

Вивчення вірусу тютюнової мозаїки за допомогою атомно-силового мікроскопу

В. П. Поліщук, О. В. Ренгевич¹, Г. В. Бекетов¹, Т. П. Тивончук², А. Л. Бойко

Київський університет імені Тараса Шевченка
Вул. Володимирська, 64, Київ, 01033, Україна

¹ Інститут фізики напівпровідників НАН України
Просп. Науки, 45, Київ, 03041, Україна

² Інститут агроєкології та біотехнології УААН
Вул. Метрологічна, 12, Київ, 03143, Україна

У роботі представлено методичні підходи до використання атомно-силового мікроскопу для вивчення об'єктів вірусної природи та їхньої взаємодії зі специфічними імуноглобулінами (IgG). Застосування формвару для покриття сколів слюди збільшує адсорбцію віріонів, практично не впливаючи на рельєф поверхні. Зображення фазового зсуву взаємодії ВТМ з IgG, який пропорційний силі адгезії зонда до поверхні, дали можливість візуалізувати розподіл антитіл по поверхні вірусних часток. Метод є унікальним з точки зору вірусології, оскільки виключає фіксацію препарату, необхідну для досліджень у трансмісійному мікроскопі.

Вступ. Атомно-силовий мікроскоп (Atomic Force Microscope — AFM) останнім часом все більше використовується для вивчення будови різноманітних біологічних систем — від тканин та клітин до хромосом, мембран, окремих білкових молекул та нуклеїнових кислот. Інтерес до методу AFM викликаний тим, що він дозволяє досліджувати біологічні структури у будь-якому середовищі: у вакуумі, повітрі або рідині [1]. Здатність цього мікроскопу працювати у рідинах відкриває можливість вивчення біологічних процесів так, як вони відбуваються в природі, та моніторингу функціонально пов'язаних конформаційних змін [2]. Метод AFM був розроблений у 1986 р. [3] як подальший розвиток ідей, покладених в основу скануючої тунельної мікроскопії (СТМ).

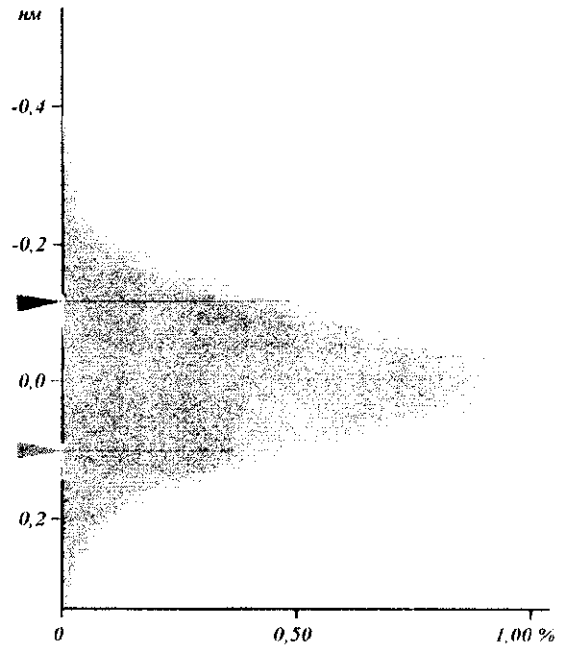
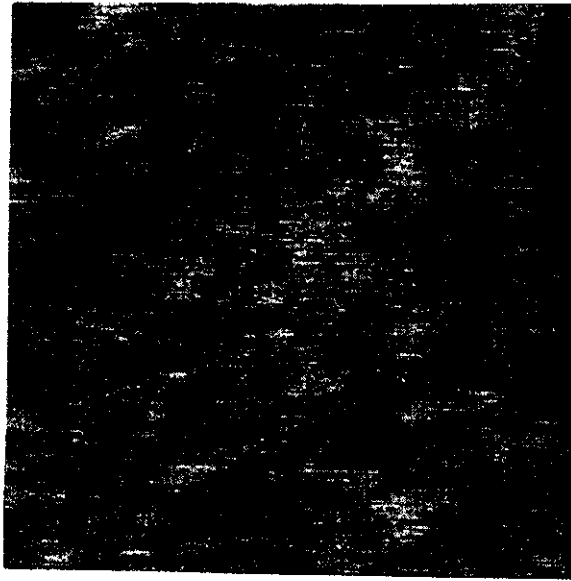
Формування зображення поверхні відбувається за допомогою механічного зонда з радіусом вістря порядку нанометрів, що забезпечує відповідну роздільну здатність методу та чітке зображення об'єкту. Сучасні атомно-силові мікроскопи дозволяють

