

МИНОБРНАУКИ РОССИИ

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования

**«САРАТОВСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ Н.Г. ЧЕРНЫШЕВСКОГО»**

Кафедра общей и неорганической химии

**Импринтированная глюкозооксидаза — рецепторный элемент
в иммунном анализе**

АВТОРЕФЕРАТ МАГИСТЕРСКОЙ РАБОТЫ

студента 2 курса 251 группы
направления 04.04.01 «Химия»
Института химии
Преснякова Кирилла Юрьевича

Научный руководитель:
профессор, д.х.н., доцент

дата, подпись

Н. А. Бурмистрова

Заведующий кафедрой
д.х.н., проф.

дата, подпись

И. Ю. Горячева

Саратов 2023

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы. Наиболее распространёнными современными методами анализа, характеризующимися высокой чувствительностью и селективностью являются биоаналитические методы [1], в которых элементами распознавания являются природные рецепторные системы — антитела. Однако, их использование сопровождается рядом ограничений, вызванных низкой стабильностью, конформационной изменчивостью при воздействии экстремальных параметров среды и высокой себестоимостью анализа [2,3], что способствует росту интереса к области создания более устойчивых и дешёвых аналогов природных рецепторных систем. Существуют примеры [4–7] успешного создания систем искусственного распознавания, например, синтетических антител, основной методикой получения которых является молекулярный импринтинг. В случае замены полимерно-органической матрицы на молекулы белковой природы при проведении импринтинга, появляется возможность придания распознающих свойств молекулам, не обладающих сайтами связывания.

Цель работы: применение импринтированной глюкозооксидазы (**ИБ ГО**) в качестве рецепторного элемента при проведении иммуноанализа для обнаружения низко- и высокомолекулярных соединений — зеараленона (**ЗЕА**) и овальбумина (**ОВА**). Выбор ЗЕА в качестве молекул шаблона представляет определённый интерес в связи необходимостью контроля содержания загрязнителей не антропогенного происхождения в зерновых культурах. Определение ОВА в пищевых продуктах актуально в связи с распространённостью аллергических реакций на продукты, содержащие следовые количества белка куриного яйца. Для достижения данной цели решены следующие **задачи**:

- Оценка эффективности синтеза ИБ ГО с использованием в качестве молекул шаблонов ЗЕА и ОВА;
- Оптимизация процедуры удаления молекул шаблонов из белковой матрицы;
- Оценка возможности замены ЗЕА, на структурные аналоги с более низкой токсичностью;
- Изучение аналитических характеристик ИБ ГО;

- Применение ИБ ГО для определения ОВА в реальных образцах и выделения ЗЕА из модельных растворов.

Краткая характеристика методов исследования. Для решения задач, поставленных в работе, применяли комплекс физических методов исследования: спектрофотометрия, спектрофлуориметрия, динамическое рассеяние света. Объекты исследования: ИБ ГО, синтезированная в присутствии низкомолекулярных шаблонов: ЗЕА и его структурных аналогов — 4-гидроксикумарина (4-ГК) и кумарина (КУ), а также высокомолекулярных молекул шаблонов — ОВА.

Описание структуры работы. Работа состоит из введения, трёх глав (литературного обзора, экспериментальной части и обсуждения результатов), заключения, списка использованных источников, инструкции по охране труда и технике безопасности. В тексте работы содержатся рисунки, таблицы и графические иллюстрации. Общий объем работы составляет 57 страниц, включающих 4 таблицы и 14 рисунков. Проанализировано 93 литературных источника.

Научная значимость работы:

- Проведён синтез ИБ ГО, специфичных к низко- и высокомолекулярным соединениям — ЗЕА и ОВА;
- Найдены аналитические характеристики синтезированных МИП;
- Изучена селективность МИП при разделении смеси ПХ и ГО;
- Показана возможность повторного многократного использования синтезированных МИП.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во введении описана актуальность темы исследования, раскрыта научная новизна работы и определены основные цели и задачи.

В **первой главе** рассмотрены основные схемы проведения иммуноанализа и искусственных систем распознавания, обсуждены их достоинства и недостатки. Описаны этапы синтеза импринтированных белков (ИБ) и влияние условий синтеза на получаемые рецепторные элементы. Приведено обоснование выбора матричных молекул и молекул шаблона.

