

УДК 578.086+539.61

## ИЗУЧЕНИЕ ОСОБЕННОСТЕЙ АДГЕЗИИ ВИРУСА ТАБАЧНОЙ МОЗАИКИ МЕТОДОМ АТОМНО-СИЛОВОЙ МИКРОСКОПИИ

© 2004 г. Е. В. Дубровин<sup>\*,\*\*</sup>, М. Н. Кирикова<sup>\*\*</sup>, В. К. Новиков<sup>\*\*\*</sup>, Ю. Ф. Дрыгин<sup>\*\*\*\*</sup>,

*Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, физический факультет  
119992 Москва, Воробьевы горы*

*\*\*Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, химический факультет  
119992 Москва, Воробьевы горы*

*\*\*\*Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, биологический факультет  
119992 Москва, Воробьевы горы*

*\*\*\*\*Научно-исследовательский институт физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского  
МГУ им. М.В. Ломоносова  
119992 Москва, Воробьевы горы*

*\*\*\*\*\*Институт физической химии РАН  
117915 Москва, Ленинский проспект, 31*

Поступила в редакцию 20.02.2004 г.

С помощью атомно-силовой микроскопии исследованы особенности адгезии вируса табачной мозаики к слюде и графиту, в частности взаимная ориентация вирусных частиц на подложке и возможное ее влияние на вирус. Рассмотрены разные варианты химической модификации поверхности слюды для усиления адгезии вирусных частиц.

### ВВЕДЕНИЕ

Техника атомно-силовой микроскопии (АСМ), появившаяся в 1986 г., дала новые возможности для изучения биологических объектов, в частности вирусов. Она основана на сканировании поверхности образца острой иглой-зондом, закрепленной на упругой пластине, отклонение которой, вызванное взаимодействием с поверхностью, детектируется высокопрецизионным оптическим методом [1]. Передвижение зонда относительно поверхности образца осуществляет пьезосканер. Образцы, исследуемые с помощью АСМ, не требуют контрастирования атомами тяжелых металлов, как для электронной микроскопии; кроме того, сканирование можно осуществлять в жидкости, что применительно к биологическим объектам означает возможность их изучения в нативных условиях.

Вирус табачной мозаики (ВТМ) – классический объект вирусологии, выделение которого в 1898 г. положило начало развитию этой науки. Вирус представляет собой “палочки” диаметром 18 нм и длиной 300 нм (рис. 1), состоящие из белка и рибонуклеиновой кислоты (РНК) [2]. Современная вирусология обязана этому вирусу не только своим рождением, но и основными концепциями, складывавшимися на протяжении всего 20 века и до настоящего времени [3, 4], поэтому его дальнейшее изучение, особенно с помощью новых методов, актуально и по сей день.

ВТМ неоднократно исследовали с помощью атомно-силовой микроскопии [5–8]. Высокая ад-

сорбционная активность вирусных частиц по отношению к поверхности высокоориентированного пиролитического графита (ВОПГ) по сравнению с поверхностью слюды была отмечена ранее [5] и объяснена гидрофобным взаимодействием частиц с подложкой. В этой работе после обработки вирионов ВТМ диметилсульфоксидом (ДМСО) или мочевиной наблюдали “раздевание” вирусной частицы и выход из нее молекулы РНК. АСМ позволяет наблюдать последовательные стадии разборки других вирусов, что было показано на примере Х-вируса картофеля [9]. Следует специально отметить, что краеугольным в большинстве подобных исследований был вопрос, выбора подложки и способа закрепления на ней вируса.

