

**Французов Павел Александрович**

**АТОМНО-СИЛОВЫЕ ЧИПЫ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ МАРКЕРОВ ЗАБОЛЕВАНИЙ  
ВИРУСНЫМИ ГЕПАТИТАМИ В И С**

03.01.04. Биохимия

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание учёной степени  
кандидата биологических наук

Москва – 2010

Работа выполнена в Учреждении Российской академии медицинских наук Научно-исследовательском институте биомедицинской химии имени В.Н.Ореховича РАМН (ИБМХ РАМН)

**Научный руководитель:**

доктор биологических наук  
Иванов Юрий Дмитриевич

**Официальные оппоненты:**

доктор биологических наук  
Шумянцева Виктория Васильевна

кандидат химических наук  
Рубцова Майя Юрьевна

**Ведущая организация:**

ГОУ ВПО Российский  
Государственный Медицинский  
Университет Росздрава

Защита состоится «21» октября 2010г. в 12<sup>30</sup> часов на заседании Диссертационного совета Д.001.010.01 при ИБМХ РАМН по адресу: 119121, Москва, ул. Погодинская, д. 10.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ИБМХ РАМН по адресу: 119121, Москва, ул. Погодинская, д. 10.

Автореферат разослан «\_\_»\_\_\_\_\_2010 г.

Ученый секретарь  
Диссертационного совета,  
кандидат химических наук

Карпова Елена Анатольевна

## **ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ**

### **Актуальность исследования.**

Создание диагностических систем нового поколения является одним из приоритетных направлений современных медицинских исследований. Настоящая диссертационная работа посвящена созданию высокочувствительного молекулярного детектора на базе АСМ для выявления маркеров вирусных частиц гепатитов В и С в сыворотке крови.

Актуальность диагностики вирусных гепатитов В и С обусловлена широкой распространенностью этих заболеваний и их ростом в последние годы. Высокий уровень хронизации с возможным исходом в цирроз и первичный рак печени, частое поражение лиц молодого возраста также обуславливают повышенное внимание к вирусным гепатитам, важность подбора рациональных методов диагностики, лечения и профилактики.

В настоящее время основными методами детекции серологических маркеров заболеваний вирусными гепатитами являются иммуноферментный анализ (ИФА) и полимеразная цепная реакция (ПЦР). Эти методы зарекомендовали себя как высокоспецифичные и чувствительные. Однако, диагностика инфекционных заболеваний на ранних стадиях (на которых не проявляются клинические симптомы заболевания) с помощью тест-систем на основе этих методов является недостаточно эффективной. В частности, чувствительность метода ПЦР очень высока - порядка нескольких копий нуклеиновой кислоты. Но существует следующее ограничение - при помощи ПЦР возможно детектировать только нуклеиновые кислоты, но не белки, в то время как многие маркеры инфекционных заболеваний имеют белковую природу. Также на результаты ПЦР существенное влияние оказывает высокая вероятность контаминации образцов, что часто приводит к ложноположительным результатам. Существенным недостатком методов белковой диагностики (к которым относится ИФА), является предел чувствительности: концентрационный барьер для обнаружения и идентификации белковых молекул в биологическом материале, существующий в протеомике, ограничен  $10^{-12}$  М (Archakov A.I. et al., 2007). Такое ограничение традиционных методик медицинской белковой диагностики приводит к тому, что в настоящее время в диагностике используется лишь 10-20% потенциально значимых диагностических белковых маркеров, что в свою очередь сдерживает создание ранних диагностикумов, основанных на использовании маркерных белков.

Дальнейшее успешное развитие медицинской диагностики и диагностики вирусных гепатитов в частности требует разработки и внедрения методик, обладающих возможностями выявления и идентификации белков и их комплексов в многокомпонентном биологическом материале в диапазоне концентраций ниже  $10^{-12}$  М. Подходы, позволяющие решать эти задачи, основаны на использовании методов регистрации и идентификации единичных молекул с помощью молекулярных детекторов (Archakov A.I. et al., 2007). Используемый в настоящей работе метод АСМ предоставляет принципиальную возможность регистрировать и визуализировать отдельные белковые молекулы с субнанометровым

разрешением, а это – прямой путь к обнаружению биомаркеров на ранних стадиях заболеваний.

Молекулярный детектор на базе АСМ основан на мониторинге силы взаимодействия зонда микроскопа с молекулами, иммобилизованными на атомарно-гладкой поверхности подложки АСМ (Ivanov Yu.D. et al., 2003). При сканировании зондом вдоль такой поверхности измеряется высота молекул и их комплексов. Высота АСМ-изображений белкового комплекса, как правило, превышает высоту составляющих его изолированных молекул белков (Kuznetsov V.Yu. et al., 2004; Kuznetsov V.Yu. et al., 2002), что позволяет их различать.

Для создания диагностического устройства на базе АСМ необходима комбинация метода АСМ-регистрации в режиме счета отдельных молекул с методами биоспецифического фишинга (вылавливание биомолекул из раствора за счет их специфического связывания с молекулами-зондами, иммобилизованными на подложке АСМ). В настоящей работе комбинация АСМ/биоспецифический фишинг была использована для выявления серологических белковых маркеров вирусных гепатитов В и С – поверхностного антигена вируса гепатита В (HBsAg) и кор-антигена вируса гепатита С (HCVcoreAg).

Схема детекции серологических маркеров гепатитов В и С с помощью метода АСМ включает два этапа: на первом этапе проводится биоспецифический фишинг, для чего биологический микрочип (АСМ-чип), представляющий собой атомарно ровную подложку с монослоем иммобилизованных макромолекул-зондов, инкубируется в биологическом растворе, содержащем маркеры гепатитов В и С; на втором этапе проводится подсчет образовавшихся иммунокомплексов на поверхности АСМ-чипа с помощью АСМ.

**Цель работы** - разработка методики выявления в сыворотке крови людей маркеров заболеваний вирусными гепатитами В и С: HBsAg и HCVcoreAg на основе АСМ-чипов.

**Задачи работы:**

1. Подбор условий иммобилизации МКА против HBsAg и HCVcoreAg на подложку АСМ;
2. АСМ-визуализация иммобилизованных антител, определение их высоты и плотности иммобилизации на поверхности АСМ-чипа;
3. Разработка методики биоспецифического АСМ-фишинга для детекции HBsAg и HCVcoreAg с помощью АСМ-чипов;
4. АСМ-визуализация, определение высоты и количества иммунокомплексов анти-HBsAg/HBsAg и анти-HCVcoreAg/HCVcoreAg на поверхности АСМ-чипа;
5. Адаптация методики АСМ/биоспецифического фишинга для определения биологических маркеров вирусов гепатитов В и С в сыворотках крови больных людей с помощью метода АСМ;
6. Анализ сывороток, положительных и отрицательных (по данным ИФА и ПЦР) по содержанию биомаркеров вирусных гепатитов, с помощью разработанной методики на основе АСМ-чипов.

**Научная новизна работы.** Впервые разработана и реализована методика ковалентной иммобилизации МКА на подложку АСМ. Показано, что в результате иммобилизации образуется монослой антител, сохраняющих биологическую активность. Показано, что комбинация методов АСМ-регистрации и биоспецифического фишинга может применяться для выявления биологических маркеров вирусных гепатитов В и С в растворах и сыворотках крови людей. Получены изображения HBsAg, HCVcoreAg, антител против этих антигенов и иммунокомплексов. Впервые осуществлена АСМ-детекция серологических маркеров вирусов гепатитов В и С - HBsAg и HCVcoreAg - в сыворотках крови людей с помощью разработанных АСМ-чипов.

**Научно-практическая ценность работы.**

Показана возможность выявления серологических маркеров вирусов гепатитов В и С в сыворотках крови людей с помощью разработанных АСМ-чипов. Разработанная методика биоспецифического фишинга в комбинации с прямым подсчетом белковых комплексов с помощью молекулярного детектора на базе АСМ может служить основой для создания высокочувствительных диагностических систем нового поколения. Данный подход может быть использован в протеомике и медицинской диагностике для выявления других белков в многокомпонентном растворе.

**Апробация работы.**

Основные положения диссертации были представлены на VII Всероссийской конференции «Физикохимия ультрадисперсных (нано-) систем» (Ершово, Московская область, 2005 г.), Московской международной конференции «Биотехнология и медицина» (Москва, 2006 г.), 4-ом Московском международном конгрессе «Биотехнология: состояние и перспективы развития» (Москва, 2007 г.), Втором международном конкурсе научных работ молодых ученых в области нанотехнологий Rusnanotech 09 (Москва, 2009 г.).

**Публикации.**

По материалам диссертации опубликовано 3 статьи и 9 публикаций в сборниках материалов научных конференций.

