

УДК 57.088.6

## УСКОРИТЕЛЬНАЯ МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЯ ДЛЯ ОБНАРУЖЕНИЯ СВЕРХНИЗКИХ КОНЦЕНТРАЦИЙ ВИРУСНЫХ ЧАСТИЦ МЕЧЕННЫХ РАДИОУГЛЕРОДОМ

Е. А. Прокопьева<sup>1,2</sup>, Е. В. Пархомчук<sup>2,3</sup>

<sup>1</sup> ФГБНУ Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины, г. Новосибирск, Россия

<sup>2</sup> Новосибирский государственный университет, ЦКП «УМС НГУ-ННЦ», г. Новосибирск, Россия

<sup>3</sup> ФГБУН Институт катализа им. Г. К. Борескова, г. Новосибирск, Россия

*Изучение вирус-клеточного взаимодействия на примере обогащенного изотопом <sup>14</sup>C вируса гриппа позволяет определять сверхнизкие количества вирусных частиц в вируссодержащей жидкости, проникших во внутренние органы экспериментально инфицированных мышей. С целью определения концентраций вируса гриппа А разработан метод УМС-диагностики: в вируссодержащую жидкость вносят линкер EDC для связывания с эпитопами на поверхности вирионов; после инкубации, осаждения и отмывки добавляют меченную <sup>14</sup>C мочевины, которая замещает линкер EDC в местах связывания с COOH-группами эпитопов. Концентрацию вирусов, меченных радиоуглеродом, измеряют с помощью ускорительного масс-спектрометра, который способен детектировать от 10<sup>7</sup> шт. меченых вирионов в 1 г углерода органа мыши.*

**Ключевые слова:** изотоп <sup>14</sup>C, мечение, вирион, грипп, вирус-клеточное взаимодействие, ускорительная масс-спектрометрия

### 1. Введение

Существуют различные количественные оценки вирусных частиц, среди которых наиболее часто применяются такие методы, как бляшкообразование; определение 50 %-го цитопатического действия, 50 %-й летальной дозы или 50 %-й эмбриональной дозы; иммуноферментные анализы; количественная полимеразная цепная реакция; реакция гемагглютинации; количественная электронная микроскопия [1]. Несмотря на широкий спектр способов количественной оценки вирусных частиц, в большинстве своем они определяют не физический титр частиц, а скорее, биологическую активность вируса, кроме того, имеется проблема точной оценки крайне малого количества патогенов. В качестве вирусного объекта нами был выбран вирус гриппа типа А, поскольку он является одним из представителей актуальных патогенов, способных поражать птиц, морских млекопитающих, лошадей, свиней и человека, а также, которые нередко становятся причиной возникновения масштабных эпидемий и пандемий [2]. В данной работе представлено описание разработанного нового метода диагностики вирус-клеточного взаимодействия на примере вируса гриппа А с введенной меткой радиоуглерода <sup>14</sup>C.

Известны методики мечения радиоактивными изотопами для определения опухолевых клеток *in vivo* путем радиоотображения, которые ранее применялись при диагностике различных онкологий (аденокарциномы, рака груди, нейробластом, рака желудка, меланомы) [3]. Существует довольно широкий спектр радионуклидов, пригодных для радиоотображения: <sup>14</sup>C, <sup>32</sup>P, <sup>67</sup>Ga, <sup>99m</sup>Tc, <sup>111</sup>In, <sup>123</sup>I, <sup>125</sup>I, <sup>169</sup>Yb, <sup>186</sup>Re, <sup>188</sup>Re. При диагностике вазоактивного кишечного рецептора в качестве радиотерапевтического агента применяется <sup>186</sup>Re или <sup>188</sup>Re [3]. В радиосцинтиграфии

используется метод радиойодирования, а для более качественного отображения достаточно широко применяют технеций [4]. Так, радиоактивный метод с применением  $^{125}\text{I}$  использовали в генной инженерии при определении антител класса IgM к корантигену вируса гепатита В [5]. Однако получение радиойодированных пептидов – относительно дорогой и ограниченный по запасам реагента метод. Для сцинтиграфического радиоотображения предпочтение отдают  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ , а не радиойодированию, и тем не менее метод с использованием радионуклидов технеция не используется широко, поскольку не подходит для мечения белков, имеющих размер молекулы менее 10 тыс. дальтонов [6]. Радиоактивный фосфор ( $^{32}\text{P}$ ) предлагается к выявлению фрагментов генома вируса инфекционного некроза поджелудочной железы. Недостатком данного способа авторы отмечают возможность ложноположительных результатов и высокую специфичность, нарастающую в случае измененного генотипа [7]. Изотопы углерода – радиоуглерод  $^{14}\text{C}$ , а также стабильный изотоп  $^{13}\text{C}$  – в составе меченой мочевины используются при бактериологическом исследовании желудочно-кишечного тракта на заражение *Helicobacter pylori* [8]. Во всех описанных случаях радионуклиды использовали в небезопасных для живого организма количествах. Предлагаемый нами метод основан на внесении радиоуглеродной метки в оболочку вируса без нарушения его жизнедеятельности и на дальнейшем определении вирусных частиц методом ускорительной масс-спектрометрии (УМС), при этом оценивается не радиоактивность, а количество меченых вирусов. Поскольку метод УМС позволяет проводить достоверные измерения концентрации изотопа  $^{14}\text{C}$  при его доле  $10^{-15}$  от общего содержания углерода, то появляется возможность определять предельно низкие концентрации вирусов. В данном методе выполняется подсчет количества вирионов в вируссодержащей жидкости (ВСЖ), а также определение числа проникших вирусных частиц в органы экспериментально инфицированных млекопитающих. Благодаря разработанному методу станет возможным углубленное изучение вирус-клеточного взаимодействия *in vitro* и *in vivo*, а также исследование механизма развития высоколетальной инфекции.

