):

$$\alpha = \left(\frac{k_1 k_2}{k_1 + k_2}\right)t = kt.$$

Таким образом, чем выше каталитическая активность каждого фермента в цикле, тем больше коэффициент усиления.

Оксидазы и дегидрогеназы или пары киназ были использованы в качестве основных компонентов в субстрат-рециклических биосенсорах для анализа глюкозы, лактата/пирувата, НАДН / НАД⁺, глутамата, пуриновых нуклеотидов, этанола, бензохинона/гидрохинона [12, 13]. Наибольшие коэффициенты усиления

получены для систем, состоящих из оксидазы и соответствующей дегидрогеназы. В частности, усиление аналитического сигнала на 3–4 порядка описано для лактата (пирувата) [12, 13]. В этом случае используется сопряженная система, состоящая из лактатоксидазы и лактатдегидрогеназы, иммобилизованных в желатиновую матрицу на поверхности кислородного электрода. Пируват, образующийся в процессе лактатоксидазной реакции, в присутствии НАДН конвертируется лактатдегидрогеназой обратно в лактат, который снова вступает в реакцию с лактатоксидазой. Потребление кислорода в биферментной мембране, регистрируемое амперометрически, обеспечивает увеличение чувствительности в случае лактата в 4100 раз, а предел обнаружения составляет 1 нМ [13].

Более низкий предел обнаружения достигнут при определении *n*-аминофенола; 100 пМ этого соединения определяли в сопряженной окислительно-восстановительной системе лакказы/глюкозодегидрогеназа, иммобилизованной в матрицу поливинилового спирта на кислородном электроде Кларка [14]. Лакказа катализирует окисление *n*-аминофенола до *n*-иминохинона, который, будучи акцептором электронов, может восстанавливаться PQQ (пирролохинон хинон)-зависимой глюкозодегидрогеназой из *Acinetobacter calcoaceticus* в присутствии глюкозы. Коэффициент усиления для *n*-аминофенола в этом случае составил 5000. Производные катехола и ферроценуксусной кислоты также чувствительно определялись в диапазоне наномолярных концентраций с помощью электрода лакказы / ГДГ [15, 16].

Другим примером субстрат-рециклической биосенсорной системы для высокочувствительного определения полифенолов может служить система с использованием пары ферментов тирозиназа / ГДГ (рис. 1, Г) [17]. Грибная тирозиназа (монофенол монооксигеназа, ЕС 1.14.18.1) представляет собой бифункциональный фермент, который катализирует превращение монофенольных соединений в катехолы и их последующее окисление до *o*-хинонов. Образующийся *o*-хинон в реакции, катализируемой тирозиназой, эффективно восстанавливается ГДГ в присутствии глюкозы, приводя к значительному увеличению потребления кислорода, которое регистрируется амперометрически с помощью электрода Кларка. Была определена чувствительность биосенсора без усиления и с усилением сигнала, коэффициент усиления, рассчитанный

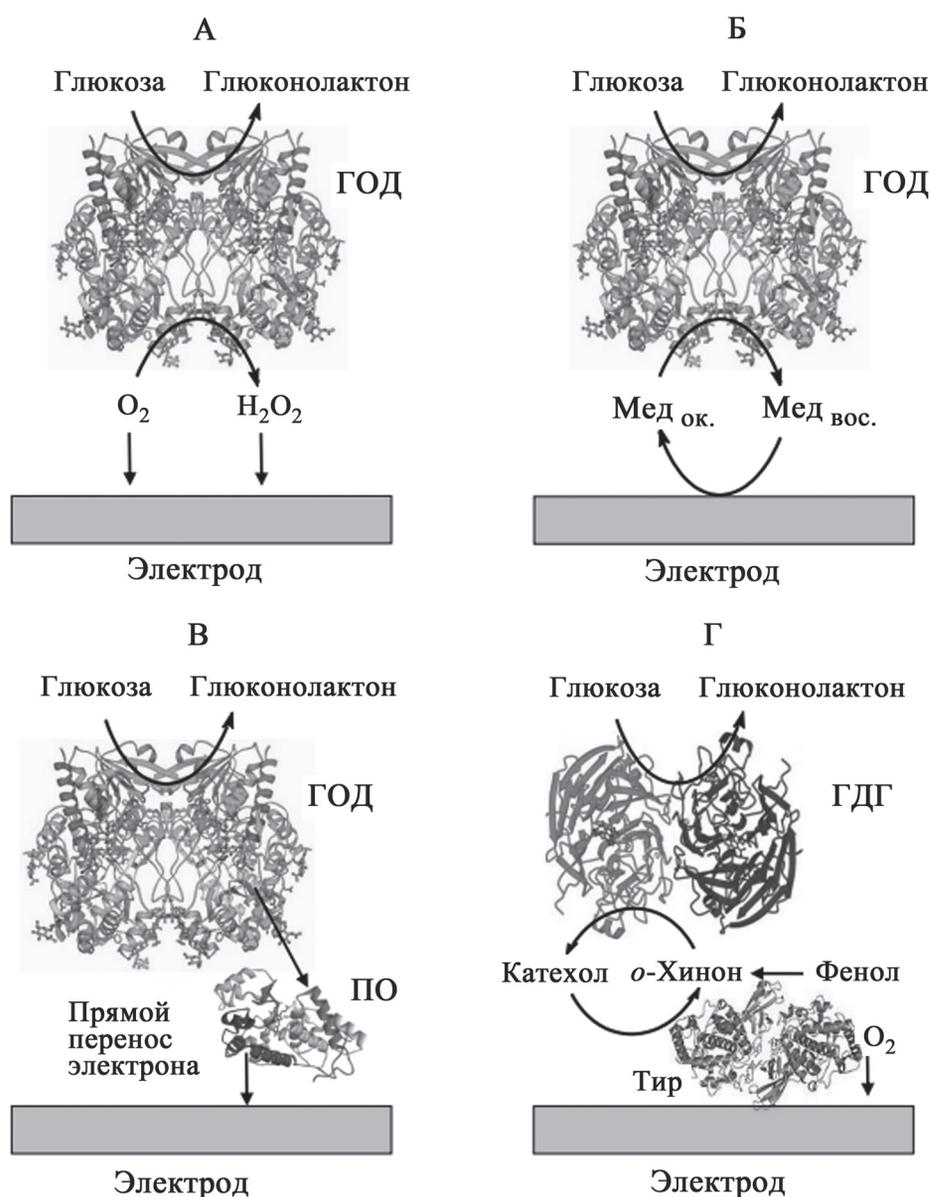


Рис. 1. Схематическое представление рабочих принципов амперометрических биосенсоров на основе оксидаз и дегидрогеназ: глюкозооксидазы (ГОД), глюкоздегидрогеназы (ГДГ), пероксидазы (ПО), тирозиназы (Тир)

как отношение усиленного сигнала к неусиленному (чувствительность или наклон калибровочной зависимости в нА/мкМ) и пределы обнаружения для исследованных соединений. Самый высокий коэффициент усиления был получен для катехола (450) и более низкие для фенола (300), *n*-крезола (240), *n*-хлорфенола (150) и *n*-ацетаминофенола (140). Достигнутые пределы обнаружения катехола и фенола с помощью биферментного биосенсора при соотношении сигнал/шум, равном 3, составили 0,6 и 0,9 нМ соответственно. Наилучшая воспроизводимость (стандартное отклонение <5%) откликов биосенсора наблюдалась при концентрации глюкозы 10 мМ и активности тирозиназы в диапазоне 20–80 Ед. Отклик биосенсора

без усиления линейно зависел от концентрации фенола в диапазоне 0,5–10 мкМ ($r = 0,9959$), в то время как градуировочная зависимость биферментного отклика была линейна ($r = 0,9988$) в широком диапазоне концентраций – от 1 до 400 нМ. Отклик биосенсора стабилен в ходе 40 повторных измерений. Хранение электрода в буферном растворе при комнатной температуре в течение 1 недели приводит к снижению откликов биосенсора на 30%.

Важным аспектом применения биосенсоров является их пригодность для быстрого анализа реальных образцов в экологическом, промышленном или медико-биологическом мониторинге. Достаточно быстрые отклики биосенсора на

величину концентрации аналита могут быть получены при измерении первой производной тока от времени (dl/dt). Такой способ измерения оказался исключительно удобным для мониторинга образцов сточных вод, содержащих фенольные соединения. Измеренная биосенсором концентрация фенола составляет $2,4 \pm 0,1$ мкМ в образце сточных вод. Возможности этого метода подтверждены сравнением с уже известными химическими методами. Фенольный индекс, определенный по стандарту для образца сточных вод, составил 2 ± 1 мкМ, что подтверждает точность определения фенола с помощью разработанного биосенсора, который может быть использован для анализа реальных образцов [17].

Аналитические характеристики такого двухферментного биосенсора позволили использовать его для прямого мониторинга биологически активных тирозин-содержащих пептидов (морфицептин, Леу-энкефалин, бета-казоморфин, диноρφин А, окситоцин, ангиотензин I) в процессе их синтеза и в фармацевтической продукции [18], а также таких ферментов, как бета-галактозидаза [19] и щелочная фосфатаза (ЩФ) [20].

На основе ферментных субстрат-рециклических биосенсоров разработаны проточно-инжекционные иммунологические системы для определения пестицидов [19, 20] и кокаина [21, 22] на уровне наномолярной концентрации.

Так, проточно-инжекционный биосенсор на основе тирозиназа/ГДГ позволяет определять фенол в концентрации 10 нМ и может быть использован для высокочувствительного определения ЩФ с фенилфосфатом (ФФ) в качестве субстрата. Предел обнаружения фермента составляет 3,2 фМ (320 цептомоль/100 мкл) при инкубации фермента с субстратом в течение 1 ч. В работе [20] описано применение этого биосенсора для определения 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислоты (2,4-Д) методом конкурентного иммуноанализа. При этом использовали иммобилизованные на иммунологической плашке антитела против 2,4-Д и конъюгат 2,4-Д-ЩФ. Такой формат иммуноанализа с последующим биосенсорным определением образовавшегося фенола в процессе гидролиза ФФ ферментом, конъюгированным с 2,4-Д, позволил определять этот гербицид с пределом обнаружения 0,1 мкг/л. Разработанный метод биосенсорного определения 2,4-Д в схеме конкурентного иммуноанализа позволяет определять этот гербицид в концентрации, сравнимой с оптической реги-

страцией (предел детекции составляет 0,1 мкг/л для двух методов), при этом существенно сокращается время (от нескольких часов до 2 мин) регистрации аналитического сигнала.

На основе тирозиназного биосенсора разработан неконкурентный иммуноферментатрический анализ (ИФМА) кокаина [21, 22], где использовали конъюгат щелочной фосфатазы (ЩФ) с антителами против кокаина, избыток которого добавляли к анализируемому раствору. Для селективного узнавания кокаина в работе были использованы поликлональные антитела (пАт) к бензоилэргонину (производное кокаина), меченные ЩФ, и иммуносорбент для аффинной колонки, полученный путем химической модификации пористого носителя POROS 50 OH производными кокаина.

Была предложена следующая процедура анализа кокаина. Образцы, содержащие постоянную концентрацию конъюгата пАт-ЩФ (рабочее разведение 1:500 или 1:1000, что соответствует 2,4 или 1,2 нМ антител соответственно) и разное количество кокаина инкубировали до введения в проточно-инжекционную систему. Несвязанные с кокаином молекулы конъюгата пАт-ЩФ задерживались на аффинной колонке, а связанный комплекс кокаин-пАт-ЩФ собирали после колонки и количественно детектировали спектрофотометрическим или биосенсорным методом посредством измерения активности ЩФ. Согласно этой процедуре анализа, измеряемый сигнал прямо пропорционально зависел от концентрации аналита (кокаина) в образце. Предел обнаружения кокаина составил 0,5 нМ (0,15 нг/мл) при времени анализа 2–10 мин [21].

Проточно-инжекционный формат анализа позволял достаточно просто и быстро разделять связанный и несвязанный с аналитом конъюгат. Для ИФМА кокаина был собран простой проточно-инжекционный лабораторный аппарат, содержащий перистальтический насос, инжектор, колонку с иммуносорбентом и коллектор фракций. На основе разработанного подхода был сконструирован прибор для автоматического проточно-инжекционного анализа (АПИА) кокаина [22]. Только процедура ввода пробы контролировалась автоматически системой («Trase GmbH», Германия), два перистальтических насоса («Miniplus 3», «Abimed-Gilson», Германия) работали постоянно. Насос для автоматического пробозабора «включался» (движение реагентов) или «выключался» (циркуляция воды) посредством работы

трехканальных электромагнитных клапанов. АПИА была снабжена специальными воздушными ловушками, удаляющими пузырьки воздуха из проточной системы, которые отрицательно влияли на точность измерения аналитического сигнала.

