

УДК 578.086:53.087.22

ВИЗУАЛИЗАЦИЯ РНК И РИБОНУКЛЕОПРОТЕИДОВ ВИРУСА ТАБАЧНОЙ МОЗАИКИ МЕТОДАМИ АТОМНО-СИЛОВОЙ МИКРОСКОПИИ

© 1999 г. М. О. Галлямов¹, Ю. Ф. Дрыгин², И. В. Яминский³

¹ Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, физический факультет, Москва, Россия

² НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

³ Московский государственный университет, химический факультет, Москва, Россия

Поступила в редакцию 04.04.98 г.

Методом атомно-силовой микроскопии (АСМ) изучена высокомолекулярная вирусная РНК на поверхностях различных субстратов. Исследован процесс высвобождения вирусной РНК из белковой оболочки под воздействием химических реагентов. Особое внимание уделено методике приготовления образцов и иммобилизации исследуемых структур. Получены изображения исходных вирусных частиц, частично депротеинизованных вирусных структур и полностью высвобожденной РНК. Проведена статистическая обработка полученных изображений. Проанализированы факторы, ограничивающие пространственное разрешение АСМ-изображений исследуемых структур.

ВВЕДЕНИЕ

Сканирующая зондовая микроскопия (СЗМ) (включающая атомно-силовую микроскопию [1], сканирующую туннельную микроскопию (СТМ) [2] и пр.) позволила провести исследования структуры и конформационных свойств макромолекул нуклеиновых кислот и их комплексов в условиях, близких к нативным [3, 4]. Получена новая информация о морфологии комплексов ДНК с поверхностно-активными веществами (ПАВ) [5]. Яркой демонстрацией возможностей метода явилось применение СЗМ для физического картирования нуклеиновых кислот [6] и их взаимодействия с белками [7, 8].

В настоящее время разработаны различные методы фиксации макромолекул линейной ДНК, кольцевой плазмидной ДНК и двуцепочечной РНК на поверхностях различных подложек для исследований СЗМ [9–12]. В то же время в литературе практически отсутствуют работы, посвященные СЗМ-исследованию высокомолекулярной одноцепочечной РНК [13]. Это объясняется спецификой молекулы одноцепочечной РНК — отсутствием двойной спирали, и, как следствие, меньшей “жесткостью”, что затрудняет фиксацию этой макромолекулы на подложке в расправленном состоянии.

Методика приготовления РНК в расправленном состоянии для исследований электронной микроскопии включает образование комплекса РНК с белками (цитохромом С или диизопропилфосфаттрипсином) на поверхности раздела фаз воздух–вода и последующий перенос данного комплекса на поверхность твердой подложки.

Очевидно, что в этом случае белковая “шуба” ограничивает решение задач, связанных с тонкой структурой РНК.

Наблюдение свободной РНК позволяет проводить как физическое картирование элементов вторичной структуры РНК, так и исследовать специфическое взаимодействие с ней белков, узнающих определенные (например, регуляторные) последовательности нуклеотидов. В свою очередь, исследование взаимодействия вирусной РНК и белков может дать вклад в понимание механизмов процесса сборки и разномержения вирус, структурной организации и функционирования рибонуклеопротеидов.

Настоящая работа посвящена разработке методов приготовления вирусной РНК и рибонуклеопротеидов для исследования с помощью СЗМ.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Для приготовления растворов использовали деионизованную бидистиллированную воду. Препарат вируса (ВТМ, штамм U1), полученный методом дифференциального центрифугирования и центрифугирования в градиенте плотности раствора сахарозы, был предоставлен Е.Н. Добровым (МГУ).

Депротеинизацию вирусных частиц производили: 1) 72% раствором диметилсульфоксида (ДМСО) [14] (экспозиция 30 мин), 2) 4 М раствором мочевины [15] (экспозиция 2,5 ч), 3) раствором глицина со значением рН 10,4 [16] (экспозиция 3 ч).

В качестве подложек использовали как чистые (свежий скол), так и модифицированные поверхности высокоориентированного пиролитического графита (пирографита) и слюды. Модификация заключалась в обработке поверхности катионным ПАВ – бензилдиметилалкиламмоний хлоридом (ВАС). Процесс модификации (экспозиция 1% раствором ВАС в формамиде [17]) завершался промывкой водой и высушиванием в струе фильтрованного сжатого воздуха.