## 2. Материалы и методы

### 2.1 Культивирование клеток и титрование вирусов

Для разработки метода диагностики вирус-клеточного взаимодействия с помощью ускорительной масс-спектрометрии в качестве модельной системы использовали вирус гриппа A(H1N1)pdm09 (штамм A/Tomsk/273MA3/2010(H1N1pdm09) (MA-CD1), выделенный от человека и адаптированный к организму мышей путем слепого пассирования через легкие [9]. Разведение вируса готовили в поддерживающей питательной среде MEM (ООО «БиолоТ», Россия), содержащей 0,2 % V фракции бычьего сывороточного альбумина (ООО «БиолоТ», Россия), 2 мкг/мл трипсина TPCK (Sigma-Aldrich, США) и 50 мкг/мл гентамицина сульфата (ООО «БиолоТ», Россия). Разведение вируса рассчитывали исходя из инфекционного титра для культуры клеток MDCK, оцененного по методу Кербера, выраженного в IgТЦИД<sub>50</sub>/мл (50%-я тканевая цитопатическая инфекционная доза в 1 мл), использовали дозу 100 ТЦИД<sub>50</sub> вируса. Затем ВСЖ фильтровали через фильтр 0,22 мкм и трехкратно разбавляли физиологическим раствором с фосфатным буфером (PBS, pH 7,4). Осаждение вируса ультрацентрифугированием проводили на Beckman Scientific Inc. TL-100 Benchtop в течение 1 ч при 38 000 g и 4 °C. Мечение вирусов проводили с помощью меченой мочевины (препарат «Уреакапс», 37 кБк, АО НИФХИ им. Л.Я. Карпова) и кросс-линкера 1-этил-3-(3-диметиламинопропил) карбодиимида (EDC) (AppliChem, Германия). Меченые вирусные частицы титровали в

клетках собачьей почки Madin-Darby (MDCK) и проводили реакцию гемагглютинации (РГА).

Для анализа содержания радиоуглерода в вирусах методом УМС готовили пробы следующим образом: 10 мкл раствора меченой ВСЖ, предварительно разбавленного в 100 раз (10 мкл меченой ВСЖ + 990 мкл ФСБ), прикапали к навескам мелкозернистого плотного графита (МПГ), не содержащего радиоактивного  $^{14}\text{C}$  (табл. 1). Затем пробы подвергли процедуре зауглероживания, которая проводилась на абсорбционно-каталитической установке в Институте катализа им. Г. К. Борескова СО РАН [10], включающей стадии сжигания, сорбции углекислого газа на селективном сорбенте, десорбции и каталитического восстановления  $\text{CO}_2$  водородом (РФ 2638820, G01N 33/60, 2017). После завершения процесса зауглероживания порошок, содержащий 1 мг углерода, прессовали в таблетки и направляли на УМС-анализ. Процедуре графитизации, помимо исследовательских образцов, подвергали также стандартные образцы: щавелевой кислоты (OxI) и сахарозы (ANU). Относительное содержание радиоуглерода  $^{14}\text{C}/^{13}\text{C}$  в исследовательских образцах нормировали на содержание  $^{14}\text{C}/^{13}\text{C}$  в стандартах, получая отношения  $^{14}\text{C}$  обр./ $^{14}\text{C}$  фон. Определение содержания радиоуглерода выполняли на уникальной научной установке «Ускорительный масс-спектрометр Института ядерной физики СО РАН» (УНУ «УМС ИЯФ СО РАН») [11].

## 2.2 Электронная микроскопия

Медную сетку TEM, 200 mesh (SPI Supplies, Уэст-Честер, Пенсильвания, США), покрытого ультратонкой формваровой пленкой-носителем, помещали на 10 мкл капли ВСЖ на 30 с, а затем сушили с помощью фильтровальной бумаги. Затем на поверхность сетки добавляли 10 мкл капли водного раствора уранилацетата (1 % по массе) в течение 15 с. После сушки, снова используя фильтровальную бумагу, сетку, исследовали с помощью просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ) (JEM-1400; Jeol, Япония) при ускоряющем напряжении 80 кВ.

## 2.3 Исследования *in vivo*

Все работы с животными одобрены Комитетом по биомедицинской этике при ФИЦ ФТМ.

Мышей линии BALB/c 6–8-недельных (масса тела 18–20 г) (питомник ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор», Кольцово) анестезировали диэтиловым эфиром (2–4 % во вдыхаемой смеси) и инфицировали интраназально  $10^4$  ТЦИД<sub>50</sub> вируса МА-CD1, меченным  $^{14}\text{C}$ , в 50 мкл ФСБ.

