

«Молекулярная диагностика детских инфекций методом атомно-силовой микроскопии»

Исполнитель: Биологический факультет Московского Государственного Университета им. М.В. Ломоносова, М.П. Кирпичников, К.В. Шайтан, Н.В. Малюченко, О.А. Венедиктова, К.Б. Терешкина

Несмотря на имеющиеся огромное разнообразие методов диагностики вирусных инфекций остается актуальной проблема быстрой и высокочувствительной диагностики. Целью данной работы является создание технологии высокоэффективной диагностики детских инфекций, основанных на использовании метода атомно-силовой микроскопии. В ходе выполнения проекта были проверены различные схемы проведения анализа и выбран наиболее оптимальный метод модификации подложки

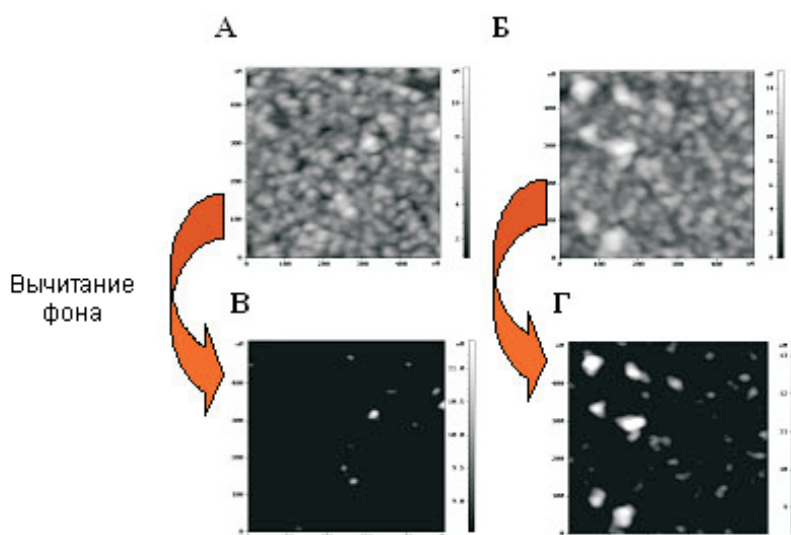
специфичными антителами, разработаны процедуры удаления неспецифически связавшихся белков, выравнивания слоев на подложке, подсчета вирусных частиц. Проведен сравнительный анализ морфологии вирусных частиц паротита, кори и др., сорбированных на немодифицированные и модифицированные подложки.

Результаты количественного анализа вирусосодержащих препаратов, проведенный с помощью АСМ, сравнивали с данными количественного ПЦР реального времени. Методом АСМ было показано, что количество вирусных частиц в 1 мл вакцины составляет $2,8 \cdot 10^7$, методом ПЦР в реальном времени было показано, что количество вирусных частиц $2,34 \cdot 10^7$. Таким образом, авторами был предложен метод использования атомно-силовой микроскопии для диагностики вирусных заболеваний. По результатам работ было опубликовано 3 статьи в различных отечественных изданиях и подана 1 заявка на патент.

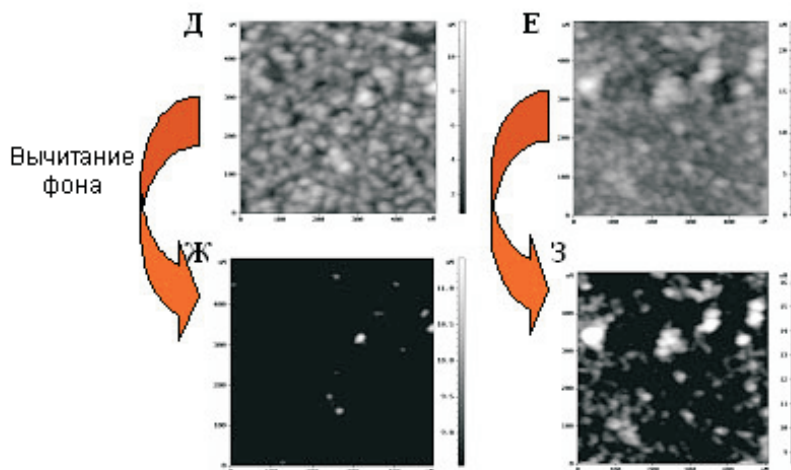
Atomic microscopy test system was developed for detection of viral particles. A specificity and efficiency of the test system was verified. In the course of work different schemes of analyses were tried and the most optimal modification methods of mica was chose. Procedures of removal of unspecific proteins, of smoothing layers on mica, and of calculation of viral particles were developed. Morphology of viruses sorbed by different manners was compared.

