

Обнаружение вирусов и белковых макромолекул методами сканирующей зондовой микроскопии

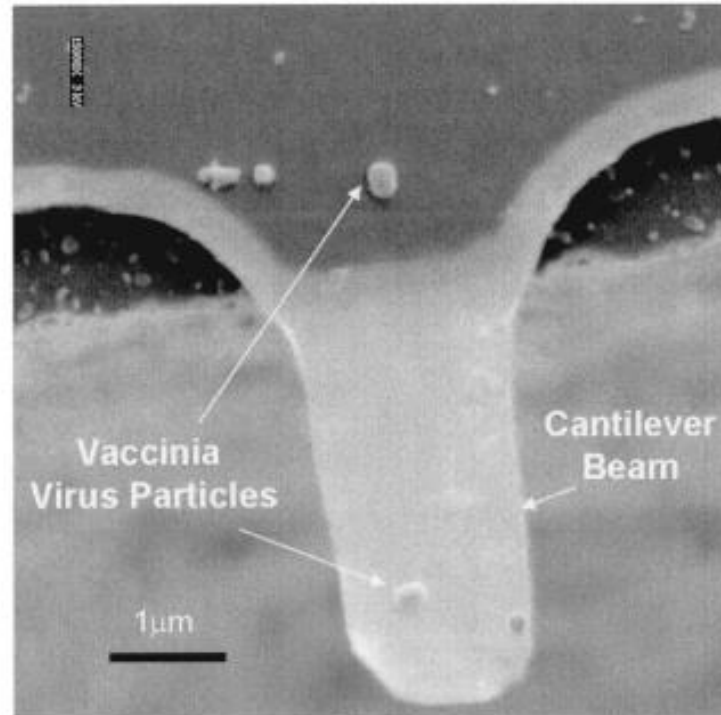
Ахметова Ассель

МГУ имени М.В.Ломоносова

10 апреля 2018

Актуальность исследования

Раннее обнаружение вирусных инфекций и белков-маркеров заболеваний



С помощью кантилеверных сенсоров определили массу одной бактерии, одной молекулы, одного вируса и даже отдельного атома

Burg T.P., Godin M., Knudsen S.M., Shen W., Carlson G., Foster J.S., Babcock K., Manalis S.R. Weighing of biomolecules, **single cells** and single nanoparticles in fluid. *Nature* 446, 1066-1069 (26 April 2007).

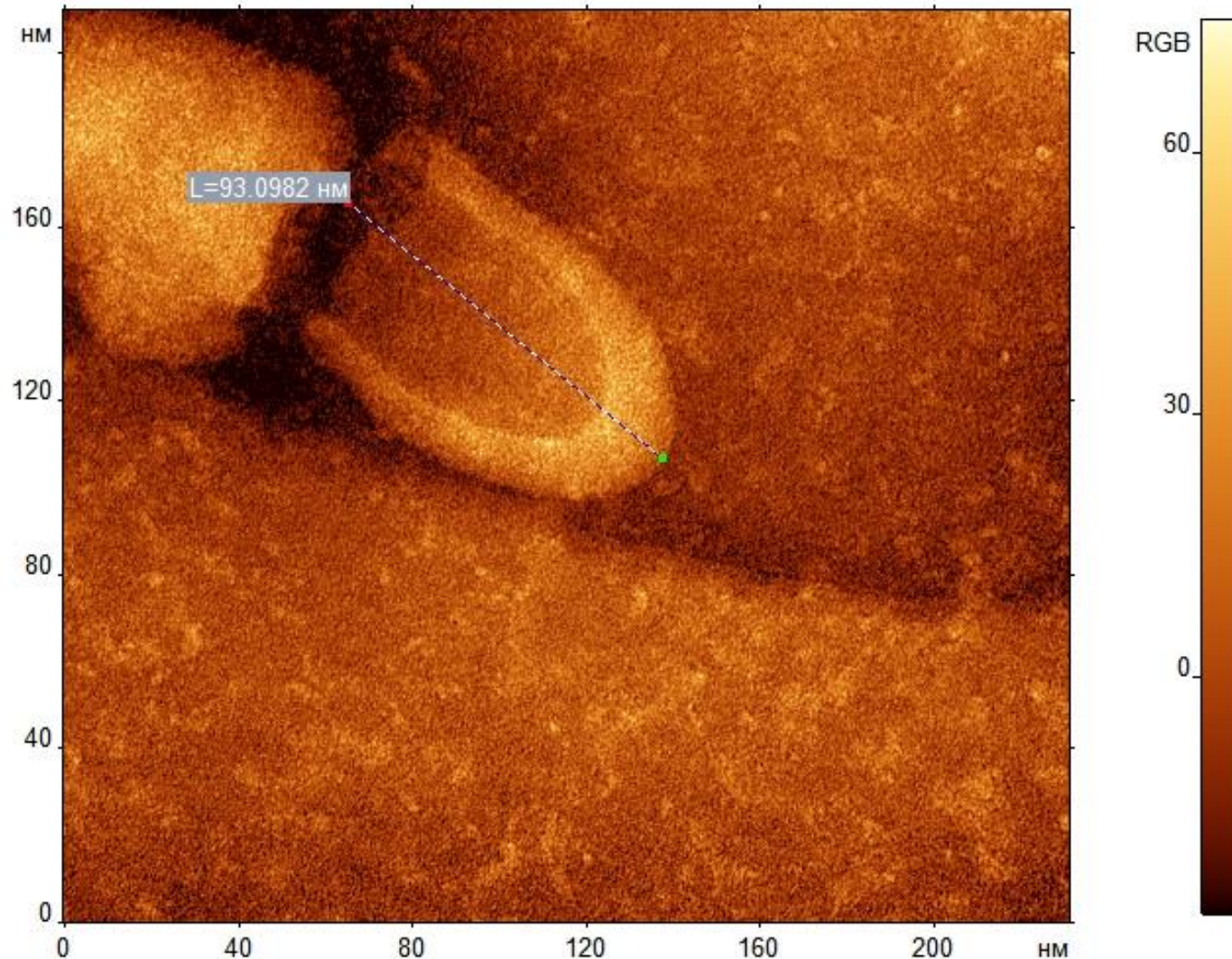
Naik K., Hanay M.S., Hiebert W.K., Feng X.L., Roukes M.L. Towards single-molecule nanomechanical mass spectrometry *Nature Nanotechnology* 4, 445 - 450 (2009).

A. Gupta, D. Akin, R. Bashir. **Single virus** particle mass detection using microresonators with nanoscale thickness // *Appl. Phys. Lett.*, – 2004, – Vol.84, – No.11, – pp.1976-1978.