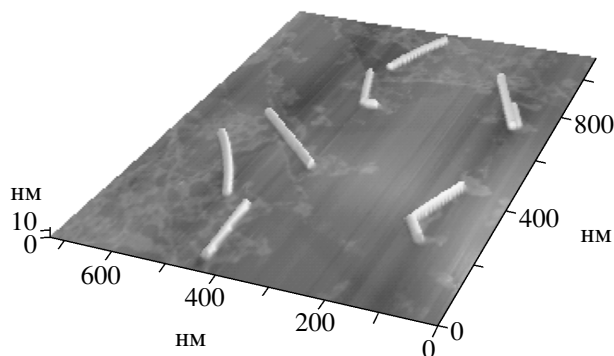
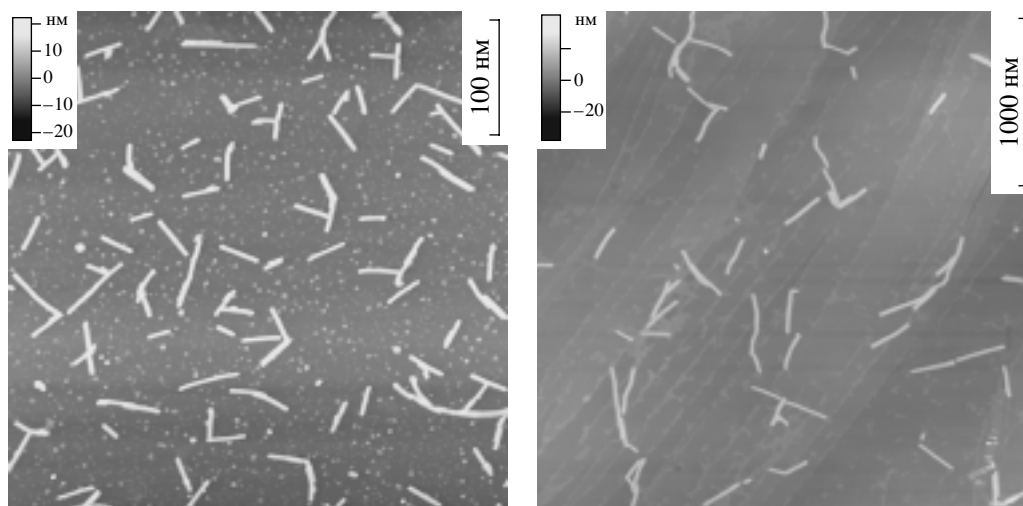


Рис. 1. Трехмерное изображение ВТМ, полученное с помощью АСМ.



**Рис. 2.** Полученные на воздухе АСМ-изображения частиц ВТМ, адсорбированных на: а – слюде (размер кадра  $4.23 \times 4.23$  мкм), б – графите (размер кадра  $2.95 \times 2.95$  мкм).

Целями настоящей работы были сравнительное изучение адгезии частиц ВТМ к подложкам из слюды и графита с помощью АСМ как на воздухе, так и в жидкости, выяснение степени воздействия зонда на образец, а также исследование возможности модификации поверхности слюды для закрепления на ней вирусов.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### *Атомно-силовая микроскопия*

Все измерения проводили на атомно-силовом микроскопе Nanoscope IIIa (Digital Instruments, USA) в режиме прерывистого контакта. Для измерений на воздухе использовали коммерческие кантилеверы из кремния с номинальной жесткостью 42 Н/м. Резонансная частота сканирования лежала в диапазоне 280–310 кГц. Измерения в жидкости проводили с использованием жидкостной ячейки (Digital Instruments, USA) для режима прерывистого контакта, применяя коммерческие кантилеверы из нитрида кремния, при частоте сканирования 8–10 кГц. Для обработки изображений использовали программу ФемтоСкан Онлайн [10].

### *Вирус табачной мозаики*

Вирус был размножен на *Tobacco nicotiana*. Для инфекции табака инокулюм вируса втирали в листья вместе с корундом. Из зараженных листьев вирус выделяли путем дифференциального центрифугирования [11]. Вирус дополнительно очищали центрифугированием в предварительно сформированном градиенте плотности водного раствора хлористого цезия на центрифуге Beckman L8 в роторе SW-41 при скорости 35000 об/мин в течение

3-х часов при температуре 4°C. Препарат ВТМ с концентрацией 65 мг/мл в 5мМ буфере Трис-НС1, содержащем, 50% глицерина (рН 7.8) хранили при –20°C.

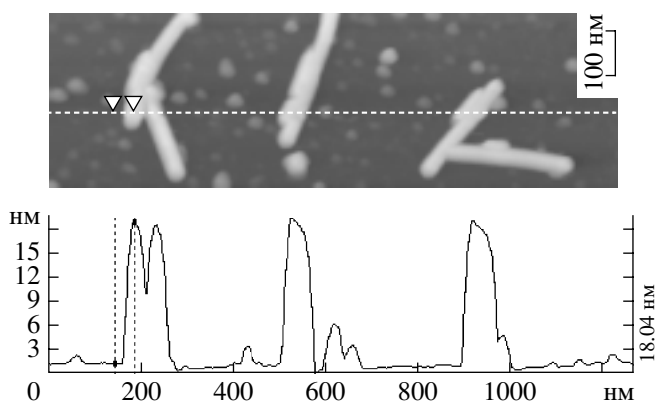
### *Приготовление образцов вируса для АСМ-анализа*