**Объем и структура диссертации.**

Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания аппаратуры и методик исследования, изложения полученных результатов и их обсуждения, заключения, выводов и списка цитируемой литературы. Работа содержит 104 страницы машинописного текста, 6 таблиц и 29 рисунков. Список литературы включает 105 источников.

## ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТ

### Аппаратура и методики исследования.

**Использованные реактивы.** Для приготовления растворов использовали дистиллированную воду, дополнительно очищенную на деионизирующей установке “Milli-Q” (Millipore, США). Для приготовления растворов использовали следующие реактивы:  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  (х.ч.),  $\text{KOH}$  (х.ч.), толуол (х.ч.), этанол 96% (Реахим, Россия), EDC и NHS (Sigma США), концентрат ФСБ-Т (Вектор-БЕСТ, Россия). Для модификации поверхности слюды использовали APTES (Sigma, США). Для изготовления подложек АСМ-чипов использовали пластины слюды (muscovite grade V-4, 25 × 75 мм) (SPI, США). Химическую модификацию слюды проводили в атмосфере APTES в течение 15 мин с последующей отмывкой в этаноле.

**Исследуемые биологические объекты:** очищенный HBsAg (Aldevron, США); мышинные МКА против HBsAg (клон NF5, аффинно очищенные до 96%, НИИ Иммунологии МЗ РФ); рекомбинантный HCVcoreAg (любезно предоставлен О.Н. Ястребовой, Вектор-Бест, Россия); мышинные МКА против HCVcoreAg (клон 1E5, Virogen, США).

**Исследуемые сыворотки крови** людей были получены с Кафедры Инфекционных болезней у детей РГМУ, ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора, МНИИЭМ им. Габричевского. Все сыворотки были предварительно протестированы на содержание маркеров вирусных гепатитов: HBsAg, антител против ВГС (методом ИФА), РНК ВГС (методом ПЦР).

**Нековалентная иммобилизация белков на подложки АСМ.** 2 мкл раствора соответствующего белка (HBsAg, HCVcoreAg, МКА против HBsAg, МКА против HCVcoreAg) с концентрацией 1 мкмоль/л в 50 мМ КФБ, pH=7,4 наносили на поверхность свежесколотой слюды, инкубировали 3 мин (25°C), далее подложку отмывали в потоке деионизированной воды в течение 10 с и высушивали в потоке воздуха.

**Ковалентная иммобилизация МКА** на модифицированную APTES поверхность слюды. Растворы EDC и NHS готовили и отфильтровывали непосредственно перед проведением эксперимента. 2 мкл раствора белка (с необходимой концентрацией в 50 мМ КФБ) смешивали с 4 мкл водного раствора EDC (0,4 моль/л) и 4 мкл водного раствора NHS (0,1 моль/л). Полученную смесь (2 мкл на одну точку) немедленно наносили на поверхность силанизированной слюды и инкубировали 2 мин при комнатной температуре. После инкубации слюду отмывали 2 раза по 20 мин на шейкере (37 °С, 600 об./мин) и высушивали в потоке воздуха.

**Получение комплексов HCVcoreAg и HBsAg с антителами против них на поверхности АСМ-чипа.** АСМ-чип с иммобилизованными МКА инкубировали в микропробирке, с раствором соответствующего антигена (V=1 мл, T=25 °С, C(HCVcoreAg)

$=10^{-9}$  М,  $C(\text{HBsAg}) = 10^{-8}$  М). Затем АСМ-чип отмывали в воде на шейкере (37°C, 600 об./мин 2 раза по 20 мин.) и высушивали в потоке воздуха.

**Фишинг HBsAg и HCVcoreAg в сыворотках крови людей.** Исследуемую сыворотку (10мкл) разбавляли в 100 раз раствором ФСБ-Т. Далее АСМ-чип с иммобилизованными МКА инкубировали в микропробирке с разбавленной сывороткой (30 мин, шейкер 600 об/мин, 37 °С). После инкубации АСМ-чип отмывали в ФСБ-Т (2 раза по 30 мин, шейкер 600 об/мин, 37 °С) и в деионизованной воде (30 мин, шейкер 600 об/мин, 37 °С), высушивали в потоке воздуха. АСМ-измерения проводили на атомно-силовом микроскопе Solver P47H или зондовой нанолаборатории NTEGRA Prima (NT-MDT, Россия). Для АСМ-визуализации исследуемых объектов использовались кремниевые микрозонды NSG 10 (NT-MDT, Россия).

**Получение АСМ-изображений.** АСМ-измерения производили в воздушной среде в прерывисто-контактном режиме. Амплитуда свободных колебаний кантилевера в воздухе лежала в пределах 50-100 нм, автоматически поддерживаемая амплитуда колебаний кантилевера в подведенном к поверхности состоянии (параметр SetPoint) устанавливалась на уровне 60-70% от амплитуды свободных колебаний кантилевера в воздухе. Размеры сканов составляли 5×5 мкм, с разрешением 256×256 точек. Количество полученных сканов для каждого образца составляло не менее 10.

**Обработка АСМ-изображений.** Обработка сигнала, перевод его в цифровой вид, и формирование изображений производилось с помощью ПО "Nova" (NT-MDT). Результаты измерений приведены в настоящей работе в виде двумерных изображений, на которых светлые участки поверхности соответствуют возвышениям рельефа, а тёмные – углублениям. Обработка полученных сканов и измерение высот визуализированных объектов производилось с помощью разработанного в ИБМХ РАМН ПО "GRF". Статистическая обработка полученных данных производилась с помощью ПО Microsoft Excel и включала в себя построение распределения полученных объектов по высотам и вычисление параметров описательной статистики. При построении распределений полученных объектов по высотам учитывалось не менее 1000 объектов для каждого типа частиц.

При анализе АСМ-изображений в качестве измеряемого параметра использовалась высота объектов. На основании результатов измерения высот были построены графики плотностей распределения объектов на поверхности АСМ-чипа по высотам. Распределение объектов, визуализированных АСМ по высотам  $\rho(h)$  было выражено как

$$\rho(h) = (N_h/N) * 100\% \quad (1)$$

где  $N_h$  – количество объектов с высотой  $h$ , и  $N$  – общее количество объектов.

## **Выявление маркера вирусного гепатита С.**

### **Иммобилизация МКА против HCVcoreAg на подложку АСМ.**

Процедура биоспецифического фишинга с помощью АСМ-чипов основана на вылавливании, концентрировании и регистрации комплексообразования между молекулами-зондами, иммобилизованными на подложке АСМ (в данном случае МКА против HCVcoreAg), и молекулами-мишенями в растворе (в данном случае HCVcoreAg). Поэтому, для эффективной процедуры биоспецифического фишинга поверхностная концентрация антител на подложке должна быть максимальной. С другой стороны, не менее важным представляется получение монослоя ковалентно иммобилизованных антител на подложке, так как при иммобилизации белка в несколько слоев возможно появление объектов с большими высотами (агрегатов), которые могут внести погрешность при последующей обработке данных. Кроме того, иммобилизация антител в несколько слоев приводит к экранированию антиген-связывающих участков (Fab-фрагментов) молекул антител, лежащих в нижних слоях. Для формирования монослоя антител с высокой плотностью на поверхности АСМ-чипа была проведена серия экспериментов, в которой варьировалась концентрация моноклональных антител в буферном иммобилизационном растворе.

В экспериментальной серии использовались следующие конечные (с учетом разбавления) концентрации антител:  $1 \times 10^{-6}$  М,  $1 \times 10^{-7}$  М,  $5 \times 10^{-8}$  М,  $2 \times 10^{-8}$  М,  $5 \times 10^{-9}$  М. Из полученных данных АСМ-сканирования была вычислена поверхностная концентрация иммобилизованных антител для каждого случая (см. рис. 1). Как видно из рис. 1 максимальная поверхностная концентрация иммобилизованных антител ( $36$  молекул/ $\mu\text{км}^2$ ) достигается при использовании иммобилизационного раствора с концентрацией антител  $2 \times 10^{-8}$  М. В то же время при более высоких концентрациях антител в иммобилизационных растворах ( $5 \times 10^{-8}$  М,  $1 \times 10^{-7}$  М и  $1 \times 10^{-6}$  М соответственно) регистрируется уменьшение поверхностной плотности иммобилизованных антител ( $27$  молекул/ $\mu\text{км}^2$ ,  $10$  молекул/ $\mu\text{км}^2$ ,  $9$  молекул/ $\mu\text{км}^2$ ). Этот факт можно объяснить образованием на подложке АСМ агрегатов антител, которые диссоциируют при отмывке, а также возможной иммобилизацией нескольких слоев белка.

