

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА СИЛОВЫХ ХАРАКТЕРИСТИК ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ЛИПОПОЛИСАХАРИДА *Yersinia pseudotuberculosis* С АНТИТЕЛАМИ МЕТОДАМИ ОПТИЧЕСКОЙ ЛОВУШКИ И АТОМНО-СИЛОВОЙ МИКРОСКОПИИ

© 2024 г. А.А. Бывалов*, **, #, В.С. Белозёров*, **, И.В. Коньшев*, **, Б.А. Ананченко*

*Вятский государственный университет, Московская ул., 36, Киров, 610000, Россия

**Институт физиологии Коми научного центра УрО РАН,
Первомайская ул., 50, Сыктывкар, Республика Коми, 167982, Россия

#E-mail: byvalov@nextmail.ru

Поступила в редакцию 07.10.2023 г.

После доработки 30.11.2023 г.

Принята к публикации 24.01.2024 г.

С помощью оптического пинцета и атомно-силовой микроскопии проведена сравнительная оценка силы связи липополисахарида из культуры *Yersinia pseudotuberculosis* с моноклональными антителами. Обсуждаются особенности двух методов, определяющие существенные различия в значениях измеряемой силы разрыва связи между сенсibilизированным липополисахаридом зондом (полистирольной микросферой в случае оптического пинцета и иглой кантилевера из нитрида кремния в случае атомно-силовой микроскопии) и субстратом (стекло и слюда соответственно), покрытым моноклональными антителами. В случае атомно-силовой микроскопии игла кантилевера до момента останковки пьезостолика скользит по поверхности субстрата, вызывая изменение пространственной структуры сенситинов и, как следствие, перераспределение множественной связи между агрегатом липополисахарида и антителами. При использовании метода оптического пинцета существенного смещения микросферы по поверхности субстрата не происходит и, в отличие от атомно-силовой микроскопии, разрыв сложной связи между липополисахаридом и комплементарными антителами регистрируется в виде единственного и кратковременного (1–2 мс) скачка сигнала фотодетектора. Фиксируемые значения силы разрыва связи, измеряемой обоими методами, относительноны и варьируют в зависимости от выбранных условий проведения экспериментов. Показано, что неспецифическая составляющая силы разрыва связи, измеряемой методом атомно-силовой микроскопии, существенно выше по сравнению с таковой, определяемой методом оптического пинцета.

Ключевые слова: оптический пинцет, атомно-силовая микроскопия, липополисахарид, моноклональные антитела, сила связи.

DOI: 10.31857/S0006302924050031, EDN: MKTSLT

Применение различных методов для оценки характеристик одного и того же объекта исследования и сравнение полученных экспериментальных данных является, как правило, необходимым подходом для получения объективных результатов. В области нанобиологии известно много примеров не только количественного, но и качественного несоответствия данных, полученных при использовании даже достаточно близких друг другу и признаваемых вполне корректными мето-

дов. Для выявления причин таких расхождений, далеко не всегда очевидных и объяснимых, требуются специальные исследования.

В предшествующих работах методами оптического пинцета (ОП) [1] и атомно-силовой микроскопии (АСМ) [2] мы определили силовые характеристики взаимодействия в системе «антиген – антитело» на примере липополисахарида (ЛПС) из культуры *Yersinia pseudotuberculosis* и моноклональных антител (МКАт). Эти два метода наряду с другими биофизическими методами широко используются в биологических исследованиях. С их помощью на молекулярном и клеточном уровнях изучаются биомеханические процессы, механизмы взаимодействий объектов биотической

Сокращения: ОП – оптический пинцет, АСМ – атомно-силовая микроскопия, ЛПС – липополисахарид, МКАт – моноклональные антитела, NHS-PEG27-acetal – N-гидроксисукцинимид-полиэтиленгликоль27-ацеталь, NHS – N-гидроксисукцинимид.

Таблица 1. Условия экспериментов по определению силовых характеристик взаимодействия исследуемых объектов методами ОП и АСМ

Метод	Способ, скорость подведения пьезостолика	Расстояние, пройденное пьезостоликом при подведении от контакта до остановки, нм	Время контакта, с	Способ, скорость отведения пьезостолика, нм/с	Расстояние, пройденное пьезостоликом при отведении, мкм	Скорость нагружения, нН/с	Диаметр (материал) зонда	Способ сенсibilизации зонда ЛПС	Способ сенсibilизации подложки МКАт
ОП	Ступенчато, шаг 50 нм	100–150	1	Непрерывно, 140	4	0.039	1000 нм (полистирольная микросфера)	Физическая адсорбция	Хемосорбция на стекле [7]
АСМ	Непрерывно, 500 нм/с	100–150	1	Непрерывно, 500	1	37	~20 нм (игла кантилевера из нитрида кремния)	Хемосорбция через NHS-полиэтиленгликоль27-ацеталь [8]	Хемосорбция на слюде [7]

