

РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ НАУК
СИБИРСКОЕ ОТДЕЛЕНИЕ
ИНСТИТУТ ХИМИЧЕСКОЙ КИНЕТИКИ И ГОРЕНИЯ

УДК
№ госрегистрации
Инв.№

УТВЕРЖДАЮ:
Директор ИХКГ СО РАН,
д.ф.-м.н., профессор

_____ С.А. Дзюба
" _____ " _____ 2007 г.

ОТЧЕТ
О НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОЙ РАБОТЕ
по Государственному контракту № 02.512.11.2004 от 27 февраля 2007 г.
по теме:
«БИОСЕНСОРЫ НА БАЗЕ ПОЛИМЕРНЫХ МИКРОЧАСТИЦ – ЖИДКИХ
МИКРОЧИПОВ ДЛЯ ИММУНОДЕТЕКЦИИ ИНФЕКЦИОННЫХ
ЗАБОЛЕВАНИЙ, В ТОМ ЧИСЛЕ И ОСОБО ОПАСНЫХ ВИРУСНЫХ
ИНФЕКЦИЙ».
(заключительный)

Научный руководитель
Зав. лабораторией ИХКГ СО РАН
д.ф.-м.н., профессор

подпись, дата

В. П. Мальцев

Новосибирск 2007

СПИСОК ИСПОЛНИТЕЛЕЙ

Руководитель темы

д.ф.-м.н., профессор

В.П. Мальцев

(весь отчет)

подпись, дата

Исполнители темы:

с.н.с., к.ф.-м.н.

А.В. Чернышев

(Раздел 1, 3)

подпись, дата

м.н.с.

В.М. Некрасов

(Раздел 1, 3)

подпись, дата

ст. инженер

К.В. Гилев

(Раздел 1)

подпись, дата

Т.Н. Шерстова

(Раздел 2, 3)

подпись, дата

д.б.н., профессор

В.Б. Локтев

(Раздел 2, ФГУН ГНЦ ВБ
«Вектор» Роспотребнадзора)

подпись, дата

к.б.н.

Е.И. Казачинская

(Раздел 2, ФГУН ГНЦ ВБ
«Вектор» Роспотребнадзора)

подпись, дата

к.б.н.

Е.В. Протопопова

(Раздел 2, ФГУН ГНЦ ВБ
«Вектор» Роспотребнадзора)

подпись, дата

к.б.н.

И.А. Разумов

(Раздел 2, ФГУН ГНЦ ВБ
«Вектор» Роспотребнадзора)

подпись, дата

к.б.н.

А.В. Качко

(Раздел 2, ФГУН ГНЦ ВБ
«Вектор» Роспотребнадзора)

подпись, дата

А.В. Иванова

(Раздел 2, ФГУН ГНЦ ВБ
«Вектор» Роспотребнадзора)

подпись, дата

РЕФЕРАТ

Отчет 19 с., 2 ч., 10 рис., 4 табл., 2 источника.

СВЕТОРАССЕЯНИЕ, ПОЛИМЕРНЫЕ ЛАТЕКСЫ, ПРЯМАЯ И ОБРАТНАЯ ЗАДАЧИ СВЕТОРАССЕЯНИЯ, ПРОТОЧНАЯ ЦИТОМЕТРИЯ, ИЗМЕРЕНИЯ РАЗМЕРА И ПОКАЗАТЕЛЯ ПРЕЛОМЛЕНИЯ СФЕРИЧЕСКИХ ЧАСТИЦ

Объектами исследования являлись системы иммунодетекции на основе полистирольных латексов для выявления антигенов вирусов Западного Нила, клещевого энцефалита, Марбург при помощи моноклональных антител и флуоресцентной метки.

Цель работы состояла в том, чтобы провести получение жидких микрочипов для выявления антигенов вирусов Западного Нила, клещевого энцефалита, Марбург, на основе моноклональных антител. В результате проделанной работы получены препараты жидких микрочипов представляющих из себя полистирольных микрочастицы размерами 6, 8 и 10 микрон с иммобилизованными моноклональными антителами, которые способны захватывать молекулы антигенов вирусов Западного Нила, клещевого энцефалита, Эбола и Марбург из раствора. Выявление иммунных комплексов на поверхности микрочастиц проводилось вторым видом моноклональных антител меченых флуорохромом с последующей цитофлюорометрией латексов.

В процессе работы проводился анализ условий формирования профиля скорости потока в переходной зоне сканирующего проточного цитометра. Был использован новый метод решения обратной задачи светорассеяния, позволяющий определять характеристики одиночных микросфер в автоматическом режиме.

В результате проведенной работы впервые было получено аппроксимационное уравнение, учитывающее установление скорости гидрофокусируемого потока в капиллярной системе цитометра. Впервые был использован метод глобальной оптимизации для решения обратной задачи светорассеяния для одиночных сферических частиц.

Сканирующий проточный цитометр позволяет измерять размер и показатель преломления одиночных микросфер с точностью, превышающей естественную ширину распределения микросфер по размеру. Полимерные микросферы могут использоваться в качестве носителя биосенсора жидкого мультиплексного биочипа для одновременной детекции до 50 патогенов.

Степень внедрения – жидкий биочип на базе полностью автоматизированного сканирующего проточного цитометра готов к первичной аттестации.

СОДЕРЖАНИЕ

определения, обозначения и сокращения	6
введение.....	7
основная часть	8
1. Сканирующая проточная цитометрия	8
1.1. Гидродинамическая система сканирующего проточного цитометра	8
1.2. Измерение флуоресценции	10
1.2.1. Канал флуоресценции оптической системы цитометра	11
1.2.2. Программная фильтрация.....	13
1.2.3. Измерение флуоресценции на модернизированном сканирующем проточном цитометре	14
1.3. Измерение светорассеяния	15
2. Иммуночувствительный жидкий микрочип	16
2.1. Методы и материалы.....	16
2.1.1. Иммунологические методы	16
2.1.2. Молекулярно-биологические методы:	17
2.1.3. Другие методы:	18
2.1.4. Клеточные культуры и вирусы.....	18
2.1.5. Материалы и реактивы:	18
2.2. Выбор моноклональных антител к вирусам Западного Нила и клещевого энцефалита для конструирования жидких микрочипов	19
2.3. Выбор моноклональных антител против ВЗН.....	20
2.4. Выбор моноклональных антител против ВКЭ	22
2.5. Выбор моноклональных антител и VP40 антигенов филовирусов	22
2.6. Выбор МКА против вируса Эбола и Марбург для конструирования жидких микрочипов.	23
2.6.1. Получение очищенного рекомбинантного VP40 антигена вируса Эбола и его иммунохимическая характеристика.	23
2.6.2. Выбор МКА для выявления антигена вируса Марбург и пригодных для создания жидких микрочипов.	25
2.7. Конструирование микрочипов на основе МКА.....	26
2.8. Кинетика моновалентного лиганд-рецепторного взаимодействия	28
2.8.1. Специфическое связывание.....	28

2.8.2. Специфическое связывание в присутствии неспецифических реакций	29
3. Анализ иммунологического жидкого микрочипа на сканирующем проточном цитометре	32
3.1. Измерение количества МКА на поверхности микросфер	32
3.2. Анализ иммунологического жидкого микрочипа против вируса Эбола.	32
3.3. Анализ иммунологического жидкого микрочипа против вируса Марбург.....	33
3.4. Анализ иммунологического жидкого микрочипа против вирусов клещевого энцефалита и Западного Нила.....	34
3.5. Анализ составного иммунологического жидкого микрочипа.	34
заключение	36
список использованных источников	38

ОПРЕДЕЛЕНИЯ, ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ

В настоящем отчете по НИР применяют следующие термины с соответствующими определениями:

БСА	бычий сывороточный альбумин
ИФА	иммуноферментный анализ
ПЦР	полимеразно цепная реакция
РСК	реакция связывания комплемента
МФА	метод флуоресцирующих антител
СПЦ	сканирующий проточный цитометр
МНК	метод наименьших квадратов
FITC	флуоресцин изотиоцианат
ВЗН	вирус Западного Нила
МКА	моноклональные антитела
ВКЭ	вирус клещевого энцефалита
ВМ	вирус Марбург
ВЭ	вирус Эбола

ВВЕДЕНИЕ

Иммунодетекция особо опасных инфекций, также как и обычных инфекционных заболеваний имеет принципиально важное значение для подтверждения факта наличия в исследуемых пробах опасных инфекционных агентов. Классические методы иммунодетекции, основанные на таких серологических тестах как реакция нейтрализации, реакция торможения гемагглютинации, РСК и МФА, были практически вытеснены сначала радиоммунными методами анализа, затем иммуноферментными методами анализа (ИФА). В настоящее время различные варианты ИФА систем рутинно используются для обнаружения различных инфекционных агентов и антител к ним. Несколько позднее стали развиваться методы детекции, основанные на обнаружении нуклеиновой кислоты инфекционных агентов, в том числе с использованием метода полимеразной цепной реакции (ПЦР). Быстрое развитие методов иммунологии, молекулярной биологии и успехи в развитие высокочувствительных систем инструментальной детекции сигнала, возникающего при взаимодействии биологических молекул, и возможности его компьютерной обработки, создали принципиально новые возможности для развития и создания нового поколения систем иммунодетекции. Для них характерны возможности позволяющие обнаруживать единичные молекулы вирусных антигенов в режиме практически реального времени и способные одновременно определять наличие целого набора антигенов в одной пробе.

Разрабатываемый подход создает основы для создания универсальной системы иммунодетекции особо опасных вирусных патогенов. Он включает в себя метод проточной сканирующей цитофлюорометрии, который позволяет регистрировать результаты нескольких тысяч иммунологических реакций на поверхности микрочастиц и проводить их компьютерную обработку в течение всего нескольких минут. Каждый вид частицы будет нести только один вид антител, что позволит учитывать реакцию антитела с антигеном индивидуально для каждой частицы. Таким образом, смесь частиц, нагруженных разными видами антител (жидкий чип) позволит одновременно регистрировать наличие различных видов антигена в одной пробе. Индивидуальный адрес каждой частицы будет первоначально задан ее размерами, что позволит в ближайшем будущем проводить одновременное определение до 100 видов различных инфекционных агентов одной пробе в течение нескольких минут с компьютерным выводом информации о наличии в пробе особо опасных патогенов. В последующем, планируется изменение системы считывания информации с жидкого чипа, что позволяет надеяться на возможность практически моментальной регистрации нескольких тысяч реакций.

Разрабатываемая технология основана на новом типе прибора – на сканирующем проточном цитометре (СПЦ). Его основное отличие от обычных проточных цитометров

состоит в том, что используется новый тип датчика. Этот датчик собирает весь световой сигнал от микрочастицы. Его анализ позволяет снять значительно больше параметров с микрочастицы, в том числе точно определить размер частицы. Биотехнологической базой для нового метода иммунодетекции являются панели моноклональных антител, которые используются в качестве лиганда на поверхности микрочастиц, антитела меченые флюорохромами и/или ферментами, обеспечивающими изменение окраски микрочастицы. Различные препараты антигенов, в том числе и рекомбинантные, вирусов Западного Нила, клещевого энцефалита и Марбург будут использоваться для стандартизации теста и в качестве положительных контролей.

Таким образом, в рамках проекта создается оригинальная приборная база обеспечивающая работу с жидкими микрочипами и будут получены необходимые иммунологические реагенты для создания жидких микрочипов для иммунодетекции трех вирусных патогенов.

ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ

1. Сканирующая проточная цитометрия

Технология сканирующей проточной цитометрии была создана авторами проекта для решения проблемы, связанной с анализом частиц дисперсных систем в режиме поштучного счета. В данном режиме анализируются одиночные частицы в потоке на скоростях, обеспечивающих проведение детального статистического анализа дисперсной среды. Режим сканирования позволяет существенно увеличить объем снимаемой с каждой частицы информации при ее движении внутри зоны измерения. Описание технологии сканирующей проточной цитометрии детально представлено в работе авторов [1].

Для проведения систематических исследований с биологическими объектами необходимо обеспечить высокую воспроизводимость процесса измерения в виду большой вариативности и видоизменяемости объектов. Воспроизводимость процесса измерения в проточном цитометре зависит от стабильности траектории движения анализируемой частицы в зоне облучения лазерным излучением. Другим важным параметром, который следует учитывать при измерении специфической флуоресценции на проточном цитометре, является чувствительность регистрации переизлученных фотонов. Необходимо добиться максимальной чувствительности, чтобы зарегистрировать специфически меченые молекулы на поверхности микросфер.