Ежедневно в течение 8 суток проводили наблюдение за инфицированными мышами, оценивали поведение (активность, наличие аппетита), внешний вид животного, качество шерстного покрова, упитанность, наличие специфических клинических проявлений болезни (конъюнктивиты, выраженная дыхательная недостаточность, нервные проявления (парезы, параличи)).

При отсутствии летальности среди экспериментально инфицированных лабораторных мышей определяли патологическое влияние вируса гриппа МА-CD1, меченого  $^{14}\text{C}$ , на организм экспериментальных животных по изменению массы и температуры тела животных опытных групп. Для этого получали данные о массе тела каждого животного ежедневно в течение всего срока наблюдения. Показатель изменения массы тела вычисляли как среднее арифметическое массы тела всех мышей в группе на 1, 2 и 3 сутки, соответственно. Измерение температуры тела производили в ушном канале при помощи инфракрасного электронного термометра Digital Veterinary Thermometer AccuVet. (Measure technology Co., LTD.) и выражали в градусах Цельсия.

На 1, 2 и 3 сутки после инфицирования по три мыши умерщвляли путем декапитации. Для вирусологического и УМС-анализов брали легкие, трахею, сердце, печень, головной мозг, почку, тонкую кишку, толстую кишку. Инфекционные титры вируса гриппа определяли титрованием 10 %-го гомогената в культуре клеток MDCK, а также с помощью определения гемагглютинирующей единицы (ГАЕ) в 1 мл ВСЖ в РГА [12]. Значение ТЦИД<sub>50</sub>/мл рассчитывали по методу Кербера в модификации Ашмарина [13] и выражали в виде  $M \pm 2\sigma$ , где  $M$  – среднее значение,  $\sigma$  – квадратичное отклонение. Определение статистической достоверности различий вирусных титров и морфометрических параметров в сравниваемых группах проводили методами вариационной статистики. Для УМС-анализа образцы биологических тканей сушили и подвергали зауглероживанию, как описано выше.

### 3. Результаты

Перед нанесением радиоактивной метки на вирионы требовалось очищение ВСЖ от остатков культуры клеток MDCK и других биомолекул, которые могут содержать карбоксильные группы. Для этого мы использовали простой и быстрый вариант очистки путем фильтрации через мембранные фильтры Millipore с диаметром пор 0,22 мкм и последующим ультрацентрифугированием. Этот метод обеспечивает высококачественную очистку вируса гриппа, но приводит к снижению его титра (с 640 до 320 ГАЕ/мл в нашем образце), поскольку некоторые вирионы остаются на поверхности мембранных фильтров Millipore. Таким образом, после процедуры ультрацентрифугирования количество вирионов в ВСЖ составило 320 ГАЕ/мл, что соответствует  $(64-128) \cdot 10^8$  шт./мл вирионов, содержащих  $10^{14} - 10^{15}$  шт. -COOH групп на эпитопах. Как было показано нами ранее [14], для внесения радиоактивной метки на поверхность вируса гриппа необходима активация карбоксильной группы белка, для чего был использован водорастворимый кросс-линкер – карбодимид (1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide, EDC, EDAC или EDCI) (рис. 1).

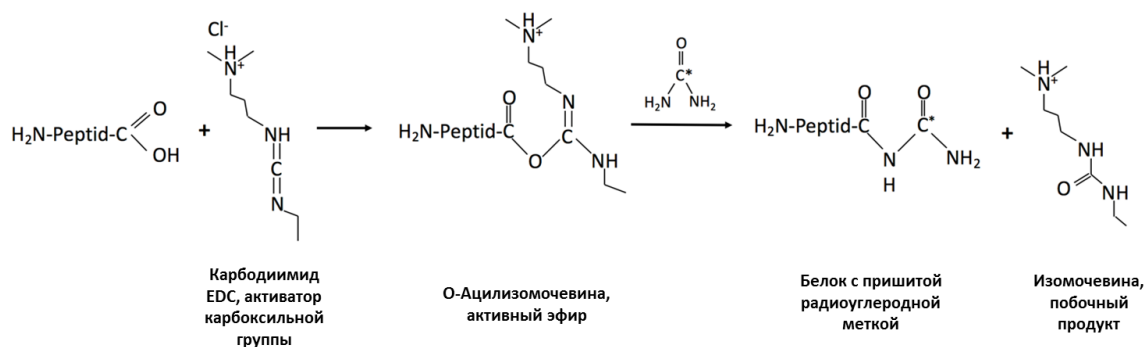


Рисунок 1. Схема связывания углерода карбоксильной группы, расположенной на поверхностном белке вируса гриппа, с азотом первичного амина через активацию карбоксильной группы белка кросс-линкером EDC

Примечание: схема связывания углерода карбоксильной группы представлена на примере мочевины, меченой  $^{14}\text{C}$ ;  $\text{C}^*$  – радиоуглерод.

УМС-анализ показал (табл. 1), что в 10 мкл меченой вирусосодержащей жидкости  $1,6 \cdot 10^{10}$   $\text{NC}^*\text{ONH}_2$ -групп, значит, в 1 мл вирусосодержащей жидкости количество меченых  $\text{NC}^*\text{ONH}_2$ -групп составляет  $1,6 \cdot 10^{12}$  шт. Если в 1 мл содержится  $(1,28-2,56) \cdot 10^{10}$  шт. вирусов и  $(6,9-14) \cdot 10^{14}$  шт. карбоксильных групп, то метка вносится на  $(0,1-0,3)$  % групп.

