



Конкурс для школьников «Гениальные мысли» Автореферат проекта победителя I степени

Название работы – Метод для определения нуклеиновой кислоты в капсидах вирусов.

Автор – Трифонова Татьяна Сергеевна, 11 класс, ГБОУ Школа № 192, г. Москва.

Руководители – Моисеенко Андрей Владимирович, ведущий инженер, биологический факультет, МГУ имени М.В. Ломоносова; Кашигина Ольга Юрьевна, педагог дополнительного образования, ГБПОУ "Воробьевы горы", г. Москва.

Основная идея работы, цели, задачи

Цель работы: Разработка метода для определения расположения ДНК в капсидах вирусов методом аналитической электронной микроскопии.

Задачи:

- 1) Узнать про вирусы бактерий;
- 2) Узнать про разные методы электронной микроскопии;
- 3) Провести картирование фосфора на изображениях бактериофагов EL методом аналитической электронной микроскопии;
- 4) Определить распределение ДНК в капсидах бактериофагов EL.

Актуальность и новизна работы

Во время пандемии COVID-19 очень важно разрабатывать различные вакцины [1]. Вакцина – это деактивированный или ослабленный вирус или белки, идентичные этому вирусу, которые вводят в организм, чтобы он мог выработать антитела для устранения вируса, если этот вирус (уже активный) попадает в организм. Поэтому после введения вакцины человек может испытывать схожие симптомы с настоящим вирусом на протяжении нескольких дней. Для деактивации вирусов часто используют формальдегид, который сшивает белки капсида по S-S связям. Однако, **до сих пор неизвестно, что происходит при деактивации с нуклеиновой кислотой, которая содержится внутри капсида.** В нашей работе мы предложили определять ДНК по распределению элемента фосфора, так как он содержится в нуклеиновых кислотах в больших количествах, в отличие от других элементов: углерода, кислорода и азота, которые также содержатся в белках.

Так как школьникам нельзя работать с опасными вирусами, то мы начали отрабатывать метод с бактериофагов – вирусов микробов. На них можно разработать метод, который дальше можно использовать на других вирусах, узнать что происходит с нуклеиновой кислотой после деактивации вируса и узнать немного больше о самих бактериофагах.

Основные результаты

- 1) Строение бактериофагов

Вирусы являются биологическими наночастицами, которые не могут жить вне другого организма и не умеют размножаться сами, поэтому они вводят свой геном (состоящий из РНК или ДНК) в чужие клетки, тем самым перекодируя их, чтобы те создавали копию этого вируса, таким образом, захватывая организм. Одними из таких вирусов являются бактериофаги, которые заражают только бактерии.

Частицы бактериофагов семейства *Myoviridae* состоят из головки диаметром около 100 нм и хвоста толщиной 10-40 нм и длиной 100-180 нм (рисунок 1).

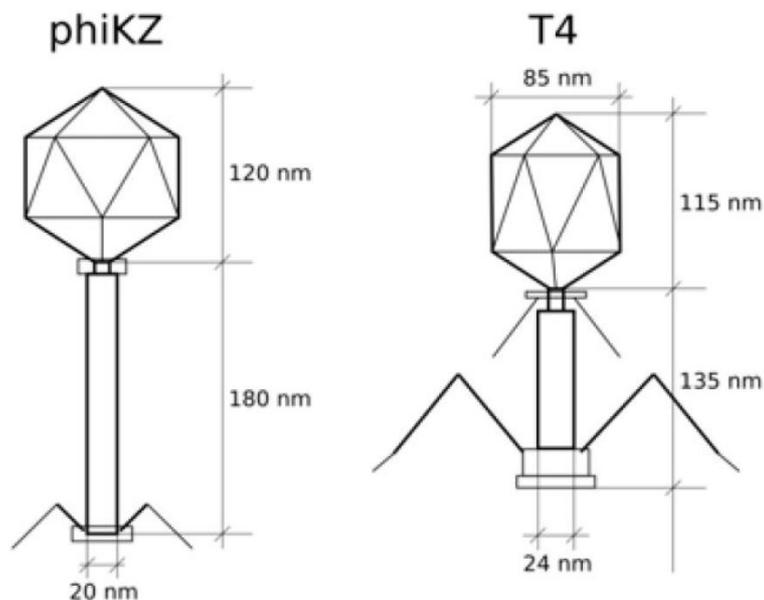


Рис.1. Схема строения бактериофагов семейства *Myoviridae*: phiKZ (слева) и T4 (справа).

