

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

УДК 57.088.1

©Коллектив авторов

НОВЫЙ МЕТОД КОЛИЧЕСТВЕННОЙ ОЦЕНКИ ВИРУСНЫХ ЧАСТИЦ

А.С. Шебанова^{1}, М.Н. Савватеев², Н.В. Малюченко¹, Д.Ю. Трофимов³,
И.И. Агапов^{1,4}*

¹Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, биологический факультет, Ленинские горы, д.1. стр.12, 119992, Москва, факс: (495) 939 57 38; эл. почта: n_shebanova@mail.ru

²“NT-MDT”, НИИ Физических Проблем, Москва, Зеленоград

³“НПФ ДНК-Технология”, Москва

⁴Научно-исследовательский институт трансплантологии и искусственных органов, Москва

Методом атомно-силовой микроскопии детектированы и визуализированы вирусные частицы живой паротитной вакцины, широко применяемой для вакцинации в России. Для количественной оценки наблюдаемых вирусных частиц разработан специальный метод. Наличие в вакцине белковых компонентов вируса проверено с помощью ИФА и дот-блот анализа. С использованием количественной ПЦР в реальном времени оценена концентрация вирусной РНК в вакцине. Результаты количественной оценки, полученные методом ПЦР в реальном времени, согласуются с данными атомно-силовой микроскопии.

Ключевые слова: атомно-силовая микроскопия, живая паротитная вакцина, вирусные частицы, ПЦР в реальном времени.

Принятые сокращения: АСМ – атомно-силовая микроскопия, ИФА – иммуноферментный анализ, ОТ – обратная транскрипция, ПЦР – полимеразная цепная реакция.

* - адресат для переписки

ВВЕДЕНИЕ. Метод атомно-силовой микроскопии (АСМ) находит всё более широкое применение в области биохимических и молекулярно-биологических исследований, т.к. позволяет за короткие промежутки времени без необходимости физико-химических воздействий на исследуемый материал визуализировать макромолекулы с нанометровым разрешением и получать информацию об их взаимодействии [1-3].

АСМ успешно применяется для изучения вирусных частиц. К настоящему моменту проведены АСМ-исследования как целых частиц, так и составляющих их белков и нуклеопротеинов [4-9]. Одним из перспективных медико-диагностических направлений является использование АСМ для диагностики различных вирусных инфекций [10]. Trindade и соавт. был разработан метод АСМ-диагностики оспы [11]. Nettikadan и соавт. был предложен метод создания мини-чипов с нанесёнными специфическими антивирусными антителами для детекции и распознавания вирусных частиц в исследуемых жидкостях [12, 13].

Важным преимуществом метода АСМ является возможность количественного учёта наблюдаемых вирусных частиц. С использованием различных алгоритмов подсчёта можно оценить концентрацию цельных сформированных вирионов в исследуемой вируссодержащей жидкости. Такая количественная оценка инфекционного агента в образцах занимает от получаса до нескольких часов, в то время как традиционные методы, основанные на цитотоксическом действии, например, титрование методом негативных колоний, являются гораздо более трудоёмкими и занимают несколько дней.

В настоящее время одним из широко применяемых методов для диагностики и количественного учёта копий вирусных нуклеиновых кислот (НК) в клинических образцах и вирусных вакцинах является метод ПЦР с детекцией в реальном времени. Преимуществами данного метода по сравнению с обычной ПЦР являются более высокая скорость и чувствительность анализа, возможность количественного учёта вирусных НК, меньший риск контаминации, возможность проведения множественных ПЦР в одной пробирке. Kubag разработана методика детекции и количественной оценки РНК вируса паротита при помощи количественной ПЦР в реальном времени с использованием зондов TaqMan, показана специфичность и высокая чувствительность – несколько копий НК на реакционную смесь объёмом 25 мкл - анализа, а также корреляция полученных результатов с данными титрования методом негативных колоний [14]. Применение ПЦР в реальном времени для детекции и количественной оценки РНК вируса паротита в клинических образцах и сравнение его с другими диагностическими методами описаны Uchida и соавт. [15] и Krause и соавт. [16]. Однако данным методом можно получить информацию только о генетической компоненте возбудителя.

Для проверки наличия в образцах белковых компонентов вируса наиболее часто применяются различные системы ИФА и иммуноблотинга, являющиеся нетрудоёмкими и экономически выгодными, но использование данных методов не даёт количественной оценки содержания инфекционного агента.

В настоящей работе с помощью метода АСМ проведены детекция и визуализация частиц живой паротитной вакцины, широко применяемой для вакцинации населения в России. Для количественного учёта вирусного материала в вакцине использован как метод АСМ, так и количественная ПЦР в реальном времени. Для подсчёта вирусных частиц, наблюдаемых с помощью метода АСМ, использован специально разработанный метод, дана количественная оценка их концентрации в вакцине. В работе сравнили данные, полученные с помощью АСМ, и данные ПЦР в реальном времени, позволившей определить количество копий вирусной РНК в вакцине.