АСМ-топография (500x500 нм²) взаимодействия иммуноглобулинов человека IgG (А-Г) и IgM (Д-З) с иммобилизованными лигандами: с контрольными антителами (слева) и со специфичными антителами (справа)

Взаимодействие с IgG



Взаимодействие с IgM



Quantitative analysis of different virus samples was conducted by atomic force microscopy and by real-time PCR. It was shown by AFM that 1 ml of vaccines contains $2,8 \cdot 10^7$ particles whereas by real time PCR $2,34 \cdot 10^7$.

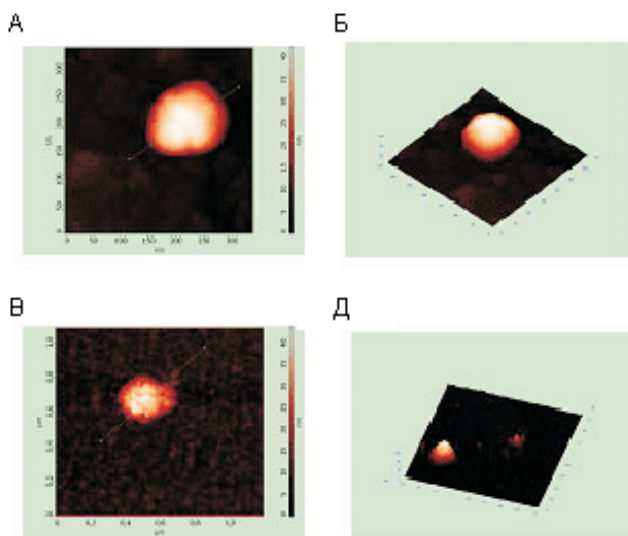
Целью данной работы является создание технологии высокоэффективной диагностики детских инфекций, основанных на использовании метода атомно-силовой микроскопии.

Несмотря на имеющиеся огромное разнообразие методов диагностики вирусных инфекций остается актуальной проблема быстрой и высокочувствительной диагностики. Атомно-силовая микроскопия (АСМ) представляет собой современный инструмент для проведения исследований в различных областях физики, химии, биологии, медицины [1—2]. Особенность метода АСМ состоит в сканировании поверхностей различного происхождения с помощью сверхчувствительного зонда — микроминиатюрной упругой пластинки, на свободном конце которой располагается острое из твердого материала (нитрида кремния, кремния). При перемещении зонда вдоль поверхности отклонения кантилевера регистрируется специальной системой детекции. Атомно-силовой микроскоп позволяет измерять не только профиль поверхности, но и локальные силы трения, величину адгезии, упругие и вязкие свойства поверхности с субнанометровым пространственным разрешением [3]. Приготовление препаратов для исследований с помощью атомно-силовой микроскопии позволяют избежать жесткой фиксации образцов и методов обработки солями тяжелых металлов, которые

традиционно применяются в рентгеноструктурном анализе и в электронной микроскопии. Подобные процедуры зачастую не соответствуют природным условиям, в которых макромолекулы проявляют свою биологическую активность. Высокое разрешение порядка нескольких нанометров, относительно небольшое время — минуты, которое требуется для сканирования, а также отсутствие необходимости фиксировать образец и вводить метки делают АСМ одним из удобных инструментов исследований в биологии. Разработка методов структурирования подложки и адресной пришивки большого числа разнообразных молекул создают предпосылки для создания диагностических чипов на основе АСМ, позволяющих анализировать одновременно десятки и сотни различных инфекций [4]. Таким образом, благодаря своим достоинствам, атомно-силовая микроскопия может занять лидирующее место в сфере разработки диагностик для детекции инфекционных заболеваний.

Частицы, наблюдаемые на образце с вирусной вакциной при нанесении её на модифицированную антителами слюду.

А, В - Двумерные изображения частиц.
Б, Г - Трехмерные изображения частиц.