Jensen K., Kim Kwanpyo, Zettl A. An **atomic**-resolution nanomechanical mass sensor. *Nature Nanotechnology* 3, 533 - 537 (2008).

Методы исследования

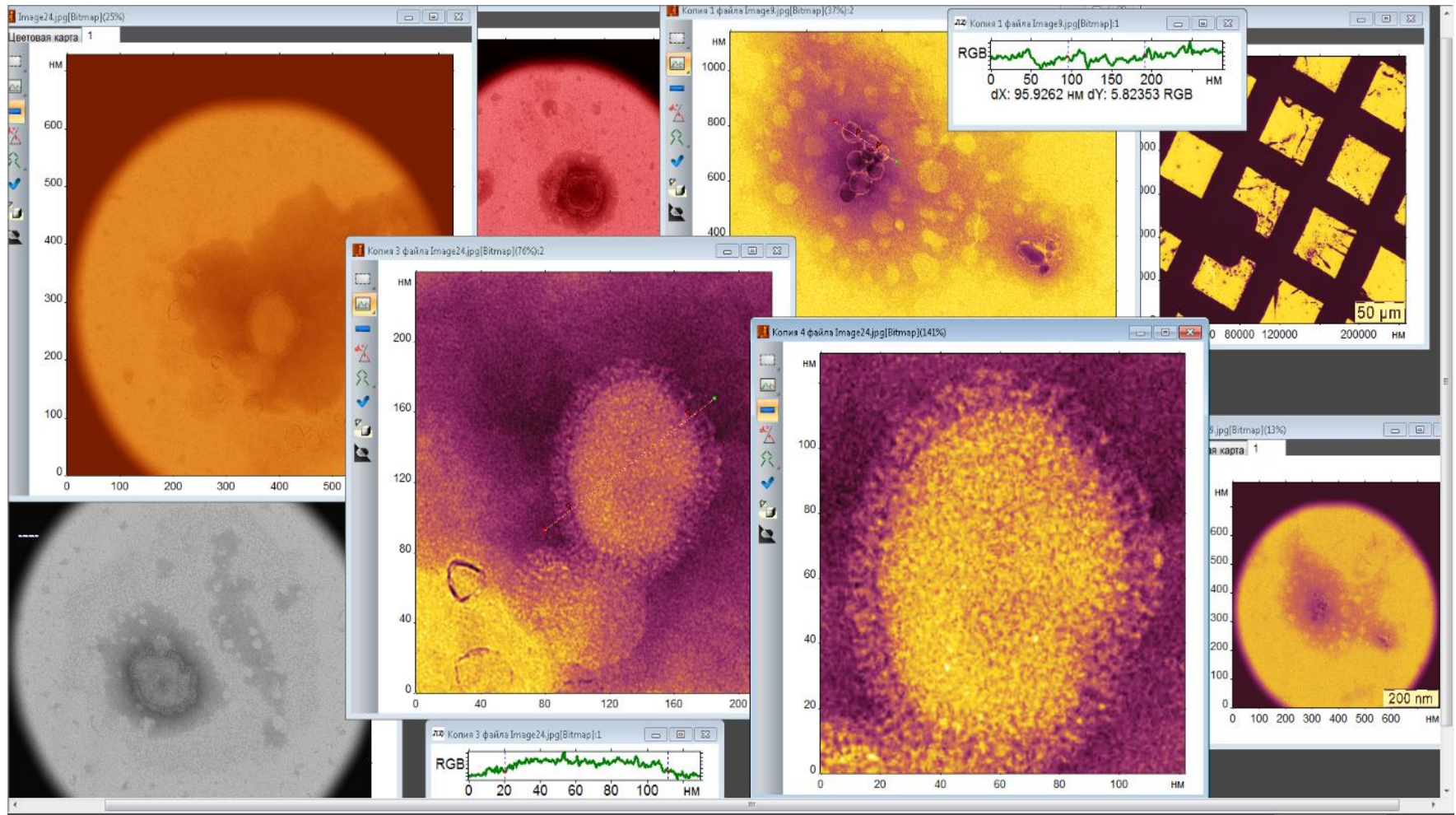
Просвечивающая электронная микроскопия



Вирус бешенства (вакцина). Измерено совместно с Институтом полиомиелита и вирусных энцефалитов имени М. П. Чумакова

Методы исследования

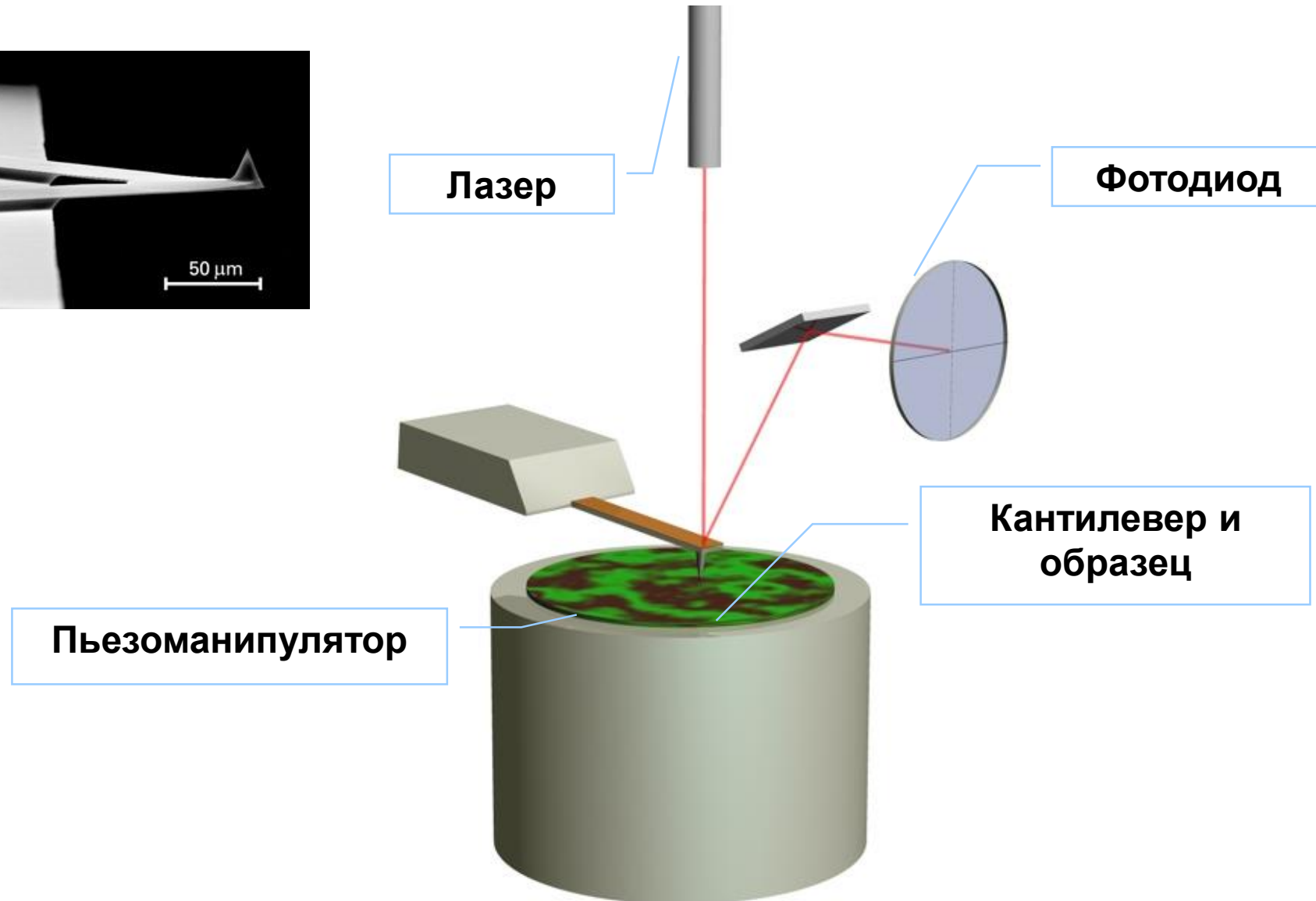
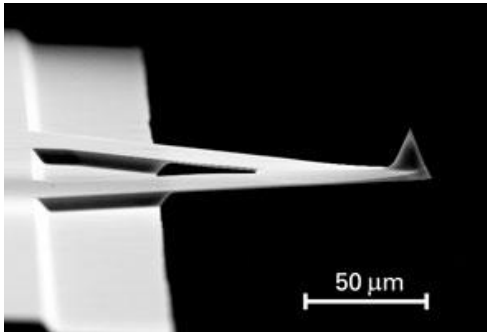
Просвечивающая электронная микроскопия



