

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ SPR АНАЛИЗ МЕЖМОЛЕКУЛЯРНЫХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ОРИГИНАЛЬНОГО ЧИПА BIACORE CM5 И ЕГО АНАЛОГА CMD500M

О.В. Гнеденко*, П.В. Еришов, Ю.В. Мезенцев, Л.А. Калужский, Е.О. Яблоков, А.А. Гилеп, А.С. Иванов

Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича, 119121, Москва, Погодинская ул., 10; *e-mail: gnedenko.oksana@gmail.com

В настоящее время пользователи SPR биосенсоров Biacore (“Cytiva”, США) столкнулись с санкционными ограничениями по закупке расходных материалов для данного оборудования, в первую очередь оптических чипов. В связи с этим стало актуальным использование их коммерчески доступных аналогов. В данной работе на SPR биосенсоре Biacore X100 было выполнено сравнительное исследование молекулярных взаимодействий с использованием оригинального оптического чипа Biacore CM5 (“Cytiva”) и его аналога CMD500M (“XanTec bioanalytics GmbH”, Германия). В качестве молекулярного лиганда на чипе был иммобилизован белок А, который часто используется в научных исследованиях и биотехнологических работах для иммобилизации антител на различных носителях (биосенсорные чипы, сорбенты, нано- и микрочастицы). В качестве белкового анализата был использован препарат антител типа IgG. Было выполнено сравнительное исследование взаимодействия различных концентраций антител с иммобилизованным на двух вариантах чипов белком А. Величины кинетических констант скоростей образования (k_{on}) и распада (k_{off}) комплексов, а также равновесной константы диссоциации комплекса (K_d), были рассчитаны из полученных наборов сенсограмм с использованием модели взаимодействия 1:1 (Langmuir) binding. Результаты сравнительных измерений показали близкие значения констант скоростей и аффинности взаимодействия (различия между величинами k_{on} , k_{off} и K_d составили 18%, 10% и 9% соответственно). Таким образом, данное исследование подтвердило практически полную взаимозаменяемость оригинальных SPR чипов CM5 и их аналогов CMD500M.

Ключевые слова: поверхностный плазмонный резонанс (SPR); карбоксиметилированный декстран; взаимодействие антиген-антитело; кинетические константы (k_{on} , k_{off}); равновесная константа диссоциации (K_d); чипы CM5 и их аналоги CMD500M

DOI: 10.18097/BMCRM00220

ВВЕДЕНИЕ

С момента появления первых оптических биосенсоров, работающих на эффекте поверхностного плазмонного резонанса (SPR, от английского Surface Plasmon Resonance), прошло более 30 лет, и в настоящее время они являются основной технологией для регистрации межмолекулярных взаимодействий. Принцип SPR анализа основан на прямой регистрации в реальном времени взаимодействия свободно плавающего в жидкости молекулярного партнера (анализата) с иммобилизованным на поверхности оптического чипа вторым партнером (лигандом) по изменению коэффициента преломления у поверхности чипа [1–5]. В течение трех десятилетий несомненным лидером в области SPR были шведские биосенсоры типа Biacore (в настоящее время бренд принадлежит фирме “Cytiva”, США). Данные биосенсоры широко используются для решения разнообразных фундаментальных задач в области биомедицины [6–10], а также прикладных работ в области фармакологии для идентификации биологически активных соединений как кандидатов для создания мишень-специфичных лекарств [11, 12], биотерапевтических препаратов [13, 14] и ингибиторов целевых белок-белковых взаимодействий [15].

Работа SPR биосенсоров типа Biacore основана на использовании сменных одноразовых оптических чипов, стоимость которых составляет значимую часть бюджета лабораторий, имеющих данные биосенсоры. В настоящее время, в связи с санкционными ограничениями, в РФ отсутствует возможность закупки расходных материалов для имеющегося оборудования производства “Cytiva”

(США). Поэтому для пользователей биосенсоров Biacore крайне актуален вопрос обеспечения их дальнейшей работы с использованием совместимых аналогов расходных материалов и в первую очередь оптических чипов.

Существуют два варианта решения данного вопроса: 1) использование совместимых с биосенсорами Biacore чипов-аналогов, выпускаемых фирмой “XanTec bioanalytics GmbH” (Германия) (далее “XanTec”); 2) замена пользователем старого оптического элемента в использованном оригинальном чипе на новый, выпускаемый фирмой “Sofchip” (США). В данной работе нами рассмотрен первый вариант – использование чипов-аналогов фирмы “XanTec”. Реализация второго варианта с заменой оптического элемента в чипе Biacore – это отдельная и непростая задача. Демонтаж старого оптического элемента из корпуса чипа и вклеивание на его места нового требует практически ювелирных навыков ручной работы и особой чистоты рабочего места, так как оптический элемент представляет собой очень тонкую стеклянную пластинку (размеры 9x9x0.3 мм) с напыленным слоем золота и функциональным покрытием (в случае чипов CM5 – это слой карбоксиметилированного декстрана).