На основании полученных результатов в дальнейших экспериментах, для формирования монослоя антител на поверхности АСМ-чипа была выбрана концентрация антител против HCVcoreAg в иммобилизационном растворе равная  $2 \times 10^{-8}$  М. АСМ-изображение МКА против HCVcoreAg, ковалентно иммобилизованных на поверхности силанизированной слюды представлено на рис. 2 (а). На рис. 2 (б) представлено распределение молекул антител по высотам. Высота максимума этого распределения составила  $1,6 \pm 0,2$  нм. Эти данные хорошо согласуются с результатами исследований других авторов, например, в работе



(Thomson N.H., 2005) измеренная высота иммуноглобулинов класса G (IgG) составила от 1,5 до 2,5 нм.

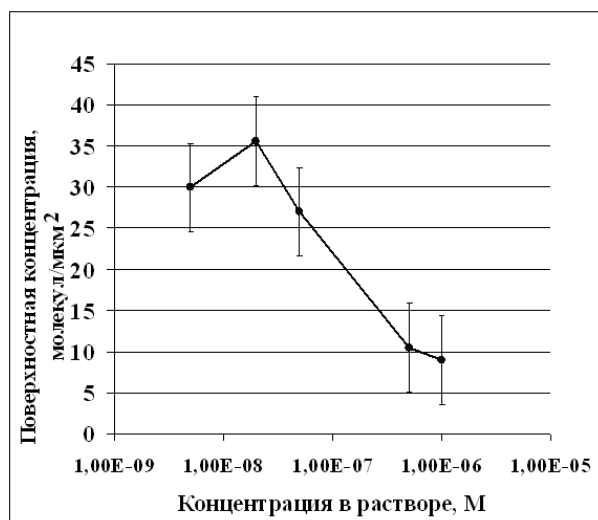
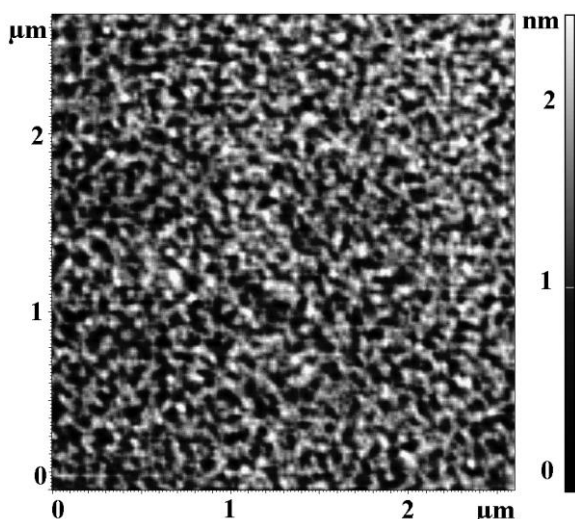
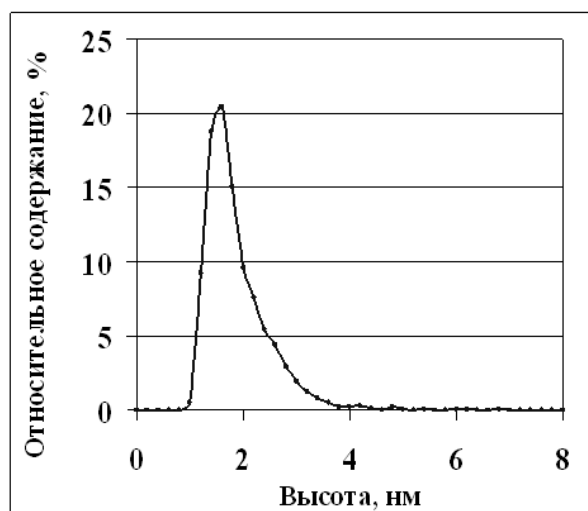


Рис. 1 Зависимость поверхностной концентрации иммобилизованных антител против HCVcoreAg от концентрации их в иммобилизационном растворе.



а)



б)

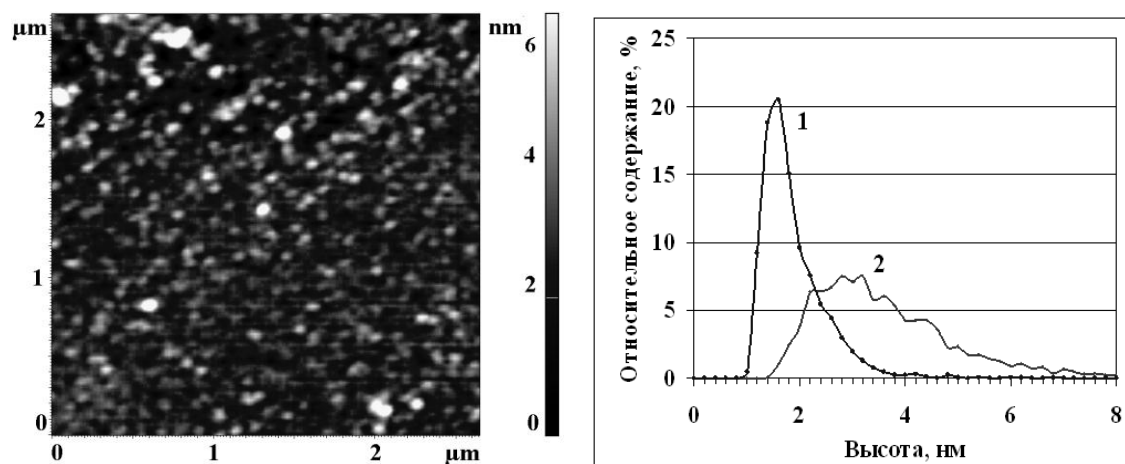
Рис. 2 а) АСМ - изображение МКА против HCVcoreAg, ковалентно иммобилизованных на поверхности силанизированной слюды; б) обработка АСМ-данных: распределение молекул МКА по высотам.

### Детекция HCVcoreAg в растворе

Для оценки высоты молекул детектируемого HCVcoreAg была проведена визуализация этого белка, нековалентно иммобилизованного на поверхности слюды. Обработка АСМ-данных показала, что величина максимума распределения мономеров HCVcoreAg по высотам составляет  $1,8 \pm 0,2$  нм.

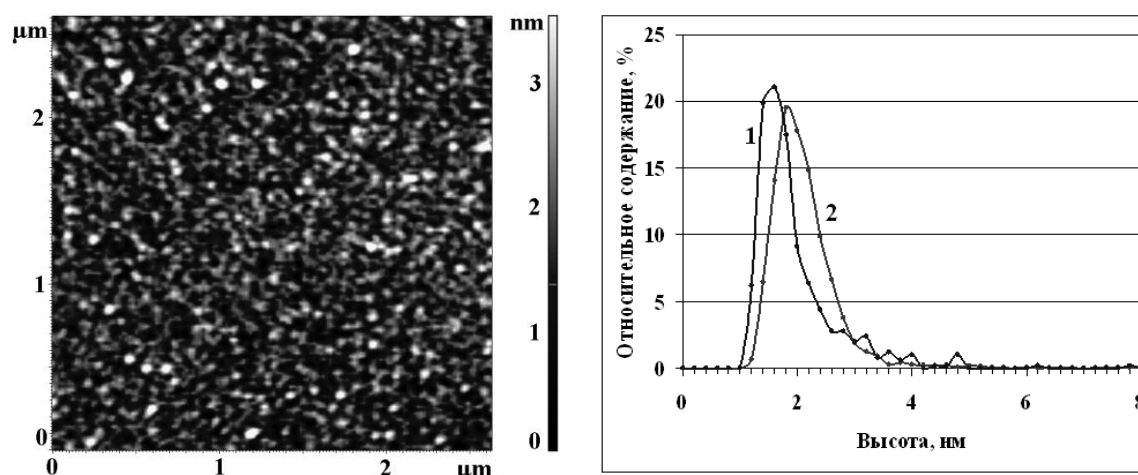
Получение комплексов HCVcoreAg/anti-HCVcore на поверхности АСМ-чипа проводилось методом фишинга по процедуре, описанной выше. Изображение поверхности АСМ-чипа в

зоне с иммобилизованными антителами против HCVcoreAg (рабочей зоне) после инкубации в растворе рекомбинантного HCVcoreAg ( $C=10^{-9}$  моль/л) и распределение объектов на поверхности по высотам представлено на рис. 3 (а, б).



а)

б)



в)

г)

Рис. 3 а) АСМ-изображение поверхности слюды с иммобилизованными МКА против HCVcoreAg после инкубации в растворе HCVcoreAg ( $10^{-9}$  М), б) обработка АСМ-данных: распределение молекул по высотам в зоне с иммобилизованными анти-HCVcoreAg (1) в сравнении с распределением анти-HCVcoreAg (2). (в, г) контрольный эксперимент: в) АСМ-изображение поверхности слюды с иммобилизованными МКА против HBsAg после инкубации в растворе HCVcoreAg ( $10^{-9}$  М); г) обработка АСМ-данных: распределение частиц по высотам в зоне с иммобилизованными анти-HBsAg (1) в сравнении с распределением анти-HBsAg (2).