Адсорбция исследуемых структур осуществлялась из капли препарата, которую наносили на поверхность подложки и экспонировали во влажной среде под колпаком. Длительность процесса экспозиции варьировали от нескольких секунд до часа и более. После завершения экспозиции поверхность подложки промывали водой и высушивали в струе фильтрованного сжатого воздуха.

АСМ-исследования проводили на приборе “Наноскоп-III” (фирма Digital Instruments, США) на воздухе в режимах постоянного (constant force mode) или прерывистого (tapping mode) контактов. При проведении исследований в контактном режиме использовали кантилеверы жесткостью 0,06 Н/м с микрозондом из нитрида кремния. Для исследований в режиме прерывистого контакта применяли кантилеверы с резонансной частотой в диапазоне 350–380 кГц и кремниевыми микрозондами.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Сканирующая зондовая микроскопия вирусных частиц. Частицы вируса табачной мозаики были исследованы в режимах постоянного и прерывистого контактов на поверхностях пирографита и слюды. Было обнаружено, что скорость сорбирования вирусных частиц на свежий скол поверхности существенно выше при использовании пирографитовой подложки, чем при использовании подложки из слюды. В первом случае при равных условиях сорбирования (температура, объемная концентрация вирусов в препарате, время промывки и пр.) поверхностная плотность вирусных частиц существенно выше. В то же время на пирографитовой подложке при сканировании в режиме постоянного контакта вирусные частицы нестабильны и увлекаются иглой даже при минимизации воздействующей силы до величины менее 1 нН. Стабильные АСМ-изображения вирусных частиц на пирографите удается получить только в режиме прерывистого контакта. В случае же использования слюдяной подложки сила адгезии вирусных частиц достаточна для проведения исследований в режиме постоянного контакта с величиной воздействующей силы ~ 10 нН.

Большая скорость сорбции вирусных частиц на поверхность пирографита в сравнении со слю-

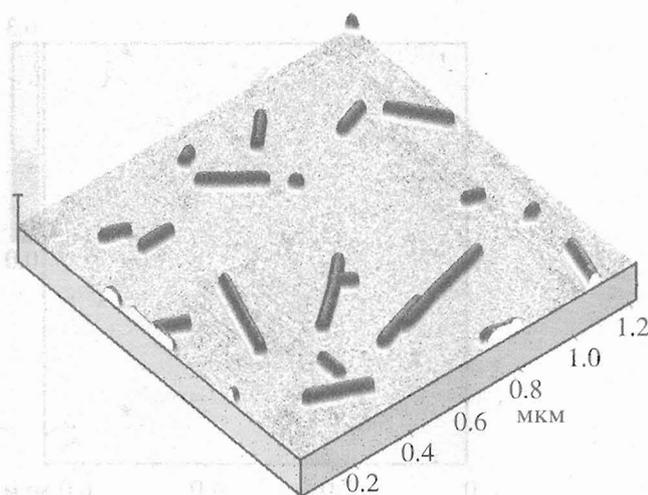


Рис. 1. Частицы вируса табачной мозаики, адсорбированные на поверхность пирографита. АСМ-исследование, измерение высоты в режиме прерывистого контакта.

дой может объясняться влиянием гидрофобного эффекта. В пользу данного утверждения говорит тот факт, что в случае гидрофобизации поверхности слюды посредством обработки ВАС скорость сорбции вирусных частиц увеличивается.

В то же время нестабильность адсорбированных на пирографит вирусных частиц в процессе сканирования в режиме постоянного контакта объясняется слабой адгезией частицы, обусловленной инертностью подложки (гидрофобный эффект не дает вклад в силу адгезии при проведении исследований на воздухе, поскольку проявляется только в водной среде).

