

НАНОБИОТЕХНОЛОГИЯ

УДК 577.1;616.073
©Коллектив авторов

ДЕТЕКЦИЯ СЕРОЛОГИЧЕСКИХ МАРКЕРОВ ВИРУСНЫХ ГЕПАТИТОВ В И С МЕТОДОМ АТОМНО-СИЛОВОЙ МИКРОСКОПИИ

**Ю.Д. Иванов^{1*}, П.А. Французов¹, Т.О. Плешакова¹, В.С. Зиборов², С.К. Светлов¹,
Н.В. Крохин¹, В.А. Конев¹, О.Б. Ковалев¹, В.Ф. Учайкин¹, О.Н. Ястребова³,
П.Г. Свешников⁴, А.И. Арчаков¹**

¹ГУ НИИ биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича РАМН, ул. Погодинская, 10,
Москва, Россия; тел.: (7)(495)2463761; факс: (7)(495) 2450857;
эл. почта: Yuri.Ivanov@ibmc.msk.ru

²Объединенный Институт Высоких Температур РАН, Москва

³ЗАО Вектор-Бест, Новосибирск

⁴НИИ Молекулярной диагностики и лечения, Москва

Продemonстрирована возможность детекции серологических маркеров, содержащих поверхностный антиген вируса гепатита В (HBsAg) и кор-антиген вируса гепатита С (HCVcoreAg) в сыворотках крови людей с помощью нового нанотехнологического подхода на основе метода атомно-силовой микроскопии (АСМ).

На АСМ-чипе были иммобилизованы антитела против поверхностного антигена вируса гепатита В (анти-HBsAg), а также антитела против кор-антигена вируса гепатита С (анти-HCVcoreAg). Было показано, что такой подход позволяет выявлять HBsAg, HCVcoreAg и фрагменты вирусов, содержащие эти антигены, в сыворотке крови. Сравнительный анализ выявления HBsAg- и HCVcoreAg-содержащих частиц в сыворотках методом АСМ и традиционными методами (иммуноферментного анализа и ПЦР) продемонстрировал 75% совпадение результатов между АСМ и последними двумя методами.

Ключевые слова: атомно-силовая микроскопия, поверхностный антиген вируса гепатита В (HBsAg), кор-антиген вируса гепатита С (HCVcoreAg).

ВВЕДЕНИЕ. С момента открытия вируса гепатита В (HBV) и до настоящего времени для детекции HBsAg были использованы практически все биохимические методы выявления антигенов – от преципитации в геле до радиоиммунного анализа [1]. Для получения информации о наличии вирусных частиц гепатита С используется метод ПЦР [2]. Иммуноферментные тест-системы для выявления

* - адресат для переписки

антигенов вируса гепатита С не нашли широкого применения из-за их низкой чувствительности. До сих пор продолжаются поиски более чувствительного, специфичного, быстрого и простого в исполнении метода детекции HBsAg. В настоящее время основными методами детекции маркеров заболеваний вирусными гепатитами В и С являются иммуноферментный анализ (ИФА) и полимеразная цепная реакция (ПЦР). Эти методы зарекомендовали себя как высокоспецифичные и чувствительные. Однако они имеют ряд недостатков: длительность постановки, отсутствие жесткого контроля качества тест-систем, возможность контаминации исследуемых образцов, высокая стоимость реактивов и приборов и т.д. Кроме того, методы иммуноферментного анализа, используемые сегодня в диагностике заболеваний, обладают общим, весьма существенным недостатком, а именно, концентрационный барьер для обнаружения и идентификации белковых молекул в биологическом материале, существующий в протеомике, ограничен 10^{-12} М [3]. Например, развивающиеся в настоящее время методы идентификации белков с помощью комбинации 2D-электрофореза или хроматографии с масс-спектрометрией LC/MS имеют чувствительность порядка 10^{-8} - 10^{-10} М [3], метод иммуноферментного (ELISA) анализа имеет чувствительность порядка 10^{-10} - 10^{-12} М [4, 5]. В последнее время находит применение экспресс-метод на основе использования оптического биосенсора, который позволяет регистрировать образование комплексов макромолекул в реальном времени без использования меток [6-12]. Однако этот метод также имеет ограничение по концентрационной чувствительности на уровне 10^{-11} - 10^{-12} М [3]. Дальнейшее успешное развитие диагностических методов обусловлено разработкой и внедрением методов, обладающих возможностями выявления и идентификации белков и их комплексов в многокомпонентном биологическом материале, в широком диапазоне концентрации ниже 10^{-12} М [3]. Подходы, позволяющие решать эти задачи, основаны на использовании методов регистрации и идентификации единичных молекул с помощью молекулярных детекторов [3].

Метод регистрации единичных молекул с помощью молекулярного детектора на базе атомно-силового микроскопа (АСМ) основан на мониторинге силы взаимодействия зонда микроскопа с молекулами, иммобилизованными на атомарно-гладкой поверхности АСМ-чипа [11]. При сканировании зондом вдоль такой поверхности измеряется высота молекул и их комплексов. В плазме крови больных вирусным гепатитом С HCVcoreAg присутствует в виде вирионов с размерами 30-70 нм [12], нуклеокапсидов ВГС, содержащих вирусную РНК, окруженную кор-белком [13, 14], а также комплексов этих частиц с иммуноглобулинами. Также в крови пациентов обнаруживается кор-белок ВГС в свободном виде [15].

Один из основных маркеров заболевания гепатитом В – HBsAg – присутствует в крови больных в составе вирусных частиц (т.н. частиц Дейна) с размерами около 42 нм [16], а также в виде сферических агрегатов и филаментозных структур диаметром около 22 нм [17]. Вертикальное разрешение АСМ достигает 0,1 нм. Такое разрешение позволяет использовать метод АСМ для регистрации HBsAg- и HCVcoreAg-содержащих частицы. Ранее нами было показано на примере молекул модельных белков, что, высота АСМ-изображений комплекса как правило, превышает высоту составляющих его изолированных молекул [18, 19], что может использоваться в иммунодиагностике.

