

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ АТОМНО-СИЛОВОЙ МИКРОСКОПИИ ПРИ ИДЕНТИФИКАЦИИ СПЕЦИФИЧЕСКИ МАРКИРОВАННЫХ МОЛЕКУЛ И КЛЕТОК МИКРООРГАНИЗМОВ

Идентификация биологических молекул и микроорганизмов является важной задачей микробиологии, традиционно решаемой с помощью маркированных антител. Однако в большинстве случаев соответствующие методы основаны на обнаружении значительного количества взаимодействующих молекул и не позволяют выявить их распределение по поверхности. Один из возможных путей решения состоит в использовании современного метода атомно-силовой микроскопии.

В настоящей работе методом атомно-силовой микроскопии обнаружены и изучены специфические комплексы, сформированные с участием наноразмерных меток, содержащие коллоидное золото или аморфный углерод, на поверхности бактериальных клеток *Staphylococcus aureus* и на поверхности иммунологического планшета. Установлены морфологические характеристики и карта распределения выявляемых комплексов по исследуемым поверхностям. В экспериментах с обнаружением единичных молекул определена чувствительность метода и проведено сравнение с иммуноферментным анализом. Полученные результаты указывают на высокую чувствительность предлагаемого метода и определенные преимущества углеродных меток по сравнению с золотыми метками, по причине их легкого обнаружения и однозначности в выявлении на полученных изображениях. Проведена идентификация микроорганизмов в модельных двухкомпонентных биологических системах и разработаны подходы к маркированию бактериальных клеток в сложных биологических смесях для направленного их выделения и последующего изучения.

Таким образом, использование атомно-силового микроскопа в сочетании с наноразмерными углеродными и золотыми метками, позволяет реализовать новый способ идентификации единичных молекул и микроорганизмов в ассоциациях сложного компонентного состава.

Ключевые слова: идентификация молекул, детектирование микроорганизмов, золотые и углеродные метки, атомно-силовая микроскопия

В микробиологии разработка быстрых и чувствительных методов распознавания биомолекул и бактерий остается достаточно актуальной и в ряде случаев решается путем специфического маркирования микроорганизмов с последующим микроскопическим исследованием. В случае использования световой микроскопии это достигается использованием иммунохимических или иммунофлюоресцентных меток [1], а при электронной микроскопии распознающие антитела конъюгируются с электронно-плотными частицами, например, коллоидным золотом [2]. На этом фоне метод атомно-силовой микроскопии для обнаружения микроорганизмов только лишь занимает своё место в ряду существующих видов микроскопии [3], [4]. Способы специфического маркирования объектов для атомно-силовой микроскопии разработаны, соответственно, в значительно меньшей степени.

Атомно-силовой микроскоп (АСМ), демонстрируя нанометровое латеральное и пространственное разрешение, позволяет исследовать не только клеточные и субклеточные структуры, но и отдельные молекулы без трудоемких

и повреждающих процедур пробоподготовки [5]. Указанные возможности АСМ позволяют развивать высокочувствительные методы обнаружения единичных комплексов на поверхностях микроорганизмов, что открывает широкие перспективы для анализа иммуно- и субстратспецифической активности. Критерием для выявления комплексов антиген-антитело может выступать оценка морфометрических характеристик визуализируемых молекул [6]. Для повышения надежности обнаружения единичных комплексов на поверхности бактериальных клеток, распознающие антитела конъюгируют с различными маркерами, в качестве которых могут выступать частицы, размеры которых находятся в пределах хорошей разрешающей способности микроскопа и имеют отчетливую структуру [6]. Это в свою очередь позволяет не только установить факт взаимодействия, но и определить локализацию составляющих реакции антиген-антитело, а также проводить их количественный анализ.

Целью работы являлась разработка АСМ метода для идентификации единичных молекул и клеток с помощью золотых и углеродных

меток. Критерием обнаружения являлась непосредственная визуализация и количественное определение морфометрических характеристик комплексов антиген-антитело.

Процесс образования комплексов антиген-антитело (Аг-Ат) на первом этапе изучался в модели *in vitro* на дне лунок стандартных иммунологических планшетов. Специфическими маркерами для контроля реакции выступали: 1) протеин А, конъюгированный с коллоидным золотом (PrA-Au); 2) протеин G, конъюгированный с аморфным углеродом (PrG-C). Молекулы протеина А и G обладают неспецифическим сродством к Fc-фрагменту антитела и за счет наноразмерной метки имеют явно выраженную морфологию и стандартные размеры, хорошо различимы на АСМ-изображениях и легко идентифицируются по значению вертикального размера, что обеспечивает высокую надежность узнавания частиц антигена [7].

