ITEP-18-03

Институт Теоретической и Экспериментальной Физики

18 – 03

И.А. Голутвин, Н.С. Насикан, Т.Е. Игнатюк

FERMILAB
JUL 20 2004
LIBRARY

НОВЫЕ ПОДХОДЫ К ИССЛЕДОВАНИЮ ВИРУСОВ ПРИ ПОМОЩИ СКАНИРУЮЩЕЙ ЗОНДОВОЙ МИКРОСКОПИИ

Москва 2003

УДК 578.086

НОВЫЕ ПОДХОДЫ К ИССЛЕДОВАНИЮ ВИРУСОВ ПРИ ПОМОЩИ СКАНИРУЮЩЕЙ ЗОНДОВОЙ МИКРОСКОПИИ:Препринт ИТЭФ 18-03/

Голутвин И.А., Насикан Н.С., Игнатюк Т.Е. – М.,2003-14 с.

В работе был предложен метод исследования микромеханики вирусов при помощи силовых кривых атомно-силового микроскопа(АСМ), при этом величина модуля Юнга ротавируса составила $E=1,0 \times 10^8 \pm 0,3 \times 10^8$ Па. Были получены карты распределения упругих характеристик и адгезии зонда к поверхности образца для случая ротавирусов, адсорбированных на слюду. В работе были описаны особенности применения подложек, обладающих биохимической специфичностью в АСМ вирусов на примере аденовируса и решена задача фиксации объекта на поверхности подложки для проведения исследования методом АСМ. Предложенные подходы позволяют расширить набор характеристик, описывающих вирусную частицу.

NEW SCANNING PROBE MICROSCOPY ASSISTED APPROACHES TO THE STUDY OF VIRUSES

Golutvin I.A, Nasikan N.S., Ignatuk T.A.

Present paper demonstrates application of an atomic force microscope (AFM) to the study of individual virus particles. AFM force curves were used to study micromechanics of rotaviruses, at this young's modulus of an individual virus particle was determined *($E=1,0 \times 10^8 \pm 0,3 \times 10^8$ Pa).* Distributions of mechanical and adhesive properties over the sample surface were plotted. Application of substrates, modified with corresponding antibodies allow to increase analysis self-descriptiveness. Present paper describes application of such substrates in the AFM of adenoviruses. The proposed approaches allow to extend set of characteristics which describe virus particle.

Рис. 6, список лит. – 20 наим.

© Институт теоретической и экспериментальной физики, 2003

Введение

АСМ [1] позволяет исследовать различные объекты с разрешением порядка нескольких нанометров, строить топографические карты поверхности, оценивать распределение сил трения между образцом и зондом, исследовать локальные вязко упругие характеристики поверхности. Большое количество работ, появившихся за последние несколько лет демонстрируют возможности АСМ для изучения различных биологических объектов, при этом особое место занимает вопрос исследования вирусных частиц. Так, в работах Малкина и других [2] изучался рост кристаллов сателлита вируса табачной мозаики с помощью АСМ. Результаты исследования вируса табачной мозаики при помощи сканирующего туннельного микроскопа описаны в работах Мантони и др. [3]. Любченко и др. изучали двойную спираль РНК реовируса с помощью АСМ [4]. При помощи АСМ, работающего в режиме постоянного контакта были исследованы упругие характеристики вируса табачной мозаики [5] и X вируса картофеля [6]. Наибольший интерес с точки зрения проведения исследования методом АСМ, представляют на наш взгляд патогенные, опасные для человека вирусы которые содержатся в питьевой воде, поскольку полученная информация может быть использована для диагностики, а также в вирусологии и фармакологии. В настоящее время обнаружено более 100 патогенных вирусов, циркулирующих в водных объектах, из них 37 выделены из питьевой воды [7]. Это вирусы различных семейств, большая часть которых относится к семействам Picornaviridae, Rotaviridae и Adenoviridae. Возможность использования АСМ для вирусологического контроля была продемонстрирована на примере вирусов полиомиелита [8], ротавирусов и аденовирусов [9]. В этих работах, в режиме снятия топографических карт поверхности была изучена морфология вирусных частиц, адсорбированных на неспецифические подложки. Набор характеристик, который описывает вирусную частицу, может быть расширен за счет использования режима снятия силовых кривых АСМ и применения подложек обладающих биохимической специфичностью к анализируемому объекту. Режим снятия силовых кривых АСМ позволяет исследовать не только морфологию объекта, но и его вязко-упругие свойства