досліджувати не лише топографію поверхні зразка, а й деякі фізичні властивості, такі як тертя, пружність, сили адгезії та еластичність у наномірній шкалі [4—6].

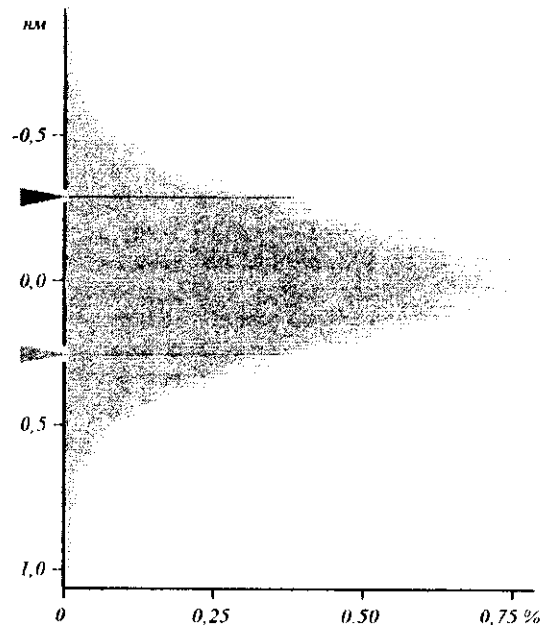
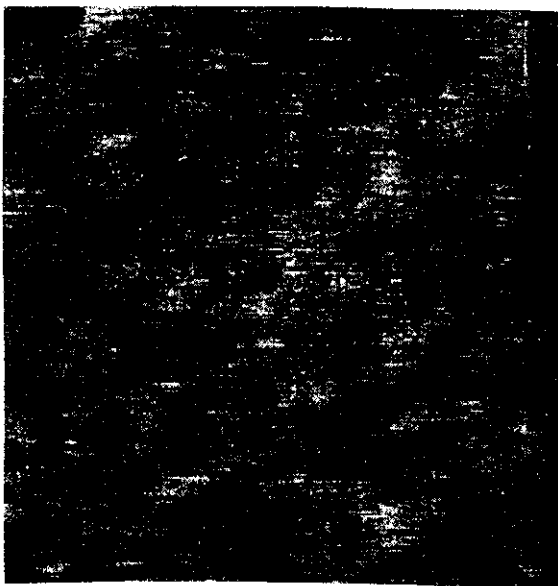
Існує також можливість вимірювання міжмолекулярних взаємодій на рівні піконьютонів у фізіологічних умовах. Результати AFM доповнюють такі традиційні методи дослідження біологічних об'єктів, як рентгеноструктурний аналіз, електронна мікроскопія та ядерний магнітний резонанс. Однак реалізація потенційних можливостей AFM у галузі біологічних досліджень ще потребує значних методичних зусиль для врахування специфіки біологічних об'єктів [7]. Зокрема, це стосується методів підготовки та фіксування зразків на поверхні субстрату для одержання зображень високої якості.

Найпоширенішим методом на сьогодні є іммобілізація біологічних об'єктів на свіжому сколі слюди, який має атомно гладку, слабонегативно заряджену та хімічно інертну поверхню [8].