Перед нанесением на подложки аликвоту дисперсии вируса центрифугировали при 13000 об/мин на центрифуге Eppendorf 5415 С, разводили фосфатным буфером (5 мМ фосфата натрия, 150 мМ NaCl, рН 7.3,) до концентрации 1.3 мг/мл (в случае слюды) или до 0.325 мг/мл (в случае графита). 5 мкл полученных таким образом коллоидных растворов наносили на свежий скол слюды или ВОПГ и выдерживали во влажной камере в течение 30 мин на слюде или 15 мин – на графите. Подложки с сорбированным вирусом промывали тридистиллированной водой (2–3 раза) и высушивали в вакуум-эксикаторе.

Для наблюдения вируса в жидкостной ячейке АСМ использовали его дисперсию в фосфатном буфере с концентрацией 0.065 мг/мл.

Средние значения высоты частиц ВТМ (нм), адсорбированных на слюде и графите, вычисленные из изображений, которые получены с помощью АСМ на воздухе и в жидкости

Подложка	Среда	
	слюда	графит
Воздух	$18.5 \pm 0.9$	$18.8 \pm 0.9$
Жидкость	$17.6 \pm 0.9$	$17.5 \pm 0.9$



**Рис. 3.** Фрагмент АСМ-изображения ВТМ на слюде и сечение, иллюстрирующие возможность использования этого вируса в качестве эталона для калибровки пьезосканера в вертикальном направлении.

*Модификация поверхности слюды*

10–15 мкл неразбавленных изобутанола, триэтиламина, диэтилтриамина или 1% водного раствора бромида цетилтриметиламмония бромистого (**ЦТАБ**) наносили на слюду и выдерживали в течение 15 мин., затем промывали 2 раза водой.

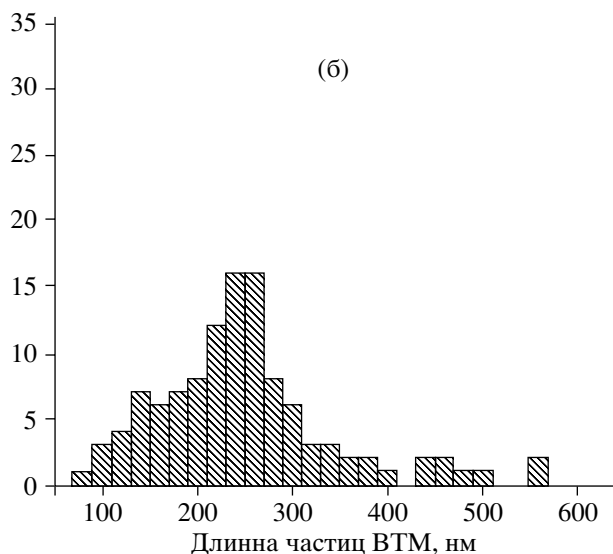
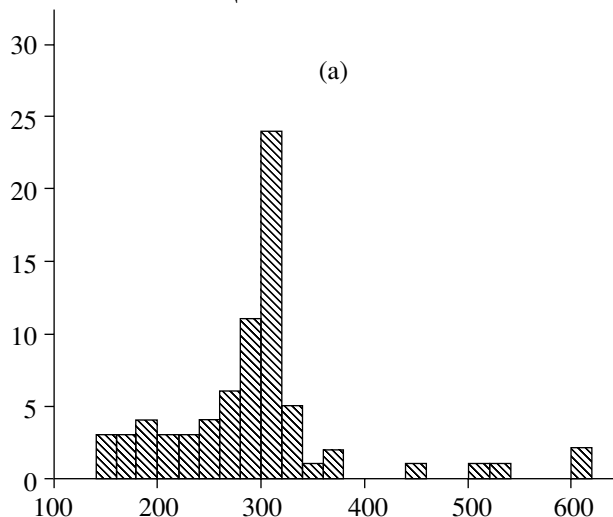
**РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ**

В работе с помощью АСМ исследовали вирусные частицы, нанесенные на два типа подложек – слюду и высокоориентированный пиролитический графит. Количество частиц, осажденных на скол ВОПГ из дисперсии с концентрацией 0.065 мг/мл, составило около 200 мкм<sup>-2</sup>, тогда как при нанесении на скол слюды из дисперсии, в 20 раз более концентрированной, это число составило всего 3–6 мкм<sup>-2</sup>.