Данная работа посвящена изучению возможности детекции фрагментов вирусных частиц, содержащих HBsAg – маркера инфицирования вирусом гепатита В и HCVcoreAg – маркера инфицирования вирусом гепатита С с помощью АСМ. Было показано, что атомно-силовой молекулярный детектор в комбинации с методом фишинга может быть использован для иммуносенсорного выявления маркеров гепатитов В и С в сыворотке крови. Такой подход позволяет обнаружить и визуализировать фрагменты вирусных частиц, содержащие HBsAg и HCVcoreAg в сыворотке крови с помощью АСМ-чипа без введения специальных меток.

МЕТОДИКА. В работе использовались кор-антиген вируса гепатита С (HCVcore Ag), полученный в ЗАО “Вектор Бест” (Россия) и поверхностный антиген вируса гепатита В (“Aldevron”, США), а также моноклональные антитела (МКА) против рекомбинантного HCVcoreAg, (НИИ Молекулярной диагностики, Москва) и МКА против поверхностного антигена вируса гепатита В (HBsAg) (Институт иммунологии МЗ РФ).

Раствор PBS/t – 50 мМ фосфатно-солевой буфер с детергентом твин-20, pH 7,4, был получен от “Вектор-Бест”.

Определение содержания поверхностного антигена вируса гепатита В в сыворотках крови проводилось методом ИФА с помощью тест-системы “Вектогеп–В” (“Вектор-Бест”).

Для определения антител к вирусу гепатита С использовали тест-системы “Бест-АНТИ-ВГС” (“Вектор-Бест”) и “ИФА-АНТИ-HCV” (НПО “Диагностические системы”, Россия).

Определение РНК вируса гепатита С в сыворотке крови проводили методом ПЦР с помощью тест системы “Амплисенс HCV Монитор” (ЦНИИ Эпидемиологии МЗ РФ).

В работе были использованы сыворотки крови, полученные от Кафедры Детских инфекций РГМУ, ЦНИИ Эпидемиологии МЗ РФ, РНИИ Геронтологии Росздрава.

В работе была использована зондовая нанолaborатория NTEGRA (NT-MDT, Россия). Измерения проводили на воздухе в полуконтактном режиме. В качестве зондов использовали кантилеверы фирмы “NT-MDT” серии NSG10. Типичный радиус кривизны игл составлял 10 нм, резонансная частота лежала в пределах от 190 до 325 кГц. Размер одного кадра сканирования АСМ-чипа составлял 5×5 мкм². Полная площадь сканирования АСМ-чипа составляла 16 кадров или 400 мкм². Каждое измерение проводили не менее 3 раз.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. Моноклональные антитела (МКА) против кор-антигена вируса гепатита С и МКА против HBsAg были ковалентно иммобилизованы на подложках к атомно-силовому микроскопу для создания АСМ-чипов с анти-HBsAg_{im} и анти-HCVcore_{im}. На рисунке 1 представлены АСМ изображения чипов с иммобилизованными МКА к кор-антигену вируса гепатита С (рис. 1А) и МКА к HBsAg (рис. 1Б). Измерение высоты изображений этих двух типов антител показало, что высота максимума плотности распределения изображений антител составила 1,5-2 нм как для анти-HBsAg, так и для анти-HCVcoreAg.

При инкубации АСМ-чипа с иммобилизованными МКА к кор-антигену вируса гепатита С в модельном растворе (PBS буфере, pH 7,4, содержащем рекомбинантный кор-антиген вируса гепатита С в концентрации 10⁻¹¹ М), на поверхности чипа наблюдается образование дополнительных объектов с высотой 5-7 нм (рис. 2А). В то же время в контрольной зоне АСМ-чипа, где не были иммобилизованы анти-HCVcore, образование дополнительных объектов с высотой более 5 нм не наблюдалось. Это указывало на то, что объекты с высотами более 5 нм соответствуют комплексам антиген/антитело анти-HCVcore_{im}/HCVcore, образовавшимся на поверхности АСМ-чипа.

При инкубации АСМ-чипа с иммобилизованными анти-HBsAg_{im} в модельном растворе (PBS буфере, pH 7,4, содержащем рекомбинантный HBsAg при концентрации 10⁻⁸ М), наблюдали образование дополнительных объектов с высотами 5-7 нм (рис. 2Б). В то же время в контрольной зоне АСМ-чипа, где не были иммобилизованы анти-HBsAg, образование дополнительных объектов с высотой более 5 нм не наблюдалось. Это указывало на то, что объекты с высотами более 5 нм соответствуют комплексам антиген/антитело анти-HBsAg_{im}/HBsAg, образовавшимся на поверхности АСМ-чипа.