1.1. Гидродинамическая система сканирующего проточного цитометра

Траектория движения задается геометрией устройства формирования гидрофокусирующего потока. Для СПЦ была сконструирована и изготовлена оригинальная система формирования гидродинамической фокусировки, работа которой была протестирована анализом стабильных полимерных сферических частиц интеркалированных флуоресцентными молекулами. Анализ показал достаточно высокую воспроизводимость сигналов флуоресценции. Однако при тестовых измерениях полимерных частиц, сенсibilизированных мечеными моноклональными антителами, воспроизводимость была существенно ниже требуемой. Анализ результатов экспериментов показал, что воспроизводимость в основном определяется траекторией движения частицы в зоне измерения. Было проведено математическое моделирование формирования профилей скорости потока при входе в гидродинамическую систему цитометра. Профили скорости в системе рассчитывались, используя численное решение уравнений Навье-Стокса с граничными условиями, определяемыми геометрией каналов. В результате было предложено отнести точку ввода облегающей жидкости на большее расстояние от зоны формирования гидрофокусировки. В результате конструкторской проработки схема гидрофокусирующей

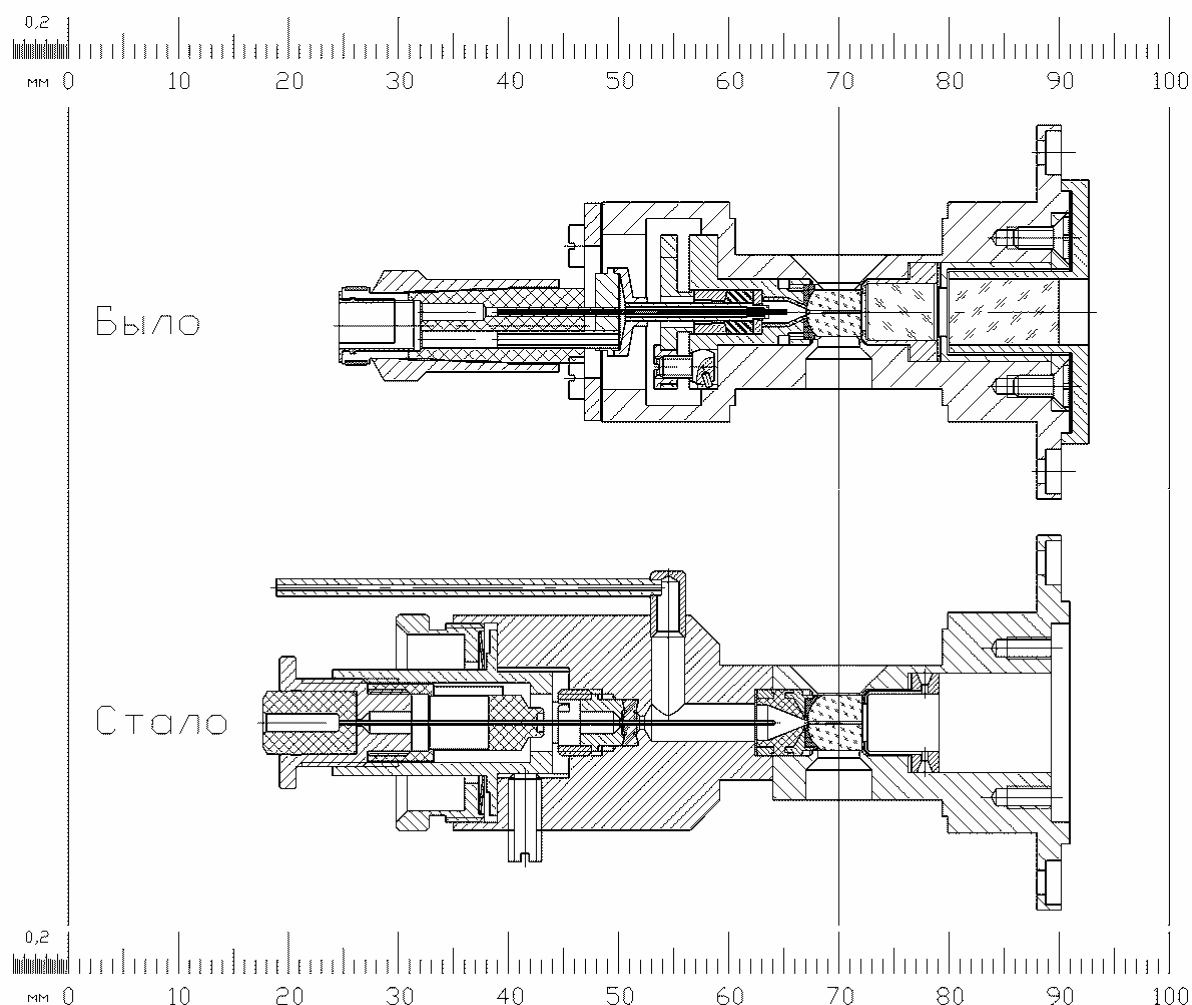


Рис. 1. Система формирования гидрофокусирующего потока сканирующего проточного цитометра.

системы приняла новый вид (Рис. 1). На новой конструкции были измерены полимерные частицы, интеркалированные флуоресцентными молекулами, и микросферы, сенсibilизированные мечеными моноклональными антителами. Дисперсия распределения интенсивности флуоресценции от одиночных частиц уменьшилась на 5 % в первом случае и на 30% во втором. Кардинально улучшилась стабильность траекторий частиц при перезапуске СПЦ. Практически исчезла необходимость тонкой подстройки лазерного луча после остановки работы прибора.

1.2. Измерение флуоресценции

С целью повышения чувствительности определения количества молекул специфически связанного с полимерной частицей красителя, была проведена модернизация канала измерения флуоресценции СПЦ. Модернизация затронула, как оптическую часть СПЦ, так и

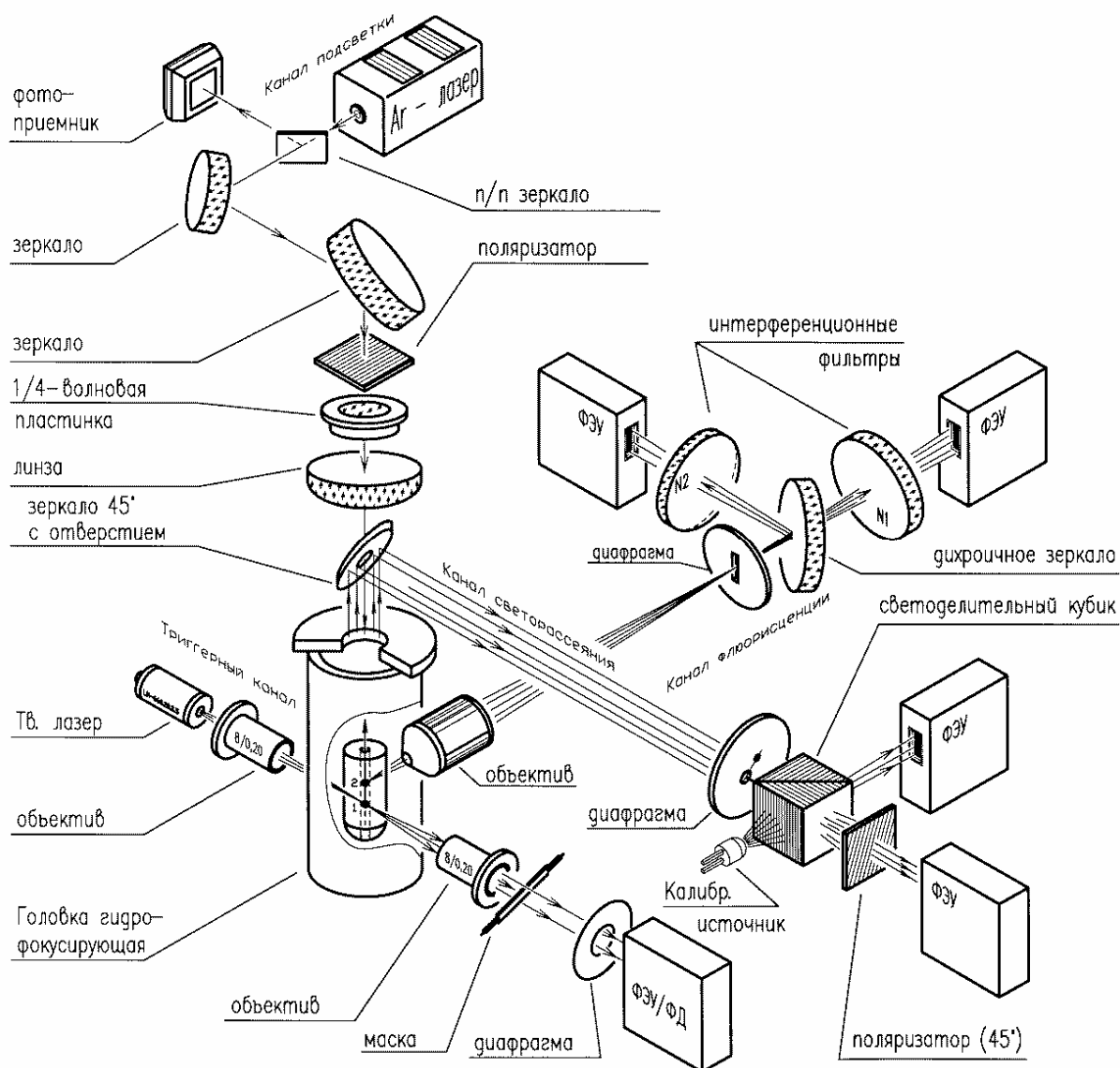


Рис. 2. Оптическая схема сканирующего проточного цитометра.

программную часть, связанную с измерением и обработкой сигналов флуоресценции.

1.2.1. Канал флуоресценции оптической системы цитометра

Оптическая схема СПЦ представлена на Рис. 2. Канал флуоресценции СПЦ образован следующими элементами: объектив, диафрагма, дихроичное зеркало, интерференционные фильтры, фотоэлектронные умножители. Данная схема является классической для проточного цитометра и позволяет одновременно измерять интенсивность флуоресценции в двух спектральных диапазонах, определяемыми характеристиками дихроичного зеркала и интерференционных фильтров. При этом возбуждение флуоресценции осуществляется с помощью лазера, расположенного в триггерном канале СПЦ. При этом настройка оптических элементов осуществляется таким образом, чтобы точка 1 совпадала с точкой 2 (Рис. 2). При этом длительность импульса флуоресценции определяется параметрами луча в триггерном канале и скоростью потока в зоне измерения. Типичный сигнал флуоресценции при данной системе возбуждения представлен на Рис. 3. Характерная длительность сигнала – 50 мкс.

Для увеличения чувствительности измерения флуоресценции от одиночных частиц была проведена модернизация оптической системы флуоресцентного канала СПЦ. Так как для решения задачи создания биосенсора необходима регистрация флуоресценции в одном

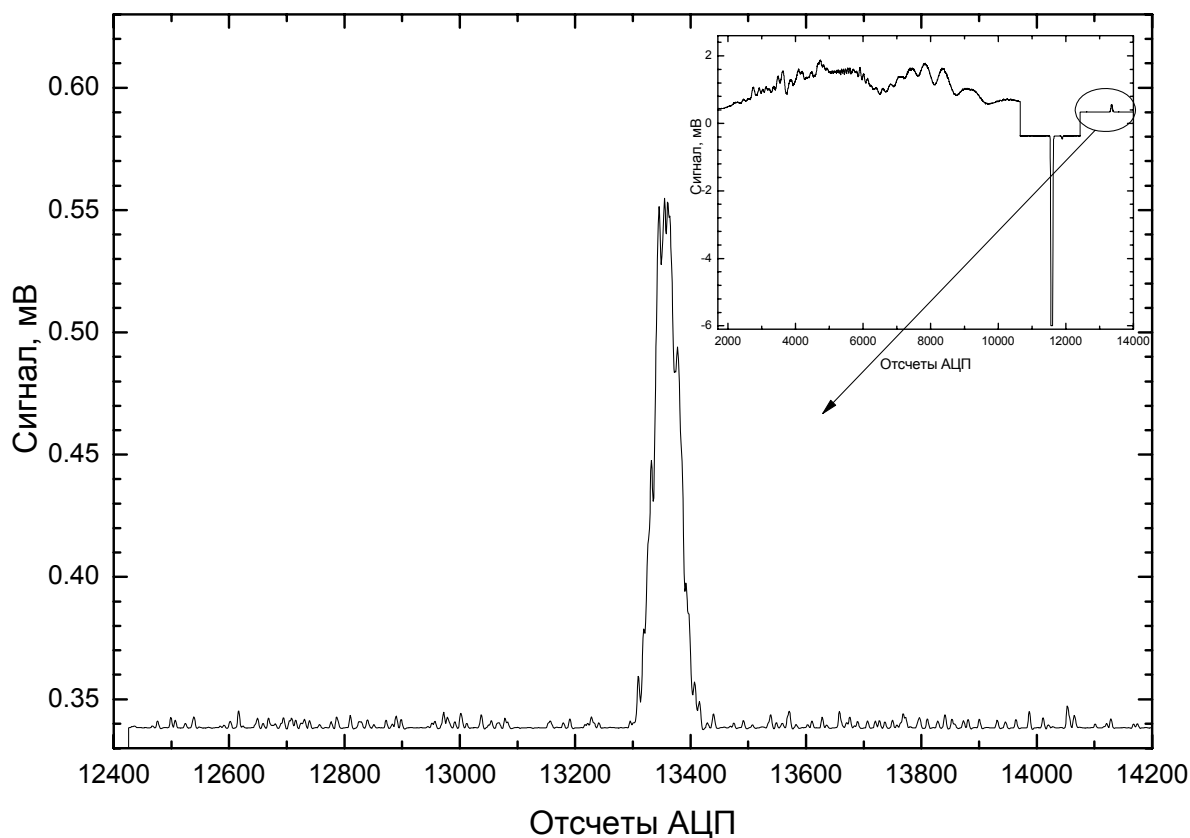


Рис. 3. Сигнал флуоресценции СПЦ до модернизации оптической системы флуоресцентного канала.

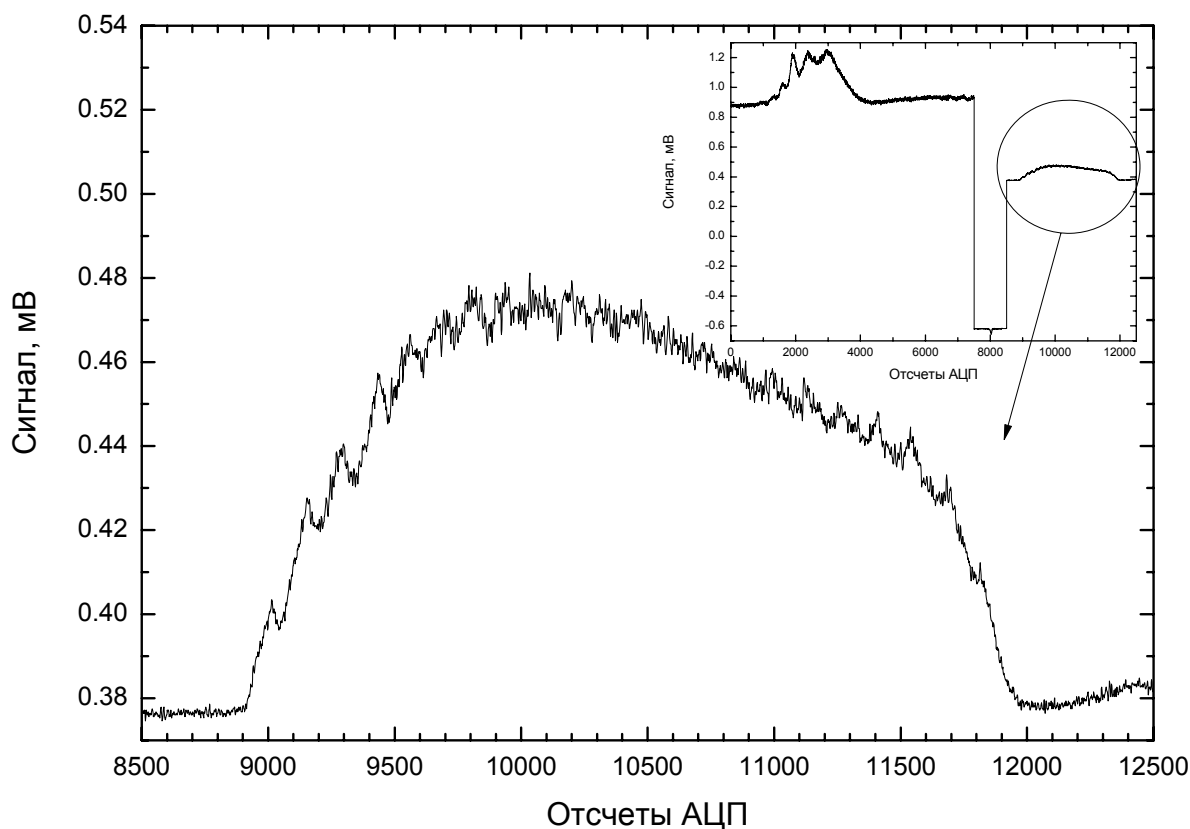


Рис. 4. Сигнал флуоресценции СПЦ модернизированной оптической системы флуоресцентного канала.