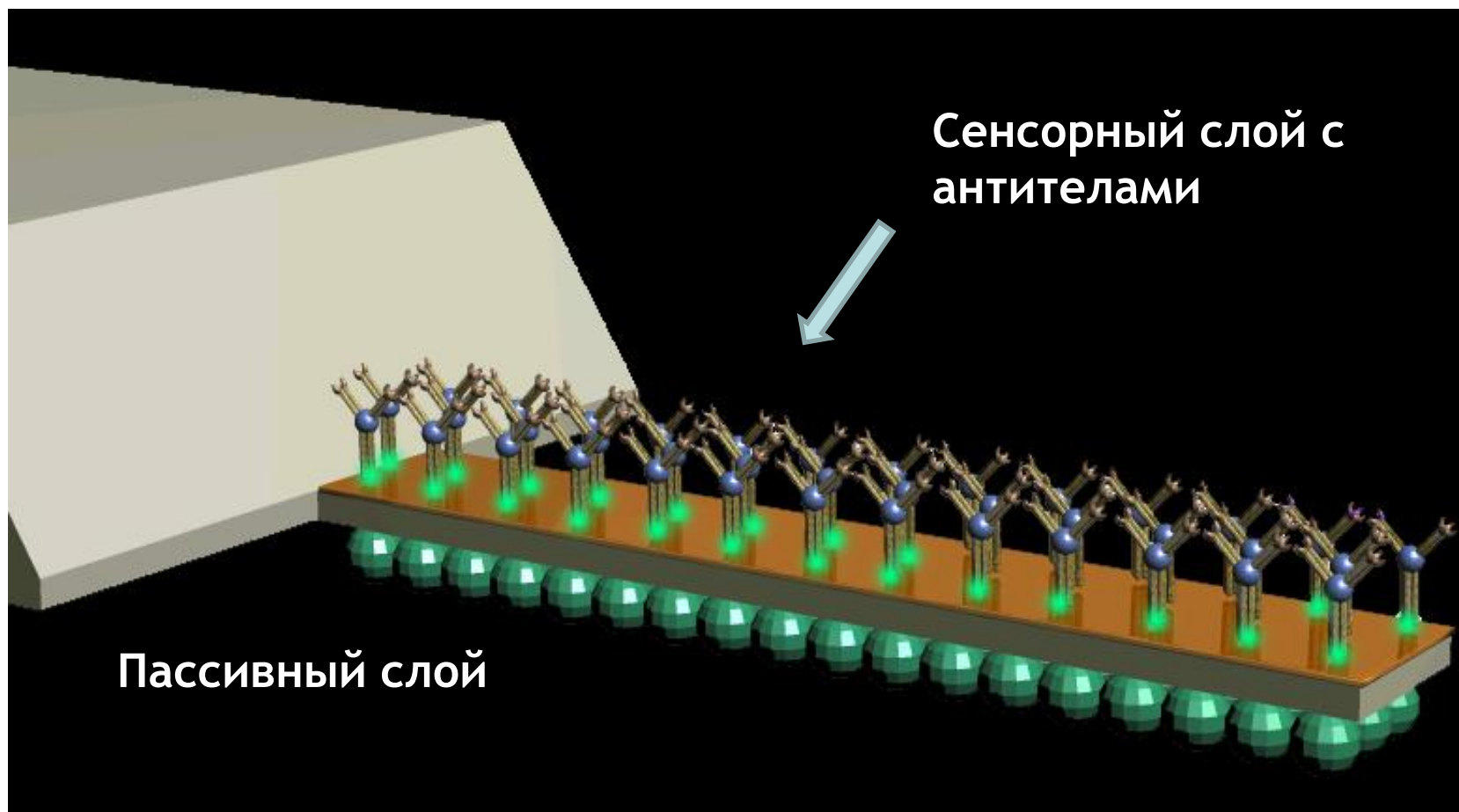
Вирус гриппа A/Duck/Moscow/4182/2008 (H5N3). ПО FemtoScan Online.