[10-13], а проведение анализа методом АСМ на аффинных подложках, покрытых антителами и обеспечивающих специфическую адсорбцию вирусов, может существенно повысить информативность анализа. Кроме того, использование специфических подложек позволит решить задачу фиксации вируса на поверхности для проведения АСМ исследования в жидкой среде. В настоящей работе методом АСМ, была исследована микромеханика частиц ротавируса и проведен анализ аденовирусов, адсорбированых на специфические подложки.

Силовые кривые АСМ

В АСМ поверхность образца сканируется острым зондом (радиус кривизны <20 нм), закрепленным на конце кантилевера, который представляет собой упругую балку (длина балки составляет 100-200 мкм). Во время сканирования сила между зондом и образцом определяется исходя из закона Гука, $F=kX$, где k-жесткость кантилевера, а X - изгиб балки [1]. Силовая кривая АСМ представляет собой зависимость изгиба балки X от расстояния между кантилевером и поверхностью образца, построенной для заданной точки поверхности (рис.1). Исходя из этой зависимости, можно установить величину силы, которая необходима для деформации образца на заданную величину, и определить упругие характеристики поверхности. В случае биологических материалов силовые кривые были использованы для определения механических свойств костей [10], бактерий [11], эпителиальных клеток [12], молекул лизоцима [13]. Если построить силовые кривые для каждой точки поверхности, то можно получить карту распределения механических характеристик по поверхности образца. Входной информацией при этом является массив данных, в котором последовательно записаны силовые кривые для различных точек анализируемого участка поверхности. Разработанное авторами программное обеспечение NanoScale Explorer позволяет работать с такими массивами, графически интерпретировать результаты и строить карты распределения различных характеристик.

Специфические подложки

Для создания подложек, обладающих биохимической специфичностью использовалась методика получения пленок Ленгмюра-Блоджетт (ЛБ) комплексов белок – амфифильный полиэлектролит (АПЭ) [14-17]. Эта технология успешно зарекомендовала себя при формировании пленок из глюкооксидазы [14], моноаминооксидазы [15], антител [16], тирозиназы [17]. В случае создания пленок антител, применение данного подхода позволяет существенно повысить их аффинность, что в свою очередь улучшает адсорбционные характеристики специфической подложки. Топография таких пленок были исследованы методом сканирующей туннельной микроскопии [18], а их возможности с точки зрения проведения анализа методом АСМ риккетсий и бактерий были описаны в работе [19].

Материалы и методы

В качестве модельного вируса для изучения микромеханики вирусной частицы использовали обезьяний ротавирус SA 11. Наработка партии вируса проводилась в институте полиомиелита и вирусных энцефалитов. В качестве модельного вируса, для фиксации на поверхности специфической подложки использовали аденовирус 6 типа штамма Tosill. Наработка партии вируса проводилась в институте гриппа (г. Санкт-Петербург). В работе использовали мышиные моноклональные антитела к гексагональному антигену аденовируса CY25. Антитела были наработаны в Российском исследовательском центре молекулярной диагностики и терапии. Для формирования ЛБ пленок комплексов белок–АПЭ на поверхности раздела фаз использовали ленгмюровскую ванну (Институт физических проблем, Зеленоград, Россия) [14]. В качестве АПЭ применялся полиэтиленимин разветвленный, модифицированный на 12% цетилбромидом и на 88% этилбромидом. Полимер был синтезирован на кафедре высокомолекулярных соединений химического факультета МГУ. При нанесении пленок комплексов полимер-антитело раствор антител (5 мкг/мл) в трис-HCl буфере (5 мМ, pH 8.0) наливали в ЛБ ванну. На поверхность водной субфазы наносили раствор АПЭ в хлороформе, после чего пленку сжимали до поверхностного давления 40 мН/м.