У цьому випадку воду чи буферний розчин зразка наносять на свіжий скол слюди, потім обережно промивають водою чи буферним розчином для видалення часток, що не адсорбуються до підкладки.



a



b

Рис 1. Зображення поверхні, отримані за допомогою атомно-силового мікроскопу: *a* — поверхня сколу слюди; *b* — поверхня формвару

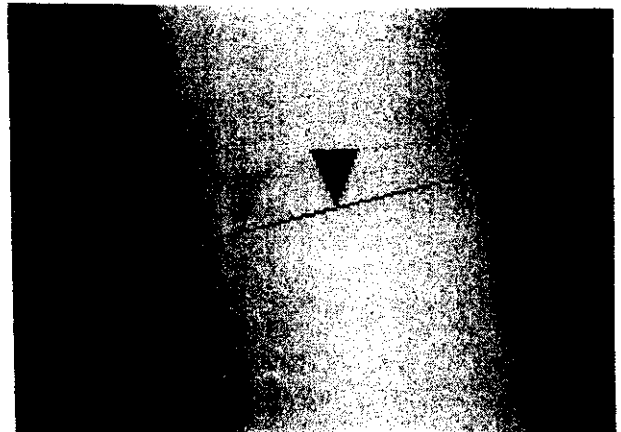
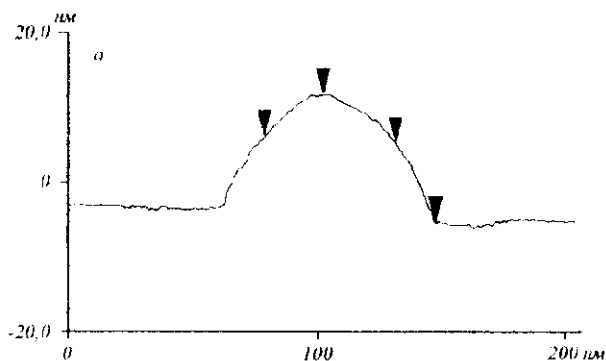


Рис 2. Зображення ВТМ, отримані за допомогою атомно-силового мікроскопу: *a* — вид зверху; *b* — поперечний переріз

Для зображення ДНК за допомогою цього мікроскопу розчин зразка у буфері наносили на слюду, потім промивали водою з наступною інкубацією у водному розчині ураніацетату, потім знову промивали водою та висушували на повітрі [9]. Для адсорбції пурпурової мембрани *Halobacterium salinarium* [10] використовували слюду, покриту полілізин-гідробромідом. Іноді, крім слюди, використовують інші субстрати. Наприклад, у роботі [11] іммобілізували гексагональні упаковки інтермедіального шару з оболонки клітини *Deinococcus radiodurans*, застосовуючи фотокрослінкер, що був ковалентно зв'язаний зі скляною поверхнею.

Для вимірювань специфічної взаємодії між комплементарними компонентами один із компонентів може бути нанесений на зонд AFM, при цьому вимірюють сили адгезії в піконьютонах між поверхнею модифікованого зонда і зразка (по величині цієї сили можна зробити висновок про специфічність взаємодії). Щоб дослідити це, Флорен та співавт. [12] застосували неспецифічну адсорбцію біотинільованого бичачого сироваткового альбуміну на поверхні зонда, виготовленого з нітриду кремнію, для вимірювання специфічної взаємодії між біотином і авідином та визначали силу взаємодії між індивідуальними молекулами.

Роздільна здатність мікроскопу по висоті становить 3—10 Å, по поверхні — залежить від зондів і становить від 0,3 до 5 нм.

Представлена робота присвячена відпрацюванню методу іммобілізації біологічних об'єктів на свіжих сколах слюди і виконана на моделях вірусу

тютюнової мозаїки (ВТМ) та імуноглобулінів класу G (IgG), специфічних до ВТМ.

Матеріали та методи. Дослідження виконували на атомно-силовому мікроскопі (Nanoscope D 3000, Digital Instruments, USA). В досліджах використовували ВТМ з концентрацією в бідистиляті 0,8 мг/мл. Краплю розчину (25 мкл) наносили на свіжий скол слюди, через 20—30 хв препарат промивали водою та поступово висушували на повітрі в закритій чашці Петрі. В іншій модифікації препарат наносили на слюду, витриману протягом 10 с у 0,2 %-му розчині формвару (полівінілформальдегіду) в хлороформі.

