

## Проблемы и способы иммобилизации в спектроскопии одиночных биомолекул

**Научный руководитель – Борщевский Валентин Иванович**

*Маслов И.В.<sup>1</sup>, Нурдина А.<sup>2</sup>, Борщевский В.И.<sup>3</sup>, Хорн П.А.<sup>4</sup>, Ильинский Н.С.<sup>5</sup>*

1 - Московский физико-технический институт, Москва, Россия, *E-mail: ivan.v.maslov@phystech.edu*; 2 - Московский физико-технический институт, Москва, Россия, *E-mail: nurdinova.an@phystech.edu*; 3 - Московский физико-технический институт, Москва, Россия, *E-mail: borshchevskiy@gmail.com*; 4 - Ярославский государственный технический университет, Ярославль, Россия, *E-mail: horn\_pa@mail.ru*; 5 - Московский физико-технический институт, Москва, Россия, *E-mail: ilinsky\_nick@mail.ru*

Флуоресцентная микроскопия одиночных молекул позволяет в реальном времени следить за конформационными переходами белков, выявлять устойчивые состояния в их конформационном пространстве и измерять кинетику переходов. Такие данные дают важную информацию о динамических свойствах белков, о том, как эти свойства влияют на функцию белка, и насколько они варьируются между молекулами в ансамбле.

В эксперименте, как правило, наблюдают либо свободно диффундирующие, либо иммобилизованные молекулы белков. Первый способ обеспечивает более нативное окружение белка, но сильно ограничивает возможное время наблюдения одиночной молекулы. Иммобилизация белков является, таким образом, важной задачей в биофизическом эксперименте.

В данной работе мы разработали протокол подготовки поверхности покровного стекла для иммобилизации биомолекул (на основе существующих [1-2]). Протокол включает химическую очистку и функционализацию покровного стекла пассивирующими слоями аминсилана и полиэтиленгликоля (PEG). Специфичная посадка целевых молекул обеспечивается взаимодействием белка стрептавидина с его нативным лигандом - биотином.

Чтобы протестировать разработанный протокол, мы провели измерения профиля получаемых поверхностей методом атомно-силовой микроскопии. Мы создали проточную камеру, позволяющую итеративно изменять концентрацию целевых молекул вблизи подложки, и с ее помощью изучили процесс иммобилизации стрептавидина. Мы показали, что связывание стрептавидина с подложкой специфично и требует присутствия на ней биотинилированного PEG. С помощью биотинилированного флуоресцентного красителя нам удалось показать, что иммобилизованный стрептавидин функционален и может специфически связывать биотинилированные молекулы, присутствующие в растворе.

Продолжая исследование возможностей разработанного протокола, мы провели пробные эксперименты по иммобилизации мембранных белков, встроенных в нанодиски, и оценили специфичность их посадки. Противоречивым образом, оказалось возможным осуществить иммобилизацию мембранных белков неспецифично, но в режиме одиночных молекул. В данной работе предложены стратегии увеличения специфичности иммобилизации мембранных белков.

Работа выполнена при поддержке Государственного Задания РФ 6.9909.2017/6.7.2017/6.7

### Источники и литература

- 1) Lamichhane R. et al. Single-molecule FRET of protein-nucleic acid and protein-protein complexes: Surface passivation and immobilization // *Methods*. 2010. Vol. 52, № 2. P. 192–200.
- 2) Chandradoss S.D. et al. Surface Passivation for Single-molecule Protein Studies // *J. Vis. Exp.* 2014.