и абиотической природы и др. При характеристике отличительных особенностей двух методов, рассматриваемых в многочисленных публикациях, в том числе обзорного характера [3, 4], авторы определяют их достоинства, ограничения и различия в сферах применения. Вместе с тем, экспериментальных данных о применении этих методов для измерения сил взаимодействия в модельных системах с идентичными парами лиганд – рецептор, антиген – антитело и др. практически нет. Цель настоящей работы состояла в выявлении особенностей двух методов, определяющих существенные различия в значениях измеряемой силы разрыва связи между ЛПС, иммобилизованным на полистирольных микросферах (ОП) и на зонде кантилевера из нитрида кремния (АСМ), и моноклональными антителами, адсорбированными на стекле и слюде соответственно. Подобные исследования расширяют и углубляют знания о природе подобных взаимодействий.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Антиген (липополисахарид). Во всех проведенных экспериментах был использован препарат ЛПС одной и той же серии, выделенный из культуры *Y. pseudotuberculosis 1b*, выращенной при температуре 10°C, способствующей продукции О-боковых цепей [5].

Антитела. В работе использовали моноклональные антитела к О-боковым цепям ЛПС *Y. pseudotuberculosis 1b* (МКАт2) [6]. В качестве от-

рицательного контроля использовали моноклональные антитела к белковому эпитопу наружной мембраны, не взаимодействующие с ЛПС (МКАт7) [6].

Иммобилизация антител. Моноклональные антитела наносили на аминированные (3-аминопропил)триэтоксисиланом подложки (стекло для ОП и слюда для АСМ) одним и тем же способом хемосорбции с помощью 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимида и N-гидроксисукцинимидом (NHS) [7].

Сенсibilизация микросфер и кантилевера. Сенсibilизацию полистирольных микросфер диаметром 1 мкм препаратом ЛПС проводили методом физической адсорбции, сенсibilизацию кантилевера – методом хемосорбции с использованием NHS-полиэтиленгликоль27-ацетата [8].

Условия проведения экспериментов. Измерение сил оцениваемой связи осуществляли на установке NanoTracker™ (JPK Instruments AG, Германия) и атомно-силовом микроскопе Ntegra Prima (NT-MDT, Зеленоград, Россия) с применением измерительного вкладыша AU-028 для проведения эксперимента в жидкости при использовании зондов серии PNP-DB (NanoWorld, Швейцария), имеющих радиус закругления иглы ~10 нм и жесткость консоли ~0.06 нН/нм. Детали условий проведения экспериментов методами ОП и АСМ описаны в работах [1, 2], а также в табл. 1.

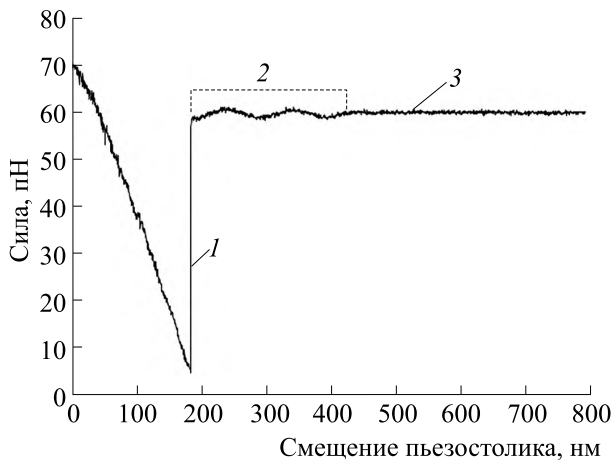


Рис. 1. Типичная силовая кривая отведения, описывающая взаимодействие ЛПС и МКАт2 методом оптического пинцета: 1 — отрыв, 2 — область проявления «тени», 3 — базисная линия.

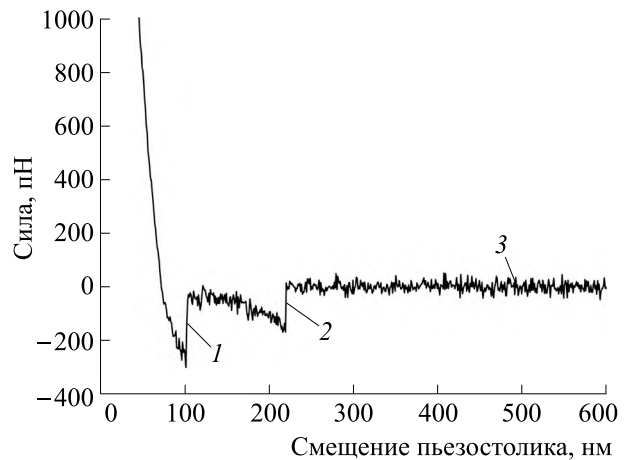


Рис. 2. Типичная силовая кривая отведения, описывающая взаимодействие ЛПС и МКАт2 методом АСМ: 1 — первый отрыв, 2 — последний отрыв, 3 — базисная линия.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для адекватного сравнения силы отрыва, определяемой двумя вышеназванными методами, применяли идентичные объекты исследования — антиген и антитела. Был использован препарат ЛПС одной и той же серии, выделенный из культуры *Y. pseudotuberculosis 1b*, которую выращивали при пониженной температуре (10°C), способствующей продукции О-боковых цепей [5]. Второй компонент исследуемой пары — моноклональные антитела к О-боковым цепям ЛПС *Y. pseudotuberculosis 1b* (МКАт2) — также был одинаков для обоих методов. В качестве отрицательного контроля использовали моноклональные антитела к белковому эпитопу наружной мембраны, не взаимодействующие с ЛПС (МКАт7) [6].

