

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность работы. Анализ сложных белковых смесей имеет решающее значение для решения многих фундаментальных и прикладных задач молекулярной биологии, протеомики, биомедицинских исследований, клинической практики и контроля пищевых продуктов [1,2]. В настоящее время методы масс-спектрометрии становятся основным и мощным инструментом для точного определения и характеристики белков [3]. Однако они также имеют некоторые ограничения, например, наличие высокого уровня шума в спектрах и трудности в интерпретации, которые вызывают проблемы при выполнении рутинного анализа, например, для скрининга отдельных белков в клинической практике [4]. В последние годы предложено большое количество новых или модернизированных методов скрининга белков. Основными недостатками этих методов являются сложное оборудование и сложная пробоподготовка. Поэтому разработка чувствительных, быстрых и недорогих методов количественного анализа белков по-прежнему актуальна. Одним из наиболее перспективных подходов, среди прочего, является использование микроструктурных оптических волноводов (МОВ) с полый сердцевиной (ПС) для анализа белков [5,6].

Целью настоящего исследования является изучение возможностей применения микроструктурных оптических волокон и оценки изменения состояния общего белкового и минералогического фона смесей-имитаторов биологических жидкостей. Для достижения поставленной цели необходимо решить следующие **задачи**:

- Выбор оптимальной архитектуры и оптических свойств МОВ для анализа белковых соединений
- Оценка пределов применимости МОВ ПС при анализе белков
- Определение возможности применения хемометрических методов для анализа белковых смесей с применением МОВ
- Проведение анализа двойных и тройных белковых смесей с применением МОВ

Научная новизна представленной работы заключается в изучении применимости МОВ для анализа растворов белков и их смесей и применении методов хемометрической обработки [7] данных к полученным спектральным данным МОВ.

Практическая значимость работы обусловлена применимостью полученных в ходе исследования данных для создания новых высокочувствительных аналитических подходов и сенсорных систем. В ходе исследования определен оптимальные архитектурные и оптические свойства МОВ ПС для изучения растворов белков, изучены влияние таких характеристик как катионный состав, рН и ρ на оптические свойства МОВ ПС. Проведен анализ двойных и тройных белковых смесей с применением МОВ ПС. Определена необходимость применения хемометрической обработки данных и определены подходы хемометрической обработки спектральных данных МОВ после внесения белковых смесей.

Структура и объем работы. Работа состоит из введения, трёх глав, 12 разделов, заключения, библиографического списка, состоящего из 78 наименований. Работа изложена на 63 листах, включает 12 таблиц и 11 рисунков.

Во введении обоснована актуальность темы работы, изложена новизна, сформулированы цель и задачи работы.

В первом разделе первой главы представлен обзор литературы по характеристике белковых соединений.

Во втором разделе описаны основные методы определения белков.

В третьем разделе рассмотрены примеры использования МОВ в качестве сенсорных элементов.

В четвертом разделе описаны области применения хемометрики.

Вторая глава содержит подробную информацию о методах и средствах, использованных в ходе исследования.

Третья глава посвящена описанию полученных результатов и их обсуждению.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Проведен подбор белковых соединений для анализа. Выбор белков осуществлен на основе информации о составе белковой фракции сыворотки крови человека, согласно [8]. Основной группой, формирующей белковую фракцию и ее оптические свойства, являются альбумины. Таким образом, изучение влияния альбуминовой фракции на оптические свойства МОВ ПС является приоритетной задачей при проведении любого анализа сыворотки крови человека в волноводах. В организме человека альбуминовая фракция представлена человеческим сывороточным альбумином (ЧСА). В качестве имитатора ЧСА нами применен бычий сывороточный альбумин (БСА). Выбор БСА обусловлен, схожестью структуры, оптических свойств и молекулярной массы с ЧСА. α_1 -Глобулиновая группа, вносит наименьший вклад в общую массу белковой фракции. Наиболее распространенным α_1 -глобулином является α_1 -антитрипсин (α_1 -АТ). Обнаружение незначительных количеств α_1 -глобулинов на фоне значительно более высоких концентраций альбуминов представляется наиболее интересной задачей. Именно это обусловило выбор второго соединения для приготовления двойных белковых смесей. В качестве модельного соединения на α_1 -глобулины выбран альбумин из куриного яичного белка (Овальбумин), обладающий схожими свойствами с α_1 -АТ. Второй группой по процентному содержанию в белковой фракции является γ -глобулиновая группа. Наибольшей массовой долей в γ -глобулиновой группе обладают иммуноглобулины класса G (IgG). Выбор именно IgG при приготовлении тройной белковой смеси, обусловлен их значительной концентрацией в белковой фракции и их важнейшей ролью в процессах жизнедеятельности человека – природные маркеры-структуры. Большое разнообразие IgG позволяет организму эффективно бороться с большим количеством антигенов. Однако по своей общей структуре, оптическим свойствам и молекулярной массе все IgG одинаковы. Это позволяет применять любые IgG в тройных белковых смесях для имитирования присутствия