Фирма “XanTec” выпускает чипы-аналоги для оптических биосенсоров разных производителей. В научной литературе есть немало работ, выполненных с использованием таких чипов на биосенсорах Reichert [16], Carterra LSA [17], Biacore 3000 [18–20], Biacore T200 [21, 22], Biacore 8K [17], Biacore X100 [23].

Наиболее часто пользователи биосенсоров Biacore используют оптический чип CM5, который является



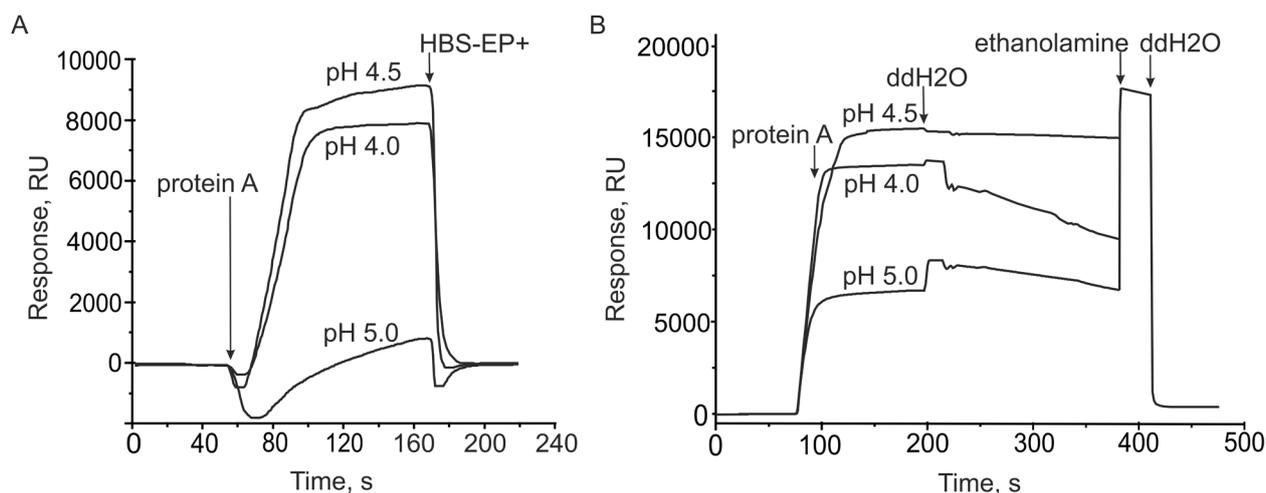


Рисунок 1. Сенсограммы pH-скаутинга белка А на чипах CM5 (А) и CMD500М (В).

стандартом для большинства исследований. Фирма “ХанТес” выпускает аналог данного чипа с маркировкой CMD500M, который ряд исследователей успешно использует в своих работах вместо стандартного CM5 [18, 19, 21]. Однако вопрос о сходимости результатов экспериментальных измерений одних и тех же молекулярных взаимодействий, полученных с использованием оригинальных чипов CM5 и их аналогов CMD500M, оставался не ясен. На сайте “ХанТес” имеется очень краткая и неполная информация в виде информационного бюллетеня [23] о результатах сравнительных испытаний чипов CM5 и CMD500M, выполненных в исследовательском центре канадской фирмы GFB Biopharmaceuticals на биосенсоре Biacore 8K. Однако документ «Test report “ХанТес sensor chips”, 2008», на который ссылается фирма “ХанТес”, в Интернете отсутствует. Вместе с тем, в научной литературе нами была найдена только одна независимая публикация [24], в которой было выполнено сравнение результатов измерений взаимодействия одной и той же пары белков, бета2-микроглобулина (b2m) и антитела к этому белку (анти-b2m антитело), с использованием чипов Biacore CM5 и ХанТес CMD500M. Авторы показали, что при полной технической совместимости чипов двух производителей наблюдаются явные различия в точности получаемых данных.