Привлекательность использования молекул белковой природы, как матричных молекул при проведении молекулярного импринтинга обуславливается набором уникальных структурных свойств белков, включая высокоорганизованную молекулярную структуру, обладающую гибкой, чётко определенной трёхмерной конфигурацией. Наличие структурных элементов, обладающих большим набором функциональных групп, позволяет взаимодействовать с другими биополимерами, небольшими лигандами посредством водородных, гидрофобных нековалентных связей или образования ионной пары [8].

Синтез ИБ включает частичную денатурацию матричного белка; добавление молекул шаблона, приводящее к образованию новой конформации; выведение системы из денатурирующих условий; фиксацию получившейся конформации; удаление молекул шаблона из белковой матрицы. ИБ отличаются от матричного белка наличием сайта связывания, способного к селективному взаимодействию с соединениями, аналогичными по строению молекулам шаблона [9,10], что открывает возможность использование ИБ в качестве замены моноклональных и поликлональных антител при проведении иммуноанализа.

По результатам анализа литературы показана и обоснована необходимость синтеза синтетического элемента распознавания с использованием подхода молекулярного импринтинга с заменой полимерно-органической матрицы на молекулы белковой природы. Проведена адаптация синтеза и условий получения ИБ на основе бычьего сывороточного альбумина (**БСА**) под задачи исследования.

Во **второй главе** приведена информация об используемых реагентах, материалах, оборудовании, а также методикам синтеза ИБ ГО и установления аналитических характеристик полученного рецепторного элемента.

Синтез ИБ, селективных к ЗЕА (**анти-ЗЕА ИБ**) проводили по ранее оптимизированной методике [9–12] (рисунок 1): водный раствор глюкозооксидазы (1 мл, 15 мкМ) выдерживали (10 мин) при перемешивании и комнатной температуре (**КТ**), добавляли HCl (0,1 М) до достижения pH = 3, перемешивали при КТ (10 мин), после чего вносили раствор молекул шаблона — ЗЕА (0,1 мл,

640 мкМ), реакционную смесь перемешивали (15 мин). Денатурацию останавливали, добавлением NaOH (0,1 М) до достижения pH 9,0 и вносили водный раствор глутарового альдегида (0,1 мл, 1 %). Смесь перемешивали (30 мин) при 4 °С и оставляли на 18 ч без перемешивания для завершения синтеза.

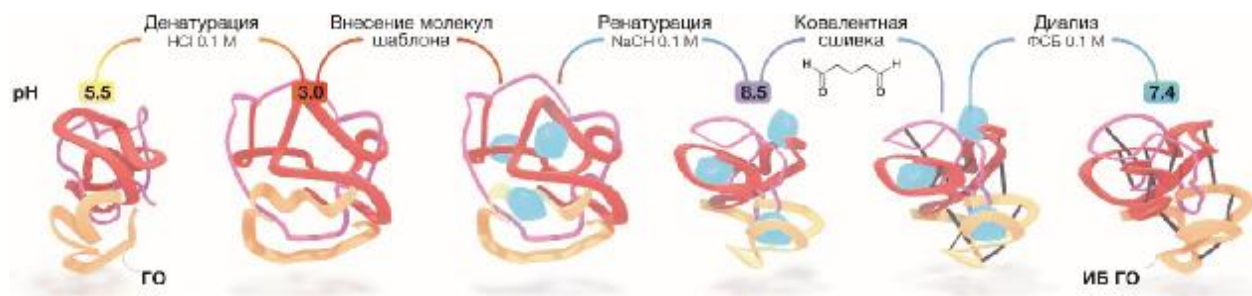


Рисунок 1 — Схема синтеза ИБ

Синтез ИБ с использованием структурных аналогов ЗЕА в качестве молекул шаблона проводили по аналогичной методике, вместо раствора ЗЕА добавляли растворы 4-ГК (**анти-4-ГК ИБ**) и КУ (**анти-КУ ИБ**) (0,1 мл, 640 мкМ). Синтез неимпринтированных белков (НИБ) проводили по аналогичной методике, вместо раствора молекул шаблона вносили аналогичный объем этанола. Очистку синтезированных ИБ и НИБ от молекул шаблона и низкомолекулярных примесей проводили методом диализа против фосфатного буферного раствора pH 6,5 (0,1 М) в течение 6 ч (с заменой диализата каждые 60 мин), затем против фосфатного буферного раствора pH 7,4 (0,1 М) в течение 18 ч.

