

## НАНОБИОТЕХНОЛОГИИ

УДК 577.152.3

©Коллектив авторов

### ВИЗУАЛИЗАЦИЯ И ИДЕНТИФИКАЦИЯ ВИРУСНЫХ ЧАСТИЦ ГЕПАТИТА С ПРИ ПОМОЩИ АТОМНО-СИЛОВОЙ МИКРОСКОПИИ, СОПРЯЖЕННОЙ С МС/МС АНАЛИЗОМ

*А.Л. Кайшева<sup>1\*</sup>, Ю.Д. Иванов<sup>1</sup>, В.Г. Згода<sup>1</sup>, П.А. Французов<sup>1</sup>, Т.О. Плешакова<sup>1</sup>,  
Н.В. Крохин<sup>1</sup>, В.С. Зиборов<sup>2</sup>, А.И. Арчаков<sup>1</sup>*

<sup>1</sup>Учреждение российской академии медицинских наук Научно-исследовательский институт биомедицинской химии РАМН имени В.Н. Ореховича РАМН, Москва, 119121, ул. Погодинская, 10;

тел.: +7 495 2463761; факс: +7 495 2450857; эл. почта: kaysheva@gmail.com

<sup>2</sup>Объединенный Институт Высоких Температур РАН, Москва, Россия

Исследовали возможность обнаружения и идентификации вирусных частиц гепатита С (ВГС) с помощью масс-спектрометрии (МС) в комбинации с атомно-силовой микроскопией (АСМ). В основе данного АСМ-МС подхода лежит объединение двух методов: АСМ-биоспецифического фишинга, позволяющего выявлять, концентрировать из раствора и подсчитывать белковые комплексы на поверхности АСМ-наночипа, и метода масс-спектрометрической идентификации этих комплексов. Был проведен АСМ-биоспецифический фишинг белка HCVcoreAg из раствора на поверхности АСМ-наночипов с иммобилизованными моноклональными анти-HCVcoreAg, и было показано, что на АСМ-наночипах формировались комплексы HCVcoreAg/анти-HCVcore<sub>im</sub> в количестве достаточном для их последующей масс-спектрометрической идентификации. В данной работе было показано, что такой АСМ-МС подход позволяет масс-спектрометрически идентифицировать фрагменты вируса гепатита С, выловленные на поверхности АСМ-наночипа непосредственно из сыворотки крови.

**Ключевые слова:** атомно-силовая микроскопия (АСМ), масс-спектрометрия (МС), HCVcoreAg вируса гепатита С.

**ВВЕДЕНИЕ.** По данным ВОЗ, вирусом гепатита С инфицировано около 10% населения Земли, в том числе в России инфицировано 6 млн. человек. Геном ВГС представлен однонитевой РНК протяженностью около 10000 нуклеотидов [1]. Популяция ВГС крайне неоднородна. Идентифицировано 6 генотипов (классификация по Simmonds [2]), более 90 подтипов [3]. Устойчивость ВГС обусловлена его способностью реплицироваться с высоким уровнем мутаций, в результате чего возникают несколько иммунологически различающихся вариантов или квазивидов, благодаря которым вирус избегает иммунного ответа организма [4]. Острый гепатит С у 85% больных переходит в хронический, который в дальнейшем может развиваться в цирроз печени и гепатоцеллюлярную карциному [5, 6]. Чаще всего заболевание протекает бессимптомно [7]; поэтому очень важно своевременно диагностировать гепатит С у групп лиц, входящих в зону риска заражения.

В настоящее время в протеомной диагностике гепатита С используются ИФА-системы на выявление анти-HCVcoreAg. Однако, такие диагностикумы обладают существенными недостатками, обусловленными ложно положительной детекцией вирусного гепатита С у пациентов вследствие постинфекционного иммунитета, кросс-реактивности антител и низкой чувствительности белковых тестов в период острой фазы гепатита С. Более перспективным является подход, основанный на детекции антигена ВГС - HCVcoreAg, поскольку этот антиген

\* - адресат для переписки

появляется в сыворотке на 16 недель раньше, чем анти-НСVcoreAg антитела вследствие иммунного ответа организма [9, 10]. Попытки создать протеомные тест-системы для идентификации НCVcoreAg в период острой фазы в большинстве своем были неудачны. Это связано с недостаточной концентрационной чувствительностью протеомных методов, которая не превосходит  $10^{-12}$  М [8]. В настоящее время развиваются новые методы регистрации белковых маркеров на основе нанотехнологических подходов, которые позволяют создавать системы регистрации макромолекул с высокой чувствительностью и быстродействием анализа [9-30]. Среди них следует выделить метод на основе биоспецифического фишинга при помощи атомно-силовой микроскопии (АСМ), который позволяет достигать концентрационной чувствительности обнаружения белков в растворе  $10^{-17}$  М за счет концентрирования белков на АСМ-наночипе и их регистрации в режиме их счета [8]. Кроме того, нами была показана возможность применения АСМ-фишинга и для выявления вирусных частиц в сыворотке крови [31].

В то же время АСМ метод имеет свои ограничения, которые заключаются в том, что этот метод не позволяет идентифицировать вирусные частицы и отличать их от других фрагментов невирусной природы, неспецифически адсорбированных на поверхности АСМ-наночипа. Для преодоления этого ограничения в нашей работе была создана сопряженная АСМ-МС система, сочетающая возможности АСМ-фишинга и масс-спектрометрии, которая позволяет идентифицировать визуализированные объекты на поверхности АСМ-наночипа (рис. 1).

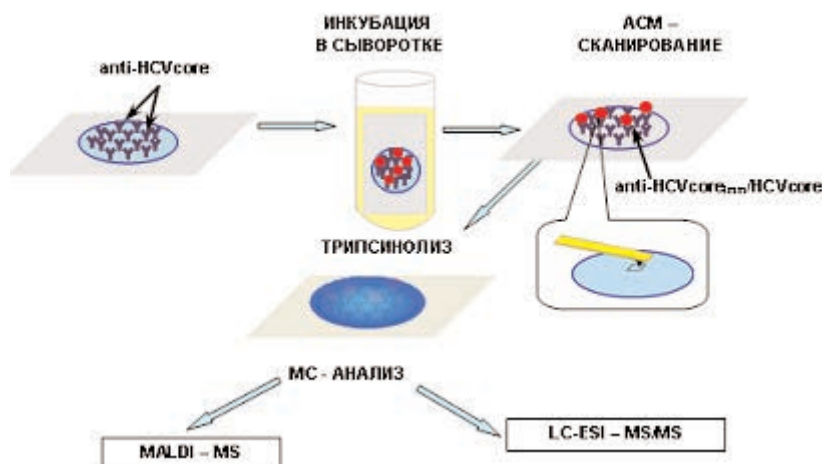


Рисунок 1.

Технологическая схема АСМ-МС анализа маркерных белков вирусного гепатита С в сыворотке крови.

## МЕТОДИКА.

### Реагенты.

НСVcoreAg антиген вируса гепатита С был получен в ЗАО “Вектор Бест” (Россия), моноклональные антитела против рекомбинантного НCVcoreAg – в НИИ молекулярной диагностики (Москва).

Раствор КФБ – 50 мМ фосфатно-солевой буфер с детергентом твин-20, pH 7,4 производства “Вектор-Бест”. Ацетонитрил, изопропанол, муравьиная кислота, дистиллированная вода производства Merck (США); трифторуксусная кислота, бикарбонат аммония производства Sigma (США);  $\alpha$ -циано-4-гидроксикоричная кислота (НССА), дигидроксibenзойная кислота (ДНВ) из Acros (США), трипсин был получен в Promega (США).