Методы исследования

Сканирующая зондовая микроскопия

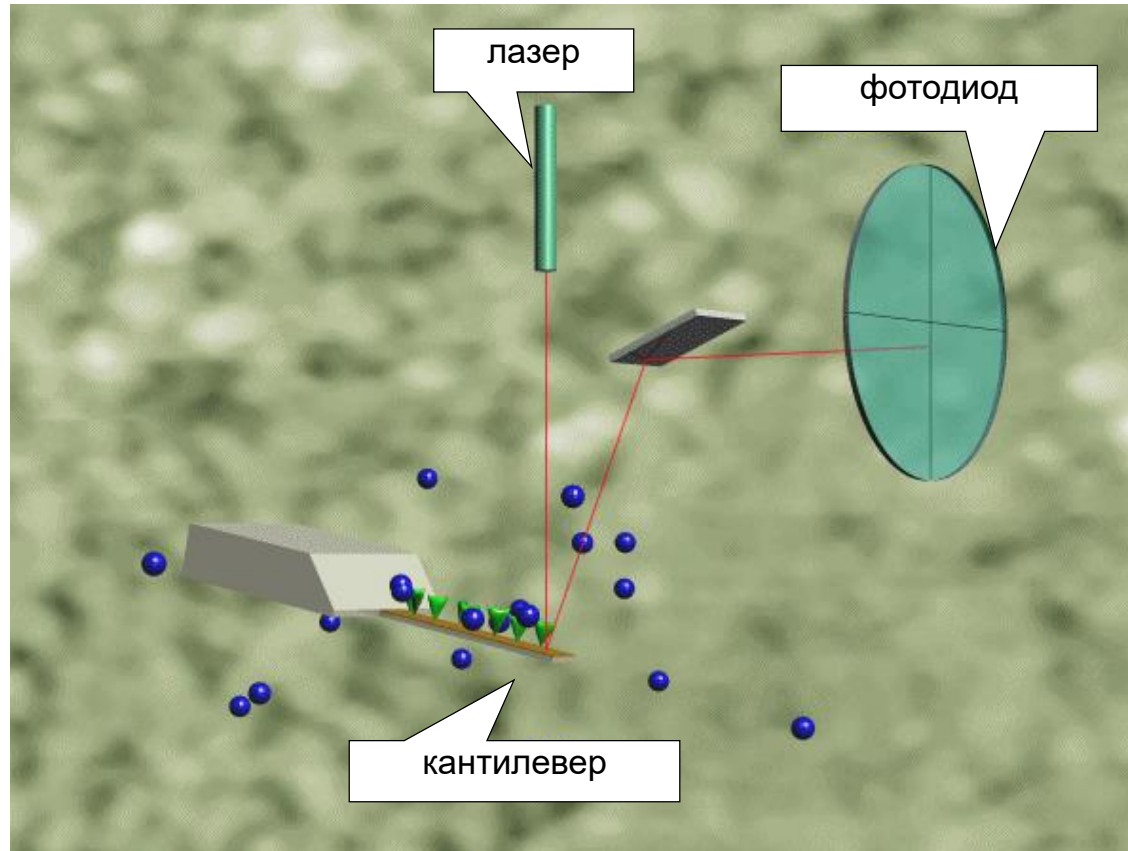


Кантилеверный биочип



Сенсорный слой обычно состоит из рецепторных молекул, обладающих свойством биоспецифического связывания, и вспомогательных молекул, обеспечивающих надёжную фиксацию и правильное расположение рецепторов.

Статический режим



$$\Delta\sigma = \frac{Et^2}{3(1-\nu)l^2} \Delta z$$

$\Delta\sigma$ - механическое напряжение в
монослое

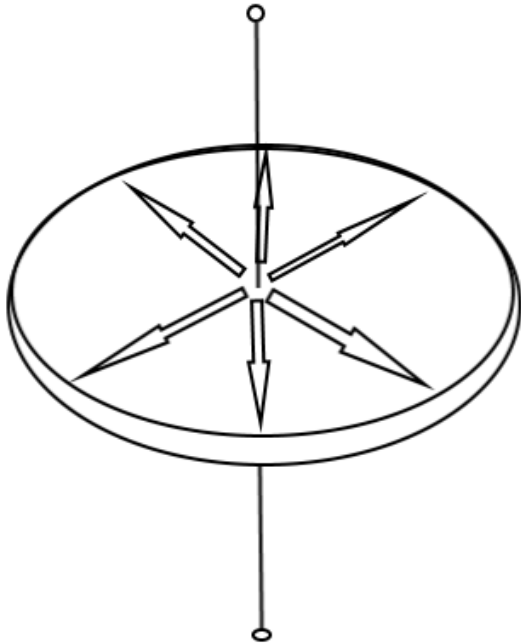
l и t - длина и толщина кантилевера

ν и E - Коэффициент Пуассона и модуль
Юнга

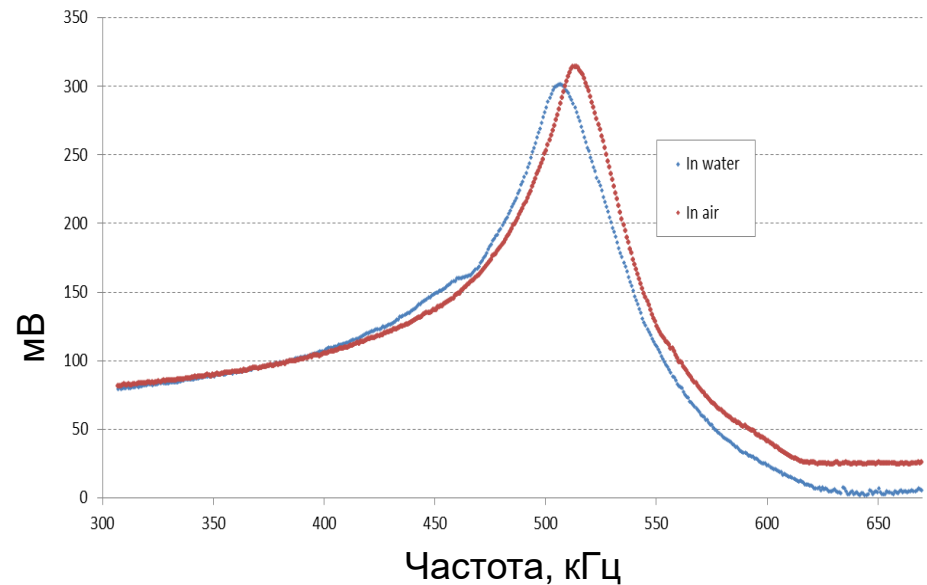
Δz - отклонение кантилевера

Динамический режим

Радиальные колебания имеют преимущества по сравнению с режимом изгиба за счет более высокой добротности и чувствительности в жидкости. Не требуется лазерная система регистрации