Синтезированные ИБ: анти-ЗЕА ИБ, анти-4-ГК ИБ, анти-КУ ИБ использовали для определения ЗЕА по схеме конкурентного иммуноферментного анализа (**ИБ-ИФА**). Аналитические характеристики синтезированных ИБ, устанавливали проведением анализа по методике описанной в [12], включающей этапы ИФА, с заменой антител на анти-ЗЕА ИБ.

Синтез ИБ, селективных к ОВА (**анти-ОВА ИБ**) и к пероксидазе хрена (**ПХ**) проводили аналогично методике синтеза анти-ЗЕА ИБ с некоторыми изменениями: все этапы, за исключением последнего проводили при 37 °С, в качестве молекул шаблона добавляли ОВА или ПХ (0,1 мл, 0,2 мг/мл). Синтез НИБ проводили по аналогичной методике, вместо раствора молекул шаблона вносили аналогичный объем ФСБ. Удаление молекул шаблона из матричных

молекул осуществляли изменением кислотности среды в процессе диализа против фосфатного буферного раствора рН 7,4 в течение 3 ч, с заменой диализата каждые 60 мин. Смесь после диализа вносили в гель-фильтрационную колонку для разделения матричных молекул и молекул шаблона. Компоненты смеси элюировали порциями фосфатно-солевого буферного раствора (1 мл, рН 7.4).

Синтезированные анти-ОВА ИБ использовали для определения ОВА по схеме конкурентного флуоресцентного иммуноанализа (ИБ-ФИА). Аналитические характеристики синтезированных анти-ОВА ИБ, определяли проведением ФИА с заменой анти-ОВА антител на анти-ОВА ИБ аналогично методике, описанной в работе [11]. Проводили пробоподготовку реальных образцов — куриных яиц согласно [13] и образцов кекса, не содержащего яичного белка, используя метод добавок. Определение концентрации ОВА для реальных образцов проводили по протоколу ИБ ФИА.

В **третьей главе** обсуждаются полученные результаты и приводятся аналитические характеристики синтезированных ИБ ГО. Существует несколько ограничений, которые необходимо учитывать при разработке рецепторов на основе белковых молекул, наиболее важными из которых являются: (1) площадь межфазной поверхности взаимодействия между молекулами шаблона и матричным белком, связанная с размерами белковой молекулы; (2) полноценное удаление молекул шаблона из матричного белка.

Проведены предварительные исследования размеров и площади молекул ГО, ОВА, БСА и ПХ методом динамического рассеяния света. Средний размер ГО составил $12,85 \pm 0,05$ нм, ОВА — $5,94 \pm 0,24$ нм, БСА — $7,78 \pm 0,14$, ПХ — $7,13 \pm 0,15$ нм. Расчёт площади поверхности проводили методами молекулярной динамики в силовом поле OPLS, для ГО площадь составила $32,4 \cdot 10^3 \text{ \AA}^2$, для ОВА — $13,1 \cdot 10^3 \text{ \AA}^2$, для БСА — $24,3 \cdot 10^3 \text{ \AA}^2$, для ПХ — $10,3 \cdot 10^3 \text{ \AA}^2$. Разница в размерах между ГО, ОВА, БСА и ПХ составила 2,2; 1,7 и 1,8 раза, разница в площадях — 2,7; 1,3 и 3,2 раза, соответственно. Этот факт подтверждает возможность использования ГО как матричной молекулы

В работе впервые показана возможность визуализации процесса очистки ИБ от низко- и высокомолекулярных соединений (рисунок 2). Для системы ГО–ЗЕА наиболее оптимальным методом очистки является диализ, поскольку низкомолекулярные молекулы шаблона свободно диффундируют в диализат из белковой матрицы. Для системы ГО–ОВА и ГО–ПХ применён комбинированный метод, включающий диализ для предварительного отделения ГО от молекул шаблонов и эксклюзионную хроматографию.