МЕТОДИКА.

Материалы и реактивы. В работе использовали живую паротитную вакцину на основе штамма Л-3 серии №0379-0905 и кроличью поликлональную

антипаротитную сыворотку, любезно предоставленные Л.Л. Сухановой, (“НПО Микроген”, Россия). В качестве контроля использовали среду инкубации вирусов (“НПО Микроген”). Антивидовые поликлональные антитела козы против иммуноглобулинов кролика и их конъюгат с пероксидазой хрена были приобретены в фирме “ИМТЕК” (Россия). Вискумин и антивискуминовая кроличья сыворотка получены ранее [17, 18]. Для выделения вирусной РНК, проведения реакции обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции с режимом детекции в реальном времени был использован набор реагентов “Количественный” фирмы “НПФ ДНК-Технология” (Россия). Все остальные реактивы производства фирмы “Sigma-Aldrich” (США).

ПЦР с детекцией в режиме реального времени. Для детекции вируса паротита использовали праймеры, амплифицирующие фрагмент гена фосфопротеина “Р” длиной 232 пар нуклеотидов (п.н.) и олигонуклеотидный зонд, меченный флуоресцентным красителем FAM и гасителем флуоресценции BHQ1.

Выделение РНК из вакцины проводили согласно протоколу, предложенному фирмой-разработчиком. Осадок РНК, полученный из 100 мкл вакцины, растворяли в 16,5 мкл буфера для растворения. Данный объем выделенной РНК использовали для постановки реакции обратной транскрипции. Общий объем реакционной смеси составил 20 мкл. Все отрицательные контрольные образцы и образцы-стандарты были проведены через те же стадии пробоподготовки и реакцию обратной транскрипции, что и исследуемые образцы. В качестве стандартов использовались образцы РНК-вируса HCV с известной копийностью вирусной РНК (образец 1 – 1 млн копий/мл, образец 2 – 3000 копий/мл), предложенные фирмой-разработчиком. Для проведения реакции обратной транскрипции использовали разработанные праймеры ОТ-паротит.

Из полученного препарата кДНК вируса паротита готовили несколько разведений, каждое в двух повторностях: исходный образец развели в 10, 100, 1000, 10000, 100000 раз. ПЦР проводилась с применением методики горячего старта. В реакционную смесь добавляли по 5 мкл препарата кДНК образцов, стандарта или отрицательного контрольного образца. Общий объем реакционной смеси составлял 35 мкл.

Для проведения реакции с детекцией в реальном времени использовали детектирующий амплификатор ДТ-322 (“НПФ ДНК-Технология”, Россия). Программа ПЦР-амплификации включала нагрев реакционной смеси в течение 2 мин при температуре 80°C, стадию первичной денатурации ДНК при 94°C, 50 циклов, включающих 10 с денатурацию ДНК при 94°C и 20 с стадию отжига праймеров и элонгации цепи при 64°C. Учет и интерпретация результатов реакции осуществлялась автоматически при помощи программного обеспечения к прибору.

ИФА. В лунки двух иммунологических планшетов Costar (“Coming Ink.”, США) наносили по 100 мкл вакцины и инкубировали в течение 1,5 ч. Свободные места связывания блокировали 0,1% раствором БСА в фосфатно-солевом буфере с добавлением 0,05% твин-20 по 100 мкл в лунку в течение 1 ч. Затем один планшет инкубировали с кроличьей антипаротитной сывороткой, второй с неспецифической (антивискуминовой) кроличьей сывороткой, взятых в различных разведениях 0,1% раствором БСА в фосфатно-солевом буфере с добавлением 0,05% твин-20, по 100 мкл в лунку в течение 1 ч. Далее следовала инкубация обоих планшетов с вторичными антителами козы к иммуноглобулинам кролика, конъюгированными с пероксидазой. Все инкубации проводили в термостате при температуре 37°C. После каждой инкубации лунки трижды отмывали фосфатно-солевым буфером, содержащим 0,05% твин-20, по 200 мкл в лунку. Для проявления использовали 15-ти минутную инкубацию с цитрат-фосфатным буфером, содержащим 0,5 мг/мл о-фенилендиамин и 0,05% H₂O₂. Реакцию останавливали концентрированной серной кислотой и детектировали сигнал на вертикальном спектрофотометре Multiscan (“Labsystems”, Финляндия) при длине волны 492 нм.