спектральном диапазоне, из канала флуоресценции были удалены диафрагма и дихроичное зеркало (Рис. 2). Для увеличения интегрального количества сбора флуоресценции было принято решение впервые осуществить возбуждение флуоресценции с помощью лазера канала подсветки (Рис. 2). При этом длительность сигнала флуоресценции будет определяться не пространственными характеристиками луча возбуждения, а апертурными ограничениями объектива флуоресцентного канала. В результате длительность сигнала флуоресценции достигла 1500 мкс, что привело к увеличению чувствительность приблизительно в 20 раз.

Сигнал в канале флуоресценции имеет две составляющие: собственно флуоресценцию, связанную с наличием флуорохрома на поверхности микросферы, и светорассеяние, величина которого зависит от физических характеристик пролетающей частицы. Для уменьшения влияния светорассеяния в канале флуоресценции предусмотрен интерференционный фильтр. Спектральные характеристики фильтра представлены на Рис. 5 а). При тестировании канала флуоресценции полимерными микросферами разного размера, на поверхности которых отсутствовали флуоресцирующие молекулы, была выявлена зависимость сигнала от размера измеряемых микросфер. Данный факт свидетельствовал о недостаточной степени поглощения интерференционным фильтром светорассеяния. Для того, чтобы уменьшить вклад светорассеяния в канал флуоресценции был установлен

дополнительный интерференционный фильтр с характеристиками, представленными на Рис. 5 б). Использование двух интерференционных фильтров уменьшило вклад светорассеяния на длине волны возбуждения 488 нм на 6 порядков, тогда как уменьшение сигнала флуоресценции составляло около 40%. Тем не менее, зависимость сигнала в канале флуоресценции от размера микросфер сохранилась. Эта зависимость имела третью степень от размера, то позволило нам сделать вывод о нерезонансном возбуждении флуоресценции молекул полистирола. Таким образом, наличие второго интерференционного фильтра не сняло проблему вычитания фона при обработке сигнала фотоумножителя, однако отношение сигнал/шум при этом уменьшилось. В результате было принято решение об использовании одного интерференционного фильтра (Рис. 5 а)).

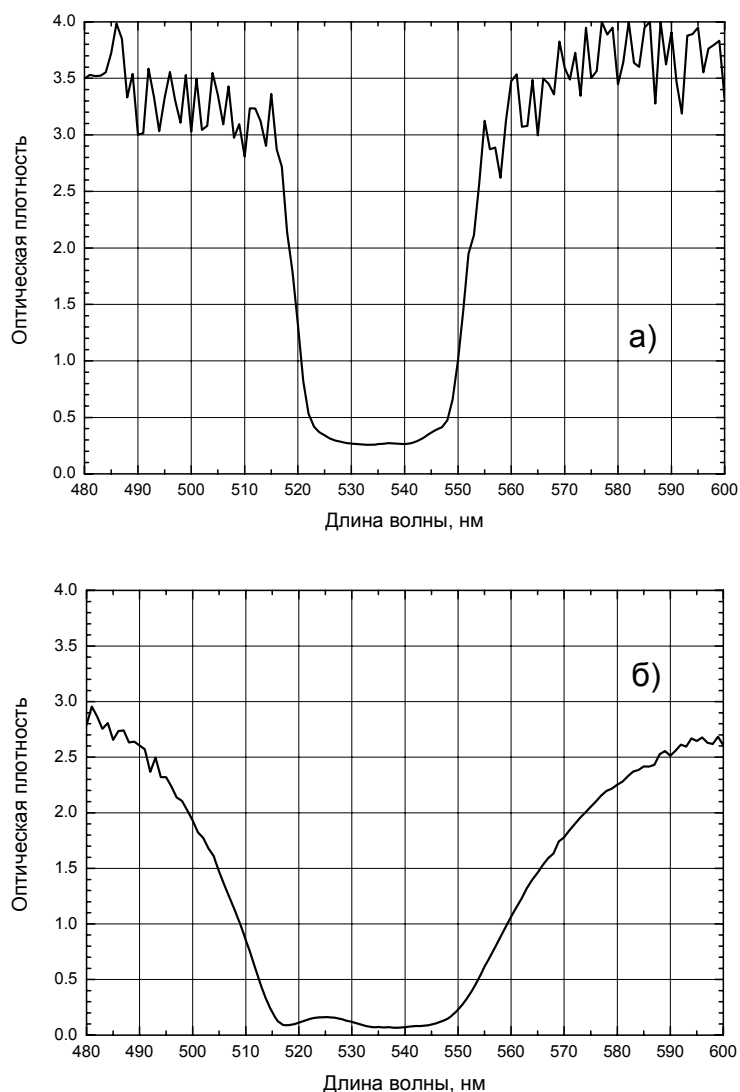


Рис. 5. Спектральные характеристики интерференционных фильтров, использованных в канале флуоресценции СПЦ.

1.2.2. Программная фильтрация

В ходе выполнения работы была реализована программная процедура повышения чувствительности за счет увеличения отношения сигнал/шум. Увеличение отношения было достигнуто за счет уменьшения шумовой составляющей сигнала с помощью программной фильтрации. Поступающие с фотодетекторов сигналы светорассеяния и флуоресценции преобразовывались в цифровой формат с помощью высокоскоростного высокоточного аналого-цифрового преобразователя (6 МГц, 14 разрядов). При максимальной чувствительности фотоумножителя, регистрирующего флуоресценцию, в сигнале наблюдался высокочастотный шум. Для его устранения был использован программный

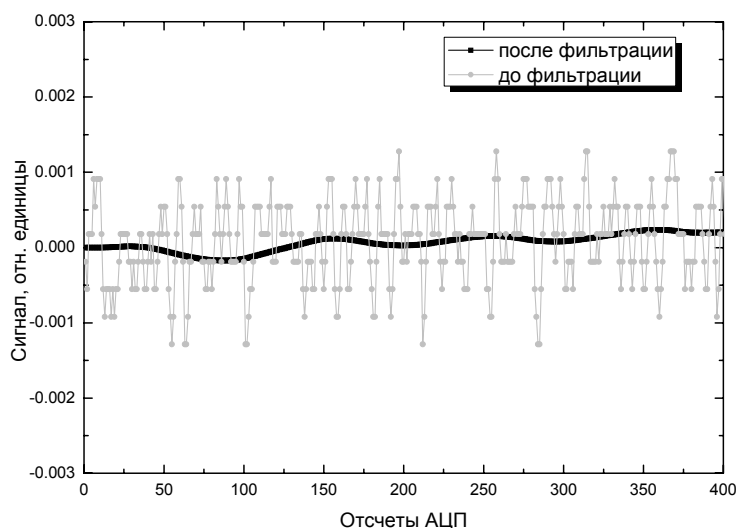


Рис. 6. Влияние программной фильтрации на шум сигнала флуоресценции.

фильтр цифрового сигнала, низкочастотный фильтр Баттерворта 4-ого порядка с частотой отсечки 60 кГц. В результате удалось уменьшить амплитуду шума сигнала флуоресценции в 5 раз. Результаты действия программного фильтра представлены на Рис. 6.

1.2.3. Измерение флуоресценции на модернизированном сканирующем проточном цитометре

В результате проведенной модернизации оптической системы СПЦ и программного обеспечения была достигнута чувствительность в 15 тыс. молекул FITC на одной полимерной микросфере. Следует отметить, что для достижения максимальной чувствительности в измерении флуоресценции, пришлось переместить область максимальной фокусировки лазерного луча в зону измерения флуоресценции, вследствие чего, отношение сигнал шум в канале измерения светорассеяния заметно снизилось. Данное обстоятельство увеличило ошибку определения размера микросфер (особенно для малых размеров), что проявилось в больших дисперсиях функций распределения по размеру анализируемых микросфер. На Рис. 7 представлен результат измерения пробы, содержащей калибровочные микросферы номинальным диаметром 2 мкм фирмы Molecular Probes (каталожный номер F8827) со средним количеством молекул FITC на одной микросфере равным 3.1×10^7 штук, исходные микросферы номинальным диаметром 10 мкм фирмы Molecular Probes и микросферы номинальным диаметром 10 мкм с адсорбированным МКА, меченными FITC. Результаты обработки представленных распределений приведены в Табл. 1.

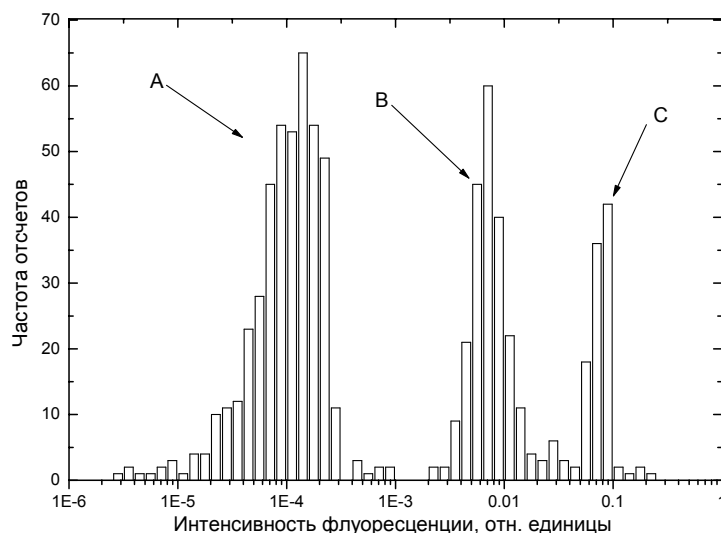


Рис. 7. Распределение интенсивности в канале флуоресценции для калибровочных микросфер (С), микросфер с адсорбированным FITC-меченным белком (В) и исходных микросфер (А).

Сигнал во флуоресцентном канале от исходных микросфер диаметром 10 мкм вызван светорассеянием и служил фоновым уровнем для вычисления вклада флуоресценции в измеряемый сигнал. Таким образом, за предельную чувствительность измерения количества флуоресцирующих молекул на микросферах можно принять дисперсию фонового сигнала. Во всех измерениях величина дисперсии фонового сигнала не превышала значение 6×10^{-4} , что соответствует 1.4×10^4 молекулам FITC. При этом средние количества молекул FITC на микросферах определяются с большей точностью за счет большого статистического объема информации.

Табл. 1. Средние интенсивности в канале флуоресценции СПЦ для распределений, представленных на Рис. 7.

	Средний сигнал	Ширина распределения	Среднее количество FITC на микросфере
А	$(1.23 \pm 0.03) \times 10^{-4}$	0.65×10^{-4}	0
В	$(7.37 \pm 0.17) \times 10^{-3}$	2.30×10^{-3}	$(2.01 \pm 0.15) \times 10^5$
С	$(7.59 \pm 0.14) \times 10^{-2}$	1.28×10^{-2}	3.1×10^7

1.3. Измерение светорассеяния

Сигнал светорассеяния использовался для определения размера микросферы с помощью метода спектрального разложения, описанного в разделе 1.3.1 промежуточного отчета по данному контракту.

2. Иммуночувствительный жидкий микрочип

Биотехнологической базой для нового метода иммунодетекции являются панели моноклональных антител, которые используются в качестве лиганда на поверхности микрочастиц, антитела меченые флюорохромами и/или ферментами, обеспечивающими изменение окраски микрочастицы.

2.1. Методы и материалы

2.1.1. Иммунологические методы

Гибридомы. Гибридомы, секретирующие моноклональные антитела против вируса клещевого энцефалита, были описаны нами ранее [2]. Описанная в этих работах коллекция клеточных линий была использована для получения моноклональных антител к поверхностному гликопротеину Е ВКЭ. Аналогично были использованы клеточные линии, продуцирующие МКА к ВЗН и вирусам Марбург и Эбола [3, 4, 5]. МКА против ВЗН, ВКЭ, вируса Марбург и Эбола нарабатывали, как описано нами ранее [6]. С этой целью получали асцитические жидкости путем внутрибрюшинного введения 10-20 млн клеток соответствующей гибридомы самкам мышей BALB/c (ФГУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора), массой 20-22г, в которых предварительно внутрибрюшинно вводили пристан (“Sigma”, США).

Моноклональные антитела. Очистку МКА была проведена с использованием каприловой кислоты с последующей преципитацией 50% раствором сульфата аммония. Асцитические жидкости или культуральные среды, содержащие МКА, были разведены в 4 раза в 0.2М ацетатно-цитратном буфере, рН 4.5. Каприловая кислота (до концентрации 2,5 $\mu\text{l}/\text{мл}$ в образце) добавлялась при постоянном перемешивании. Балластные белки осаждались в течение 30 минут, затем смесь центрифугировалась 30 минут при 10,000g. Супернатант смешивался с 10-кратным Tris-HCl физиологически раствором в 9:1 пропорции (v/v), рН доводилась до 7.4 посредством 1N HCl, охлаждалась до 4°C, и затем добавлялся равный объем насыщенного раствора сульфата аммония, смесь постоянно перемешивалась, инкубировалась в течение 30 минут. Затем суспензия центрифугировалась в течение 15 минут при 5,000g. Осадок растворялся в начальном объеме и диализировался против забуференного физиологического раствора. Биотинилирование очищенных МКА с использованием biotinyl-N-hydroxysuccinimide (Sigma) и мечение антител ФИТЦ проводили в соответствии с рекомендациями [7].