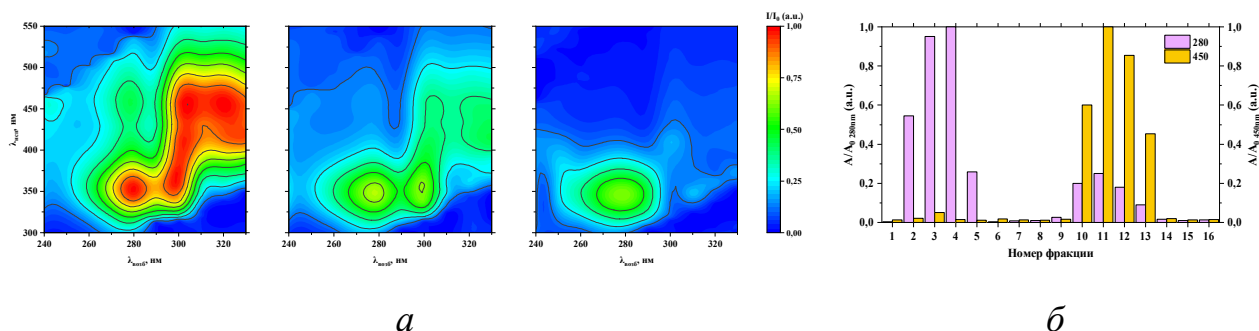


Рисунок 2 — (а) Визуализация процесса очистки анти–ЗЕА ИБ, в процессе диализа; (б) хроматографическое распределение компонентов анти–ПХ ИБ при $\lambda_{\text{погл}} = 280$ нм, фиолетовый и $\lambda_{\text{погл}} = 450$ нм, оранжевый

В качестве метода контроля очистки от низкомолекулярных шаблонов использовали флуоресцентную спектроскопию позволяющую регистрировать флуоресценцию компонентов при разных длинах волн возбуждения (рисунок 2а). Использование колориметрического контроля удаления высокомолекулярных шаблонов — появление окраски ТМБ субстрата в присутствии ПХ (рисунок 2б), позволило подтвердить успешное разделение ГО и молекул шаблона.

Изучены аналитические свойства иммобилизованных анти–ЗЕА ИБ. Градуировочные зависимости для определения ЗЕА при использовании анти–ЗЕА ИБ и ИБ, синтезированных в присутствии его структурных аналогов — анти–4–ГК ИБ и анти–КУ ИБ, представлены на рисунке 3.

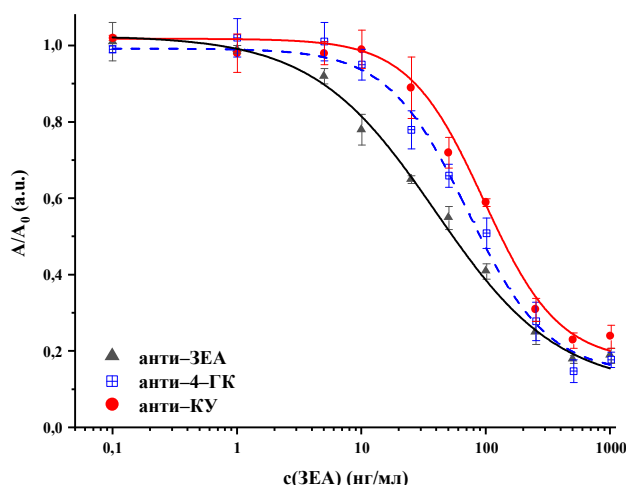


Рисунок 3 — Градуировочные зависимости для определения ЗЕА методом ИБ-ИФА для анти-ЗЕА ИБ, анти-4-ГК ИБ и анти-КУ ИБ

Линейный диапазон определяемых содержаний и предел обнаружения (c_{\min}) для ЗЕА при использовании анти-ЗЕН ИБ, анти-4-ГК ИБ и анти-КУ ИБ составляет 11–112 нг/мл ($c_{\min} = 5$ нг/мл, 100 мкг/кг), 30–142 нг/мл ($c_{\min} = 12$ нг/мл, 240 мкг/кг) и 54–183 нг/мл ($c_{\min} = 25$ нг/мл, 500 мкг/кг), соответственно. Аналитические характеристики анти-ЗЕА ИБ показывают их перспективность для определения ЗЕА в зерне различного назначения и продуктах питания, на уровнях рекомендуемых в РФ.