Дот-блот анализ. Образцы сорбировали на две нитроцеллюлозные мембраны ("Shleicher & Schuell", Германия). Мембраны выдерживали в растворе 3% сухого молока в фосфатно-солевом буфере, содержащем 0,05% твин-20 в течение часа, затем одну из них инкубировали с антипаротитной сывороткой (1:1000), вторую с антивискуминовой (1:1000), после чего обе мембраны обрабатывали конъюгатом антикроличьих антител с пероксидазой. После каждой инкубации мембраны три раза отмывали фосфатно-солевым буфером, содержащим 0,05% твин-20. Все инкубации проводили в термостате при температуре 37°C. Мембраны проявляли с помощью набора для хемолюминесцентной детекции сигнала производства фирмы "Amersham" (Великобритания). Сигнал детектировали на фотоплёнке "Kodak" (США) с помощью фотокассеты. Для проявления фотоплёнки использовали набор фотореагентов производства "Kodak".

Атомно-силовая микроскопия. На первом этапе исследования проводили тестирование различных АСМ-подложек и подбор оптимальных условий для сорбции на них частиц вакцины. На подготовленную подложку наносили 10 мкл вакцины и инкубировали от 5 мин до 12 часов. Далее следовали две пятиминутные отмывки образца деионизованной водой и сушка сжатым воздухом.

Сканирование проводили в полуконтактном режиме на воздухе при комнатной температуре на приборе Solver P 47 с использованием кремниевых кантилеверов NSG01S, радиус кривизны острия ≈ 10 нм ("NT-MDT", Россия). Начальная и рабочая амплитуда сканирования были экспериментально подобраны ранее [19]. Обработку АСМ-изображений проводили с помощью программного обеспечения Nova для зондовых микроскопов NT-MDT. Скорость сканирования составляла 1 Гц.

Следующим этапом работы стала разработка метода сорбции частиц вакцины на слюду, модифицированную специфичными иммуноглобулинами. На подложке формировали монослой антител козы, специфичных к иммуноглобулинам кролика. Для этого на свежесколотой слюде инкубировали 10 мкл антител в течение 3 мин, далее образец отмывали 0,05% твин-20 для снижения неспецифической сорбции, два раза по 5 мин в деионизованной воде, высушивали, проводили АСМ-измерение и при помощи программного обеспечения к прибору оценивали высоту полученного слоя. Концентрацию антител варьировали от 1 до 20 мкг/мл, добиваясь создания ровного монослоя на подложке. На полученном монослое формировали второй, специфичный слой. IgG, выделенные высаливанием 40% сульфатом аммония из антипаротитной сыворотки, разводили 1:100 фосфатно-солевым буфером с 0,05% твин-20 и инкубировали с полученным монослоем в течение 20 мин во влажной камере. Затем образец отмывали 0,05% твин-20 для снижения неспецифических взаимодействий, два раза деионизованной водой, высушивали и проводили АСМ-измерение. За критерий образования второго слоя принимали увеличение высоты образца. На модифицированную таким образом подложку наносили каплю вакцины объёмом 4 мкл, инкубировали в течение 20 мин во влажной камере, два раза отмывали деионизованной водой, высушивали и проводили АСМ-измерение. Отмывку в твин-20 не проводили, т.к. детергент мог нарушить целостность вирионов в вакцине. Все препараты антител и сыворотку перед использованием для приготовления АСМ-образцов центрифугировали в течение 20 мин на скорости 13000 об/мин на лабораторной центрифуге Eppendorf 5810R (Германия).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.

В процессе ПЦР-амплификации детектировали флуоресцентный сигнал от образцов-стандартов, исследуемых образцов вакцины и их разведений в 10, 100, 1000 и 10000 раз. При разведении более чем в 10000 раз сигнал не наблюдался. С использованием калибровочной кривой образцов-стандартов были оценены концентрации вирусной РНК в исследуемых образцах. Данный расчёт был произведён без учёта поправок на различные эффективности амплификации исследуемого образца и образца-стандарта, а также эффективностей реакций

обратной транскрипции и пробоподготовки, поэтому требовал дальнейшей доработки. С учётом данных поправок концентрацию вирусной РНК в образце можно оценить по формуле 1.

$$N = \frac{N_0 \times \left(\frac{E_{\text{стандарт}}}{E_{\text{образец}}} \right)^n}{E_{\text{ОТ}} \times E_{\text{пробоподготовки}}} \quad (1),$$

где N_0 - концентрация вирусной РНК, рассчитанная прибором, $E_{\text{стандарт}}$ и $E_{\text{образец}}$ - эффективности амплификации стандарта и исследуемого образца, $E_{\text{ОТ}}$ - эффективность реакции обратной транскрипции, $E_{\text{пробоподготовки}}$ - эффективность пробоподготовки.

Для расчёта эффективности амплификации НК для вируса НСV рассмотрели зависимость логарифма концентрации копий НК, рассчитанной с помощью программного обеспечения к прибору, от количества циклов ПЦР, при котором сигнал достигает заданной величины относительно фонового (C_t), и получили, что она составила 1,95.