Использование контактного режима сканирования, при котором упругая пластина с зондом (кантилевер) движется вдоль поверхности образца, находясь с ним в “физическом контакте”, лежит в основе распространенной в атомно-силовой микроскопии методики измерения упругости или модуля Юнга исследуемого объекта, в т.ч. и вирусных частиц (см., например, [12]): при увеличении силы контакта зонда с поверхностью уменьшается высота вирусной частицы на получаемом изображении. Минимизация эффективного воздействия кантилевера на объект до нуля бывает достаточно проблематичной из-за наличия капиллярных сил. Поэтому на изображениях, регистрируемых в контактном режиме, высоты мягких объектов, таких как вирусная частица, часто бывают заниженными. Принимая это во внимание, мы проводили измерения в режиме прерывистого контакта, при котором наличие капиллярных сил не играет существенной роли.

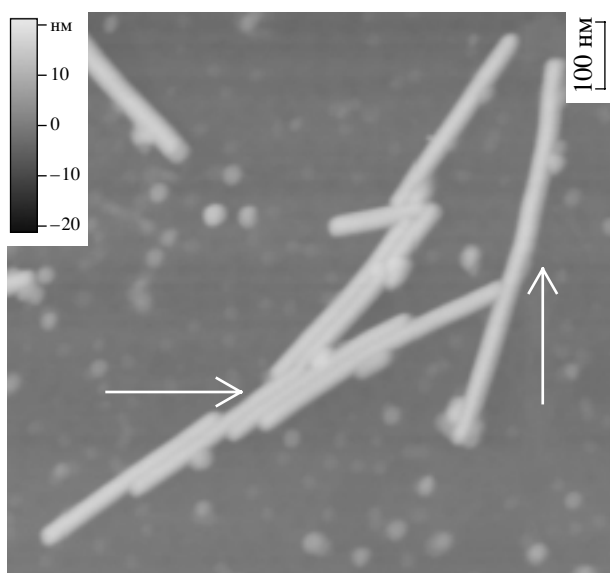
АСМ-изображения вируса табачной мозаики, осажденного на слюду и графит, полученные на

Количество частиц ВТМ



**Рис. 4.** Гистограмма распределения по длинам частиц ВТМ, адсорбированных на слюде (а) и графите (б).

воздухе в режиме прерывистого контакта, представлены на рис. 2. Высота вирусной частицы, вычисленная на основе полученных изображений, оказалась равной  $18.5 \pm 0.9$  и  $18.8 \pm 0.9$  нм для слюды и графита соответственно, что в пределах погрешности хорошо согласуется со значением диаметра частицы ВТМ, определенным другими методами. Средние значения высоты частиц ВТМ, осажденных на обе подложки, полученные при измерениях на воздухе и в жидкости (в буферном растворе), приведены в таблице. Вирус табачной мозаики, нанесенный на слюду, может использоваться как эталон для калибровки пьезосканера микроскопа в вертикальном направлении, поскольку дает стабильные значения высоты (см. рис. 3) (основная часть погрешности значений высоты связана с неидеальностью обратной связи,

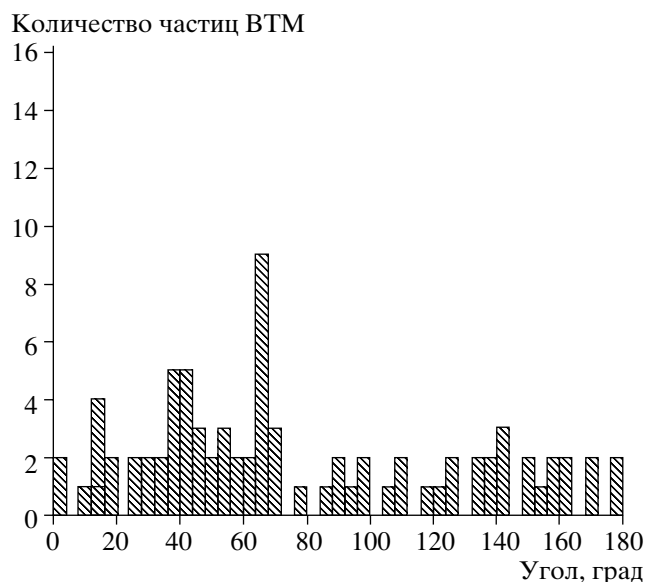


**Рис. 5.** АСМ-изображение частиц ВТМ на слюде, иллюстрирующее агрегацию частиц “бок в бок” (горизонтальная стрелка) и их стыковку “торец в торец” (вертикальная стрелка).

