

Исследование бактериофага ФКЗ методом АСМ и СТМ.

Д.В.Клинов, Н.Мацко, В.В.Демин, А.А.Манькин

Институт биоорганической химии РАН

С момента открытия бактериофагов в 1915-1917 гг. они по сей день оказываются в центре внимания биологов. Эта группа вирусов сыграла выдающуюся роль в развитии биологической науки, став классическим объектом молекулярной биологии и генетики. С помощью этих уникальных объектов были решены многие фундаментальные проблемы, такие как доказательство генетической роли ДНК, триплетность генетического кода, ряд вопросов, связанных с механизмами переключения генов, и различных генетических рекомбинаций [1,2]. Наконец, открытие ферментов рестрикции, приведшее к созданию в 70-х годах генной инженерии, явилось результатом исследования роли метилирования ДНК в размножении бактериофагов [3].

Однако, в лаборатории молекулярных биологов попали лишь немногие бактериофаги, преимущественно *Escherichia coli*. Большинство выделяемых фагов характеризуют по наиболее легко определяемым свойствам: морфологии частицы, типу нуклеиновых кислот, особенностям цикла развития. На этой основе построена современная классификация вирусов и, в частности, бактериофагов [4].

Более тонкое изучение особенностей организации фагов требует больших усилий и затрат, и поэтому на практике часто приходится довольствоваться сравнением с "популярными" моделями, такими как Т4, λ , Mu, M13 и другими фагами, хотя такое сравнение в большинстве случаев не вполне правомерно. Кроме того, в ряду обычных моделей отсутствуют фаги многих групп бактерий.

Целью данной работы является исследование бактериофага фкз *Pseudomonas aeruginosa* методами сканирующей зондовой микроскопии, а именно АСМ (атомной силовой микроскопии).

АСМ представляет собой оригинальную конструкцию сверхчувствительного измерителя профиля поверхности и позволяет измерять не только топографию поверхности, но и локальные силы трения, величину адгезии, упругие и вязкие свойства поверхности с субнанометровым пространственным разрешением [4]. Кроме этого, по сравнению с классической электронной микроскопией - самым популярным на сегодняшний день методом изучения структурно-морфологических свойств вирусов, АСМ имеет ряд существенных преимуществ: а) значительно упрощается процедура приготовления образцов и обработка полученной информации; б) АСМ позволяет получать уникальную информацию как о высоте исследуемого объекта (в ЭМ этот

параметр вычисляется лишь косвенными методами), так и о ряде его локальных поверхностных свойств;в) АСМ дает возможность изучать биообъекты в естественном водном окружении, близком к *in vivo*; г) сам прибор в силу своей простоты и дешевизны (по сравнению с ЭМ) может быть установлен в любой микробиологической лаборатории.