Иммуноферментный анализ. Иммуноферментный анализ (ИФА) проводили с использованием 96 луночных плат или полистирольных микрочастиц с конъюгированными МКА и МКА против вирусных антигенов, меченных биотином и стрептовидин пероксидазы как описано нами ранее [8]. Для этого, 100 мкл раствора антигена вносили в лунки 96-

луночной платы в 0,1М бикарбонатном буфере, рН 8.0 и после сорбции блокировали места неспецифического связывания посредством 0.5% яичного альбумина или 0.5% казеина в физрастворе с 5mM PMSF (Serva, Germany) и 0.1% Tween-20 (Serva, Germany) в течение 45 минут при 37⁰С. Иммуный комплекс выявляли с помощью стрептовидин пероксидазы и 0.1% раствора ОФД. В случае использования микрочастиц реакцию проводили в микропробирках и на последнем этапе микрочастицы переносили в планшеты для проведения окрашивания иммунного комплекса и учета результатов.

Иммобилизация МКА на поверхность латекса и их использование для выявления антигена. Для иммобилизации МКА были использованы СМЛ- латексы размерами от 2 μm до 10 μm (Invitrogen, США). Сенсibilизацию латексов выбранными видами МКА против вирусных антигенов проводили, как описано в инструкции фирмы производителя, путем карбодиимидным конъюгированием антител с латексами различных размеров. Активированные латексы после насыщения мест неспецифического связывания 0,5% казеином в ФСБ использовали для проведения иммунологического анализа. С этой целью использовали приблизительно 10⁶ активированных латексов в 100-200 мкл в БСА-ФСБ буфере. Далее в суспензию латексов вносили различное количество вирусных антигенов и после инкубации в течение 1,5-2 часов при комнатной температуре при постоянном встряхивании и трехкратной промывки путем центрифугирования выявляли иммунные комплексы с помощью МКА меченных ФИТЦ или биотином. В последнем случае проводили дополнительное окрашивание при помощи стрептоавидин-ФИТЦ. Окрашенные таким образом латексы были исследованы при помощи проточной цитофлуорометрии для снятия количественных параметров характеризующих размеры частиц и интенсивность флуоресцентного сигнала.

2.1.2. Молекулярно-биологические методы:

Рекомбинантные плазмиды, содержащие полноразмерный ген белков VP40, были использованы для экспрессии полноразмерных белков VP40 вируса Марбург и Эбола. Для этого клетки *E. coli* трансформировали плазмидой. Индукцию синтеза рекомбинантных белков проводили добавлением к культуре клеток (при A₆₀₀ = 0.5-0.8) изопропил--D-тиогалактозида (IPTG) до конечной концентрации 1 мМ. Бактериальную культуру после добавления IPTG инкубировали в течение 4-6 ч при температуре 30⁰ С. Очистку рекомбинантных белков VP40 вирусов Марбург и Эбола проводили методом аффинной хроматографии на Ni-NTA агарозе («QIAGEN», Германия) согласно протоколу фирмы-производителя.

2.1.3. Другие методы:

Белковый электрофорез проводили в 12%-ном ПААГ по методу Лэммли [9]. Концентрацию белка определяли при помощи набора Protein Assay фирмы «Bio-Rad» (США) и бычьего сывороточного альбумина как стандарта. Набор молекулярных весов (Sigma) был использован как стандарт молекулярных весов.

2.1.4. Клеточные культуры и вирусы

Были использованы следующие флавивирuсы: вирус Западного Нила, штаммы Влг27924 LEIV; Влг27889 LEIV; А-1640 LEIV; А-72 LEIV; Тур 2914 LEIV; Нр-94; Ег-101 и вирус клещевого энцефалита, штамм 205. Эти штаммы были получены из коллекции ФГУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора. Монослой клеток в 225 см² культуральных сосудах инфицировались флавивирuсами с множественностью 0,1 -1,0 ТЦПД₅₀/клетка. После абсорбции в течение 1 часа монослом промывали три раза средой Игла МЕМ и вносили поддерживающую среду с 2% фетальной сыворотки. ВЗН и ВКЭ очищали в градиенте плотности сахарозы как описано нами ранее [10]. Инфекционные титры определяли стандартным методом по развитию ЦПД на 96-луночных планшетах (ICN, Cat No 7600305) в автоматическом СО₂-инкубаторе (Cole Palmer, Cat No P-39200-15) как описано [11].

2.1.5. Материалы и реактивы:

В работе были использованы следующие материалы и реактивы: неполный и полный адъювант Фрейнда (НПА, ПАФ, “Sigma”, США); трис-(оксиметил)-аминометан, диметилсульфоксид (ДМСО), маркеры молекулярных масс белков, 3,3-диаминобензидин тетрагидрохлорид, ФИТЦ (F7250), ФИТЦ меченый стрептоавидин (S2313), N-гидроксисукцинимидный эфир биотина (H1759), EDAC (E7750), натриевая соль MES (M3058), (“Sigma”, США); ПЭГ-20000 (“Merck”, США); полиэтиленгликоль м.в. 6000 (ПЭГ-6000), этилендиаминтетрауксусная кислота, глицерин, трипановый синий, каприловая кислота, сахароза, глицин, твин-20, натрия азид, (“Serva”, США); набор для определения концентрации белка “Bio-Rad Protein Assay Kit” (“Bio-Rad”, США); акриламид, бисакриламид, натрия додецилсульфат, тетраметилэтилендиамин (ТЕМЭД), 2-меркаптоэтанол, бромфеноловый синий, кумасси G-250, амидочерный 10В (“Bio-Rad” США); гипоксантин, аминокперин, тимидин, орто-фенилендиамин (ОФД), казеин, бычий сывороточный альбумин (БСА), яичный альбумин, пероксидазные конъюгаты АТ козы против IgG кролика, мыши и крысы, а так же против IgM мыши, конъюгаты пероксидазы со стрептовидином (“ICN”, США); фетальная бычья сыворотка (ФБС), сыворотка крупного рогатого скота (КРС) (“Gibco”, Англия); пластиковая культуральная посуда (“Costar”, США). Полистирольные микросферы (Invitrogen, США): CML latex, 4% w/v 2 μm, CML latex, 4% w/v

4 µm, CML latex, 4% w/v 6 µm, CML latex, 4% w/v 8 µm, CML latex, 4% w/v 10 µm. Все остальные реактивы были отечественного производства и имели квалификацию не ниже х.ч.

2.2. Выбор моноклональных антител к вирусам Западного Нила и клещевого энцефалита для конструирования жидких микрочипов

Семейство флавивирусов (*Flaviviridae*) включает около 80 различных видов вирусов [12]. Род флавивирусов (*Flaviviruses*) весьма существенно отличается от двух других родов этого семейства – пестивирусов (*Pestivirus*) и гепацивирусов (*Hepacivirus*). Род флавивирусов включает около 50 видов вирусов. Они способны инфицировать широкий круг организмов, которые включают в себя млекопитающих, насекомых, птиц и рептилий [13]. В большинстве случаев передача инфекции осуществляется вектором, через укус переносчика - комара или клеща. Однако для некоторых флавивирусов вектор не известен. Это позволило условно разделить флавивирусы на клещевые и комариные инфекции, а также группу вирусов, для которых вектор не известен [14]. Многие флавивирусы способны вызывать заболевания у человека. Наиболее значимые для человека флавивирусные инфекции связаны с вирусами Денге, желтой лихорадки, Японского энцефалита, Западного Нила и клещевого энцефалита [15]. Для России наиболее значимым является вирус клещевого энцефалита и Западного Нила [16].

Вспышка лихорадки Западного Нила в южных районах России в 1999 и 2005 годах; установление факта циркуляции современного генотипа Ia ВЗН на территории юга Западной Сибири и Приморского края; выявление там первых случаев заболевания человека позволяет говорить о распространении вируса Западного Нила по всем южным районам России от Каспийского моря до Тихого океана в течение нескольких последних лет. Вирус клещевого энцефалита (ВКЭ) является прототипным представителем одноименной серогруппы вирусов. ВКЭ был открыт в 1937 году на Дальнем Востоке [17]. Вирусы клещевого энцефалита подразделяют на три основных генотипа: Дальневосточный, Европейский (Западный) и Сибирский [18]. Основным переносчиком ВКЭ являются клещи *Ixodes persulcatus* и *Ixodes ricinus*. Возможно заражение через употребление молока от инфицированных животных. Вирус широко распространен на севере Евро-Азиатского континента, где ежегодно регистрируется до 14000 случаев заболевания [19]. Заболеваемость клещевым энцефалитом регистрируется более чем 25 европейский странах и 7 азиатских странах [20]. На этой территории проживает около 700 миллионов человек, исключая Китай. Систематических данных по количеству случаев КЭ в Китае нет, имеется только сообщение о регистрации 3500 случаев в 1994 году [21]. На территории России регистрируется до 11 тысяч случаев заболевания. Инкубационный период заболевания от 7 до 28 дней. В Европейской части

России заболевание протекает, как правило, в виде тяжелой лихорадки, которая может иметь двухфазный характер. В Азиатской части страны часто встречаются менингиальные, менингоэнцефалитические и очаговые формы заболевания. При тяжелых формах заболевания развиваются параличи и парезы, преимущественно верхнего плечевого пояса и дыхательной мускулатуры. Известны случаи хронических форм клещевого энцефалита [22]. Летальность для человека колеблется от 0,03% до 20-35%. Дальневосточные варианты ВКЭ, как правило, более патогенны для человека. Выздоровление протекает медленно, у большинства переболевших наблюдаются стойкие остаточные явления перенесенных менингоэнцефалитов.

Усовершенствование методов иммунодетекции для диагностики этих значимых инфекционных заболеваний через разработку новых подходов на основе жидких микрочипов было одной из важных задач данного проекта. Поэтому, основная задача в рамках данного проекта состояла в получении препаратов высокоспецифических моноклональных антител против ВЗН и ВКЭ, пригодных для выявления и детекции антигенов ВЗН и ВКЭ при помощи полистирольных микрочастиц.

2.3. Выбор

моноклональных антител против ВЗН

Для конструирования систем для выявления антигенов ВЗН были использованы МКА полученные нами ранее. Сравнительное исследование трех вариантов систем (Рис. 8) показало возможность выявления антигенов ВЗН с помощью МКА и позволило отобрать перспективные МКА для разработки жидких микрочипов.

Оценка способности МКА захватывать антиген ВЗН из раствора представлена в Табл. 2. Вполне понятно, что использование двух видов МКА для детекции антигена ограничено

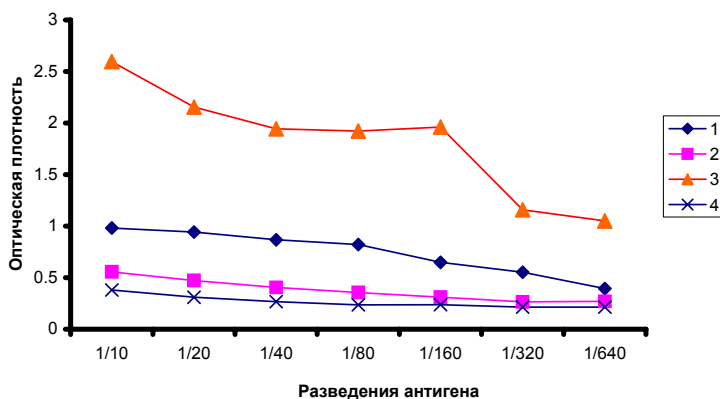


Рис. 8. Предварительный подбор условий для ИФА системы для обнаружения антигена ВЗН. В качестве антигена использовался лизат клеток СПЭВ, зараженных ВЗН.

- 1 – ИФА (вариант 1). Подложка суммарные Ig G мыши против антигена ВЗН. Выявление иммунного комплекса – очищенные Ig G МКА 1Е3 против ВЗН, конъюгированные с биотином, в разведении 1: 1000 и стрептовидин – пероксидазный конъюгат в разведении 1: 3000;
- 2 – ИФА (вариант 2). Подложка без изменений. Выявление с очищенными Ig G МКА 10Н10 против ВКЭ, конъюгированные с биотином, в разведении 1: 1000 и стрептовидин – пероксидазный конъюгат в разведении 1: 3000;
- 3 – ИФА (вариант 3). Подложка без изменений. Выявление с очищенными Ig G мыши против ВЗН, конъюгированные с биотином, в разведении 1: 1000 и стрептовидин – пероксидазный конъюгат в разведении 1: 3000;
- 4 – Отрицательный контроль с лизатом неинфицированных клеток. Система ИФА аналогична варианту 3.

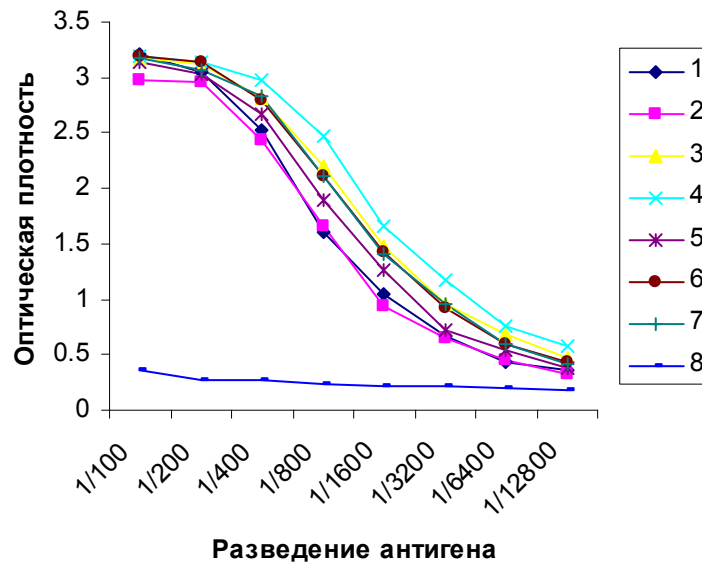


Рис. 9. Предварительный подбор условий для ИФА системы для обнаружения антигена ВЗН. В качестве антигена использовался лизат клеток СПЭВ, зараженных ВЗН.

Примечание: 1 – ВЗН, штамм Vlg 27889; 2 - штамм Tur-2914; 3 - A-1640; 4 - Eg-101; 5 - Vlg 27924; 6 - A-72; 7 - Нр-94; 8 - отрицательный контроль.