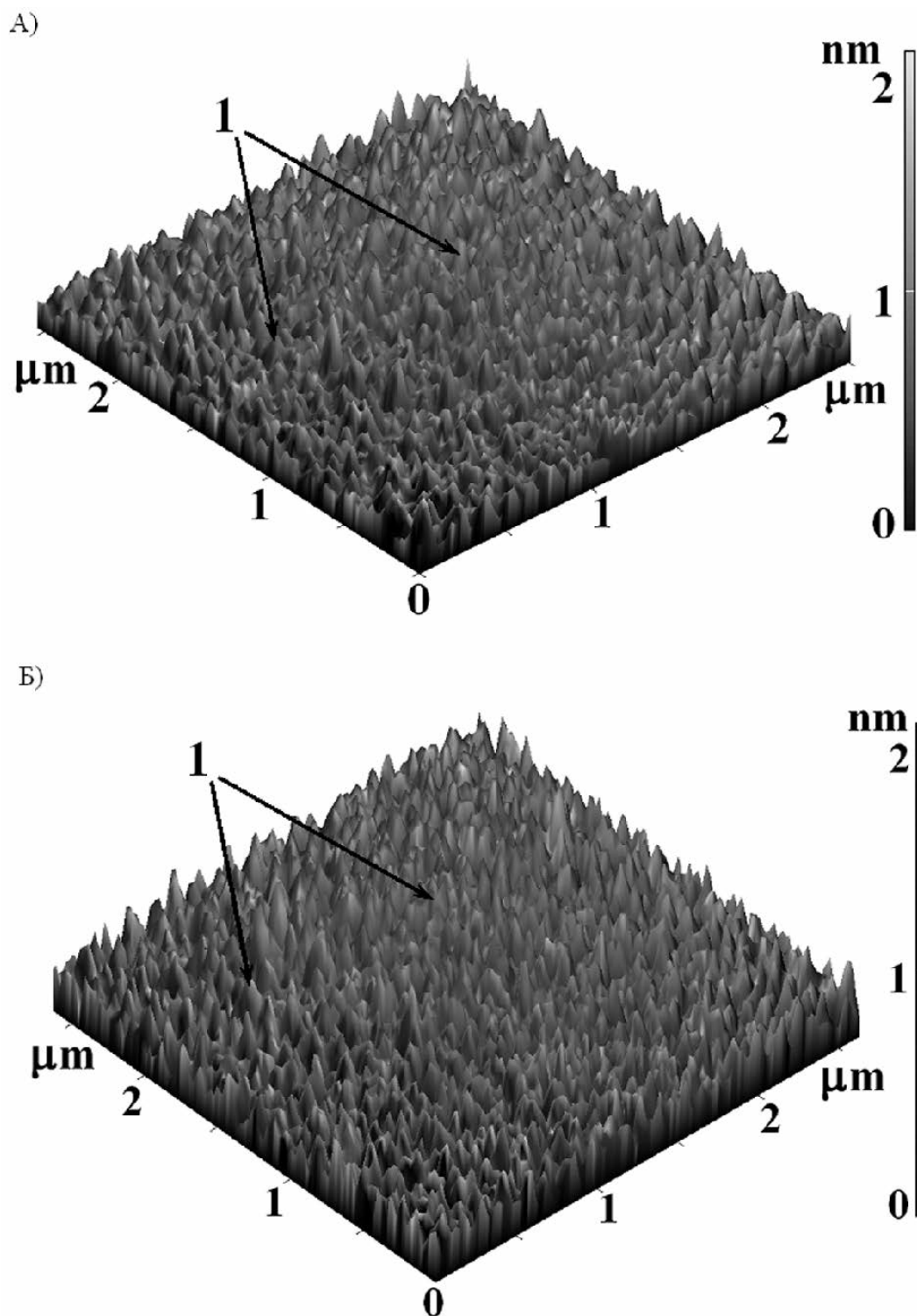


Рисунок 1.

АСМ-изображения поверхности АСМ-чипов с иммобилизованными моноклональными анти-HCVcore (А) и моноклональными анти-HBsAg (Б). Высота максимума плотности распределения изображений антител составляла 1,5-2 нм в обоих случаях. Экспериментальные условия: измерения были проведены в полуконтактной моде в воздушной среде на АСМ NTEGRA. Размеры отсканированных кадров - 5×5 мкм. Стрелками 1 указаны анти HCVcore (А) и анти-HBsAg (Б) антитела.