Внутри головки содержится дезоксирибонуклеиновая кислота (ДНК), которая плотно уложена. Хвост имеет вид полой трубки, окруженной сократимым чехлом. При адсорбции фага на бактериальной клетке чехол сокращается и ДНК впрыскивается в клетку. phiKZ-подобные бактериофаги содержат внутри капсида белковое тело (“внутреннее тело”).

2) Про “внутреннее тело”

Внутреннее тело представляет собой белковую “катушку” на которой намотана ДНК. Впервые раз его увидели с помощью электронной микроскопии в 1984 году после разрушения капсидов бактериофага phiKZ [2] и поначалу многие ученые даже не верили в его существование. В 2014 году был найден способ визуализации этого тела в головке бактериофагов при помощи криоэлектронной микроскопии и высокой дозы электронов [3,4]. Под действием электронного облучения в белках происходит радиолиз воды с выделением водородных пузырей [5], однако кипение начинается сначала в уязвимых местах, в контакте с нуклеиновыми кислотами, которые не дают этим пузырям уйти и поэтому мы видим внутреннее тело на микрографиях.

3) ДНК и фосфор

ДНК – это двухцепочечный полимер, состоящий из пар нуклеотидов, содержащий генетическую информацию (инструкции организму). Каждый нуклеотид состоит из остатков пуринового или пиримидинового основания, углевода (рибозы или дезоксирибозы) и фосфорной кислоты (рисунок 2). В одном нуклеотиде в составе нуклеиновой кислоты содержится всего лишь один атом фосфора.

Для детекции ДНК на электронно-микроскопических изображениях, мы решили использовать элемент фосфор, так как он не содержится в белках оболочки, по крайней мере в таких же количествах. ДНК бактериофага EL имеет длину 211000 пар нуклеотидов, то есть, содержит 422000 атомов фосфора.

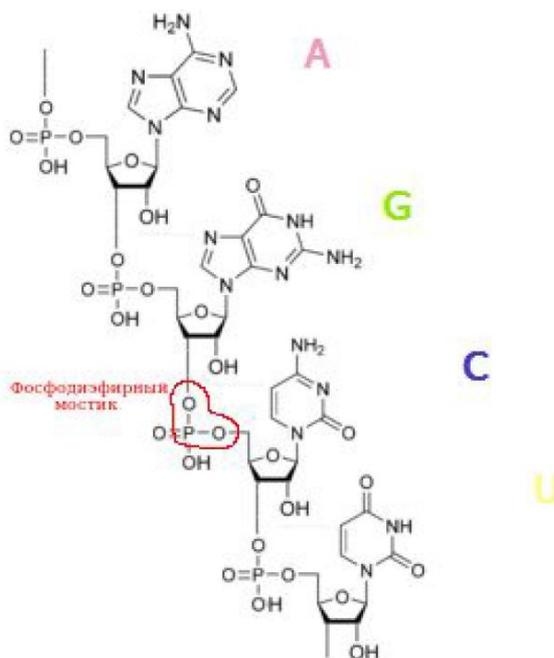


Рис.2. Структура нуклеиновой кислоты.

4) Про метод электронной микроскопии

Электронный микроскоп, который был использован в работе – JEOL2100 (рисунок 3). Этот микроскоп использует луч электронов для получения изображения, что позволяет рассматривать пробы с увеличением до 1 млн, в то время как световые микроскопы увеличивают до 2000.

Образцы исследовали методом спектроскопии характеристических потерь энергии электронов (СХПЭЭ) с ускоряющим напряжением 200 кВ и энергетическим фильтром/спектрометром СХПЭЭ Gatan GIF Quantum ER.