В результате проведенного ранее определения силовых характеристик взаимодействия препарата ЛПС *Y. pseudotuberculosis* с комплементарными и гетерологичными моноклональными антителами методами ОП [1] и АСМ [2] было сделано однозначное заключение о наличии специфической составляющей в сложной многокомпонентной связи. Очевидным было также участие в изучаемом обоими методами взаимодействии неспецифических сил, отличных от взаимодействия «антиген — специфическое антитело».

Как видно из табл. 1, основными различиями между сравниваемыми вариантами проведения измерений методами ОП и АСМ являются скорость нагружения (loading rate), материал и диаметр зондов, способ сенсibilизации зондов препаратом ЛПС. Очевидно, этими причинами объясняется получение результатов, отличающихся качественными и количественными характеристиками. Так, резко различается форма регистри-

руемых хронограмм сигнала фотодетекторов двух приборов. Типичные силовые кривые сигнала, полученные методами ОП и АСМ, представлены на рис. 1 и 2 соответственно.

В случае применения метода ОП отрыв микросферы от стеклянной подложки в подавляющем большинстве случаев фиксируется в виде единственного и практически одномоментного (продолжительностью не более 3 мс, как правило — 1–2 мс) скачка сигнала с выходом на базисную линию. Для системы «ЛПС-10 — МКАт2» время с момента пересечения базисной линии силовой кривой отведения (начала нагружения связи) до разрыва связи составляло в среднем 900 мс, за которые пьезостолик опускался на 120–150 нм.

При оценке методом АСМ силы связи в системе «ЛПС-10 — МКАт2» от начала нагружения связи до выхода силовой кривой на базисную линию при указанных выше условиях измерений проходит, в среднем, 200–300 мс. Регистрируемый сигнал имеет сложную форму и включает, как правило, более одного отрыва, программно выявляемого как однонаправленный относительно резкий подъем хронограммы сигнала до ближайшего изменения направления силовой кривой на противоположное. Длительность такого единичного отрыва составляла обычно 5–8 мс. Среднее число отрывов при выбранных нами условиях оценки шума было равным ~2.0.

Одним из возможных подходов к оценке обоими методами силы специфического взаимодействия «ЛПС — МКАт2» является определение силы разрыва связи, последней для АСМ и единственной, в подавляющем большинстве случаев, для ОП. Однако, как видно из данных табл. 2, абсолютные значения этого показателя не отражают действительную силу оцениваемого

Таблица 2. Сила связи ЛПС *Y. pseudotuberculosis* 1b с моноклональными антителами, измеренная методами ОП и АСМ

Сенситин стекла (ОП), слюды (АСМ)	Измеренная сила разрыва последней связи ($X_{\text{mean}} \pm 99\%CI$, нН)	
	ОП*	АСМ
МКАт2 (комплементарные ЛПС)	0.057 ± 0.012	0.240 ± 0.017
МКАт7 (гетерологичные)	0.035 ± 0.008	0.222 ± 0.017

Примечание. 95%CI – доверительный интервал для $p = 0.95$; * – Для большей наглядности сопоставления данных значения средней силы разрыва связи представлены с доверительным интервалом, а не стандартным отклонением, как в оригинальной работе [1].

специфического взаимодействия. Об этом свидетельствуют результаты определения двумя методами силы связи в системах «ЛПС – МКАт7», в которых нет специфического связывания.

По-видимому, относительно приемлемое представление о силе специфического взаимодействия могут дать значения разницы в силе разрываемой связи между системами на основе МКАт2 и МКАт7. Так, эти значения, полученные с помощью методов ОП и АСМ, оказались достаточно близкими и составили соответственно 22 и 18 пН (табл. 2). Однако едва ли и эти числа отражают реальную силу взаимодействия субъединицы ЛПС и молекулы МКАт2 хотя бы потому, что антитела [9] и тем более ЛПС [2, 10] могут присутствовать на поверхности сенсibiliзируемых субстратов в виде крупномолекулярных агрегатов. Регистрируемая сила указанной связи, измеренная для каждого из двух методов, может быть и выше и ниже приведенных в табл. 2 значений. Величина ее зависит от условий проведения эксперимента: особенностей свойств сенситинов, субстратов, методов функционализации, физико-химических характеристик среды, алгоритма измерений и обработки полученных результатов [11–13]. Вышеперечисленное определяет не только результирующую силу регистрируемых взаимодействий, но и взаимовлияние специфической и неспецифической составляющих сигнала хронограммы.