Пленки наносили на различные подложки при помощи метода горизонтального касания Ленгмюра-Шеффера. В качестве подложек использовали стекло, золото и нитрид кремния. Перед нанесением подложки очищали в 96% этиловом спирте и промывали дистиллированной водой. При нанесении образца аденовируса на поверхность модифицированных подложек, исходный препарат добавляли в PBS-T (10 мМ фосфата, 150 мМ NaCl, 0.05% твин-20) в соотношении 1:10, после чего подложка целиком погружалась в получившийся буфер на 30 минут. Дальнейшая процедура включала двукратную промывку в PBS-T. Для блокировки мест неспецифического связывания использовали бычий сывороточный альбумин (БСА, Sigma).

Атомно-силовая микроскопия была осуществлена с использованием коммерческого сканирующего зондового микроскопа Nanoscope IIIa (Digital Instruments, USA, Santa Barbara) Для снятия силовых кривых и для работы в режиме постоянного контакта использовались треугольные зонды Olympus OMCL-TR400PSA-1 (Радиус кривизны зондирующего острия <20 нм, длина кантилевера составляет 200 мкм, жесткость 0,02 Н/м). Данные обрабатывались при помощи программного обеспечения Digital Instruments и программы NanoScale Explorer.

Микромеханика вирусных частиц

Для исследования механических свойств ротавирусов, вирусные частицы наносили на поверхность слюды, после чего проводили исследование методом АСМ. При этом вначале получали изображение участка поверхности слюды с адсорбированными вирусами в режиме постоянного контакта, а потом снимали силовые кривые для различных точек выбранного участка поверхности. При построении силовых кривых получают зависимость изгиба кантилевера ΔZc от положения образца по отношению к зонду ΔZp (рис. 1). Для анализа механических характеристик более удобно перейти к зависимости ΔZc от величины $D=\Delta Zp - \Delta Zc$ (рис. 3). В этом случае D будет описывать деформацию образца под воздействием зонда, при этом мы предполагаем, что материал образца гораздо мягче, чем материал зонда.

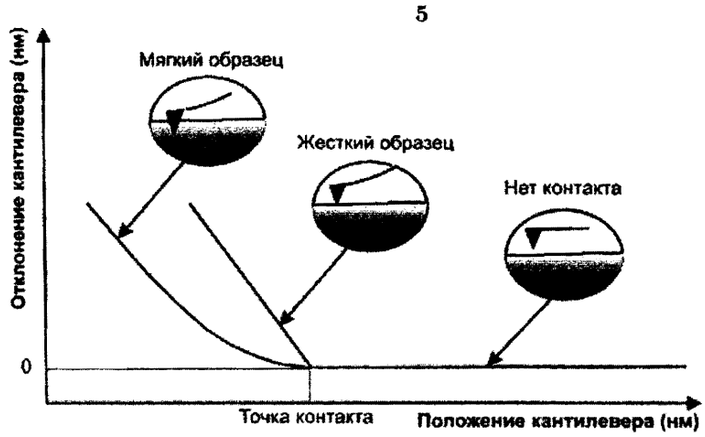

Рис. 1 Характерный вид силовых кривых АСМ для жесткого и мягкого образцов в координатах $\Delta Zc(\Delta Zp)$, полученных при подводе зонда к поверхности.