АСМ-изображения частиц вируса табачной мозаики приведены на рис. 1. Согласно анализу полученных данных, для вирусных частиц максимум гауссовой аппроксимации распределения по длинам соответствует 320 нм, среднее значение длины составляет 310 нм, при этом среднеквадратичное относительное отклонение от среднего – 30% (число проанализированных АСМ-изображений вирусов $N = 120$). Столь широкое распределение объясняется, во-первых, частичным разрушением вирусных структур в процессе центрифугирования при приготовлении препарата и, во-вторых, агрегацией вирусных частиц торец в торец. С началом процесса обработки вирусных структур с целью высвобождения вирусной РНК максимум распределения вирусных частиц по длинам смещается в более короткую область. Так, для вирусных частиц, обработанных 50% формаидом в течение 2 мин, максимум составляет 260 нм ($N = 500$), а для вирусных частиц, обработанных 40% ДМСО при 37° в течение 30 мин, значение максимума – 180 нм ($N = 270$).

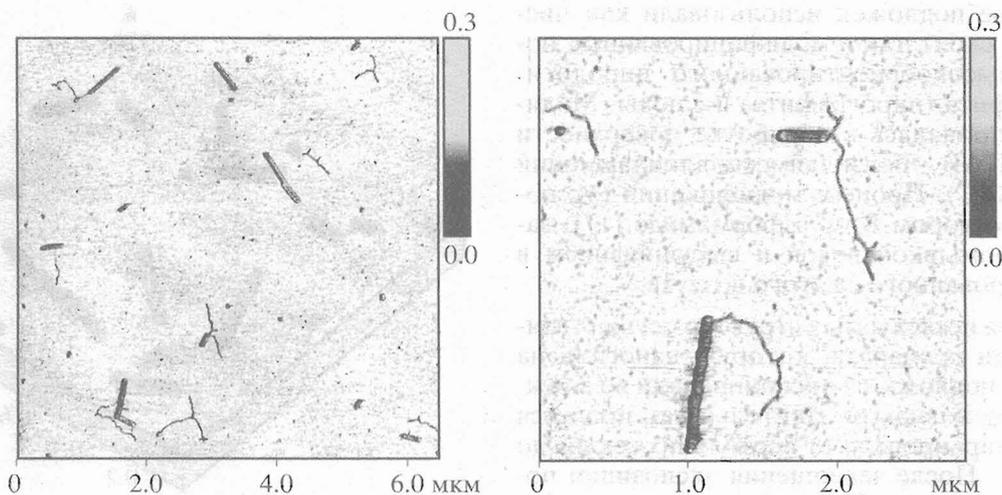


Рис. 2. Вирусные структуры, частично депротеинизованные обработкой 72% ДМСО и адсорбированные на слюду. АСМ-исследование, измерение сил трения в режиме постоянного контакта.

Анализ высот АСМ-изображений вирусных частиц над поверхностью подложки дает значение 18 ± 2 нм (независимо от режима исследования), что хорошо согласуется с литературными данными [18].

Частицы ВТМ, являясь природными “наноразмерными” объектами с жестко фиксированными геометрическими параметрами (каждая частица представляет собой цилиндр длиной 300 нм и радиусом 9 нм), могут служить удобным тест-объектом для анализа качества зондирующего острия. Подобный анализ позволяет отследить механизм возникновения артефактов, например, при исследовании вирусной РНК. Согласно элементарным геометрическим построениям для острия с радиусом кривизны кончика R значение реально измеряемой ширины на полувысоте АСМ-изображений вирусных частиц радиуса r должно составлять величину:

$$d_{\text{eff}} = 2(2Rr + r^2)^{1/2}. \quad (1)$$

Экспериментально определенные значения ширины АСМ-изображений вирусных частиц для режимов прерывистого и постоянного контактов составляют величины 30 ± 5 нм ($N = 270$) и 32 ± 6 нм ($N = 400$) соответственно. Воспользовавшись формулой (1), можно оценить радиус кривизны для кончиков зондов используемых типов кантилеверов: $R \approx 6-7$ нм.

Сканирующая зондовая микроскопия депротеинизованных вирусных структур с частично высвобожденными макромолекулами РНК. В мягких условиях депротеинизации наблюдали рибонуклеопротеиды (РНП) с выходящими из них (с одного конца или с обоих) нитями РНК (рис. 2, 3). Сравнительный анализ трех используемых методов частичной полярной депротеини-

зации ВТМ и высвобождения РНК показал, что наиболее перспективным является метод с применением ДМСО (рис 2). Метод депротеинизации в растворах со щелочным значением pH характеризуется большим фоном получаемых АСМ-изображений. Кроме того, молекулы РНК в этом случае склонны к агрегации. Метод с использованием мочевины позволяет получать АСМ-изображения с незначительным фоном, но при этом наблюдается агрегация вирусных РНП (рис. 3).