Для расчёта эффективности амплификации НК для образцов вируса паротита также использовали зависимость логарифма концентрации копий НК от количества циклов ПЦР; поскольку концентрации копий НК в образцах неизвестны, они были взяты произвольно. Решающее значение в данном случае имело то, что взятые концентрации соответствовали приготовленным десятикратным разведениям НК вируса паротита, т.е. каждая последующая была в 10 раз меньше предыдущей. Эффективность амплификации вируса паротита составила 1,87.

Ранее было показано, что коэффициенты эффективности пробоподготовки и проведение реакции обратной транскрипции с использованием данного метода составляют 0,8 [20]. Таким образом, рассчитанная концентрация вирусной РНК в вакцине составила $2,34 \times 10^7$ копий/мл вакцины.

Результаты, полученные методом ПЦР в реальном времени, свидетельствуют не только о наличии генетической компоненты возбудителя, но также позволяют дать количественную оценку вирусной РНК в вакцине. Однако по ним нельзя судить о наличии белковых компонентов вируса, от которых в большей степени зависит развитие иммунного ответа организма вакцинируемого, и цельных сформированных вирионов, способных к размножению.

Для проверки наличия белковых компонентов вируса в вакцине использовали методы дот-блот анализа и ИФА.

При использовании метода ИФА регистрировали сигнал от лунок с вакциной, проинкубированных с антипаротитной сывороткой, ослабевающий с увеличением разведения сыворотки. Сигнал от лунок с вакциной, проинкубированных с антивискуминовой сывороткой, держался на уровне фонового значения (рис. 1а).

При проявлении блотов регистрировали сигнал в виде отчётливых пятен на фотоплёнке от образцов вакцины на мембране, проинкубированной со специфической антипаротитной сывороткой (рис. 1б). На мембране, проинкубированной с антивискуминовой сывороткой, соответствующие точки не детектируются (рис. 1в).

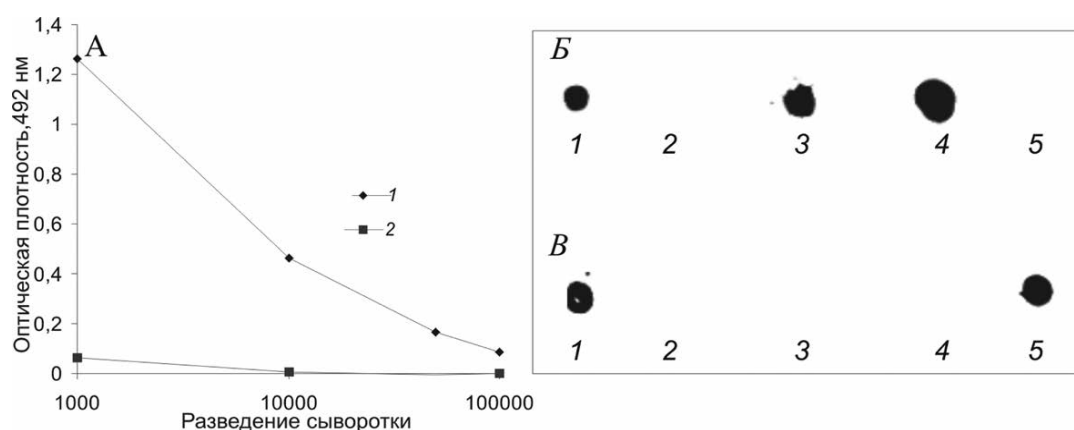


Рисунок 1.

Проверка взаимодействия вакцины с антипаротитной (1) и антивискуминовой (2) сывороткой в системе ИФА (А). Проверка взаимодействия образцов вакцины с антипаротитной (Б) и антивискуминовой (В) сывороткой методом дот-блот анализа. Цифрами обозначены сорбированные на мембрану образцы: 1 - очищенные иммуноглобулины кролика, нанесённые в концентрации 1 мкг/мл; 2 - среда инкубации вирусов; 3 - паротитная вакцина; 4 - паротитная вакцина, сконцентрированная в 12,5 раз; 5- контрольный белок вискумин.

Результаты проведённых дот-блот анализа и ИФА позволяют судить о наличии в вакцине белковых компонентов вирусных частиц и специфичности взаимодействия вакцины с сывороткой, но не дают количественной оценки вирусных частиц в вакцине.