При вивченні реакції антиген—антитіло (Аг—Ат) як Аг використовували суспензію ВТМ, як Ат — були взяті мишачі моноклональні Ат класу G (IgG), специфічні до звичайного штаму ВТМ (Інститут діагностики патогенів, Німеччина) з робочим титром, що в 10 разів перевищував такий для імуноферментного аналізу. Термін контакту становив 24 год при кімнатній температурі, далі препарат промивали дистильованою водою і поступово висушували на повітрі в закритій чашці Петрі.

Результати та обговорення. Однією з проблем дослідження зразків за допомогою AFM є нанесення препарату на ідеально рівну поверхню та його закріплення на ній. У нашому випадку для покращання адсорбції по аналогії з приготуванням препаратів для електронної мікроскопії ми використовували формвар, який наносили на слюду. Для контролю поверхні були зняті показники рельєфу чистої слюди та слюди, обробленої формваром, що

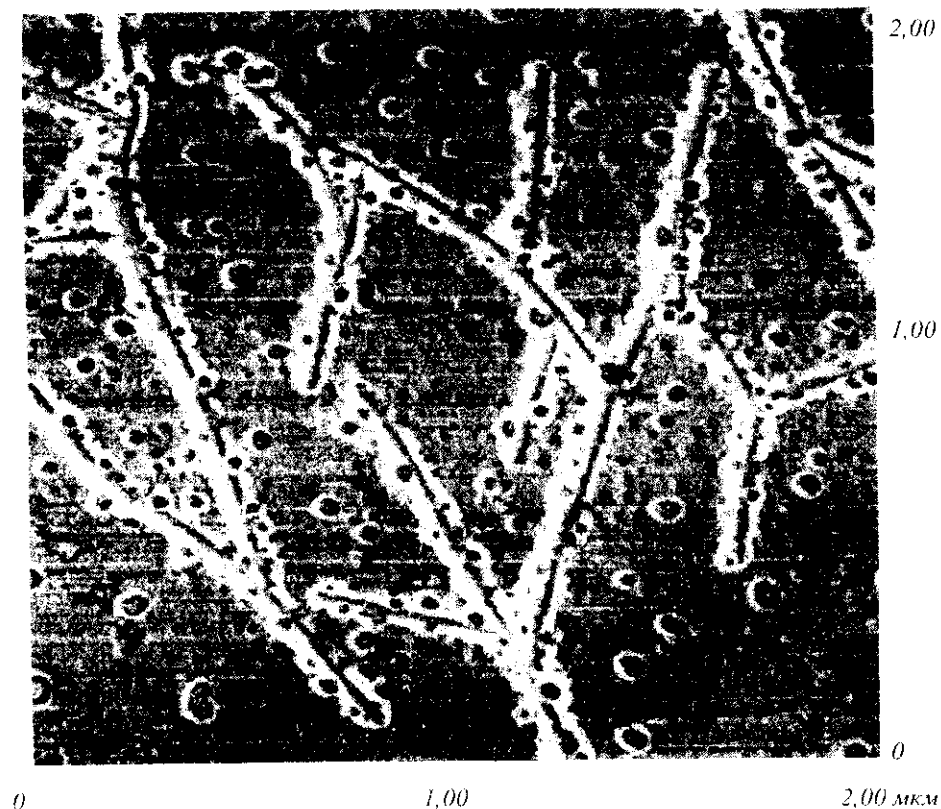


Рис 3. Взаємодія ВТМ з антитілами. Зображення фазового зсуву, отримані за допомогою атомно-силового мікроскопу. Зсув фаз змінюється від 0 (чорний) до 100 (білий колір)

становили 0,087 та 0,239 нм відповідно (рис. 1). Порівнюючи адсорбуючу здатність для ВТМ цих поверхонь, встановлено, що у випадку формварової обробки поверхні слюди відбувається ефективно прикріплення ВТМ, оскільки необроблена слюда має погану адсорбуючу здатність для білкових структур і не утримує на своїй поверхні вірусних часток, тому для подальшого вивчення взаємодії Аг—Ат використовували модифіковану формваром слюду, що загально прийнято для електронної мікроскопії.