пространственным расположением эпитопов, узнаваемых МКА. По предварительным результатам наиболее оптимальным является использование МКА 9Е2 и 5Н6 в качестве подложки для захвата антигенов ВЗН в ИФА. При этом не менее трех видов биотинилированных антител способны эффективно распознавать такой иммунный комплекс на поверхности полистирола.

Табл. 2 Оценка способности пар МКА, использованных в качестве подложки и конъюгата с биотином, выявлять антиген ВЗН в ИФА.

№	Очищенные МКА (подложка)	Биотинилированные препараты МКА										
		9E2	3F4	4F11	3A9	7G9	11G3	5F11	5H6	7E6	4D10*	Смесь МКА
1	9E2	0,246	0,148	0,228	0,128	0,263	0,259	0,174	2,677	0,064	0,211	2,231
2	3F4*	0,158	0,097	0,133	0,117	0,216	0,156	0,185	0,133	0,164	0,162	0,388
3	4F11	0,073	0,156	0,246	0,134	0,078	0,133	0,219	0,210	0,053	0,233	0,133
4	3A9*	0,128	0,117	0,172	0,147	0,120	0,191	0,191	0,185	0,093	0,117	0,875
5	7G9	0,213	0,233	0,183	0,097	0,216	0,141	0,147	0,198	0,172	0,183	0,398
6	11G3	0,133	0,191	0,214	0,216	0,198	0,112	0,156	0,169	0,097	0,185	0,162
7	5F11	0,173	0,248	0,124	0,138	0,179	0,133	0,233	0,092	0,064	0,117	0,349
8	5H6	3,610	0,145	0,228	0,129	2,708	2,578	0,189	0,955	1,268	0,224	2,805
9	7E6	0,178	0,131	0,213	0,155	0,119	0,133	0,095	0,147	0,191	0,198	0,285
10	4D10*	0,104	0,172	0,156	0,167	0,124	0,147	0,183	0,156	0,127	0,162	0,564

Примечание: оптимальные разведения биотинилированных препаратов МКА были предварительно определены титрованием. Очищенные МКА в концентрации 1 мкг/0,1 мл сорбировали на пластик в течение ночи. В таблице показаны значения оптической плотности при длине волны 492 нм.

С целью отработки метода детекции антигенов ВЗН было продолжено отработка системы на основе полученных ранее МКА. Было исследовано три варианта ИФА, два из которых основаны на нейтрализующих МКА 5Н6 и 9Е2. Они были использованы в качестве подложки в ИФА для захвата антигенов ВЗН из раствора и в виде конъюгата с биотином для обнаружения иммунного комплекса на поверхности твердой фазы. Третий вариант был основан на ненейтрализующих МКА 3А6 против рекомбинантного антигена ВЗН и меченных биотином поликлональных антител против ВЗН (Рис. 9). Все три варианта высокоэффективно обнаруживали антиген различных штаммов ВЗН.

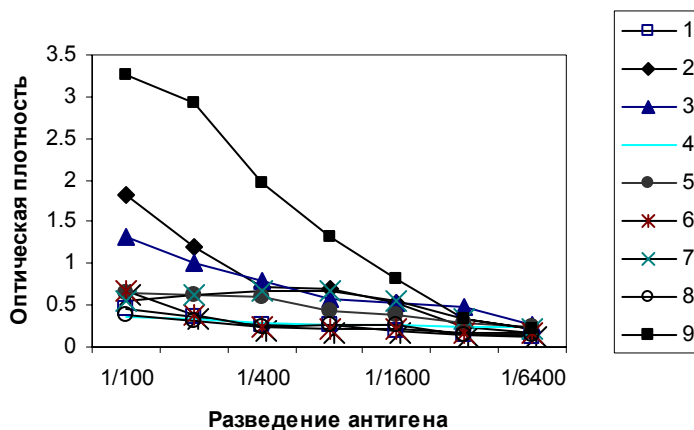


Рис. 10. Выявление антигена ВКЭ при помощи моноклональных антител против ВКЭ в твердофазном ИФА.

Примечание: ВКЭ, штамм 205, очищенный при помощи сахарозной подушки, в лизирующем буфере (1,4 мг/мл); Были исследованы следующие пары МКА (подложка – индикаторные МКА меченые биотином):

1. 7F10 – 4F6 - биотин;
2. 7F10 – EB1 - биотин;
3. 4F6 – EB1 - биотин;
4. 4F6 – 7F10 - биотин;
5. E6B – 4F6 - биотин;
6. E6B – 7F10 - биотин;
7. 13F6 – 4F6 - биотин;
8. 13F6 – EB1 - биотин;
9. 10H10 – EB1 - биотин;

2.4. Выбор моноклональных антител против ВКЭ

Для конструирования систем для выявления антигенов ВКЭ были использованы 14 типов МКА к ВКЭ, полученные нами ранее. Они были исследованы на пригодность их использования в твердофазном иммуноанализе. На Рис. 10 показана эффективность выявления антигена ВКЭ при помощи выбранной пары моноклональных антител. Представленные данные показывают, что МКА 10Н10 и EB1 могут быть использованы для проведения твердофазного ИФА с целью детекции антигена ВКЭ и для разработки жидких микрочипов на основе этих чипов.

2.5. Выбор моноклональных антител и VP40 антигенов филовирюсов

Вирусы Марбург и Эбола относятся к семейству *Filoviridae*, порядок *Mononegavirales*. У них идентифицировано по 7 структурных белков: GP - основной поверхностный белок, L-белок - РНК-зависимая РНК-полимераза; NP - главный нуклеопротеин; VP30, является, возможно, дополнительным минорным нуклеопротеином; VP35 - компонент

транскриптазного комплекса; VP40 – матриксный белок, участвующий в «почковании» вируса, и функция белка VP24, в настоящее время, точно не определена.

Ранее, нами были описаны наборы МКА против антигенов вируса Эбола [23, 24]. МКА обладали способностью взаимодействовать с вирусными белками VP40, NP и VP35. Моноклональные и поликлональные антитела к VP35 вируса показали преимущественную локализацию В-клеточных эпитопов на N-конце белка. Несколько позднее была показана возможность использования МКА для иммунодетекции вируса Эбола [25, 26]. Антитела против VP40 были успешно использованы для обнаружения антигенов вируса Эбола в сыворотке людей после ее инактивации додецилсульфатом натрия. Это позволило разработать безопасный тест для широко использования в лабораториях с низким уровнем биологической защиты.

В настоящем проекте мы использовали моноклональные антитела против вируса Эбола и Марбург, также рекомбинантный VP40 антиген вируса Эбола и Марбург.

2.6. Выбор МКА против вируса Эбола и Марбург для конструирования жидких микрочипов.

Ранее нами была получена коллекция из 24 гибридом мышиноного происхождения, стабильно продуцирующих МКА против вируса Эбола и исследованы некоторые биологические свойства МКА. Идентификация вирусных белков, с которыми взаимодействуют МКА, была

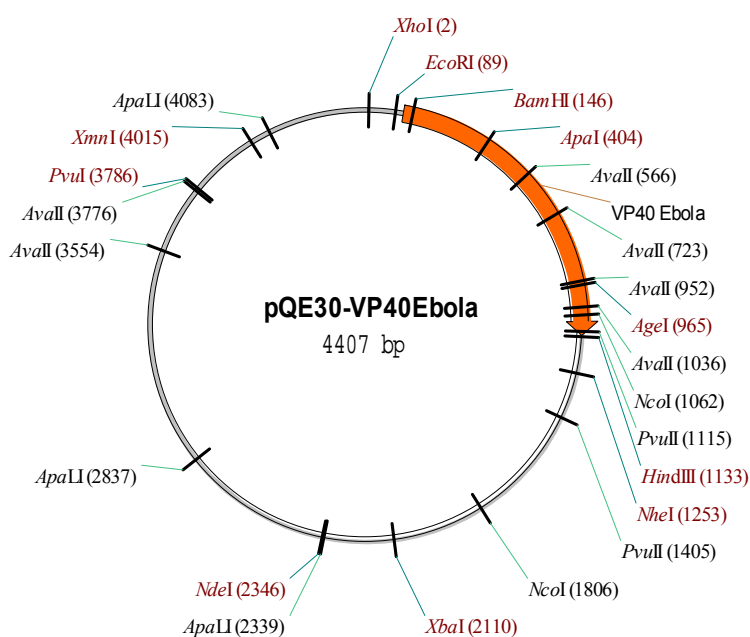


Рис. 11. Схема плазмиды pQE-VP40Ebola.

проведена методом иммуноблота с ВЭ и в ИФА, где в качестве антигена был использован рекомбинантный белок VP35 и VP40.

2.6.1. Получение очищенного рекомбинантного VP40 антигена вируса Эбола и его иммунохимическая характеристика.

Полноразмерная копия гена VP40 вируса Эбола была получена амплификацией с кДНК, синтезированной с геномной РНК вируса Эбола, штамм Заир. Соответствующий фрагмент кДНК был клонирован в плазмиду pQE30 “QIAGEN”, (Германия) по сайтам рестрикции BamHI и HindIII. В результате получена плаزمиды pQE-VP40 (Рис. 11,

содержащая под промотором фага T5 открытую рамку трансляции, кодирующую белок длиной 338 аминокислотных остатка (с шестью остатками гистидина, обеспечивающими выделение экспрессированного белка на Ni-хелатном носителе). Полученная плазида pQE30-VP40 была проверена рестриктивным картированием и секвенированием.

Клетки *E.coli* JM103 трансформировали плазмидой pQE30-VP40 и индуцировали

экспрессию рекомбинантного белка VP40 вируса Эбола добавлением 0.5 мМ IPTG в течение 3 часов при 30⁰С. Рекомбинантный белок был очищен в денатурирующих условиях Ni-хелатной хроматографией согласно протоколу фирмы QIAGEN.

Из 22 типов МКА только два типа МКА (4A2 и 1C1) были способны весьма взаимодействовать с вирусным VP40. Эти МКА, а также и поликлональные антитела были способны взаимодействовать как нативным антигеном на основе вирусных лизатов, так и с рекомбинантным антигеном на основе VP40 в иммуноблоте и ИФА. Эти МКА 4A2 и 1C1 показали высокую эффективность во взаимодействии с VP40 в сэндвич варианте ИФА, что позволяет их использовать для определения типа антигенов вируса Эбола - нативного и рекомбинантного (Рис. 12 и Рис. 13). Поликлональные антитела против антигенов вируса Эбола показали сходные результаты с МКА по способности взаимодействовать с нативным и рекомбинантным антигеном.

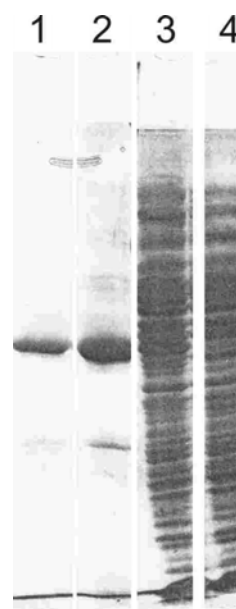


Рис. 12. Очистка рекомбинантного VP40 антигена вируса Эбола при помощи аффинной хроматографии. Дорожки 1 и 2 VP-40 антиген после очистки Ni-хелатной хроматографией; 3 - лизат клеток после индукции; 4 – контрольный лизат клеток.

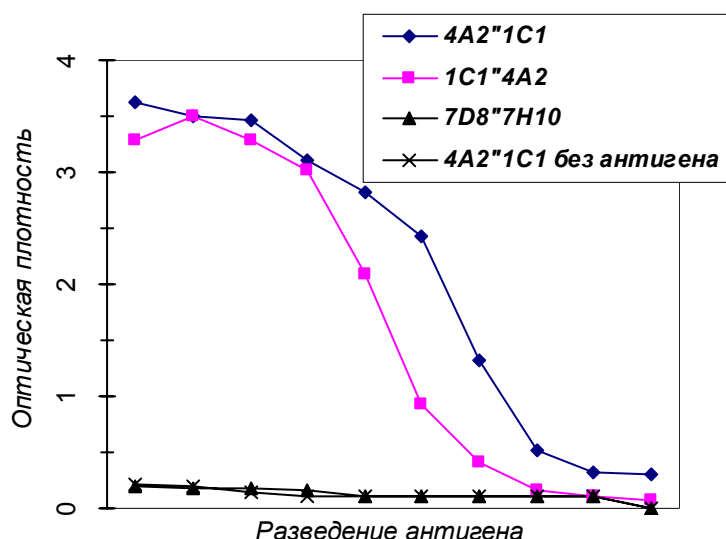


Рис. 13. Оценка эффективности МКА против вируса Эбола для выявления антигена VP40 в ИФА. Концентрация антигена 0,9 мг/мл. Начальная точка разведения 1/100 соответствует 900нг общего белка VP40. Очищенные и меченые биотином МКА против вируса Эбола взяты в разведении 1/500. Отрицательные контроли – пара МКА против вируса Марбург (7D8 и 7H10) и пара 4A2 и 1C1 без антигена. Концентрации очищенных МКА: 4A2 -7,4мг/мл; 1C1 – 11,7 мг/мл.

Данные ИФА полностью подтверждаются результатами иммуноблоттинга. Совокупность полученных данных показывает, что рекомбинантный VP40 имеет представительный набор эпитопов, которые идентичны антигенам вируса Эбола, полученному на основе вирусных лизатов.

Таким образом, получен коллекция МКА против нескольких структурных вирусных белков вируса Эбола и набор поликлональных антител к этому же вирусу. Полученные антитела обеспечивают уверенную детекцию антигенов вируса Эбола и два типа МКА 4A2 и 1C1 были отобраны для конструирования перспективных систем иммунодетекции. Полноразмерный рекомбинантный VP40 оказался высоко иммуногенным и сохранил основные В-клеточные эпитопы характерные для вирусного нативного антигена на основе вирусных лизатов.

Разработанные генные конструкции обеспечивают синтез полноценного рекомбинантного антигена, который может быть рекомендован в качестве безопасного полноценного референс антигена вируса Эбола.

2.6.2. Выбор МКА для выявления антигена вируса Марбург и пригодных для создания жидких микрочипов.