Количественный анализ кокаина мог проводиться в диапазоне от 0,38 до 3,2 нМ. Минимально детектируемая концентрация кокаина составила 0,38 нМ. Общее время анализа кокаина составило 75 с после введения пробы, включая 30 с для взаимодействия аналита и конъюгата (иммунореакция), 5 с для аффинного разделения, 2 с для реакции с субстратом (ФФ) и 38 с для транспорта к детектору и измерению сигнала. Система снова была готова для анализа следующего образца через 135 с, что позволяло достичь производительности 26 анализов за 1 ч. Такой высокочувствительный и высокопроизводительный иммуноанализ основан на комплексном использовании следующих принципиальных преимуществ:

1) высокая аффинность антител ($K_a = 7,4 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$ для ВК 241 В1, $K_a = 3,9 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$ для ВК 227), позволяющая связывать кокаин в образце менее чем за 2 мин;

2) использование фермента ЩФ с $k_{\text{cat}} = 800 \text{ с}^{-1}$ в качестве ферментной метки;

3) высокая скорость перфузионной хроматографии и большая емкость колонки для аффинного разделения меченных ферментом антител и их комплекса с аналитом;

4) проточный детектор для ферментной метки, регистрирующий сигнал после нескольких секунд инкубации с субстратом;

5) технические особенности проточно-инжекционной системы для одновременного проведения реакции иммуноузнавания и смешивания образца и реагентов без последующего разведения в магистральной перед измерением.

Сравнение характеристик АПИА с описанным выше «ручным» методом иммуноанализа кокаина [21], разработанным с такими же реагентами, показало, что значения пределов детекции кокаина в обоих случаях близки (0,38 нМ для АПИА и 0,5 нМ для «ручного» метода). Однако получение количественного результата с помощью АПИА достигалось в 50 раз быстрее за счет элиминирования процесса разведения и полной интеграции многошагового «ручного» протокола анализа в один автоматизированный процесс со значительным снижением времени для иммунореакции и измерения активности ЩФ.

Следует отметить, что несмотря на многочисленные технологические достижения в разработке биоузнающих элементов для биосенсоров, датчик для определения глюкозы на основе глюкозооксидазы или глюкозодегидрогеназы и медиаторов окисления-восстановления активного центра фермента доминирует на современном мировом рынке. Доминирование этого основного аналита в биораспознавании обусловлено распространенностью сахарного диабета, а также стоимостью затрат на разработку и размер обслуживаемого целевого рынка. Биосенсоры, основанные на циклических ферментативных реакциях и рециркуляции субстрата, менее распространены из-за небольшого числа возможных комбинаций ферментов, несмотря на то, что эти биосенсоры обладают наилучшей чувствительностью среди электрохимических. В первую очередь, они разработаны для расширения области применения электрохимических биосенсоров. Использование нескольких ферментов усложняет биосенсор и, как следствие, может накладывать существенные ограничения на его характеристики и возможность применения. Более того, ключевыми моментами при разработке мультиферментных биосенсоров являются тщательный подбор ферментной системы для достижения высокой чувствительности и снижения влияния на нее веществ-интерферентов, обеспечение достаточной стабильности биосенсора, а также его стоимость и востребованность на рынке.

Наряду с выбором подходящей для определения целевых аналитов ферментативной системы важную роль играет модификация поверхности биосенсорного электрода. Модификация позволяет улучшить условия для протекания необходимой электрохимической реакции, помогает значительно увеличить электроактивную площадь электродов, обеспечивает прочную фиксацию молекул-репортеров (в том числе биомакромолекул), участвующих в электрохимическом процессе, и т.д. Все это обеспечивает значительное улучшение аналитических характеристик метода, таких как предел обнаружения, селективность, диапазон определяемых концентраций аналита и т.д. (рис. 2).

В качестве модификаторов могут быть использованы различные материалы, в том числе природные и синтетические полимеры, металлы и их оксиды, наноразмерные структуры, такие как наночастицы металлов и их оксидов, одностенные и многостенные углеродные нанотрубки, графен, оксид графена, графен,

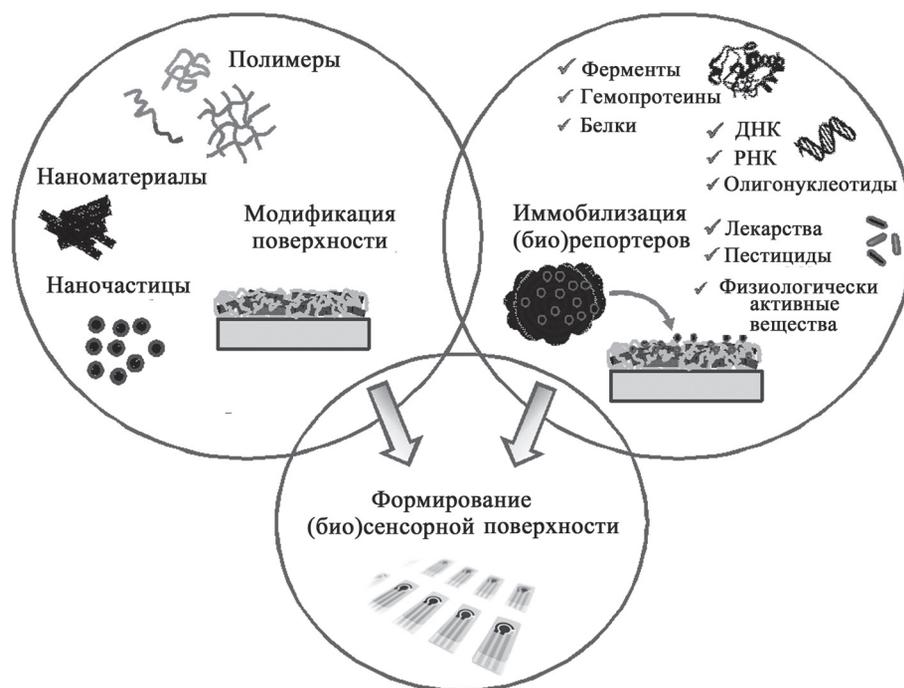


Рис. 2. Модификация поверхности электродов многокомпонентными полимерсодержащими системами как способ формирования (био)сенсоров

допированный бором, азотом, серой, липиды, синтетические мембраноподобные вещества [23–26]. В настоящее время это направление активно развивается благодаря бурному прогрессу в области нанотехнологий и наноматериалов.

Отдельная проблема модификации электродов заключается в иммобилизации биомолекул, в частности ферментов как ключевых компонентов ферментных электрохимических биосенсоров. В этой связи можно сформулировать следующие основные требования к модификатору: высокая емкость по отношению к связываемым биообъектам, биосовместимость, обеспечение благоприятного микроокружения для сохранения биологической активности, преимущественно «деликатные» способы иммобилизации, такие, например, как физическое включение или адсорбция.

Адсорбция биомолекул представляет собой один из наиболее простых способов закрепления (фиксации) биообъектов на поверхностях, который в настоящее время активно применяется для формирования сенсорных покрытий, в том числе и электрохимических [27]. В последние годы все возрастающее число теоретических и экспериментальных работ посвящается исследованию электростатической адсорбции биообъектов, при которой они связываются противоположно заряженной поверхностью. Отметим, что

для придания поверхности необходимого заряда широко используются различные низко- и высокомолекулярные соединения, содержащие в своем составе ионогенные группы [28]. Такие соединения способны весьма эффективно связывать противоположно заряженные биомолекулы, тем самым способствуя их иммобилизации на поверхности.

Как было продемонстрировано в работах [29–38], упомянутый выше подход можно успешно использовать для создания высокочувствительных электрохимических биосенсоров на основе полимер-ферментных пленок, формируемых на графитовых (проводящих) поверхностях. Такие пленки могут быть легко получены путем последовательной (двухстадийной) адсорбции, при которой вначале осуществляют нанесение полимерного компонента (первая стадия), а затем фермента (вторая стадия). Отметим, что вторую стадию проводят в условиях, при которых биообъект и полимерный компонент противоположно заряжены. Главное и несомненное достоинство такого подхода заключается в прочной (многоточечной) фиксации биомолекул за счет электростатического связывания с адсорбированным на поверхности противоположно заряженным полимером. Количество связываемого фермента зависит от структуры (морфологии) сформированной на предыдущей стадии полимерной пленки и ее

толщины, а при несплошном покрытии определяется, прежде всего, степенью заполнения исходной поверхности полимером. Таким образом, стадия нанесения (адсорбции) полимерного компонента является ключевой для формирования высокоактивных, т.е. содержащих значительное количество иммобилизованного фермента, полимер-ферментных покрытий.

Исследования показали, что адсорбция сильных полиэлектролитов, таких как полидиметилдиаллиламмоний хлорид, не позволяет получать сплошные полимерные пленки на графитовых поверхностях [39]. Высокая плотность заряда уже адсорбировавшихся макромолекул препятствует дальнейшей адсорбции последующих. Некоторого улучшения эффективности адсорбции сильных полиэлектролитов можно добиться, если проводить ее в присутствии низкомолекулярных солей, ионы которых способны эффективно экранировать заряд полимерного компонента, например йодидов щелочных металлов [39].

Продемонстрирована эффективность использования слабых полиэлектролитов, таких как полидиметиламиноэтилметакрилат и амфифильные ионогенные диблок-сополимеры на его основе. В частности, было показано, что эффективность их взаимодействия с относительно гидрофобными поверхностями (графит, золото) находится в обратной зависимости от степени протонирования слабого полиэлектролита, которую можно варьировать путем изменения рН. Таким образом, только за счет изменения рН, при котором происходит адсорбция слабых полиэлектролитов, можно формировать полимерные покрытия с совершенно различной морфологией, переходя от островковой морфологии (при высокой степени заряженности макромолекул) к сетчатой структуре (при умеренной степени заряженности) и, наконец, к сплошной пленке (при полном отсутствии заряда у макромолекул) [29, 30, 37]. Отметим, что формирование сплошного покрытия из полидиметиламиноэтилметакрилата или амфифильных ионогенных диблок-сополимеров на его основе послужило необходимым условием создания высокоактивных (содержащих значительное количество иммобилизованных ферментов или белков) биосенсоров на фенол [29], холин [30, 37] и кардиомиоглобин [32].

Применение для модификации поверхности электродов диблок-сополимеров амфифильной природы значительно расширяет функциональные свойства покрытия. Эти полимерные объ-

екты содержат в своем составе одновременно гидрофобный блок (например, 1,2-полибутадиеновый, поли-*n*-бутилакрилатный или поли-*n*-бутилметакрилатный) и ионогенный блок, который может быть как катионным (например, полидиметиламиноэтилметакрилат), так и анионным (например, полиакриловая или полиметакриловая кислота). За счет особенностей строения макромолекулы подобных диблок-сополимеров могут быть многофункциональными и служить связующей средой для создания композитных электрохимических материалов. Гидрофобный блок диблок-сополимеров может способствовать диспергированию углеродных наноматериалов, а также обеспечивать прочную связь модифицирующего слоя с гидрофобной поверхностью электрода. Ионогенный (заряженный) блок может служить матрицей для синтеза наночастиц металлов, а также обеспечивать электростатическое связывание биообъектов или молекул аналита. В качестве примеров полезного эффекта от использования амфифильных ионогенных диблок-сополимеров для модификации электродов можно упомянуть значительное улучшение операционной стабильности биосенсоров на холин при формировании их поверхности послойным нанесением поли-*n*-бутилметакрилат-блок-полидиметиламиноэтилметакрилат и холиноксидазы [30]. Другой пример демонстрирует синергетический эффект от использования многостенных углеродных нанотрубок в сочетании с 1,2-полибутадиен-блок-полидиметиламиноэтилметакрилатом для электрохимического детектирования скелетного и кардиомиоглобина [32]. Еще один пример описывает иммобилизацию цитохрома *c* на поверхности электрода, модифицированного стабильной дисперсией углеродных нанотрубок в водном растворе полианионного диблок-сополимера поли-*n*-бутилакрилат-блок-полиакриловая кислота [36]. Такой тип модификации электродов позволил зарегистрировать не только окислительно-восстановительные процессы иона железа гема при потенциале около 0 В, но и электрохимическое окисление аминокислот полипептидной цепи цитохрома *c* (тирозина и триптофана при +0,6 В), а также необратимое электрохимическое окисление гема при +0,8 В. Это многоточечное обнаружение цитохрома *c* можно рассматривать как метод распознавания и количественного определения цитохрома *c* в сложных (био)химических матрицах. Другие примеры демонстрируют эффективную модификацию электродов дисперсия-

ми углеродных нанотрубок в водных растворах амфифильных полимеров и сополимеров для количественного электроанализа пуриновых гетероциклических оснований, олигонуклеотидов и двухцепочечной ДНК [40, 41], а также лекарственных препаратов диклофенака и ацетаминофена [42].