Совокупность представленных результатов позволяет предположить, что в модели оцениваемого двумя методами взаимодействия между комплементарными антителами и ЛПС на поверхности микросферы или иглы кантилевера формируются сложные множественные связи специфического и неспецифического характера. А наличие на хронограмме единичного скачка сигнала или малое количество регистрируемых отрывов может определяться тем, что разрыв первой связи вызывает перераспределение силы между оставшимися связями с резким повыше-

нием приложенной нагрузки и соответствующим сокращением длительности связей. Это приводит к быстрому разрыву оставшихся связей после разрыва первой, что объясняет регистрацию разрыва множественных связей как одно событие. Такое толкование экспериментальных данных предложено авторами работы [14] применительно к изучению методом АСМ взаимодействия частиц одного из риновирусов человека, иммобилизованных на игле кантилевера, с липопротеиновыми рецепторами плазматической мембраны на поверхности слюды. Несмотря на существенные различия между упомянутой модельной системой и использованной в настоящей работе, такое объяснение, по-видимому, применимо и для полученных нами данных, учитывая склонность ЛПС к агрегации и связанное с этим формирование множественных связей. Вполне вероятно, в большей мере это относится к результатам, полученным методом ОП, поскольку в данных экспериментах при каждом отведении мы регистрировали лишь один разрыв связи, длящийся 1–2 мс. При измерениях методом АСМ, как правило, фиксировали более одного разрыва связей, и каждый из них характеризовался большей длительностью по сравнению с методом ОП.

Следует отметить, что парциальный вклад неспецифических взаимодействий в суммарную картину сигнала хронограммы, в среднем, существенно превышает вклад специфических взаимодействий. Это наблюдение справедливо при оценке силы связи между ЛПС и МКАт2 как методом ОП [1], так и, в большей мере, методом АСМ [15]. По-видимому, регистрация собственно специфического отрыва этими методами практически невозможна, во всяком случае, для антигенов, склонных к агрегации. Тем не менее, минимизировать вклад неспецифической компоненты в оцениваемое взаимодействие можно, выбирая оптимальные для каждого конкретного эксперимента условия. Следует отметить, что при подведении «чистого» или сенсibiliзированного каким-либо антигеном зонда к поверхности

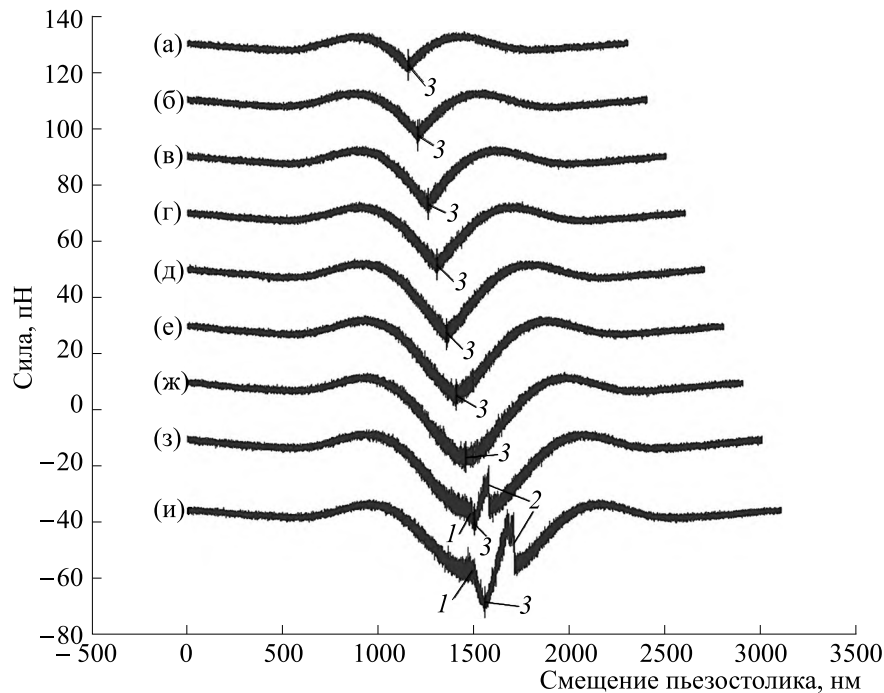


Рис. 3. Демонстрация эффекта «тени» на силовых кривых, полученных с использованием метода оптической ловушки: 1 — момент контакта двух несенсибилизированных полистирольных микросфер, 2 — разрыв связи, 3 — начало отведения. Объяснения в тексте.