С этой целью был использован тот же подход что и для ВЭ, подробно описанный выше. Были исследованы очищенные препараты МКА к ВМ, которые были получены ранее путем культивирования 41 гибридом против ВМ. Оценку возможности использования МКА против ВМ проводили с использованием двух схем проведения иммуноферментного анализа: прямой вариант, с использованием двух схем проведения иммуноферментного анализа: прямой вариант, с использованием биотинилированных МКА для выявления антигена, иммобилизованного на твердой фазе и непрямой вариант ИФА, при котором антиген, сорбированный на поверхности планшетов, взаимодействует со специфическими МКА, и образовавшийся иммунный комплекс выявляется с помощью вторых антител и антивидового конъюгата к ним. Типичные кривые титрования вирусных препаратов в данных системах представлены на Рис. 14 и Рис. 15. Сопоставление кривых титрования антигена вируса

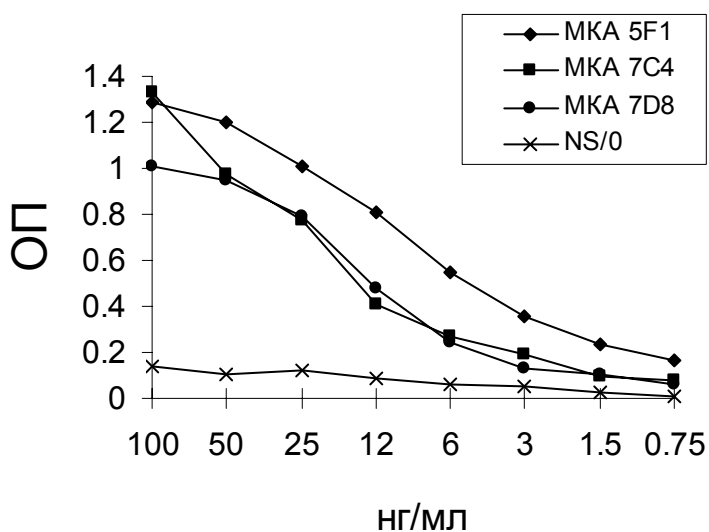


Рис. 14. Выявление антигена вируса Марбург при помощи МКА методом прямого ИФА.

чувствительность ИФА на основе МКА колебалась в зависимости от используемых МКА и составила 1-2 нг/мл и 5-10 нг/мл для двух исследованных вариантов. Минимальное количество антигена, выявляемого в ИФА с помощью МКА 5F1 специфичных к нуклеопротеину ВМ, достигло 1 нг/мл, что в 5 раз превышает чувствительность ИФА при использовании поликлональных кроличьих антител.

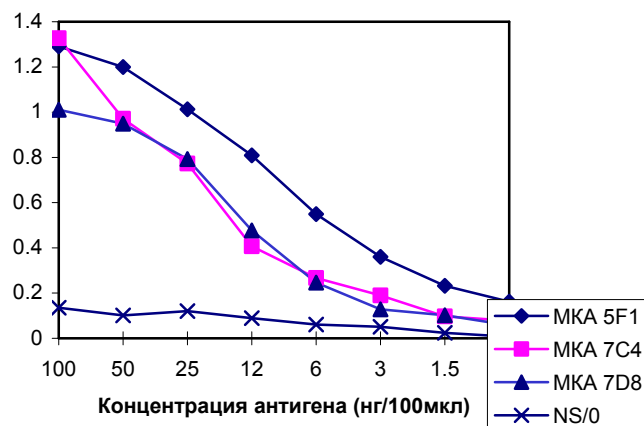


Рис. 15. Выявление антигена вируса Марбург при помощи МКА методом непрямого ИФА.

Результаты проведенных экспериментов показали, что препараты моноклональных иммуноглобулинов против внутренних белков вируса Марбург, NP и VP40, могут использоваться как для выявления антигенов ВМ в твердофазных системах. Проведенные исследования показали, что МКА к вирусу Марбург, могут быть использованы для разработки системы выявления на основе твердофазного анализа на полистироловой поверхности, а рекомбинантный белок VP40 в качестве адекватного антигена ВМ.

2.7. Конструирование микрочипов на основе МКА

Использование МКА на полистирольной поверхности для захвата антигена из пробы с последующим выявлением образовавшегося иммунного комплекса другим видом МКА меченых биотином или ФИТЦ позволило выбрать наиболее эффективные МКА для конструирования жидких микрочипов.

Для конструирования микрочипов были выбраны следующие варианты:

- А. на антиген вируса Западного Нила,
 - МКА 9E2 (твердая фаза) и МКА 5H6 меченые ФИТЦ или биотином;
- В. на антиген вируса клещевого энцефалита,
 - МКА 10H10 (твердая фаза) и МКА EB1 меченые ФИТЦ или биотином;
- С. на антиген вируса Марбург,
 - МКА 7D8 (твердая фаза) и МКА 6B7 меченые ФИТЦ или биотином;
- Д. на антиген вируса Эбола,
 - МКА 4A2 (твердая фаза) и МКА 1C1 меченые ФИТЦ или биотином.

Выбранные МКА были использованы для конструирования жидких микрочипов на основе полистирольных микрочастиц различного диаметра, принципиальная схема которых была следующая:

1. Латексы активировали с помощью моноклональных антител против ВЗН, ВКЭ, ВМ или ВЭ. С этой целью МКА конъюгировали с поверхностью микрочастиц в соответствии с рекомендациями фирмы производителя латексов.
2. К активированным МКА латексам добавляли исследуемый антиген ВЗН, ВКЭ, ВМ или ВЭ.
3. К суспензии латексов вносили индикаторные моноклональные антитела, меченные биотином или ФИТЦ, для выявления иммунного комплекса на поверхности микрочастицы.
4. В случае использования МКА, меченых биотином, использовали стрептавидин меченый ФИТЦ для окраски иммунного комплекса на поверхности латекса.

В случае использования МКА, меченых биотином, использовали стрептавидин меченый ФИТЦ для окраски иммунного комплекса на поверхности латекса. Меченные ФИТЦ препараты, использованные в данном проекте, имели следующие молярные соотношения белок/ФИТЦ: стрептавидин-ФИТЦ – 1/4 (паспортные данные коммерческого препарата); БСА-ФИТЦ – 1/4.25; (МКА ЕВ1)-ФИТЦ – 1/1.63; (МКА 5Н6)-ФИТЦ – 1/22; (МКА 1С1)-ФИТЦ – 1/1.9; (МКА 6В7)-ФИТЦ – 1/3.6.

На Рис. 16 представлен типичный вид латекса после формирования на нем иммунного комплекса меченого ФИТЦ при микроскопии в люминесцентном микроскопе.

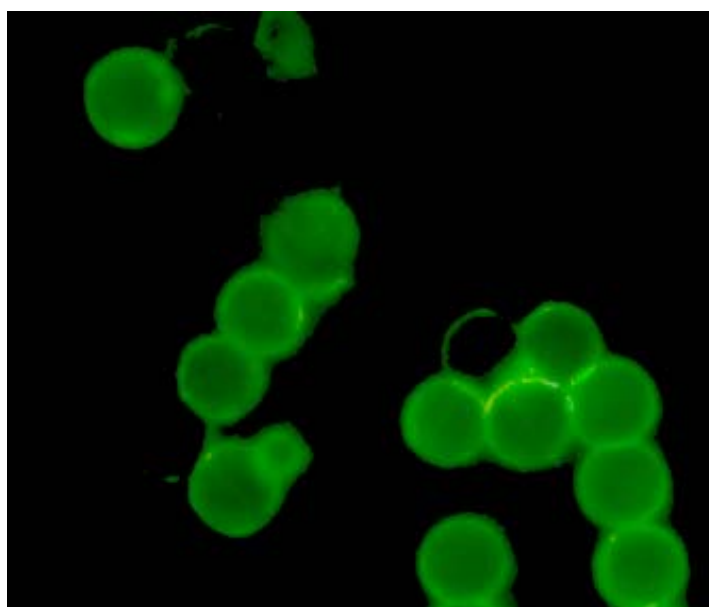


Рис. 16. Микрофотография латекса размером 8 микрон при увеличении в 200 раз.

2.8. Кинетика моновалентного лиганд-рецепторного взаимодействия

2.8.1. Специфическое связывание

Для того чтобы иметь возможность оценки оптимальных концентраций реагентов, используемых при формировании микрочипа, был проведен анализ негомогенной кинетики моновалентного связывания лиганда с рецепторами, находящимися на поверхности микросфер.

В равновесии уравнения для концентраций записываются в следующем виде:

$$[A][R]=K[AR], \quad (1)$$

где K - константа равновесия (аффинности) антител с рецепторами; A - равновесная концентрация лигандов в растворе; R - равновесная концентрация свободных (незанятых) рецепторов в растворе. Закон сохранения вещества позволяет записать следующие соотношения для концентраций:

$$A_0 - A = R_0 - R = AR, \quad (2)$$

где A_0 - первоначальная концентрация лигандов (антител) в растворе; R_0 - первоначальная концентрация рецепторов в растворе.

В наших условиях параметры реакций выражаются следующими величинами:

$A_0 \approx 10^{15}$ мл⁻¹, концентрация латексных частиц в растворе $L \approx 2 \times 10^7$ мл⁻¹, среднее число рецепторов (посадочных мест) на одной латексной частице $N \approx 2.5 \times 10^6$ штук для латексной частицы размером 6 мкм, $R_0 = L \times N \approx 5 \times 10^{13}$ мл⁻¹, $K \approx 10^{-8}$ моль/л = 6×10^{12} мл⁻¹.

Исходя из того, что $A_0 \gg R_0$, в уравнении (1) можно сделать приближение $A = A_0$, и, с учетом (2) переписать уравнение (1) в виде:

$$A_0 \times (R_0 - [AR]) = K[AR] \quad (3)$$

В итоге у нас получается, что равновесная концентрация AR равна

$$AR = \frac{A_0}{A_0 + K} R_0. \quad (4)$$

В пересчете на одну частицу, мы получаем, что среднее число лиганд-рецепторных комплексов на одной латексной частице равно

$$\frac{AR}{L} = \frac{A_0}{A_0 + K} N. \quad (5)$$

Приближенное уравнение (5) верно и хорошо выполняется при условии $A_0 \gg R_0$, что в нашем случае хорошо выполняется.

Рекомендации:

В силу того, что $A_0 \gg K$, из (5) мы получаем, что практически все рецепторы связаны с лигандами, и это остается приблизительно верным вплоть до значений $A_0 \approx 2 \times R_0 \approx 10^{13}$ мл⁻¹.

Следовательно, количество образовавшихся комплексов зависит от начальной концентрации лигандов (антител), если концентрация лигандов не превышает 10^{13} мл⁻¹.

Из уравнения (5) следует, что среднее число комплексов на одной микросфере в равновесии практически не зависит от концентрации латексов в растворе.

2.8.2. Специфическое связывание в присутствии неспецифических реакций

Допустим, существует конкуренция между специфическим и неспецифическим присоединением лиганда (A) к рецептору (R). Будем рассматривать эти реакции в равновесии с соответствующими константами равновесия K_S (специфическое связывание) и K_N (неспецифическое связывание):



Соответствующая система уравнений для равновесных концентраций:

$$\begin{cases} AR = K_S (AR)_S \\ AR = K_N (AR)_N \\ A + (AR)_S + (AR)_N = A_0 \\ R + (AR)_S + (AR)_N = R_0 \end{cases} \quad (7)$$

где:

A_0 - начальная концентрация лигандов (антител) в растворе;

A - равновесная концентрация лигандов в растворе;

R_0 - начальная концентрация рецепторов в растворе;

R - равновесная концентрация свободных (незанятых) рецепторов в растворе;

$(AR)_S$ - равновесная концентрация специфических лиганд-рецепторных комплексов в растворе;

$(AR)_N$ - равновесная концентрация неспецифических лиганд-рецепторных комплексов в растворе;

Система уравнений (7) сводится к следующему квадратному уравнению относительно $(AR)_S$:

$$\left(1 + \frac{K_S}{K_N}\right)^2 (AR)_S^2 - \left(\left(1 + \frac{K_S}{K_N}\right)(A_0 + R_0) + K_S\right) (AR)_S + A_0 R_0 = 0, \quad (8)$$

общее решение которого описывается следующим выражением:

$$(AR)_s = \frac{\left(\left(1 + \frac{K_s}{K_N} \right) (A_0 + R_0) + K_s \right) - \sqrt{\left(\left(1 + \frac{K_s}{K_N} \right) (A_0 + R_0) + K_s \right)^2 - 4 \left(1 + \frac{K_s}{K_N} \right)^2 A_0 R_0}}{2 \left(1 + \frac{K_s}{K_N} \right)^2}. \quad (9)$$

В нашем случае, объемная концентрация рецепторов, R_0 , выражается через концентрацию латексов, L , и среднее количество рецепторов на одной латексной частице, N :
 $R_0 = LN$. (10)

В наших условиях (раздел 2.8.1) при избытке лиганда, $A_0 \gg R_0$, следует что $A_0 \gg (AR)_s$ и $A_0 \gg (AR)_N$, и возникает следующая величина малого порядка ($\delta \ll 1$), по которой можно линеаризовать вышеприведенное уравнение (9):

$$\delta = \frac{4 \left(1 + \frac{K_s}{K_N} \right)^2 A_0 R_0}{\left(\left(1 + \frac{K_s}{K_N} \right) (A_0 + R_0) + K_s \right)^2} \ll 1. \quad (11)$$

Пренебрегая слагаемыми второго порядка малости по δ , решение (9), то есть концентрация специфических комплексов, приводится к следующему виду:

$$(AR)_s \approx \frac{A_0 R_0}{\left(\left(1 + \frac{K_s}{K_N} \right) A_0 + K_s \right)}, \quad (12)$$

откуда следует, что среднее количество специфических комплексов на одной латексной частице равно

$$N_s = \frac{(AR)_s}{L} \approx \frac{A_0 N}{\left(\left(1 + \frac{K_s}{K_N} \right) A_0 + K_s \right)}, \quad (13)$$

Из уравнения (13) следует, что при увеличении концентрации лигандов A_0 в растворе, среднее количество специфических комплексов на латексной частице не может превысить величины $N_{s,\max}$:

$$N_{s,\max} = \frac{N}{1 + \frac{K_s}{K_N}}. \quad (14)$$

При сильной аффинности неспецифических комплексов, число специфических комплексов может быть существенно меньше числа рецепторов. Например, если $K_s = 10^{-8}$

моль/л = $6 \cdot 10^{12}$ мл⁻¹, а $K_N = 10^{-9}$ моль/л = $6 \cdot 10^{11}$ мл⁻¹, то для типичных условий наших экспериментов из формулы (13) получим, что число специфических комплексов равно

$$N_S = 0.01N = 2 \cdot 10^6. \quad (15)$$

Стоит отметить, что в данном примере реализуется условие насыщения, $A_0 \gg \frac{K_N K_S}{K_N + K_S}$, при котором количество специфических комплексов практически не зависит от концентрации лиганда A_0 и приближается к максимально возможному. При этом дальнейшее увеличение количества специфических комплексов можно добиться только увеличением отношения $\frac{K_N}{K_S}$ констант равновесия неспецифических и специфических комплексов. Однако, использование моноклональных антител с существенно меньшим K_S (то есть более высокой аффинностью специфических комплексов) относительно величины $K_S = 10^{-8}$ моль/л представляется нежелательным в силу ряда причин (увеличение специфической аффинности сопровождается удорожанием моноклональных антител и сужением их спектра действия, вследствие повышения их селективности). Таким образом, остается только один путь существенного повышения N_S - увеличение константы K_N (то есть уменьшение аффинности неспецифических комплексов). Это может быть достигнуто, например, уменьшением размера «неспецифической части» антитела биохимическими методами. Стоит также отметить, что при типичном значении $K_S = 10^{-8}$ моль/л, как показывает анализ формулы (13), концентрация A_0 может быть снижена на порядок до величины $\sim 10^{14}$ см⁻³ без существенного уменьшения количества специфических комплексов (что подтверждается результатами наших экспериментов).