человеческих IgG. В работе в качестве модельных применяли антимышинные IgG из сыворотки кролика. Концентрации БСА и Овальбумина находились в диапазоне от $0.1 - 10^3$ мкг/мл, для IgG значения составили $25 - 1,6 \cdot 10^2$ мкг/мл. Примененные белки не реагируют между собой и подходят для создания модельных двух и трех компонентных смесей.

Выбор оптимальной архитектуры МОВ ПС для проведения анализа белков

Выбор волноводов с оптимальной архитектурой проводился проведением анализа одиночных растворов БСА и Овальбумина в диапазоне концентраций $0,1-10^3$ мкг/мл. Спектры пропускания волокон всех типов после заполнения растворами белков: $0,1-10^3$ мкг/мл и фосфатно-солевым буферным раствором (ФСБ).

Полученные данные показали, что наибольшая трансформация спектров пропускания наблюдается в случае МОВ ПС, имеющих в диапазоне 400-800 нм не менее двух ФЗЗ. При этом конкретное положение ФЗЗ не оказывает влияния на последующие результаты. Количество капиллярных технологических обкладок расположенных над зоной капилляров первого ряда, формирующих полую сердцевину волокна, не оказывает существенного влияния на спектры пропускания волокон, однако приводит к существенному увеличению времени полного заполнения волновода раствором аналита, что негативно сказывается на скорости проведения анализа и оказывает негативное влияние на получаемые спектральные данные .

Таким образом установлено, что при анализе белковых матриц, наибольшей дискриминационной способностью обладают МОВ ПС с диаметром поллой сердцевины 150-250 мкм с количеством ФЗЗ не менее пяти в спектральном диапазоне 400-800 нм, изготовленные из стекла НС- ГОСТ 19808-86 и С-89-ГОСТ 28165-89. Выбранные типы МОВ ПС с селективно изолированными внешними обкладками от поллой сердцевины на торцевой поверхности использовали в дальнейшей работе.

Определение пределов применения МОВ с ПС для анализа растворов белков

Изучение влияния рН растворов на форму и положение спектральных полос МОВ ПС БПР проведено при их заполнении растворами БСА и Овальбумина ($C_{\text{белок}} = 10^3$ мкг/мл) приготовленными с использованием различных буферных растворов: цитратного (рН 4,2 – 5,0) и ФСБ (рН 5,0 -7,4). Результаты демонстрируют, что в области рН соответствующей изоэлектрической точке соответствующего белка наблюдается характерная трансформация спектра МОВ ПС, что свидетельствует о возможности применения МОВ ПС для определения данной характеристики.

Оценку влияния минералогического состава биологических жидкостей на возможные трансформации спектров пропускания МОВ ПС проводили на примере растворов солей с различным зарядом катионов NaCl, KCl, CaCl₂ и AlCl₃ в концентрациях соответствующих составу биологических жидкостей: 1 - 10³ мкг/мл. Установлено что, введение растворов NaCl, KCl, CaCl₂, AlCl₃ в диапазоне концентраций 10⁻⁴ -10⁻² М в МОВ ПС приводит к изменению интенсивности спектральных полос волокна, но не вызывает изменения их морфологии. Анализ данных показал, что ионная сила в изученном диапазоне не оказывает существенного влияния на спектры пропускания МОВ ПС. Вероятно, полученные результаты влияния растворов солей на интенсивность спектральных полос спектра пропускания МОВ ПС обусловлены изменением показателя преломления растворов на уровне ниже 10⁻⁴ RIU.