Исследование паротитной вакцины методом АСМ позволило не только детектировать и визуализировать вирусные частицы на различных подложках, но и разработать алгоритм их количественного учёта и дать оценку их концентрации в вакцине. Были проведены эксперименты по сорбции частиц вакцины на различные виды подложек, используемых для АСМ: 1) чистую слюду; 2) слюду, модифицированную полилизинном; 3) слюду, модифицированную фетуином; 4) кремний; 5) графит; 6) полистирол; 7) применён метод ковалентной пришивки к слюде по ранее описанной методике [21]. Все методы сорбции, при использовании которых частицы садились на подложку, дали один и тот же результат – одна вирусная частица на площадь скана в 100 мкм². Известно, что диаметр паротитных вирионов может варьировать от 100 до 600 нм, в среднем составляя 150-200 нм. Kim и соавт. визуализировали полуконтактным методом АСМ на воздухе вирус паротита штамма 98-40, культивированного в клетках VeroE6, как плеоморфные частицы неправильной сферической формы диаметром 107-134 нм [22]. В наших экспериментах наблюдались сходные частицы различной формы, от округлой до овально вытянутой, диаметры которых составляли от 100 до 200-250 нм. Наиболее часто встречались частицы диаметром 150-200 нм. На контрольных образцах, инкубированных со средой инкубации вирусов, подобных частиц не наблюдалось. Время инкубации вакцины на подложке варьировали от 5 мин до 12 часов, до полного высыхания капли на подложке. При 5-минутной инкубации частиц не наблюдали. С увеличением длительности инкубации от 5 до 30 мин количество частиц на сканах росло. При длительности инкубации более 30 мин дальнейшего увеличения числа частиц на сканах не происходило.

При модификации подложки иммуноглобулинами антипаротитной сыворотки по выбранной схеме экспериментально подбирали оптимальные концентрации реагентов и условия отмывки образцов. Для формирования первого слоя была выбрана концентрация антител козы 5 мкг/мл. При концентрации антител 1 мкг/мл на сканах наблюдались одиночные иммуноглобулины, при концентрации антител 5 мкг/мл на подложке формировался ровный слой высотой 2-3 нм (рис. 2а), при дальнейшем увеличении концентрации антител ровного монослоя не формировалось.

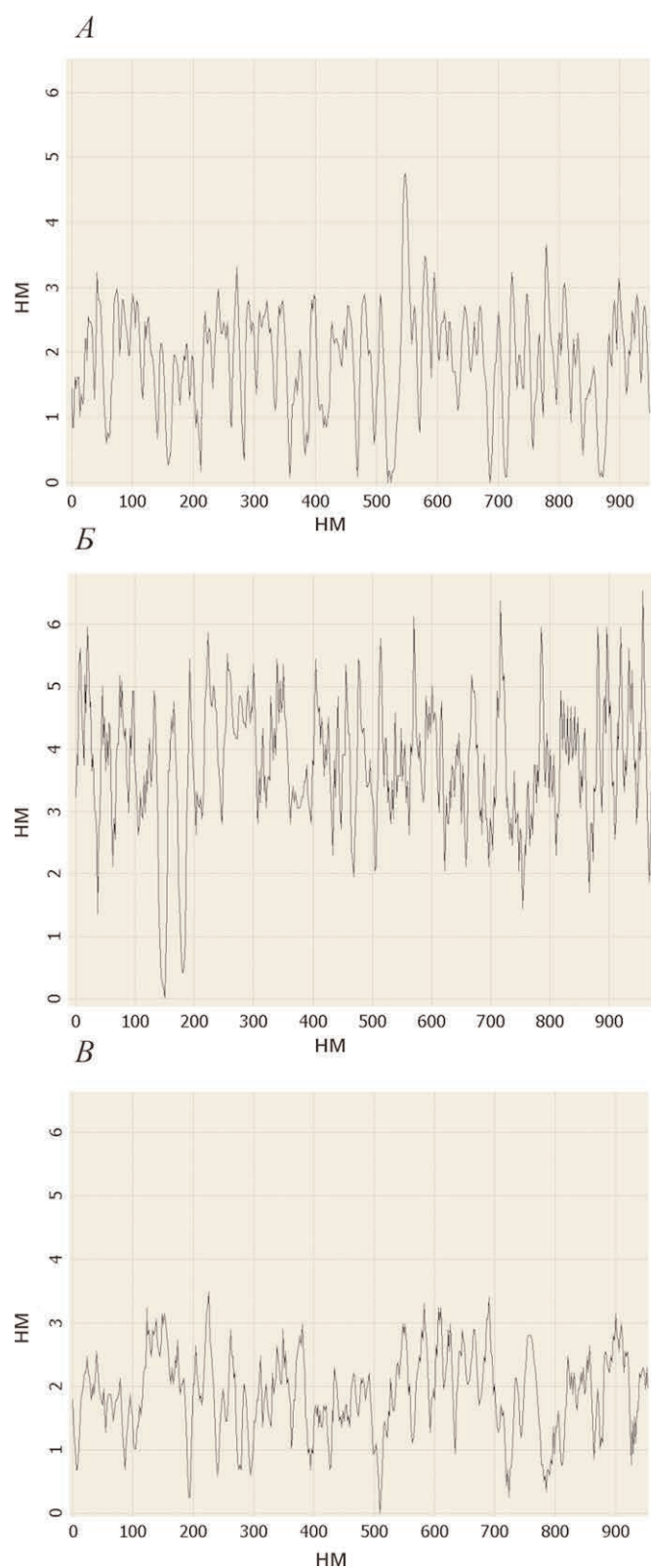


Рисунок 2.

