

УДК 620.187.3+578.347

Визуализация нуклеиновых кислот в микро- и нанометровых биологических объектах с помощью аналитической электронной микроскопии

О. С. Соколова¹, Т. С. Трифонова¹, Н. И. Деркачева², А. В. Моисеенко¹¹Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, биологический факультет, Москва, 119234 Россия²Российский университет медицины, кафедра биохимии, Москва, 127473 Россия

*E-mail: sokolova@mail.bio.msu.ru

Поступила в редакцию 06.08.2024

Принята к печати 21.10.2024

DOI: 10.32607/actanaturae.27483

РЕФЕРАТ Методы аналитической электронной микроскопии, включая метод энергодисперсионной рентгеновской спектроскопии (ЭДРС) и метод спектроскопии характеристических потерь энергии электронов (СХПЭЭ), используются для визуализации и картирования различных химических элементов в материаловедении и биологии. В данном обзоре представлены примеры успешной идентификации нуклеиновых кислот в клетках, а также в ДНК- и РНК-содержащих вирусах с использованием химического элемента фосфора в качестве маркера.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА энергодисперсионная рентгеновская спектроскопия, спектроскопии характеристических потерь энергии электронов, элементное картирование фосфора, бактериофаг, *P. aeruginosa*, SARS-CoV-2, вирус клещевого энцефалита.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ ЭДРС – энергодисперсионная рентгеновская спектроскопия; СХПЭЭ – спектроскопии характеристических потерь энергии электронов; ПЭМ – просвечивающая электронная микроскопия; ЭФПЭМ – энергофильтрующая просвечивающая электронная микроскопия; СПЭМ – сканирующая просвечивающая электронная микроскопия; HAADF – темнопольное изображение в высокоугловых рассеянных электронах (high-angle annular dark-field); ВКЭ – вирус клещевого энцефалита; криоЭМ – криоэлектронная микроскопия; GFP – зеленый флуоресцентный белок.

ВВЕДЕНИЕ

Точная идентификация и ультраструктурная локализация молекул, органелл, клеток и других биологических структур являются ключевым шагом к определению их функций. Локализация макромолекул с помощью иммуномечения на срезах позволяет обнаружить специфические мишени [1]. Криотомография дает возможность визуализировать структуру тканей [2] и криоЭМ-структуру макромолекул белка с атомным разрешением [3, 4]

Нобелевские премии, присужденные за достижения в области микроскопии, подчеркивают важность визуализации молекул с высоким разрешением: GFP для живых клеток [5], преодоление дифракционного предела с помощью световой флуоресцентной микроскопии сверхразрешения [6] и криоЭМ [7].

Трансмиссионная (просвечивающая) электронная микроскопия (ПЭМ) – распространенный метод изучения структуры тканей, клеток, органелл и белковых молекул, который, в свою очередь, помогает понять механизмы, лежащие в основе функционирования клеток в норме и патологии. В связи со значительным улучшением методик электронной микроскопии белковых молекул и повышением возможностей компьютеров, применяемых для расчетов трехмерных структур белков, в последнее десятилетие ПЭМ превратилась в полноправный метод, применяемый в структурной биологии. КриоЭМ позволяет визуализировать не только трехмерную структуру, но и динамику самых разнообразных биологических нанообъектов с разрешением от 2–5 нм до атомного [3, 4]. В то же время метод

криоЭМ лишен многих недостатков, присущих другим структурным методам: размер частиц не лимитирован, наличие кристаллов не обязательно, используется небольшое количество материала. Более того, крио-модификация метода ПЭМ позволяет наблюдать молекулы в нативном водном окружении в состоянии, близком к физиологическому, что особенно важно для изучения их функциональных особенностей.