Таблица 1. Массы проб для УМС-анализа и содержание радиоуглерода в меченой ВСЖ

Номер пробы	1	2	3
Масса МПГ, мг	3,590	2,075	2,938
$^{14}\text{C}$ обр./ $^{14}\text{C}$ фон	0,833	1,433	1,151
Количество $^{14}\text{C}$ в 10 мкл меченой ВСЖ	$1,5 \cdot 10^{10}$	$1,5 \cdot 10^{10}$	$1,7 \cdot 10^{10}$

Примечание: ВСЖ – вирусосодержащая жидкость; МПГ – мелкозернистый плотный графит.

ПЭМ выявила структурную целостность мембран меченых вирионов (рис. 2), что свидетельствует о сохранности вирусных частиц после процедур очистки, концентрирования и мечения радиоуглеродом.

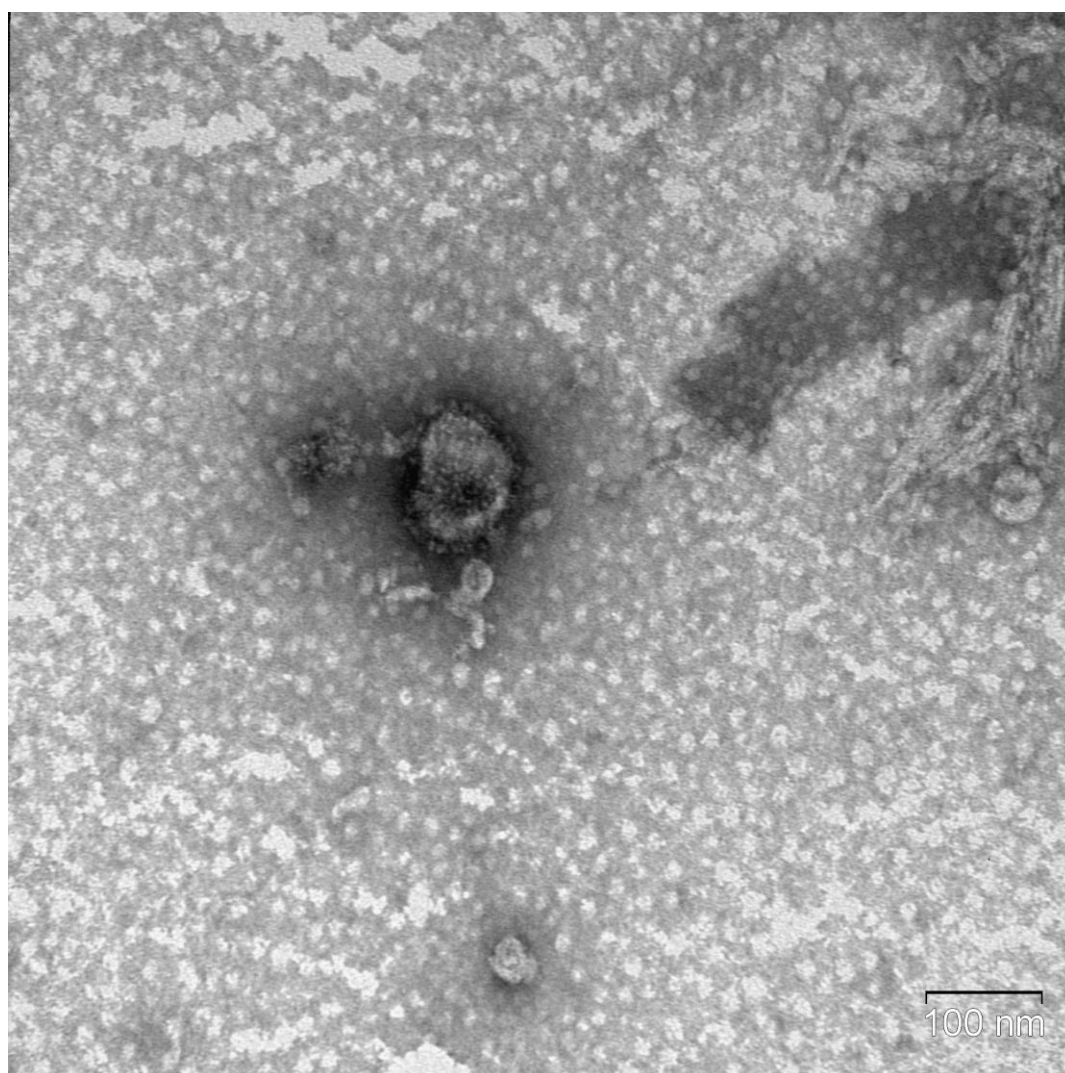


Рисунок 2. Изображение меченого радиоуглеродом вируса гриппа на ПЭМ

В результате инфицирования мышей линии BALB/c вирусом гриппа A/H1N1pdm09, меченым  $^{14}\text{C}$ , отмечались признаки гриппозного заболевания в виде снижения массы тела и гипотермии (рис. 3, 4).