Исследования проводились с помощью атомно-силового микроскопа СММ-2000 (ЗАО «ПРОТОН-МИЭТ», Россия) с использованием кантиллеров общего назначения MSCT (Bruker, США), жесткостью 0,01 Н/м и радиусом кривизны зонда не более 15 нм. Количественный морфометрический анализ полученных изображений проводили с использованием штатного программного обеспечения микроскопа. Методика приготовления образцов подробно описана в работах [8] и [9].

Для решения задачи идентификации молекулярных комплексов методом АСМ были последовательно изучены: используемые конъюгаты на подложке из слюды, что позволило количественно оценить их характерные морфологические особенности; поверхность лунок пластикового планшета для иммунологических реакций в отсутствие и с молекулами антигена адсорбированных на ней, а также инкубированных с антителами и конъюгатами антител. Антигены, адсорбированные на дне лунок иммунологического планшета, визуализируются в виде дискретных макромолекул со средним диаметром $75,3 \pm 2,1$ нм и высотой $10,3 \pm 0,4$ нм. Измеренные значения соответствуют литературным данным, согласно которым размер молекулы используемого в работе антигена (вирус краснухи) лежит в диапазоне 40-80 нм [10].

При инкубировании совместно со специфическими антителами иммуноглобулина G отмечалось увеличение диаметра (на 36 нм) и высоты (5 нм) наблюдаемых на подложке структур, идентифицированных в качестве молекул антигена. Увеличение размеров согласуется с результатами морфометрии единичных молекул иммуноглобулина G, полученными авторами [11]-[12]. Соразмерное укрупнение визуализируемых структур свидетельствует о формировании специфических комплексов антиген-антитело, обнаружение которых, однако, возможно лишь при измерении размерных характеристик большого числа структур для проведения статистического анализа и определения достоверных различий.

Инкубирование комплексов Аг-Ат в присутствии конъюгатов золота приводило к формированию маркированных комплексов на поверхности лунки иммунологического планшета (рисунок 1а). Так, обнаруживались структуры округлой формы, визуалью сложно отличимые от немаркированных комплексов. Средний диаметр меченых комплексов составлял 190 нм, высота – 30 нм.

Несколько иная картина наблюдается в случае использования углеродных меток (рисунок 1б). Маркированные аморфным углеродом комплексы, в отличие от всех приведенных выше случаев, по причине значительного размера совершенно отчетливо визуализируются на подложке. Сопоставление кривых распределения диаметра и высоты исследуемых частиц на каждом этапе исследования, позволило проследить процесс формирования специфических комплексов, что подтверждает смещение размерных характеристик полученных комплексов.

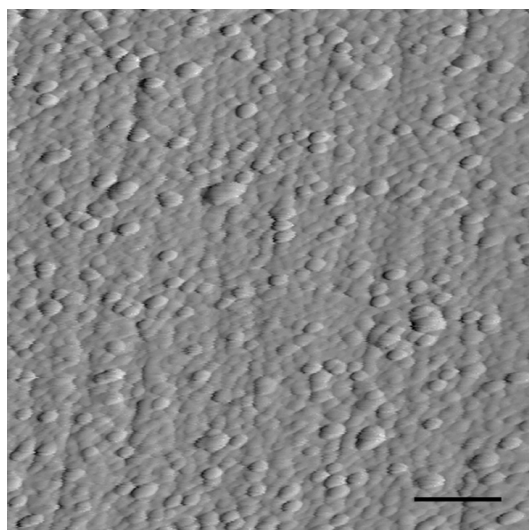
Следующим этапом исследования являлось определение возможности специфического маркирования исследуемых микроорганизмов *Staphylococcus aureus* в *in vivo* условиях. Критерием идентификации являлась визуализация маркерных комплексов непосредственно на поверхности бактериальных клеток. Специфические комплексы, представленные конъюгатами иммуноглобулина G с коллоидным золотом (IgG-Au) и аморфным углеродом (IgG-C), равно как и все последующие объекты исследования в экспериментах *in vivo*, были исследованы методом АСМ на слюдяных подложках. Выбор

клеток *S. aureus* в качестве модельных обусловлен тем, что данные бактерии представлены формами, имеющими достаточно однородную морфологию, кроме того, клеточная стенка бактерий содержит характерный для штаммов *S. aureus* протеин А, на долю которого приходится от 6% до 30% массы клеточной стенки [13]. Являясь поверхностным антигеном, протеин А обладает способностью к неспецифическому соединению с Fc-фрагментами антител, в связи с чем стафилококки были использованы в нашей работе в качестве лигандов антител, конъюгированных с наночастицами коллоидного золота [14].