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

В работе были использованы сыворотки крови, полученные на кафедре детских инфекций РГМУ, в ЦНИИ Эпидемиологии МЗ РФ, РНИИ Геронтологии Росздрава.

#### *АСМ-МС анализ.*

В качестве зондов, иммобилизованных на АСМ-подложке, были использованы моноклональные анти-HCVcoreAg, способные формировать биоспецифические комплексы с белковым маркером HCVcoreAg. На первом этапе исследования при помещении АСМ-наночипа в биологический материал происходило вылавливание и концентрирование молекул HCVcoreAg на поверхности чипа и их АСМ-регистрация, затем на втором этапе исследования проводилась масс-спектрометрическая идентификация этих молекул. По нашим данным, предложенный метод позволяет выявлять HCVcoreAg в сыворотке крови напрямую без использования меток и дополнительных операций по истощению сыворотки крови. Получено хорошее совпадение результатов АСМ-МС с методом ПЦР, которое составляет порядка 75% [31].

АСМ-подсчет белков и комплексов антиген/антитело на поверхности АСМ-наночипа проводили на основе анализа высот соответствующих изображений, измеренных с помощью АСМ, согласно методике, изложенной в [31]. Был использован АСМ NTEGRA (NT-MDT, Россия). Измерения проводились в воздухе в полуконтактном режиме. В качестве зондов использовались кантилеверы фирмы NT-MDT серии NSG10. Типичный радиус кривизны игл составлял 10 нм, резонансная частота находилась в пределах от 190 до 325 кГц. Площадь сканирования наночипа составляла 400 мкм<sup>2</sup>. Каждое измерение проводили не менее 3 раз.

#### *- Протеолиз на поверхности АСМ-наночипа.*

Трипсинолиз белков, выловленных на анти-HCVcoreAg, проводили на поверхности АСМ-наночипа. Для этого к 5 мкл 50 мМ NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> буферного раствора (рН 7,4) добавляли 1 мкл раствора трипсина (10<sup>-9</sup> М). Трипсинолиз проводили по стандартной схеме, аналогично описанной в [32]. После этого трипсинолитическая смесь смывалась с АСМ-наночипа для масс-спектрометрического анализа.

#### *- MALDI-TOF-MS анализ.*

MALDI-TOF-MS анализ выполняли на времяпролетном масс-спектрометре Bruker Microflex (Bruker Daltonics, Германия), оснащенным азотным лазером с длиной волны излучения  $\lambda=337$  нм. Масс-спектрометрический анализ проводили в режиме отражения с напряжением на отражателе 17 кВ, время задержки импульса составляло 200 нс. Накопление спектра происходило за 1000 лазерных импульсов.

Для получения масс-спектров образцов раствор трипсинолизированных проб, снятых с АСМ-наночипа, смешивали с насыщенным раствором матрицы (2,5-дигидроксibenзойная кислота в 50% ацетонитриле с 0,7% ТФУ), и полученную смесь наносили на MALDI-мишень AnchorChip<sup>tm</sup>, согласно стандартному протоколу [33].

Масс-спектры анализировали программой flexAnalysis версии 2.0. Идентификацию белков проводили с помощью пакета программ Mascot Server с использованием библиотеки данных белковых последовательностей NCBI по всем таксономическим группам. Были выбраны следующие параметры поиска: 1-2 пропущенных сайта гидролиза, точность измерения моноизотопных масс допускалась не более 80 ppm, в качестве фиксированной модификации был выбран окисленный метионин.

#### *-LC-MS/MS анализ.*

Масс-спектрометрический тандемный анализ белков проводили на хромато-масс-спектрометрической системе LC/MSD Trap XCT Ultra (Agilent, США), оснащённой электроспрейным интерфейсом chip-ESI-online, наноасосом и капиллярным насосом. Для этого образцы объемом 1 мкл наносились на чип-систему Zorbax, с объемом насыщения 40 нл аналитической колонки C18-SB, с размерами колонки – 75 мкм×43 мм×5 мкм.

Разделение пептидов осуществляли с помощью раствора А (0,1% муравьиная кислота в дистиллированной воде) и раствора Б (0,1% муравьиная кислота в 90/10 ацетонитрила/дистиллированной воде). Элюцию пептидов с хроматографической

колонок проводили в градиенте раствора Б от 0 до 80% в течение 80 минут по следующей схеме: 0 мин – 5% раствор Б, 45 мин – 45% раствор Б, 60 мин – 100%, 75 мин – 5% раствор Б. Скорость потока через капиллярный насос была постоянна и составляла 3 мкл/мин, скорость потока через нанонасос составляла 0,3 мкл/мин.

Масс-спектрометрический анализ проводили в режиме ESI-положительной ионизации со следующими параметрами ионной ловушки: скорость потока осушающего газа составляла 3,5 л/мин, температура осушающего газа - 320°C, напряжение на источнике составляло 1,8 кВ, на скиммере 30 В, на выходе из капилляра 100 В. Масс-спектры снимали в автоматическом “MS(2)” режиме, с диапазоном  $m/z=400-1200$ , МС/МС фрагментацию проводили в диапазоне  $m/z=200-1350$ .

МС и МС/МС спектры анализировали программой Data Analysis версии 3.3.

Идентификацию белков проводили с помощью пакета программ Mascot Server с использованием библиотеки данных аминокислотных последовательностей белков NCBI по всем таксономическим группам. Были выбраны следующие параметры поиска: 1 пропущенный сайт гидролиза, точность измерения иона-предшественника – 200 ppm, точность измерения дочерних ионов – 300 ppm; в качестве фиксированной модификации была выбрана модификация - окисленный метионин.

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.

*Обнаружение и идентификация рекомбинантного HCVcoreAg в растворе с помощью комбинации АСМ-МС методов.*

На первом этапе для демонстрации возможностей АСМ-МС метода для анализа белков были проведены эксперименты по выявлению и идентификации рекомбинантного HCVcoreAg из КФБ раствора с помощью АСМ-МС подхода.

Для этого в первой части процедуры АСМ-наночип с ковалентно иммобилизованными в рабочей зоне его поверхности анти-HCVcoreAg инкубировали в КФБ растворе (рН 7,4), содержащем рекомбинантный HCVcoreAg в концентрации  $10^{-8}$  М. В результате чего на поверхности рабочей зоны АСМ-наночипа кроме объектов высотой 2 нм, соответствующих иммобилизованным анти-HCVcoreAg, наблюдалось образование объектов высотой около 7 нм (рис. 2А), размер которых соответствовал размерам белок-белковых комплексов анти-HCVcoreAg/HCVcoreAg [31]. В контрольных экспериментах по выявлению неспецифически сорбированных молекул HCVcoreAg на поверхности АСМ-наночипа, не содержащей иммобилизованные анти-HCVcoreAg, формирование объектов высотой более 2 нм не наблюдалось, что указывало на отсутствие неспецифической сорбции HCVcoreAg в выбранных условиях (рис. 2Б).