Модификация подложки специфичными антителами: профиль поверхности первого слоя антикроличьих антител (А), профиль поверхности после нанесения на первый слой иммуноглобулинов антипаратитной кроличьей сыворотки (Б), профиль поверхности контрольного образца, вместо сыворотки нанесён раствор БСА (В).

МЕТОД КОЛИЧЕСТВЕННОЙ ОЦЕНКИ ВИРУСНЫХ ЧАСТИЦ

При формировании на монослой второго слоя из иммуноглобулинов антипаротитной сыворотки высота образца возросла в два раза и составила 4-5 нм (рис. 2б). Высота контрольного образца, инкубированного с раствором 5 мкг/мл БСА в фосфатно-солевом буфере с добавлением 0,05% твин-20, не изменилась и осталась около 2-3 нм (рис. 2в).

Такая двухступенчатая процедура модификации подложки с использованием первого слоя антикроличьих антител козы вместо непосредственного покрытия подложки иммуноглобулинами антипаротитной кроличьей сыворотки была выбрана с учётом следующего. Во-первых, в процессе высаливания вместе с иммуноглобулинами, как правило, выпадают в осадок примеси других компонентов сыворотки, которые за счёт сильного электростатического притяжения могут сорбироваться на слюду и препятствовать образованию ровного слоя, в то время как коммерческий препарат очищенных антикроличьих антител козы заведомо является более чистым. Во-вторых, при непосредственной сорбции иммуноглобулинов можно ожидать произвольной их ориентации на подложке (это подтверждается АСМ-исследованием одиночных иммуноглобулинов, высота которых может варьировать от 1 до 2,5 нм), когда есть вероятность их сорбции своими антиген-связывающими участками, расположенные на Fab-фрагменте, на подложку и потеря способности связывать антиген. Антивидовые антитела против иммуноглобулинов в основном направлены против Fc-фрагментов, следовательно, можно предположить, что при сорбции их в качестве первого слоя Fab-фрагменты связанных ими специфических иммуноглобулинов второго слоя будут доступны для взаимодействия с антигеном.

Сохранение активности антител после сорбции их на АСМ-подложку показано в [21].

После инкубации паротитной вакцины на модифицированной таким образом подложке на сканах наблюдались частицы диаметром 100-250 нм и высотой около 40 нм (рис. 3), отсутствующие на контрольном образце и схожие по морфологии с частицами, наблюдаемыми в экспериментах на других подложках.

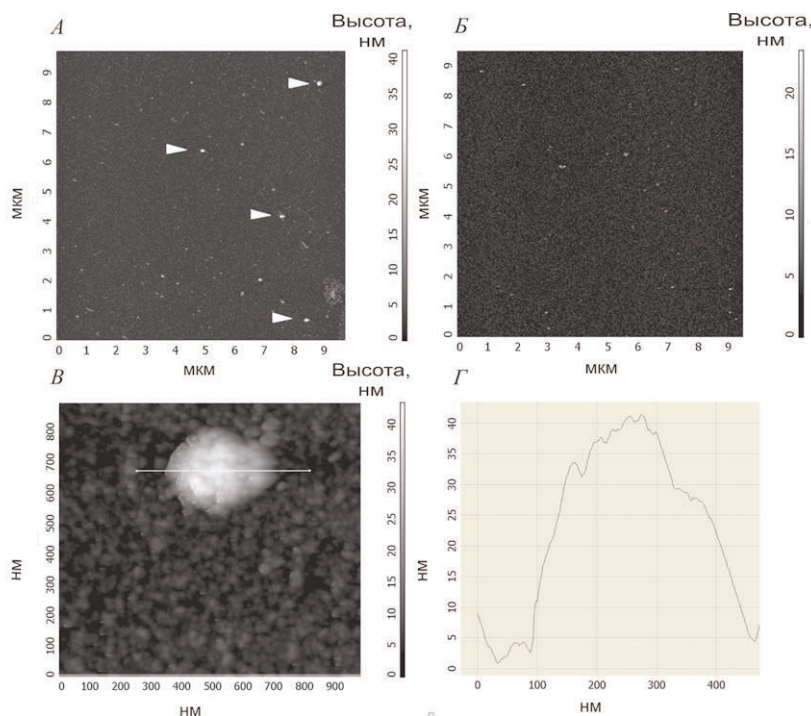


Рисунок 3.

Вирусные частицы на подложке, модифицированной иммуноглобулинами антипаротитной сыворотки (отмечены стрелочками) (А), контрольный образец (Б), частица вакцины при большем увеличении (В) и профиль её поверхности для указанного сечения (Г).