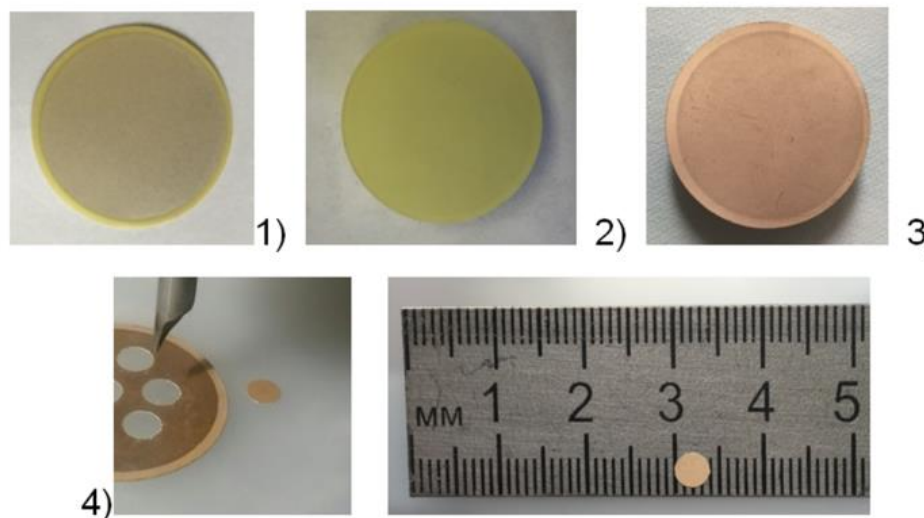


Схематическое изображение колебаний диска на первой радиальной моде

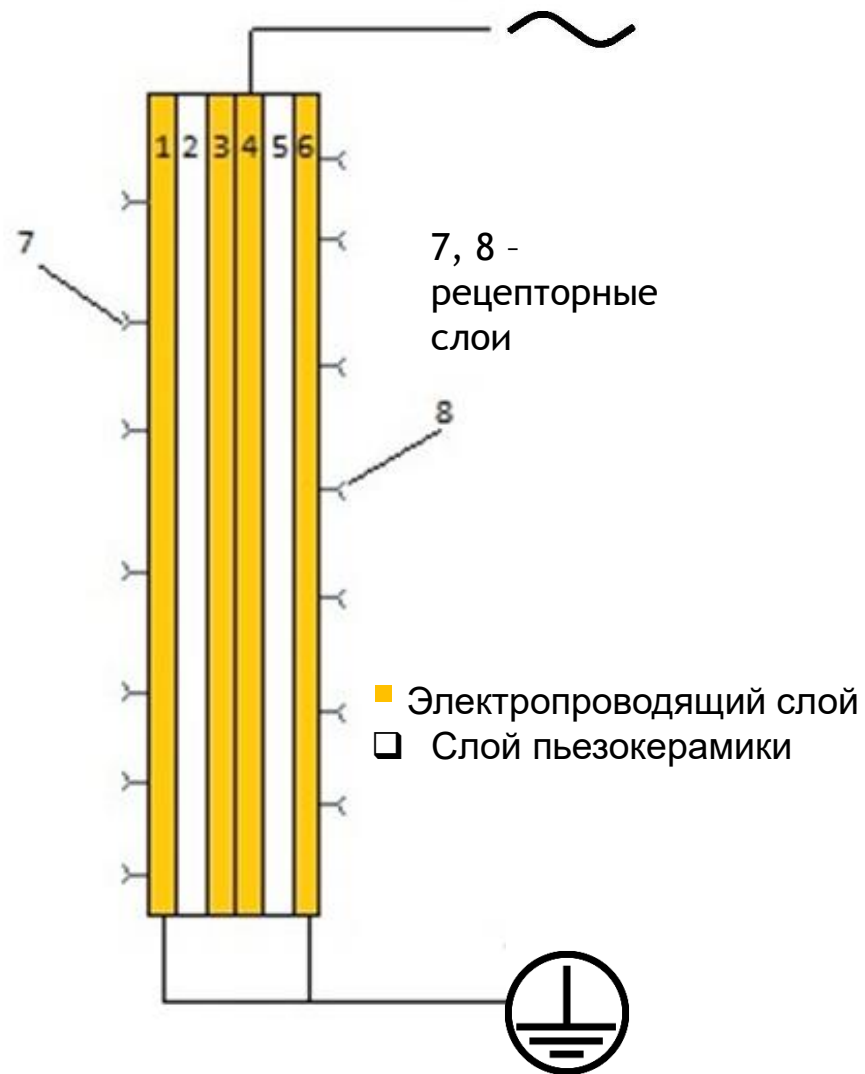


Зависимость амплитуда колебания от приложенной частоты. Типичные резонансные кривые пьезодиска: красная линия - измерения на воздухе, синяя - в воде.