Градуировочная зависимость для определения ОВА методом ИБ ФИА, представленная на рисунке 4, и построена с использованием стандартных растворов ОВА ($0,1-1 \times 10^4$ нг/мл) и конъюгатов ОВА-ФИТЦ, вносимых к иммобилизованным анти-ОВА ИБ. Сигмоидальные кривые строили по максимуму испускания при $\lambda_{\text{исп}} = 520$ нм. Линейный диапазон определения ОВА = 10–2000 нг/мл, $c_{\min} = 6$ нг/мл. Аналитические характеристики методики позволяют проводить определение следовых количеств ОВА.

Изучена возможность связывания анти-ПХ ИБ и нИБ молекул ПХ. К иммобилизованному на поверхности МТП анти-ПХ ИБ и нИБ добавляли растворы ПХ с различной концентрацией 80–2500 нг/мл и инкубировали в течение 2 ч, после чего растворы ПХ удаляли и определяли концентрацию несвязанной ПХ хромогенной реакцией с ТМБ-субстратом. Количество ПХ, связанной с анти-ПХ ИБ и нИБ устанавливали по разнице концентраций между раствором ис-

ходной ПХ и несвязанной ПХ — рисунок 5, анти-ПХ ИБ характеризуются более высокой способностью связывания с ПХ, чем НИБ,

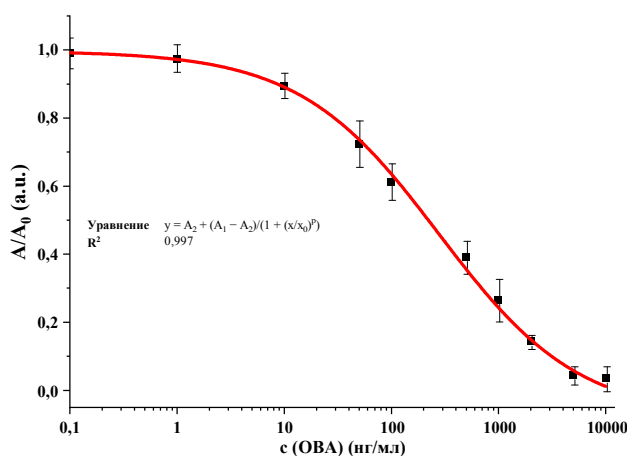


Рисунок 4 — Градуировочная кривая для количественного определения ОВА методом ИБ ФИА

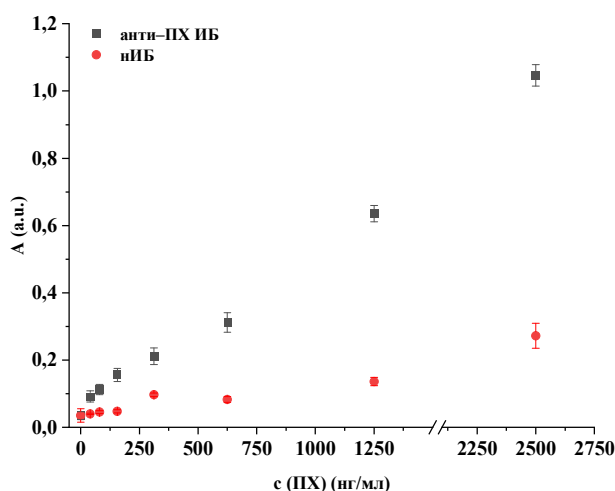


Рисунок 5 — Эффективность связывания анти-ПХ ИБ и НИБ с ПХ в зависимости от концентрации ПХ

Синтезированные анти-ОВА ИБ использованы для определения ОВА в реальных образцах методом ИБ ФИА. Изучено 9 образцов — 6 экстрактов яичного белка и 3 искусственно загрязнённых образца кекса, определение в каждом образце проводили тремя параллельными опытами. Согласно результатам, представленным в таблице 1, наблюдается хорошее соответствие между введённой и найденной концентрацией ОВА. Степень извлечения ОВА из яичных

растворов составляла 90–112%, в искусственно загрязнённых образцах кекса — 95–120 %.