Неоднозначность информации о совместимости чипов двух производителей побудила нас выполнить собственный сравнительный SPR анализ сходимости результатов, получаемых с использованием оригинального чипа Biacore CM5 и чипа-аналога ХанТес CMD500M. В качестве тестовой белковой пары были использованы белок А и антитело класса иммуноглобулинов G. Данная пара была выбрана как оптимальная по устойчивости к физико-химическим воздействиям, хорошей растворимости в воде и стехиометрии взаимодействия 1:1, что значительно упрощает математический анализ полученных сенсограмм.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для анализа взаимодействий антител с иммобилизованным на оптическом чипе белком А был использован оптический биосенсор Biacore X100 (“Cytiva”, США), работающий на эффекте поверхностного плазмонного резонанса (SPR). Сигнал биосенсора регистрировали в реальном времени в резонансных единицах RU (1 RU = 1 пг

белка на поверхности оптического чипа) в виде сенсограмм. Все измерения проводили при температуре 25°C. В работе использовали оригинальные чипы Biacore CM5 (“Cytiva”, США) и их аналоги CMD500M (“ХанТес”, Германия), покрытые карбоксиметилированным декстраном. В соответствии с руководствами фирм-производителей чипы CM5 и CMD500M хранили при температуре 4°C и -20°C, соответственно.

В работе были использованы следующие реактивы фирмы “Cytiva” (США): рабочий буфер HBS-EP+ (150 mM NaCl, 3 mM ЭДТА, 0.05% детергент P20, 10 mM HEPES, pH 7.4), набор для ковалентной иммобилизации белков за первичные аминогруппы (1-этил-3-(3-диметиламинопропил)-карбодимид-НCl (EDC), N-гидроксисукцинимид (NHS), 1 M этаноламин-НCl (pH 8.5), набор 10 mM ацетатных буферов (pH 4.0, 4.5, 5.0), 10 mM глициновый буфер (pH 2.5). Белок А был получен от фирмы “Имтек” (Россия). Моноклональные антитела мыши к иммуноглобулинам G человека, изотип IgG2a (кат. № 1G1cc клон 5A9cc) были получены от фирмы “Хайтест” (Россия).

Процедура pH-скаутинга

Для оптимизации протокола иммобилизации белка А в качестве белка-лиганда была выполнена процедура pH-скаутинга на чипах CM5 и CMD500M (рис. 1). Для этого через измерительную ячейку биосенсора последовательно инжестировали растворы белка А (100 мкг/мл) в 10 mM ацетатном буфере с pH 4.0, 4.5, 5.0 в течение 2 мин при скорости потока 10 мкл/мин. В соответствии с инструкциями к чипам от фирм-производителей, в качестве рабочего буфера для чипа CM5 был использован буфер HBS-EP+, а в случае CMD500M - бидистиллированная вода (ddH₂O). В случае чипа CM5 после каждой инъекции раствора белка А поверхность чипа регенерировали промывкой рабочим буфером в течение 30 с при скорости потока 10 мкл/мин (рис. 1 А). В случае чипа CMD500M после каждой инъекции раствора белка А поверхность чипа регенерировали инъекциями 1 M раствора этаноламин-НCl (pH 8.5) в течение 30 с при скорости потока 30 мкл/мин (рис. 1 В). Выполнение протокола pH-скаутинга позволило оценить уровень преконцентрации белка А у поверхности чипов и в обоих случаях выбрать оптимальное значение pH 4.5, при котором наблюдался максимальный рост сигнала биосенсора.