Площадь под этой кривой представляет собой работу А, которую совершает система при деформации образца. На рис. 2В приведено карта распределения величины А по выбранному участку поверхности, а рис. 3 демонстрирует характерный вид силовых кривых снятых на поверхности слюды и на поверхности вирусной частицы. Для построения карты был использован массив, состоящий из 64 x 64 силовых кривых, снятых на площади 250 x 250 нм^2. Если считать, что деформация вирусной частицы при заданной силе давления является упругой то можно использовать модель Герца [13,20], которая описывает механический контакт двух твердых тел, для нахождения значения модуля Юнга вирусной частицы. Согласно этой модели:

$$F = B \cdot D^{3/2} \qquad (1)$$

где $F=k\Delta Zc$ – сила давления на образец, а

$$B = \frac{1}{\frac{3}{4}\left(\frac{1-\sigma_o^{\,2}}{E}\right)\sqrt{\frac{1}{R_з}+\frac{1}{R_o}}}$$

где E- модуль Юнга вирусной частицы, $R_э$ – радиус кривизны зонда, R_o – радиус кривизны вирусной частицы, σ_o - коэффициент Пуассона вирусной частицы. Таким образом, если произвести аппроксимацию силовой кривой снятой в точке, которая соответствует центру вирусной частицы, зависимостью вида (1), и методом наименьших квадратов определить значение коэффициента B/k, то можно вычислить величину модуля Юнга для вирусной частицы. Усредняя значение этого коэффициента по нескольким кривым, и считая, что диаметр ротавируса составляет 70 нм, радиус кривизны зонда – 10 нм, а жесткость балки кантилевера равна 0,02 Н/м, получим модуль Юнга вирусной частицы $E=1{,}0 \times 10^8 \pm 0{,}3 \times 10^8$ Па. Для сравнения значение модуля упругости для вируса табачной мозаики составило 4×10^9 Па [5], а для X вируса картофеля 7×10^8 Па [6].

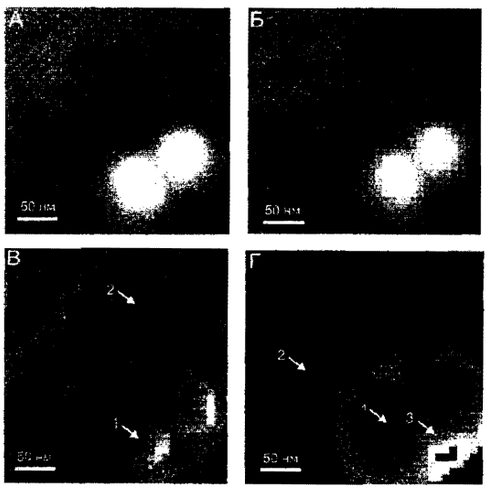

Рис.2 Построение многомерного образа вирусной частицы на основе данных, полученных в различных режимах работы прибора. А – топография поверхности, полученная в режиме постоянного контакта, Б - топография поверхности, полученная в режиме снятия силовых кривых АСМ, В – карта распределения работы, совершаемой системой при деформации образца, Г – карта распределения силы адгезии зонда АСМ к поверхности образца.