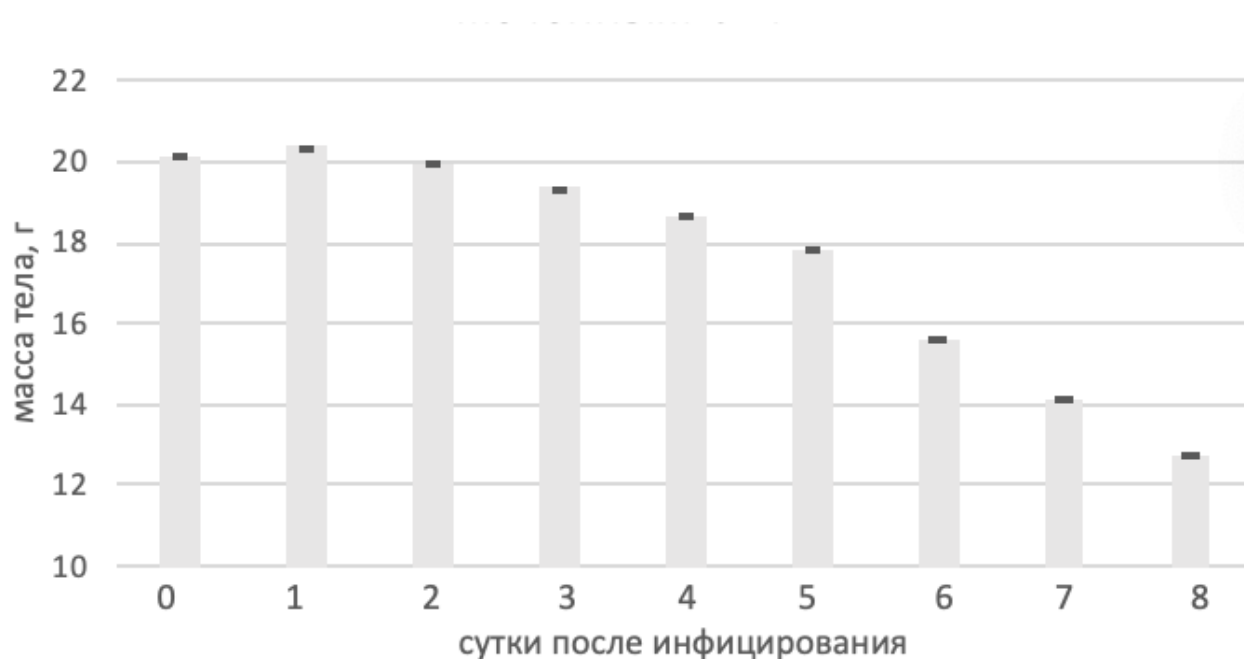


Рисунок 3. Снижение массы тела у экспериментальных животных, инфицированных вирусом гриппа A/H1N1pdm09, меченным  $^{14}\text{C}$

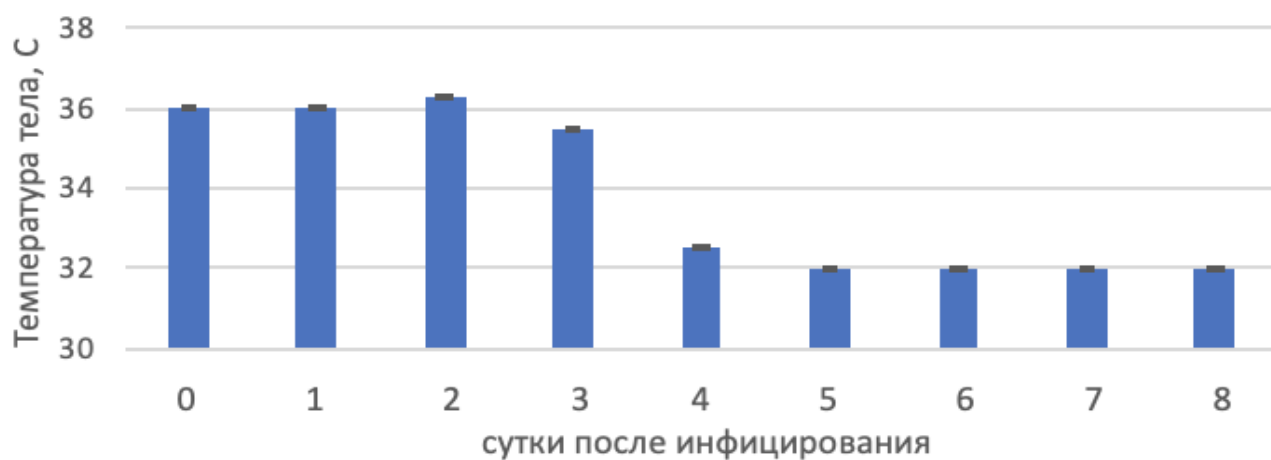


Рисунок 4. Изменение температуры тела у экспериментальных животных после инфицирования вирусом гриппа A/H1N1pdm09, меченным  $^{14}\text{C}$

Результаты определения инфекционного титра вируса, гемагглютинирующей активности, а также физического титра вируса методом УМС в органах лабораторных мышей (табл. 2) показали сохранность вирулентных свойств у меченого вируса.