Принцип работы просвечивающего электронного микроскопа основан на рассеянии пучка электронов в тонком слое исследуемого объекта (рис. 1А). Рассеяние электронов на атомах объекта приводит к многочисленным явлениям, таким, как упругое рассеяние электронов на большие углы, частичная потеря энергии неупругорассеянными электронами, ионизация атомов объекта и генерация вторичных электронов, генерация характеристического рентгеновского излучения и др. (рис. 1Б). Характер наблюдаемых явлений будет зависеть от конкретной структуры объекта под электронным пучком, от распределения рассеивающего потенциала, среднего атомного номера, толщины объекта и пр. Используя методы просвечивающей электронной микроскопии, можно детектировать соответствующие сигналы и использовать их для определения структуры объекта.

АНАЛИТИЧЕСКАЯ ЭЛЕКТРОННАЯ МИКРОСКОПИЯ

В биологии и науках о материалах часто возникает необходимость в качественных и количественных измерениях, а также составить карту распределения химических элементов в микроскопических областях образца. Для этого используются аналитические электронные микроскопы (сканирующие и просвечивающие). В аналитической ПЭМ детектируются неупругорассеянные электроны, то есть электроны, которые при прохождении через образец в колонне просвечивающего электронного микроскопа теряют часть своей энергии (рис. 1Б).

Аналитический электронный микроскоп оснащен специальными детекторами, которые позволяют анализировать химическое состояние образца с помощью ЭДРС (энергодисперсионной рентгеновской спектроскопии) или СХПЭЭ (спектроскопии потерь энергии электронов). Использование методов аналитической ПЭМ предоставляет уникальную возможность получать информацию об элементном составе изучаемых объектов с нанометровым разрешением [8, 9]. Среди методов аналитической ПЭМ широкое применение в элементном анализе биологических объектов нашли метод энергодисперсионной рентгеновской спектроскопии (ЭДРС) [10], метод спектроскопии характеристических потерь энергии электронов (СХПЭЭ) и основанное на СХПЭЭ эле-