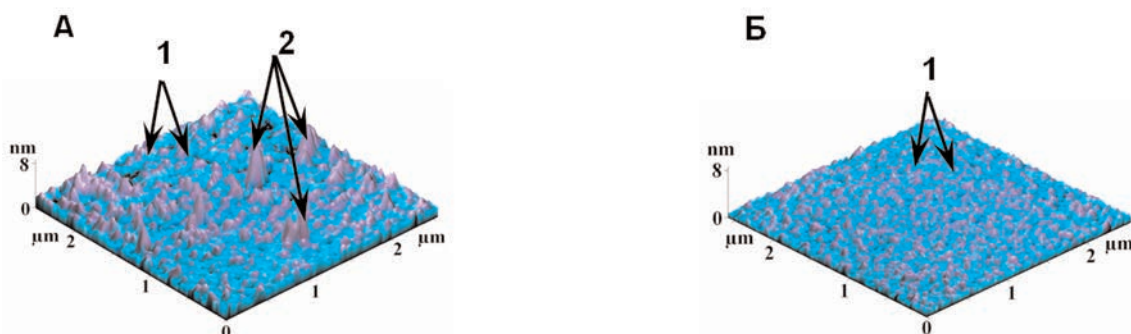


Рисунок 2.

АСМ-изображение рабочей зоны поверхности АСМ-наночипа с иммобилизованными моноклональными анти-HCVcoreAg после его инкубации в растворе  $10^{-8}$  М HCVcoreAg (А); изображение контрольной зоны АСМ-наночипа, не содержащей иммобилизованные анти-HCVcoreAg, после его инкубации в растворе HCVcoreAg (Б). Экспериментальные условия: измерения проводились в полуконтактном режиме в воздушной среде на АСМ NTEGRA.

Размеры отсканированных кадров -  $5 \times 5$  мкм.

Стрелками 1 указаны анти-HCVcoreAg, стрелками 2 указаны комплексы анти-HCVcoreAg/HCVcoreAg.



Во второй части процедуры ACM-МС анализа была проведена масс-спектрометрическая идентификация визуализированных объектов на поверхности ACM-наночипа **в рабочей зоне** – с иммобилизованными анти-HCVcoreAg, и **в контрольной зоне** – без иммобилизованных анти-HCVcoreAg до и после их инкубации в растворе HCVcoreAg ( $C=10^{-8}$  М). Анализ MALDI-TOF-MS спектра (рис. 3) трипсинолизированных объектов рабочей зоны ACM-наночипа с анти-HCVcoreAg<sub>im</sub> до его инкубации в растворе HCVcoreAg позволил достоверно выявить наличие анти-HCVcoreAg по 9 идентифицированным пептидам: IVPRDCGCK ( $m/z=990,5$ ), VNSAAFPAPIEK ( $m/z=1243,8$ ), PKDVLITLTPK ( $m/z=1325,8$ ), VNSAAFPAPIEKTISK ( $m/z=1673,8$ ), TISKTKGRPKAGPQADR ( $m/z=1812,0$ ), SVSELPIMHQDWLNGK ( $m/z=1854,8$ ), EFKCRVNNSAAFPAPIEK ( $m/z=1906,8$ ), SVSELPIMHQDWLNGKEFK ( $m/z=2275,1$ ), PKAGPQADRRLHRCTPFHLPR ( $m/z=2452,0$ ). В контрольной зоне ACM-наночипа пиков с  $m/z$  значениями, соответствующими анти-HCVcoreAg, не наблюдалось (данные не приведены).

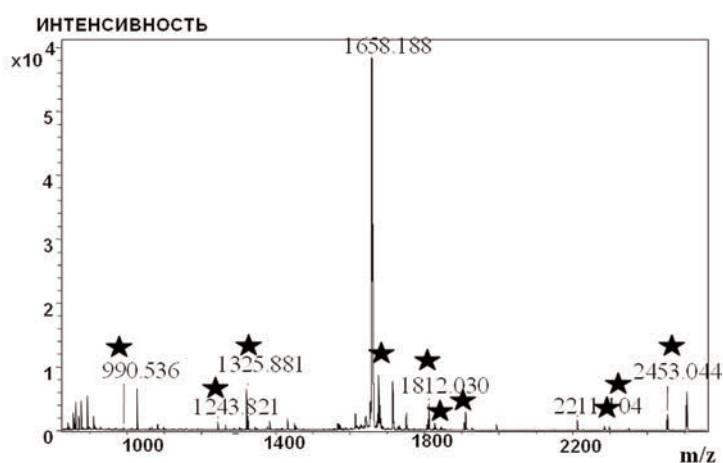


Рисунок 3.

Масс-спектр гидролизированных объектов рабочей зоны ACM-наночипа с иммобилизованными анти-HCVcoreAg. Звездочками отмечены пептиды соответствующие анти-HCVcoreAg. Экспериментальные условия: измерения были проведены на MALDI-TOF-MS масс-спектрометре Microflex (Bruker).

Далее проводили MALDI-TOF-MS и ESI-MS/MS анализы рабочей и контрольной зон ACM-наночипов, инкубированных в растворе рекомбинантного HCVcoreAg. Анализ MALDI-TOF-MS спектра рабочей зоны ACM-наночипа (рис. 4) позволил выявить пептиды, соответствующие анти-HCVcoreAg: VNSAAFPAPIEK ( $m/z=1243,8$ ), PKDVLITLTPK ( $m/z=1325,8$ ), VNSAAFPAPIEKTISK ( $m/z=1673,8$ ), TISKTKGRPKAGPQADR ( $m/z=1812,0$ ), SVSELPIMHQDWLNGK ( $m/z=1854,8$ ), EFKCRVNNSAAFPAPIEK ( $m/z=1906,8$ ), и также пептиды, не принадлежащие анти-HCVcoreAg, а соответствующие пептидам антигена HCVcoreAg: STNPKPQK ( $m/z=899,51$ ), MSTNPKPQK ( $m/z=1030,58$ ), GPRLGVRATR ( $m/z=1082,075$ ), FPGGGQIVGGVYLLPR ( $m/z=1629,82$ ), TSERSQPRGGRQPIPK ( $m/z=1793,8600$ ), RPQDVKFPGGGQIVGGVYLLPR ( $m/z=2353,23$ ).

Анализ ESI-MS/MS спектров той же рабочей зоны ACM-наночипа также позволил достоверно обнаружить HCVcoreAg по двум идентифицированным уникальным пептидам: RPQDVKFPTGGQIVGGVYLLPR ( $m/z=799,7$ ) и RPQDVKFPSGGQIVGGVYLLPR ( $m/z=795,0$ ). Соответствующие tandemные спектры этих пептидов представлены на рисунке 5. Для пептида со значением  $m/z=795,0$  Mascot-идентификатором было выявлено 7 фрагментов, которые совпали с теоретически предсказанными значениями  $m/z$  фрагментов данного пептида, анализ пептида со значением  $m/z=799,7$  выявил 20 фрагментов, которые совпали с теоретически предсказанными фрагментами.