Влияние плотности и вязкости анализируемых растворов изучено на примере растворов глицерина (1-10 % масс.). Установлено, что в пределах вязкости и плотности биологических жидкостей (1.0-1.08 г/см³) данные параметры не оказывают существенного влияния на спектры пропускания МОВ ПС.

Таким образом на примере модельных растворов установлены граничные условия (плотность, вязкость, ионная сила, показатель преломления) анализа биологических жидкостей в выбранных МОВ ПС.

На примере БСА и Овальбумина оценены аналитические характеристики определения белковых молекул в МОВ ПС выбранного типа. Спектры пропускания волокон после заполнения растворами белков: $2 \cdot 10^3$ (а), $1 \cdot 10^3$ (б), $5 \cdot 10^2$ (в), $2.5 \cdot 10^2$ (г), $1 \cdot 10^2$ (д), 10 (е), 0.1 (и), 0.05 (з) мкг/мл и ФСБ (з), результаты обработки полученных данных с применением МГК представлены в таблице 1.

Таблица 1 – Определение аналитических характеристик анализа растворов белков в МОВ ПС БПР

Белок	Спектры пропускания	Результаты МГК
БСА		
Овальбумин		

Установлено, что для БСА диапазон определяемых концентраций (ДОК) составляет $0.1 - 6 \cdot 10^4$ мкг/мл с пределом определяемых концентраций (ПрО) 0.089 мкг/мл с, для Овальбумина ДОК = $1 - 4 \cdot 10^3$ мкг/мл с ПрО = 0.25 мкг/мл. Низкие значения аналитических характеристик демонстрируют перспективность применения МОВ ПС в качестве сенсора для определения

белковых соединений в широком диапазоне концентраций. Более высокий ПО для Овальбумина вероятно обусловлен меньшим значением молекулярной массы и меньшим значением коэффициента молярного поглощения по сравнению с БСА. Результаты показывали необходимость математической обработки спектральных данных.

Анализ двойных белковых смесей с применением хемометрических методов

Регистрировали спектры пропускания МОВ ПС после внесения двойных смесей с различными концентрациями БСА и Овальбумина (10 - 10^3 мкг/мл) в диапазоне 450-800 нм. Проанализированный методом главных компонент (МГК) [9] набор данных состоял из 25 образцов (5 групп с фиксированными концентрациями БСА и варьируемыми концентрациями Овальбумина) и представлен в виде спектров с 709 длинами волн. Метод МГК применен для изучения полученных данных. На рисунке 1 представлены спектры пропускания волноводов после внесения смесей с различными концентрациями Овальбумина, при постоянной концентрации БСА и результаты МГК анализа полученных спектральных данных в виде графиков счетов главных компонент (ГК) ГК1/ГК2, нагрузок, объяснённой остаточной дисперсии (ООД) для каждой из рассчитанных ГК и графики оценки евклидовых расстояний от каждой точки до МГК модели (Outliers) на рисунке 2.

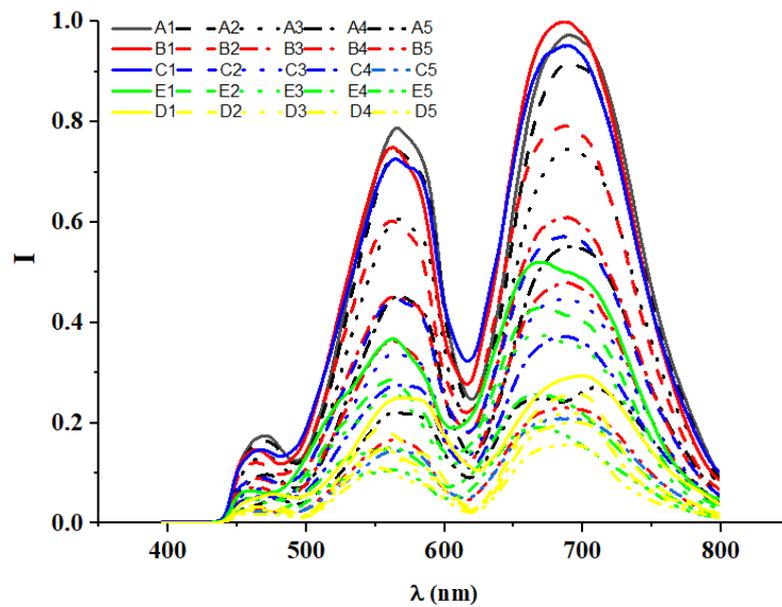


Рисунок 1 – Спектры пропускания МОВ ПС БПП после внесения смесей БСА//Овальбумин с различными концентрациями компонентов