3. Анализ иммунологического жидкого микрочипа на сканирующем проточном цитометре

3.1. Измерение количества МКА на поверхности микросфер.

Для измерения количества МКА на поверхности микросфер использовались полистирольные микросферы номинальным размером 6 мкм, иммобилизованные БСА с FITC. Анализируемые микросферы смешивались с калибровочными микросферами фирмы Molecular Probes (каталожный номер F8827). Калибровочные микросферы содержали флуорохром в количестве, которое эквивалентно 3.1×10^7 молекулам FITC. Результат

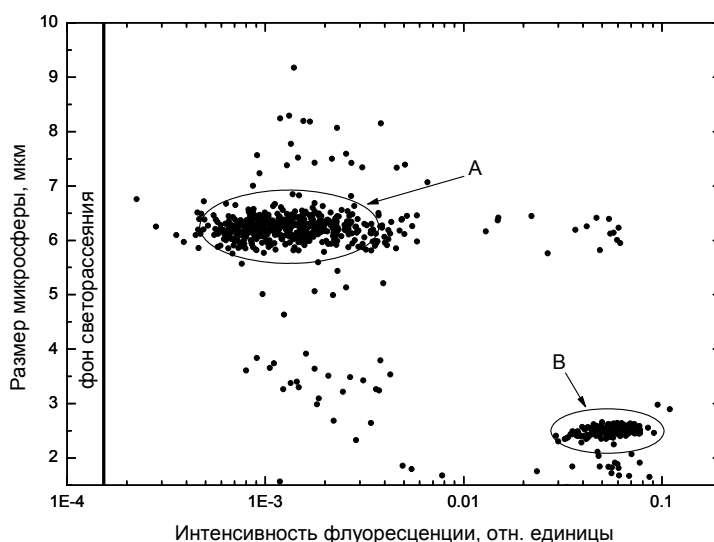


Рис. 17. Измерение количества МКА на поверхности микросферы с номинальным размером 6 мкм. Каждая точка на рисунке соответствует одной измеренной микросфере. Область А – анализируемые микросферы, область В – калибровочные микросферы.

анализа одной из проб представлен на Рис. 17. Была измерена 731 микросфера. Среднее значение интенсивности флуоресценции для микросфер области В равнялось 5.65×10^{-2} , что соответствует 3.1×10^7 молекул FITC. После вычитания фона светорассеяния (пояснения в разделе 1.2.1) для микросфер области А, было рассчитано среднее значение количества молекул FITC для микросфер, иммобилизованных БСА с FITC, которое получилось равным 7.4×10^5 молекул FITC. Учитывая, что молярное соотношение для комплекса БСА+FITC равно 4.25 (см. раздел 2.7), среднее количество молекул БСА на поверхности микросфер получилось равным 1.7×10^5 молекул БСА.

3.2. Анализ иммунологического жидкого микрочипа против вируса Эбола.

На СПЦ была измерена проба иммунологического жидкого микрочипа против вируса Эбола, сконструированному по варианту D (микросфера+(МКА 4A2)+ВЭ+(МКА 1С1)+ФИТЦ, раздел 2.7). В качестве полимерного носителя использовались микросферы с номинальным диаметром 10 мкм. Среднее значение количества молекул FITC для микросфер получилось равным 2.8×10^5 молекул FITC. Учитывая, что молярное соотношение для комплекса МКА 1С1+FITC равно 1.9 (см. раздел 2.7), среднее количество комплексов на поверхности микросфер получилось равным 1.5×10^5 . При формировании комплексов с использованием МКА, меченых биотином, и использованием связки стрептовидин+FITC для

регистрации флуоресценции были измерено среднее значение количества молекул FITC на одну микросферу, 1.3×10^6 молекул FITC. Так как типичное молярное соотношение по литературным источникам для комплекса МКА+биотин равно 20, а для комплекса стрептовидин+FITC – 4, то среднее количество образовавшихся комплексов в этом случае равнялось 1.6×10^4 . Количество образовавшихся комплексов в случае четырехслойной композиции меньше, чем в трехслойной композиции, скорее всего из-за дополнительной процедуры отмывки. Однако из-за большого молярного соотношения комплекса МКА-биотин отношение сигнал/шум для флуоресценции для четырехслойной композиции было выше.

3.3. Анализ иммунологического жидкого микрочипа против вируса Марбург.

На СПЦ была измерена проба иммунологического жидкого микрочипа против вируса Марбург, сконструированному по варианту С (микросфера+(МКА 7D8)+BM+(МКА 6B7)+ФИТЦ, раздел 2.7). В качестве полимерного носителя использовались

микросферы с номинальным диаметром 6 мкм. Результаты измерения данного микрочипа представлены на Рис. 18. Следует отметить, что для достижения максимальной чувствительности в измерении флуоресценции, пришлось переместить область максимальной фокусировки лазерного луча в зону измерения флуоресценции, вследствие чего, отношение сигнал шум в канале измерения светорассеяния заметно снизилось. Данное обстоятельство

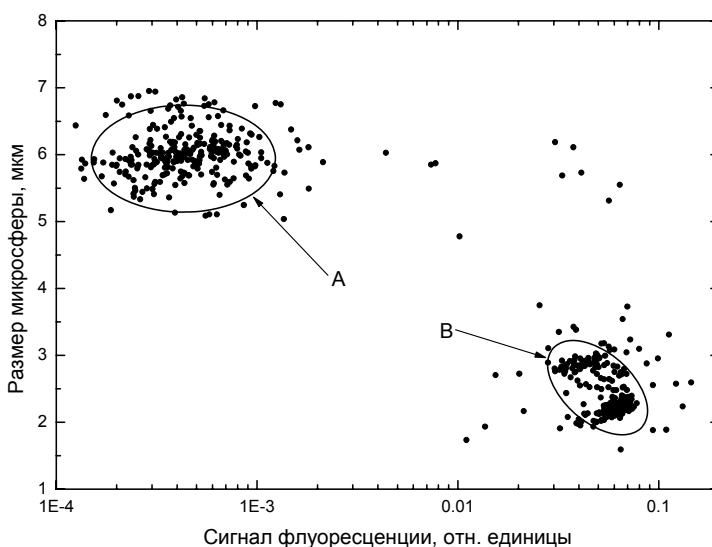


Рис. 18. Анализ иммунологического жидкого микрочипа против вируса Марбург. Каждая точка на рисунке соответствует одной измеренной микросфере. Область А – анализируемые микросферы, область В – калибровочные микросферы.

увеличило ошибку определения размера микросфер (особенно для малых размеров), что проявилось в больших дисперсиях функций распределения по размеру анализируемых микросфер (Рис. 18). Среднее значение количества молекул FITC для микросфер получилось равным 1.1×10^5 молекул FITC. Учитывая, что молярное соотношение для комплекса МКА 6B7+FITC равно 3.9 (см. раздел 2.7), среднее количество комплексов на поверхности микросфер получилось равным 2.8×10^4 .

3.4. Анализ иммунологического жидкого микрочипа против вирусов клещевого энцефалита и Западного Нила.

Аналогичный анализ работоспособности жидких микрочипов был проведен против вируса клещевого энцефалита, сконструированному по варианту В (микросфера+(МКА 10Н10)+ВКЭ+(МКА ЕВ1)+ФИТЦ, раздел 2.7) и против вируса Западного Нила, сконструированному по варианту А (микросфера+(МКА 9Е2)+ВЗН+(МКА 5Н6)+ФИТЦ, раздел 2.7). В качестве полимерного носителя использовались микросферы с номинальным диаметром 8 мкм и 10 мкм. Оба микрочипа продемонстрировали работоспособность.

3.5. Анализ составного иммунологического жидкого микрочипа.

На СПЦ была измерена проба составного иммунологического жидкого микрочипа против трех вирусов: Западного Нила, Эбола и клещевого энцефалита. В качестве полимерного носителя использовались микросферы с номинальными диаметрами 10 мкм, 8 мкм и 6 мкм, соответственно. Непосредственно перед измерением в пробу внесли калиброванные по количеству молекул ФИТС полимерные микросферы с номинальным размером 2 мкм. За 105 секунд было зарегистрировано 7900 частиц. Так как для обработки сигналов флуоресценции и светорассеяния требуется время, то из измеренных частиц было обработано около 1600 штук. Результат измерения пробы представлен в виде гистограмм отсчетов для размера микросфер и интенсивности флуоресценции на

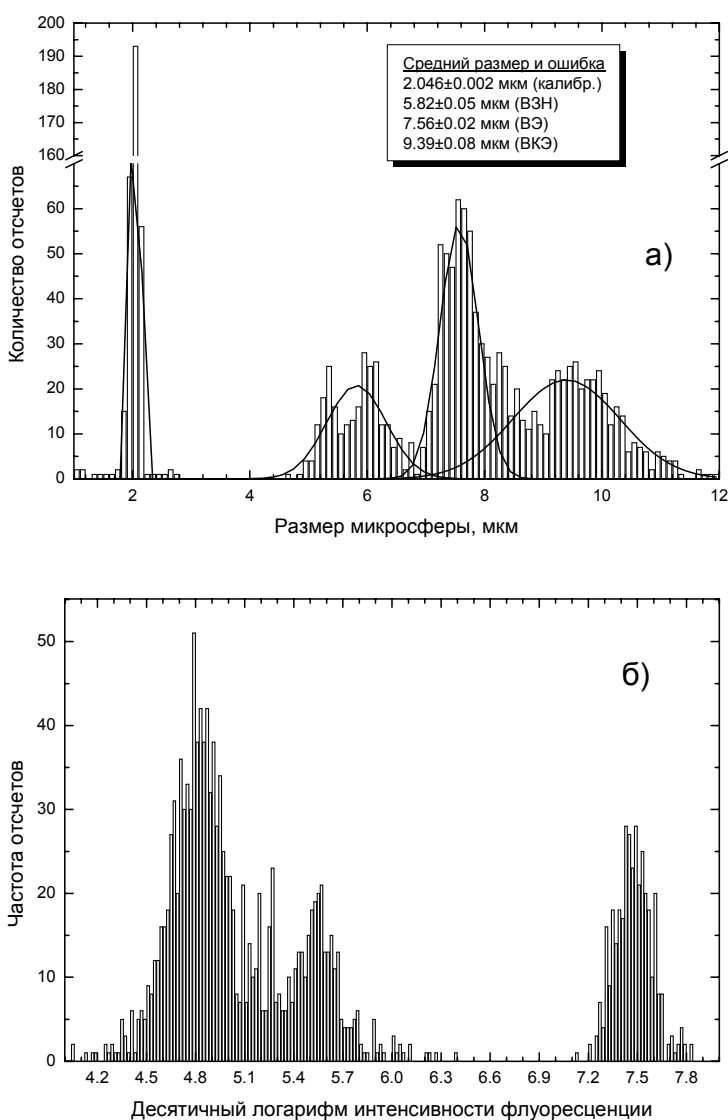


Рис. 19. Распределение микросфер по размерам – а), распределение интенсивности флуоресценции от микросфер – б).

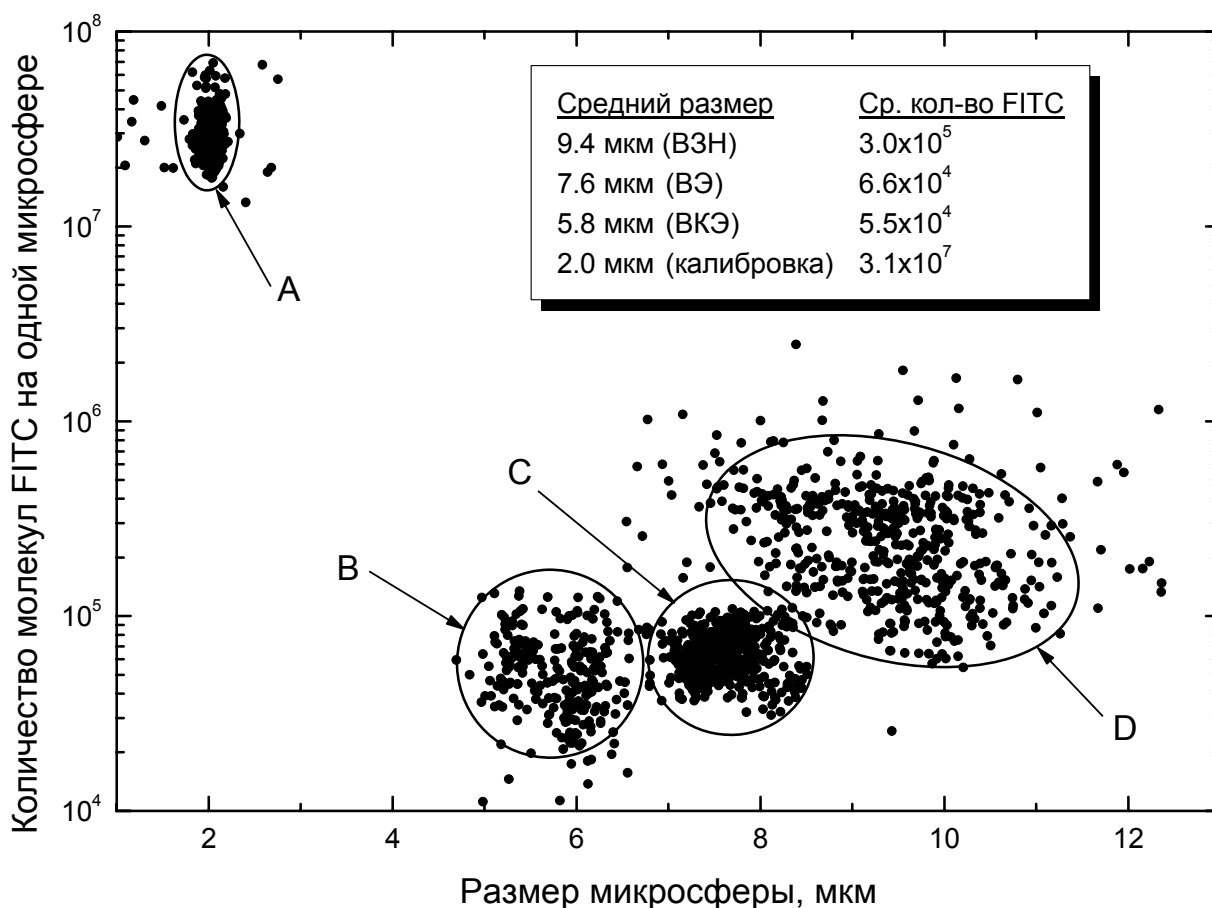


Рис. 20. Двумерное распределение по размеру и интенсивности флуоресценции для микросфер составного иммунологического микрочипа. Каждая точка на рисунке соответствует одной измеренной микросфере. Область А – калибровочные микросферы, область В – микросферы «Клещевой энцефалит»; С – микросферы «Эбол»; D – микросферы «Западный Нил».