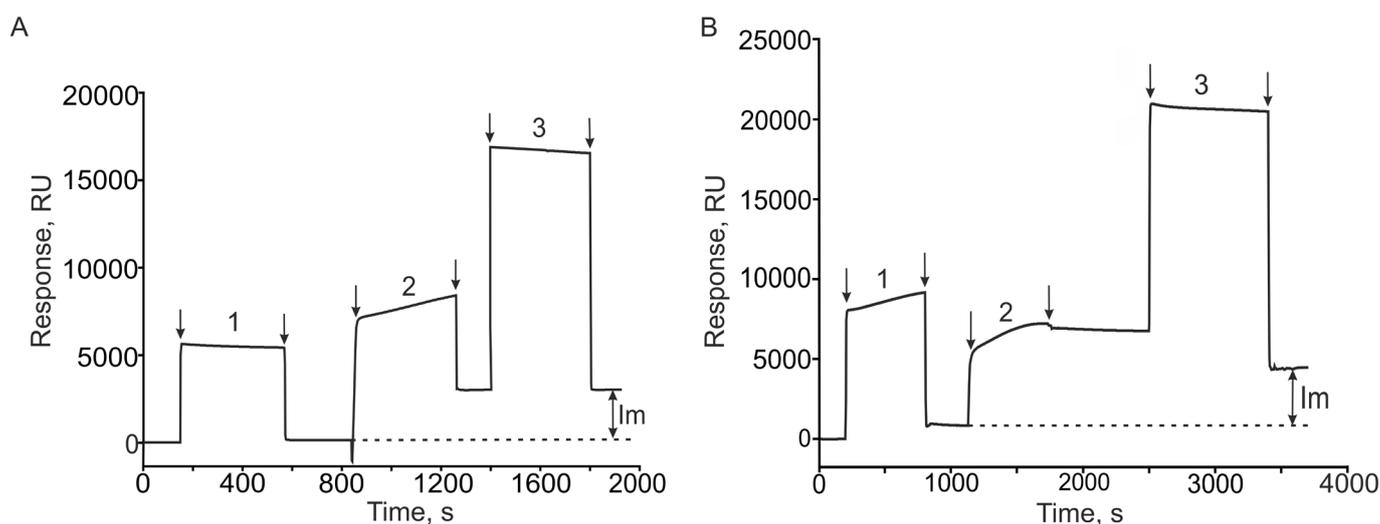


Рисунок 2. Сенсограммы иммобилизации белка А на чипах CM5 (А) и CMD500М (В). Стрелками отмечены начало и конец инъекций EDC/NHS (1), белка А (2), этаноламин-НCl (3). Im - количество иммобилизованного белка.

Таблица 1. Протоколы иммобилизации белка-лиганда (белок А), выполненные в соответствии с рекомендациями фирм-производителей для чипов CM5 и CMD500M.

№	Процедура	CM5	CMD500M
1	Активация поверхности	7 мин, 10 мкл/мин, 0.2 М EDC/0.05 М NHS	10 мин, 5 мкл/мин, 0.2 М EDC/0.05 М NHS
2	Иммобилизация белка-лиганда	7 мин, 5 мкл/мин, лиганд 100 мкг/мл в 10 мМ ацетатном буфере (pH 4.5)	10 мин, 5 мкл/мин, лиганд 100 мкг/мл в 10 мМ ацетатном буфере (pH 4.5)
3	Инактивация поверхности	7 мин, 10 мкл/мин, 1 М этаноламин-НCl (pH 8.5)	15 мин, 5 мкл/мин, 1 М этаноламин-НCl (pH 8.5)
4	Рабочий буфер	HBS-EP+ (pH 7.4)	dd H ₂ O
5	Уровень иммобилизации белка-лиганда	3000 RU	3400 RU

Иммобилизация белка А на чипе CM5

Иммобилизацию белка А осуществляли за счет формирования ковалентных связей между карбоксильными группами на поверхности оптического чипа CM5 и аминоклупами белка А. Для этого карбоксильные группы чипа активировали инъекцией смеси 0.2 М EDC/0.05 М NHS в течение 7 мин при скорости потока 10 мкл/мин. Инъекцию раствора белка А (100 мкг/мл) в 10 мМ ацетатном буфере (pH 4.5) выполняли со скоростью 5 мкл/мин в течение 7 мин. Остаточные непрореагировавшие активные группы на поверхности чипа блокировали инъекцией раствора 1 М этаноламин-НCl (pH 8.5) в течение 7 мин при скорости потока 10 мкл/мин. В качестве рабочего буфера использовали HBS-EP+ (pH 7.4). В результате на поверхности чипа было иммобилизовано примерно 3.0 нг белка А (3000 RU). Сенсограмма иммобилизации представлена на рис. 2А.

Иммобилизация белка А на чип CMD500M

Карбоксильные группы чипа CMD500M активировали инъекцией смеси 0.2 М EDC /0.05 М NHS в течение 10 мин при скорости потока 5 мкл/мин. Инъекцию раствора белка А (100 мкг/мл) в 10 мМ ацетатном буфере (pH 4.5) выполняли со скоростью 5 мкл/мин в течение 10 мин. Непрореагировавшие активные группы чипа блокировали инъекцией раствора 1М этаноламин-НCl (pH 8.5) в течение

15 мин при скорости потока 5 мкл/мин. В качестве рабочего буфера была использована бидистиллированная вода. В результате на поверхности чипа было иммобилизовано примерно 3.4 нг белка А (3400 RU) (рис. 2В).

Протоколы иммобилизации белка А на обоих вариантах чипов представлены в табл. 1. Различия протоколов минимальны - в случае чипов CMD500M - более длительные инъекции и использование ddH₂O вместо буфера HBS-EP+. Количество иммобилизованного белка А на чипах двух типов отличается незначительно (не более 12 %).