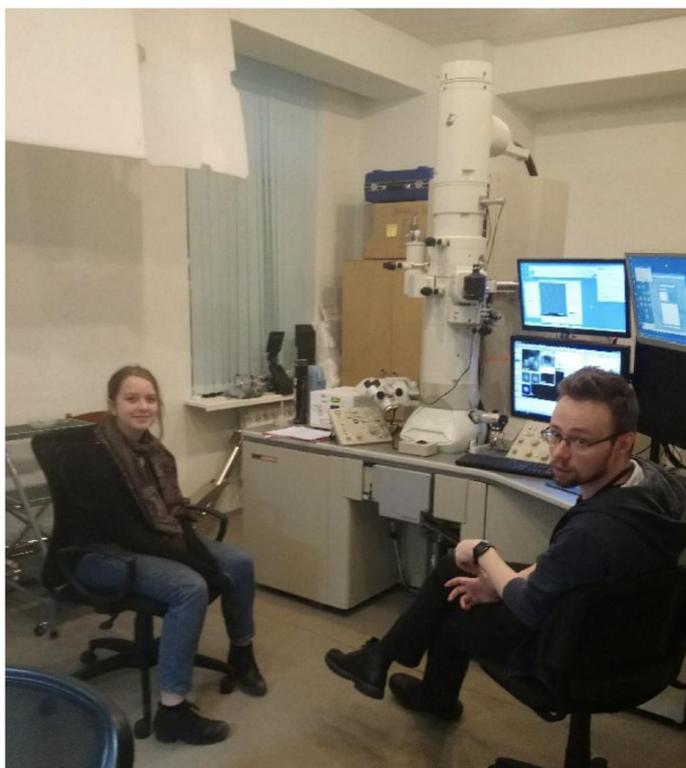


Рис.3. Электронный аналитический микроскоп JEOL JEM2100.

При работе с микроскопом мы использовали 2 режима: ТЕМ (transmission electron microscope) и СПЭМ (scanning transmission electron microscope):

ТЕМ – режим, в котором пробу просвечивают большим лучом.

СПЭМ – (режим) когда вместо большого луча используют очень узкий луч и получают изображение методом сканирования образца. Мы старались минимизировать диаметр луча, чтобы меньше навредить пробе и чтобы увеличить соотношение сигнал-фон.

СХПЭЭ – (спектры характеристических потерь энергии электронов) способ анализа проб в режиме STEM, где при просвечивании маленькой точки анализируются потери энергии электронов. Далее компьютер группирует электроны с похожими или одинаковыми потерями и идентифицирует искомый элемент.

HAADF – высокоугловой кольцевой темнопольный детектор электронов – вид детектора в котором улавливаются электроны, которые вылетают после столкновения с образцом под высокими углами.

В СХПЭЭ и HAADF используются неупругорассеянные электроны (рисунок 4), которые передают свою энергию образцу.

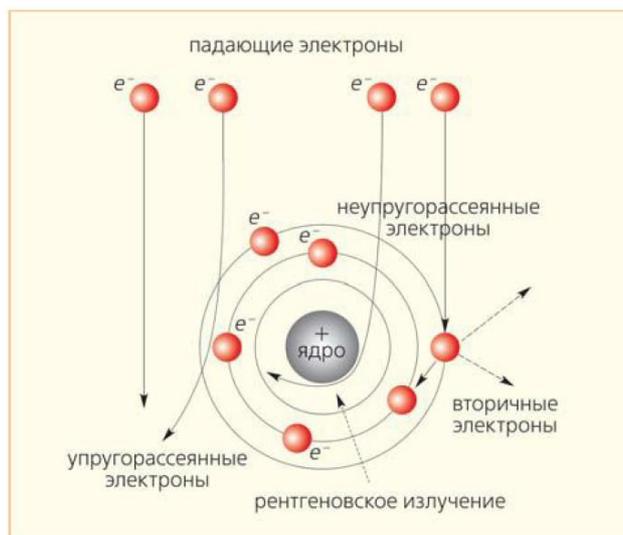


Рис.4. Траектории электронов, взаимодействующих с веществом образца. Из [5].

5) Методы

Мы начали отработку метода картирования ДНК с бактериофагов – вирусов микробов. На них можно разработать метод, который дальше можно использовать для изучения других вирусов. Бактериофаги EL были получены из Института вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова. Их наносили на стандартные медные сеточки для электронной микроскопии, покрытые углеродной подложкой, и контрастировали молибдатом аммония.

Сетки вставляли в специальный держатель, который в отличие от обычных, имеет сосуд дьюара и медную проволоку для охлаждения пробы, а также может удерживать только одну пробу, а не 4.

После этого температуру объекта понижали до -180°C . Это делается для того, чтобы образец меньше повреждался под действием луча электронов [2].

При просмотре в ТЕМ и СПЭМ проба сначала вводится в вакуумную камеру, т.к. воздух может повлиять на поток электронов. После откачки воздуха пробу вставляют в микроскоп и помещают под луч. После настройки (которую проводит инженер) пробу хорошо видно (рисунок 5А).