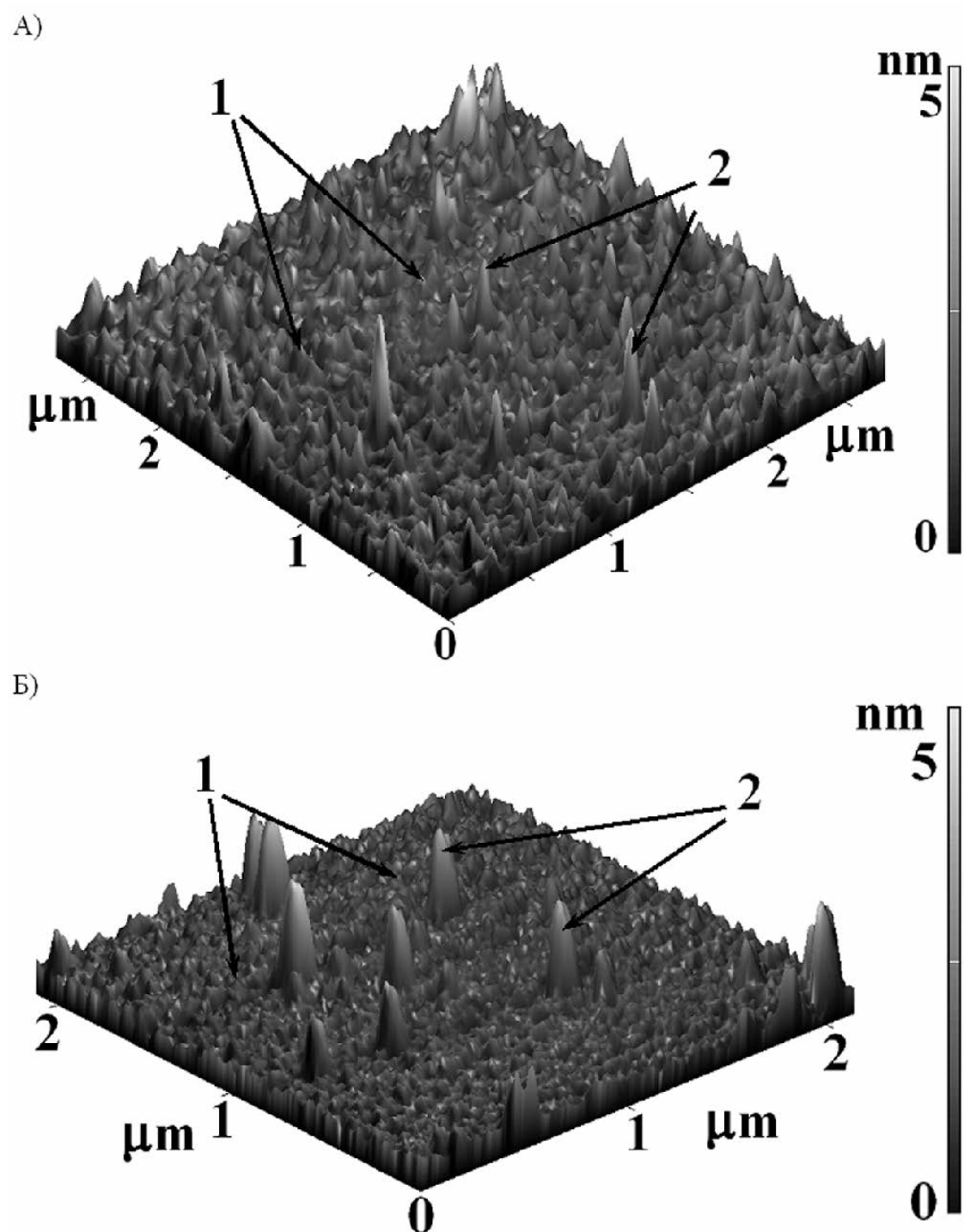


Рисунок 2.

АСМ-изображения поверхности АСМ-чипа с иммобилизованными моноклональными анти-HCVcore после его инкубации в растворе HCVcoreAg (А); АСМ-биочипа с иммобилизованными анти-HBsAg после ее инкубации в растворе HBsAg (Б). Экспериментальные условия: измерения были проведены в полуконтактной моде в воздушной среде на АСМ NTEGRA.

Размеры отсканированных кадров - 5×5 мкм.

Стрелками 1 указаны анти-HCVcore (А) и анти-HBsAg (Б). Стрелками 2 указаны изображения комплексов анти-HBsAg_{imm}/HBsAg (А) и анти-HCVcore_{imm}/HCVcoreAg (Б).

Таким образом, критерием наличия маркеров вирусных гепатитов В и С в биологических жидкостях является обнаружение на АСМ-чипе с помощью атомно-силового микроскопа объектов с высотами более 5 нм как в случае HBsAg, так и в случае HCVcoreAg.

Далее нами были проведены эксперименты по выяснению влияния неспецифически сорбированных макромолекул на АСМ-измерение. Для этого АСМ-чип с иммобилизованными анти-HBsAg_{im} был инкубирован в PBS буфере, pH 7,4, содержащем HCVcoreAg в концентрации 10^{-8} М, но не содержащем HBsAg. В этом случае не наблюдалось образования дополнительных объектов с высотой более 5 нм. При инкубации АСМ-чипа с иммобилизованными анти-HCVcoreAg_{im} в PBS буфере, pH 7,4, содержащем 10^{-8} М рекомбинантного HBsAg и не содержащем HCVcoreAg, не наблюдалось образования дополнительных объектов с высотами 5 нм и более на поверхности чипа.

Это указывало на то, что АСМ-чип с иммобилизованными на его поверхность анти-HBsAg_{im} и анти-HCVcoreAg_{im} позволяет специфически выявлять поверхностный антиген вируса гепатита В и антиген кор белка вируса гепатита С.

Выявление маркеров гепатитов В и С в сыворотке.

Нами была разработана схема одновременного выявления кор антигена вируса гепатита С и HBsAg а также вирусных фрагментов, содержащих эти антигены, в сыворотке крови. Для этого на чипе к АСМ были ковалентно иммобилизованы в двух разных зонах антитела двух типов: анти-HCVcoreAg_{im} и анти-HBsAg_{im}. На том же чипе также предусматривалась третья зона, на которой не были иммобилизованы ни антитела к HBsAg, ни антитела к HCVcoreAg (для контроля отсутствия неспецифически сорбированных объектов из сыворотки крови).

Для выявления маркеров вирусов гепатита В и гепатита С в сыворотке крови с помощью такого чипа к атомно-силовому микроскопу проводилась следующая процедура. АСМ-чип инкубировали в растворе сыворотки. Далее АСМ-чип промывали в бидистиллированной воде. Для выявления HBsAg и вирусных фрагментов, содержащих этот антиген, использовали сыворотки, содержащие HBsAg (содержание HBsAg было подтверждено методом ИФА). Для выявления HCVcoreAg и фрагментов вирусов, содержащих этот антиген, использовали сыворотки, содержащие HCVcoreAg (в них содержалась РНК HCV, обнаруженная методом ПЦР, они же были положительные на анти-HCV методом ИФА). В качестве контрольных использовали сыворотки, не содержащие HCVcoreAg и HBsAg (они не содержали анти-HCV и HBsAg по методу ИФА и были отрицательные на наличие РНК HCV методом ПЦР). При инкубации нанобиочипов в контрольных растворах было обнаружено, что неспецифически сорбированные объекты на АСМ-наночипах имеют размеры, не превышающие 5 нм.

На рисунке 3(А) приведены АСМ – изображения объектов на поверхности чипа в зоне с иммобилизованными анти-HCVcoreAg, инкубированного в контрольной сыворотке, не содержащей HCVcoreAg, а на рисунке 4(А) - изображения объектов на поверхности АСМ-чипа, инкубированного в сыворотке, содержащей HCVcoreAg. Как видно из рисунка 3(А), размеры изображений, полученные после инкубации АСМ-чипа в контрольной отрицательной сыворотке, не превышают 5 нм. В случае инкубации АСМ-чипа в сыворотке, содержащей HCVcoreAg, (рис. 4А) появляются объекты с размерами высот 5-40 нм, которые не наблюдались на рисунке 3(А). Эти объекты соответствуют комплексам HCVcoreAg/анти-HCVcoreAg_{im} с размерами 5-7 нм, а также комплексам анти-HCVcoreAg_{im} с вирусными фрагментами, содержащими HCVcoreAg, с размерами более 7 нм, сформированными на поверхности АСМ-чипа.