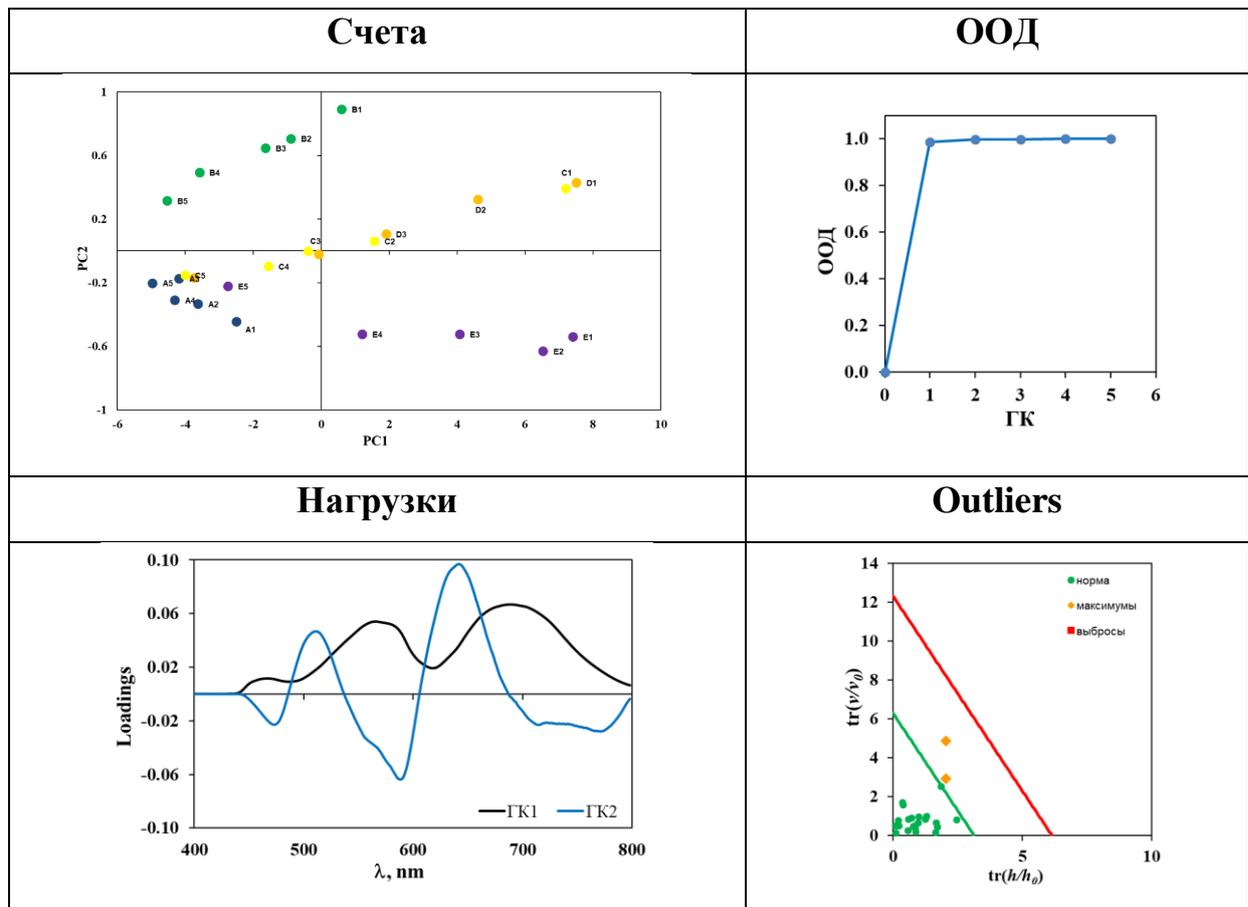


Рисунок 2 – Спектральные характеристики МОВ ПС БПП после внесения белковых смесей, результаты хемометрической обработки полученных данных методом главных компонент

Анализ графика счетов показал закономерности распределения образцов в пространстве ГК. Исходя из этого можно предположить, что ГК1 отвечает за концентрацию овальбумина, а ГК2 за концентрацию БСА в исследуемых смесях.