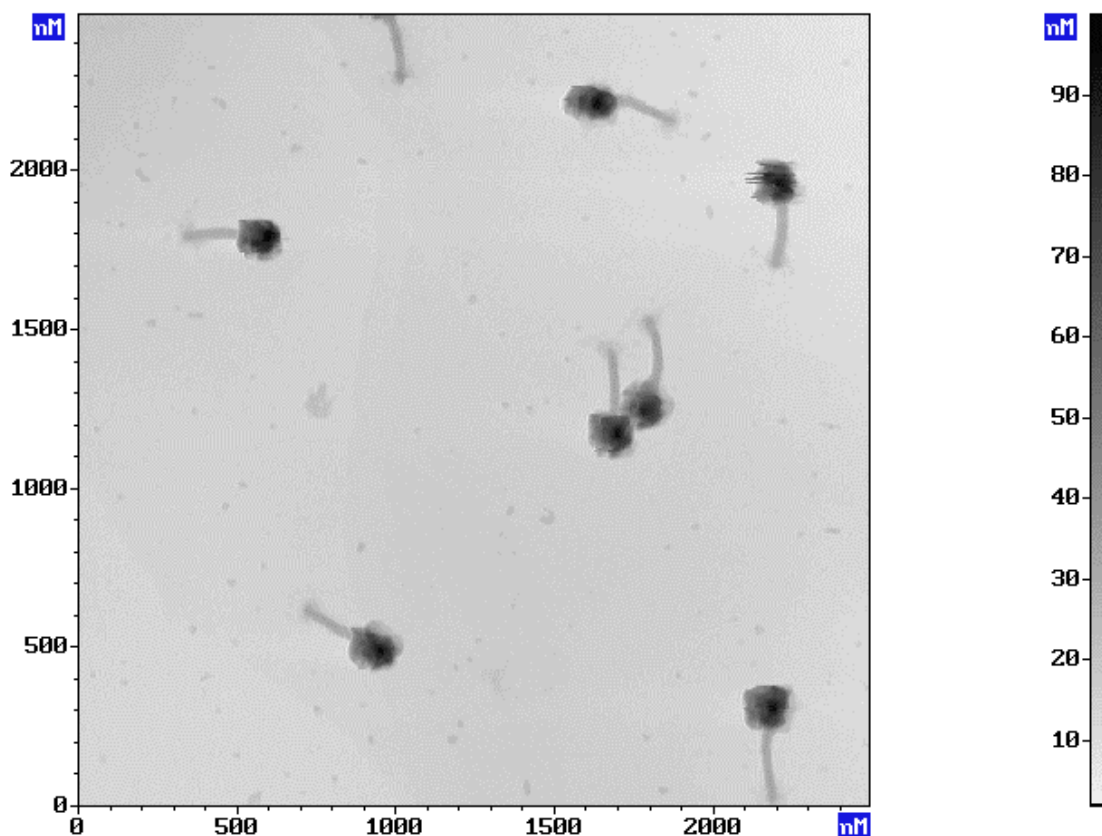


Рис.1. Бактериофаг ϕk_z , полученный методом АСМ.

На рис.1а. представлено типичное изображение бактериофага ϕk_z - фага *Pseudomonas aeruginosa*, полученное методом атомной-силовой микроскопии. Особый интерес, с нашей точки зрения, представляет своеобразная организация вирусной частицы ϕk_z . Этот фаг имеет сократимый отросток и изометричную головку и относится, таким образом, к семейству *Myoviridae* [6]. Размер частицы приблизительно в 1,5 раза больше, чем у T4, и составляет по данным электронной микроскопии: диаметр головки - 120 нм, длина несокращенного чехла - 180 нм, а его толщина - 20 нм [7]. При исследовании размеров структурных частей фага в АСМ были получены интересные результаты. Во-первых: оказалось, что наблюдаемая высота объекта в значительной степени зависит от материала подложки. Так, на слюде с напыленной тонкой пленкой углерода, высота головки - (92 ± 1.6) , высота несокращенного чехла - (21 ± 2.8) , а на пиролитическом графите (ПГ), на свежесколотую поверхность которой был так же напылен углерод - (111 ± 2.6) и (23 ± 2.6) соответственно. Ширина головки на слюде составила (183 ± 10) , а на пиролитическом графите - (190 ± 8) . Если учесть уширение изображения объектов в АСМ, которое

проявляется как следствие влияния кривизны кантилевера, то оказывается, что ширины структурных частей бактериофага хорошо согласуются с данными электронной микроскопии, в то время как высоты несколько отличны. То, что высоты объекта более адекватны при нанесении последнего на пиролитический графит, может свидетельствовать в пользу предпочтения ПГ другим подложкам в виду меньшего воздействия на объект исследования, и как следствие этого, получения более правдоподобных результатов.