Пьезокерамический биочип

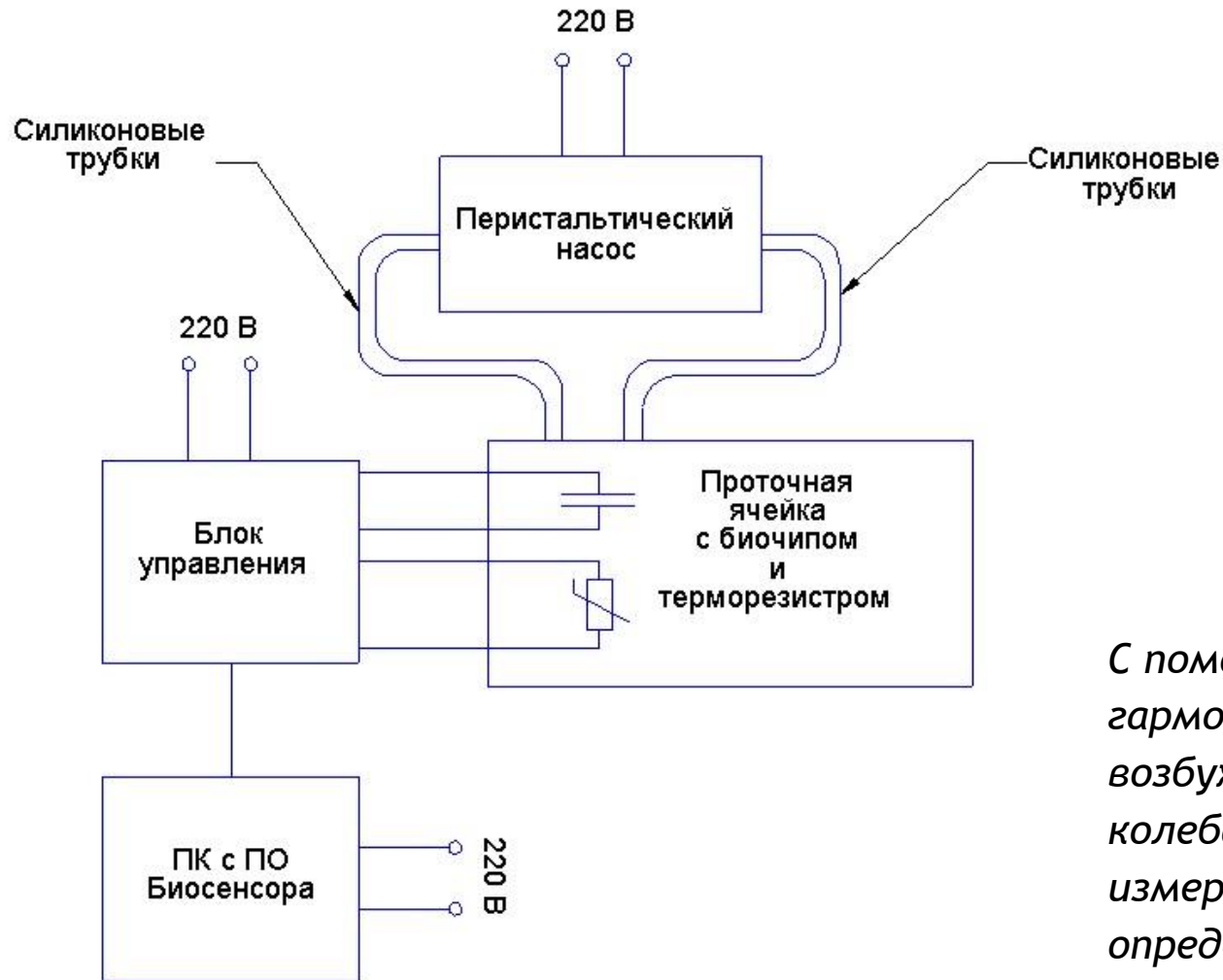


- 1) Пьезокерамические пластины с серебряно-покрытыми электродами с обеих сторон;
- 2) Пластина после инкубации в 100% азотной кислоты;
- 3) Пластина с напыленным золотым слоем в 50 нм, нанесенным с обеих сторон.
- 4) Из пластина нарезаны заготовки для биочипов диаметром 4 мм



А. Ахметова, Г. Мешков, И. Назаров, А. Сагитова, И. Яминский // Биосенсорное устройство для обнаружения биологических микро и нанобъектов. Патент 2636048, 2017

Конструкция биосенсора



С помощью генератора гармонического сигнала возбуждаются механические колебания. Электрическая измерительная схема определяет частоту резонансных колебаний кантилевера

Конструкция ячейки

На левом рисунке показан клапан в позиции впрыска. На правом изображении показана замкнутая система с запорным клапаном.

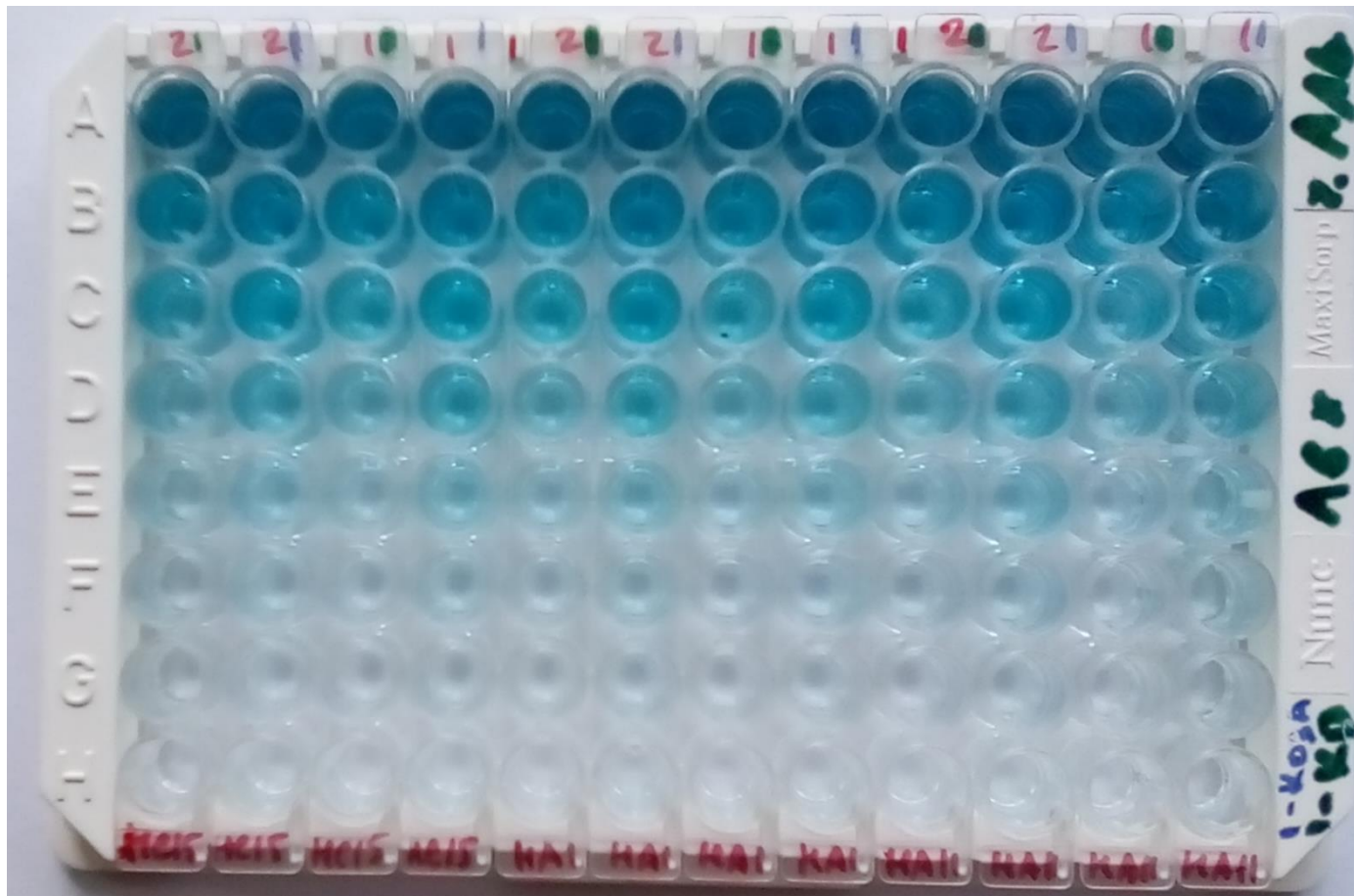


Проверка активности антител на микроальбумин

Название продукта	Мышинные моноклональные антитела к альбумину человека		
Название клона	H-C15	H-A1	H-A11
Источник	Асцитная жидкость		
Изотип	IgG2b	IgG2a	IgG1
Применение	Иммуноанализ сывороточного альбумина, все антитела работают в методе Вестерн-блоттинг. Не реагируют с бычьим сывороточным альбумином, с яичным белком и альфа-фетопротеином человека		
Метод очистки	Хроматография на протеин А-сефарозе		
Состав буфера	Фосфатно-солевой буфер, pH 7.4, 0,09 % азид натрия (NaN_3)		
Концентрация	5,7 мг/мл	6,5 мг/мл	6,3 мг/мл
Объем	0,09 мл	0,08 мл	0,08 мл