Сканирующая зондовая микроскопия молекул вирусной РНК. На заключительной стадии обработки вирусных частиц белковая оболочка разрушается, и макромолекула РНК полностью высвобождается. На рис. 4 приведены типичные результаты АСМ-исследования свободных РНК, адсорбированных на подложку из слюды.

Анализ ширины макромолекул РНК, адсорбированных на слюду, дает значения 10–15 и 20–30 нм для режимов прерывистого и постоянного контактов соответственно.

Воспользуемся формулой (1) для оценки механизма уширения, связанного с конечностью радиуса кривизны зонда. Основываясь на анализе распределения свободных макромолекул по длинам (см. ниже) и зная число нуклеотидов в молекуле (~ 6400), оценим радиус макромолекулы РНК: $r \approx 1$ нм; для радиуса зонда воспользуемся значением, оцененным выше: $R \approx 6-7$ нм. Тогда реально измеряемая ширина на полувысоте АСМ-изображений макромолекулы должна составлять 7–8 нм. Отличие данной оценки от экспериментально наблюдаемой величины, по-видимому, связано с деформациями образца под воздействием зонда. Причем роль данных деформаций существенно выше для режима постоянного контакта в сравнении с режимом прерывистого контакта.

Действительно, сила воздействия на образец, обусловленная изгибом кантилевера, может быть минимизирована в процессе сканирования до величины 10^{-9} Н и менее. Однако при проведении исследований на воздухе, поверхность гидрофильных образцов покрыта адсорбированной пленкой воды, которая вызывает увеличение силы воздействия зонда на образец благодаря капиллярному эффекту. Для величины этого дополнительного силового воздействия имеем:

$$F = 4\pi R\gamma \cos \Theta,$$

где R – радиус кривизны зонда, γ – поверхностное натяжение воды на границе раздела с воздухом, Θ – контактный угол для материала образца (зонда) и воды. При стандартных условиях эксперимента справедлива оценка: $F \approx 10^{-8}$ Н.

При воздействии с силой F зонда радиуса R на макромолекулу РНК радиуса r будет происходить деформация зонда, образца и подложки. При этом сближение h зонда и образца (а также сближение образца и подложки) может быть оценено с применением контактной теории Герца [19]:

$$h \approx (FD)^{2/3} ((R+r)/2)^{-1/3}, \quad (2)$$

где

$$D = \frac{3}{4} ((1-\sigma^2)/E + (1-\sigma'^2)/E').$$

Здесь E' и σ' – модуль Юнга и коэффициент Пуассона для материалов зонда (подложки), E и σ – те же параметры для упругого стержня, аппроксимирующего макромолекулу РНК.

Область контакта зонда и макромолекулы будет представлять собой эллипс с полуосями a и b :

$$a \approx (FD)^{1/3} ((R+r)/2)^{-2/3} R$$

$$b \approx (FD)^{1/3} ((R+r)/2)^{-2/3} r.$$

Предполагая, что $E' \gg E$ (модули Юнга кремния и оксида кремния лежат в диапазоне 100–150 ГПа), учтем вклад в D только первого слагаемого. Тогда, оценивая $E \approx 10$ ГПа, получим для a и b оценку 3 нм и 0.3 нм соответственно. Таким образом, латеральные размеры области контакта зонд-образец сравнимы с радиусом РНК. Из приведенной оценки очевидно, что при анализе АСМ-изображений необходимо учитывать деформацию биообъектов. Так, латеральные размеры области контакта определяют предел достижимого пространственного разрешения.