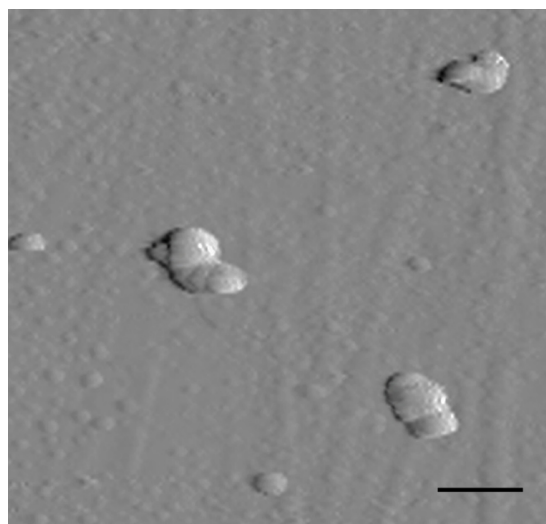
Интактные клетки *S. aureus* визуализировались как морфологически однородные объекты округлой формы шириной 780 нм, с минимальным размером 550 нм и максимальным значением 1100 нм. Опытная часть образцов представляла инкубацию клеток *S. aureus* совместно с частицами IgG-Au. Результатом их взаимодействия являлась адсорбция частиц IgG-Au к поверхности бактериальных клеток *S. aureus* предположительно в участках, богатых протеином А. Морфометрический анализ частиц, обнаруживаемых на поверхности опытных клеток после воздействия антител, конъюгированных с наночастицами коллоидного золота, позволил установить их средний размер, который составил 127 нм. Сравнительный анализ морфологических параметров клеток опытной и контрольной групп указывал на достоверное увеличение размера и

значения среднеквадратичной шероховатости клеток опытной группы. Анализ более 200 меток позволил выявить неравномерное распределение конъюгатов вдоль поверхности бактерий, что можно объяснить дискретной локализацией протеина А в клеточной мембране.

Для подтверждения специфичности данных частиц в отношении клеток золотистого стафилококка в опытную среду был внесен дополнительный микроорганизм. В качестве дифференцирующего компонента была выбрана культура клеток *Bacillus licheniformis*, клетки которой отличаются по морфологическим и рецепторным свойствам от клеток золотистого стафилококка, т.е. по морфологическому типу представляют собой палочки длиной 2 мкм и шириной 0,9 мкм, не несущие на своей поверхности протеина А или иные Fc-рецепторы, что говорит об их неспособности к связыванию антител через Fc-фрагмент. Полученные в ходе АСМ визуализации результаты указали на предпочтительное (56,5 % частиц) связывание IgG к клеткам *S. aureus*. Около 24,7 % конъюгатов IgG-Au не были связаны с клеточной поверхностью или были локализованы на границе между *S. aureus* и *B. licheniformis* (12,3%). Некоторые наблюдаемые метки (6,3%) были найдены на поверхностях бацилл, что являлось нежелательным фактором для селективного маркирования и распознавания протеина А на поверхности клеток. Мы предполагаем, что подобное неспецифическое связывание может быть объяснено



а



б

Рисунок 1. Комплексы «антиген-антитело», меченные коллоидным золотом (а) и аморфным углеродом (б). Масштабная линейка соответствует 500 нм.

электростатическим взаимодействием между отрицательно заряженной поверхностью клеток [15] и положительно заряженными частицами коллоидного золота [16]. Это обстоятельство частично ограничивает использование золотых частиц в клеточных суспензиях с отрицательным значением дзета-потенциала.

Алгоритм выполнения экспериментов с участием углеродных меток был аналогичен экспериментам с золотыми метками. При проведении исследований в двухкомпонентных смесях было отмечено чрезвычайно низкое количество частиц на дифференцирующем микроорганизме, что очевидно свидетельствовало о практически полном отсутствии неспецифи-

ческого связывания меток с поверхностью бактерий. По этой причине специфичность метода идентификации бактериальных клеток методом атомно-силовой микроскопии с участием углеродных меток значительно выше этого показателя для золотых наночастиц.

Таким образом, представленные в работе результаты указывают на возможность использования атомно-силового микроскопа в задачах детектирования и идентификации маркированных молекул и микроорганизмов. При этом, особое внимание требуется уделять выбору наноразмерных меток, от которых зависит чувствительность и специфичность предлагаемого подхода.