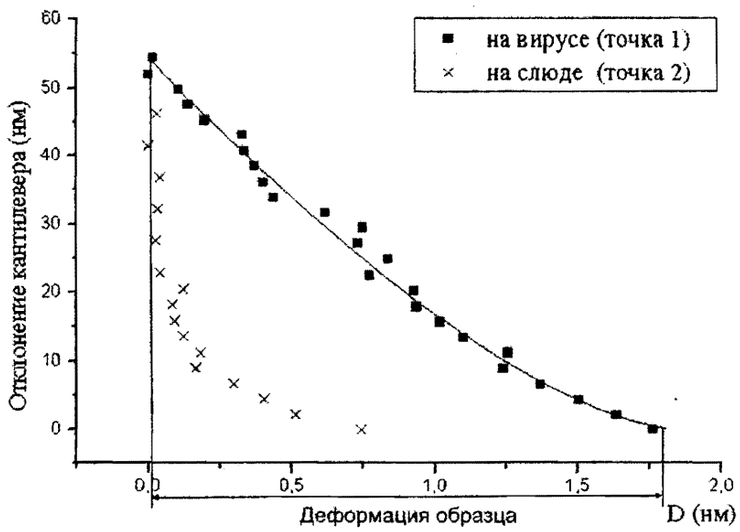

Рис. 3 Силовые кривые АСМ в координатах $\Delta Zc(D)$ снятые в точках 1 и 2 рисунка 2В, соответствующие поверхности вирусной частицы и поверхности слюды. Кривая, снятая в точке 1 аппроксимирована зависимостью вида (1). Кривые получены при подводе кантилевера к поверхности образца.

Следует отметить, что для успешного применения модели Герца необходимо исключить из рассмотрения силовые кривые, полученные в точках на границах вирусной частицы, поскольку в этом случаем возникают искажения, связанные с формой зонда и особенностями лазерной системы слежения [1].

В то время как силовые кривые АСМ полученные при подводе кантилевера к поверхности дают возможность определить упругие характеристики объекта, силовые кривые АСМ, полученные при отводе от поверхности позволяют измерить силу адгезии зонда к поверхности. Эта сила соответствует максимальному отрицательному изгибу кантилевера на силовой кривой (рис. 4). Карта распределения сил адгезии для случая ротавирусов приведена

на рис. 2Г. Величина силы адгезии в центре вирусной частицы составляет 0,3 нН, а на краях – 1 нН, что объясняется увеличением площади контакта в граничных точках, которое возникает в связи с формой зонда АСМ.

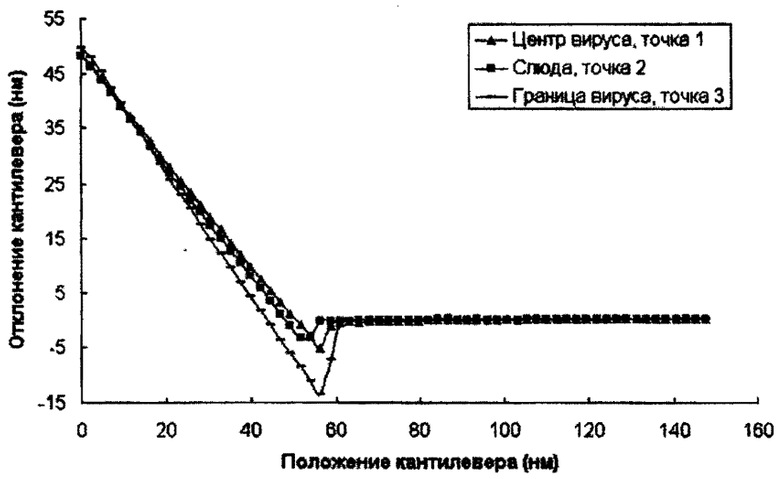

Рис. 4 Силовые кривые АСМ полученные при отводе кантилевера от поверхности образца в точках, которые соответствуют точкам 1,2,3 на рис. 2Г. Адгезия зонда к поверхности в точках соответствующих границам вирусной частицы (точка 3) больше чем в центре вируса (точка 1).

АСМ вирусов на специфических подложках

В процессе работы было проведено исследование образцов аденовируса, иммобилизованного на неспецифические и специфические подложки методом АСМ. Случай неспецифических подложек рассматривался для адекватного отождествления объектов наблюдаемых на ЛБ пленках антител. Наблюдаемый диаметр аденовируса по данным АСМ составляет в среднем 120 нм, а наблюдаемая высота - 75 нм [9]. На следующем этапе работы была исследована топография сформированных пленок на трех различных стадиях: пленки антител, перенесенные на поверхность золота до добавления БСА, те же пленки, но уже после блокировки мест неспецифического связывания за счет добавления БСА и ЛБ пленки комплексов после добавления в систему образца аденовируса. Средняя толщина ЛБ пленки комплекса антитело-АПЭ на поверхности золота составляет 12 нм. Последующее добавление бычьего сывороточного альбумина ведет к выравниванию ЛБ пленки. Добавление образца аденовируса в систему приводит к увеличению толщины ЛБ пленки.