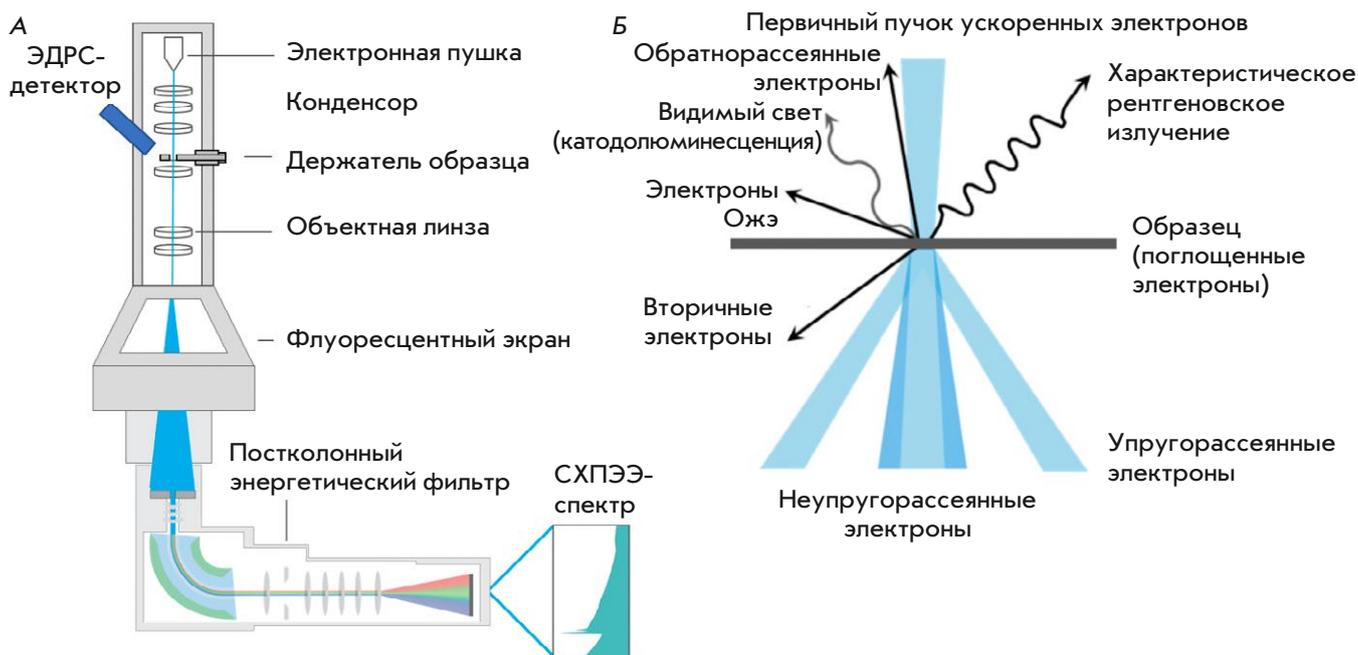


Рис. 1. А – строение электронного просвечивающего аналитического микроскопа. Б – распределение энергии пучка ускоренных электронов, прошедшего сквозь тонкий объект, и возникающие при этом вторичные излучения (с использованием Biorender.com)

ментное картирование методом энергофильтрующей ПЭМ (ЭФПЭМ).

МЕТОД СПЕКТРОМЕТРИИ ХАРАКТЕРИСТИЧЕСКОГО РЕНТГЕНОВСКОГО ИЗЛУЧЕНИЯ (ЭДРС)

Метод ЭДРС основан на регистрации рентгеновских фотонов, испускаемых образцами при электронном облучении (рис. 2В), и измерении их энергий. Поскольку каждый вид атомов (химический элемент) имеет свои строго определенные (квантованные) значения энергий, рентгеновские спектры имеют линейчатый характер и могут служить «визитными карточками» элементов. Расположение пиков на оси абсцисс типичного спектра ЭДРС соответствует значениям энергии поглощенных детектором рентгеновских фотонов: чем выше энергия, тем правее отображается пик (рис. 2Д). Высота каждого пика определяется количеством импульсов, поступивших в данный канал.

Элементный анализ методом ЭДРС проводят с использованием энергодисперсионных спектро-

метров (например, X-Max, Oxford Instruments, Великобритания). Спектрометры характеристических потерь энергии электронов устанавливаются на колонну ПЭМ в качестве аналитической приставки и применяются для построения карт распределения элементов.

Энергодисперсионные рентгеновские спектры от выбранных участков образца регистрируют, как правило, в режиме сканирующей просвечивающей электронной микроскопии (СПЭМ). В отличие от ПЭМ, пучок электронов в СПЭМ фокусируется с помощью электронной оптики, образуя небольшой зонд, который сканирует тонкий образец. В диапазон энергий рентгеновского излучения 0.15–4 кэВ входят наиболее интенсивные пики биологически значимых элементов: P, N, O, K, Ca, Mg, Na, Cl и S (рис. 2Д). Метод ЭДРС в целом считается качественным, то есть основная цель – это идентификация специфического $K\alpha$ -пика. Характеристические рентгеновские пики могут быть определены с использованием специальных таблиц и баз данных.

