

Детекция, визуализация и количественный учёт вирусных частиц

методом атомно-силовой микроскопии

Шебанова А.С., Савватеев М.Н., Агапов И.И.

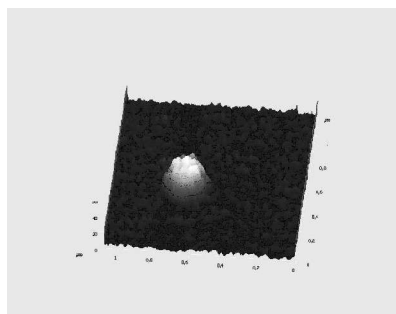
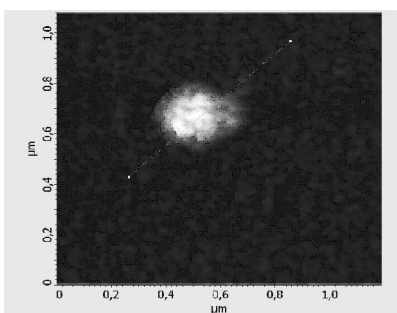
студент, сотрудники

Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

NT-MDT, НИИ Физических Проблем, Зеленоград, Россия

Несмотря на огромное количество существующих в настоящее время диагностических методов, проблема создания новых, быстрых и чувствительных, тест-систем для диагностики вирусных инфекций остаётся актуальной. Применение метода атомно-силовой микроскопии (АСМ) в данной области является перспективным, поскольку позволяет за относительно короткие промежутки времени детектировать, визуализировать и количественно учитывать вирусные частицы без необходимости физико-химических воздействий на исследуемый материал.

В настоящей работе было проведено АСМ-исследование вирусной вакцины против паротита и разработаны методики сорбции вирусных частиц на подложки для АСМ. Были протестированы различные сорбенты: слюда, слюда, модифицированная АРТЕS, полилизин и фетуин, кремний, графит, пластик; применялся метод ковалентной пришивки к слюде. Следующим этапом была разработка метода сорбции вирусных частиц на АСМ-подложку, модифицированную специфичными антителами. На свежесколотой слюде формировали слой антител, обладающих антивидовой специфичностью к иммуноглобулинам антипаротитной сыворотки. После проведения процедур отмывки и сушки на образце формировали второй, специфичный, слой иммуноглобулинов антипаротитной сыворотки. Далее на модифицированную таким образом подложку наносили вирусную вакцину и проводили АСМ-исследование. На сканах наблюдались частицы округлой формы диаметром 150-200 нм, отсутствующие на контрольных образцах, вместо вакцины на которые была нанесена среда инкубации вирусов. В процессе работы изучали морфологию частиц и производили их количественный подсчёт по специально разработанному алгоритму. Количество вирусных частиц в вакцине, оцененное с помощью метода АСМ, составило $2,8 \cdot 10^7$ частиц/мл вакцины, что хорошо согласуется с данными, полученными в исследовании вакцины методом real-time PCR, проводимом параллельно с АСМ-экспериментами - $2,34 \cdot 10^7$ копий вирусной РНК/мл вакцины.



А

Б

Рис.1. Частица паротитной вакцины на подложке из слюды, модифицированной специфичными антителами. А. 2D-изображение. Б.3D-изображение.

Проведённое исследование в целом продемонстрировало весьма успешное применение метода АСМ для изучения вирусных частиц и их количественного учёта и является начальным этапом разработки метода АСМ-диагностики вирусных инфекций.

S.R.Nettikadan, J.C.Jonson, C.Mosher, E.Henderson. Virus particle detection by solid phase immunocapture and atomic force microscopy. // Bioch. and Biophys. Res. Comm. 2003. V.311. P.540-545.