субстрата неспецифический сигнал если и регистрируется методом АСМ до момента касания, то его выраженность минимальна [15]. Напротив, при использовании метода ОП подведение микросферы к исследуемому объекту достаточно большого размера вплоть до их соприкосновения сопровождается выраженным изменением сигнала фотодетектора. После разрыва связи, регистрируемого при отведении в виде скачка сигнала, визуализируется изменение сигнала в виде зеркального, симметричного относительно точки контакта микросферы и субстрата, отображения сигнала подведения-отведения. На рис. 1 эта зона сигнала отведения, зона эффекта «тени», помечена цифрой 2.

Более ярко и наглядно упомянутый выше эффект «тени» проявляется при приближении лазерной ловушки к объекту в горизонтальной плоскости. На рис. 3 приведены хронограммы сигнала подведения и отведения закрепленной на дне чашки микросферы диаметром 3 мкм к захваченной в ловушку микросфере диаметром 1 мкм с постоянной скоростью 100 нм/с. После каждого цикла подведения-отведения расстояние, пройденное пьезостоликом, увеличивали на 50 нм до контакта между микросферами (хронограммы (а)–(ж)) и после их взаимодействия в результате контакта (хронограммы (з), (и)). Как видно из данных рис. 3, выраженность феномена «тени»

растет при уменьшении расстояния между микросферами. Указанный эффект «тени» выявлен и теоретически обоснован в работе [16] при изучении методом ОП силы взаимодействия липополисахарида иерсиний с эукариотическими клетками. Степень его проявления зависит от размеров и показателя преломления взаимодействующих объектов; при их увеличении эффект «тени» усиливается. Однако, вклад этого неспецифического компонента в силу разрываемой связи, оцениваемую по амплитуде скачка сигнала, относительно невысок вследствие чрезвычайно низкой, фактически одномоментной длительности этого события. Помимо феномена «тени» основная неспецифическая составляющая взаимодействия, регистрируемого методом ОП, определяется, как и в методе АСМ, физико-химическими характеристиками сенситивов и материалов зонда (микросферы) и подложки, а также иными условиями проведения экспериментов.

Учитывая относительно невысокую по сравнению с ОП чувствительность АСМ, способной регистрировать силы разрываемой связи, как правило, превышающие 20 пН [17], область применения этих двух методов силовой спектроскопии может не совпадать. Они считаются взаимодополняемыми [18]. Вместе с тем оба метода применялись для оценки силы связывания в системах «антиген — антитело», причем сила такого

взаимодействия, оцениваемая методом АСМ, колеблется в пределах 50–900 пН, и разрыв такой связи происходит на расстоянии 25–300 нм, в том числе и за счет «растяжения» взаимодействующих молекул [19]. Сила разрываемой связи между микрообъектами, определяемая методом ОП, как правило, находится в пределах 0.1–100 пН [20]. Примеров сравнительной экспериментальной оценки двумя методами силы одного и того же межмолекулярного взаимодействия в литературе встречается мало. Так, приблизительно одинаковая (34–35 пН) сила связи между молекулами муцина Tn-PSM, проявляющего способность к агрегации, самосборке (self-associating mucin), достигалась при использовании различных значений скорости нагружения (loading rate) – 350 пН/с для ОП [21] и 640 пН/с для АСМ [22].

Оценивая силу связи в сравниваемых модельных системах – «сенсibilизированная ЛПС микросфера – МКАт на стекле» в случае ОП и «сенсibilизированный ЛПС кантилевер – МКАт на слюде» в случае АСМ, следует учитывать еще и другие особенности этих систем. Одна из них состоит в том, что площадь соприкосновения обоих сенситинов на твердых субстратах существенно различается. Так, даже если толщину слоя МКАт на поверхности того и другого субстрата принять равной ~5 нм [23] (по другим данным – 14.5 нм [24]), то площадь контакта «чистых», несенсibilизированных иглы кантилевера (радиус закругления ~10 нм) и микросферы (диаметр 1 мкм) с покрытыми МКАт субстратами по расчетам составляет 314 и 15700 нм² соответственно, если подведение столика завершилось соприкосновением минеральных поверхностей носителей сенситинов (слюды или стекла) с зондом (иглой кантилевера или микросферой). Вполне вероятно, что используемой мощности оптического пинцета недостаточно для преодоления слоя антител и непосредственного касания микросферы с минеральной подложкой. Однако площадь контакта иглы кантилевера со слоем антител на субстрате и при этом допущении должна быть явно меньше по сравнению с площадью контакта сенсibilизированной микросферы со слоем антител. В случае сенсibilизации зонда и микросфер препаратом ЛПС площадь соприкосновения функционализированных поверхностей в обоих случаях должна существенно увеличиться, о чем косвенно можно судить, например, по увеличению амплитуды и работы сил адгезии при атомно-силовом исследовании [15]. Несмотря на значительно большую площадь контакта между целевыми молекулами при измерениях методом ОП, регистрируемые методом АСМ значения си-

лы связи оказались существенно выше по сравнению с таковыми для ОП (табл. 2). Очевидно, основная причина такого расхождения состоит в различном удельном вкладе в оцениваемое взаимодействие, главным образом, неспецифической составляющей. Это считается одной из проблем практического применения АСМ в подобных исследованиях [3]. Вполне вероятно, указанное несовпадение результатов измерений объясняется использованием различной скорости нагружения связей, значимость которой в формировании интегрального сигнала фотодетектора выше по сравнению с влиянием площади контакта сенситинов и, по-видимому, другими факторами, определяющими отличительные особенности двух методов.