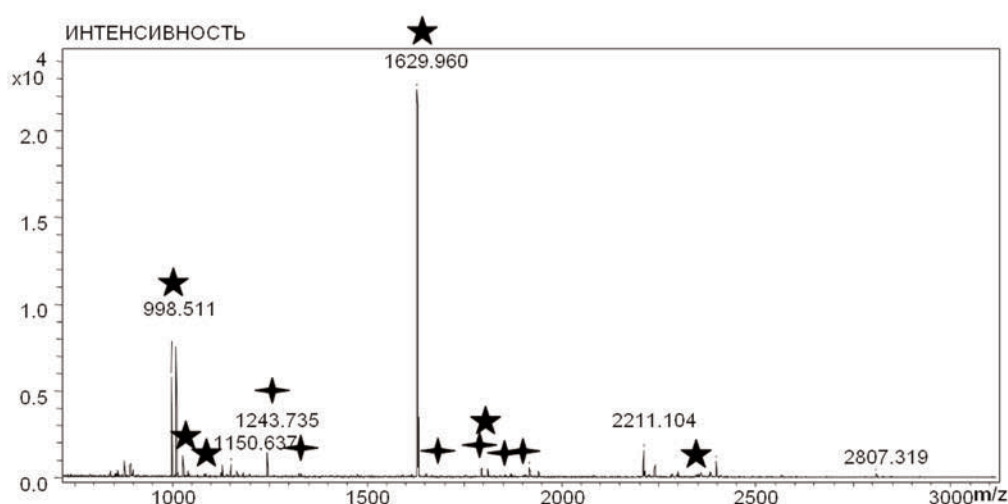


Рисунок 4.

Масс-спектр трипсинолизированных объектов рабочей зоны АСМ-наночипа с иммобилизованными анти-HCVcoreAg, инкубированный в растворе HCVcoreAg ( $C=10^{-8}$  M). ♦ отмечены пептиды соответствующие анти-HCVcoreAg, ★ отмечены пептиды соответствующие HCVcoreAg.

Экспериментальные условия: измерения были проведены на MALDI-TOF-MS масс-спектрометре Microflex (Bruker).

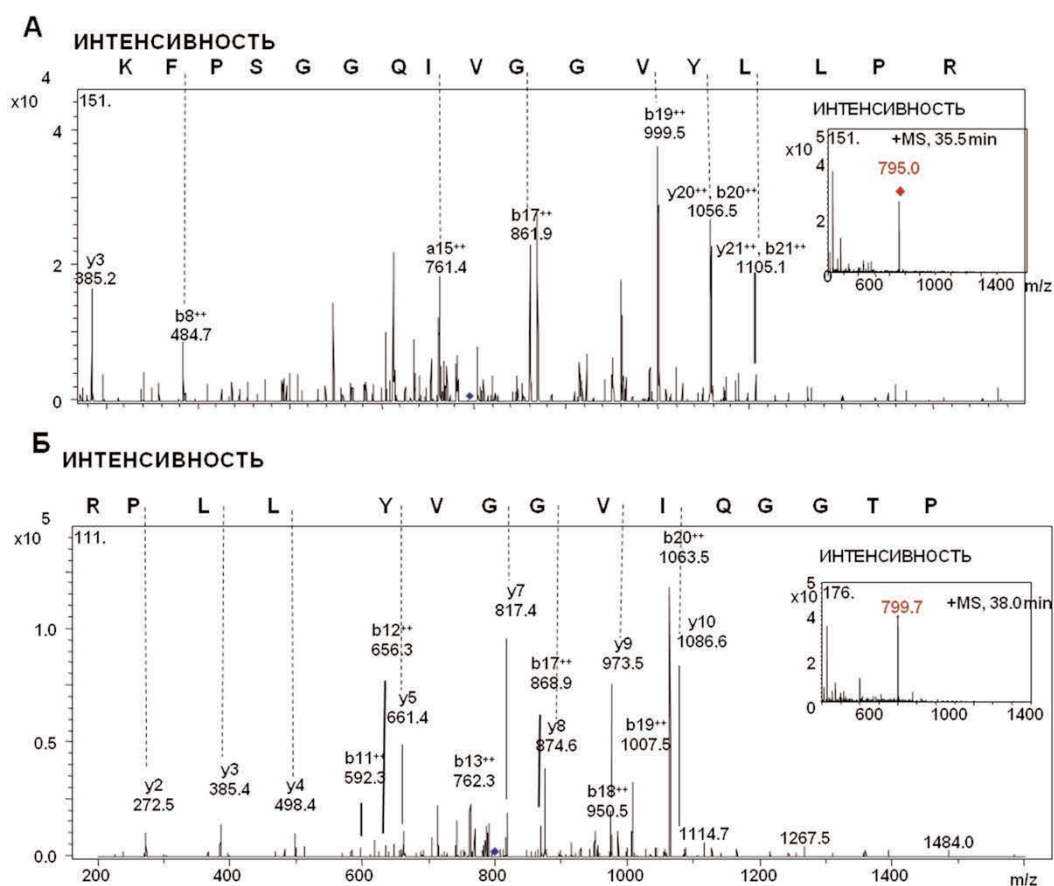


Рисунок 5.

Масс-спектр трипсинолизированных объектов АСМ-наночипа с иммобилизованными анти-HCVcoreAg, инкубированный в растворе HCVcoreAg ( $C=10^{-8}$  M). А, Б – пептиды HCVcoreAg с  $m/z=795,0$  и  $m/z=799,7$ . Экспериментальные условия: измерения были проведены на масс-спектрометре LC/MSD Trap XCT Ultra (Agilent).

Масс-спектрометрический анализ контрольных зон АСМ-наночипов, инкубированных в растворе рекомбинантного HCVcoreAg, наличие неспецифически сорбированных молекул антигена не выявил.

*Выявление и идентификация вирусных частиц с помощью сопряжения АСМ-МС методов в сыворотке крови.*

Следующим этапом исследования стала адаптация АСМ-МС метода для выявления и идентификации вирусных частиц в сыворотке человека. Для этого АСМ-наночипы инкубировали в сыворотках, положительных и отрицательных по наличию РНК вируса гепатита С, по данным ПЦР анализа.

С целью выяснения вклада неспецифической сорбции компонентов сыворотки крови в формирование объектов на поверхности АСМ-наночипов вначале были проведены контрольные эксперименты. В первой серии контрольных экспериментов АСМ-наночип, не содержащий иммобилизованных анти-HCVcoreAg инкубировали в положительной на ВГС сыворотке №54290 человека. При этом на наночипе (рис. 6А) регистрировались АСМ-изображения объектов (3) с высотой не более 5 нм; объекты с большей высотой 7–40 нм на поверхности АСМ-наночипов не наблюдались.

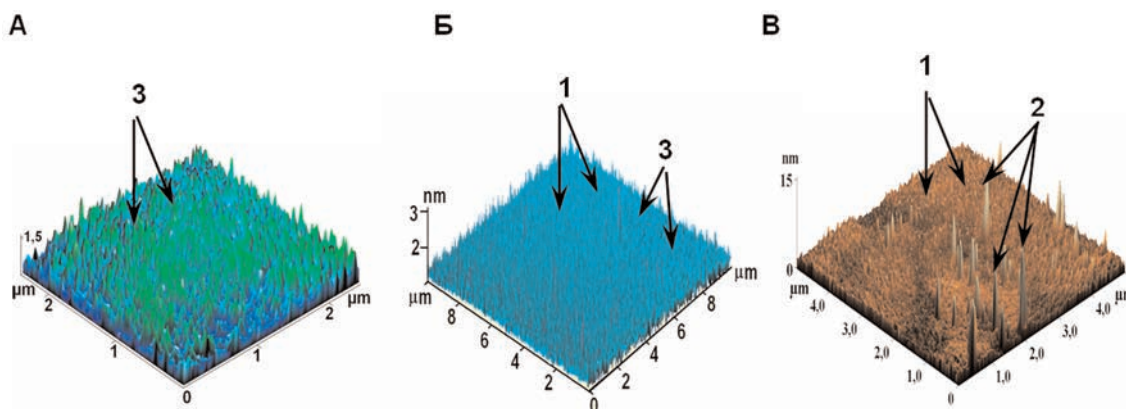


Рисунок 6.