02.10.2015

Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект №13-04-97054).

Список литературы:

1. Ramos-Vara J.A. Technical aspects of immunohistochemistry // *Vet. Pathol.* – 2005. – 42. – P. 405-426.
2. *Electron Microscopy: Methods and Protocols*, Kuo J ed. Humana Press. – 2007. – 608 p.
3. Binning G, Quate C.F, Gerber C. Atomic force microscope//*Phys.Rev.Lett.*– 1986. – 56(9). – P. 930-933.
4. Dufrene Y.F., Hinterdorfer P. Recent progress in AFM molecular recognition studies//*Pflugers Arch* – Eur.*J.Physiol.* – 2008. – 256. – P.237–245 DOI:10.1007/s00424-007-0413-1.
5. Heinisch J.J, Lipke P.N, Beaussart A, El Kirat Chatel S, Dupres V, Alsteens D, Dufrene Y.F.//*J.Cell Sci.* – 2012. – 125. – P. 4189-4195. – DOI: 10.1242/jcs.106005.
6. Maluchenko N.V., Agapov I.I., Tonevitsky A.G. et al. Detection of immune complexes using atomic force microscopy//*Biofizika.* – 2004. – V.49. – № 6. – P. 1008–1014.
7. Quist, A. P. Direct measurement of single immunocomplex formation by atomic force microscopy/ A. P. Quist, A. A. Bergman, C. T. Reimann // *Solution for a nanoscale world.* – 2004. – № 8. – P. 4.
8. Nikiyani H., Tatlybaeva E., Rayev M. and Deryabin D. Applying Nanosized Gold and Carbon Immunolabels for the Quantitative Detection of Specific Ag–Ab Complexes by Using Atomic Force Microscopy//*Current Nanoscience.*– 2015. – V.11. – P. 615-620.
9. Tatlybaeva E.B., Nikiyani H.N., Vasilchenko A.S. and Deryabin D.G. Atomic force microscopy recognition of protein A on *Staphylococcus aureus* cell surfaces by labeling with IgG–Au conjugates//*Beilstein J. Nanotechnol.* – 2013. – 4. – P.743–749. DOI:10.3762/bjnano.4.84.
10. Edlich, R.F., Winters, K.L., Long, W.B., Gubler, K.D. Rubella and congenital rubella (German measles)// *Journal of Long-Term Effects of Medical Implants.*– 2005. – 15(3). – P.319–328.
11. Zhang, P.C., Bai, C., Ho, P.K., Dai, Y., Wu, Y.S. Observing interactions between the IgG antigen and anti-IgG antibody with AFM // *IEEE Eng. Med. Biol. Mag.* – 1997. – 16(2). – P.42-46.
12. Chen Y., Cai J., Xu Q., Chen Z.W. Atomic force bio-analytics of polymerization and aggregation of phycoerythrin-conjugated immunoglobulin G molecules//*Mol. Immunol.* – 2004. – 41(12). – P. 1247–1252. DOI 10.1016/j.molimm.2004.05.012.
13. Forsgren A, Sjöquist J. “Protein A” from *S. aureus*. I. Pseudo-immune reaction with human gamma-globulin// *J.Immunol.*– 1966. – 97(6). – P.822–827.
14. DeDent A.C., McAdow M. and Schneewind O. Distribution of Protein A on the Surface of *Staphylococcus aureus*//*J.Bacteriol.*– 2007. – V.189. – №12. – P. 4473-4484.
15. Dickson J. S., Koohmarai M. K. Cell surface charge characteristics and their relationship to bacterial attachment to meat surfaces // *Appl.Environ.Microbiol.* – 1989. – 55(4). – P.832.
16. Leff D.V., Brandt L., Heath J.R., Synthesis and Characterization of Hydrophobic, Organically-Soluble Gold Nanocrystals Functionalized with Primary Amines //*Langmuir.*– 1996. – 12 (20). – P. 4723–4730. – DOI 10.1021/la960445u.

Сведения об авторах:

Никиян Аик Николаевич, доцент кафедры биофизики и физики конденсированного состояния Оренбургского государственного университета, кандидат физико-математических наук, доцент
e-mail: nikiyan@yahoo.com

Татлыбаева Елена Батыровна, аспирант кафедры биохимии и микробиологии Оренбургского государственного университета,
e-mail: tatlybaeva@mail.ru

460018, г. Оренбург, пр-т Победы, 13