Среди перспективных способов формирования поверхности ферментных биосенсоров следует отдельно выделить модификацию поверхности электрода пленками на основе стимулчувствительных полимеров, способных значительно, быстро и обратимо изменять свой гидрофильно-гидрофобный баланс при изменении внешнего стимула, в первую очередь, рН и температуры. В частности, уже упомянутый выше линейный полидиметиламиноэтилметакрилат относится к стимулчувствительным полимерам. Помимо рН-чувствительности, о которой уже говорилось, этот полимерный объект обладает термочувствительностью. Ниже некоторой температуры он находится в набухшем высокогидратированном состоянии, в то время как при превышении некоторой критической температуры этот полимер гидрофобизуется и переходит в сколлапсированное состояние. Такое поведение является обратимым, и при понижении температуры набухание восстанавливается. Отметим, что критическая температура фазового перехода зависит от рН окружающей водной среды, и при зарядении макромолекул термочувствительность подавляется. Таким образом, варьирование рН и температуры позволяет контролировать гидрофильно-гидрофобный баланс полимера в водной среде и, как следствие, влиять на эффективность его взаимодействия с поверхностями [37].

Подобное стимулчувствительное поведение характерно также для рН- и термочувствительных сополимерных микрогелей – сшитых сополимеров на основе поли-*N*-изопропилакриламида, содержащих в своем составе небольшое количество ионогенного сомономера, который может быть как катионным, так и анионным. Термочувствительность таких сополимерных микрогелей обусловлена субцепями поли-*N*-изопропилакриламида – термочувствительного полимера, обладающего нижней критической температурой растворения около 32 °С; рН-чувствительность определяется звеньями ионогенного сомономера, которые могут протонироваться или депротонироваться в зависимости от условий окружающей среды. Размеры частиц сополимерных микрогелей, как правило, нахо-

дятся в диапазоне от 50 нм до 5 мкм. В водных средах они образуют устойчивые на коллоидном уровне системы, их частицы проницаемы для широкого круга различных соединений. Стимулчувствительные сополимерные микрогели представляют собой высокочувствительные контейнеры для различных соединений и проявляют адаптивность [43, 44]. Кроме того, и это важно в контексте формирования поверхности биосенсора, их частицы способны обеспечить обогащенное водой неструктурное микроокружение для биомолекул, что позволяет сохранить биологическую активность и функции последних. Таким образом, полимерные микрогели являются перспективной платформой для неструктурной иммобилизации биомолекул.

Продемонстрировано успешное применение стимулчувствительных катионных сополимерных микрогелей для создания биосенсорных систем [31, 33–35, 38]. Оказалось, что наибольшие биосенсорные отклики наблюдаются в том случае, когда нанесение таких микрогелей на графитовые электроды проводят при высоких значениях рН и повышенной температуре. В этих условиях они дегидратированы и сильно гидрофобизованы, проявляя наибольшее сродство к поверхности графитовых электродов. Действительно, использование этих оптимальных условий позволяет достичь наилучшей модификации поверхности электрода и затем иммобилизовать на второй стадии формирования биосенсора большее количество фермента, что значительно повышает чувствительность ферментных биосенсоров [38].

Отметим, что иммобилизация ферментов наиболее эффективна, когда микрогелевая пленка, сформированная при высоком значении рН и повышенной температуре, вводится в контакт с раствором фермента при рН 7 и комнатной температуре. В этом случае связывание фермента происходит одновременно с набуханием микрогеля, который работает как своеобразная «губка», всасывая в себя дополнительное количество биомолекул [31].

В случае, когда микрогель содержит первичные аминогруппы, появляется возможность ковалентно пришить фермент к микрогелю, используя любые подходящие способы ковалентной иммобилизации, что существенно улучшает операционную стабильность ферментных биосенсоров на основе микрогель-ферментных пленок [35].

Сетчатая структура микрогелей дает возможность проводить селективную иммобилизацию

объектов в зависимости от их размера. Это позволило сконструировать интересную биферментную биосенсорную систему, в которой два фермента, сильно различающиеся размерами своих глобул, имеют разную локализацию в частицах микрогеля [33]. Один из ферментов – холиноксидаза, он обладает небольшим размером глобулы и способен проникать внутрь частиц поли(*N*-изопропилакриламид-*co*-диметиламинопропилметакриламид)ного микрогеля. Второй фермент – бутирилхолинэстераза. Это крупный четырехсубъединичный фермент, он не может проникать внутрь частиц микрогеля и локализуется преимущественно на их поверхности. В зависимости от выбранного субстрата можно независимо измерять ферментативные отклики холиноксидазы (по холину), бутирилхолинэстеразы (по бутирилтиохолину) или каскадного двухферментного процесса (по бутирилхолину).

Преимущественно поверхностная локализация фермента бутирилхолинэстеразы на частицах поли(*N*-изопропилакриламид-*co*-диметиламинопропилметакриламид)ного микрогеля в нанесенном на электроды микрогель-ферментном покрытии привела к созданию высокочувствительного биосенсора для количественного определения высокотоксичных фосфорорганических пестицидов хлорпирифоса и диазинона [34]. С одной стороны, поверхностная иммобилизация бутирилхолинэстеразы на частицах микрогеля обеспечивает благоприятное микроокружение для длительного сохранения активной конформации фермента, а с другой стороны, оставляет доступными активные центры фермента для субстрата и/или фосфорорганических ингибиторов (к которым относятся хлорпирифос и диазинон). В результате пределы определения указанных соединений составили менее 10 пМ, что можно считать очень значительным достижением.

Потенциал стимулчувствительных микрогелей, на наш взгляд, еще далеко не исчерпан, в частности, интересным продолжением этого направления может стать исследование возможности температурной регуляции ферментативной активности биосенсоров на основе микрогель-ферментных пленок [45].

Рассмотренные в этом разделе лишь некоторые варианты применения полимеров для эффективной модификации поверхности электродов демонстрируют их значительный потенциал. Действительно, с помощью полимеров можно эффективно модифицировать поверхности электродов и осуществлять неdestructивную

иммобилизацию биомолекул. Это существенно расширяет аналитические возможности биосенсорного анализа, позволяет включать в состав модифицирующего слоя дополнительные компоненты, в частности углеродные наноматериалы, дает возможность реализовать биосенсорные системы с разной пространственной локализацией нескольких ферментов, конструировать ферментативные каскадные биосенсорные системы, а также закладывает основу для формирования «смарт»-биосенсоров с возможностью дополнительной регуляции аналитического отклика системы внешним стимулом.

Иммуноферментный анализ с использованием спектроскопии гигантского комбинационного рассеяния

Спектроскопия комбинационного рассеяния (КР) – это один из типов колебательной спектроскопии. Путем облучения вещества монохроматическим излучением в ультрафиолетовой, видимой или ближней инфракрасной областях и регистрации неупругого рассеяния, как правило, в Стоксовой области получают набор полос, соответствующих колебаниям различных группировок атомов. В соответствии с правилами отбора КР-активными считаются колебания, в результате которых изменяется поляризуемость молекулы. Спектроскопия КР является неразрушающим методом анализа и благодаря этому широко применяется для идентификации и дискриминации соединений, а также количественного анализа содержания основных компонентов в пищевой и фармацевтической промышленности [46, 47]. Этот метод используют в криминалистике, преимущественно в сочетании с микроскопией [48], археологии, искусствоведении, а также в биологии для исследования клеток и тканей [49, 50]. Еще одно ключевое направление использования спектроскопии КР – исследование структуры веществ [51, 52], в том числе белков [53, 54]. Вероятность КР-излучения на веществе мала по сравнению с упругим рассеянием, что в существенной мере ограничивает чувствительность метода. Открытие эффекта гигантского комбинационного рассеяния (ГКР) в 1974 г. позволило получать выраженные спектры КР для предельно низкой концентрации исследуемых соединений.

Эффект ГКР возникает при нахождении молекулы в непосредственной близости от наноструктурированной металлической поверхности [55]. Он проявляется в виде многократного (на несколько порядков) усиления интенсив-

ности полос в спектрах КР. Принято выделять электромагнитную и химическую составляющие ГКР. Первая имеет плазмонную природу: резонансное поглощение энергии падающей электромагнитной волны наноструктурой приводит к возбуждению локализованного поверхностного плазмон-поляритона. Напряженность электрического поля E в приповерхностной области оказывается многократно повышенной по сравнению с E_0 падающей волны. В таком окружении, во-первых, увеличивается эффективность возбуждения молекулярного осциллирующего диполя, а во-вторых, происходит стимуляция его эмиссии. Эта совокупность эффектов приводит к степенному усилению интенсивности полос КР,

$$I(\text{ГКР}) / I(\text{КР}) \propto (E/E_0)^4.$$

Электромагнитная составляющая ГКР универсальна и в равной степени усиливает сигнал КР всех типов молекул, находящихся вблизи металлической поверхности. Сигнал ГКР может быть дополнительно модулирован благодаря химической составляющей. Нековалентные взаимодействия молекулы с поверхностью металла влияют на изменение поляризуемости при колебаниях группировок атомов. Этот эффект может приводить к дополнительному селективному усилению или ослаблению интенсивности отдельных полос в спектрах ГКР по сравнению со спектрами КР.

Усиливающие наноструктуры называют ГКР-субстратами. Выделяют два основных типа: твердые носители, содержащие металлические наноструктуры, и золи металлических наночастиц [56]. Первые представляют собой материал (планарная поверхность, волокнистые структуры и т.д.), на котором уже сформированы металлические наноструктуры в конфигурации, обеспечивающей плазмонное усиление сигнала КР. При использовании на такой субстрат наносят анализируемый раствор и либо высушивают, либо производят измерение под слоем жидкости, иногда в проточной ячейке. Способ использования зольей золотых или серебряных наночастиц (в том числе нанообъектов несферической формы) подразумевает формирование усиливающих структур в ходе анализа. Золь смешивают с анализируемым раствором, происходит связывание интересующих молекул с поверхностью металла. Затем частицы агрегируют, так как именно в зазорах между частицами формируются так называемые «горячие точки» – области дополнительного усиления электрического поля за счет взаимодействия плазмонов отдельных частиц.

Сигнал ГКР регистрируют непосредственно с суспензии агрегатов наночастиц.

Спектроскопия ГКР считается высокочувствительным методом с типичными пределами обнаружения в диапазоне от 10^{-13} до 10^{-6} М при регистрации сигнала, усредненного по ансамблю молекул. Нижним пределом обнаружения аналитов для ГКР служит уровень единичных молекул [55, 57]. При этом не каждое соединение может быть зарегистрировано методом ГКР с высокой чувствительностью. Молекула должна обладать высоким сечением комбинационного рассеяния, а также тем или иным способом помещена в непосредственной близости от поверхности металлической наноструктуры. В простейшем случае соединение должно адсорбироваться на поверхность металла.

В рамках предлагаемого обзора рассмотрено активно развивающееся в настоящее время направление иммуноферментного анализа с ГКР-регистрацией. Иммуноанализ в целом – это широкий спектр методов, основанных на высокоаффинных и специфических взаимодействиях между антителами и антигенами. Для определения высокомолекулярных антигенов (маркёров патологий, патогенных агентов и т.д.) наибольшее распространение получил твердофазный иммуноанализ в формате так называемого «сэндвича» (рис. 3, А). Образец, содержащий определяемый антиген, инкубируют с иммобилизованными на твердой поверхности антителами захвата, при этом происходит специфическое связывание антигена с антителами. После отмывки от не связавшихся компонентов добавляют конъюгат вторых антител с той или иной меткой, позволяющей провести регистрацию результатов анализа. Для высокочувствительного количественного анализа в подавляющем большинстве случаев используют ферментные метки: пероксидазу из корней хрена (КФ 1.11.1.7), щелочные фосфатазы (КФ 3.1.3.1), β -галактозидазы (КФ 3.2.1.23). Популярность ферментных меток обусловлена двумя факторами. Во-первых, они позволяют осуществить дополнительное усиление сигнала, так как в процессе каталитического превращения субстрата на одну молекулу фермента образуются тысячи или даже десятки тысяч молекул продукта (рис. 3, Б). Во-вторых, путем выбора подходящего субстрата анализ может быть сопряжен с различными системами регистрации сигнала: колориметрической, флуоресцентной, хемилюминесцентной, электрохимической и т.д.