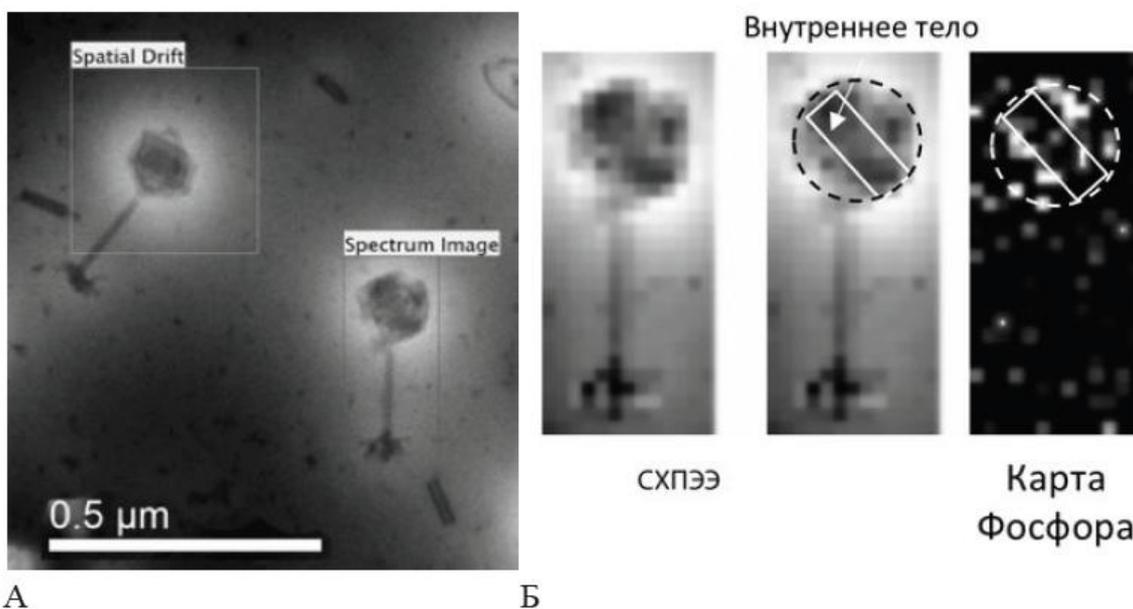


Рис.5. Картирование содержания фосфора в бактериофаге EL. (А) темнопольное СПЭМ изображение поля зрения. (Б) Слева – внутреннее тело (показано стрелкой) выглядит более темным на фоне ДНК в капсиде. Справа – карта распределения фосфора. Яркость пикселей отражает уровень сигнала фосфора.

б) Результаты картирования

Было проведено картирование фосфора внутри и вне капсида бактериофага (рисунок 5Б). Снаружи от капсида сигнал фосфора практически отсутствовал, что соответствует наличию ДНК только внутри капсида.

Распределение фосфора внутри капсида оказалось неравномерно – прямоугольная область посередине капсида содержала слабый сигнал, а по краям – более интенсивный. Это может быть объяснено наличием внутри капсида белкового образования, “внутреннего тела”, на которое намотана ДНК [2-4]. В этом месте будет содержаться меньше ДНК, чем с краю. Таким образом мы впервые применили метод нахождения внутреннего тела бактериофагов с помощью детектора HAADF.

Опробованный метод позволил специфически определить не только наличие нуклеиновой кислоты в капсиде вируса, но и показать изменения в ее пространственном распределении.

Выводы, заключение, перспективы

Наши результаты обосновывают возможность применения разработанной методики для исследования распределения фосфора в биологических нано-объектах при сравнительно низких содержаниях искомого элемента.

В дальнейшем, этот метод можно предложить ученым для определения содержания нуклеиновой кислоты в капсидах других вирусов, включая инактивированные вирусы, используемые для производства вакцин от SARS-Cov-2.

Список цитированных источников

1. Ng, W. H., Liu, X., Mahalingam, S. *F1000Research* , 2020, 9.
2. Krylov, V.N., Smirnova, T.A., Minenkova, I.B., Plotnikova, T.G., Zhazikovm I.Z., Khrenova, E.A. Pseudomonas bacteriophage phiKZ contains an inner body in its capsid. *Can J Microbiol* . 1984, Jun;30(6), 758-762.3.
3. Wu, W., Thomas, J. A., Cheng, N., Black, L. W., Steven, A. C. *Science* , 2012, 335(6065), 182-182.
4. Sokolova, O. S., Shaburova, O. V., Pechnikova, E. V., Shaytan, A. K., Krylov, S. V., Kiselev, N. A., & Krylov, V. N. (2014). Genome packaging in EL and Lin68, two giant phiKZ-like bacteriophages of *P. aeruginosa*. *Virology* , 468, 472-478.
5. Печникова, Е. В., Кирпичников, М. П., Соколова, О. С. *Природа* , 2015, 3, 25-29.