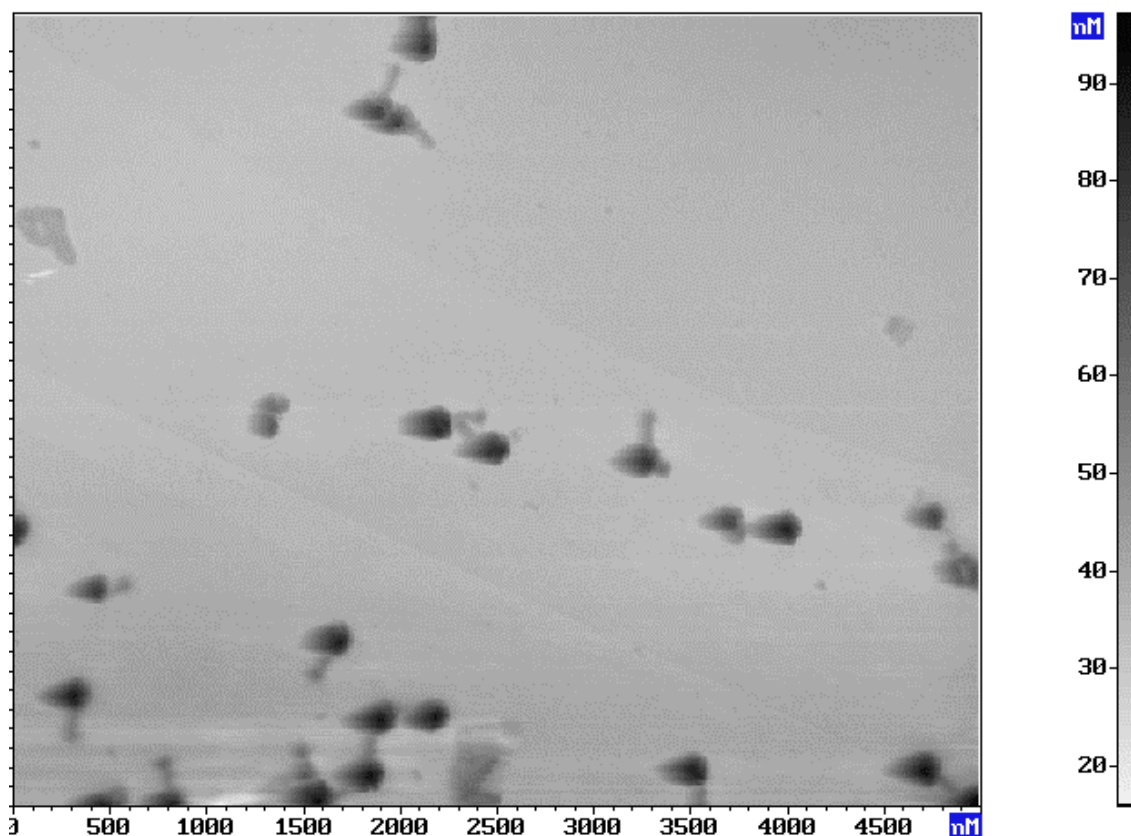


Рис. 2. Бактериофаг фкz, полученный методом СТМ.

На рис.2. представлено изображение бактериофага фкz, полученное методом силовой туннельной микроскопии. На адсорбированный на поверхности ПГ фаг был напылен углерод.

Одним из существенных отличий бактериофага фкz от известных на сегодняшний день вирусов этой группы является наличие внутри капсида цилиндрического белкового тела, сонаправленного с осью отростка. По данным ЭМ внутреннее тело (ВТ) появляется в пустых головках еще до их заполнения ДНК, но, при этом не является стабильным и подвергается распаду почти сразу после разрыва белковой оболочки капсида,

разламываясь в поперечном направлении, что позволяет предположить, что структура ВТ представляет собой спираль или стопку дисков [8].