Пределы обнаружения иммуноанализа во многом определяются возможностями ис-

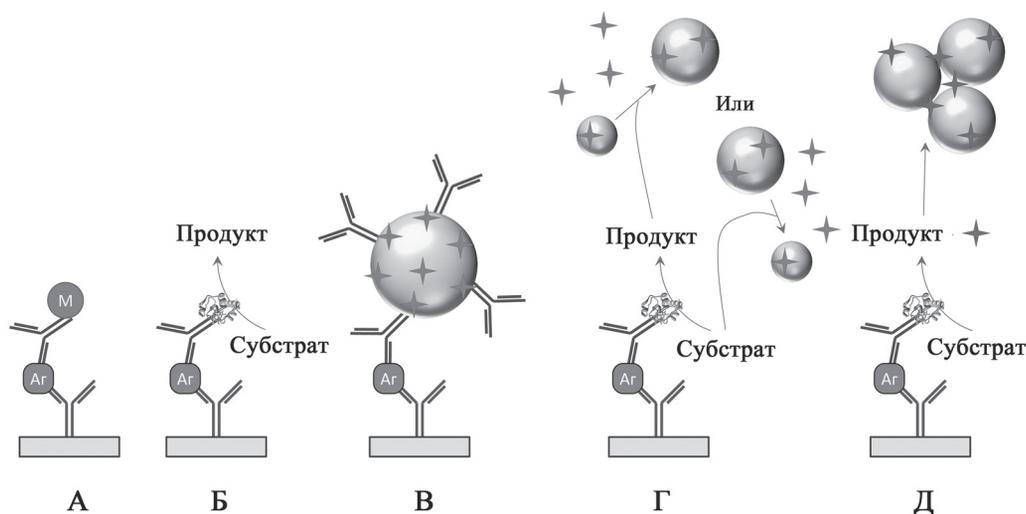


Рис. 3. Схемы твердофазного иммуноанализа в формате «сэндвича»: А – общая схема (вторые антитела конъюгированы с меткой М, количество которой отражает количество связавшегося определяемого антигена Аг); Б – схема твердофазного иммуноферментного анализа; в качестве метки используется одна или несколько молекул фермента, на стадии проявления каталитически превращающих добавленный субстрат в регистрируемый продукт; В – схема иммуноанализа с использованием ГКР-меток; Г – схема ГКР-ИФА, основанного на растворении металлических наночастиц субстратом или их росте под действием продукта ферментативной реакции; Д – схема ГКР-ИФА с регистрацией продукта ферментативной реакции при помощи ГКР

пользуемых систем регистрации. Поэтому спектроскопия ГКР на протяжении последних трех десятилетий привлекает внимание исследователей в качестве платформы для разработки высокочувствительных методик иммуноанализа. Исторически первыми были реализованы системы с использованием так называемых ГКР-меток (SERS labels, SERS tags), схема которых представлена на рис. 3, В. В них используются конъюгаты вторых антител с металлическими наночастицами (сферической формы или анизотропными), на поверхности которых иммобилизованы молекулы, обладающие высокоинтенсивными спектрами ГКР. Этот подход широко представлен в литературе и детально проанализирован в обзорах и протоколах [58–62]. Одним из основных недостатков таких систем являются диффузионные ограничения, в значительной мере усугубляющиеся при замене молекулы антитела с небольшой меткой на объемный конъюгат антител с наночастицей. Наиболее успешно ГКР-метки используются в латеральном проточном иммуноанализе (иммунохроматографических «тест-полосках») как высокочувствительная альтернатива визуальной (или колориметрической) системе детекции [63]. Необходимо отметить, что при использовании ГКР-меток не задействована ранее обсуждавшаяся возможность ферментативного усиления. По этой причине все большее внимание исследователей привлекают

системы иммуноферментного анализа (ИФА), сопряженные с ГКР-регистрацией (ГКР ИФА).

На создание первого типа ГКР ИФА (рис 3, Г) вдохновили работы [64–66], в которых показана возможность визуальной колориметрической детекции низкой концентрации биомаркёров с использованием принципов роста/растворения/агрегации металлических наночастиц. В работе [67] в качестве метки использовали фермент каталазу; на стадии регистрации в раствор добавляли пероксид водорода и агрегированные серебряные наночастицы с нанесенной 4-меркапто-бензойной кислотой (4-МБК). В отсутствие антигена и, как следствие, каталазы пероксид водорода растворяет наночастицы, что приводит к низкой интенсивности полос 4-МБК в спектре ГКР. С ростом концентрации антигена за счет активности каталазы снижается концентрация H_2O_2 , в результате возрастает интенсивность полосы 1077 см^{-1} 4-МБК в спектре ГКР при длине волны возбуждения (ДВВ) 785 нм.

Описано применение принципа роста плазмонных наночастиц за счет продукта ферментативной реакции [68, 69]. Метка в виде щелочной фосфатазы осуществляет гидролиз 2-фосфата-L-аскорбиновой кислоты. В системе также присутствуют ионы серебра Ag^+ , золотые зародыши и ГКР-активное соединение – 4,4'-(1,4-фениленбис(этилен-2,1-диил))-дибензилтиол или 4-амино-тиофенол.

В присутствии антигена под действием щелочной фосфатазы образуется L-аскорбат, восстанавливающий ионы серебра, что приводит к росту наночастиц серебра на золотых зародышах, адсорбции ГКР-активного соединения на их поверхности и возрастанию интенсивности его полос в спектре ГКР.

Второй подход к ГКР ИФА основан на непосредственной регистрации спектров ГКР продуктов ферментативной реакции (рис. 3, Д). Этот вариант представляется наиболее перспективным, так как с помощью подбора пары субстрат-продукт ферментативной реакции возможно сочетание двух последовательных систем усиления. Во-первых, под действием фермента-метки происходит генерация большого числа молекул продукта. Во-вторых, продукт с высокой чувствительностью может быть зарегистрирован методом спектроскопии ГКР за счет высокого сечения КР и высокого сродства к поверхности металла.

Наиболее часто используемым ферментом в колориметрическом ИФА является пероксидаза из корней хрена. Для целей ГКР-регистрации описано использование ее субстратов *o*-фенилендиамина, 2,2'-азино-бис-(3-этилбензтиозолин-6-сульфоуксиды) (АБТС), бензидина, а также 3,3',5,5'-тетраметилбензидина (ТМБ).

o-Фенилендиамин под действием H_2O_2 в присутствии пероксидазы претерпевает окислительную димеризацию с образованием 2,3-диаминофеназина [70, 71]. В пионерской работе [72] продукт регистрировали без остановки ферментативной реакции при pH 5 с использованием золя наночастиц серебра и ДВВ 514,5 нм. В качестве аналитической была выбрана наиболее интенсивная полоса в спектре ГКР при 1442 см^{-1} . Несмотря на ряд недостатков (не указан анализируемый антиген, неверно указана структура продукта ферментативной реакции), в [72] впервые была показана принципиальная возможность проведения ГКР ИФА. В недавней работе [73] ГКР-регистрацию продукта (2,3-диаминофеназина) проводили после остановки пероксидазной реакции серной кислотой. При использовании золя серебряных наночастиц и ДВВ 785 нм было показано, что в кислой среде возможно использование полос 727 , 766 и 1370 см^{-1} продукта для ГКР-регистрации результатов ИФА. С использованием дополнительной стадии тирамидного усиления на примере антигена хорионического гонадотропина продемонстрирован предел обнаружения (ПО) в $0,17\text{ мМЕ/мл}$ с повторяемостью около 5%.

Еще одним субстратом пероксидазы, для которого была показана возможность ГКР-регистрации продукта, является АБТС [74]. При ДВВ 514,5 нм и использовании золей золотых наночастиц наиболее интенсивной ГКР-полосой продукта является полоса 1405 см^{-1} с оптимальным для регистрации pH 5. На примере человеческого простатспецифического антигена, в том числе в сыворотке крови, для ГКР ИФА показана возможность достижения аналитических характеристик (предел обнаружения, рабочий диапазон концентраций, повторяемость), не уступающих коммерческому колориметрическому набору.

ТМБ также является одним из перспективных субстратов для ГКР ИФА. В ходе его окисления, катализируемого пероксидазой, под действием H_2O_2 образуется смесь продуктов. Основным продуктом представляет собой сопряженный димин, условно обозначаемый как ТМБ²⁺, возможно в комплексе с исходным диамином. Показано, что в кислой среде, после остановки ферментативной реакции серной кислотой, продукт реакции обладает более высоким сродством к поверхности золотых наночастиц по сравнению с субстратом и дает высокоинтенсивные ГКР-спектры (ДВВ 633 нм) с основными полосами при 1191 , 1337 и 1605 см^{-1} [75, 76]. На основе этой системы продемонстрировано создание методик ГКР ИФА для определения сердечной формы тропонина Т [75], гаптоглобина [76], респираторно-синцитиального вируса человека [77] и аденовируса [78] с аналитическими характеристиками, достаточными для их медико-диагностического применения.

Использование бензидина в качестве субстрата пероксидазы в настоящее время ограничивается его канцерогенными свойствами. Тем не менее, на его основе реализована необычная схема ГКР ИФА, основанная на измерении убыли субстрата [79–81]. Регистрацию проводят при ДВВ 638 или 785 нм, используя полосы бензидина 1197 или 1609 см^{-1} . Разработанные методики измерения альфа-фетопротеина и человеческой карбоксилэстеразы 1 демонстрируют аналитические характеристики, эквивалентные ИФА в микропланшетном формате с колориметрической регистрацией.

Все перечисленные субстраты пероксидазы исходно были предложены для ее колориметрической детекции и в описанных работах были адаптированы для целей ГКР. Можно предположить, что дальнейшее качественное развитие эта область получит в результате перехода к субстратам, подобранным специально для ГКР-регистрации.

Такие ферменты, как щелочная фосфатаза и β -галактозидаза пока реже используются в ГКР ИФА, несмотря на их преимущество перед пероксидазой ввиду более высоких каталитических констант. Высококчувствительное измерение активности щелочной фосфатазы с пределом обнаружения 4×10^{-15} М с помощью ГКР впервые было продемонстрировано в работе [82]. Анализ основан на каталитическом гидролизе 5-бром-4-хлор-3-индоксилфосфата с последующим некаталитическим окислением продукта кислородом воздуха до галоген-замещенного производного индиго. Это соединение дает интенсивные спектры ГКР при использовании золей золотых наночастиц и ДВВ 785 нм. Полоса при 600 см^{-1} может быть использована в качестве аналитической. Этот принцип получил развитие в виде методик ГКР ИФА для определения С-реактивного белка с пределом обнаружения 0,3 нг/мл [83], модельных мышинных антител (ПО = 0,33 нг/мл) [84], патогенов на примере модельной бактерии *E. coli* (ПО = 10 колониеобразующих единиц в 1 мл) [85]. Для всех трех приведенных методик пределы обнаружения ГКР ИФА на 1–1,5 порядка лучше коммерческих колориметрических ИФА наборов. Вероятно, для ИФА возможна аналогичная система регистрации с использованием β -галактозидазы в качестве метки, поскольку для нее существует коммерчески доступный субстрат 5-бром-4-хлор-3-индоксил- β -D-галактопиранозид, при ферментативном гидролизе которого с последующим окислением образуется то же галоген-замещенное производное индиго. Использование этого принципа для регистрации активности внутриклеточной β -галактозидазы описано в работе [86], однако примеров ГКР ИФА для него не опубликовано.

В пионерской работе [87] впервые описан подход для одновременного ГКР-измерения активности щелочной фосфатазы и β -галактозидазы с использованием субстратов, синтезированных специально для целей ГКР. Они представляют собой фосфорный эфир и β -D-галактопиранозид двух диазокрасителей на основе 8-гидроксихинолина. Характерные полосы каждого из продуктов могут быть использованы для измерения активности обоих ферментов.