Для определения толщины пленки использовалась следующая методика: участок поверхности образца (1,5 мкм х 1,5 мкм) сканировался с большой силой взаимодействия зонд-образец, что приводило к “сдиранию” пленки на этом месте и позволяло визуализировать поверхность подложки. Полученный перепад высот отождествлялся с толщиной ЛБ пленки антител, после добавления антигена. Эта величина варьировалась от 12 до 14 нм в зависимости от выбранного участка поверхности, то есть можно констатировать некоторое увеличение толщины пленки по сравнению с предыдущим случаем. Кроме того, на поверхности наблюдались частицы (рис. 5), которые по своим морфологическим характеристикам совпадали с частицами аденовируса, нанесенными на поверхность золота, что дает возможность отождествить их с целыми частицами аденовируса.

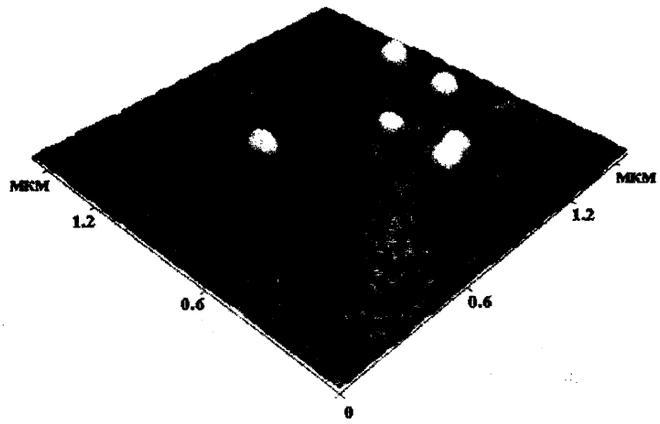

Рис.5 Отдельные частицы аденовируса на поверхности ЛБ пленки соответствующих антител. В местах присоединения вирусов к поверхности, пленка имеет более плотную структуру. Сканирование было осуществлено в дистиллированной воде с использованием жидкостной ячейки АСМ. Размер кадра составляет 1,5 x 1,5 мкм^2 ,а перепад высот по вертикальной оси – 80 нм.

Предложенный способ иммобилизации вирусных частиц на поверхности подложки для АСМ дает возможность проводить исследования в жидкой среде, при этом взаимодействие между вирусной частицей и поверхностью подложки оказывается достаточным, для того чтобы частица была надежно закреплена на поверхности, что и продемонстрировано на рис. 5. Являясь мощным средством анализа поверхности, атомно-силовая микроскопия позволила детально исследовать топографию поверхности ЛБ пленок комплексов антитело-АПЭ на различных стадиях проведения анализа с использованием аденовируса и соответствующих антител.

Заключение

В работе был предложен метод исследования микромеханики вирусов при помощи силовых кривых АСМ, при этом величина модуля Юнга ротавируса составила $E=1{,}0 \times 10^8 \pm 0{,}3 \times 10^8$ Па. Были получены карты распределения упругих характеристик и адгезии зонда к поверхности образца для случая ротавирусов, адсорбированных на слюду. Были описаны особенности применения специфических подложек в АСМ вирусов на примере аденовируса и решена задача фиксации объекта на поверхности подложки для проведения исследования методом АСМ. Предложенные подходы позволяют расширить набор характеристик, описывающих вирусную частицу.