АСМ-изображение поверхности наночипа с иммобилизованными анти-HCVcoreAg после инкубации в сыворотке, не содержащей HCVcoreAg (А); АСМ-изображение поверхности наночипа без иммобилизованных анти-HCVcoreAg после инкубации в сыворотке, содержащей HCVcoreAg (Б); АСМ-изображение поверхности наночипа с иммобилизованными анти-HCVcoreAg после инкубации в сыворотке, содержащей HCVcoreAg (В).

Высоты изображений объектов, неспецифически сорбированных на поверхности, не превышают 5 нм (А, Б). Экспериментальные условия: измерения были проведены в полуконтактной моде в воздушной среде на АСМ NTEGRA. Размеры отсканированных кадров - 5×5 μm.

Стрелками 1 указаны анти-HCVcoreAg, стрелками 2 указаны комплексы анти-HCVcoreAg/HCVcoreAg, стрелками 3 указаны объекты неспецифической сорбции.

Вторая серия контрольных экспериментов проводилась для АСМ-наночипа с иммобилизованными анти-HCVcoreAg после его инкубации в отрицательной на гепатит С сыворотке человека с целью обнаружения перекрестной специфичности моноклональных анти-HCVcoreAg к компонентам сыворотки крови. В результате этого контрольного эксперимента также регистрировались объекты с высотой не более 5 нм на поверхности АСМ-наночипа (рис. 6Б).

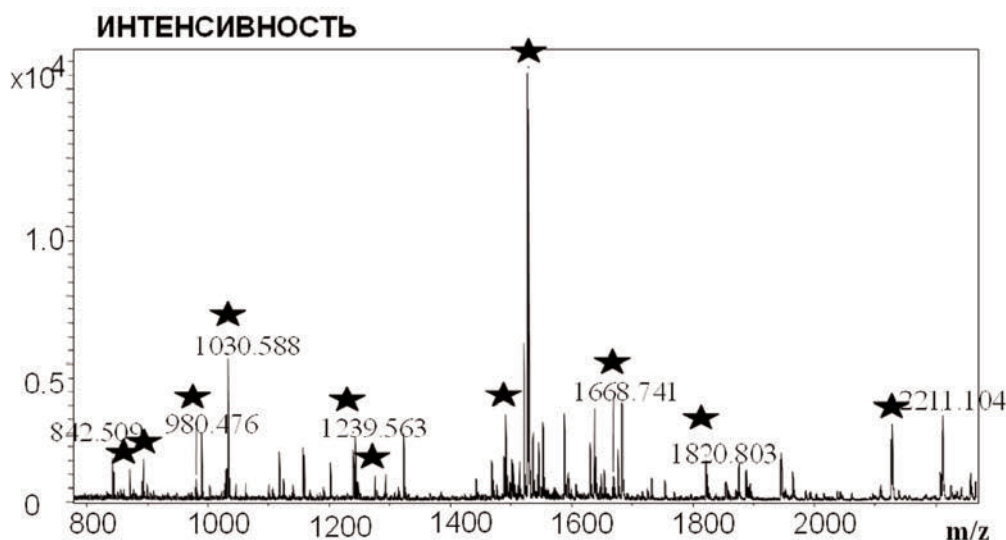
Таким образом, неспецифической сорбции на поверхности АСМ-наночипа компонентов сыворотки крови и сорбции на иммобилизованные моноклональные антитела за счёт перекрёстной реактивности для сыворотки №54290 не было выявлено.

## АСМ-МС АНАЛИЗ ВИРУСНЫХ ЧАСТИЦ ГЕПАТИТА С

На рисунке 6В представлено изображение АСМ-наночипа после инкубации в сыворотке №54290, содержащей HCVcoreAg; при этом на его поверхности наблюдалось формирование объектов (2) с размерами высот 5–40 нм, среди которых объекты с высотой 5–7 нм соответствовали по размеру комплексам анти-HCVcoreAg/HCVcoreAg, объекты с  $h=40$  нм соответствовали вирусным частицам, а объекты размерами  $7 < h < 40$  нм соответствовали по размерам комплексам анти-HCVcoreAg с фрагментами вирусных частиц, содержащих HCVcoreAg.

Последующую масс-спектрометрическую идентификацию АСМ-визуализированных объектов проводили с использованием MALDI и ESI типов ионизации.

На рисунке 7 представлен MALDI-TOF-MS спектр, полученный с поверхности АСМ-наночипа, инкубированного в положительной на наличие ВГС сыворотке №54290. Анализ этого спектра позволил достоверно выявить и идентифицировать HCVcoreAg по 11 пептидам: STNPKPQK ( $m/z=899,51$ ), RGPRLGVR ( $m/z=910,52$ ), ATRKTSEK ( $m/z=948,54$ ), KTNKNTNR ( $m/z=1003,61$ ), MSTNPKPQK ( $m/z=1030,58$ ), MSTNPKPQKK ( $m/z=1158,59$ ), GSRPSWGPTDPR ( $m/z=1312,63$ ), GSRPSWGPTDPRR ( $m/z=1468,77$ ), MSTNPKPQKKTNR ( $m/z=1529,82$ ), FPGGGQIVGGVYLLPR ( $m/z=1629,82$ ).



**Рисунок 7.**

Масс-спектр гидролизированных объектов АСМ-наночипа с иммобилизованными анти-HCVcoreAg, инкубированный в сыворотке №54290, содержащей HCVcoreAg. Звездочками отмечены пептиды соответствующие HCVcoreAg. Экспериментальные условия: измерения были проведены на MALDI-TOF-MS масс-спектрометре MICROFLEX (Bruker).

В результате анализа ESI-MS/MS спектров, представленных на рисунке 8, также был выявлен HCVcoreAg в сыворотке №54290 по двум идентифицированным пептидам: RPQDVKFPTGGQIVGGVYLLPR ( $m/z=799,7$ ) и RPQDVKFPSGGQIVGGVYLLPR ( $m/z=795,0$ ). Следует отметить, что те же пептиды были идентифицированы и при ESI-MS/MS анализе рекомбинантного HCVcoreAg из раствора, как было ранее показано в разделе 1 (рис. 5). Для пептида со значением  $m/z=795,0$  Mascot-идентификатором было выявлено 7 фрагментов, которые совпали с теоретически предсказанными значениями  $m/z$  фрагментов данного пептида, анализ пептида со значением  $m/z=799,7$  выявил 14 фрагментов, которые совпали с теоретически предсказанными фрагментами данного пептида.