гистерезисом и крипом пьезокерамики, наличием в микроскопе температурного дрейфа и шумов).

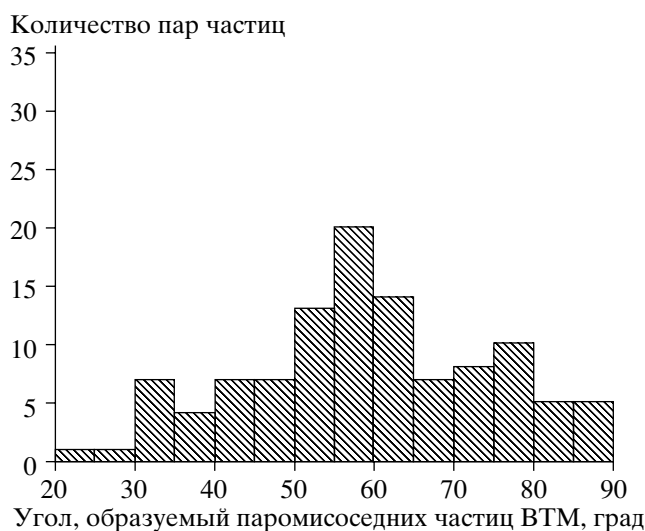
На рис. 4 показаны распределения по длинам вирусных частиц для обеих исследованных подложек. Их анализ свидетельствует о заметном отклонении от нормы в длинах частиц ВТМ, адсорбированных на подложке из графита: пик распределения приходится на значение, равное 250 нм, тогда как длина вириона ВТМ составляет 300 нм (что и получается для вирусов на слюде). Причина такой разницы в длинах нам окончательно не ясна; возможно, она связана с влиянием графитовой подложки на частицы ВТМ, которое приводит либо к частичному разрушению белковой оболочки вируса, либо к механической деформации (сжатию) вируса, адсорбированного на подложке. Частичное разрушение палочковидных вирионов на гидрофобных поверхностях наблюдали в работе [8]. Наличие в распределениях частиц ВТМ, длина которых приблизительно в два раза больше значения, приходящегося на максимум, свидетельствует о способности вирионов состыковываться “торец в торец”. При повышении концентрации препарата ВТМ наряду со стыковкой “торец в торец” наблюдается также агрегация вирусных частиц “бок в бок” (рис. 5), причем в таком взаимодействии могут участвовать до десятка частиц. Наличие подобных агрегатов в виде островков на подложке дает основание предположить о кооперативном механизме такого связывания вирусных частиц между собой.

Еще одно различие при адсорбции ВТМ на слюде и на графите состоит в ориентации отдель-

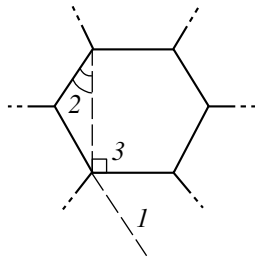


**Рис. 6.** Гистограмма распределения по углам частиц ВТМ, адсорбированных на подложке из графита. Угол отсчитывался от горизонтального направления против часовой стрелки.

ных вирусных частиц на этих подложках: в ориентации частиц ВТМ на ВОПГ есть выделенное направление, совпадающее с направлением ступенек, всегда присутствующих на графите вследствие наличия дефектов в его кристаллической решетке. На рис. 6 представлена гистограмма распределения адсорбированных на ВОПГ частиц по углам, отсчитываемым от горизонтального направления против часовой стрелки. Максимум в районе  $63^\circ$  как раз соответствует направлению ступенек.