Для количественной оценки частиц в вакцине использовали следующий способ. На модифицированную подложку наносили каплю вакцины известного объёма и инкубировали 30 минут. Для определения площади капли её снимали при помощи цифровой видеокамеры специальной приставки Olympus SZ-STB2 к атомно-силовому микроскопу и с использованием калибровочной сетки в программе Adobe Photoshop вычисляли её площадь. После сканирования не менее 20 площадей размером 100 мкм² определяли среднее значение количества частиц на скан и рассчитывали количество частиц на площадь капли данного объёма. Предполагали, что на подложку сорбировались все частицы капли, тогда это рассчитанное количество частиц соответствовало количеству вирусных частиц в капле данного объёма. Концентрацию частиц пересчитывали в расчёте на мл вакцины. Рассчитанная таким образом концентрация вирусных частиц составила $2,8 \times 10^7$ частиц/мл.

Количество копий вирусной РНК в вакцине, оцененное методом ПЦР в реальном времени, и количество в ней вирусных частиц, оцененное методом атомно-силовой микроскопии, совпадают. После инкубации на модифицированной подложке слюде капли вакцины собирали в специальную пробирку и проводили количественную ПЦР для проверки наличия в ней вирусной РНК. Вирусная РНК в вакцине, проинкубированной на слое специфичных иммуноглобулинов, не детектировалась, значит, практически весь генетический материал возбудителя сорбировался на подложку в составе паротитных вирионов.

Представленные результаты демонстрируют возможность использования АСМ для детекции и быстрой количественной оценки вирусного материала в вирусосодержащих жидкостях наряду с такими количественными методами, как ПЦР в реальном времени.

Помимо высокой чувствительности, метод ПЦР в реальном времени обладает высокой специфичностью. Показано отсутствие перекрёстных реакций при использовании в качестве матрицы НК разных вирусов [14, 15]. Эти преимущества позволяют использовать данный метод в диагностических целях для детекции вирусов в клинических образцах, таких, как мазки из ротовой полости и цереброспинальная жидкость [15, 16]. Значения концентрации вирусной РНК в образцах, определённые с использованием количественной ПЦР, коррелируют с количеством бляшкообразующих единиц вируса, определённых титрованием методом негативных колоний. Однако в некоторых случаях результаты, полученные данными методами, могут различаться в 10-200 раз [14], так как количественная ПЦР даёт информацию только о генетической компоненте возбудителя, а не о цельных, способных к размножению вирионах.

Метод АСМ позволяет визуализировать вирусные частицы и давать оценку их количества. С использованием измерений различных физических характеристик, таких как модуль Юнга, есть возможность отличать целые, полностью сформированные вирионы от разрушенных, что особенно важно при количественном учёте вирусных частиц в живых вакцинах, эффективность которых напрямую зависит от наличия в них цельных, способных к размножению вирионов. Специфичность анализа достигается применением методик модификации подложек специфичными антителами. Nettikadan и соавт. предложили метод АСМ-диагностики вирусных инфекций на мини-чипах с нанесёнными специфичными антивирусными антителами [12, 13]. Было показано отсутствие перекрёстных реакций – вирусные частицы детектировались только на участках чипа, модифицированных специфичными антителами, и не встречались на участках, модифицированных антителами к другим вирусам. Существует возможность создания миниатюрных тест-систем для АСМ-диагностики различных заболеваний. При адресном нанесении антител на подложку возможна детекция различных возбудителей на одном чипе. Важными факторами являются скорость анализа, простота приготовления образцов и малый объём исследуемой вирусосодержащей жидкости, который требуется для АСМ-эксперимента, - порядка десяти микролитров. Таким образом, метод АСМ может найти широкое применение для диагностики и быстрой количественной оценки вирусных частиц.

Исследования финансировались по государственному контракту № 02.434.11.3010.