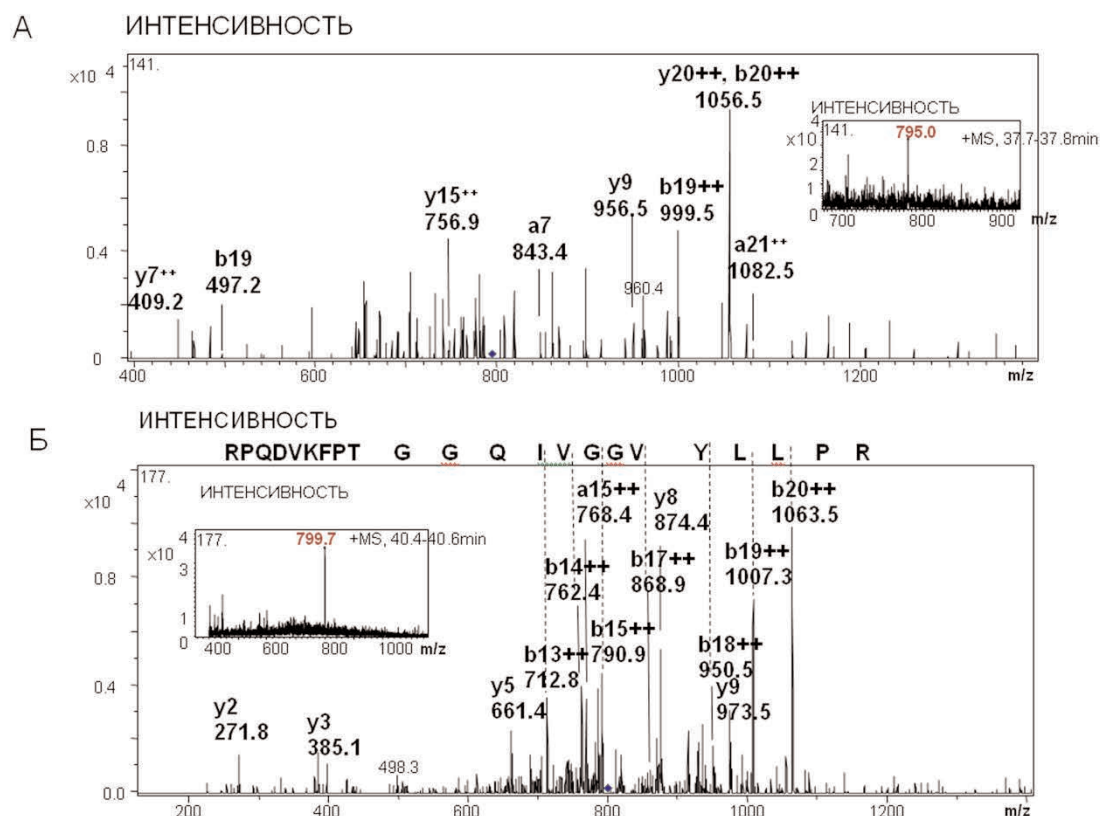


Рисунок 8.

Масс-спектр гидролизованных объектов с поверхности АСМ-наночипа с иммобилизованными анти-HCVcoreAg после инкубации в сыворотке № 54290. А, Б – пептиды HCVcoreAg с  $m/z=795,0$  и  $m/z=799,7$ . Экспериментальные условия: измерения были проведены на масс-спектрометре LC/MSD Trap XCT Ultra (Agilent).

Всего в нашей работе с помощью MALDI-TOF-MS и ESI-MS/MS были проанализированы АСМ-наночипы, инкубированные в 41 сыворотке человека; из них 29 сывороток были положительны на ВГС (содержали HCVcoreAg) и 12 сывороток были отрицательны на ВГС (не содержали HCVcoreAg). Рассмотрим далее результаты АСМ-MALDI-TOF-MS анализа АСМ-наночипов, инкубированных в сыворотках человека.

А) MALDI-TOF-MS анализ АСМ-наночипов, инкубированных в сыворотке крови.

С помощью MALDI типа ионизации всего было проанализировано 27 АСМ-наночипов, инкубированных в сыворотке крови. Анализ АСМ-МС сывороток крови, положительных на гепатит С, показал, что для большинства сывороток был идентифицирован Q8V7V3 изотип HCVcoreAg.

Сравнение результатов АСМ-MALDI-TOF-MS анализа сывороток крови с данными ПЦР приведено в таблице 1. Как видно из таблицы, данные ПЦР-анализа и АСМ-MALDI-TOF-MS подхода согласуются для 15 сывороток крови, из которых в 7 случаях оба подхода выявили наличие HCVcoreAg в сыворотках человека, для 8 сывороток крови оба подхода не обнаружили HCVcoreAg и, наконец, в 12 случаях метод ПЦР выявил наличие вируса гепатита С в крови, но АСМ-MALDI-TOF-MS анализ этих же сывороток не выявил наличие HCVcoreAg (табл. 1).

## АСМ-МС АНАЛИЗ ВИРУСНЫХ ЧАСТИЦ ГЕПАТИТА С

Таблица 1. Результаты MALDI-TOF-MS идентификации HCVcoreAg с АСМ-наночипов, инкубированных в 27 сыворотках крови.

Количество сывороток	ПЦР-анализ	АСМ-анализ	MALDI-MS идентификация HCVcoreAg
7	+	+	+
12	+	+	-
8	-	-	-

Исходя из приведенных данных можно сделать вывод, что хотя АСМ-МС метод с MALDI типом ионизации на приборе Microflex позволяет идентифицировать HCVcoreAg в сыворотке, но с невысоким около 50% совпадением результатов MALDI-TOF-MS с данными АСМ-анализа.

Б) ESI-MS/MS анализ АСМ-наночипов, инкубированных в сыворотке крови.

MS/MS идентификация HCVcoreAg проведена с помощью программы Mascot по двум и более уникальным пептидам антигена. С помощью АСМ-ESI-MS/MS-анализа всего было проанализировано 14 сывороток, 10 из которых были положительны на ВГС, по данным ПЦР; и 4 сыворотки были отрицательны на ВГС. Данные представлены в таблице 2. Как видно из таблицы 2, анализ 14 сывороток крови показал совпадение результатов методов ПЦР/АСМ и ESI-MS/MS для 7 сывороток крови, но для 7 сывороток, положительных на гепатит С, по данным ПЦР и АСМ, MS/MS анализ не выявил наличие вирусного антигена.

Таблица 2. Результаты масс-спектрометрической идентификации с помощью программы Mascot HCVcoreAg с АСМ-наночипов, инкубированных в 14 сыворотках крови.

Количество сывороток	ПЦР/АСМ анализ ВГС	MS/MS идентификация HCVcoreAg (Mascot)
3	+	+
7	+	-
4	-	-

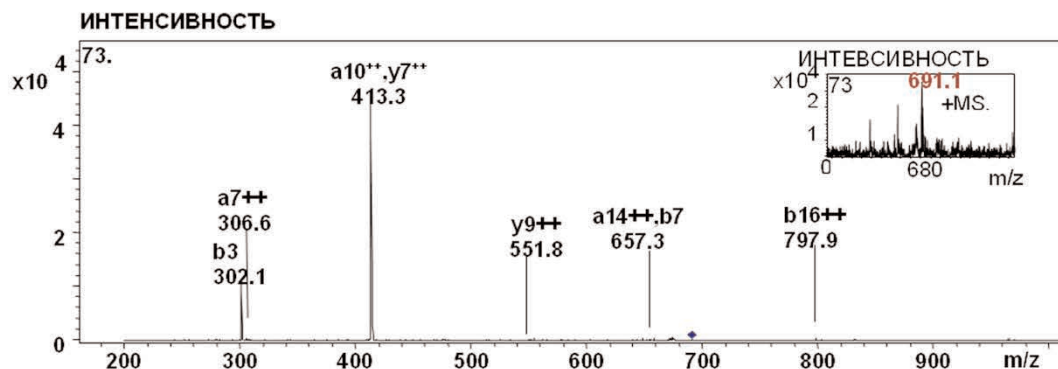
Для случаев, когда Mascot-идентификация антигена HCVcoreAg не давала достоверных результатов вследствие идентификации лишь одного пептида HCVcoreAg, применялся поиск возможных аминокислотных замен в полипептидной последовательности HCVcoreAg, которые обусловлены прежде всего наличием переменных участков в последовательности ВГС антигена. Для выявления этих замен в качестве матрицы выравнивания из библиотеки данных NCBI была выбрана последовательность - Core protein ВГС, которая была идентифицирована для большинства исследуемых АСМ-MALDI-TOF-MS анализом сывороток крови.