На основании формулы (2) получим для $h \approx 0.5$ нм. Таким образом, для относительного занижения высот макромолекул РНК над поверхностью подложки получаем оценку – 50%, что хорошо согласуется с полученными экспериментальными результатами. Это оправдывает

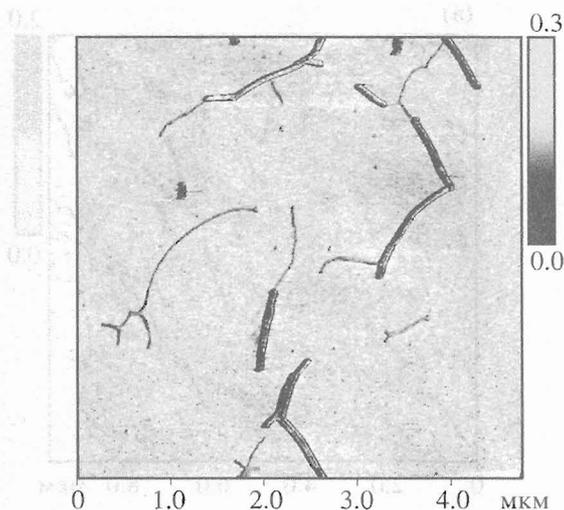


Рис. 3. Вирусные структуры, частично депротенизированные обработкой 4 М раствором мочевины и адсорбированные на слюду. АСМ-исследование, измерение сил трения в режиме постоянного контакта.

использование оценки для модуля Юнга стержня, моделирующего РНК ($E \approx 10$ ГПа).

Экспериментальный анализ значений высот макромолекул показал, что эти величины достаточно сильно варьируются как для различных молекул, так и для различных участков одной и той же молекулы, и в основном заключены в диапазоне 0.3–1.5 нм (для исследований как в режиме постоянного, так и прерывистого контактов). Данный разброс может объясняться сохранением макромолекулой элементов вторичной структуры (неполное разворачивание на поверхности подложки, наличие скрученных участков).

О частичном сохранении элементов вторичной структуры макромолекул говорит также наличие петель и “шпилек”. Расправлению макромолекул может способствовать нанесение на подложку в потоке (рис. 4б). При этом на АСМ-изображении четко идентифицируются участки прикрепления макромолекулы к подложке. Видно, что молекула, будучи закрепленной в данной точке, ориентируется, расправляясь по потоку. Стабилизация макромолекул на поверхности подложки в расправленном состоянии позволяет провести анализ распределения макромолекул РНК по длинам. Согласно нашим результатам для макромолекул РНК, высвобожденных с применением ДМСО, максимум распределения по длинам составляет величину 1.6 ± 0.5 мкм. Принимая во внимание, что РНК ВТМ штамма U1 включает около 6400 нуклеотидов, можно определить длину межнуклеотидной связи для РНК, изображения которой получены в описанных нами условиях. Данная величина 0.25 ± 0.08 нм.