Спектральные данные 20 образцов с известной концентрацией БСА и Овальбумина использованы для построения моделей проекции на латентные структуры (ПЛС)[9] для определения БСА, Овальбумина и концентрации общего белка. Графики «измерено-предсказано» у БСА, Овальбумина и суммарной концентрации, как для обучающего, так и тестового наборов данных характеризуются высоким значением коэффициента корреляции. Этот показатель показывает высокую сходимость рассчитанных значений концентраций белков с заданными.

Определение γ -глобулина в двойных белковых смесях

Вид спектров пропускания МОВ демонстрируют, что интенсивность и форма спектральных полос 420-500 и 530-620 нм зависит от концентрации IgG. Метод ПЛС применен для определения концентрации IgG в растворах содержащих БСА и Овальбумин. Графики «измерено-предсказано», нагрузок, среднеквадратичных остатков (RMSE) обучения (RMSEC) и проверки (RMSEP) (ООД) и графики евклидового расстояния от точки до модели (Outliers) для Антител представлены на рисунке 3.

Антитела

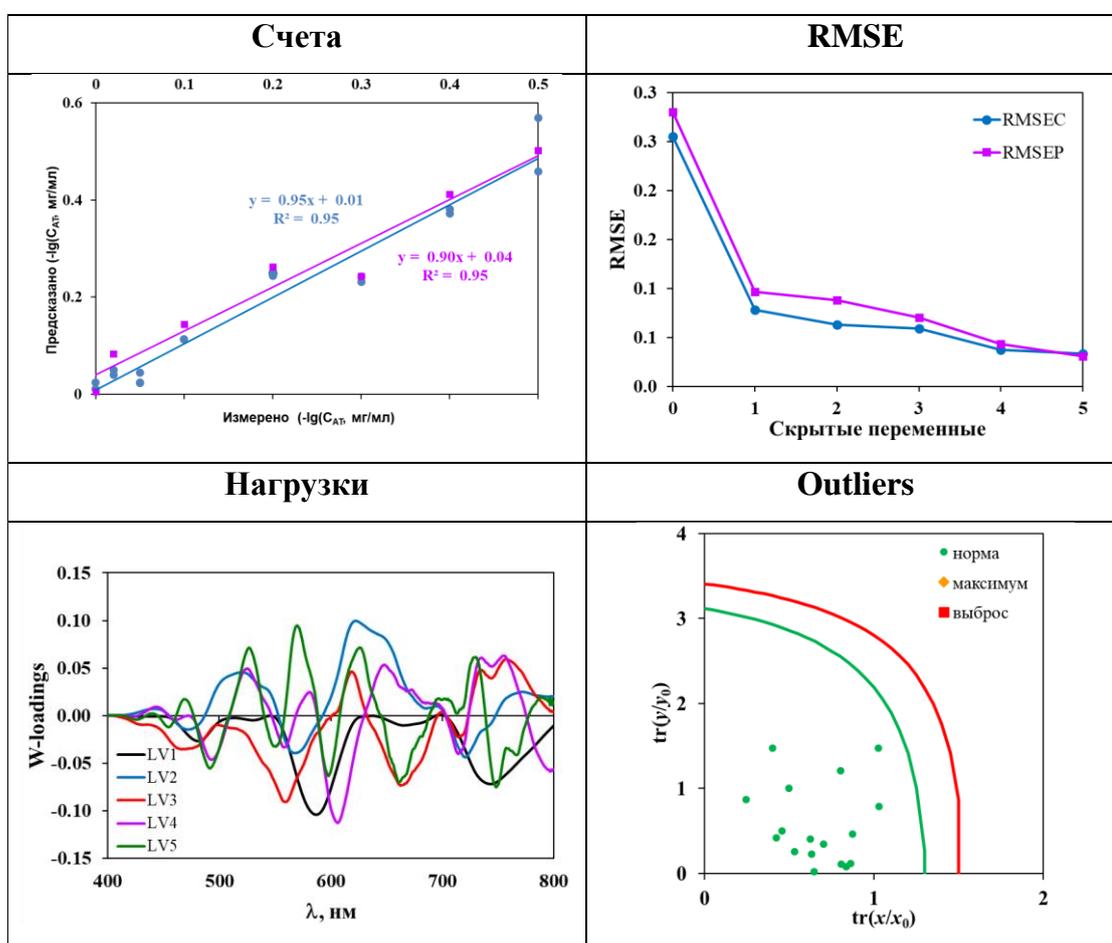


Рисунок 3 – Результаты хемометрической обработки полученных данных методом проекции на латентные структуры для IgG

Графики «измерено-предсказано» для IgG, как для обучающего, так и тестового наборов данных обладают высоким значением коэффициента корреляции. Этот показатель показывает степень сходимости результатов и в данном случае указывает на высокую сходимость рассчитанных значений концентраций белков с заданными. Согласно графикам значений среднеквадратичных остатков (RMSE) для построения градуировочных кривых применялась 5 скрытая переменная (LV). Отсутствие шумового сигнала на графиках нагрузок для 5 LV демонстрирует возможность построения градуировочных кривых при этом значении LV. Отсутствие выбросов на графиках Outliers позволяет говорить о правильности выбранной модели и оптимальной математической обработке исходных данных.