Помимо уже описанных вариантов ГКР ИФА, в которых продукт ферментативной реакции взаимодействует с металлическими наночастицами за счет адсорбции, необходимо отметить две работы, в которых поверхность частиц предва-

рительно модифицировали для связывания продуктов, в обычном состоянии не являющихся ГКР-активными. В работе [88] из фенилфосфата под действием щелочной фосфатазы генерировали фенол, реагирующий с иммобилизованным на поверхности наночастиц диазониевым катионом. Образующийся диазокраситель демонстрирует интенсивный спектр ГКР, что позволяет регистрировать активность щелочной фосфатазы с пределом обнаружения 10^{-4} ед./л, не уступающим наиболее чувствительным коммерческим хемолуминесцентным наборам. Использование этой системы позволило разработать методику ГКР ИФА для определения холеротоксина с ПО 0,04 пг/мл (33 фМ). Значимым ограничением этого подхода является неустойчивость диазониевых солей. В работе [89] аскорбат, образующийся при катализируемом щелочной фосфатазой гидролизе 2-фосфата-L-аскорбиновой кислоты, взаимодействовал с тиольным производным *o*-фенилендиамина, заранее иммобилизованным на металлических частицах. Получаемое полициклическое производное регистрировали методом ГКР по интенсивности полосы 1059 см^{-1} . Предел обнаружения щелочной фосфатазы составил 0,2 ед./л.

Таким образом, в настоящее время направление ГКР ИФА активно развивается. Использование ферментных меток значительно расширяет спектр биоаналитических применений спектроскопии ГКР. Возможность высокочувствительного измерения активности ферментных меток (пероксидазы, щелочной фосфатазы, β -галактозидазы) с помощью ГКР, по сути, открывает новую универсальную платформу для разработки методик определения различных антигенов с использованием на иммунохимических стадиях всего накопленного опыта классического колориметрического ИФА. В ряде работ [73, 83–85, 88] значительное улучшение пределов обнаружения антигенов в ГКР ИФА, по сравнению с существующими коммерческими наборами, уже продемонстрировано экспериментально. Ключевыми направлениями развития этой области нам видятся совершенствование и оптимизация протоколов ГКР-регистрации для уже описанных пар субстрат/продукт и поиск новых, предназначенных специально для ГКР.

Роль протеаз в дизайне масс-спектрометрических экспериментов

За более чем вековую историю своего существования, от первых экспериментов по определению масс стабильных изотопов некото-

рых элементов [90], метод масс-спектрометрии перешел в разряд основных методов исследования сложнейших биологических систем. Это оказалось возможным благодаря ряду научных работ, в том числе разработке методов «мягкой» ионизации путем экстракции ионов из растворов при атмосферном давлении (electrospray ionization, ESI) [91, 92] и матрично-активированной лазерной десорбции/ионизации (matrix-assisted laser desorption/ionization, MALDI) [93], позволивших эффективно переводить относительно крупные биомолекулы (например, пептиды и белки) в газовую фазу в виде заряженных ионов, развитию и комбинированию способов разделения смесей молекул перед анализом [94], а также методов первичной подготовки исследуемых материалов.

Почти три десятилетия назад возникла новая область исследований, посвященная идентификации и количественному анализу белков, а также поиску посттрансляционных модификаций (ПТМ), получившая (по аналогии с геномикой) название протеомика. Термин «протеом», как и первая специализированная лаборатория протеомики, появился в 1994 г. для описания и характеристики белков в дополнение к геномным данным [95]. С этого времени масс-спектрометрия стала широко применяться для установления первичной структуры пептидов, анализа и идентификации белков.

Биологические белковые смеси характеризуются большим разнообразием белков по химическому составу, форме, размеру и (что особенно важно) по содержанию в образце. Некоторые белки могут присутствовать в количестве всего нескольких молекул на клетку [96], тогда как другие могут достигать нескольких миллионов молекул в той же клетке. Несмотря на большую селективность и чувствительность масс-спектрометров, ни один доступный сегодня прибор не имеет достаточной разрешающей способности для работы в таких диапазонах. По этой причине для улучшения охвата протеомного анализа используют различные стратегии фракционирования [97].

Несмотря на развитие разных методик и постоянные попытки исследователей применить новые способы анализа сложных смесей, наиболее распространенным подходом для анализа белковых образцов является протеомика «снизу-вверх» («bottom-up», BU) [98]. Этот подход характеризуется использованием протеаз для гидролиза белков, находящихся в исследуемом

образце, для получения пептидов с предсказуемой аминокислотной последовательностью. Затем пептиды анализируются методом tandemной масс-спектрометрии (MS/MS), а их отношение массы к заряду, сопоставляемое с предполагаемым, используется для получения информации о белках, находящихся в образце.

Подход BU использует преимущества работы с пептидами по сравнению с белковыми молекулами: пептиды легче разделяются с помощью обращенно-фазовой жидкостной хроматографии (reversed-phase liquid chromatography (RPLC)), эффективно ионизируются и более предсказуемо фрагментируются [99]. Эти особенности обеспечивают высокопроизводительный анализ, позволяя идентифицировать и количественно определять тысячи белков из сложных лизатов. Именно по причине ориентированности подхода BU на работу с пептидами ключевой стадией любого эксперимента является стадия подготовки проб.

Первый этап включает экстракцию белков из биологической матрицы и зависит от типа анализируемого образца. За ним обычно следует этап непосредственной подготовки белка к гидролизу, включающий восстановление и последующую модификацию дисульфидных связей, образующихся при формировании третичной структуры между аминокислотными остатками цистеина и оказывающих существенное влияние на эффективность анализа. Осложняющим фактором при анализе пептидов, между которыми сохраняется дисульфидная связь, является их менее эффективная фрагментация и существенное искажение tandemных масс-спектров, затрудняющее их интерпретацию, аннотирование пиков ионов фрагментов и сопоставление с теоретическими спектрами [100]. Поскольку предполагаемая масса пептида при обработке результатов рассчитывается на основании линейной аминокислотной последовательности, соединенные дисульфидной связью пептиды, имеющие совершенно другой показатель, могут быть исключены из анализа. Кроме вышеописанных проблем, дисульфидные связи стабилизируют структуру белка, делая сайты гидролиза протеолитическими ферментами менее доступными, что существенно снижает эффективность гидролиза – важнейшего этапа подготовки образца к анализу и методической основы подхода BU.

Выбор протеолитического фермента или комбинации ферментов зависит от многих факторов. Наиболее полно охарактеризовать их можно на примере использования трипсина. Для BU

гидролиз с использованием трипсина стал настоящим «золотым стандартом» подготовки образцов. Трипсин использовался в тысячах работ, включая первый проект по исследованию протеома человека, и на данный момент остается основной протеазой, используемой при анализе ПТМ и изучении межбелковых взаимодействий [101, 102]. Трипсин так широко используется в протеомном анализе благодаря своим свойствам. В первую очередь – это его специфичность, которая является определяющим фактором в идентификации пептидов, поскольку позволяет конструировать базы данных из теоретических масс-спектров фрагментации для их последующего сопоставления с экспериментальными данными. Трипсин специфически гидролизует пептидную связь после аминокислотных остатков аргинина (Arg) и лизина (Lys), что в свою очередь также обеспечивает пептидам оптимальное зарядовое состояние при ионизации, так как среди природных аминокислот Arg и Lys обладают наибольшим сродством к протону [103]. При использовании ESI (до последнего времени наиболее распространенного метода ионизации в протеомике) триптические пептиды имеют заряд +2 или +3, а при диссоциации оба фрагмента пептида остаются заряженными. Это означает, что при фрагментации в масс-спектрах будут присутствовать пики ионов фрагментов обеих серий, например, у- и b-серии в случае столкновительной диссоциации (Collision-induced dissociation, CID) [104]. Кроме того, трипсин является крайне эффективным ферментом и широко доступен по относительно разумной цене. Учитывая все его особенности, многие научные группы предприняли попытки свести к минимуму недостатки, обнаруженные при использовании нативного трипсина.

Нативный трипсин подвергается автолизу с образованием псевдо трипсина, обладающего расширенной специфичностью, включая хитрипсинаподобную активность [105]. Продукты автолиза, присутствующие в препарате трипсина, могут привести к образованию дополнительных пептидных фрагментов, которые способны помешать анализу при сопоставлении с теоретическими базами данных. Поэтому для использования в масс-спектрометрических исследованиях производится модифицированный трипсин. Одной из первых модификаций стало восстановительное метилирование остатков лизина в молекуле свиного трипсина, в результате чего был получен высокоактивный и стабиль-

ный фермент, устойчивый к автолизу и повышенной температуре [106]. В настоящее время ведутся работы по получению рекомбинантного трипсина с необходимой стабильностью [107].

Благодаря своему широкому распространению именно трипсин стал основным модельным ферментом для исследования различных способов сокращения времени на стадии ферментативного гидролиза. При использовании стандартных протоколов гидролиза в растворе, время инкубации образца с трипсином при 37 °C составляет 12–16 ч, достигая в некоторых случаях 24 ч.

Исследовали различные подходы к улучшению эффективности гидролиза, включая использование повышенной температуры, ультразвуковой энергии, высокого давления, инфракрасной энергии, микроволновой энергии, переменных электрических полей, микроспиновых колонок и микрореакторов [108]. Наибольшее распространение, в том числе в коммерчески доступных наборах, получили протоколы гидролиза в растворе при повышенной температуре и с проведением гидролиза и некоторых предшествующих стадий на мембранах микроспиновых колонок (filter aided sample preparation, FASP). В свою очередь, параметры масс-спектрометрических измерений, такие как частота сканирования, условия фрагментации и параметры хроматографического разделения (тип неподвижной фазы, размеры колонки, скорость потока) оптимизированы для анализа коротких триптических пептидов с массой от 0,8 до 3 кДа [109].

Таким образом, на примере использования трипсина в масс-спектрометрических исследованиях белков можно наблюдать ту неопределимую роль, которую одна протеаза может сыграть в совершенствовании методической базы и в развитии целой области науки. По данным анализа на ноябрь 2014 г., в базе данных Global Proteome Machine Database (GPM DB), содержащей более 2 млрд идентификаторов пептидов, было обнаружено 96% депонированных наборов данных, относящихся к трипсиновому гидролизу [110].

Однако все чаще сообщается и о возможных проблемах, связанных с тем, что оптимизация аналитических инструментов и программного обеспечения в протеомных исследованиях в основном ориентируется на параметры триптических пептидов. Несмотря на то, что генерируемые трипсином короткие пептиды идеально подходят для современных методов хро-

матографического разделения и фрагментации, большинство из них слишком малы (56% всех сгенерированных пептидов составляют ≤ 6 аминокислотных остатков) и не идентифицируются в анализе. Это означает, что в экспериментах оказывается детектирован только ограниченный сегмент протеома [111], что часто делает невозможным различие изоформ белков, а также идентификацию всех ПТМ. В связи с этим некоторыми авторами утверждается, что результатом доминирования трипсина в протеомных исследованиях может стать так называемое туннельное видение протеома [110]. Для того чтобы преодолеть эту проблему, многие научные лаборатории начали исследовать альтернативные протеазы, способные дополнить или заменить трипсин.

Ряд ферментов, нашедших применение в протеомике, с каждым годом неуклонно расширяется. К настоящему моменту некоторые из протеаз коммерчески уже доступны, а значит, начинают применяться по отдельности или в комплексе для задач, которые сложно решить с использованием трипсина.

Среди альтернативных ферментов, используемых в протеомике, есть несколько представителей сериновых протеаз, таких как химотрипсин, глутамил эндопептидаза (Glu-C) из *Staphylococcus aureus* и эндопротеиназа Lys-C из *Lysobacter enzymogenes*. Так же, как и трипсин, эти сериновые протеазы используются в высокопроизводительной протеомике.

Химотрипсин предпочтительно расщепляет гидрофобные аминокислотные остатки, такие как тирозин (Tyr), фенилаланин (Phe) и триптофан (Trp), в меньшей степени лейцин (Leu) и метионин (Met). В нескольких мультипротеазных исследованиях было показано, что детектируемые области белков при протеолизе химотрипсином наиболее отличаются от таковых при использовании трипсина как в качественном, так и в количественном отношении. Поскольку частой проблемой при анализе мембранных белков является отсутствие в их некоторых областях аминокислотной последовательности сайтов гидролиза трипсином и другими протеазами, для получения дополнительной информации об аминокислотной последовательности используется химотрипсин [112].