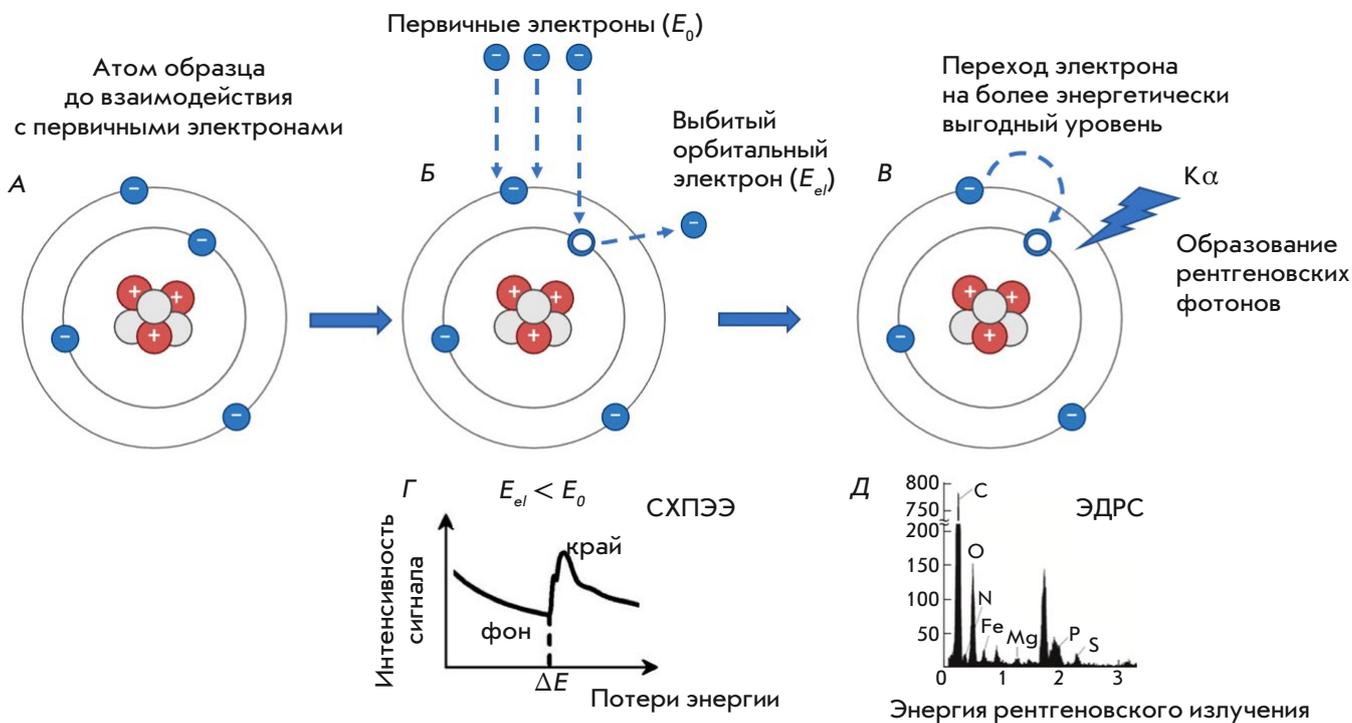


Рис. 2. Возбуждение внутренних оболочек атома образца в колонне просвечивающего электронного микроскопа и получающиеся в результате этого процесса спектр потерь энергии электронов (СХПЭЭ) и энергодисперсионный спектр (ЭДРС). А – атом образца до взаимодействия с первичным электроном; Б – потери энергии, детектируемые методом СХПЭЭ. E_0 – энергия первичного электрона до взаимодействия с атомом образца; E_{el} – энергия первичного электрона после прохождения через образец; В – генерация кванта рентгеновского излучения, детектируемого методом ЭДРС. $K\alpha$ – рентгеновский фотон, образовавшийся в результате перехода атома образца из возбужденного; Г – спектр потерь энергии электронами (СХПЭЭ); Д – энергодисперсионный спектр (ЭДРС) (с использованием Biorender.com)

Большинство программ рентгеновского анализа оснащены автоматизированным программным обеспечением для идентификации пиков.