Существенное различие сравниваемых методов состоит также в способе механического контакта микросферы и иглы кантилевера с субстратами. В первом случае при подъеме пьезостолика и соответствующем выходе микросферы из фокуса лазерного луча после первичного соприкосновения не происходит ее смещения относительно поверхности функционализированного стекла. Напротив, вслед за первичным касанием функционализированной слюды иглой кантилевера последующее движение пьезостолика приводит к взаимному смещению/трению двух объектов. Так, согласно расчетам, при использованных нами условиях проведения измерений методом АСМ (тип кантилевера и угол его наклона, пройденное пьезостоликом расстояние от момента соприкосновения зонда с жестким субстратом до остановки) зонд «скользит» (скребет) по поверхности слюды, «проходя» около 24–36 нм. Едва ли это приводит к разрыву ковалентной связи «ЛПС – зонд» и «МКАт – слюда», поскольку полученные результаты свидетельствуют о наличии специфической связи между МКАт2 и ЛПС, определяемой методом АСМ (табл. 2). Однако пространственная структура молекул МКАт и особенно ЛПС, в большей мере склонного к агрегации, по названной причине может трансформироваться, приводя к изменению механизма и силы как специфического, так и неспецифического взаимодействия, которое можно было бы зарегистрировать в отсутствие «скольжения» зонда.

Значительное отличие сравниваемых вариантов анализа состоит в использовании нами в этих экспериментах физической, пассивной адгезии ЛПС на полистироловой микросфере для ОП и химической, ковалентной сшивки ЛПС с зондом из нитрида кремния для АСМ. Главным образом, именно такие методы иммобилизации целевых

биообъектов используются в аналогичных работах для двух сравниваемых методов. Целесообразность ковалентного связывания целевого антигена с материалом зонда кантилевера определяется в том числе и вышеуказанным «скреблением» зонда поверхности слюды после их соприкосновения, что при физической адсорбции сенситина может привести к разрыву его связи с материалом зонда и кардинальному изменению его свойств, приводящему, соответственно, к получению некорректных результатов. Ковалентное прикрепление обеспечивает надежную связь между биомолекулами и зондом, сила которой многократно превышает силу оцениваемой связи. Примером может служить исследование взаимодействия между химически связанным с зондом фибриногеном и стеклянной подложкой [25]. При измерении подобных взаимодействий методом ОП скорость нагружения, как правило, на 1–3 порядка ниже по сравнению с таковой в исследованиях методом АСМ. Наряду с другими факторами это делает необязательным ковалентное связывание антигена с поверхностью микросферы, так как для разрыва связи «антиген – антитело» требуются силы, как правило, не превышающие нескольких десятков пН и существенно меньшие по сравнению с силой связи сенситина с подложкой. Кроме того, физическая адсорбция, в отличие от химического связывания, не приводит к значительным изменениям нативной структуры сенситина.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Методы ОП и АСМ, используемые для силовой спектроскопии взаимодействий микрообъектов, объединяет, в первую очередь, применение лазерного луча, который используется для передачи на фотодетектор местоположения зонда, а применительно к ОП и для захвата и манипулирования микрообъектом. Вместе с тем, рассмотренные выше особенности методов ОП и АСМ обуславливают получение существенно различающихся значений измеряемой силы связывания, в нашем случае – липополисахарида *Y. pseudotuberculosis* с комплементарными моноклональными антителами. В отличие от метода АСМ, разрыв сложной связи между ЛПС и комплементарными антителами при использовании метода ОП регистрируется в виде единственного и кратковременного скачка сигнала фотодетектора. В случае АСМ в процессе подведения к кантилеверу пьезостоллика от момента касания до момента его остановки игла кантилевера скользит («скрежет») по поверхности субстрата, вызывая перераспре-