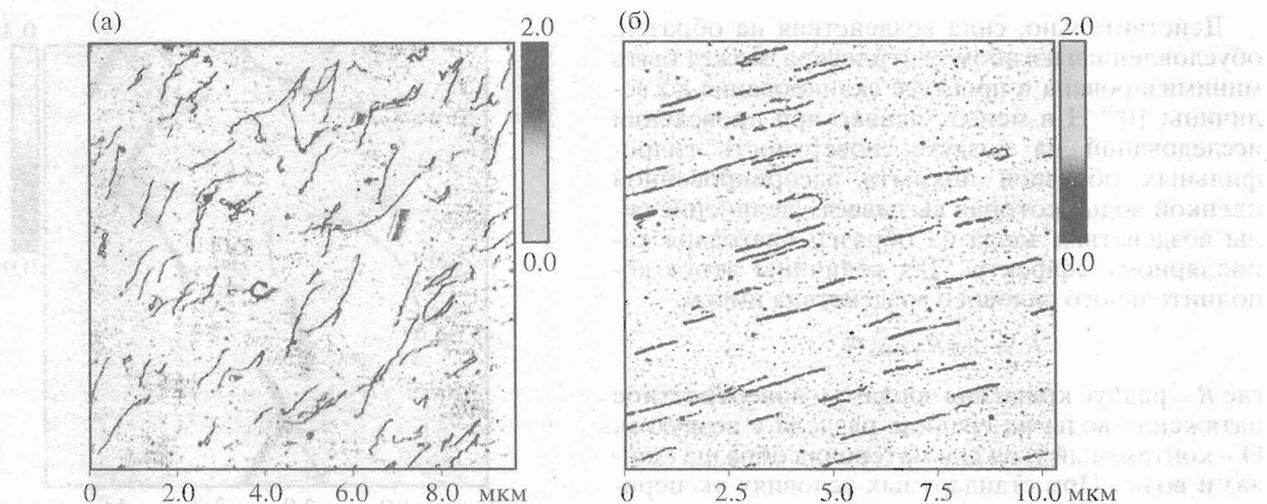


Рис. 4. Молекулы РНК, высвобожденные из белковой оболочки посредством обработки ДМСО и адсорбированные на слюду с разной степенью ориентации по потоку. (а, б) АСМ-исследование, измерение высоты в режиме постоянного контакта.

Авторы выражают благодарность Е.Н. Доброву (МГУ) за предоставленный препарат вируса. Данная работа была частично поддержана Российским фондом фундаментальных исследований, гранты № 97-04-49763 и № 97-03-32778а.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Binnig G., Quate C.F., Gerber Ch. // *Phys. Rev. Lett.* 1986. V. 56. P. 930.
2. Binnig G., Rohrer H. // *Helv. Phys. Acta.* 1982. V. 55. P. 726.
3. Lyubchenko Y.L., Gall A.A., Shlyakhtenko L.S. et al. // *J. Biomol. Struct. Dynam.* 1992. V. 10. № 3. P. 589.
4. Bustamante C., Vesenska J., Tang C.L. et al. // *Biochemistry.* 1992. V. 31. P. 22.
5. Sergeev V.G., Pyshkina O.A., Gallyamov M.O. et al. // *Progr. Colloid. Polym. Sci.* 1997. V. 106. P. 978.
6. Murray M.N., Hansma H.G., Bezanilla M. et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1993. V. 90. P. 3811.
7. Guthold M., Bezanilla M., Erie D.A. et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1994. V. 91. P. 12927.
8. Rees W.A., Keller R.W., Vesenska J.P. et al. // *Science.* 1993. V. 260. P. 1646.
9. Thomson N.H., Kasas S., Smith B. et al. // *Langmuir.* 1996. V. 12. P. 5905.
10. Lubchenko Y.L., Jacobs B.L., Lindsay S.M. // *Nucleic Acids Res.* 1992. V. 20. № 15. P. 3983.
11. Галлямов М.О., Яминский И.В. // *Сканирующая зондовая микроскопия биополимеров.* М.: Научный мир, 1997. С. 25.
12. Schaper A., Pietrasanta L.I., Jovin T.M. // *Nucleic Acids Res.* 1993. V. 21. № 25. P. 6004.
13. Drygin Yu.F., Bordunova O.A., Gallyamov M.O., Yaminsky I.V. // *FEBS Lett.* 1998. V. 425. P. 217.
14. Nicolaieff A., Lebeurier G., Morel M.-C., Hirth L. // *J. Gen. Virol.* 1975. V. 26. P. 295.
15. Blowers L.E., Wilson T.M.A. // *J. Gen. Virol.* 1982. V. 61. P. 137.
16. Hogue R., Asselin A. // *Can. J. Botany.* 1984. V. 62. P. 2236.
17. Vollenweider H.J., Sogo J.M., Koller Th. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1975. V. 72. P. 83.
18. Lebeurier G., Nicolaieff A., Richards K.E. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1977. V. 74. P. 149.
19. Ландау Л.Д., Лифшиц Е.М. *Теория упругости.* М.: Наука, 1987. 246 с.

Atomic Force Microscopy Visualization of Tobacco Mosaic Virus RNA and TMV Ribonuclioproteins

M. O. Gallyamov, Yu. F. Drygin, I. V. Yaminsky

Observation of high molecular weight virus RNA on different substrates is performed using atomic force microscopy (AFM). The process of RNA releasing from protein coating due to chemical treatment of the virus is studied. Particular attention is paid to the techniques of sample preparation and immobilization of structures. It is the first demonstration of the AFM images of tobacco mosaic viral particles, deproteinized virus structures and fully released RNA molecules. The statistical analysis of the obtained images is performed. The main factors restricting the spatial resolution of the AFM images are revealed.