Исследование взаимодействия IgG2a с иммобилизованным белком А

Регистрацию взаимодействий антител (IgG2a) с иммобилизованным белком А выполняли в режиме реального времени путём последовательных инъекций растворов IgG2a (в диапазоне концентраций от 10 нМ до 1 мкМ) через рабочий (с белком А) и контрольный (без белка) каналы биосенсора в течение 5 мин при скорости потока 10 мкл/мин. После каждого измерения поверхность оптического чипа регенерировали инъекцией 10 мМ глицинового буфера (pH 2.5) в течение 30 с при скорости потока 30 мкл/мин. В качестве рабочего буфера использовали HBS-EP+. Серии полученных сенсограмм анализировали с помощью программы Biaevaluation 4.1.1 с использованием модели взаимодействия 1:1 (Langmuir) binding.

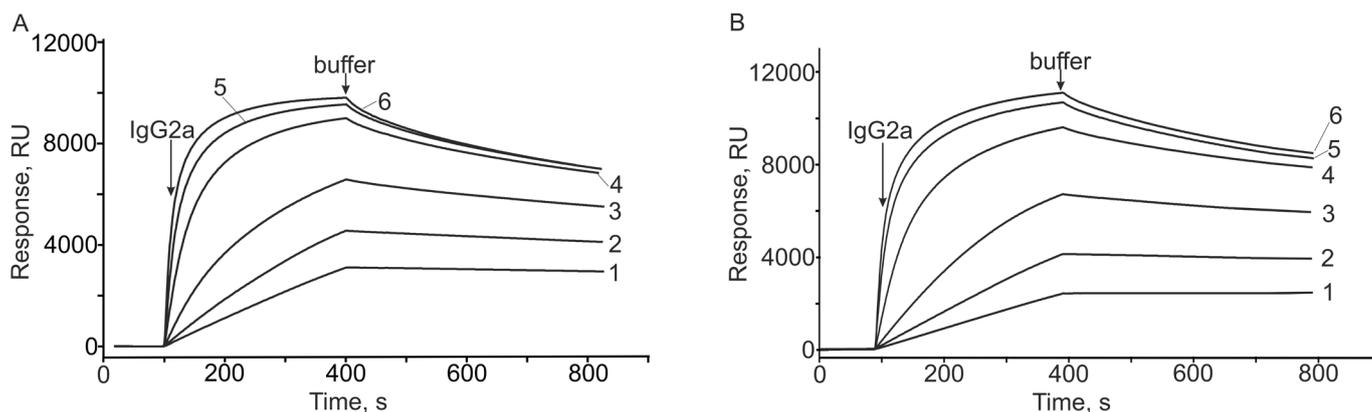


Рисунок 3. Сенсограммы взаимодействия IgG2a с иммобилизованным белком А на чипах CM5 (А) и CMD500M (В) в диапазоне концентраций от 10 до 1000 нМ: 1 – 10 нМ, 2 -25 нМ, 3 – 50 нМ, 4 – 100 нМ, 5 – 500 нМ, 6 – 1000 нМ.

Таблица 2. Кинетические параметры и равновесная константа диссоциации комплексов антител IgG2a с иммобилизованным белком А.

Чип	k_{on} , $M^{-1}s^{-1}$	k_{off} , s^{-1}	K_d , M
CM5	$(1.69 \pm 0.19) \cdot 10^5$	$(5.20 \pm 0.60) \cdot 10^{-4}$	$(3.08 \pm 0.34) \cdot 10^{-9}$
CMD500M	$(1.38 \pm 0.17) \cdot 10^5$	$(4.67 \pm 0.51) \cdot 10^{-4}$	$(3.38 \pm 0.55) \cdot 10^{-9}$

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В результате выполненного SPR-анализа были получены наборы сенсограмм взаимодействий антител IgG2a (в диапазоне концентраций от 10 нМ до 1 мкМ) с иммобилизованным на двух типах чипов белком А. Типичные сенсограммы представлены на рис. 3. Величины кинетических констант и равновесной константы диссоциации комплексов, рассчитанные из экспериментальных кривых согласно модели 1:1 (Langmuir) binding представлены в табл. 2. Можно видеть, что отличия в значениях констант, полученных на чипах от разных производителей, незначительны: значения константы скорости ассоциации (k_{on}) различаются на 18%, значения константы скорости диссоциации (k_{off}) - на 10%, а значения равновесной константы диссоциации (K_d) - на 9%.

В публикации [23] авторы в сравнительном исследовании чипов CM5 и CMD500M обнаружили значительные различия как в уровнях иммобилизации белка-лиганда, так и в величинах кинетических констант и равновесной константы диссоциации. Различие в уровнях иммобилизации приводит также к различию в значениях R_{max} (максимально возможного сигнала биосенсора при насыщении лиганда), определенных из экспериментальных кривых. R_{max} был выше в случае чипа CMD500M по сравнению с чипом CM5. В нашем исследовании мы также наблюдали более высокий R_{max} (на 11%) в случае чипа CMD500M от “XanTec” по сравнению с CM5 (11000 RU против 9800 RU).