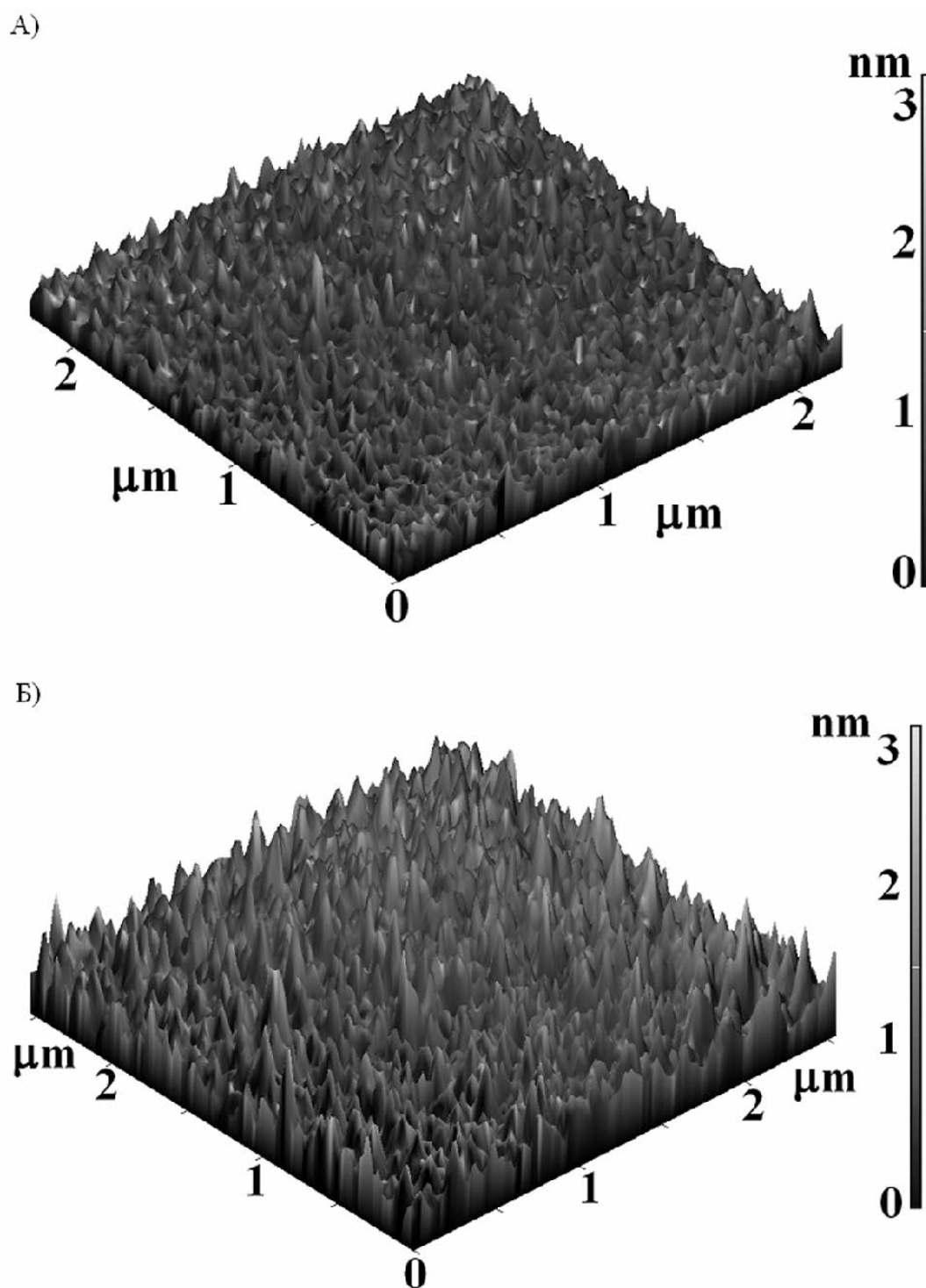


Рисунок 3.

АСМ-изображения поверхности АСМ-чипов с иммобилизованными анти HCVcore антителами после инкубации его в сыворотке, отрицательной по HCVcore-антигену (А); и поверхности АСМ-чипа с иммобилизованными анти-HBsAg антителами после инкубации его в сыворотке, отрицательной по HBsAg (Б). Высоты изображений объектов, неспецифически сорбированных на поверхности, не превышают 5 нм. Экспериментальные условия: АСМ-чип с иммобилизованными антителами инкубировали в растворе сыворотки, после чего промывали бидистиллированной водой и высушивали в потоке воздуха. Измерения были проведены в полуконтактной моде в воздушной среде на АСМ NTEGRA. Размеры отсканированных кадров - 5×5 мкм.