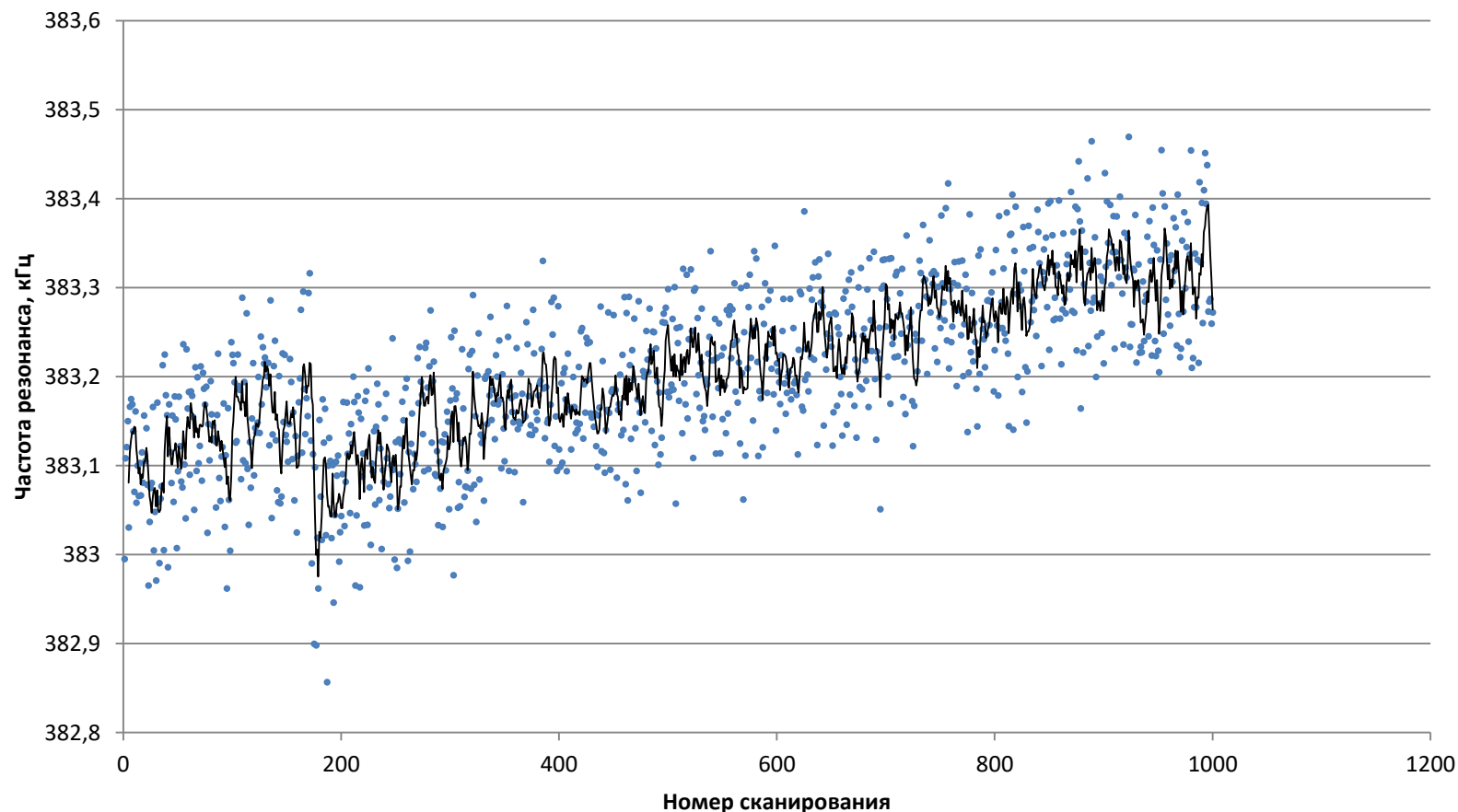
Три разных изотипа антител IgG2b, IgG2a, IgG1 были куплены в компании «Биалекса». Для проверки антител использовался иммуноферментный анализ.

Проверка активности антител на микроальбумин



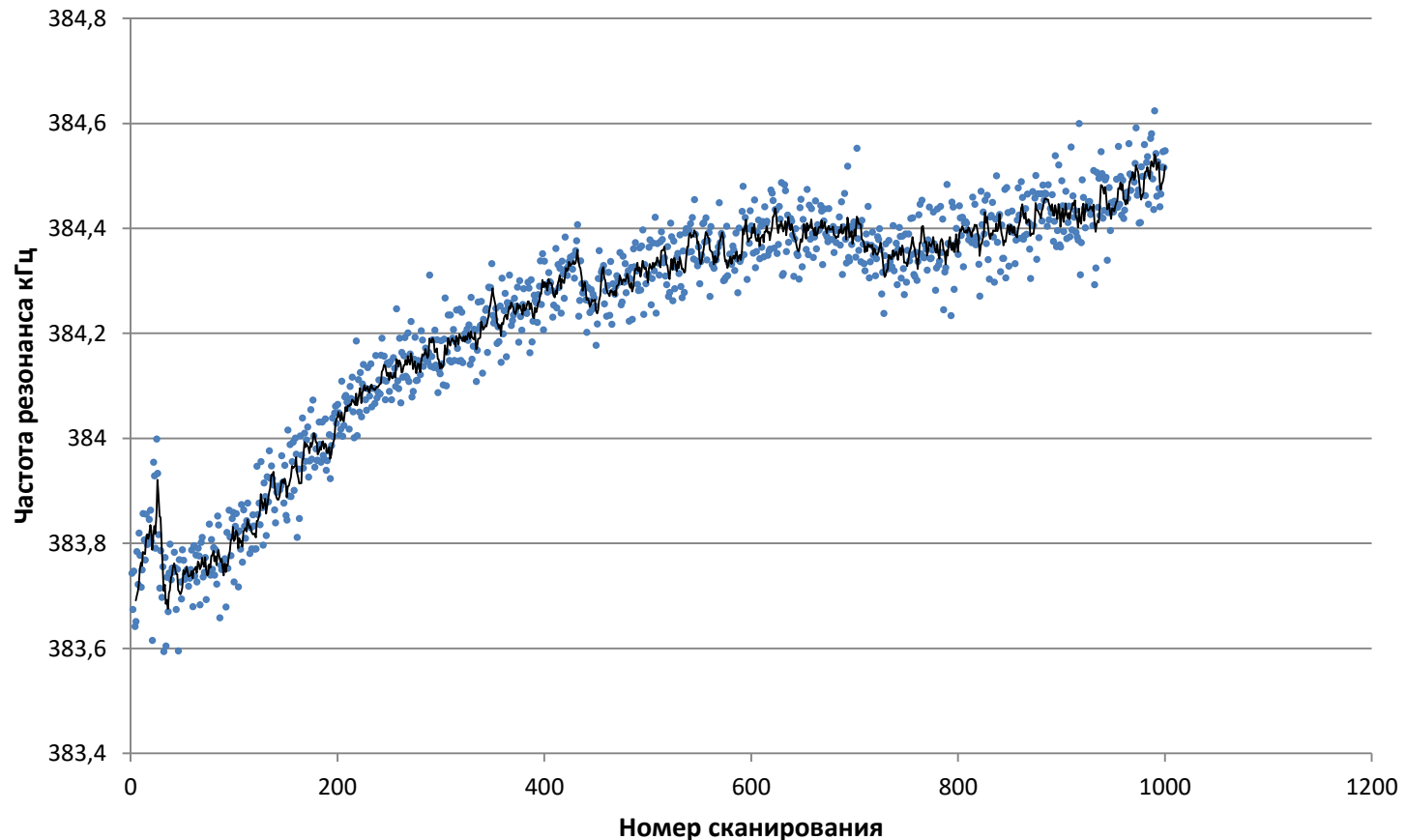
На плашки осаждают антитела, промываются, добавляется конъюгат (пероксидаза с козьими и кроличьими антителами) в соотношении 1:250, 1:500, 1:1000, 1:2000, 1:4000, 1:8000, 1:16000, 1:32000 на 1,5 часа при 4°C. Затем добавлялся ТМВ раствор в каждую ячейку по 100 мкл, который позволяет подкрашивать конъюгат