Результаты количественного рентгеновского анализа могут быть достигнуты с точностью до 1%. Они позволяют сравнить содержание искомого элемента в различных клетках и тканях при нормировании на пик углерода и наложении полученных графиков друг на друга (см. далее). В этой связи следует упомянуть, что некоторые трудности количественного определения могут быть обусловлены тем, что разные химические элементы могут иметь близкие значения энергий связи. Например, пик $K\alpha$ (2.013 кэВ) фосфора (P) находится очень близко к M-линии (1.914 кэВ) осмия (Os), который обычно используется для фиксации клеточных мембран. В таком случае сложно разделить мечение мембран осмием и содержание фосфолипидов в тех же мембранах. Для того, чтобы избежать подобных перекрытий пиков, рекомендуется использовать для контрастирования соединения других тяжелых металлов, например марганца, соответствующий пик которого располагается в другом месте.

ДЕТЕКЦИЯ ФОСФОРА НА СРЕЗАХ КЛЕТОК И ТКАНЕЙ С ПОМОЩЬЮ ЭДРС

Фосфор является одним из ключевых макроэлементов, необходимых для функционирования живых организмов: он входит в состав важнейших соединений, таких, как нуклеиновые кислоты, АТФ и фосфолипиды, и играет ключевую роль в энергетических процессах клетки [11]. Для многих видов микроводорослей и цианобактерий характерно запасание фосфора в виде полифосфатных внутриклеточных включений [12].

Особый интерес представляет картирование ДНК путем регистрации распределения фосфора, один атом которого связан с каждым основанием нуклеиновой кислоты [13]. В последние годы появился также интерес к визуализации ДНК в составе наночастиц и оригами [14].

Впервые визуализация изолированной ДНК в электронном просвечивающем микроскопе состоялась более 75 лет назад [15]. Для этого была разработана методика кругового напыления образца тяжелыми металлами. Негативное контрастирование ацетатом урана широко используется для электронно-микроскопической визуализации ДНК и хроматина с 1960-х годов. Однако для идентификации фосфора в составе клеток чаще используют аналитическую ПЭМ. Распределение эндогенных элементов, таких, как фосфор, содержащийся в мембранах и ДНК, азот в полипептидах и сера в богатых метионином и цистеином белках, может быть качествен-

но измерено в точке или по площади с помощью ЭДРС и наложено на карту. Этот подход позволил локализовать расположение гранул, содержащих азот и фосфор, в эукариотических клетках (рис. 3А) [16], определить сложный элементный состав вакуолярных включений зеленых микроводорослей [17], картировать фосфор и другие элементы на срезах личинок дрозофилы [18] и миелиновой оболочки периферического нерва человека [19], а также в ДНК-оригами [14] (рис. 3Б–Д).

Картирование на срезах по всей площади поля зрения, в том числе получение суммарных карт