На рисунке видны образовавшиеся в ходе инкубации в растворе антигена дополнительные объекты с высотами 3-7 нм.

В качестве контрольного эксперимента была просканирована зона с иммобилизованными антителами против HBsAg на том же АСМ-чипе (контрольная зона 1). АСМ-изображение и распределение объектов на поверхности по высотам представлено на рис. 3 (в, г). Как видно на рис. 3 (в), рельеф поверхности АСМ-чипа в контрольной зоне 1 после инкубации в растворе HCVcoreAg в целом повторяет рельеф поверхности до инкубации (см. рис. 2 (а)): присутствует большое количество близлежащих объектов с высотами, не превышающими 2 нм, при этом частиц большего размера практически не наблюдается. Визуальная оценка АСМ-сканов подтверждается полученным распределением объектов на поверхности АСМ-чипа по высотам (рис. 3 (г)), которое имеет один максимум ( $1.8 \pm 0,2$ ) нм, это значение совпадает в пределах погрешности со значением максимума распределения молекул антител против HCVcoreAg ( $1.6 \pm 0.2$ ) нм. Таким образом, к иммунокомплексам анти-HCVcore/HCVcoreAg можно отнести появившиеся после инкубации в растворе HCVcoreAg в рабочей зоне АСМ-чипа объекты с высотами 3-7 нм.

АСМ-сканирование поверхности чипа в зоне, где не были иммобилизованы антитела (контрольная зона 2), показало, что количество частиц в этой зоне не превышало 1 на  $1 \text{ мкм}^2$ , а их размеры не превышали 3 нм.

Таким образом, было показано, что иммобилизованные на АСМ-чипе МКА сохраняют свою активность и способны образовывать комплексы с антигеном из раствора.

### **Детекция HCVcoreAg в сыворотках крови людей**

Перед тем, как приступить к выявлению маркеров вирусных гепатитов В и С в сыворотках крови, были выполнены контрольные эксперименты по визуализации поверхности АСМ-чипа после инкубации в сыворотке крови, не содержащей HBsAg и HCVcoreAg. Целью этих экспериментов было подобрать условия отмывки АСМ-чипов от неспецифически связавшихся компонентов сыворотки крови. Сыворотка крови человека содержит в своем составе большое количество компонентов (например, мажорные белки сыворотки – альбумины, глобулины, фибриноген, липопротеиды). Поэтому процедура инкубации АСМ-чипа в сыворотке крови включала разведение сыворотки с целью уменьшения концентрации компонентов, обладающих высокой адгезией к подложке.

В процессе контрольного эксперимента силанизированная слюда инкубировалась в сыворотке крови человека и далее отмывалась в воде. АСМ-сканирование показало, что после инкубации, на поверхности АСМ-подложки имеются объекты, высотой не превышающие 5 нм в небольшом количестве - 0,5-1,0 частиц на  $1 \text{ мкм}^2$ . Принимая во внимание факт, что количество учитываемых объектов, используемое нами при построении

распределений частиц по высотам, составляло не менее 1000 и поверхностная концентрация молекул была не менее 30 на 1 мкм<sup>2</sup>, при обработке результатов мы можем пренебречь погрешностью подсчета объектов, вносимую неспецифически связавшимися с поверхностью АСМ-чипа компонентами сыворотки.

#### **Анализ сывороток крови на содержание HCVcoreAg с помощью АСМ-чипов.**

Для анализа были выбраны положительные и отрицательные по содержанию РНК ВГС сыворотки, согласно данным ПЦР. Наличие РНК ВГС в сыворотке крови больных предполагает активную репликацию вируса в клетках печени, а, следовательно, продукцию и выделение в кровь вирусных частиц и белков ВГС, в т.ч. HCVcoreAg. Всего была протестирована 41 сыворотка, из которых 32 положительные и 9 отрицательные по содержанию РНК ВГС (согласно данным ПЦР).

В качестве примера на рис. 4 (а) представлено изображение АСМ-чипа с иммобилизованными МКА после инкубации в контрольной сыворотке крови, не содержащей HCVcoreAg. Обработка АСМ-данных (рис. 4 (б)) показала, что относительное содержание объектов с размерами более 5 нм (линия отсечения) на поверхности АСМ-чипа составляет 1,67 % для данной сыворотки.

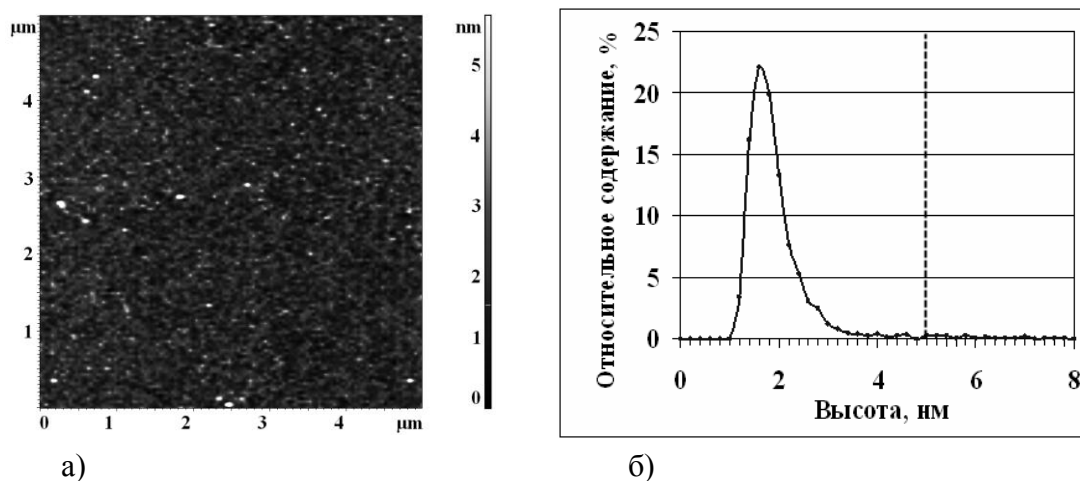


Рис. 4 а) Изображение поверхности АСМ-чипа (зона с иммобилизованными анти-HCVcoreAg) после его инкубации в сыворотке, не содержащей HCVcoreAg; б) обработка АСМ-данных: распределение объектов по высотам. ( - - - - - ) – линия отсечения.

Изображение АСМ-чипа с иммобилизованными МКА после инкубации в положительной сыворотке крови (содержащей HCVcoreAg) и результаты обработки АСМ-данных представлены на рис. 5 (а, б). На АСМ-скане (рис. 5 (а)) на поверхности АСМ-чипа регистрируются образовавшиеся в процессе инкубации в сыворотке дополнительные объекты с высотами 5 нм (линия отсечения) и более, соответствующие комплексам иммобилизованных МКА против HCVcoreAg с HCVcoreAg – содержащими частицами, находящимися в сыворотке крови больных. Относительное содержание этих объектов на

поверхности АСМ-чипа составляет 17,46% для данной сыворотки, что на порядок больше, чем в контрольном эксперименте, упомянутом выше.

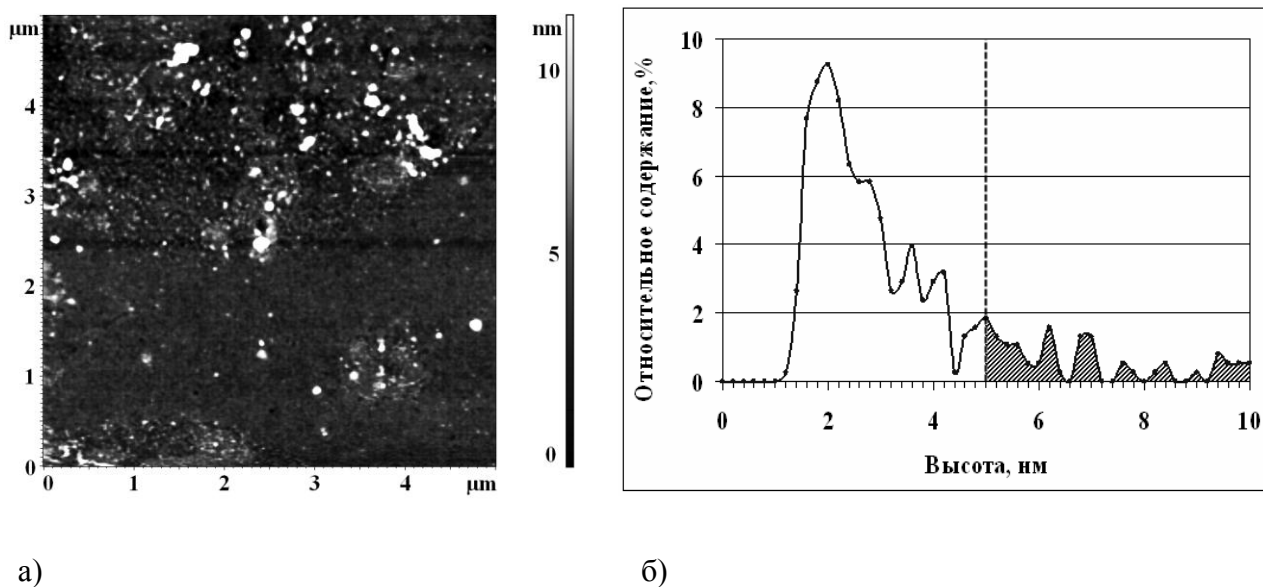


Рис. 5 а) Изображение поверхности АСМ-чипа (зона с иммобилизованными анти-НСVcoreAg антителами) после его инкубации в сыворотке, содержащей НCVcoreAg; б) обработка АСМ-данных: распределение объектов по высотам. ( - - - - - ) – линия отсечения.