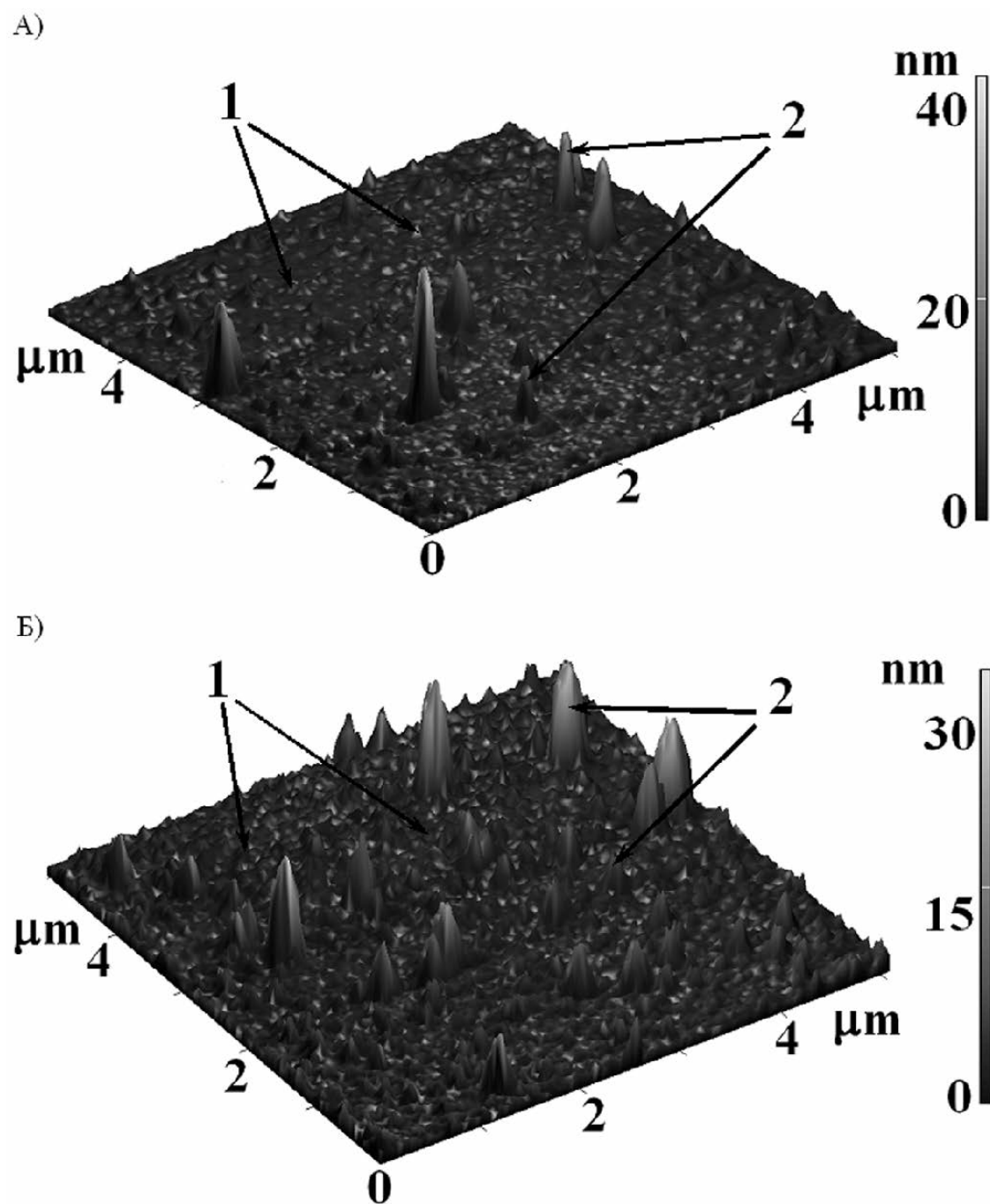


Рисунок 4.

АСМ-изображения поверхности АСМ-чипа с иммобилизованными анти-HCVcore антителами после инкубации его в сыворотке, содержащей HCV coreAg (А); и поверхности АСМ-чипа с иммобилизованными анти-HBsAg после инкубации его в сыворотке, содержащей HBsAg (Б), стрелками указаны: 1-моноклональные антитела, размер 1,5-2нм, 2 - комплексы HCVcoreAg/анти-HCVcoreAg_{им} (А) и HBsAg/анти-HBsAg_{им} (Б) с высотами изображений 5 нм и более. Экспериментальные условия: АСМ-чип с иммобилизованными антителами инкубировали в растворе сыворотки, после чего промывали бидистиллированной водой и высушивали в потоке воздуха. Измерения были проведены в полуконтактной моде в воздушной среде на АСМ NTEGRA. Размеры отсканированных кадров - 5×5 мкм.

Была протестирована группа из 40 сывороток, из них, согласно данным ИФА+ПЦР, 24 положительных (содержащих HCVcore Ag) и 16 отрицательных (не содержащих HCVcore Ag). Нами было найдено, что критический уровень количества объектов, выявляемых на АСМ-чипе, после его инкубации в сыворотке, выше которого сыворотка считалась положительной по HCVcore Ag, составлял 150 объектов с высотой $h > 5$ нм на площади сканирования 400 мкм². В таблице 1, для примера, представлен результат АСМ-анализа 10 сывороток из этой группы. Как видно из данных таблицы 1, сыворотки с номерами N 51117, 54290, 54117, 54275, 22, занимающие первые 5 строк таблицы, характеризуются количеством объектов от 202 до 504 с высотой $h > 5$ нм, что выше критического уровня. Поэтому, эти сыворотки были отнесены к положительным (содержащим HCVcore Ag). Остальные 5 сывороток с N 54182, 54081, 1, 19, 7 характеризуются количеством объектов от 17 до 85 с высотой $h > 5$ нм, поэтому они были отнесены к отрицательным сывороткам.

Таблица 1. АСМ- анализ по выявлению HCVcore Ag в 10 сыворотках.

№ сыворотки	Результат АСМ - тестирования	Количество объектов ($h > 5$ нм) на площади 400 мкм²
51117	HCVcoreAg (+)	384
54290	HCVcoreAg (+)	202
54117	HCVcoreAg (+)	500
54275	HCVcoreAg (+)	254
22	HCVcoreAg (+)	504
54182	HCVcoreAg (-)	24
54081	HCVcoreAg (-)	17
1	HCVcoreAg (-)	60
19	HCVcoreAg (-)	77
7	HCVcoreAg (-)	85

Примечание: *- Количество объектов, соответствующее критическому уровню составляет 150.

+ - соответствует наличию в биопробе белкового маркера на уровне выше критического.

Сравнительные результаты по тестированию группы из 40 сывороток на содержание HCV core, полученные с помощью чипа к атомно-силовому микроскопу и с помощью ИФА и ПЦР представлены в таблице 2. Как видно из таблицы 2, имеется совпадение результатов, полученных с помощью метода АСМ с результатами ИФА и ПЦР в случае 30 сывороток, из которых 18 положительных и 12 отрицательных по содержанию HCVcoreAg. Для 6 положительных, согласно данным ИФА+ПЦР сывороток, HCVcoreAg не выявлялся методом АСМ, а в 4 отрицательных согласно данным ИФА+ПЦР сыворотках, метод АСМ позволил выявить HCVcoreAg. Таким образом, совпадение данных, полученных методом АСМ с данными ИФА+ПЦР составило 75%.