**Рис. 7.** Гистограмма распределения пар соседних частиц ВТМ, адсорбированных на графите, по образуемым ими углам.

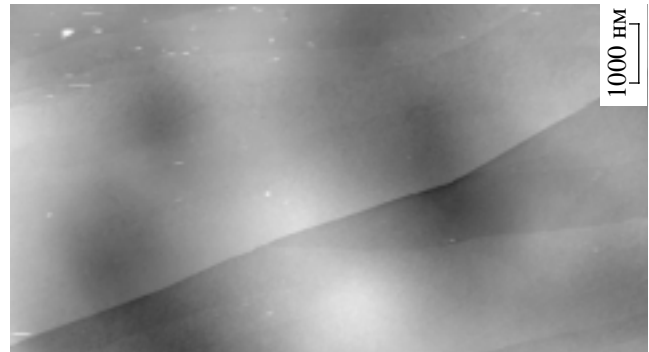
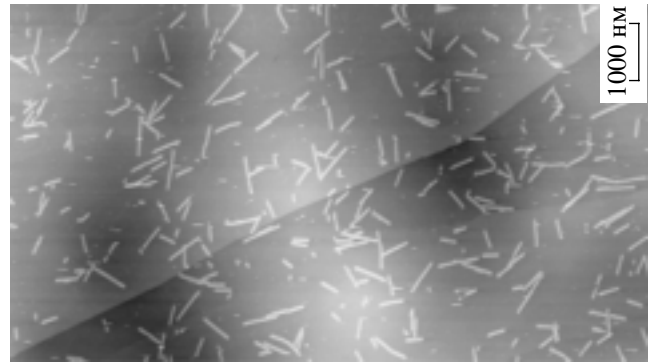


**Рис. 8.** Схема, иллюстрирующая фрагмент гексагональной кристаллической решетки высокоориентированного пиролитического графита. Углы 1, 2 и 3 равны соответственно 60°, 30° и 90°.

Необходимо отметить, что графит не является идеальным кристаллом, а состоит из кристаллитов – областей упорядоченности углеродных атомов, размеры которых зависят от вида графита. Поэтому для описания взаимного расположения частиц ВТМ на графите измеряли острые углы, образованные парами только соседних вирионов, адсорбированных на одном кристаллите. Полученная гистограмма для ВТМ на графите характеризуется хорошо выраженным максимумом при 55°, и менее выраженными максимумами при 35° и 77° (см. рис. 7). Поскольку кристаллическая решетка графита имеет гексагональную структуру, то в пределах погрешности этим можно объяснить полученные значения максимумов: вирусы адсорбируются вдоль направлений кристалла, показанных на рис. 8, где углы 1 и 2 составляют 60° и 30° соответственно. Третий максимум получился очень уширенным, и мы считаем, что он соответствует углу в 90°, который обозначен на рис. 8 как 3. Интересно, что похожие результаты были получены при анализе ориентации молекул ДНК на графите в [13], где изгибы этих молекул составляли 30°, 60° и 90°.

Способность вирусных частиц в значительном количестве осаждаться на графите, отмеченная выше, не означает, однако, наличия сильного адгезионного взаимодействия между подложкой и ВТМ: при сканировании в жидкости даже в режиме прерывистого контакта, когда воздействие зонда на образец минимизировано, можно наблюдать, как резко уменьшается количество частиц ВТМ на двух последовательно полученных изображениях (рис. 9). Похожие результаты были получены и при сканировании в жидкости частиц ВТМ, адсорбированных на слюде, обработанной  $\gamma$ -аминопропилтриэтоксисилоном [14]. Таким образом, для эффективного исследования ВТМ в жидкости необходима предварительная модификация поверхности подложки с целью более прочного закрепления на ней вирусных частиц.

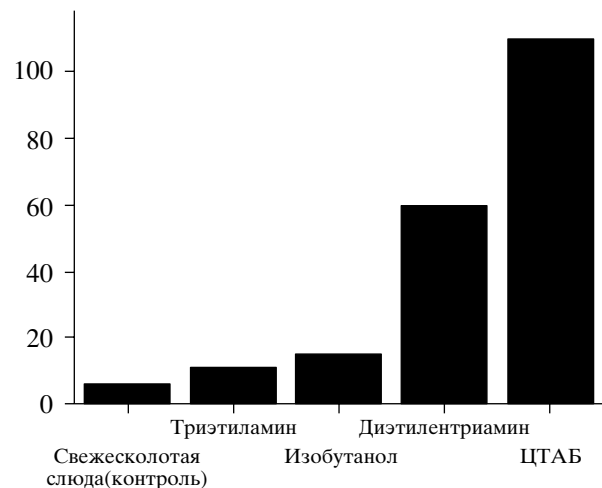
Как упоминалось выше, разница в величинах адсорбции на ВОПГ и слюде вирионов связана, скорее всего, с гидрофобным взаимодействием



**Рис. 9.** Последовательные изображения ВТМ на графите, полученные в жидкости. Размер кадров 10,7×5,9 мкм.

поверхности графита и частиц ВТМ. Таким образом, количество этих вирусов, адсорбированных на единице площади подложки, может служить своеобразным показателем гидрофобности ее поверхности.