Значения кинетических констант и равновесной константы диссоциации комплексов PD-1/анти-PD-1 (рецептор программируемой гибели клеток 1/моноклональные антитела к нему), измеренные на Biacore 8K с использованием чипа CMD200M (“XanTec”), практически накладываются на значения, измеренные на сенсорном чипе CM5 (“Cytiva”) [17]. Полученные нами результаты сходны с

этим и показывают небольшую разницу между одинаковыми типами чипов от разных поставщиков.

Наши данные свидетельствуют о том, что чипы CM5 и CMD500M взаимозаменяемые, так как позволяют выполнять исследования на одном и том же приборе с отличиями от 9 % до 18 % в уровнях ковалентной иммобилизации белка и в параметрах белок-белковых взаимодействий.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Нами было выполнено сравнительное исследование межмолекулярных взаимодействий с использованием оригинального оптического чипа CM5 (“Cytiva”) и его аналога CMD500M (“XanTec bioanalytics GmbH”). Это исследование будет полезно пользователям биосенсоров Biacore, работающим в условиях санкций. Полученные результаты позволяют сделать вывод, что чипы CMD500M “Xantec” можно использовать для работы на SPR биосенсорах типа Biacore. Результаты анализа одних и тех же белок-белковых взаимодействий в этом случае могут отличаться не более чем на 18%. Таким образом, данное исследование подтвердило практически полную взаимозаменяемость оригинальных SPR чипов CM5 (“Cytiva”) и их аналогов CMD500M (“XanTec bioanalytics GmbH”).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей или с использованием животных в качестве объектов.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа была выполнена в рамках Программы фундаментальных научных исследований в Российской