Розміри ВТМ, отримані за допомогою AFM, по висоті становили 17,2 нм, а по горизонталі — 45 нм (рис. 2). Збільшення горизонтальної проекції діаметру ВТМ обумовлено формою та радіусом кривизни зонда [12].

При дослідженні взаємодії Аг—Ат умови контакту були підібрані по аналогії з умовами в імуноферментному аналізі — 24 год при кімнатній температурі. Зображення фазового зсуву взаємодії ВТМ з IgG, який пропорційний силі адгезії зонда до поверхні, дали можливість візуалізувати розподіл Ат по поверхні вірусних часток (рис. 3). Після взаємодії з Ат вірусні частки не прилягають

одна до одної боковими поверхнями. Вони лежать або окремо, або агрегують кінець-у-кінець. Крім того, Ат нерівномірно розподілялися по поверхні вірусних часток, що може свідчити про невідповідність концентрацій реагуючих компонентів.

Дослідження за допомогою AFM, на нашу думку, в майбутньому можуть бути використані як методологічна основа для нового покоління діагностиків. Крім того, AFM можна застосовувати для вивчення збірки вірусів в умовах *in vitro*, орієнтації віріонів під дією фізико-хімічних факторів, дослідження процесу кристалізації вірусів, комплементарності біологічних компонентів та інше. Метод є унікальним з точки зору вірусології, оскільки виключає фіксацію препарату, необхідну для досліджень в трансмісійному мікроскопі.

В. П. Подицук, О. В. Ренгевич, Г. В. Бекетов, Т. П. Тьвовицук, А. Л. Бойко

Изучение вируса табачной мозаики при помощи атомно-силового микроскопа

Резюме

В работе представлены методические подходы к использованию атомно-силового микроскопа для изучения объектов ви-

3. *Binning G., Quate C. F., Gerber C.* Atomic force microscope // *Phys. Rev. Lett.*—1986.—56.—P. 930.
4. *Kasas S., Ikaï A.* A method for anchoring round shaped cells for atomic force microscope imaging // *Biophys. J.*—1995.—68.—P. 1678—1680.
5. *Radmacher M., Cleveland J. P., Fritz M., Hansma H. G., Hansma P. K.* Mapping interaction forces with the atomic force microscope // *Biophys. J.*—1994.—66.—P. 2159—2165.
6. *Radmacher M., Fritz M., Cleveland J. P., Walters D. A., Hansma P. K.* Imaging adhesion forces and elasticity of lysozyme adsorbed on mica with the atomic force microscope // *Langmuir.*—1994.—10.—P. 3809—3814.
7. *Nagao E., Dvorak J. A.* Developing the atomic force microscope for studies of living cells // *Int. Lab.*—1999.—N 1.—P. 21—23.
8. *Thomson N. H., Fritz M., Radmacher M., Cleveland J. P., Schmidt Ch. F., Hansma P. K.* Protein tracking and detection of protein motion using atomic force microscopy // *Biophys. J.*—1996.—70.—P. 2421—2431.
9. *Hansma H. G., Laney D. E., Bezanilla M., Sinsheimer R. L., Hansma P. K.* Applications for atomic force microscopy of DNA // *Biophys. J.*—1995.—68.—P. 1672—1677.
10. *Muller D. J., Schabert F. A., Buldt G., Engel A.* Imaging purple membranes in aqueous solutions at sub-nanometer resolution by atomic force microscopy // *Biophys. J.*—1995.—68.—P. 1681—1686.
11. *Karrasch S., Hegerl R., Hoh J. H., Baumeister W., Engel A.* Atomic force microscopy produces faithful high-resolution images of protein surfaces in an aqueous environment // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*—1994.—91.—P. 836—838.
12. *Florin E., Moy V. T., Gaub H. E.* Adhesion forces between individual ligand-receptor pairs // *Science.*—1994.—264.—P. 415—417.

УДК 578.6

Надійшла до редакції 30.06.99