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе работы изучено влияние растворов БСА и Овальбумина на спектры пропускания МОВ ПС различной архитектуры. Показано что оптимальными для анализа белков, являются МОВ ПС, характеризующиеся диаметром ПС = 200 мкм и четырьмя характеристическими зонами в спектральном диапазоне 400-800 нм. Оценено влияние рН, ионной силы и плотности растворов на спектры пропускания МОВ ПС при анализе БСА и Овальбумина. Установлено, что использование МОВ ПС позволяет определять БСА и Овальбумин в диапазоне $0.1-6 \cdot 10^3$ и $0.1-5 \cdot 10^3$ с ПО $8,9 \cdot 10^{-2}$; 0.25 мкг/мл соответственно. Изучены возможности применения хемометрической обработки данных для обработки сложных спектральных сигналов МОВ ПС. Показано, что регрессионная модель ПЛС позволяет определять БСА, Овальбумина и их общую концентрацию в бинарных смесях и IgG в присутствии БСА и Овальбумина с достаточно высокой точностью ($R^2 \sim 0.97$, $RMSE < 15\%$).

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Ansari S., Karimi M. Novel developments and trends of analytical methods for drug analysis in biological and environmental samples by molecularly imprinted polymers // Trends Anal. Chem. – 2017. – Vol. – 89, P. – 146–162.
2. Blein-Nicolas M., Zivy M. Thousand and one ways to quantify and compare protein abundances in label-free bottom-up proteomics // Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics. – 2016. – Vol. – 1864, № 8. P. – 883–895.
3. Chang S.K., Zhang Y. Protein Analysis // Food analysis. – Springer, Cham. – 2017. P. – 315–331.
4. Huang Q. et al. SWATH enables precise label-free quantification on proteome scale // Proteomics. – 2015. Vol. – 15, № – 7. P. – 1215–1223.
5. Concepcion J. et al. Label-Free Detection of Biomolecular Interactions Using BioLayer Interferometry for Kinetic Characterization // Comb. Chem. High Throughput Screen. – 2009. Vol. – 12, № 8. P. – 791–800.
6. Sansone L. et al. Label-free optical biosensing at femtomolar detection limit // Sensors Actuators B Chem. – 2018. Vol. – 255, P. – 1097–1104.
7. Померанцев А. Л. Хемометрика в Excel: учебное пособие // Томск: из-во ТПУ. – 2014. С. – 435.
8. Комаров Ф.И., Коровкин Б.Ф., Меньшиков В.В. Биохимические исследования в клинике // Элиста: АПП Джангар. – 1998. С. – 250.
9. Brereton R.G. et al. Chemometrics in analytical chemistry—part II: modeling, validation, and applications // Anal. Bioanal. Chem. Springer Berlin Heidelberg, – 2018. Vol. – 410, № – 26. P. – 6691–6704.