Федерации на долгосрочный период (2021 - 2030 годы) (№122030100168-2).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Karlsson, R. (2004) SPR for molecular interaction analysis: a review of emerging application areas. *Journal of molecular recognition: JMR*, **17**(3), 151–161. DOI: 10.1002/jmr.660
2. Jason-Moller, L., Murphy, M., Bruno, J. (2006) Overview of Biacore systems and their applications. *Current Protocols in Protein Science*, **Chapter 19**, Unit 19.13. DOI: 10.1002/0471140864.ps1913s45
3. Florinskaya, A., Ershov, P., Mezentsev, Y., Kaluzhskiy, L., Yablokov, E., Medvedev, A., Ivanov, A. (2018) SPR biosensors in direct molecular fishing: implications for protein interactomics. *Sensors*, **18**(5), 1616. DOI: 10.3390/s18051616
4. Liu, H., Fu, Y., Yang, R., Guo, J., Guo, J. (2023) Surface plasmonic biosensors: principles, designs and applications. *The Analyst*, **148**(24), 6146–6160. DOI: 10.1039/d3an01241g
5. Douzi, B. (2024) Surface plasmon resonance: a sensitive tool to study protein-protein interactions. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, **2715**, 363–382. DOI: 10.1007/978-1-0716-3445-5_23
6. Yablokov, E.O., Sushko, T.A., Ershov, P.V., Florinskaya, A.V., Gnedenko, O.V., Shkel, T.V., Grabovec, I.P., Strushkevich, N.V., Kaluzhskiy, L.A., Usanov, S.A., Gilep, A.A., Ivanov, A.S. (2019) A large-scale comparative analysis of affinity, thermodynamics and functional characteristics of interactions of twelve cytochrome P450 isoforms and their redox partners. *Biochimie*, **162**, 156–166. DOI: 10.1016/j.biochi.2019.04.020
7. Ershov, P.V., Kaluzhskiy, L.A., Yablokov, E.O., Gnedenko, O.V., Kavaleuski, A.A., Tumulovich, A.M., Gilep, A.A., Strushkevich, N.V., Ivanov, A.S. (2021) Application of the SPR biosensor for the analysis of protein–protein interactions in aqueous environment and bilayer lipid membrane as exemplified by P450scc (CYP11A1). *Biochemistry (Moscow), Supplement Series A: Membrane and Cell Biology*, **15**(1), 89–96. DOI: 10.1134/S1990747821010049
8. Kaluzhskiy, L., Ershov, P., Yablokov, E., Shkel, T., Grabovec, I., Mezentsev, Y., Gnedenko, O., Usanov, S., Shabunya, P., Fatykhava, S., Popov, A., Artyukov, A., Styshova, O., Gilep, A., Strushkevich, N., Ivanov, A. (2021) Human lanosterol 14- α demethylase (CYP51A1) is a putative target for natural flavonoid luteolin 7,3'-disulfate. *Molecules*, **26**(8), 2237. DOI: 10.3390/molecules26082237
9. Ershov, P.V., Yablokov, E., Zgoda, V., Mezentsev, Y., Gnedenko, O., Kaluzhskiy, L., Svirid, A., Gilep, A., Usanov, S.A., Ivanov, A. (2021) A new insight into subinteractomes of functional antagonists: Thromboxane (CYP5A1) and prostacyclin (CYP8A1) synthases. *Cell Biology International*, **45**(6), 1175–1182. DOI: 10.1002/cbin.11564
10. Gilep, A., Varaksa, T., Bukhdruker, S., Kavaleuski, A., Ryzhykau, Y., Smolskaya, S., Sushko, T., Tsumoto, K., Grabovec, I., Kapranov, I., Okhrimenko, I., Marin, E., Shevtsov, M., Mishin, A., Kovalev, K., Kuklin, A., Gordeliy, V., Kaluzhskiy, L., Gnedenko, O., Yablokov, E., Ivanov, A., Borshchevskiy, V., Strushkevich, N. (2023) Structural insights into 3Fe–4S ferredoxins diversity in *M. tuberculosis* highlighted by a first redox complex with P450. *Frontiers in Molecular Biosciences*, **9**, 1100032. DOI: 10.3389/fmolb.2022.1100032
11. Shepherd, C., Robinson, S., Berizzi, A., Thompson, L.E.J., Bird, L., Culurgioni, S., Varzandeh, S., Rawlins, P.B., Olsen, R.H.J., Navratilova, I.H. (2022) Surface plasmon resonance screening to identify active and selective adenosine receptor binding fragments. *ACS medicinal chemistry letters*, **13**(7), 1172–1181. DOI: 10.1021/acsmchemlett.2c00099
12. Zhang, X., Sun, L., Meuser, M.E., Zalloum, W.A., Xu, S., Huang, T., Cherukupalli, S., Jiang, X., Ding, X., Tao, Y., Kang, D., De Clercq, E., Pannecouque, C., Dick, A., Cocklin, S., Liu, X., Zhan, P. (2021) Design, synthesis, and mechanism study of dimerized phenylalanine derivatives as novel HIV-1 capsid inhibitors. *European Journal of Medicinal Chemistry*, **226**, 113848. DOI: 10.1016/j.ejmech.2021.113848
13. Wang, W., Thiemann, S., Chen, Q. (2022) Utility of SPR technology in biotherapeutic development: Qualification for intended use. *Analytical Biochemistry*, **654**, 114804. DOI: 10.1016/j.ab.2022.114804
14. Matharu, Z., Bee, C., Schwarz, F., Chen, H., Tomlinson, M., Wu, G., Rakestraw, G., Hornsby, M., Drake, A., Strop, P., Rajpal, A., Dollinger, G. (2021) High-throughput surface plasmon resonance biosensors for identifying diverse therapeutic monoclonal antibodies. *Analytical Chemistry*, **93**(49), 16474–16480. DOI: 10.1021/acs.analchem.1c03548
15. Zhu, Z.-L., Qiu, X.-D., Wu, S., Liu, Y.-T., Zhao, T., Sun, Z.-H., Li, Z.-R., Shan, G.-Z. (2020) Blocking Effect of Demethylzeylasteral on the Interaction between Human ACE2 Protein and SARS-CoV-2 RBD Protein Discovered Using SPR Technology. *Molecules (Basel, Switzerland)*, **26**(1), 57. DOI: 10.3390/molecules26010057
16. Risse, F., Gedig, E.T., Gutmann, J.S. (2018) Carbodiimide-mediated immobilization of acidic biomolecules on reversed-charge zwitterionic sensor chip surfaces. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **410**(17), 4109–4122. DOI: 10.1007/s00216-018-1048-0
17. Brown, M.E., Bedinger, D., Lilov, A., Rathanaswami, P., Vásquez, M., Durand, S., Wallace-Moyer, I., Zhong, L., Nett J. H., Burnina, I., Caffry, I., Lynaugh, H., Sinclair, M., Sun, T., Bukowski, J., Xu, Y., Abdiche, Y. N. (2020) Assessing the binding properties of the anti-PD-1 antibody landscape using label-free biosensors. *PLoS One*, **15**(3), e0229206. DOI: 10.1371/journal.pone.0229206
18. Chen, Q., Manzke, M., Hartmann, A., Büttner, M., Amann, K., Pauly, D., Wiesener, M., Skerka, C., Zipfel, P.F. (2016) Complement factor H-related 5-hybrid proteins anchor properdin and activate complement at self-surfaces. *Journal of the American Society of Nephrology*, **27**(5), 1413–1425. DOI: 10.1681/ASN.2015020212
19. Fu, Z., Xu, Y., Cai, C. (2021) Ginsenoside Rg3 inhibits pulmonary fibrosis by preventing HIF-1 α nuclear localisation. *BMC Pulmonary Medicine*, **21**(1), 70. DOI: 10.1186/s12890-021-01426-5
20. Di Primo, C., Dausse, E., Toulmé, J.-J. (2011) Surface plasmon resonance investigation of RNA aptamer–RNA ligand interactions. In J. Goodchild (Ed.), *Therapeutic Oligonucleotides* (Vol. 764, pp. 279–300). Totowa, NJ: Humana Press. DOI: 10.1007/978-1-61779-188-8_19
21. Desmyter, A., Farenc, C., Mahony, J., Spinelli, S., Bebeacua, C., Blangy, S., Veisler, D., Van Sinderen, D., Cambillau, C. (2013) Viral infection modulation and neutralization by camelid nanobodies. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **110**(15). DOI: 10.1073/pnas.1301336110
22. Rohlik, D. L., Patel, E., Gilbert, N.C., Offenbacher, A.R., Garcia, B.L. (2023) Investigating membrane-binding properties of lipoxigenases using surface plasmon resonance. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **670**, 47–54. DOI: 10.1016/j.bbrc.2023.05.066
23. XanTec. Comparison between sensor chips from XanTec and other manufacturers. Newsletter II. Retrieved March 28, 2024, from: https://www.xantec.com/material/pdf/comparison_between_sensorchips_from_xantec_and_other_manufacturers.pdf
24. Steinicke, F., Oltmann-Norden, I., Wätzig, H. (2017) Long term kinetic measurements revealing precision and general performance of surface plasmon resonance biosensors. *Analytical Biochemistry*, **530**, 94–103. DOI: 10.1016/j.ab.2017.05.009