Рис. 19 а) и б), соответственно. В распределении микросфер по размеру (Рис. 19а)) можно выделить четыре типа частиц. Используя МНК для четырех гауссовых распределений, были определены средние размеры микросфер и их соотношение в пробе, а именно, средние размеры: 2.046, 5.82, 7.56, 9.39; соответствующие соотношения: 32:26:46:50. Однако в распределении флуоресценции не наблюдали четыре пика (Рис. 19б)).

Для того чтобы выделить информацию по четырем видам микросфер, была построена двумерная «цитограмма» для измеренной пробы. Цитограмма представлена на Рис. 20. На цитограмме все четыре типа микросфер легко выделяются и для них были определены средние размеры и средние количества молекул FITC. По известным молярным соотношениям можно вычислить среднее количество комплексов, образовавшихся на микросферах для каждого антигена. Результаты обработки составного иммунологического жидкого микрочипа сведены в Табл. 3.

Табл. 3. Средние величины размера микросфер, количества молекул FITC и количества комплексов на поверхности микросфер, образовавшихся в ходе иммунных реакций.

	Средний размер, мкм	Ширина распределения, мкм	Среднее количество FITC на микросфере	Ширина распределения	Среднее количество комплексов на микросфере	Ширина распределения
B	5.78±0.03	0.42	(5.55±0.17)×10 ⁴	2.6×10 ⁴	(3.40±0.10)×10 ⁴	1.6×10 ⁴
C	7.60±0.02	0.34	(6.61±0.08)×10 ⁴	1.7×10 ⁴	(3.48±0.04)×10 ⁴	0.9×10 ⁴
D	9.39±0.05	1.03	(3.00±0.11)×10 ⁵	2.4×10 ⁵	(1.36±0.05)×10 ⁴	1.1×10 ⁴

Представленный результат является первой попыткой использования составного жидкого иммунологического микрочипа на три типа вирусов в одной пробе. По результатам получены количественные данные о наличии комплексов МКА+(антиген вируса). Достигнутая чувствительность позволяет измерять достаточно малые количества образовавшихся комплексов на поверхности микросфер.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенной в рамках контракта работы удалось подготовить инструментарий для экспериментальной работы по анализу иммунологического микрочипа на несколько вирусов. На прототипе сканирующего проточного цитометра была проведена экспериментальная работа по изучению формирования многослойного иммунологического микрочипа на микросферах разного размера. В процессе работы были внесены измерения в оптическую систему флуоресцентного канала цитометра и усовершенствовано программное обеспечение, с помощью которого проводилась обработка сигналов флуоресценции. В результате проведенной работы впервые была реализована система возбуждения флуоресценции в коаксиальной схеме распространения возбуждающего излучения и движения анализируемой частицы. В результате проведенной модернизации флуоресцентного канала сканирующего проточного цитометра была достигнута высокая чувствительность измерения количества молекул FITC на микросфере, которая в контрольных экспериментах достигала величины 15 тыс. молекул на одну микросферу.

В ходе выполнения работы по контракту были выбраны моноклональные антитела для конструирования иммуночувствительного жидкого микрочипа на следующие вирусные частицы: вирус Эбола, вирус Марбург, вирус клещевого энцефалита и вирус Западный Нил.

Сканирующий проточный цитометр позволяет измерять размер и показатель преломления одиночных микросфер, а так же количество флуоресцентных молекул на каждой измеряемой микросфере. Работоспособность иммуночувствительных микрочипов

изучалась с помощью модифицированного цитометра. В результате была продемонстрирована регистрация комплексов антиген-антитело, образовавшихся в ходе иммунной реакции сенсорных микросфер с присутствующими в растворе антигенами трех вирусов: вирус Западного Нила, вирус Эбола и вирус клещевого энцефалита. При этом каждый антиген формировал комплекс на микросфере определенного диаметра. Этот факт регистрировался на сканирующем проточном цитометре по светорассеянию и флуоресценции от одиночных микросфер.

Продемонстрированные возможности анализа оригинальных иммуночувствительных микрочипов на сканирующем проточном цитометре ставят новые задачи в исследовании формирования комплексов антиген-антитело на поверхности микросфер, а именно, необходимо подобрать оптимальные концентрации моноклональных антител, использующихся при формировании специфического слоя на поверхности микросфер и антител, служащих индикатором сформированных комплексов посредством флуоресцирующей метки. Также необходимо оптимизировать условия проведения иммунных реакций с целью получения максимальной разницы в сигналах между отрицательной и положительными пробами за счет подавления неспецифических реакций. Необходимо оптимизировать систему облучения микросферы в рабочей зоне сканирующего проточного цитометра для достижения максимального отношения сигнал/шум одновременно в каналах светорассеяния и флуоресценции.

При решении вышеперечисленных задач открывается прямой путь к созданию многопараметрического иммунологического микрочипа на несколько вирусных инфекций. Использование микросфер из различных полимеров и разных диаметров должно обеспечить в будущем количество анализируемых в одной пробе аналитов до 50 штук. Следует отметить, что такое решение проблемы многопараметрического биочипа возможно только с использованием оригинального сканирующего проточного цитометра.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Maltsev V.P. and Semyanov K.A. Characterization of Bio-Particles from Light Scattering. // Inverse and Ill-Posed Problems Series, Utrecht: VSP, 2004.
2. Протопопова Е.В., Коновалова С.Н., Локтев В.Б. Выделение клеточного рецептора для вируса клещевого энцефалита при помощи антиидиотипических антител, *Вопр. Вирусологии*, 1997, т. 42, N 6, с. 264-268
3. V. Sorokin, E.I. Kazachinskaia, A.V. Ivanova, A.V. Kachko, S.V. Netesov, A.A. Bukreyev, V.B. Loktev, and I.A. Razumov, Mapping of Two Dominant Sites of VP35 of Marburg Virus, *Viral Immunology*, 2002, v15, N3, 481-493
4. Razumov I.A., E.I. Kazachinskaia, V. A. Ternovoi, E.V. Protopopova, I.V. Galkina, V.L. Gromashevskii, A.G. Prilipov, A.V. Kachko, A.V. Ivanova, D.K. L'vov, V.B. Loktev. Neutralizing Monoclonal Antibodies against Russian Strain of the West Nile Virus. *Viral Immunology*, 2005, v 18, N3, p 558-568.
5. Т.Н. Рудзевич, В.А.Терновой, Е.И. Казачинская, И.А. Разумов, А.А. Чепурнов, В.Б. Локтев, С.В. Нетёсов. Выявление антигенных детерминант на N-конце белка VP35 вируса Эбола с помощью коротких рекомбинантных фрагментов этого белка, *Молекулярная генетика, микробиология и вирусология*, 2003, N 2, 38-42
6. Razumov I A, Agapov E V, Pereboev A V, Protopopova E V, Lebedeva S D, Loktev V B, 1991 "Investigation of antigenic structure of attenuated and virulent Venezuelan equine encephalomyelitis virus by of monoclonal antibodies" *Biomedical Science* 2 610-615
7. Goding J.W. 1980. Antibody production by hybridoma. *J Immunol Methods* 39: 285–291
8. Agapov, E. V., Razumov, I. A., Frolov, I. V., Kolykhalov, A. A., Netesov, S. V., and Loktev, V. B. (1994). Localization of four antigenic sites involved in Venezuelan equine encephalomyelitis virus protection. *Arch Virol* 139, 173-181
9. Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature (London)*. 227. 680-685.
10. Протопопова Е.В., Хусаинова А.Д., Коновалова С.Н., Локтев В.Б. (1996) Получение и характеристика антиидиотипических антител несущих на своей поверхности гемагглютинирующие паратопы вируса клещевого энцефалита, *Вопр. Вирусологии* 1996, 41, №2 с.50-53.
11. Chanas A., Johnson B., Simpson D. et al. (1976) Antigenic relationships of alphaviruses by a simple microculture cross-neutralization method. *J. Gen. Virol.*, Vol. 32, p.295-300.
12. Lindenbach BD, Rice CM. Flaviviridae: The viruses and their replication. In: Knippe DM, Howley PM. Editors. *Fundamental Virology*. Philadelphia: Lippincott Williams &Wilkins;

2001. p. 589-641
13. [Grard G, Moureau G, Charrel RN, Lemasson JJ, Gonzalez JP, Gallian P, Gritsun TS, Holmes EC, Gould EA, de Lamballerie X](#). Genetic characterization of tick-borne flaviviruses: New insights into evolution, pathogenetic determinants and taxonomy. *Virology*. 2006; doi:10.1016/j.virol.2006.09.015 [Epub ahead of print]
 14. Burke, M. (2001) Flaviviruses. In: Knipe, D., Howley, P. (Eds.), *Virology*, Fourth edition ed., vols. 1 and 2. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, pp. 1043–1125 [Chapter 33].
 15. Monath T.P., Heinz F.X., Flaviviruses, in *Fields Virology* Eds. Fields BN., Knipe., Howley P.M., Lippincott-Raven, PA-N.Y. 1995, v.1, p. 961-1034.
 16. Korenberg EI, Kovalevskii YV. Main features of tick-borne encephalitis eco-epidemiology in Russia. *Zentralbl Bakteriol* 1999; 289: 525-39
 17. Воспоминания о М.П. Чумакове, под ред. Дроздова С.Г., Нувахова Б.Ш., Погодиной В.В., Москва 1999, с 221.
 18. Heinz, F. X., M. S. Collett, R. H. Purcell, E. A. Gould, C. R. Howard, M. Houghton, R. J. M. Moormann, C. M. Rice, and H. J. Thiel. 2000. Family Flaviviridae, p. 859–878. In M. H. V. van Regenmortel, C. M. Fauquet, D. H. L. Bishop, E. Carstens, M. K. Estes, S. Lemon, J. Maniloff, M. A. Mayo, D. McGeogch, C. R. Pringle, and R. B. Wickner (ed.), *Virus taxonomy: classification and nomenclature of viruses*. Seventh report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Academic Press, San Diego, Calif.
 19. T.S. Gritsun, V.A. Lashkevich, E.A. Gould, Tick-borne encephalitis *Antiviral Research*. 2003, V 57 P 129–146
 20. Charrel R. N., H. Attoui, A. M. Butenko, J.C. Clegg, V. Deubel, T. V. Frolova, E. A. Gould, T. S. Gritsun, F. X. Heinz, M. Labuda, V. A. Lashkevich, V. Loktev, A. Lundkvist, D. V. Lvov, C. W. Mandl, M. Niedrig, A. Papa, V. S. Petrov, A. Plyusnin, S. Randolph, J. Suss, V. I. Zlobin and X. de Lamballerie “Tick-borne virus diseases of human interest in Europe”, *Clinical Microbiology and Infection*, 2004, 10, N.12, p.1040-1055.
 21. Süß J. (2003) Epidemiology and ecology of TBE relevant to the production of effective vaccines *Vaccine* 21 S1/19–S1/35
 22. T. S. Gritsun, T. V. Frolova, A. I. Zhankov, M. Armesto, S. L. Turner, M. P. Frolova, V. V. Pogodina, V. A. Lashkevich, and E. A. Gould. Characterization of a Siberian Virus Isolated from a Patient with Progressive Chronic Tick-Borne Encephalitis *J. Virol*. 2003, V. 77, No. 1 p. 25–36.
 23. [Kazachinskaia EI](#), [Pereboev AV](#), [Chepurnov AA](#), [Belanov EF](#), [Razumov IA](#) Monoclonal antibodies to Ebola virus: isolation, characteristics, and study of cross reactivity with Marburg

- virus [Vopr Virusol](#). 2000 May-Jun;45(3):40-4
24. [Kazachinskaia EI](#), [Ternovoi VA](#), [Rudzevich TN](#), [Netesov SV](#), [Chepurnov AA](#), [Razumov IA](#). Antigenic structure of Ebola virus VP35 protein [Vopr Virusol](#). 2001 Sep-Oct;46(5):25-31.
 25. [Lucht A](#), [Grunow R](#), [Otterbein C](#), [Moller P](#), [Feldmann H](#), [Becker S](#) Production of monoclonal antibodies and development of an antigen capture ELISA directed against the envelope glycoprotein GP of Ebola virus. [Med Microbiol Immunol \(Berl\)](#). 2004 Nov;193(4):181-7.
 26. [Lucht A](#), [Grunow R](#), [Moller P](#), [Feldmann H](#), [Becker S](#). Development, characterization and use of monoclonal VP40-antibodies for the detection of Ebola virus. [J Virol Methods](#). 2003 Jul;111(1):21-8