АСМ-ДЕТЕКЦИЯ МАРКЕРОВ ВИРУСНЫХ ГЕПАТИТОВ

Таблица 2. Сравнительный анализ по выявлению HCVcore Ag в 40 сыворотках с помощью АСМ-чипа и ИФА+ПЦР методов.

Количество сывороток	Результат тестирования анти-HCV (ИФА) и РНК HCV (ПЦР)	Результат тестирования HCVcore Ag с помощью АСМ
18	+	+
12	-	-
4	-	+
6	+	-

В случае выявления маркера вируса гепатита В в сыворотках крови процедура была аналогичной процедуре, описанной выше для HCVcoreAg, за исключением того, что использовались сыворотки, содержащие HBsAg согласно данным ИФА, вместо сывороток, содержащих HCVcoreAg. Изображение объектов на поверхности АСМ-чипа в зоне с иммобилизованными анти-HBsAg_{im} после инкубации чипа в контрольной сыворотке, отрицательной по содержанию HBsAg, представлено на рисунке 3(Б). На рисунке 4(Б) представлено изображение поверхности АСМ-чипа, инкубированного в сыворотке, положительной по содержанию HBsAg. Из рисунка 3(Б) видно, что на поверхности АСМ-чипа, инкубированного в отрицательной контрольной сыворотке, не выявляются объекты с высотами 5 нм и более. Напротив, после инкубации АСМ-чипа в сыворотке, содержащей HBsAg, на поверхности появляются объекты высотой 5-35 нм (рис. 4Б). Эти объекты соответствуют комплексам HBsAg/анти-HBsAg_{im} с размерами 5-7 нм, а также комплексам вирусных частиц ВГВ с иммобилизованными антителами с размерами более 7 нм.

Была протестирована 31 сыворотка, из них, согласно данным ИФА, 20 положительных (содержащих HBsAg) и 11 отрицательных (не содержащих HBsAg). Нами было найдено, что критический уровень количества объектов, выявляемых на АСМ-чипе, после его инкубации в сыворотке, выше которого сыворотка считалась положительной по HBsAg, составлял 150 объектов с высотой $h > 5$ нм на площади сканирования 400 мкм². В таблице 3, для примера, представлен результат АСМ-анализа 10 сывороток из этой группы. Как видно из таблицы 3, сыворотки с номерами 52073, 52074, 337, 51621, 19 занимающие первые 5 строк таблицы, характеризуются количеством объектов от 293 до 501 с высотой $h > 5$ нм, что выше критического уровня. Поэтому, эти сыворотки были отнесены к положительным (содержащим HBsAg). Остальные 5 сывороток с N 54290, 51979, 50427, 327, 51757 характеризуются количеством объектов от 48 до 129 с высотой $h > 5$ нм, поэтому они были отнесены к отрицательным сывороткам.

Сравнительные результаты по тестированию 31 сывороток на содержание HBsAg, полученные с помощью чипа к атомно-силовому микроскопу и с помощью ИФА представлены в таблице 4. Как видно из таблицы 4, наблюдается совпадение результатов, полученных с помощью метода АСМ с результатами ИФА в случае 24 сывороток, из которых 18 положительных и 6 отрицательных по содержанию HBsAg. Для 2 положительных, согласно данным ИФА сывороток, HBsAg не выявлялся методом АСМ, а в 5 отрицательных, согласно данным ИФА сыворотках, метод АСМ позволил выявить HBsAg. Таким образом, совпадение данных, полученных методом АСМ с данными ИФА+ПЦР составило около 77%.

Таблица 3. АСМ- анализ по выявлению HBsAg в 10 сыворотках.

№ сыворотки	Результат АСМ - тестирования	Количество объектов ($h > 5$ нм) на площади 400 мкм^2
52073	HBsAg (+)	420
52074	HBsAg (+)	330
337	HBsAg (+)	459
51621	HBsAg (+)	293
19	HBsAg (+)	501
54290	HBsAg (-)	88
51979	HBsAg (-)	65
50427	HBsAg (-)	102
327	HBsAg (-)	48
51757	HBsAg (-)	129

Примечание: * - Количество объектов, соответствующее критическому уровню составляет 150.

+ - соответствует наличию в биопробе белкового маркера на уровне выше критического.

Таблица 4. Сравнительный анализ по выявлению HBsAg в 31 сыворотке с помощью АСМ-чипа и ИФА.

Количество сывороток	Результат тестирования HBsAg (ИФА)	Результат тестирования HBsAg с помощью АСМ
18	+	+
6	-	-
5	-	+
2	+	-

Анализ данных, представленных в таблицах 2 и 4, в которых объединены результаты анализов по 71 сыворотке, позволяет сделать следующие выводы. Метод АСМ, основанный на регистрации и подсчете белков и их комплексов, позволяет обнаруживать HCVcoreAg и HBsAg, а также вирусные фрагменты, содержащие эти антигены, как в модельных растворах, так и в сыворотках крови людей. Сравнение данных, полученных с помощью молекулярного детектора

АСМ-ДЕТЕКЦИЯ МАРКЕРОВ ВИРУСНЫХ ГЕПАТИТОВ

на базе атомно-силового микроскопа, с данными ИФА и ПЦР, показывает хорошее совпадение результатов по методу АСМ с данными традиционно используемых для диагностики методов (ИФА и ПЦР), которое составило около 75%.

В перспективе возможно существенное повышение чувствительности за счёт ориентированной посадки моноклональных антител (например, с помощью NTA-His₆ процедуры) против исследуемых маркеров заболеваний на подложки атомно-силового микроскопа, так как такая схема иммобилизации антител повышает количество комплексов, образующихся на подложке атомно-силового микроскопа, как было показано в работе [20].

ВЫВОДЫ. Показана возможность выявления маркеров гепатитов В и С в сыворотке крови с помощью атомно-силовой микроскопии. Данный метод позволяет выявлять HCVcoreAg и HBsAg, а также вирусные фрагменты, содержащие эти антигены, в сыворотке крови человека. Было показано, что совпадение результатов, полученных методом АСМ с результатами ИФА и ПЦР, составляет около 75%.