Следует отметить, что высоты образовавшихся комплексов МКА против НCVcoreAg с НCVcoreAg – содержащими частицами для различных сывороток колебались от 5 нм до 35 нм. В то же время, модельный эксперимент показал, что высоты комплексов анти-НСVcore/НСVcoreAg составляют 3-7 нм. Повышение максимальной высоты иммунных комплексов, полученных при инкубации АСМ-чипа в сыворотке по сравнению с высотой комплексов, полученных при инкубации в растворе, можно объяснить следующим образом: НCVcoreAg в крови больных зачастую может находиться в комплексе с белками и липопротеинами (Kanto T. et al., 1994), кроме того, в крови больных вирусным гепатитом С присутствуют нуклеокапсиды ВГС, окруженные НCVcoreAg (Prince A.M. et al., 1996); такие комплексы, содержащие в своем составе НCVcoreAg, очевидно, имеют размеры, превышающие размеры агрегатов рекомбинантного НCVcoreAg.

В связи с тем, что при визуализации иммобилизованных антител против НCVcoreAg большинство объектов (> 90%) лежат в пределах высот 1-3 нм, а объекты с высотами более 5 нм полностью отсутствуют, порог высоты для отнесения каждого объекта к образовавшимся комплексам анти-НСVcoreAg/НСVcoreAg (линия отсечения) был выбран на уровне, равном 5 нм.

Результаты анализа сывороток на наличие НCVcoreAg показали, что для 9 сывороток, не содержащих НCVcoreAg согласно данным ПЦР, относительное содержание объектов с высотами >5 нм на АСМ-чипе составило 1,67-8,80%. В то же время, для сывороток,

содержащих HCVcoreAg согласно данным ПЦР, относительное содержание объектов с высотами >5 нм на АСМ-чипе составило 0,61-36,1%.

В настоящей работе для выбора порога отнесения сывороток к положительным или отрицательным по содержанию HCVcoreAg был использован метод ROC-анализа (Zweig M.H. et al., 1993). Полученная ROC-кривая представлена на рис. 6.

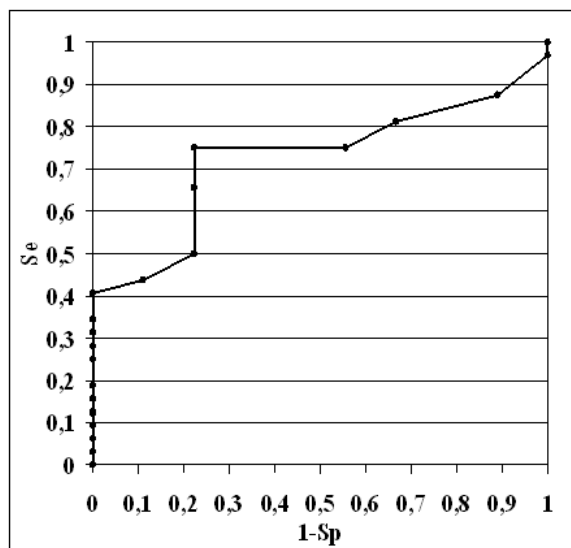


Рис. 6 ROC-кривая для теста сыворотки крови на содержание HCVcoreAg на основе АСМ.

*Se* – чувствительность теста,

*Sp* – специфичность теста.

В табл. 1 приводится фрагмент массива точек «чувствительность-специфичность» в зависимости от уровня отсечения (порогового значения для отнесения исследуемой сыворотки к отрицательным или положительным по содержанию HCVcoreAg).

Из представленных в таблице 1 данных видно, что порогом отсечения, обеспечивающим максимальную суммарную чувствительность и специфичность теста (т.е. минимальное количество ошибок I и II рода), является значение 5%. По-видимому, это значение можно принять оптимальным и использовать его в качестве критерия отнесения сыворотки к положительным по содержанию HCVcoreAg.

Исходя из принятого нами критерия отнесения сыворотки к положительным по содержанию HCVcoreAg, можно сделать вывод, что совпадение данных АСМ-тестирования с данными ПЦР и ИФА составляет 77,8% (7 из 9 сывороток) для отрицательных сывороток и 75,0% (24 из 32 сывороток) для положительных сывороток (см. Табл. 2).

Наличие двух ложноположительных (по сравнению с методом ПЦР, используемым в данной работе в качестве стандартного) результатов детекции HCVcoreAg в сыворотке крови с помощью методики на основе АСМ-чипов можно объяснить высокой аналитической чувствительностью метода АСМ, регистрирующего белковые комплексы в режиме их счета (Archakov A.I. et al., 2009). Наличие 8 ложноотрицательных результатов может быть объяснено следующим образом. Только 132 аминокислотных остатка из 191 (69,1 %) в последовательности кор-белка ВГС являются инвариантными у всех генотипов ВГС (Bukh J., et al., 1994), причем на участке 1-80 а.о. (участок, распознаваемый использованными в работе

моноклональными антителами 1E5) находится 13 переменных позиций. Возможные аминокислотные замены в переменных участках последовательности HCVcoreAg могут приводить к снижению специфичности связывания используемых в настоящей работе моноклональных антител с HCVcoreAg и, как следствие, появлению ложноотрицательных результатов.

Таблица 1. Чувствительность (Se) и специфичность (Sp) АСМ-методики анализа сыворотки крови на содержание HCVcoreAg.

Порог отсечения (содержание частиц высотой >5 нм, %)	Se	Sp	Se+Sp
0	1	0	1
1	0,97	0	0,97
2	0,88	0,11	0,99
3	0,81	0,33	1,14
4	0,75	0,44	1,19
5	0,75	0,78	<b>1,53</b>
6	0,66	0,78	1,44
7	0,5	0,78	1,28
8	0,44	0,89	1,33
9	0,41	1	1,41
10	0,34	1	1,34

Таблица 2. Сравнение данных по детекции HCVcoreAg в сыворотках крови, полученных с помощью метода АСМ и метода ПЦР.

АСМ	ПЦР	
	+	-
+	24	2
-	8	7

### **Выявление маркера вирусного гепатита В.**

#### **Иммобилизация МКА против HBsAg на подложку АСМ.**

Иммобилизация МКА против HBsAg на аминотифицированную поверхность проводилась по методике, описанной выше. Используемые в данной работе антитела против HBsAg принадлежат к тому же субклассу, что и используемые антитела против HCVcoreAg (мышинные IgG 2a), структурное различие между ними существует только в небольшом антиген-связывающем участке. Исходя из этого, концентрация антител против HBsAg для ковалентной иммобилизации на поверхность АСМ-чипа была выбрана равной оптимальной концентрации антител против HCVcoreAg в иммобилизационном растворе, определенной ранее ( $2 \times 10^{-8}$  М).

Анализ АСМ-изображения МКА против HBsAg, ковалентно иммобилизованных на поверхности АСМ-чипа (рис. 7 (а)), показывает присутствие на поверхности объектов, лежащих близко друг к другу и имеющих сходную высоту. Результаты обработки АСМ-

данных показали, что высота максимума распределения антител по высотам составила  $1,6 \pm 0,2$  нм (рис. 7 (б)).