В начале создания диагностического метода на основе атомно-силовой микроскопии были сформулированы следующие задачи: 1) выбрать из множества режимов АСМ оптимально подходящий для диагностики вирусных инфекций 2) определить разрешающую способность прибора, 3) подобрать метод приготовления и модификации подложек. В качестве основного метода анализа был выбран «полуконтактный» («прерывисто-контактный») метод атомно-силовой микроскопии [5-6]. Полуконтактный режим обладает определенными преимуществами по сравнению контактными методами. Прежде всего, при использовании этого метода давление кантилевера на поверхность образца существенно меньше, что позволяет работать с более мягкими и легко разрушающимися материалами, такими, как полимеры и биоматериалы. Полуконтактный метод также более чувствителен к различным взаимодействиям с поверхностью, что дает возможность ряд характеристик поверхности – распределение вязкости и упругости, электрических и магнитных доменов.

Анализ возможности разрешать пространственную структуру белков проводили используя «линейку» белков различных молекулярных масс. Подобная чувствительность позволяет анализировать размеры и детали строения молекул и молекулярных комплексов, размеры которых превышают 60 кДа. В качестве прототипа диагностического метода был взят анализ комплексов Антиген-Антитело. В начале работы над детекцией комплексов были предприняты попытки отличить иммунные комплексы от свободных антител и антигенов по морфологии и геометрическим параметрам. Однако трудоемкость данной процедуры и неоднозначность в интерпретации результатов способствовала поиску дополнительных, более простых критериев для выявления комплексов. Таким критерием стала оценка изменения высоты слоя нанесенных белков. Для того чтобы вносимые вторые компоненты комплекса можно было детектировать по изменению высоты, необходимо формирование гладкого монослоя из первого лиганда. Для этого была разработана система для анализа связывания АГ-АТ в условиях, когда один из компонентов комплекса ковалентно иммобилизован. Упрощенная система с антигеном небольшой молекулярной массы, имеющего только один сайт связывания для вносимых антител, позволила отработать алгоритм вычитания фоновых значений и выявления специфических взаимодействий. С помощью иммуноферментного анализа, проведенного на подложке, была доказана доступность и сохранность эпитопов ковалентно пришитого антигена. Продолжением работы стала детекция комплексов с человеческими иммуноглобулинами IgG и IgM, имеющими клиническое значение. Особенностью взаимодействия антиген-антитело в данной системе была вероятность бивалентного связывания и образования более сложных белковых комплексов. При определении вирусных инфекций показатель присутствия в сыворотке иммуноглобулинов IgG и IgM является не только диагностическим (наличие инфекции), но и прогностическим (состояние иммунного ответа) параметром. С помощью атомно-силовой микроскопии существует возможность дифференциального определения IgG и IgM. Было показано, что образующиеся комплексы антиген-IgG и антиген-IgM имеют различную форму, характерную для каждого из данных изотипов иммуноглобулинов.

Также в ходе работы было продемонстрировано возможность применения атомно-силовой микроскопии количественной оценки образующихся комплексов. Детекция специфических антител или антигенов в биологических образцах, таких как слюна, сыворотка, моча и др. больных является основой методов диагностики различных заболеваний. Сыворотка крови представляет собой многокомпонентную систему, в которой содержание исследуемых объектов может быть чрезвычайно низко. Была определена возможность детекции специфических комплексов методом атомно-силовой микроскопии в сыворотке в достаточно низкой концентрации 0,5 мкг/мл.

Следующий этап работ был связан с визуализацией вирусов, вызывающие детские заболевания методами АСМ. В качестве источника вирусных частиц использовали вакцины, широко применяемые в нашей стране для профилактики детских вирусных заболеваний. При инкубации на немодифицированную подложку происходит сорбция вирусных частиц и вирусных фрагментов за счет ряда взаимодействий между белковым материалом вируса и гидрофильной, слабозаряженной поверхностью слюды. Было показано, что по составу паротитная вакцина представляет собой гетерогенную смесь частиц различной формы и размеров. Разная степень гетерогенности вирусного материала вероятно отражает степень разрушения частиц. Концентрация вирусных частиц в вакцине и в исследуемых биологических материалах мала, поэтому требовалось подобрать оптимальный метод сорбции вирусных частиц для детекции, визуализации и количественного учёта вирусных частиц с использованием метода АСМ. Подбирали оптимальное время инкубации образцов - от 5 мин до 12 часов. Были проведены эксперименты на различных видах подложек, используемых для АСМ: на чистой слюде, слюде, модифицированной АPTES, полилизинном и фетуином, кремнии, высокоориентированном пиролитическом графите, пластике. Для модификации также применяли метод ковалентной пришивки и протокол сорбции нуклеиновых кислот. Проведены эксперименты по получению аффинных подложек с применением специфических антител против вирусов. Дальнейшие исследования проводили, используя аффинные сорбенты, представленные специфическими антителами. Нанесение специфичного аффинного слоя проводили послойно в два этапа: вносили нижние - козы поликлональные антивидовые антитела против иммуноглобулинов кролика (АК) и затем, верхние - кроличьи поликлональные антипаротитные антитела.