Работа была выполнена в рамках ФЦП "Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2007-2012 гг.", ГК №02.552.11.7060; а также при поддержке гранта РФФИ 09-04-12113-ОФИ.

ЛИТЕРАТУРА

1. Farci P., Alter H.J., Miller R.H., Shih J.W., Jett B., Purcell R.H. (1991) J. Med. Virol., **37**, 210-214.
2. Баранов А.А., Каганов Б.С. и др. (2003) Диагностика и лечение хронических вирусных гепатитов В, С и D у детей. М.
3. Archakov A.I., Ivanov Y.D., Lisitsa A.V., Zgoda V.G. (2007) Proteomics, **7**(1), 4-9.
4. Anderson N.L., Anderson N.G. (2002) Molecular & Cellular Proteomics, **1**(11), 845-867.
5. Sabatino L., Chopra I.J., Tanavoli S., Iacconi P., Iervasi G. (2001) Thyroid., **11**, 733-739.
6. Ivanov Yu.D., Kanaeva I.P., Eldarov M.A., Skryabin K.G., Lehnerer M., Schulze J., Hlavica P. Archakov, A. I. Biochem. (1997) Mol. Biol. Int., **42** (4), 731-737.
7. Ivanov Yu. D., Kanaeva I.P., Kuznetsov V.Yu., Lehnere, M., Schulze J., Hlavica P., Archakov A.I. (1999) Arch. Biochem. Biophys., **362**(1), 87-93.
8. Ivanov Yu. D., Usanov S.A., Archakov A. I. (1999) Biochem. and Mol. Biol. Int., **47**(2), 327-336.
9. Ivanov Yu.D., Kanaeva, I.P., Archakov A.I. (2000) Biochem. Biophys. Res. Commun., **273**, 750-752.
10. Иванов Ю.Д., Гнеденко О.В., Конев В.А., Ковалев О.Б., Николаева Л.И., Семенова Н.В., Учайкин В.Ф., Арчаков А.И. (2001) Вопр. Мед. Хим., **47**(4), 419-425.
11. Ivanov Yu.D., Gnedenko O.V., Nikolaeva L.I., Konev V.A., Kovalev O.B., Uchaikin V.F., Govorun V.M., Pokrovsky V.I., Archakov A.I. (2003) Zh. Microbiol., **2**, 58-62.
12. Sato K., Okamoto H., Aihara S., Hoshi Y., Tanaka T., Mishiro S. (1993) Virology, **196**, 354-357.
13. Prince A.M., Huima-Byron T., Parker T.S., Levine D.M. (1996) J. Viral Hepat., **3**, 11-17.
14. Andre P., Komurian-Pradel F., Deforges S., Perret M., Berland J.L., Sodoyer M., Pol S., Brechot C., Paranhos-Baccala G., Lotteau V. (2002) J. Virol., **76**, 6919-6928.

15. Yasui K., Wakita T., Tsukiyama-Kohara K., Funahashi S.I., Ichikawa M., Kajita T., Moradpour D., Wands J.R., Kohara M. (1998) *J. Virol.*, **72**, 6048–6055.
16. Dane D.S., Cameron C. H., Briggs M. (1970) *Lancet*, **1**, 695–698.
17. Wounderlich G., Bruss V. (1996) *Arch. Virol.*, **141**, 1191–1205.
18. Kuznetsov V.Yu., Ivanov Yu.D., Archakov A.I. (2004) *Proteomics*, **4**, 2390–2396.
19. Kuznetsov V.Yu., Ivanov Y.D., Bykov V.A., Saunin S.A., Fedorov I.A., Lemeshko S.V., Hui Bon Hoa G., Archakov A. I. (2002) *Proteomics*, **2**, 1699–1705.
20. Ghatnekar-Nilsson S., Dexlin L., Wingren C., Montelius L., Dorrebaek C.A.K. (2007) *Proteomics*, **7**, 540–547.

Поступила: 23. 06. 2008.

ATOMIC FORCE MICROSCOPY DETECTION OF SEROLOGICAL MARKERS OF VIRAL HEPATITES B AND C

***Yu.D. Ivanov¹, P.A. Frantsuzov¹, T.O. Pleshakova¹, V.S. Ziborov², S.K. Svetlov¹, N.V. Krohin¹,
V.A. Konev¹, O.B. Kovalev¹, V.F. Uchaikin¹, O.N. Yastrebova³, P.G. Sveshnikov⁴, A.I. Archakov¹***

¹Institute of Biomedical Chemistry RAMS 119121, Russia, Moscow, Pogodinskaya ul., 10;
tel.: +7 (495) 246-69-80; fax: +7 (495) 245-08-57; e-mail: Yurii.Ivanov@ibmc.msk.ru

²Scientific Association for High Temperatures RAS, Moscow

³JSV "VECTOR-BEST", Novosibirsk

⁴Russian Research Center of Molecular Diagnostics & Therapy, Moscow

The aim of the study was to demonstrate the possibility of detection of serological markers, containing the hepatitis B surface antigen (HBsAg) and hepatitis C virus core-antigen (HCVcoreAg) in human serum, by use of a new atomic force microscopy (AFM)-based nanotechnological approach.

In this study, the immobilization on AFM-chip of antibodies against the hepatitis B virus surface antigen (anti-HBsAg) as well as the antibodies against the hepatitis C virus core antigen (anti-HCVcoreAg) was performed. It was shown that such approach enables to detect HBsAg, HCVcoreAg and the viral fragments containing these antigens in the serum. Comparative analysis of detection of HBsAg- and HCVcoreAg – containing particles by use of the AFM method vs. traditional methods (ELISA, PCR) has demonstrated the 75% coincidence of results between the AFM and the latter two methods.

Key words: atomic-force microscopy, hepatitis B virus surface antigen (HBsAg), hepatitis C virus core antigen (HCVcoreAg).