При выравнивании аминокислотных последовательностей HCVcoreAg, выявленного в различных сыворотках, было обнаружено, что антиген HCVcoreAg является достаточно консервативным белком. Известно, что степень идентичности аминокислотных остатков составляет около 85,3%, наиболее высококонсервативными участками HCVcoreAg являются: гидрофобный домен, включающий аминокислотные остатки (а.о.) 24-39, который вовлечен в белок-белковые и белок-РНК взаимодействия; кластеры 38-43 а.о., 58-64 а.о. и 76-107 а.о. [34].

На рисунке 9А представлены тандемные спектры пептидов HCVcoreAg, полученных с поверхности АСМ-наночипа, инкубированного в сыворотке №20. В результате Mascot-анализа спектров был идентифицирован уникальный пептид

HCVcoreAg FPGGGQIVGGVYLLPRMGRP ( $m/z=691,1$ ). На этом же рисунке 9Б представлен тандемный спектр другого идентифицированного пептида HCVcoreAg TPQDVKFPGGGQIVGGVYLLPR ( $m/z=766,5$ ), который отличается от пептида матрицы выравнивания RPQDVKFPGGGQIVGGVYLLPR ( $m/z=799,9$ ) всего лишь заменой одного аминокислотного остатка (Arg17→Tpe) неконсервативного участка HCVcoreAg.

А



Б

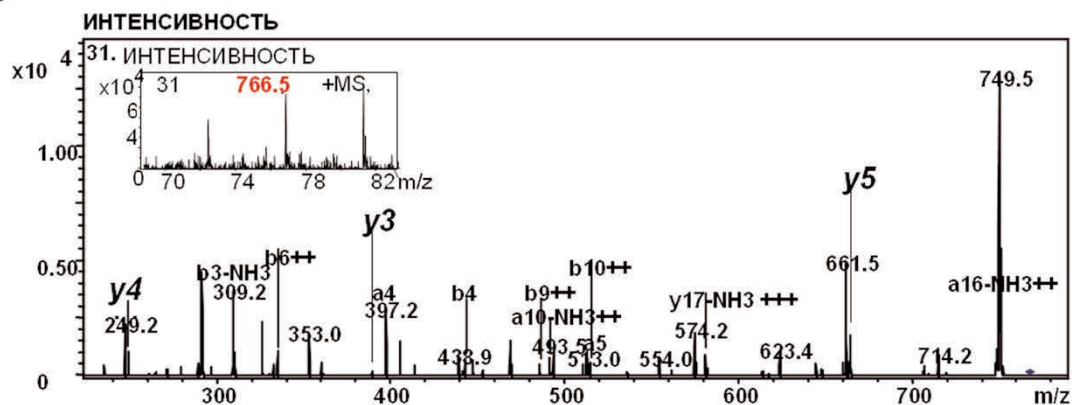


Рисунок 9.

Тандемные спектры пептидов HCVcoreAg, полученные в результате ACM-МС анализа сыворотки крови: А – FPGGGQIVGGVYLLPRMGRP, Б – TPQDVKFPGGGQIVGGVYLLPR. Цифрами отмечены идентифицированные фрагменты пептидов.

В результате сравнения спектров фрагментации двух пептидов с  $m/z=799,9$  и с  $m/z=766,5$  было выявлено несколько идентичных фрагментов для обоих пептидов: y3 ( $m/z=388,28$ ), y4<sup>++</sup> ( $m/z=249,24$ ) и y5 ( $m/z=661,4$ ). При сравнении теоретически предсказанного спектра фрагментации пептида TPQDVKFPGGGQIVGGVYLLPR ( $m/z=766,5$ ) с экспериментально полученным спектром было выявлено 15 идентичных фрагментов.

Сравнение данных анализа ACM-ESI-MS/MS с учетом однократных аминокислотных замен с данными ПЦР представлены в таблице 3.

Как видно из столбцов №№ 2 и 3 таблицы 3, данные ПЦР анализа и данные ACM-ESI-MS/MS полностью согласуются. Во всех сыворотках, положительных на гепатит С, по данным ПЦР-анализа, ACM-ESI-MS/MS подход выявил наличие HCVcoreAg. В результате анализа аминокислотных последовательностей HCVcoreAg в семи сыворотках крови были выявлены следующие аминокислотные замены в неконсервативных участках антигена: Arg17→Tpe, Tpe75→Ала, Глн78→Ала, Лиз91→Цис.

## АСМ-МС АНАЛИЗ ВИРУСНЫХ ЧАСТИЦ ГЕПАТИТА С

Таблица 3. Результаты масс-спектрометрической идентификации HCVcoreAg с учетом аминокислотных замен с поверхности АСМ-наночипов, инкубированных в 11 сыворотках крови.

Количество сывороток	ПЦР/АСМ анализ ВГС	Идентификация по MS/MS спектрам с учетом аминокислотной замены
Столбец №1	Столбец №2	Столбец №3
7	+	+
4	-	-

Как видно из таблицы 3, наблюдается совпадение результатов АСМ с ESI-MS/MS анализа на уровне 100%, что выше, чем для АСМ-MALDI-TOF-MS. Таким образом, учет аминокислотных замен позволил повысить степень обнаружения HCVcoreAg с помощью АСМ-МС подхода в сыворотках крови, положительных на ВГС по данным ПЦР.

Как было показано ранее в [31], совпадение результатов в отдельности методов АСМ и ПЦР составляет 75%. Учитывая, что вероятность совпадения результатов АСМ-ESI-MS/MS равно произведению вероятностей совпадения АСМ с ПЦР и АСМ с МС, методика АСМ-выявления HCVcoreAg была идентична [31] то полная вероятность совпадений АСМ-ESI-MS/MS с ПЦР составляет:  $0,75 \cdot 1,00 = 0,75$ , или 75%.

**ВЫВОДЫ.** АСМ-МС подход позволяет выявлять и идентифицировать белки не только в однокомпонентных растворах, но и в сложных смесях, таких как сыворотка крови. К достоинствам АСМ-МС подхода относятся также возможность выявления белков без дополнительных процедур подготовки образцов и удаления высококопийных белковых фракций сыворотки, не требует введения меток.

Показано, что совпадение результатов, полученных методом АСМ-ESI-MS/MS анализа с данными ПЦР анализа составляет около 75% [31].

Работа была выполнена при поддержке Федерального агентства по науке и инновациям (Роснауки) в рамках ФЦНТП “Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития науки и техники” на 2002- 2006 годы. ГК № 02.512.11.2176, 06-04-08057-ОФИ, программы “ПРОТЕОМИКА В МЕДИЦИНЕ И БИОТЕХНОЛОГИИ”, Федерального агентства по науке и инновациям (Роснауки) в рамках ФЦНТП “Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2007-2012 годы”. ГК № 02.512.11.2334, от 1 июня 2009 г.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Kato N. (2000) Microb. Comp. Genomics, **5**, 129–151.
2. Simmonds E. (1994) Hepatology, **19**, 1321-1324.
3. Choo Q.L., Kuo G., Weiner A.J. (1989) Science, **244**, 359-362.
4. Ogata N., Alter H.J., Miller R.H., Purcell R.H. (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **88**, 3392-3396.
5. Alberti A.L. (2002) Hepatology, **36**, 195-200.
6. Di Bisceglie A.M. (2000) Hepatology, **31**, 1014-1018.
7. Seeff L.B. (1997) Hepatology, **26**, 21-28.
8. Archakov A.I., Ivanov Y.D., Lisitsa A.V., Zgoda V.G. (2007) Proteomics, **7**, 4-9.
9. Ivanov Yu.D., Kanaeva I.P., Eldarov M.A., Skryabin K.G., Lehnerer M., Schulze J., Hlavica P., Archakov A.I. (1997) Biochem. Mol. Biol. Int., **42**(4), 731-737.
10. Ivanov Yu. D., Kanaeva I.P., Kuznetsov V.Yu., Lehnerer M., Schulze J., Hlavica P. Archakov A.I. (1999) Arch. Biochem. Biophys., **362**(1), 87-93.