Снижение шероховатости образуемого слоя добивались с помощью процедур подбора оптимальных концентраций и отмывок вносимых антител. После формирования гладкого и плотного монослоя вносили образцы паротитных вакцин и наблюдали появление частиц круглой или овальной формы диаметром около 200 нм, высотой около 40-45 нм, отсутствующие на контрольных образцах.

Был разработан алгоритм количественного подсчета вирусных частиц АСМ, который заключается в следующем. Капля с вирусными фрагментами (4мкл) и фрагмент калибровочной сетки снимали при помощи цифровой фотокамеры специальной оптической приставки к атомно-силовому микроскопу (рисунок 3 А,Б).

Далее с помощью программы Adobe Photoshop была определена площадь нанесённой капли. Сначала на снимке были выделены 12 ячеек калибровочной сетки, которые соответствуют площади 12 мм², и определено количество пикселей, соответствующее данной площади. Затем была выделена капля и также определено количество пикселей, соответствующее площади капли (рисунок 3В,Г). Площадь капли в мм² получается путём пересчёта из количества пикселей с использованием калибровки. Она составила 11,14 мм². В среднем на площадь 500 мкм² (5 сканов) наблюдается 5 вирусных частиц, т.е. 1 частица на 100 мкм². На площадь капли, составившую 11,14 мм² ($=11,14 \cdot 106 \text{ мкм}^2$), приходится, таким образом, $11,14 \cdot 106 / 100 = 11,14 \cdot 104$ частиц. Если принять предположение, что на слюду сорбировались все частицы из раствора, то в объёме капли, равном 4 мкл, содержится $11,14 \cdot 104$ частиц. Тогда количество вирусных частиц в 1 мл вакцины составляет $11,14 \cdot 104 \cdot 250 = 2,8 \cdot 10^7$. Количественный анализ вирусосодержащих препаратов, проведенный с помощью АСМ, проверяли другим независимым количественным методом - ПЦР в реальном времени. Было получены сопоставимые данные. Методом ПЦР в реальном времени было показано, что количество вирусных частиц в 1 мл вакцины $2,34 \cdot 10^7$.

Таким образом, авторами был предложен метод использования атомно-силовой микроскопии для диагностики вирусных заболеваний. Проведена оценка чувствительности, эффективности, селективности предложенной тест-системы.

По результатам работ было опубликовано 3 статьи в различных отечественных изданиях и подана заявка на патент «Способ оценки качества вакцин» (№ 2005133587 от 01.11.2005)

Список цитируемой литературы:

1. Cidade G.A., Costa L.T., Weissmuller G., da Silva Neto A.J., Roberty N.C., de Moraes M.B., Prazeres G.M., Hill C.E., Ribeiro S.J., de Souza G.G., Teixeira L., Moncores M, Bisch P.M // Artif. Organs. 2003. V. 27. P. 447-451.
2. Fotiadis D., Liang Y., Filipek S., Saperstein D.A., Engel A., Palczewski K.// Nature. 2003 V. 421. P. 127-128.
3. В.Л. Миронов «Основы сканирующей зондовой микроскопии», изд Техносфера, 2005
4. Nettikadan SR, Johnson JC, Mosher C, Henderson E. //Biochem Biophys Res Commun. 2003 V. 311 P. 540-545
5. Morris V.J., Kirby A.R., Gunning A.P. //Atomic force microscopy for biologists/ Imperial College Press, London, 2001. p.208
6. Paulo S.A., Garcia R.// Biophys. J. 2000. V. 78. P. 1599-1605

© Электронное издание «Наука и технологии России».

Свидетельство о регистрации средства массовой информации Эл №ФС77-29914 от 12 октября 2007 года.

При использовании размещенных на сайте материалов ссылка на источник обязательна.

Редакция: +7(495)930-87-07; infostrf.ru