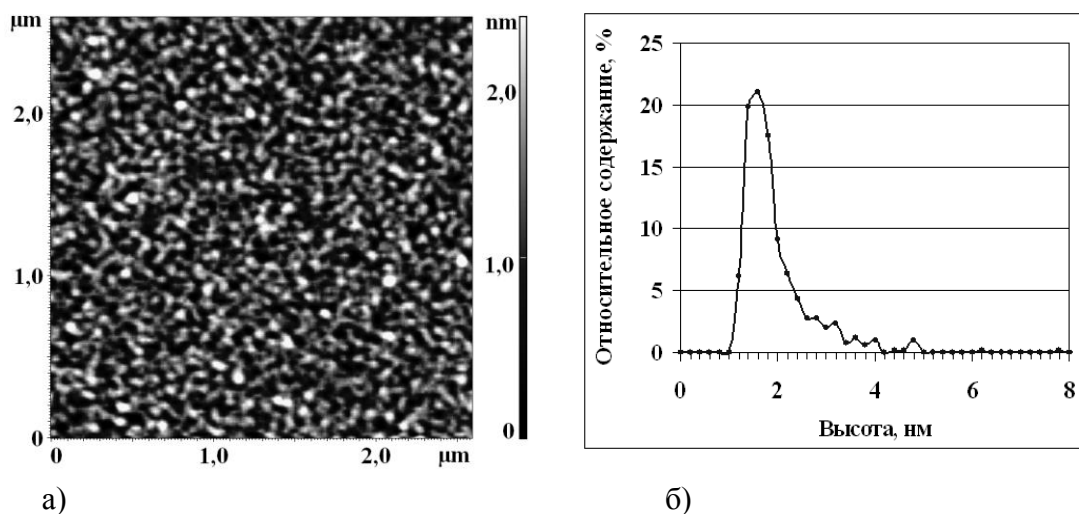


Рис. 7 а) АСМ - изображение МКА против HBsAg, ковалентно иммобилизованных на поверхности силанизированной слюды; б) обработка АСМ-данных: распределение молекул МКА по высотам.

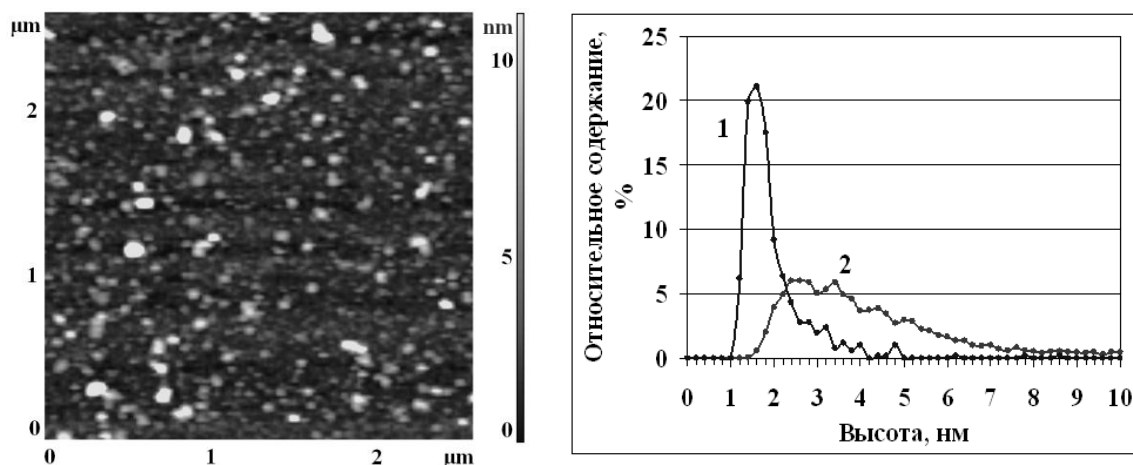
#### Детекция HBsAg в растворе

Для оценки высоты молекул детектируемого HBsAg была проведена визуализация этого белка, нековалентно иммобилизованного на поверхности слюды. Результаты обработки АСМ-данных показали, что величина максимума распределения мономеров HBsAg по высотам составляет  $2,4 \pm 0,2$  нм.

Получение комплексов HBsAg/anti-HBsAg на поверхности АСМ-чипа проводилось методом фишинга по процедуре, описанной выше. На рис. 8 (а) представлено полученное изображение поверхности АСМ-чипа с иммобилизованными анти-HBsAg после процедуры фишинга. В зоне с иммобилизованными антителами после инкубации АСМ-чипа в растворе HBsAg регистрируются дополнительные объекты с высотами более 3 нм (3-8 нм), что превосходит высоту антител ( $1,6 \pm 0,2$  нм) и HBsAg ( $2,4 \pm 0,4$  нм). В качестве контрольного эксперимента была просканирована зона на том же самом АСМ-чипе, в которой были иммобилизованы антитела против HCVcoreAg (контрольная зона 1). Визуальная оценка АСМ-изображений после процедуры фишинга (рис. 8 (в)) показала, что общий рельеф поверхности АСМ-чипа в контрольной зоне 1 сходен с рельефом поверхности с иммобилизованными антителами до инкубации АСМ-чипа в растворе антигена. Распределение визуализированных объектов по высотам имеет 1 максимум в районе  $1,8 \pm 0,2$  нм (рис. 8 (г)). Это значение совпадает в пределах погрешности со значением максимума распределения антител против HCVcoreAg по высотам ( $1,6 \pm 0,2$  нм).

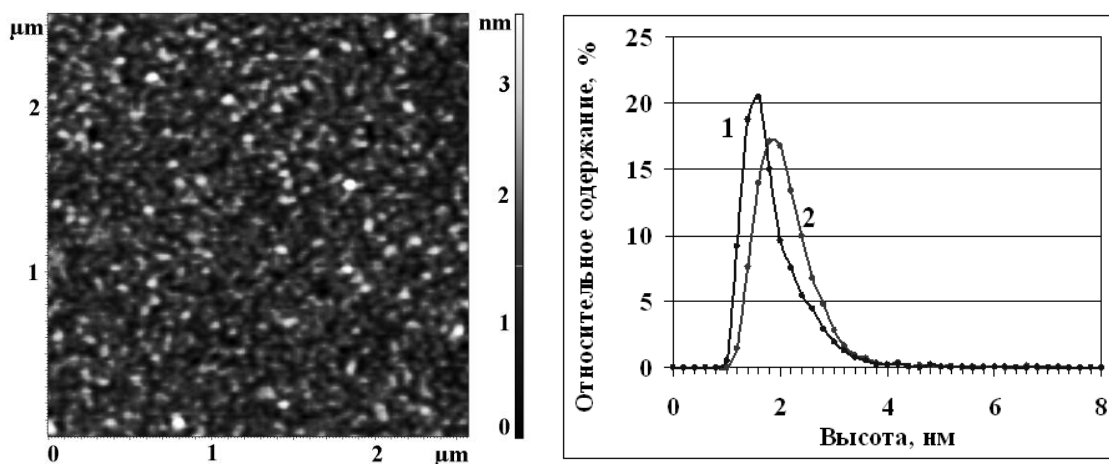


АСМ-сканирование поверхности чипа в зоне, где не были иммобилизованы антитела (контрольная зона 2), показало ровную поверхность; количество частиц в этой зоне не превышало 0,5-1 на  $1 \text{ мкм}^2$ , размеры частиц не превышали 3 нм.



а)

б)



в)

г)

Рис. 8 а) АСМ-изображение поверхности слюды с иммобилизованными МКА против HBsAg после инкубации в растворе HBsAg ( $10^{-8} \text{ M}$ ), б) обработка АСМ-данных: распределение частиц по высотам в зоне с иммобилизованными анти-HBsAg (2) в сравнении с распределением анти-HBsAg (1). (в, г) контрольный эксперимент: в) АСМ-изображение поверхности слюды с иммобилизованными МКА против HCVcoreAg после инкубации в растворе HBsAg ( $10^{-8} \text{ M}$ ); г) обработка АСМ-данных: распределение частиц по высотам в зоне с иммобилизованными анти-HCVcoreAg (2) в сравнении с распределением анти-HCVcoreAg (1).

## Детекция HBsAg в сыворотках крови людей

Для анализа были выбраны сыворотки, положительные и отрицательные по содержанию HBsAg согласно данным ИФА. Всего было протестировано 35 сывороток, из которых 26 положительные и 9 отрицательные по содержанию HBsAg (согласно данным ИФА).

В качестве примера на рис. 9 (а) представлено изображение АСМ-чипа с иммобилизованными МКА против HBsAg после инкубации в контрольной сыворотке крови, не содержащей HBsAg. АСМ-сканирование показало наличие на поверхности небольшого количества образовавшихся в процессе инкубации в сыворотке дополнительных объектов с высотами 5 нм (линия отсечения) и более. Обработка АСМ-данных показала, что относительное содержание этих объектов на поверхности АСМ-чипа составляет 1,9 % для данной сыворотки.