Поступила: 23.04.2024

После доработки: 30.05.2024

Принята к публикации: 31.05.2024

COMPARATIVE SPR ANALYSIS OF INTERMOLECULAR INTERACTIONS PERFORMED USING THE ORIGINAL BIACORE CM5 CHIP AND ITS ANALOG CMD500M

O.V. Gnedenko, P.V. Ershov, Y.V. Mezentsev, L.A. Kaluzhskiy, E.O. Yablokov, A.A. Gilep, A.S. Ivanov*

Institute of Biomedical Chemistry, 10/8 Pogodinskaya str., Moscow, 119121 Russia; *e-mail: gnedenko.oksana@gmail.com

Currently, users of Biacore SPR biosensors (“Cytiva”, USA) are faced with sanctions restrictions on the purchase of consumables (primarily optical chips) for this type of equipments. In this regard, the use of commercially available analogues of the optical chips has become relevant. In this work, a comparative study of molecular interactions was performed on a Biacore X100 SPR biosensor using an original Biacore CM5 optical chip (“Cytiva”, USA) and its analogue CMD500M (“XanTec bioanalytics GmbH”, Germany). Protein A was immobilized on both chips as a molecular ligand, often used in scientific research and biotechnological works to immobilize antibodies on various carriers (biosensor chips, sorbents, nano- and microparticles). An IgG antibody was used as a protein analyte. A comparative study of the interaction of various concentrations of antibodies with protein A immobilized on two versions of the chips was carried out. The values of the kinetic rate constants for the association (k_{on}) and dissociation (k_{off}) of complexes, as well as the equilibrium dissociation constant (K_d), were calculated from the obtained sensorgrams using the interaction model 1:1 (Langmuir) binding. The results of comparative measurements showed similar values of the rate constants and interaction affinities. The differences between the values of k_{on} , k_{off} and K_d were 18%, 10% and 9%, respectively. Thus, this study confirmed the interchangeability of the original SPR chips CM5 and their analogues CMD500M.

Key words: surface plasmon resonance (SPR); carboxymethylated dextran; antigen-antibody interaction; kinetic constants (k_{on} , k_{off}); equilibrium dissociation constant (K_d); CM5 chips and their analogues CMD500M

FUNDING

The work was carried out within the framework of the Program for Basic Research in the Russian Federation for a long-term period (2021–2030) (No. 122030100168-2).

Received: 23.04.2024, revised: 30.05.2024, accepted: 31.05.2024