Таблица 2. Сравнительный анализ вирусной нагрузки в органах мышей, экспериментально инфицированных вирусом гриппа A/H1N1pdm09 с меткой  $^{14}\text{C}$ , измеренный с помощью вирусологических методов и УМС-анализа

	Титр вируса, IgТЦИД <sub>50</sub> /мл <sup>1</sup>			РГА, ГАЕ/мл			УМС 10 <sup>7</sup> шт. вирусов/1 г углерода органа		
	Сутки после инфицирования			Сутки после инфицирования			Сутки после инфицирования		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3
Легкие	5,1±0,18	4±0,24	4,8±0,14	4±1,63	13,3±3,8	16±0	413- 1677	342- 1387	324- 1318
Трахея	2,5	1,5	1,5	32	8	32	6-25	41- 166	43- 173
Сердце	1,25	4,25	1,5	4	8	8	3-13	14- 57	1-3
Печень	0	0	0	13,3±13,2	14,7±12,4	6,7±1,9	1-3	2-7	1-4
Почки	0,8±0,34	0	0	14,7±12,4	6,7±1,9	9	3-13	5-21	3-14
Мозг	0	0	0	0	0	0	1-2	2-7	1-2
Тонкий кишечник	0	0	0	48,0±22,6	37,3±19,9	45,3±26,4	2-7	35- 142	0,1- 0,8
Толстый кишечник	0	0	1,3±0,07	42,7±15,1	219±212	69,3±45,9	1-4	1-5	1-4

Примечание: <sup>1</sup> – титры вирусов выражены в IgТЦИД<sub>50</sub> (тканевая цитопатическая инфекционная доза) на 1мл исследуемого образца в виде  $M \pm m$ , где  $M$  – средняя арифметическая величина, а  $m$  – ошибка среднего; РГА – реакция гемагглютинации выражена в ГАЕ (гемагглютинирующая единица) в виде  $M \pm m$ , где  $M$  – средняя арифметическая величина, а  $m$  – ошибка среднего; УМС – ускорительный масс-спектрометр.

Полученные результаты, показав вирусологическую нагрузку во всех исследуемых органах с 1 по 3 сутки инфицирования, продемонстрировали высокую точность предложенного метода мечения вируса по сравнению с двумя классическими вирусологическими методами оценки.

#### 4. Обсуждение

Предложенный нами метод диагностики вирусов и вирусных инфекций *in vitro* и *in vivo* основан на количественном подсчете радиоуглеродной метки, внесенной на оболочку вирусов без разрушения вирионов. С целью определения концентрации вирусов на примере вируса А разработан метод УМС-диагностики: в вирусосодержащую жидкость вносят линкер EDC для связывания радиоуглеродной метки, находящейся в составе аминокислотного вещества, с карбоксильными группами эпитопов на поверхности вирионов; после инкубации, осаждения и отмывки добавляют вещество, в котором есть изотоп  $^{14}\text{C}$  и аминокислота, вещество замещает линкер EDC в местах связывания с COOH-группами эпитопов. Содержание изотопа  $^{14}\text{C}$  в вирусных препаратах измеряют с помощью ускорительного масс-спектрометра, который способен детектировать сверхнизкие концентрации частиц.

В проведенном нами исследовании была подтверждена сохранность вирулентных свойств у меченого вируса гриппа в исследованиях *in vitro* и *in vivo*. В процессе очистки ВСЖ от клеточного дебриса, последующего мечения и концентрирования с помощью ультрацентрифугирования титр вируса гриппа снижался, но незначительно. При инфицировании экспериментальных животных наблюдалось классическое течение гриппозной инфекции со снижением веса и гипотермии у последних. Методом УМС меченые вирусы обнаруживали во всех исследованных органах, наибольшая концентрация наблюдалась в легких и трахее. Стоит отметить, что во всех органах, за исключением легких, наблюдалось

увеличение концентрации меченых вирусов на вторые сутки после инфицирования, после чего концентрация падала.

Изучение вирус-клеточного взаимодействия методом ускорительной масс-спектрометрии на примере обогащенного изотопом  $^{14}\text{C}$  вируса гриппа позволяет определить сверхнизкие количества проникших вирусных частиц, способных вызвать заболевание в органах экспериментально инфицированных млекопитающих. Кроме того, данный метод применим при анализе других вирусов и пептидов, содержащих на своей поверхности белки с COOH-группами в исследованиях *in vitro* и *in vivo*. Таким образом, данный метод может быть применен в медицинской биотехнологии, а именно как метод определения вирусных инфекций в вирусологии, например, для выявления и идентификации вируса гриппа А, определения специфичности онколитических вирусов и др.

## 5. Выводы

На примере вируса гриппа разработан метод количественной оценки вирусов и вирусных инфекций *in vitro* и *in vivo* с помощью радиоуглеродной метки и последующего УМС-анализа. Удалось зафиксировать от  $10^7$  шт. меченых вирионов в 1 г углерода органа мыши.

## 6. Благодарность

Авторы выражают особую признательность А. А. Чепурнову за помощь в проведении пробоподготовки вируса гриппа, Д. В. Кулешову за графитизацию биологических проб и С. А. Растигееву за измерения на ускорительном масс-спектрометре.

Данные исследования проведены при финансировании из государственного бюджета проекта № 122012400086-2, а также проекта № FSUS-2020-0036 (БЧ-2020-0036).