На изображении АСМ-чипа с иммобилизованными МКА после инкубации в сыворотке крови, содержащей HBsAg (рис. 10 (а)) видно наличие на поверхности АСМ-чипа образовавшихся в процессе инкубации в сыворотке дополнительных объектов с высотами 5 нм (линия отсечения) и более, соответствующих комплексам иммобилизованных МКА против HBsAg с HBsAg-содержащими частицами, находящимися в сыворотке крови больных. Анализ АСМ-данных (рис. 10(б)) показал, что относительное содержание этих объектов на поверхности АСМ-чипа составляет 8,9 % для данной сыворотки. Размеры этих объектов колебались от 5 до 40 нм, что превышает размеры комплексов анти-HBsAg/HBsAg, полученные в эксперименте с раствором рекомбинантного белка ( $2,4 \pm 0,4$  нм). Это можно объяснить возможностью наличия полноразмерных вирусных частиц в сыворотке

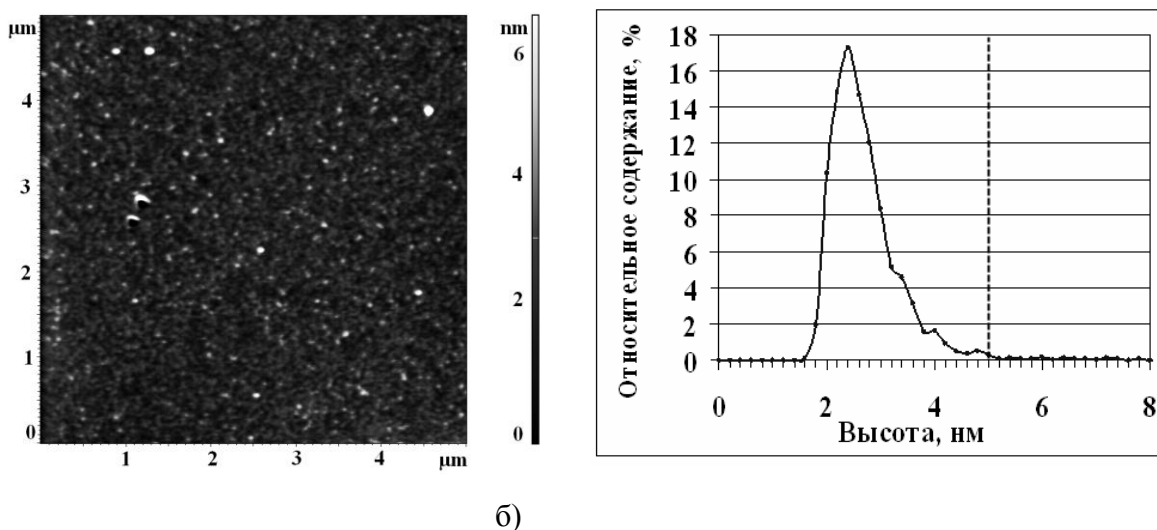


Рис. 9 а) Изображение поверхности АСМ-чипа (зона с иммобилизованными анти-HBsAg антителами) после его инкубации в сыворотке, не содержащей HBsAg; б) обработка АСМ-данных: распределение объектов по высотам. ( - - - - - ) – линия отсечения.

крови больных гепатитом В и поверхностным расположением HBsAg в составе вирусной частицы. Таким образом, можно предположить, что часть зарегистрированных на поверхности АСМ-чипа комплексов может представлять собой комплексы МКА против HBsAg с вирионами ВГВ.

В связи с тем, что при визуализации иммобилизованных антител против HBsAg большинство объектов (> 90%) лежат в пределах высот 1-3 нм, а объекты с высотами более 5 нм полностью отсутствуют, порог высоты для отнесения каждого объекта к образовавшимся комплексам анти-HBsAg/HBsAg (линия отсечения) был выбран на уровне, равном 5 нм, как и в случае с HCVcoreAg.

Результаты анализа сывороток на наличие HBsAg показали, что для 9 сывороток, не содержащих HBsAg согласно данным ИФА, относительное содержание объектов с высотами >5 нм на АСМ-чипе составило 0-9%. В то же время, для сывороток, содержащих HBsAg по данным ИФА, относительное содержание объектов с высотами >5 нм на АСМ-чипе составило 2,9-60%. Также как в случае детекции HCVcoreAg в сыворотках крови людей, для выбора порога отнесения сывороток к положительным или отрицательным по содержанию HBsAg был использован метод ROC-анализа. Полученная ROC-кривая представлена на рис. 11.

Фрагмент массива точек «чувствительность-специфичность» в зависимости от уровня отсечения (порогового значения для отнесения исследуемой сыворотки к отрицательным или положительным по содержанию HBsAg) приведен в табл. 3.

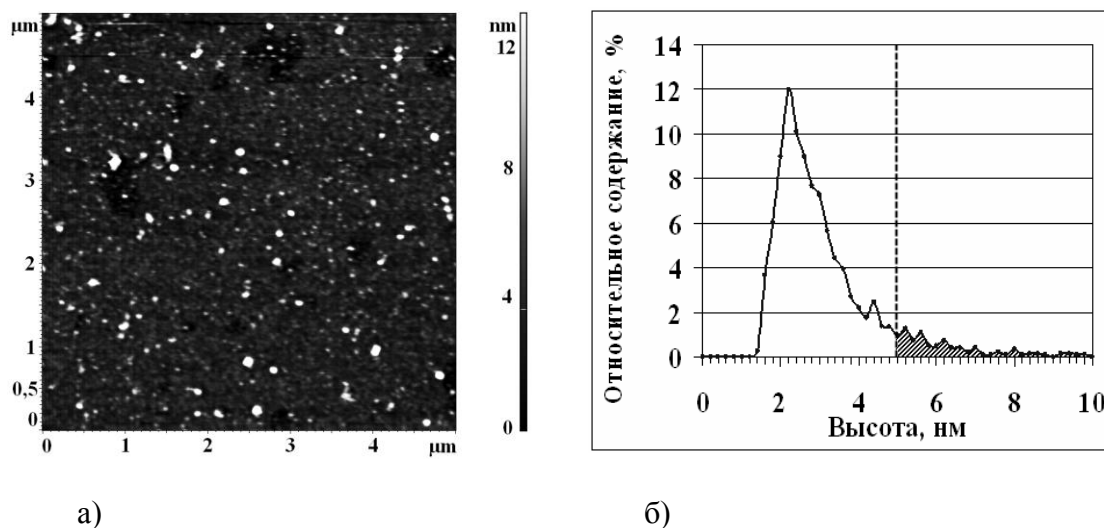


Рис. 10 а) Изображение поверхности АСМ-чипа (зона с иммобилизованными анти-HBsAg антителами) после его инкубации в сыворотке, содержащей HBsAg; б) обработка АСМ-данных: распределение объектов по высотам. ( - - - - ) – линия отсечения.

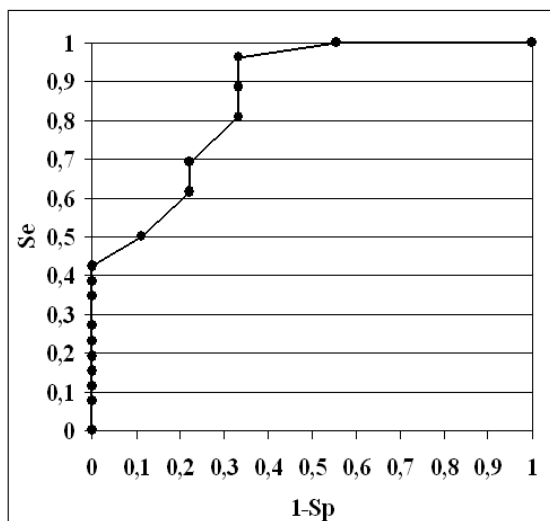


Рис. 11 ROC-кривая для теста сыворотки крови на содержание HBsAg на основе АСМ.

*Se* – чувствительность теста,

*Sp* – специфичность теста.

Из представленных в таблице данных видно, что порогом отсечения, обеспечивающим максимальную суммарную чувствительность и специфичность теста (т.е. минимальное количество ошибок I и II рода), является значение 3%. По-видимому, это значение следует принять оптимальным и использовать его в качестве критерия отнесения сыворотки к положительным по содержанию HBsAg.

На основании принятого в настоящей работе критерия отнесения сыворотки к положительным по содержанию HBsAg, можно сделать вывод, что совпадение данных АСМ-тестирования с данными метода ИФА составляет 66,7 % (6 сывороток из 9) для отрицательных сывороток и 96,1% (25 сывороток из 26) для положительных сывороток (см. Табл. 4). Наличие ложноположительных (по сравнению с методом ИФА) результатов детекции HBsAg, в сыворотке крови с помощью методики на основе АСМ-чипов можно объяснить высокой аналитической чувствительностью метода АСМ (Archakov A.I. et al., 2009).