деление множественной связи между агломератом ЛПС и антителами; при использовании метода ОП существенного смещения микросферы по поверхности субстрата не происходит. Показано, что регистрируемые обоими методами силы связи являются величинами относительными и могут варьировать в широком диапазоне значений, в том числе в зависимости от условий и алгоритма осуществления экспериментов. При сравнении результатов, полученных двумя методами на выбранной модели, следует учитывать, что силы взаимодействия между компонентами системы включают специфическую и неспецифическую составляющие, соотношение которых для методов ОП и АСМ может быть различным. Тем не менее, при правильной оценке достоинств и ограничений, свойственных каждому из двух сравниваемых методов, они, безусловно, являются эффективными взаимодополняющими подходами и с успехом применяются для силовой спектроскопии взаимодействий нанобъектов биотической и абиотической природы.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов, связанных с изложенными в статье данными.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит описания собственных исследований с участием людей или животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Konyshov I., Byvalov A., Ananchenko B., Fakhrullin R., Danilushkina A., and Dudina L. Force interactions between *Yersinia* lipopolysaccharides and monoclonal antibodies: An optical tweezers study. *J. Biomech.*, **99**, 109504 (2020). DOI: 10.1016/j.jbiomech.2019.109504
2. Ananchenko B., Belozorov V., Byvalov A., Konyshov I., Korzhavina A., and Dudina L. Evaluation of intermolecular forces between lipopolysaccharides and monoclonal antibodies using atomic force microscopy. *Int. J. Biol. Macromol.*, **156**, 841–850 (2020). DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2020.04.055
3. Neuman K. C. and Nagy A. Single-molecule force spectroscopy: optical tweezers, magnetic tweezers and atomic force microscopy. *Nat. Methods*, **5** (6), 491–505 (2008). DOI: 10.1038/nmeth.1218
4. Zhang Q., Li S., Yang Y., Shan Y., and Wang H. Studying structure and functions of cell membranes by single molecule biophysical techniques. *Biophys. Rep.*, **7** (5), 384–398 (2021). DOI: 10.52601/bpr.2021.210018

5. Skurnik M. Molecular genetics, biochemistry and biological role of *Yersinia* lipopolysaccharide. *Adv. Exp. Med. Biol.*, **529**, 187–197 (2003).
6. Бывалов А. А., Кононенко В. Л. и Конышев И. В. Влияние О-боковых цепей липополисахарида на адгезивность *Yersinia pseudotuberculosis* к макрофагам J774, установленное методом оптической ловушки. *Прикл. биохимия и микробиология*, **53** (2), 234–243 (2017).
7. Vashist S. K., Lam E., Hrapovic S., Male K. B., and Luong J. H. Immobilization of antibodies and enzymes on 3-aminopropyltriethoxysilane-functionalized bioanalytical platforms for biosensors and diagnostics. *Chem. Rev.*, **114** (21), 11083–11130 (2014). DOI: 10.1021/cr5000943
8. Ebner A., Wildling L., and Gruber H. J. Functionalization of AFM tips and supports for molecular recognition force spectroscopy and recognition imaging. *Methods Mol. Biol.*, **1886**, 117–151 (2019). DOI: 10.1007/978-1-4939-8894-5_7
9. Gleńska-Olender J., Sęk S., Dworecki K., and Kaca W. A total internal reflection ellipsometry and atomic force microscopy study of interactions between *Proteus mirabilis* lipopolysaccharides and antibodies. *Eur. Biophys J.*, **44** (5), 301–307 (2015). DOI: 10.1007/s00249-015-1022-0
10. Rodríguez C. and Hardy E. Lipopolysaccharide aggregates in native agarose gels detected by reversible negative staining with imidazole and zinc salts. *Anal. Biochem.*, **485**, 72–80 (2015). DOI: 10.1016/j.ab.2015.06.020
11. Zhou Z. L., Tang B., Ngan A. H., Dong Z. N., and Wu Y. S. Hepatitis B surface antigen-antibody interactions studied by optical tweezers. *IET Nanobiotechnol.*, **6** (1), 9–15 (2012). DOI: 10.1049/iet-nbt.2010.0023
12. Witt H. and Janshoff A. Using force spectroscopy to probe coiled-coil assembly and membrane fusion. *Methods Mol. Biol.*, **1860**, 145–159 (2019). DOI: 10.1007/978-1-4939-8760-3_8
13. Dorobantu L. S. and Gray M. R. Application of atomic force microscopy in bacterial research. *Scanning*, **32** (2), 74–96 (2010). DOI: 10.1002/sca.20177
14. Rankl C., Kienberger F., Wildling L., Wruss J., Gruber H. J., Blaas D., and Hinterdorfer P. Multiple receptors involved in human rhinovirus attachment to live cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **105** (46), 17778–17783 (2008). DOI: 10.1073/pnas.0806451105
15. Бывалов А. А., Белозёров В. С., Ананченко Б. А. и Конышев И. В. Специфические и неспецифические взаимодействия липополисахарида *Yersinia pseudotuberculosis* с моноклональными антителами, охарактеризованные методом атомно-силовой микроскопии. *Биофизика*, **67** (6), 1056–1067 (2022). DOI: 10.31857/S0006302922050023
16. Бывалов А. А., Кононенко В. Л. и Конышев И. В. Исследование взаимодействия липополисахаридов *Yersinia pseudotuberculosis* и *Yersinia pestis* с мембраной макрофага J774 методом силовой спектроскопии с использованием оптического пинцета. *Биол. мембраны*, **35** (2), 115–130 (2018). DOI: 10.7868/S0233475518020032
17. Formosa-Dague C., Castelain M., Martin-Yken H., Dunker K., Dague E., and Sletmoen M. The role of glycans in bacterial adhesion to mucosal surfaces: how can single-molecule techniques advance our understanding? *Microorganisms*, **6** (2), 39 (2018). DOI: 10.3390/microorganisms6020039
18. Elmahdy M. M., Drechsler A., Gutsche C., Synytska A., Uhlmann P., Kremer F., and Stamm M. Forces between blank surfaces as measured by the colloidal probe technique and by optical tweezers—a comparison. *Langmuir*, **25** (22), 12894–12898 (2009). DOI: 10.1021/la901804a
19. Arnal L., Longo G., Stupar P., Castez M. F., Cattelan N., Salvarezza R. C., Yantorno O. M., Kasas S., and Vela M. E. Localization of adhesins on the surface of a pathogenic bacterial envelope through atomic force microscopy. *Nanoscale*, **7** (41), 17563–17572 (2015). DOI: 10.1039/c5nr04644k
20. Zhang H. and Liu K. K. Optical tweezers for single cells. *J. R. Soc. Interface*, **5** (24), 671–690 (2008). DOI: 10.1098/rsif.2008.0052
21. Haugstad K. E., Hadjilirezaei S., Stokke B. T., Brewer C. F., Gerken T. A., Burchell J., Picco G., and Sletmoen M. Interactions of mucins with the Tn or sialyl Tn cancer antigens including MUC1 are due to GalNAc-GalNAc interactions. *Glycobiology*, **26** (12), 1338–1350 (2016). DOI: 10.1093/glycob/cww065
22. Haugstad K. E., Gerken T. A., Stokke B. T., Dam T. K., Brewer C. F., and Sletmoen M. Enhanced self-association of mucins possessing the T and Tn carbohydrate cancer antigens at the single-molecule level. *Biomacromolecules*, **13** (5), 1400–1409 (2012). DOI: 10.1021/bm300135h
23. Chaves R. C., Teulon J. M., Odorico M., Parot P., Chen S. W., and Pellequer J. L. Conformational dynamics of individual antibodies using computational docking and AFM. *J. Mol. Recognit.*, **26** (11), 596–604 (2013). DOI: 10.1002/jmr.2310
24. Zhang Z., Orski S., Woys A. M., Yuan G., Zarraga I. E., Wagner N. J., and Liu Y. Adsorption of polysorbate 20 and proteins on hydrophobic polystyrene surfaces studied by neutron reflectometry. *Colloids Surf. B. Biointerfaces*, **168**, 94–102 (2018). DOI: 10.1016/j.colsurfb.2018.04.036
25. Tsapikouni T. S. and Missirlis Y. F. Measuring the force of single protein molecule detachment from surfaces with AFM. *Colloids Surf. B. Biointerfaces*, **75** (1), 252–259 (2010). DOI: 10.1016/j.colsurfb.2009.08.041