Таблица 1 — Определение ОВА в реальных образцах методом ИБ ФИА

		Содержится ОВА, нг/мл	Найдено ОВА, нг/мл	Степень извлечения, %
Образец яйца	<i>1.a</i>	20	21 ± 1	105
	<i>б</i>	100	110 ± 3	110
	<i>в</i>	500	514 ± 8	103
	<i>2.a</i>	20	18 ± 3	90
	<i>б</i>	100	110 ± 1	110
	<i>в</i>	500	561 ± 15	112
		Введено ОВА, нг/мл	Найдено ОВА, нг/мл	Степень извлечения, %
Образец кекса	3	100	95 ± 6	95
	4	200	245 ± 11	120
	5	500	481 ± 25	96

Заключение:

- Показана возможность применения ИБ ГО в качестве рецепторного элемента при проведении иммуноанализа (ИБ ИФА и ИБ ФИА)
- Изучена возможность проведения синтеза ИБ ГО с заменой молекул шаблона на структурные аналоги ЗЕА, обладающие более низкой токсичностью
- Оптимизирована процедура удаления низко- и высокомолекулярных молекул шаблонов из белковой матрицы
- Предложен подход контроля и визуализации процессов удаления молекул шаблонов: проекция трёхмерных спектров флуоресценции в виде тепловых карт и применение хромогенной реакции
- Оценены аналитические свойства ИБ ГО в формате иммуноанализа для определения

ЗЕА методом ИБ–ИФА: $c_{\min} = 5$ нг/мл, линейный диапазон 11...112 нг/мл

ОВА методом ИБ–ФИА: $c_{\min} = 6$ нг/мл, линейный диапазон 10...2000 нг/мл.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Turner N.W. et al. From 3D to 2D: A review of the molecular imprinting of proteins // *Biotechnol. Progr.* 2006. Vol. 22, № 6. P. 1474–1489.
2. Moreno-Bondi M.C. et al. Immuno-Like Assays and Biomimetic Microchips // *Molecular Imprinting* / ed. Haupt K. Berlin, Heidelberg: Springer, 2012. P. 111–164.
3. Zhang H. et al. Immunoassay technology: Research progress in microcystin-LR detection in water samples // *J. Hazard. Mater.* 2022. Vol. 424. P. 127406.
4. Mosbach K. Molecular imprinting // *Trends Biochem. Sci.* 1994. Vol. 19, № 1. P. 9–14.
5. Belbruno J.J. Molecularly Imprinted Polymers: review-article // *Chem. Rev. American Chemical Society.* 2019. Vol. 119, № 1. P. 94–119.
6. Ansari S., Masoum S. Molecularly imprinted polymers for capturing and sensing proteins: Current progress and future implications // *TrAC — Trends in Analytical Chemistry.* Elsevier Ltd, 2019. Vol. 114. P. 29–47.
7. Gutiérrez-Climente R. et al. Sol-gel process: The inorganic approach in protein imprinting // *J Mater Chem B.* 2021. Vol. 9, № 9. P. 2155–2178.
8. Piletsky S. *Molecular Imprinting of Polymers* // *Molecular Imprinting of Polymers.* CRC Press, 2006.
9. Gutierrez A.V.R., Hedström M., Mattiasson B. Bioimprinting as a tool for the detection of aflatoxin B1 using a capacitive biosensor // *Biotechnology Reports.* Elsevier B.V., 2016. Vol. 11. P. 12–17.
10. Liu J. et al. Bioimprinted protein exhibits glutathione peroxidase activity // *Anal. Chim. Acta.* 2004. Vol. 504, № 1. P. 185–189.
11. Pidenko P. et al. Imprinted proteins for determination of ovalbumin // *Analytical and Bioanalytical Chemistry.* Springer Berlin Heidelberg, 2022.
12. Pidenko P. et al. Imprinted proteins as a receptor for detection of zearalenone // *Anal. Chim. Acta.* Elsevier B.V., 2018. Vol. 1040. P. 99–104.

13. Wang X. et al. Fluorescent nanosensor designing via hybrid of carbon dots and post-imprinted polymers for the detection of ovalbumin // Talanta. 2020. Vol. 211. P. 120727.