Таблица 3. Чувствительность(Se) и специфичность(Sp) АСМ-методики.

Порог отсечения (содержание частиц высотой >5 нм, %)	Se	Sp	Se+Sp
0	1	0	1
1	1	0	1
2	1	0,44	1,44
3	0,96	0,67	<b>1,63</b>
4	0,88	0,67	1,55
5	0,81	0,67	1,48
6	0,69	0,78	1,47
7	0,69	0,78	1,47
8	0,62	0,78	1,40
9	0,5	0,89	1,39
10	0,42	1	1,42

Таблица 4. Сравнение данных по детекции HBsAg в сыворотках крови, полученных с помощью метода АСМ и метода ИФА.

АСМ	ИФА	
	+	-
+	25	3
-	1	6

## **ВЫВОДЫ**

- 1.** АСМ/биоспецифический фишинг может быть использован для детекции биологических маркеров вирусов гепатитов В и С – HBsAg и HCVcoreAg.
- 2.** Разработан АСМ-чип с иммобилизованными МКА против HBsAg и против HCVcoreAg для детекции указанных биологических маркеров вирусов гепатитов. Этот АСМ-чип содержит монослой антител, ковалентно иммобилизованных в определенные зоны на поверхности слюды. Активность иммобилизованных антител подтверждена серией экспериментов в растворах рекомбинантных белков HBsAg и HCVcoreAg.
- 3.** Получены АСМ-изображения HBsAg, HCVcoreAg, МКА против этих антигенов и иммунокомплексов анти-HBsAg/HBsAg и анти-HCVcoreAg/HCVcoreAg. Обработка АСМ-изображений показала, что высота иммунокомплексов на поверхности АСМ-чипа превышает высоты соответствующих антител и антигенов.
- 4.** Отработана комбинированная методика АСМ/биоспецифический фишинг для детекции белковых маркеров заболеваний гепатитами В и С в сыворотках крови людей. Проведен анализ тестовых образцов сывороток, положительных и отрицательных по содержанию биомаркеров вирусных гепатитов. Для исследованных образцов сывороток проведено сравнение результатов АСМ-анализа с результатами традиционно используемых методов диагностики (ИФА и ПЦР).

## СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Иванов Ю.Д., Николаева Л.И., Гнеденко О.В., Константинова Н.И., Французов П.А., Светлов С.К., Ковалёв О.Б., Конев В.А., Говорун В.М., Учайкин В.Ф., Арчаков А.И. Выявление комплексов антиген/антитело методом оптического биосенсора и атомно-силовой микроскопии // Сборник докладов II Московского международного Конгресса Биотехнология: состояние и перспективы развития. – Москва, Россия. – 10-14 ноября 2003. – С. 38.
2. Арчаков А.И., Иванов Ю.Д., Плешакова Т.О., Светлов С.К., Французов П.А. Атомно-силовая микроскопия для медицинской диагностики // Материалы VII Всероссийской конференции Физикохимия ультрадисперсных (нано)-систем. – Ершово, Московская область, Россия. – 22-24 ноября 2005. – С. 233.
3. Ivanov Yu.D, Ivanov A.V., Gnedenko O.V., Konstantinova N.I., Pleshakova T.O., Svetlov S.K., Frantsuzov P.A., Archakov A.I. AFM and Optical Biosensor Nanotechnology in Revelation of Protein Complexes // Molecular&Cellular Proteomics. Abstracts Volume for HUPO 4<sup>th</sup> Annual World Congress. – Munich, Germany. – August 29 – September 1, 2005. – P. 330.
4. Иванов Ю.Д., Учайкин В.Ф., Плешакова Т.О., Французов П.А., Светлов С.К., Конев В.А., Ковалев О.Б., Ястребова О.Н., Свешников П.Г., Уланова Т.И., Арчаков А.И. Создание нового поколения био- и иммуносенсоров и биочипов для диагностики инфекционных и неинфекционных заболеваний // Физиология и патология иммунной системы. – 2006. – Т.12, вып. 10. – С. 11-14.
5. Ivanov Yu.D., Pleshakova T.O., Frantsuzov P.A., Svetlov S.K., Nikolskaya O.S., Nikitina S.Ye., Rachenkova N.I., Moshkovskii S.A., Archakov A.I. Nanotechnology in diagnostics // Moscow International Conference Biotechnology and Medicine. – Moscow, Russia. – March, 14-17, 2006. – P. 20.
6. Ivanov Y.D., Pleshakova T.O., Frantsuzov P.A., Svetlov S.K., Ivanov A.V., Nikolskaya O.S., Konstantinova N.I., Gnedenko O.V., Moshkovsky S.A., Archakov A.I. Nanochips for diagnostics of diseases // Materials of The 3<sup>rd</sup> International Conference “Genomics, Proteomics, Bioinformatics and Nanotechnologies for Medicine”. – Novosibirsk, Russia. – July, 12-16, 2006. – P. 12.
7. Иванов Ю.Д., Плешакова Т.О., Французов П.А., Светлов С.К., Никольская О.С., Никитина С.Е., Арчаков А.И. Нанобиочипы для диагностики заболеваний // Материалы Четвертого Московского международного конгресса «Биотехнология: состояние и перспективы развития». – Москва. – 12-16 марта 2007. – С.32.
8. Ivanov Y.D., Pleshakova T.O., Nikitina S.E., Ivanov A.V., Kaysheva A.L., Frantsuzov P.A., Archakov A.I. Nanobiochips for Proteomics and Diagnostics // HUPO 7<sup>th</sup> Annual World Congress. – Amsterdam, Netherlands. – August, 16-20, 2008. – URL: <http://hupo.org/meetings/congress/?7> (дата обращения: 24.08.2010).
9. Иванов Ю.Д., Плешакова Т. О., Никитина С.Е., Кайшева А.Л., Французов П.А., Иванов А.В., Арчаков А.И. Нанобиотехнология для диагностики // Материалы IV съезда Российского общества биохимиков и молекулярных биологов. – Новосибирск, Россия. – 11-15 мая 2008. – С. 306.
10. Иванов Ю.Д., Французов 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. Детекция серологических маркеров вирусных гепатитов В и С методом атомно-силовой микроскопии // Биомедицинская химия. – 2009. – Т. 55, вып. 6. – С. 689-701.
11. Кайшева А.Л., Французов П.А., Плешакова Т.О. Иванов Ю.Д. Згода В.Г. Зибров В. С., Крохин Н.В., Арчаков А.И. Идентификация белков и вирусных частиц с помощью комбинации атомно-силовой микроскопии и масс-спектрометрии // Сборник докладов участников Второго международного конкурса научных работ молодых ученых в области нанотехнологий Rusnanotech 09. – Москва. – 6-8 октября 2009. – С. 896.

12. Кайшева А.Л., Плешакова Т.О., Французов П.А., Иванов Ю.Д., Згода В.Г., Зибров В.С., Крохин Н.В., Ястребова О.В., Конев В.А., Учайкин В.Ф., Арчаков А.И. Визуализация и идентификация вирусных частиц гепатита С при помощи атомно-силовой микроскопии, сопряженной с масс-спектрометрией // Биомедицинская химия. – 2010. – Т. 56, вып. 1. – С. 26-39.

## ФИНАНСИРОВАНИЕ

Проведенные исследования поддержаны грантом РФФИ # 09-04-12113-ОФИ, Государственной программой «Протеомика в медицине и биотехнологии», Государственными контрактами № 02.512.11.2176 «Атомно-силовая микроскопия и биосенсоры для диагностики гепатитов В и С»; № 02.552.11.7060 «Проведение поисковых научно-исследовательских работ в области разработки методики измерений по детекции ультранизкокопийных белков посредством атомно-силовой микроскопии и способов ее применения в медицинских исследованиях в центре коллективного пользования научным оборудованием».

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АСМ – атомно-силовая микроскопия, атомно-силовой микроскоп

ИФА – иммуноферментный анализ

ПЦР – полимеразная цепная реакция

HBsAg – поверхностный антиген вируса гепатита В

HCVcoreAg – кор-антиген вируса гепатита С

МКА – моноклональные антитела

Анти-HBsAg – антитела против поверхностного антигена вируса гепатита В

Анти-HCVcoreAg – антитела против кор-антигена вируса гепатита С

EDC – 1-этил-(3,3-диметил)-аминопропилкарбодиимид

NHS – N-гидроксисукцинимид

ФСБ-Т – фосфатно-солевой буфер, содержащий 0,5% Твина-80

APTES – аминопропилтриэтоксисилан

ВГВ – вирус гепатита В

ВГС – вирус гепатита С

КФБ – калий-фосфатный буферный раствор

IgG – иммуноглобулины класса G