Список литературы

1. *Binning, G., Quate, C.F., Gerber, C.* // Phys. Rev. Lett. 1986 V.56. P. 930-933.
2. *Kuznetsov Yu.G., Malkin A.J., Glantz W., McPherson A.*//J. of Cryst. Growth. 1996. V. 168. P. 63-73.
3. *Mantovani J.D., Allison D.P., Warmack R.J., Ferrel T.L. et al* //J. of Microscopy. 1990. V. 158. Pt 1. P. 109-116.
4. *Lyubchenko B.L., Jacobs, Lindsay S.M.* //Nuclear Acids Research. 1992. V. 20. N. 15. P. 3983-3986.
5. *Галлямов М.О.* Сканирующая микроскопия нуклеиновых кислот и тонких органических пленок: диссертация канд. физико-математических наук (01.04.07): МГУ, 1999. 228 с.
6. *Kiselyova O.I., Nasikan N.S., Yaminsky I.V* // Physics of Low-Dimensional Structures. 2001. V. 3/4. P. 167-174.
7. *Gerba C.P., Rose J.B.* // Drinking water microbiology/ Eds. Springer-Verlag, New York. 1990. P. 380-395.
8. *Яминский И.В., Большакова А.В., Логинов Б.А., Протасенко В.В., Суворов А.Л., Козодаев М.А., Волнин Д.С.* // Поверхность: рентгеновские, синхротронные и рентгеновские исследования 1999, Т.7. С. 74-77.
9. *Игнатюк Т.Е, Голутвин И.А., Насикан Н.С., Суворов А.Л., Иванова О.Е., Еремеева Т.П.* // Поверхность 2004., №2., С.38-42.
10. *Tao, N. J., S. M. Lindsay, S. Lees.* // Biophys. J. 1996. V. 63. P.1165–1169.
11. *Fritz, M., M. Radmacher, N. Peterson, H. E. Gaub.* //J. Vac. Sci. Technol. 1994. V.12. P.1526–1529.
12. *Putman, C. A., K. O. Van der Werf, B. G. de Grooth, N. F., Hulst, J. Greve.* // Biophys. J. 1994 V.67. P. 1749–1753.
13. *Radmacher M., Fritz M.,Cleveland J.P., Walters D.A., Hansma P.K.*// Langmuir 1994 V. 10. P. 3809-3814.

14. *Barmin A.V., Eremenko A.V., Sokolovsky A.A., Chernov S.F., Kurochkin I.N.* //Biotechnol. Appl. Biochem. 1994.V.18. P. 369-376.

15. *Barmin A.V., Eremenko A.V., Kurochkin I.N., Moskvina N.A.*// Biotechnol. And Bioengineering 1994. V.44. P. 849-853.

16. *Бабицкая Ю.И., Будашов И.А., Курочкин И.Н., Чернов С.Ф.*// Биол. Мембраны 1996. Т. 13. вып. 6. С. 634-641

17. *Wang J., Lin Y., Eremenko A.V., Kurochkin I.N., Mineeva M.F.* //Anal. Chem. 1993. V. 65. P. 513-516.

18. *Павельев А.Б., Курочкин И.Н., Чернов С.Ф.* // Биол. Мембраны 1998. Т. 15. вып. 3. С. 342-348.

19. *Курочкин И.Н., Будашов И.А., Павельев А.В., Денисов А.К., Скрипнюк В.В., Шабанов Г.А.* // Сенсорные Системы, 1998., т. 12, вып. 1, С. 122-134.

20. Ландау Л.Д., Лифшиц Е.М., Теория упругости, М.: Наука, 1987. 244 с.

Подписано к печати 24.11.03 Формат 60x90 1/16
Усл. печ. Л. 1,0 уч.-изд. Л. 0,7 Тираж 101 экз. Заказ 18-03
Индекс 3649

Отпечатано в ИТЭФ, 117218, Москва, Б. Черемушкинская, 25