## 7. Список литературы

1. Karakus U., Cramer M., Lang C., Yangüez E. Propagation and Titration of Influenza Viruses. *Methods Mol Biol.* 2018. 1836 P. 59-88.
2. Kramer F., Smith G., Fouchier R., Paris M., Kedzierska K., Doherty P., Palace P., Shaw M., Treanor J., Webster R., Garcia-Sastre A. Influenza. *Nat Rev Dis Primers* 2018. 4, 3.
3. Меченые радиоактивным изотопом пептиды для диагностики и терапии RU 2171117 С2. Дин Р. Т., Пирсон Д. Э., Листер-джеймс Д., Сивителло Э. Р. [https://yandex.ru/patents/doc/RU2171117C2\\_20010727](https://yandex.ru/patents/doc/RU2171117C2_20010727)
4. Радиоактивный иммуореагент направленного действия, композиция для получения изображения злокачественного новообразования в организме, способ получения изображения и комплексообразующий агент. RU 2122431 С1. Тоунер Д.Л., Хилборн Д.А., Мюррей Б.Д., Хауссейн Т.З., Сноу Р.А., Саха А.К., Филион Р., Ширман К.В., Шах Ч. [https://yandex.ru/patents/doc/RU2122431C1\\_19981127](https://yandex.ru/patents/doc/RU2122431C1_19981127);
5. Способ определения антител класса IgM к корантигену вируса гепатита В. SU 1 642 399 А1. Цибиногин В.В., Лосева В.Я. [https://yandex.ru/patents/doc/SU1642399A1\\_19910415](https://yandex.ru/patents/doc/SU1642399A1_19910415)
6. Lamberts SW, Bakker WH, Reubi JC, et al. Receptors on tumors studied with radionuclide scintigraphy. *J Nucl Med.* 1991. 32. P. 1189–1191



7. Способ диагностики вируса инфекционного некроза поджелудочной железы лососевых методом полимеразной цепной реакции. RU 2 508 547 C2 Кандрина Н.Ю., Ломакина Н.Ф., Завьялова Е.А., Гулюкин М.И. [https://yandex.ru/patents/doc/RU2508547C2\\_20140227](https://yandex.ru/patents/doc/RU2508547C2_20140227) (RU 2508547, G01N 33/50, 2013)
8. Balon H.R., Roff E., Freitas J.E., Gates V., Dworkin H.J. Society of Nuclear Medicine Procedure Guideline for C-14 Urea Breath Test. J Nucl Med. 1998 Nov. 39(11). P. 2012-2014.
9. Адаптированные пандемические штаммы вируса гриппа A/Tomsk/273/2010-MA1(H1N1pdm09), A/Tomsk/273/2010-MA2(H1N1pdm09) и A/Tomsk/273/2010-MA3(H1N1pdm09) для оценки действия противовирусных препаратов (варианты). Прокопьева Е.А., Шестопалова Л.В., Шестопалов А.М. RU 2 605 317 C1 [https://yandex.ru/patents/doc/RU2605317C1\\_20161220](https://yandex.ru/patents/doc/RU2605317C1_20161220).
10. Lysikov A.I., Kalinkin P.N., Sashkina K.A., Okunev A.G., Parkhomchuk E.V., Rastigeev S.A., Parkhomchuk V.V., Kuleshov D.V., Vorobyeva E.E., Dralyuk R.I. Novel Simplified Absorption-Catalytic Method of Sample Preparation for AMS analysis designed at the Laboratory of Radiocarbon Methods of Analysis (LRMA) in Novosibirsk Akademgorodok // International Journal of Mass-spectrometry. 2018. V. 433. P. 11-18.
11. Parkhomchuk V.V., Rastigeev S.A. Accelerator mass spectrometer of the center for collective use of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences // Journal of Surface Investigation. 2011. V. 5. I. 6. P. 1068-1072.
12. Manual for the laboratory diagnosis and virological surveillance of influenza. WHO Global Influenza Surveillance Network, 2011. 153p.
13. Ашмарин, И.П. Статистические методы в микробиологических исследованиях / И.П. Ашмарин, А.А. Воробьев. - М.: Медгиз, 1962. - 179 с.
14. Прокопьева Е.А., Пархомчук Е.В., Соболев И.А., Шестопалов А.М. Разработка нового метода диагностики вирус-клеточного взаимодействия с помощью ускорительной масс-спектрометрии // Современные проблемы науки и образования. 2019. № 1. doi. 10.17513/spno.28463.

#### **Сведения об авторах:**

**Прокопьева Елена Александровна**, Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины», кандидат биологических наук, доцент, г. Новосибирск, ул. Пирогова, 2, 630090, e.prokoreva@g.nsu.ru;

**Пархомчук Екатерина Васильевна**, ФГБУН Институт катализа им. Г.К. Борескова, кандидат химических наук, старший научный сотрудник, г. Новосибирск, пр. Лаврентьева, 5, 630090.