Comparative Evaluation of Interaction Force Characteristics for the Lipopolysaccharide of *Yersinia pseudotuberculosis* and Antibodies by Optical Trapping and Atomic Force Microscopy

A.A. Byvalov*, **, V.S. Belozеров*, **, I.V. Konyshchev*, **, and B.A. Ananchenko*

*Vyatka State University, Moskovskaya ul. 36, Kirov, 610000 Russia

**Institute of Physiology, Komi Science Centre of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Pervomaiskaya ul. 50, Syktyvkar, Komi Republic, 167982 Russia

Optical tweezers and atomic force microscopy were used for comparative evaluation of the interaction force between the lipopolysaccharide of *Yersinia pseudotuberculosis* and monoclonal antibodies. This paper discusses the peculiarities of two methods which allow determining significant differences in the values of the measured force required to rupture the interaction of probe sensitized by lipopolysaccharide (polystyrene microsphere for optical tweezers and silicon nitride cantilever for atomic force microscopy) with substrate (glass and mica, respectively) covered with monoclonal antibodies. In atomic force microscopy, the cantilever slides along the substrate for some time after the piezo stage is brought to a stop, causing changes in the spatial structure of sensitins and, therefore, redistribution of multiple bonds between the lipopolysaccharide agglomerate and antibodies. No significant displacement of the microsphere along the substrate occurs when an optical tweezers setup is used, and, unlike atomic force microscopy, the breaking of a complex bond between lipopolysaccharide and complementary antibodies is recorded in the form of a single and short-term (1–2 ms) leap of the photodetector signal employing optical tweezers. The recorded values of the force required to rupture the interaction measured by both methods are relative and vary depending on the chosen experimental conditions. It is shown that the non-specific component of the force needed to break the interaction measured by atomic force microscopy is significantly higher than that determined with optical tweezers.

Keywords: optical tweezers, atomic force microscopy, lipopolysaccharide, monoclonal antibodies, interaction force