Lys-C гидролизует Lys на карбоксильном конце. Важное преимущество Lys-C, помимо его строгой специфичности, заключается в его устойчивости к денатурирующим агентам (например, к мочеvine). Кроме того, Lys-C в

высокой степени комплементарен трипсину, поскольку обе протеазы имеют сходные оптимумы pH (pH 7–9). Это отражено в многочисленных исследованиях протеомики с использованием BU, в которых применяли эту конкретную комбинацию ферментов. Независимо от источника трипсин проявляет по отношению к остаткам Lys несколько более низкую эффективность расщепления, чем к остаткам Arg, что снижает точность и чувствительность количественного определения пептидов [113]. Кроме того, некоторые белки с плотно упакованной структурой устойчивы к протеолизу, а реагенты, используемые для создания денатурирующих условий, обратимо ингибируют активность трипсина. С учетом этих особенностей было предложено использовать смеси Lys-C и трипсина для уменьшения числа пропущенных сайтов гидролиза [114]. Наиболее эффективной для протеолиза белков, устойчивых к гидролизу в неденатурирующих условиях, стала схема последовательного гидролиза с использованием смеси Lys-C и трипсина. В этом случае сначала (при концентрации мочевины 6–8 М) гидролиз белковой смеси осуществляется ферментом Lys-C, а затем, по прошествии определенного времени инкубации (около 4 ч), образец разбавляется до 1 М (или ниже, если позволяет концентрация белка) концентрации мочевины и оставшееся время инкубации (8–12 ч) протеолиз происходит при участии трипсина.

Glu-C гидролизует в основном аминокислотные остатки глутаминовой кислоты (Glu) с C-концевой стороны при pH 4, тогда как при pH 8 он дополнительно гидролизует аминокислотные остатки аспарагиновой кислоты (Asp). В связи с тем, что Glu и Asp не гликируются, Glu-C чаще всего используется при качественном и количественном анализе гликированных белков в сложных биологических образцах, таких как плазма или эритроциты [113]. В свою очередь, эндопротеиназа Asp-N осуществляет гидролиз пептидных связей Asp по N-концу. В присутствии детергентов Asp-N может также гидролизовать Glu [115].

Эндопротеиназа Lys-N обладает более высокой устойчивостью к денатурантам, чем трипсин, а также может работать при температуре до 70 °C. Lys-N гидролизует пептидную связь по N-концу Lys и проявляет оптимальную активность при pH 9. Фрагментация пептидов, полученных при гидролизе белков с использованием Lys-N методом диссоциации с переносом электрона (Electron-transfer dissociation, ETD),

обеспечивает простую интерпретацию аминокислотной последовательности, позволяет проводить легкое секвенирование *de novo* и упрощает анализ сайтов фосфорилирования белков [116].

Несколько лет назад появились работы, в которых использовалась новая N-концевая протеаза – LysargiNase. Это термофильная протеаза, полученная из архей *Methanosarcina acetivorans*, с точки зрения специфичности является отражением трипсина, так как гидролизует Arg и Lys на N-концевой стороне аминокислотных остатков [117]. При использовании трипсина или Lys-C C-концевой пептид белковой молекулы может иметь любые концевые остатки с обеих сторон, так как аминокислотные остатки Lys или Arg, после которых гидролизуется связь, будут находиться в «предыдущем» пептиде. Это приводит к низкому заряду, несовместимости таких пептидов с анализом жидкостной хроматографией, совмещенной с тандемной масс-спектрометрией (ЖХ-МС/МС), а также поисковыми системами, в алгоритмах которых предполагается присутствие на концах анализируемых пептидов одного из специфических для используемых протеаз аминокислотных остатков. Следовательно, C-концы белка, которые принимают участие в интеграции белка в мембраны, образовании белковых комплексов и других межбелковых взаимодействиях, могут быть утеряны. Поэтому, чтобы идентифицировать C-концевые пептиды, в настоящее время используют протеазы, расщепляющие основные аминокислоты с N-конца, такие как Lys-N или LysargiNase. Кроме того, Lys-N гидролизует метилированный Lys, тогда как LysargiNase дополнительно гидролизует метилированный Arg, что позволяет идентифицировать эти ПТМ [116, 118].

Несмотря на растущий список ферментов, которым находят новые применения в протеомике, маловероятно, что в ближайшее время будет найдена универсальная протеаза. На данный момент для каждой научной группы, занимающейся протеомикой, а в частности подходом BU к анализу протеома, одной из основных задач является подбор подходящего гидролитического фермента или комплекса ферментов, в зависимости от объектов и основных целей исследования.

По данным многочисленных работ, надежные результаты можно получить при использовании мультипротеазного гидролиза. Например, использование подхода с мультипротеазным

гидролизом РНК-полимеразных белковых комплексов Pol II и Pol III позволило практически полностью картировать все белки, входящие в состав комплексов Pol II и Pol III. Этот подход позволил также идентифицировать 12 новых сайтов фосфорилирования в Pol II [119]. Кроме того, в фосфопротеомике ценность мультипротеазного подхода была дополнительно продемонстрирована при параллельном использовании Lys-N, Lys-C и трипсина. Эта комбинация ферментов привела к увеличению идентифицированных сайтов фосфорилирования на 72% по сравнению с использованием трипсина [120]. Исследования тканей сердца человека [121] и клеток HeLa [112] подтверждают, что значительно большее число детектированных последовательностей протеома может быть картировано при использовании более чем одного фермента. На данный момент известно, что специфичность фермента может влиять и на количественную оценку белков, поэтому для более надежных измерений также предпочтительны подходы с использованием нескольких протеаз.

Степень применимости подхода BU, будь то изучение одного очищенного белка или целого протеома, зависит от числа сайтов, гидролизующихся используемыми протеазами, и аминокислотной последовательности исследуемых белков (числа аминокислотных остатков, находящихся между сайтами гидролиза). Учитывая разнообразие белков в протеоме, несмотря на все усилия по совершенствованию методик и подбору новых комбинаций ферментов, добиться достаточного числа детектируемых областей для обнаружения, например, различных изоформ белков или ПТМ, необходимых для понимания многих биологических процессов, с помощью только подхода BU не представляется возможным. В то же время подход, который мог бы обеспечить полный анализ целого белка без необходимости его гидролиза, а именно подход «сверху-вниз» («Top-down», TD), направленный на полное покрытие последовательности белка с помощью CID, ETD, ультрафиолетовой фотодиссоциации и их комбинаций, нашел лишь ограниченное применение для анализа белков с небольшой массой, оставаясь перспективным подходом для обнаружения ПТМ и изоформ [122, 123].

Относительно новым подходом, разработанным с учетом сильных сторон BU и TD, стал «middle-down» (MD), или «от середины – вниз», названный по аналогии со «сверху-вниз»

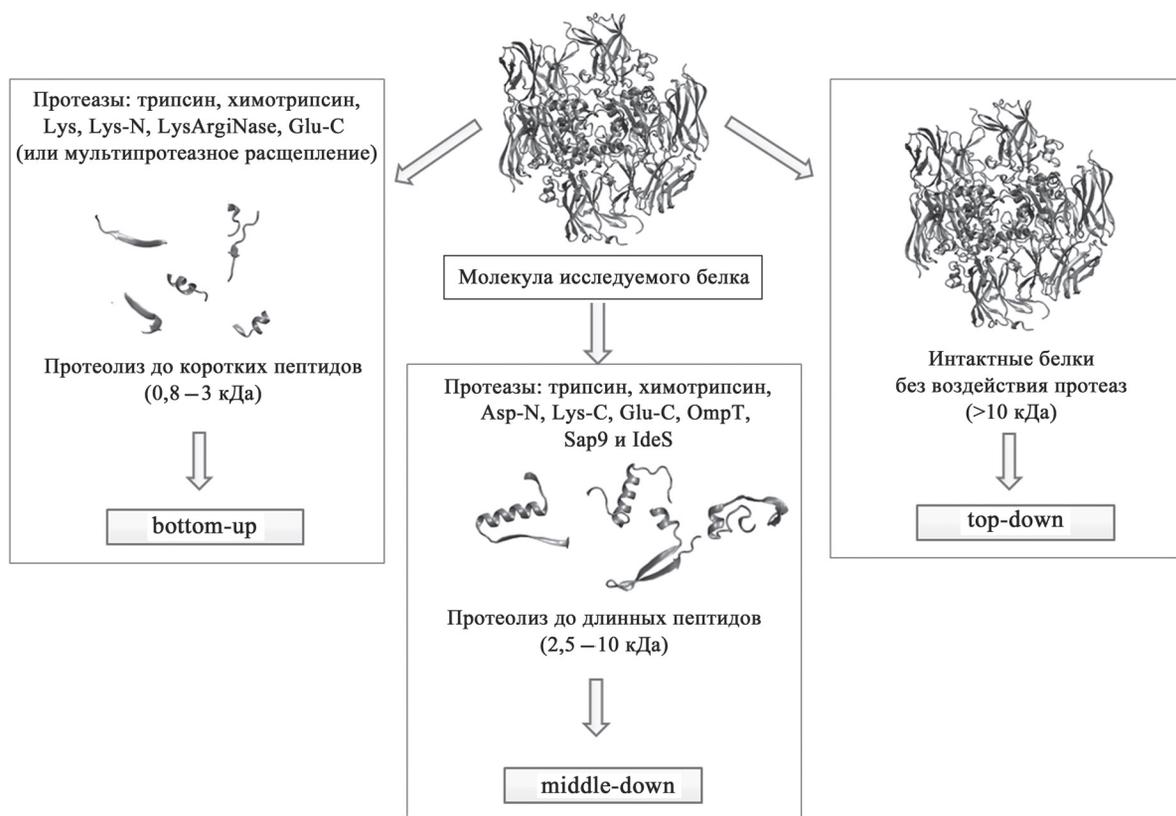


Рис. 4. Основные подходы к анализу протеомных образцов

(рис. 4). В этом подходе при гидролизе белков генерируются значительно более длинные пептиды, чем типичные пептиды для BU, которые впоследствии анализируются с помощью ЖХ-МС/МС [124]. Протеомика MD использует возможность получения ценной информации о последовательности из более длинных пептидов (около 10 кДа) с помощью современных методов фрагментации, в то время как эти пептиды также могут быть предварительно фракционированы с помощью большинства методов ЖХ. В этом случае, например, белок массой около 30 кДа будет полностью секвенирован всего тремя пептидами. Следовательно, смеси пептидов станут гораздо менее сложными, а образующиеся длинные пептиды почти всегда будут иметь уникальную последовательность, одновременно несущую множество посттрансляционных модификаций, каждая из которых может быть картирована.

Для осуществления этого подхода, который позволяет, по крайней мере теоретически, решить наиболее трудные задачи протеомики, необходим поиск подходящих средств для создания таких более длинных пептидов. Как уже упоминалось, трипсин не идеален для этой цели, так как он расщепляет две часто встречающиеся

аминокислоты Arg и Lys и образует короткие пептиды. По этой причине наиболее часто используемыми до настоящего времени протеазами в MD являются Asp-N, Lys-C и Glu-C [124]. В качестве альтернативы рассматривался ограниченный протеолиз, который может давать более длинные пептиды, но он требует тщательной оптимизации условий и не подходит для количественной протеомики, поскольку получаемые результаты трудно воспроизводимы.

Поэтому были предприняты попытки поиска специальных протеаз, пригодных именно для подхода MD. Так, в качестве возможных кандидатов были предложены протеазы OmpT, Sap9 и IdeS.

OmpT представляет собой протеазу, принадлежащую к семейству омпинов, которая обладает специфической способностью катализировать расщепление пептидных связей между последовательно расположенными сайтами Lys-Arg, Arg-Arg, Arg-Lys и Lys-Lys [125], тогда как Sap9 представляет собой аспарагиновую протеазу, происходящую из семейства япсинов [125, 126]. Оба фермента способны гидролизовать белок до пептидов массой более 2 кДа. Sap9 применялся для экспериментов в подходе BU, и

предполагается, что он будет перспективен для успешного проведения протеомных исследований MD. В ходе исследований антител методом MD использовался также фермент, гидролизующий иммуноглобулин G [127]. Протеаза IdeS осуществляет гидролиз пептидной связи между двумя последовательными глицинами, присутствующими в шарнирной области иммуноглобулина (Ig). Например, три протеолитических пептида большего размера были получены путем обработки с помощью IdeS коммерчески доступных антител (цетуксимаба, ритуксимаба и др.) [128]. Однако исследования по поиску специализированных для подхода MD протеаз находятся только в начале пути.

Несомненно, протеом (со всем разнообразием по химическому составу, форме и размеру белков) является одним из самых сложных объектов для изучения. Поскольку белки играют ключевую роль во всех процессах, происходящих в живых организмах, знание их строения, функций, взаимодействий, локализации и регуляции необходимо для понимания всех уровней биологии. На данный момент ни один метод не продвинулся в изучении белков так, как масс-спектрометрия. Сложно переоценить

ту роль, которую играли и играют протеазы в развитии этого метода. С одной стороны, ведется постоянный поиск новых ферментов, которые бы отвечали требованиям к специфичности, активности и другим параметрам, в соответствии с тенденциями развития подходов и особенностями процессов, сопровождающих непосредственный анализ образца, а также последующую обработку результатов. С другой стороны, как можно пронаблюдать на примере трипсина, многие параметры приборов и программного обеспечения, а также методики подготовки образцов адаптируются под особенности функционирования используемого фермента.