Количество частиц ВТМ на 1 мкм<sup>2</sup>



**Рис. 10.** Гистограмма, показывающая количество вирусных частиц, адсорбированных на единице площади слюды, модифицированной различными химическими соединениями.

Чтобы повысить гидрофобность поверхности слюды, ее свойства были изменены путем модифицирования различными химическими соединениями (см. выше): изобутанолом, триэтиламинном, диэтилентриамином, бромидом цетилтриметиламмония. На рис. 10 приведена гистограмма, на которой показано количество частиц ВТМ, адсорбированных на слюде, поверхность которой была обработана каждым из указанных соединений. Наиболее эффективным модификатором оказался бромид цетилтриметиламмония, который повысил адсорбцию ВТМ к слюде более чем в 10 раз по сравнению с немодифицированной слюдой.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Вирус табачной мозаики может служить эталонным объектом для атомно-силовой микроскопии [15]. Гидрофобные поверхности лучше адсорбируют частицы ВТМ, при этом имеет место их частичное разрушение или деформация. Взаимная ориентация частиц ВТМ на графите коррелирует со структурой его кристаллической решеткой.

Проведенные исследования свидетельствуют о необходимости разработки методов фиксации частиц ВТМ на подложке для изучения с помощью АСМ в жидкой среде: немодифицированные подложки из слюды и графита не дают возможности получать воспроизводимые при многократном сканировании изображения даже в режиме прерывистого контакта.

Работа выполнена при поддержке Российской академии наук (Программа “Создание и изучение макромолекул и макромолекулярных структур новых поколений”, проект “Механика одиночных макромолекул и их комплексов на примере растительных и бактериальных вирусов”), Научной

программы НАТО (Проект № LST.CLG.980194 “Analytical Nanoscopy of Nucleic Acid Dynamics”) и ИНТАС (проект № 01-0045).

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Binnig G., Quate C., Gerber C.* // Phys. Rev. Lett. 1986. V. 56. № 9. P. 930.
2. The Universal Virus Database. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/Ictv/>
3. *Milner J. J.* // Trends in microbiology. 1998. V. 6. № 12. P. 466.
4. *Zaitlin M.* // Endeavour. 2002. V. 26. № 2. P. 76.
5. *Drygin Yu.F., Bordunova O.A., Gallyamov M.O., Yaminsky I.V.* // FEBS Lett. 1998. V. 425. P. 217.
6. *Maeda H.* // Langmuir 1997. V. 13. P. 4150.
7. *Falvo M.R., Washburn S., Superfine R. et al.* // Biophys. J. 1997. V. 72. № 3. P. 1396.
8. *Britt D.W., Buijs J., Hlady V.* // Thin Solid Films. 1998. V. 327–329. P. 824.
9. *Kiselyova O.I., Yaminsky I.V., Karpova O.V. et al.* // J. Mol. Biol. 2003. V. 332. P. 321.
10. *Филонов А.С., Гаврилко Д.Ю., Яминский И.В.* Программное обеспечение “ФемтоСкан” для обработки трехмерных изображений. М.: Центр перспективных технологий, 2001.
11. *Атабеков И.Г.* Практикум по общей вирусологии. М.: Изд-во МГУ, 1981.
12. *Kiselyova O.I., Nasikan N.S., Yaminsky I.V., Novikov V.K.* // Phys. Low-Dimen. Struct. 2001. V. 3/4. P. 167.
13. *Yamamoto I., Kanno T., Tanaka H., Kaway T.* // Jpn. J. Appl. Phys. 2003. V. 42. P. L559.
14. *Shlyakhtenko L.S., Gall A.A., Weimer J.J. et al.* // Biophys. J. 1999. V. 77. P. 568.
15. Эталонные и калибровочные решетки для атомно-силовой микроскопии. М.: Центр перспективных технологий: <http://www.nanoscopy.net>.