Проверка активности антител на микроальбумин



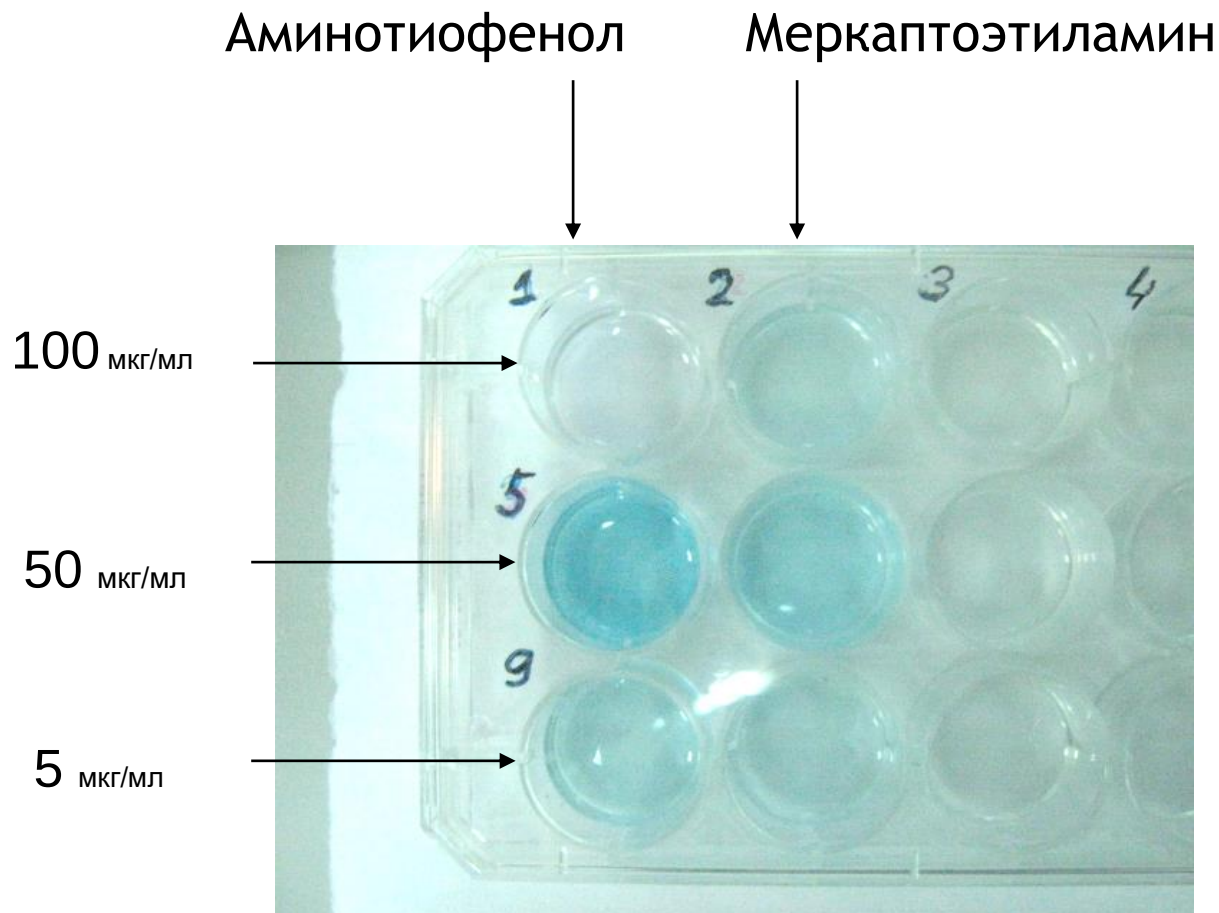
Контрольное измерение отклика биосенсора в буфере PBST. За 1000 сек среднее значение резонансной частоты сместилось на 0,3 кГц

Кривая связывания конъюгата антител козы против антител мыши с иммобилизованными антителами на поверхности биочипа.



Пьезокерамический диск (подложка золото+аминотиофенол+антитела H-C15 к альбумину) помещен в проточную ячейку. В объем буфера PBST 0,75 мл добавлено 0,25 мл конъюгата с буфером с соотношением 1:1000000. За 1000 сек. сдвиг по частоте составил 0,8 кГц.

Результаты ИФА-анализа



Наилучшее связывание происходило на поверхности диска, модифицированного аминотиофенолом, при концентрации антител 50 мкг/мл. Для модификации поверхности носителя лучше использовать аминотиофенол.

Выводы

- Биосенсор использован для идентификации биологических частиц в жидкости и определения их концентрации
- Разработана методика ковалентной иммобилизации антител на золотой поверхности кантилевера
- Уменьшение геометрических размеров биочипа позволяет повысить чувствительность метода - вплоть до единичных частиц