Возможно, в последующие годы произойдет ряд научных открытий, которые изменят нынешнюю ситуацию, но на данный момент для получения воспроизводимых результатов и достижения необходимого уровня чувствительности анализа в масс-спектрометрических исследованиях протеома, ключевым моментом является подготовка образца к анализу, в частности, выбор протеазы или их комплекса в соответствии со спецификой объектов и решаемых в исследовании задач.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Березин И.В., Клесов А.А. Ферменты – химические катализаторы? М., 1971. С. 48.
2. Thevenot D.R., Toth K., Durst R.A., Wilson G.S. // *Pure Appl. Chem.* 1999. Vol. 71. P. 2333.
3. Singh A., Sharma A., Ahmed A., Sundramoorthy A.K., Furukawa H., Arya S., Khosla A. // *Biosensors* 2021. Vol. 11. P. 336.
4. Clark L.C., Jr., Lyons C. // *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1962. Vol. 102. P. 29.
5. Gorton L., Lindgren A., Larsson T., Munteanu F.D., Ruzgas T., Gazaryan I. // *Anal. Chim. Acta.* 1999. Vol. 400. P. 91.
6. Березин И.В., Богдановская В.А., Варфоломеев С.Д., Ярополов А.И., Тарасевич М.Р. // *Докл. АН СССР.* 1978. Т. 240. С. 615.
7. Ярополов А.И., Маловик В., Варфоломеев С.Д., Березин И.В. // *Докл. АН СССР.* 1979. Т. 249. С. 1399.
8. Yaropolov A.I., Karyakin A.A., Varfolomeev S.D., Berezin I.V. // *Bioelectrochem. Bioenergetics* 1984. Vol. 12. P. 267.
9. Schubart I.W., Göbel G., Lisdat F. // *Electrochim. Acta* 2012. Vol. 82. P. 224.
10. Pfeiffer D., Scheller F.W., McNeil C., Schulmeister T. // *Biosen. Bioelecton.* 1995. Vol. 10. P. 169.
11. Schubert F., Kirstein D., Schroeder K.L., Scheller F.W. // *Anal. Chim. Acta.* 1985. Vol. 169. P. 391.
12. Scheller F.W., Schubert F., Pfeiffer D., Wollenberger U., Renneberg R., Hintsche R., Kuehn M. *GBF Monographs.* 1992. Vol. 17. P. 3.
13. Wollenberger U., Schubert F., Scheller F.W., Danielsson B., Mosbach K. // *Anal. Lett.* 1987. Vol. 20. P. 657.
14. Ghindilis A.L., Makower A., Bauer C.G., Bier F.F., Scheller F.W. // *Anal. Chim. Acta.* 1995. Vol. 304. P. 25.
15. Ghindilis A.L., Makower A., Scheller F.W. // *Anal. Lett.* 1995. Vol. 28. P. 1.
16. Eremenko A.V., Makower A., Scheller F.W. // *Frezenius J. Anal. Chem.* 1995. Vol. 351. P. 729.
17. Makower A., Eremenko A.V., Streffer K., Wollenberger U., Scheller F.W. // *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 1996. Vol. 65. P. 39.
18. Eremenko A.V., Makower A., Bauer Ch.G., Kurochkin I.N., Scheller F.W. // *Electroanalysis* 1997. Vol. 9. P. 269.
19. Bier F.F., Ehrentreich-Foerster E., Scheller F.W., Makover A., Eremenko A., Wollenberger U., Bauer Ch.G., Pfeiffer D., Michael N. // *Sensors Actuat.* 1996. Vol. B 33. P. 5.
20. Bauer Ch.G., Eremenko A.V., Ehrentreich-Foerster E., Bier F.F., Makower A., Halsall H.B., Heineman W.R., Scheller F.W. // *Anal. Chem.* 1996. Vol. 68. P. 2453.
21. Eremenko A.V., Bauer C.G., Makower A., Kanne B., Baumgarten H., Scheller F.W. // *Anal. Chim. Acta* 1998. Vol. 358. P. 5.
22. Bauer C.G., Eremenko A.V., Kuehn A., Kuerzinger K., Makower A., Scheller F.W. // *Anal. Chem.* 1998. Vol. 70. P. 4624.

23. Anzar N., Hasan R., Tyagi M., Yadav N., Narang J. // *Sensors Int.* 2020. Vol. 1. P. 100003.
24. Baig N., Sajid M., Saleh T.A. // *TrAC Trends Anal. Chem.* 2019. Vol. 111. P. 47.
25. McClements D.J. // *Adv. Colloid Interface Sci.* 2018. Vol. 253. P. 1.
26. Shumyantseva V.V., Agafonova L.E., Bulko T.V., Kuzikov A.V., Masamrek R.A., Yuan J., Pergushov D.V., Sigolaeva L.V. // *Biochem. (Moscow)* 2021. Vol. 86. P. S140.
27. Putzbach W., Ronkainen N.J. // *Sensors.* 2013. Vol. 13. N 4. P. 4811.
28. De Villiers M.M., Otto D.P., Strydom S.J., Lvov Y.M. // *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2011. Vol. 63. N 9. P. 701.
29. Sigolaeva L.V., Pergushov D.V., Synatschke C.V., Wolf A., Dewald I., Kurochkin I.N., Fery A., Müller A.H.E. // *Soft Matter.* 2013. Vol. 9. N 10. P. 2858.
30. Sigolaeva L.V., Günther U., Pergushov D.V., Gladyr S.Yu., Kurochkin I.N., Schacher F.H. // *Macromol. Biosci.* 2014. Vol. 14. N 7. P. 1039.
31. Sigolaeva L.V., Gladyr S.Yu., Gelissen A.P.H., Mergel O., Pergushov D.V., Kurochkin I.N., Plamper F.A., Richtering W. // *Biomacromolecules.* 2014. Vol. 15. N 10. P. 3735.
32. Shumyantseva V.V., Sigolaeva L.V., Agafonova L.E., Bulko T.V., Pergushov D.V., Schacher F.H., Archakov A.I. // *J. Mater. Chem. B.* 2015. Vol. 3. N 27. P. 5467.
33. Sigolaeva L.V., Mergel O., Evtushenko E.G., Gladyr S.Yu., Gelissen A.P.H., Pergushov D.V., Kurochkin I.N., Plamper F.A., Richtering W. // *Langmuir.* 2015. Vol. 31. N 47. P. 13029.
34. Sigolaeva L.V., Gladyr S.Yu., Mergel O., Gelissen A.P.H., Noyong M., Simon U., Pergushov D.V., Kurochkin I.N., Plamper F.A., Richtering W. // *Anal. Chem.* 2017. Vol. 89. N 11. P. 6091.
35. Sigolaeva L. V., Pergushov D. V., Oelmann M., Schwarz S., Brugnoni M., Kurochkin I.N., Plamper F.A., Fery A., Richtering W. // *Polymers.* 2018. Vol. 10. N 7. 791.
36. Shumyantseva V.V., Bulko T.V., Kuzikov A.V., Masamrek R.A., Pergushov D.V., Schacher F.H., Sigolaeva L.V. // *Mendeleev Commun.* 2020. Vol. 30. N 3. P. 299.
37. Сиголаева Л.В., Коняхина А.Ю., Пергушов Д.В., Курочкин И.Н. // *Вестн. Моск. ун-та. Сер. 2. Химия.* 2021. Т. 62. N 5. С. 445.
38. Sigolaeva L.V., Pergushov D.V., Gladyr S.Yu., Kurochkin I.N., Richtering W. // *Adv. Mater. Interfaces.* 2022. Vol. 9. N 17. 2200310.
39. Gromova M.S., Sigolaeva L.V., Fastovets M.A., Evtushenko E.G., Babin I.A., Pergushov D.V., Amitonov S.V., Eremenko A.V., Kurochkin I.N. // *Soft Matter.* 2011. Vol. 7. N 16. P. 7404.
40. Sigolaeva L.V., Bulko T.V., Konyakhina A.Yu., Kuzikov A.V., Masamrek R.A., Max J.B., Köhler M., Schacher F.H., Pergushov D.V., Shumyantseva V.V. // *Polymers.* 2020. Vol. 12. N 7. P. 1514.
41. Sigolaeva L.V., Bulko T.V., Kozin M.S., Zhang W., Köhler M., Romanenko I., Yuan J., Schacher F.H., Pergushov D.V., Shumyantseva V.V. // *Polymer.* 2019. Vol. 168. P. 95.
42. Shumyantseva V.V., Bulko T.V., Kuzikov A.V., Masamrek R.A., Konyakhina A.Yu., Romanenko I., Max J.B., Köhler M., Gilep A.A., Usanov S.A., Pergushov D.V., Schacher F.H., Sigolaeva L.V. // *Electrochim. Acta.* 2020. Vol. 336. 135579.
43. Walta S., Pergushov D.V., Oppermann A., Steinschulte A.A., Geisel K., Sigolaeva L.V., Plamper F.A., Wöll D., Richtering W. // *Polymer.* 2017. Vol. 119. P. 50.
44. Pergushov D.V., Sigolaeva L.V., Balabushevich N.G., Sharifullin T.Z., Noyong M., Richtering W. // *Polymer.* 2021. Vol. 213. 123227.
45. Sigolaeva L.V., Efremova O.V., Pergushov D.V. // *Mendeleev Commun.* 2023. Vol. 33. N 4. (in press).
46. Vankeirsbilck T., Vercauteren A., Baeyens W., Van der Weken G., Verpoort F., Vergote G., Remon J.P. // *TrAC Trends Anal. Chem.* 2002. Vol. 21. N 12. P. 869.
47. Deidda R., Sacre P.-Y., Clavaud M., Coïc L., Avohou H., Hubert P., Ziemons E. // *TrAC Trends Anal. Chem.* 2019. Vol. 114. P. 251.
48. Doty K.C., Muro C.K., Bueno J., Halámková L., Lednev I.K. // *J. Raman Spectrosc.* 2016. Vol. 47. N 1. P. 39.
49. Brauchle E., Schenke-Layland K. // *Biotechnol. J.* 2013. Vol. 8. N 3. P. 288.
50. Smith R., Wright K.L., Ashton L. // *Analyst.* 2016. Vol. 141. N 12. P. 3590.
51. Das R.S., Agrawal Y.K. // *Vib. Spectrosc.* 2011. Vol. 57. N 2. P. 163.
52. Orlando A., Franceschini F., Muscas C., Pidkova S., Bartoli M., Rovere M., Tagliaferro A. // *Chemosensors.* 2021. Vol. 9. N 9. 262.
53. Rygula A., Majzner K., Marzec K.M., Kaczor A., Pilarczyk M., Baranska M. // *J. Raman Spectrosc.* 2013. Vol. 44. N 8. P. 1061.
54. Kuhar N., Sil S., Umapathy S. // *Spectrochim. Acta Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* 2021. Vol. 258. 119712.
55. Ru E. Le, Etchegoin P. *Principles of Surface-Enhanced Raman Spectroscopy and Related Plasmonic Effects.* Oxford, 2008.
56. Mosier-Boss P.A. // *Nanomaterials.* 2017. Vol. 7. N 6. 142.
57. Kneipp K., Kneipp H., Bohr H.G. in *Surface-Enhanced Raman Scattering: Physics and Applications*, K. Kneipp, M. Moskovits, H. Kneipp, Eds. Berlin, Heidelberg, 2006. P. 261.
58. Porter M.D., Lipert R.J., Siperko L.M., Wang G., Narayanan R. // *Chem. Soc. Rev.* 2008. Vol. 37. N 5. P. 1001.
59. Wang Z., Zong S., Wu L., Zhu D., Cui Y. // *Chem. Rev.* 2017. Vol. 117. N 12. P. 7910.
60. Wang Y., Zhang Y., Schlücker S. / *Vibrational Spectroscopy in Protein Research. From Purified Proteins to Aggregates and Assemblies*, Y. Ozaki, M. Baranska, I.K. Lednev, B.R. Wood, Eds. 2020. P. 485.
61. Liu H., Gao X., Xu C., Liu D. // *Theranostics.* 2022. Vol. 12. N 4. P. 1870.
62. Pollap A., Świt P. // *Int. J. Mol. Sci.* 2022. Vol. 23. N 9. 4740.
63. Khlebtsov B., Khlebtsov N. // *Nanomaterials.* 2020. Vol. 10. N 11. 2228.