## ACCELERATOR MASS-SPECTROMETRY FOR DETECTING ULTRA-LOW CONCENTRATIONS OF VIRAL PARTICLES, LABELLED BY RADIOCARBON

E.A. Prokopyeva <sup>1,2</sup>, E.V. Parkhomchuk <sup>2,3</sup>

<sup>1</sup> Federal Research Center for Fundamental and Translational Medicine, Novosibirsk, Russia,

<sup>2</sup> Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia,

<sup>3</sup> Institute of Catalysis named after G.K. Boreskov, Novosibirsk, Russia,

*Annotation - The study of virus-cell interaction on the example of influenza virus enriched with the <sup>14</sup>C isotope allowed us to determine the ultra-low amounts of viral particles in the virus-containing liquid and penetrated into the internal organs of experimentally infected mice. In order to determine the concentrations of influenza A virus, a method using AMS detection has been developed: an EDC linker is introduced into the virus-containing liquid to bind to epitopes on the surface of virions; after incubation, precipitation and washing, urea labelled by <sup>14</sup>C is added, which replaced the EDC linker at the sites of binding to the COON groups of epitopes. The labelled viruses are counted using an accelerator mass-spectrometer, which is capable of detecting ultra-low concentrations of labelled virions.*

**Key words:** isotope <sup>14</sup>C, labeling, virion, influenza, virus-cell interaction, accelerator mass-spectrometry

### References

1. Karakus U., Cramer M., Lang C., Yangüez E. Propagation and Titration of Influenza Viruses. *Methods Mol Biol.* 2018; 1836: 59-88. DOI: 10.1007/978-1-4939-8678-1\_4.
2. Kramer F., Smith G., Fouchier R., Paris M., Kedzierska K., Doherty P., Palace P., Shaw M., Treanor J., Webster R., Garcia-Sastre A. Influenza. *Nat Rev Dis Primers* 4, 3 (2018). <https://doi.org/10.1038/s41572-018-0002-y>
3. Radioactive isotope labeled peptides for diagnosis and therapy RU 2171117 C2. Dean R.T., Pearson D.E., Lister-James D., Civitello E.R. [https://yandex.ru/patents/doc/RU2171117C2\\_20010727](https://yandex.ru/patents/doc/RU2171117C2_20010727)
4. A directed radioactive immunoreagent, a composition for obtaining an image of a malignant neoplasm in the body, a method for obtaining an image and a complexing agent. RU 2122431 C1. Towner D.L., Hilborn D.A., Murray B.D., Haussein T.Z., Snow R.A., Saha A.K., Filion R., Shirman K.V., Shah Ch. [https://yandex.ru/patents/doc/RU2122431C1\\_19981127](https://yandex.ru/patents/doc/RU2122431C1_19981127)
5. A method for determining antibodies of the IdM class to the hepatitis B virus corantigen. SU 1 642 399 A1. Cibirgin V.V., Loseva V.Ya. [https://yandex.ru/patents/doc/SU1642399A1\\_19910415](https://yandex.ru/patents/doc/SU1642399A1_19910415)
6. Lamberts SW, Bakker WH, Reubi JC, et al. Receptors on tumors studied with radionuclide scintigraphy. *J Nucl Med.* 1991; 32: 1189-1191
7. A method for diagnosing the virus of infectious necrosis of the pancreas of salmon by polymease chain reaction. RU 2 508 547 S2 Kandrina N.Yu., Lomakina N.F., Zavyalova E.A., Gulyukin M.I. [https://yandex.ru/patents/doc/RU2508547C2\\_20140227](https://yandex.ru/patents/doc/RU2508547C2_20140227) (RU 2508547, G01N 33/50, 2013)
8. Balon H.R., Roff E., Freitas J.E., Gates V., Dworkin H.J. Society of Nuclear Medicine Procedure Guideline for C-14 Urea Breath Test. *J Nucl Med.* 1998 Nov;39(11): 2012-2014.

9. Adapted pandemic strains of influenza A virus/Tomsk/273/2010- MA1(H1N1pdm09), A/Tomsk/273/2010- MA2(H1N1pdm09) and A/Tomsk/273/2010- MA3(H1N1pdm09) to evaluate the effect of antiviral drugs (variants). Prokopyeva E.A., Shestopalova L.V., Shestopalov A.M. RU 2 605 317 C1 [https://yandex.ru/patents/doc/RU2605317C1\\_20161220](https://yandex.ru/patents/doc/RU2605317C1_20161220).
10. Lysikov A.I., Kalinkin P.N., Sashkina K.A., Okunev A.G., Parkhomchuk E.V., Rastigeev S.A., Parkhomchuk V.V., Kuleshov D.V., Vorobyeva E.E., Dralyuk R.I. Novel Simplified Absorption-Catalytic Method of Sample Preparation for AMS analysis designed at the Laboratory of Radiocarbon Methods of Analysis (LRMA) in Novosibirsk Akademgorodok // International Journal of Mass-spectrometry. 2018. V. 433. P. 11-18. DOI: 10.1016/j.ijms.2018.08.003.
11. Parkhomchuk V.V., Rastigeev S.A. Accelerator mass spectrometer of the center for collective use of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences // Journal of Surface Investigation. 2011. V. 5. I. 6. P. 1068-1072. DOI: 10.1134/S1027451011110140.
12. Manual for the laboratory diagnosis and virological surveillance of influenza. WHO Global Influenza Surveillance Network, 2011. 153p.
13. Ashmarin, I.P. Statisticheskie metody v mikrobiologicheskikh issledovaniyach [in russian] / I.P. Ashmarin, A.A. Vorobyev. - M.: Medgiz, 1962. - 179 p.
14. Prokopyeva E.A., Parkhomchuk E.V., Sobolev I.A., Shestopalov A.M. Development of a new method for diagnosing virus-cell interaction using accelerator mass spectrometry // Modern problems of science and education. 2019. № 1. doi. 10.17513/spno.28463