11. *Ivanov Yu.D., Usanov S.A., Archakov A.I.* (1999) *Biochemistry and Molecular Biology International*, **47**, 327-336.
12. *Kuznetsov V.Yu., Ivanov Yu.D., Archakov A.I.* (2004) *Proteomics*, **4**, 2390-2396.
13. *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.
14. *Kiselyova O.I., Yaminsky I.V., Ivanov Yu.D., Kanaeva I.P., Kuznetsov V.Yu., Archakov A.I.* (1999) *Arch. Bioch. Biophys.*, **371**, 1-7.
15. *Ivanov Yu.D., Kanaeva I.P., Archakov A.I.* (2000) *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **273**, 750-752.
16. *Ivanov Yu.D., Kanaeva I.P., Gnedenko O.V., Pozdnev V.F., Shumyantseva V.V., Samenkova N.F., Kuznetsova G.P., Tereza A.M., Schmid R.D., Archakov A.I.* (2001) *J. Molec. Recognition*, **14**, 185-196.
17. *Семенова Н.В., Иванов Ю.Д., Гнеденко О.В., Конев В.А., Ковалев О.Б., Учайкин В.Ф., Морозов С.Г., Арчаков А.И.* (2001) *Аллергия, астма и клин. иммунология*, **1**, 183-185.
18. *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. химии*, **47**, 419-425.
19. *Дмитриев Д.А., Массино Ю.С., Сегал О.Л., Смирнова М.Б., Павлова Е.В., Коляскина Г.И., Гуревич К.Г., Гнеденко О.В., Иванов Ю.Д., Арчаков А.И., Осипов А.П., Дмитриев А.Д., Егоров А.М.* (2002) *Биохимия*, **67**, 1643-1654.
20. *Dmitriev D.A., Massino Y.S., Segal O.L., Smirnova M.B., Pavlova E.V., Gurevich K.G., Gnedenko O.V., Ivanov Y.D., Kolyaskina G.I., Archakov A.I., Osipov A.P., Dmitriev A.D., Egorov A.M.* (2002) *J. Immunol. Methods*, **261**, 103-118.
21. *Archakov A.I., Ivanov Y.D.* (2002) *Methods in Enzymology*, **357**, 94-103.
22. *Veselovsky A.V., Ivanov Yu.D., Ivanov A.S., Archakov A.I., Lewi P., Janssen P.* (2002) *J. Mol. Recognition*, **15**, 405-422.
23. *Арчаков А.И., Иванов Ю.Д., Говорун В.М., Учайкин В.Ф., Николаева Л.И., Гнеденко О.В., Константинова Н.И., Ковалев А.В., Конев В.А.* (2003) *Аллергия, астма и клин. иммунология*, **9**, 175-178.
24. *Иванов Ю.Д., Гнеденко О.В., Николаева Л.И., Конев В.А., Ковалев О.Б., Учайкин В.Ф., Говорун В.М., Покровский В.И., Арчаков А.И.* (2003) *Микробиол.*, **2**, 58-62.
25. *Archakov A.I., Govorun V.M., Dubanov A.V., Ivanov Yu.D., Veselovsky A.V., Lewi P., Janssen P.* (2003) *Proteomics*, **3**, 380-391.
26. *Ivanov Yu.D., Govorun V.M., Bykov V.A., Archakov A.I.* (2006) *Proteomics*, **6**, 1399-1414.
27. *Archakov A.I., Ivanov Yu.D.* (2007) *Molecular Biosystems*, **3**, 336-342.
28. *Medvedeva N.V., Ipatova O.P., Ivanov Yu.D., Drozhzhin A.I., Archakov A.I.* (2007) *Biochemistry (Moscow) Supplement Series B Biomedical Chemistry*, **1**, 114-124.
29. *Иванов Ю.Д., Учайкин В.Ф., Плешакова Т.О., Франузов П.А., Светлов С.К., Конев В.А., Ковалев О.Б., Ястребова О.Н., Свешников П.Г., Уланова Т.И., Арчаков А.И.* (2006) *Физиология и патология иммунной системы*, **12**, 11-14.
30. *Archakov A., Ivanov Y., Lisitsa A., Zgoda V.* (2009) *Proteomics*, **9**, 1326-1343.
31. *Иванов Ю.Д., Франузов П.А., Плешакова Т.О., Зиборов В.С., Светлов С.К., Крохин Н.В., Конев В.А., Ковалев О.Б., Учайкин В.Ф., Ястребова О.Н., Свешников П.Г., Арчаков А.И.* (2009) *Биомед. хим.*, **55**, 689-701.
32. *Shevchenko A., Keller P., Mann M., Simons K.* (1997) *Electrophoresis*, **18**, 2591-2600.
33. *Kusmann M., Roepstorf P.* (2000) *Methods in Molecular Biology*, **146**, 405-424.
34. *Bukh J., Purcell R.H., Miller R.H.* (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**, 8239-8243.

Поступила: 01. 09. 2008.

**VISUALIZATION AND IDENTIFICATION OF HEPATITIS C VIRAL PARTICLES BY  
ATOMIC FORCE MICROSCOPY COMBINED WITH MS/MS ANALYSIS**

*A.L. Kaysheva<sup>1</sup>, Yu.D. Ivanov<sup>1</sup>, V.G. Zgoda<sup>1</sup>, P.A. Frantsuzov<sup>1</sup>, T.O. Pleshakova<sup>1</sup>, N.V. Krohin<sup>1</sup>,  
V.S. Ziborov<sup>2</sup>, A.I. Archakov<sup>1</sup>*

<sup>1</sup>Institute of Biomedical Chemistry RAMS, Pogodinskaya ul., 10, Moscow, 119121 Russia;  
e-mail: kaysheva@gmail.com

<sup>2</sup>Joint Institute for High Temperatures RAS, Moscow, Russia

Possibility of detection and identification of hepatitis C viral particles with mass spectrometry (MS) in combination with atomic force microscopy (AFM) had been investigated. AFM/MS approach is based on two technologies: 1. AFM-biospecific fishing that allows to detect, concentrate from solution and to count protein complexes on a surface of AFM-nanochip; 2. mass spectrometric identification of these complexes. AFM-biospecific fishing of HCVcoreAg from solution was carried onto surface of AFM-nanochips with immobilized anti-HCVcoreAg. It was shown that HCVcoreAg/anti-HCVcore<sub>im</sub> complexes were formed onto AFM-nanochips in quantity sufficient for mass spectrometric identification. Thus, AFM/MS approach allows to identify fragments of hepatitis C virus fished onto a surface of AFM-nanochip from serum.

**Key words:** atomic force microscopy, mass spectrometry, HCVcoreAg.