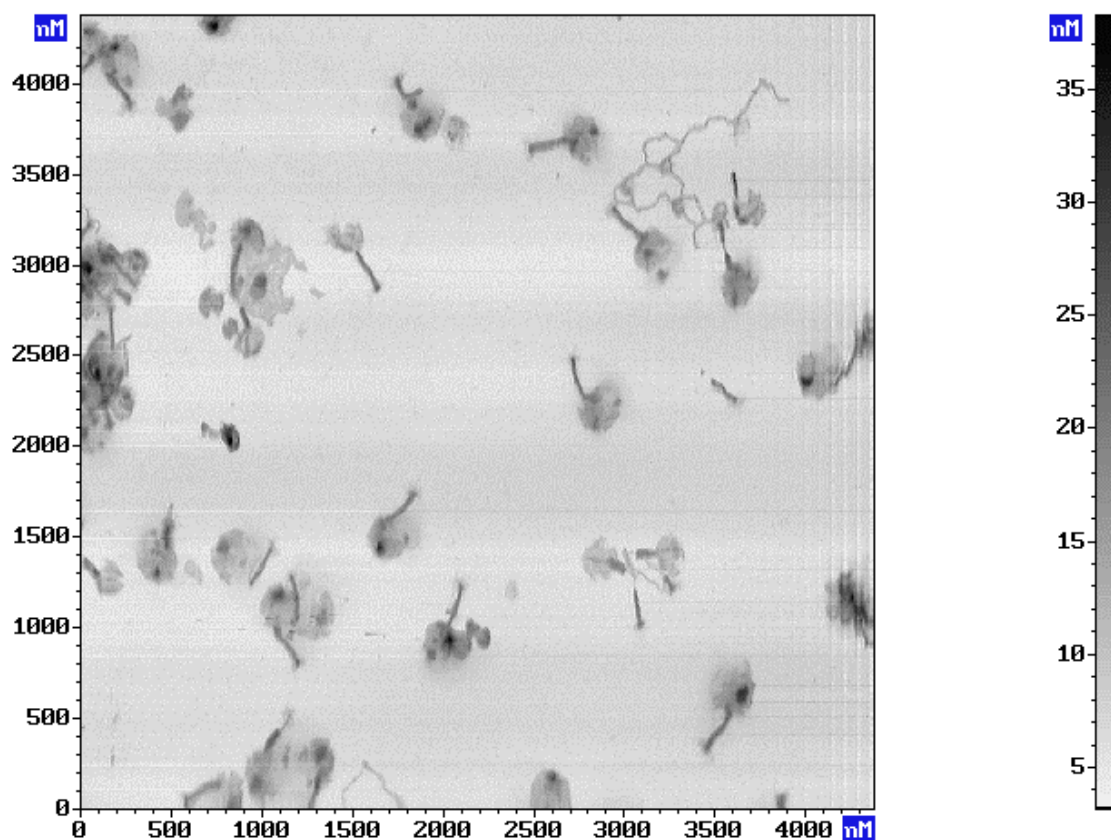


Рис.3. Разрушенные частицы бактериофага фкz.

На рис.3 представлены частично разрушенные частицы бактериофага. Высоты фаговых капсидов заметно меньше, чем у целых частиц, из чего можно сделать вывод, что данные частицы лишены ДНК. Чем обусловлена деградация вирусных частиц при нанесении их на подложку, сказать пока сложно. Возможно, при промывании образца водой уже адсорбированные на поверхности подложки частицы подвергаются осмотическому шоку. Как хорошо видно, внутри почти каждой разрушенной головки просматривается частично деградировавшее внутреннее тело. Поскольку ВТ действительно является очень нестабильным белковым комплексом, что хорошо согласуется с данными В. Н. Крылова с соавторами, можно сделать предположение, что морфологическая роль ВТ носит исключительно структурный характер и служит компактизирующим и упорядочивающим укладку геномной ДНК фактором. Возможно, структура ВТ стабилизируется уложенной вокруг него ДНК, чем и можно объяснить крайнюю нестабильность этого белкового комплекса при нарушении нативной укладки ДНК, как это происходит при частичной или полной деградации головки и выхода геномной ДНК в

раствор. Более подробное изучение структуры ВТ и организации геномной ДНК методами сканирующей зондовой микроскопии, возможно, привел к разрешению одной из фундаментальных на сегодняшний день задач, стоящей перед молекулярными биологами, а именно проблемы упаковки ДНК вирусов.

Список литературы

1. T. F. Anderson Annu. Rev. Genet. 15, 405-417, 1981
2. H.-W. Ackermann, Frequency of Morphological Phage Descriptions. Archives of Virology. 124, 201-209, 1992
3. В. Н. Крылов. Современные проблемы бактериофагии. Успехи микробиологии. Вып. 20М, 122-153. 1986
4. H.-W. Ackermann, M.S. Du Bow Viruses of Prokaryotes, 1987
5. И. В. Яминский. Сканирующая зондовая микроскопия биополимеров. М. Научный мир, 16-17, 1997
6. В. Н. Крылов,, А. Б. Джусупова, В. З. Ахвердян, Е. А. Хренова. Изучение морфологии частиц и структуры генов бактериофагов *Pseudomonas aeruginosa* с целью их классификации. Генетика. Т 25.N.9.C. 1559-1570. 1989.
7. В. Н. Крылов, Т. А. Смирнова. Вопросы вирусологии, 5, 568-571, 1978
8. Т. А. Смирнова, И. Б. Миненкова, Е. А. Хренова, Т. Г. Плотникова, В. Н. Крылов. Электронно-микроскопическое исследование внутриклеточного развития бактериофага фкз *Pseudomonas aeruginosa*. Журнал микробиологии, эпидемиологии, иммунобиологии. N.5.C. 25-28. 1983