64. de la Rica R., Stevens M.M. // *Nat. Nanotechnol.* 2012. Vol. 7. N 12. P. 821.
65. Rodríguez-Lorenzo L., de la Rica R., Álvarez-Puebla R.A., Liz-Marzán L.M., Stevens M.M. // *Nat. Mater.* 2012. Vol. 11. N 7. P. 604.
66. de la Rica R., Stevens M.M. // *Nat. Protoc.* 2013. Vol. 8. N 9. P. 1759.
67. Liang J., Liu H., Huang C., Yao C., Fu Q., Li X., Cao D., Luo Z., Tang Y. // *Anal. Chem.* 2015. Vol. 87. N 11. P. 5790.
68. Zeng Y., Ren J.-Q., Wang S.-K., Mai J.-M., Qu B., Zhang Y., Shen A.-G., Hu J.-M. // *ACS Appl. Mater. Interfaces.* 2017. Vol. 9. N 35. P. 29547.
69. Pham X.-H., Hahn E., Kim T.H., Kim H.-M., Lee S.H., Lee S.C., Kang H., Lee H.-Y., Jeong D.H., Choi H.S., Jun B.-H. // *Nano Res.* 2020. Vol. 13. N 12. P. 3338.
70. Tarcha P.J., Chu V.P., Whittern D. // *Anal. Biochem.* 1987. Vol. 165. N 1. P. 230.
71. Hempen C., van Leeuwen S.M., Luftmann H., Karst U. // *Anal. Bioanal. Chem.* 2005. Vol. 382. N 1. P. 234.
72. Dou X., Takama T., Yamaguchi Y., Yamamoto H., Ozaki Y. // *Anal. Chem.* 1997. Vol. 69. N 8. P. 1492.
73. Fu C., Zhang L., Bao M., Zhang Y., Li Y., Wu Y., Jung Y.M. // *Analyst.* 2022. Vol. 147. N 24. P. 5718.
74. Stevenson R., Ingram A., Leung H., McMillan D.C., Graham D. // *Analyst.* 2009. Vol. 134. N 5. P. 842.
75. Yu Z., Chen L., Wang Y., Wang X., Song W., Ruan W., Zhao B., Cong Q. // *J. Raman Spectrosc.* 2014. Vol. 45. N 1. P. 75.
76. Perumal J., Balasundaram G., Mahyuddin A.P., Choolani M., Olivo M. // *Int. J. Nanomedicine.* 2015. Vol. 10. N 1. P. 1831.
77. Zhan L., Zhen S.J., Wan X.Y., Gao P.F., Huang C.Z. // *Talanta.* 2016. Vol. 148. P. 308.
78. Kudryashova A.M., Galstian A.G., Faizuloev E.B., Olein A.Y., Lisichkin G.V., Zverev V.V., Borisova O.V. // *J. Microbiol. Epidemiol. Immunobiol.* 2018. Vol. 95. N 3. P. 25.
79. Hu Y., Liao J., Wang D., Li G. // *Anal. Chem.* 2014. Vol. 86. N 8. P. 3955.
80. Feng J., Lu H., Yang Y., Huang W., Cheng H., Kong H., Li L. // *Microchim. Acta.* 2021. Vol. 188. N 8. P. 280.
81. Lu H., Yang Y., Chen R., Huang W., Cheng H., Liu X., Kong H., Li L., Feng J. // *Microchem. J.* 2022. Vol. 183. P. 108114.
82. Ruan C., Wang W., Gu B. // *Anal. Chem.* 2006. Vol. 78. N 10. P. 3379.
83. Campbell F.M., Ingram A., Monaghan P., Cooper J., Sattar N., Eckersall P.D., Graham D. // *Analyst.* 2008. Vol. 133. N 10. P. 1355.
84. Chen Y., Cheng H., Tram K., Zhang S., Zhao Y., Han L., Chen Z., Huan S. // *Analyst.* 2013. Vol. 138. N 9. P. 2624.
85. Bozkurt A.G., Buyukgoz G.G., Soforoglu M., Tamer U., Suludere Z., Boyaci I.H. // *Spectrochim. Acta Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* 2018. Vol. 194. P. 8.
86. Stevenson R., McAughtrie S., Senior L., Stokes R.J., McGachy H., Tetley L., Nativo P., Brewer J.M., Alexander J., Faulds K., Graham D. // *Analyst.* 2013. Vol. 138. N 21. P. 6331.
87. Ingram A., Moore B.D., Graham D. // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2009. Vol. 19. N 6. P. 1569.
88. Li N., Chen H., Zhang M., Zha Y., Mu Z., Ma Y., Chen P. // *Sensors Actuators B Chem.* 2020. Vol. 315. P. 128135.
89. Wang W., Zhang Y., Zhang W., Liu Y., Ma P., Wang X., Sun Y., Song D. // *Anal. Chim. Acta.* 2021. Vol. 1183. P. 338989.
90. Aston F.W. // *Nature.* 1920. Vol. 105. P. 617.
91. Александров М., Галль Л., Краснов Н., Николаев В., Шкуро В. // *ДАН СССР.* 1984. Т. 277. С. 379.
92. Whitehouse C. M., Dreyer R. N., Yamashita M., Fenn J. B. // *Analytical Chemistry.* 1985. Vol. 57. P. 675.
93. Karas M., Bachmann D., Bahr U., Hillenkamp F. // *Int. J. Mass Spectrom. Ion Processes.* 1987. Vol. 78. P. 53.
94. Henzel W.J., Billeci T.M., Stults J.T., Wong S.C., Grimley C., Watanabe C. // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1993. Vol. 90. P. 5011.
95. Wasinger V.C., Cordwell S.J., Cerpa-Poljak A., Yan J.X., Gooley A.A., Wilkins M.R., Duncan M.W., Harris R., Williams K.L., Humphery-Smith I. // *Electrophoresis.* 1995. Vol. 16. P. 1090.
96. Fitcher B., Latter G.I., Monardo P., McLaughlin C.S., Garrels J.I. // *Mol. Cell. Biol.* 1999. Vol. 19. P. 7357.
97. Kim H., Dan K., Shin H., Lee J., Wang J.I., Han D. // *Anal. Methods.* 2019. Vol. 11. P. 4693.
98. Aebersold R., Mann M. // *Nature.* 2003. Vol. 422. P. 198.
99. Rogers J.C., Bomgarden R.D. // *Adv. Experim. Med. Biol.* 2016. Vol. 919. P. 43.
100. Sechi S., Chait B.T. // *Anal. Chem.* 1998. Vol. 70. P. 5150.
101. Bensimon A., Heck A.J.R., Aebersold R. // *Annu. Rev. Biochem.* 2012. Vol. 81. P. 379.
102. Munoz J., Low T.Y., Kok Y.J., Chin A., Frese C.K., Ding V., Choo A., Heck A.J.R. // *Mol. Syst. Biol.* 2011. Vol. 7. P. 550.
103. Bleiholder C., Suhai S., Paizs B. // *Journal of the American Society for Mass Spectrometry.* 2006. Vol. 17. P. 1275.
104. Hustoft H.K., Malerod H., Wilson S.R., Reubsæet L., Lundanes E., Greibrokk T. // *Integrative Proteomics.* 2012. Rijeka. Vol. 1. P. 73.
105. Keil-Dlouha V.V., Zylber N., Imhoff J., Tong N., Keil B. // *FEBS Lett.* 1971. Vol. 16. P. 291.
106. Rice R.H., Means G.E., Brown W.D. // *Biochim Biophys Acta.* 1977. Vol. 492. P. 316.
107. Wu F., Zhao M., Zhang Y., Su N., Xiong Z., Xu P. // *Rapid Communications in Mass Spectrometry.* 2016. Vol. 30. P. 1059.
108. Capelo J.L., Carreira R., Diniz M., Fernandes L., Galecio M., Lodeiro C., Santos H.M., Vale G. // *Analytica Chimica Acta.* 2009. Vol. 650. P. 151.
109. Washburn M. P., Wolters D., Yates J. R. // *Nature Biotechnology.* 2001. Vol. 19. P. 242.
110. Tsiatsiani L., Heck A.J.R. // *FEBS J.* 2015. Vol. 282. P. 2612.
111. Swaney D.L., Wenger C.D., Coon J.J. // *Journal of Proteome Res.* 2010. Vol. 9. P. 1323.
112. Guo X., Trudgian D.C., Lemoff A., Yadavalli S., Mirzaei H. // *Mol. Cell. Proteomics.* 2014. Vol. 13. P. 1573.
113. Glatzer T., Ludwig C., Ahrne E., Aebersold R.,

- Heck A.J.R., Schmidt A. // *Journal of Proteome Res.* 2012. Vol. 11. P. 5145.
114. Priego-Capote F., Ramirez-Boo M., Finamore F., Gluck F., Sanchez J.C. // *Journal of Proteome Res.* 2014. Vol. 13. P. 336.
115. Ingrosso D., Fowler A.V., Bleibaum J., Clarke S. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1989. Vol. 162. P. 1528.
116. Taouatas N., Drugan M.M., Heck A.J.R., Mohammed S. // *Nat. Methods.* 2008. Vol. 5. P. 405.
117. Huesgen P.F., Lange P.F., Rogers L.D., Solis N., Eckhard U., Kleifeld O., Goulas T., Gomis-Ruth F.X., Overall C.M. // *Nat. Methods.* 2014. Vol. 12. P. 55.
118. Taouatas N., Heck A.J.R., Mohammed S. // *Journal of Proteome Res.* 2010. Vol. 9. P. 4282.
119. Mohammed S., Lorenzen K., Kerkhoven R., van Breukelen B., Vannini A., Cramer P., Heck A.J.R. // *Anal. Chem.* 2008. Vol. 80. P. 3584.
120. Gauci S., Helbig A.O., Slijper M., Krijgsveld J., Heck A.J.R., Mohammed S. // *Anal. Chem.* 2009. Vol. 81. P. 4493.
121. Aye T.T., Scholten A., Taouatas N., Varro A., Van Veen T.A.B., Vos M.A., Heck A.J.R. // *Mol. Bio. Syst.* 2010. Vol.6. P. 1917.
122. Benjamin A.G. // *Journal of the American Society for Mass Spectrometry.* 2010. Vol. 21. P. 193.
123. Zhou H., Ning Z., Starr A.E., Abu-Farha M., Figeys D. // *Anal. Chem.* 2012. Vol. 84. P. 720.
124. Cannon J., Lohnes K., Wynne C., Wang Y., Edwards N., Fenselau C. // *Journal of Proteome Res.* 2010. Vol. 9. P. 3886.
125. Wu C., Tran J.C., Zamdborg L., Durbin K.R., Li M., Ahlf D.R., Early B.P., Thomas P.M., Sweedler J.V., Kelleher N.L. // *Nat. Methods.* 2012. Vol. 9. P. 822.
126. Laskay U.A., Srzentic K., Monod M., Tsybin Y.O. // *Journal of Proteomics.* 2014. Vol. 110. P. 20.
127. Fornelli L., Ayoub D., Aizikov K., Beck A., Tsybin Y.O. // *Anal. Chem.* 2014. Vol. 86. P. 3005.
128. Ryan M.H., Petrone D., Nemeth J.F., Barnathan E., Bjorck L., Jordan R.E. // *Molecular Immunology.* 2008. Vol. 45. P. 1837.

Информация об авторах

Курочкин Илья Николаевич – директор Института биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН, зав. лабораторией кафедры химической энзимологии химического факультета Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова, докт. хим. наук, профессор (inkurochkin@gmail.com);

Васильева Александра Дмитриевна – ст. науч. сотр. лаборатории термодинамики биосистем Института биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН, канд. биол. наук (ms.kadaver@mail.ru);

Евтушенко Евгений Геннадиевич – мл. науч. сотр. кафедры химической энзимологии химического факультета Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова, науч. сотр. совм. лаборатории химической физики биоаналитических процессов Института биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН (evtushenko@enzyme.chem.msu.ru);

Еременко Аркадий Вениаминович – вед. науч. сотр. лаборатории химической физики биоаналитических процессов Института биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН, канд. биол. наук (eremenkoav@yandex.ru);

Пергушов Дмитрий Владимирович – вед. науч. сотр. кафедры высокомолекулярных соединений химического факультета Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова, канд. хим. наук (pergush@belozersky.msu.ru);

Сиголаева Лариса Викторовна – ст. науч. сотр. кафедры химической энзимологии химического факультета Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова, канд. хим. наук (lsigolaeva@belozersky.msu.ru).

Вклад авторов

Все авторы сделали эквивалентный вклад в подготовку публикации.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Статья поступила в редакцию 15.02.2023;
одобрена после рецензирования 21.02.2023;
принята к публикации 14. 03.2023.