ЛИТЕРАТУРА

1. Cidade G.A., Costa L.T., Weissmuller G., Neto A.J., Roberty N.C., Moraes M.B., Prazeres G.M., Hill C.E., Ribeiro S.J., Souza G.G., Teixeira L., Moncores M., Bisch P.M. (2003) *Artif. Organs*, **27**, 447-451.
2. Pereira R.S. (2001) *Biochem Pharmacol.*, **62**, 975-983.
3. Ouerghi O., Touhami A., Othmane A., Ouada H.B., Martelet C., Fretigny C., Jaffrezic-Renault N. (2002) *Biomol. Eng.*, **19**, 183-188.
4. Plomp M., Rice M.K., Wagner E.K., McPherson A., Malkin A.J. (2002) *Am. J. Pathol.*, **160**, 1959-1966.
5. Malkin A.J., McPherson A., Gershon P.D. (2003) *J. Viral.*, **77**, 6332-6340.
6. Kuznetsov Y.G., Daijogo S., Zhou J., Semler B.L., McPherson A. (2005) *J. Mol. Biol.*, **347**, 41-52.
7. Kuznetsov Y.G., Victoria J.G., Low A., Robinson W.E. Jr., Fan H., McPherson A. (2004) *Scanning*, **26**, 209-216.
8. Porter M.D., Driskell J.D., Kwarta K.M., Lipert R.J., Neill J.D., Ridpath J.F. (2006) *Dev. Biol. (Basel)*, **126**, 31-39.
9. Polishchuk V.P., Tyvonchuk T.P., Rengevich I.V., Beketov G.V., Budzanivskaia I.G., Boiko A.L. (2000) *Mikrobiol. Z.*, **62**(№6), 40-43.
10. Huff J.L., Lynch M.P., Nettikadan S.R., Johnson J.C., Vengasandra S.G., Henderson E. (2004) *J. Biomol. Screen.*, **9**, 491-497.
11. Trindade G.S., Vilela J.M., Ferreira J.M., Aguiar P.H., Leite J.A., Guides M.I., Lobato Z.I., Madureira M.C., da Silva M.I., da Fonseca F.G., Kroon E.G., Andrade M.S. (2007) *J. Virol. Methods*, **141**, 198-204.
12. Nettikadan S.R., Jonson J.C., Mosher C., Henderson E. (2003) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **311**, 540-545.
13. Johnson J.C., Nettikadan S.R., Vengasandra S.G., Henderson E. (2004) *J. Biochem. Biophys. Meth.*, **59**, 167-180.
14. Kubar A., Yapar M., Besirbelioglu B., Avci I.Y., Guney C. (2004) *Diagnos. Microbiol. Infect. Dis.*, **83**, 83-88.
15. Uchida K., Shinohara M., Shimada S., Segava Y., Doi R., Gotoh A., Hondo R. (2005) *J. Med. Virol.*, **75**, 470-474.
16. Krause C.H. (2006) *J. Clin. Virol.*, **37**, 184-189.
17. Eifler R., Pfueller K., Goeckeritz W., Pfueller U. (1993) *Lectins: Biology, Biochemistry, Clinical Biochemistry*, vol. 9 (Basu J., Kundu M., Chakrabarti P., eds.), Wiley Eastern Ltd., India, 144-151.
18. Moisenovich M.M., Egorova S.G., Chelnokova O.V., Demina I.A., Polosukhina E.R., Kozlovskaya N.V., Popova E.N., Fattakhova G.V., Solopova O.N., Agapov I.I. (2000) *Russ. J. Immunol.*, **5**, 376-384.
19. Малюченко Н.В., Тоневицкий А.Г., Савватеев М.Н., Быков В.А., Мойсенович М.М., Агапов И.И., Козловская Н.В., Архипова В.С., Егорова С.Г., Кирпичников М.П. (2003) *Биофизика*, **48**, 830-836.
20. Ребриков Д.В., Трофимов Д.Ю. (2006) *Прикл. биохим. микробиол.*, **42**, 520-528.
21. Малюченко Н.В., Агапов И.И., Тоневицкий А.Г., Мойсенович М.М., Савватеев М.Н., Тоневицкий Е.А., Быков В.А., Кирпичников М.П. (2004) *Биофизика*, **49**, 1008-1014.
22. Kim H.S., Jung S.H., Kim S.H., Suh I.B., Kim W.J., Jung J.W., Yuk J.S., Kim Y.M., Ha K.S. (2006) *Proteomics*, **6**, 6426-6432.

Поступила: 03. 12. 2007.

**A NEW METHOD FOR QUANTITATIVE ESTIMATION OF THE NUMBER
OF VIRUS PARTICLES**

A.S. Shebanova¹, M.N. Savvateev², N.V. Maluchenko¹, D.Yu. Trofimov³, I.I. Agapov^{1,4}

¹Lomonosov Moscow State University, Biological Department, Leninskie gory, 1, bld. 12, Moscow,
119992 Russia: fax (495) 939 57 38, e-mail n_shebanova@mail.ru

²NT-MDT Co., State Research Institute of Physical Problems, Zelenograd, Moscow, Russia

³DNA-Technology Co., Moscow, Russia

⁴Research Institute of Transplantology and Artificial Organs, Moscow, Russia

In the present work virus particles of live mumps virus vaccine widely used for vaccination in Russia have been detected and visualized by atomic force microscopy. For quantitative estimation of the number of observed virus particles the special method has been proposed. The presence of protein component of the virus in vaccine was tested by ELISA and dot-blot analysis. Using quantitative real-time PCR assay the number of copies of viral RNA was estimated. The results of quantitative estimation obtained by real-time PCR corresponded with atomic force microscopy data.

Key words: atomic force microscopy, live virus vaccine, virus particles, quantitative real-time PCR.