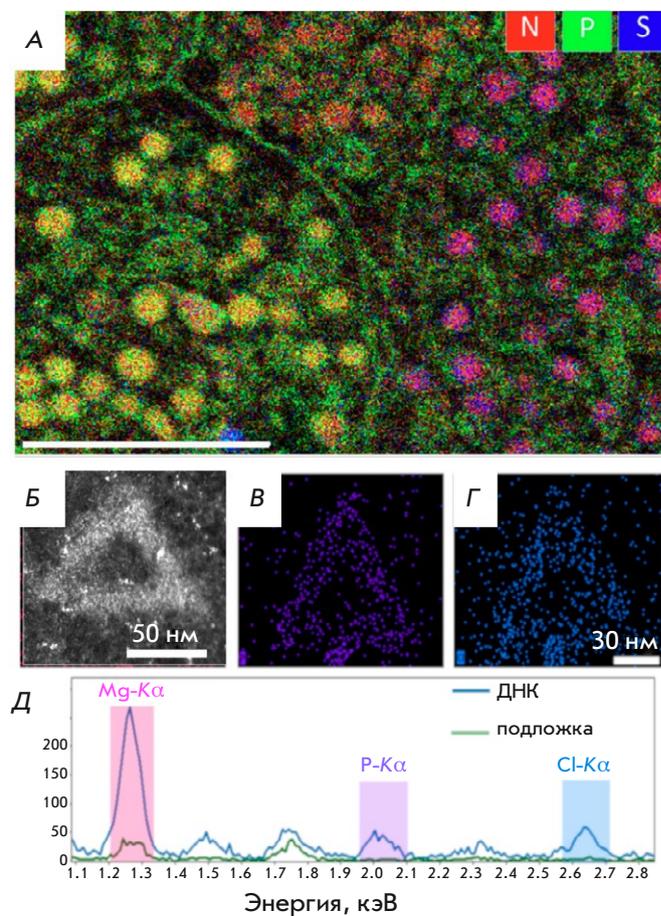


Рис. 3. Элементное картирование на срезах клеток с помощью ЭДРС. А – клетки островка Лангерганса крысы (из [16], открытый источник). Наложение карт азота (красный), фосфора (зеленый) и серы (синий) позволяет идентифицировать мембраны и гранулы в зависимости от элементного содержания. Длина масштабного отрезка 2 мкм. Картирование ЭДРС треугольника ДНК-оригами (Б): распределение сигналов фосфора (В) и хлора (Г). Д – два суммированных ЭДРС-спектра: синяя линия суммирована по ДНК, а зеленая линия суммирована по подложке. Оба спектра представляют собой необработанные данные без вычитания фона (из [14], воспроизведено с разрешением)

с последующим цветовым кодированием каждого из интересующих исследователя химических элементов (рис 3А), предоставляет ценную информацию об элементном составе и концентрационных составляющих в различных областях образца, позволяет идентифицировать субклеточное распределение, выявить мембраны и цитоплазматические гранулы.

В работах последних лет метод ЭДРС позволил выявить взаимодействие ДНК с белками Dps в бактериальных клетках [20]. ДНК-связывающий белок Dps является главным фактором, определяющим архитектуру бактериального нуклеоида [21]. Dps это ферритин-подобный белок, который состоит из 12 мономеров, каждый из которых содержит четыре альфа-спиральных субдомена, собранные в додекаэдр с тетраэдрической симметрией (рис. 4А). Одним из универсальных механизмов ответа бактерий на стресс является повышение синтеза Dps [22]. В результате в цитоплазме голодающих клеток могут наблюдаться двух- и трехмерные кристаллические решетки, образованные Dps, перемежающимися спиралями ДНК (рис. 4Б). Кристаллизация обеспечивает физическую защиту ДНК от неблагоприятных факторов.

С использованием аналитической электронной микроскопии был разработан оригинальный метод для доказательства образования комплекса ДНК

с Dps. Авторы метода постулировали, что пик К α (2.307 кэВ) серы отражает существование связывающего ДНК белка Dps (каждый белок Dps содержит 48 остатков метионина), а пик К α (2.013 кэВ) соответствует фосфору в ДНК. Одновременное присутствие обоих пиков на ЭДРС-спектрах показывает образование комплекса ДНК–Dps (рис. 4Г). Полученные результаты свидетельствуют о том, что в нанокристалле большая часть белка Dps плотно связана с нуклеоидной ДНК, формируя компактную структуру, что согласуется с данными предыдущих исследований [23, 24]. В контрольных областях ни сера, ни фосфор не обнаружены (рис. 4Г). Ярко выраженный сигнал меди (Cu) во всех образцах исходит от медных сеток-подложек.

Аналогичный подход был использован для изучения воздействия стресса, вызванного инфекцией бактериофагами болезнетворных бактерий *Pseudomonas aeruginosa* [25]. Для того, чтобы исключить перекрывание пиков К α (2.013 кэВ) фосфора (P) и M-линии (1.914 кэВ) осмия (Os), использующегося для фиксации, образцы были контрастированы 2% молибдатом аммония. Все ЭДРС-спектры были нормированы на пик С и наложены друг на друга (рис. 5А).

Пик фосфора, отражающий содержание ДНК, увеличился после заражения, что, видимо, может свидетельствовать об одновременном существова-

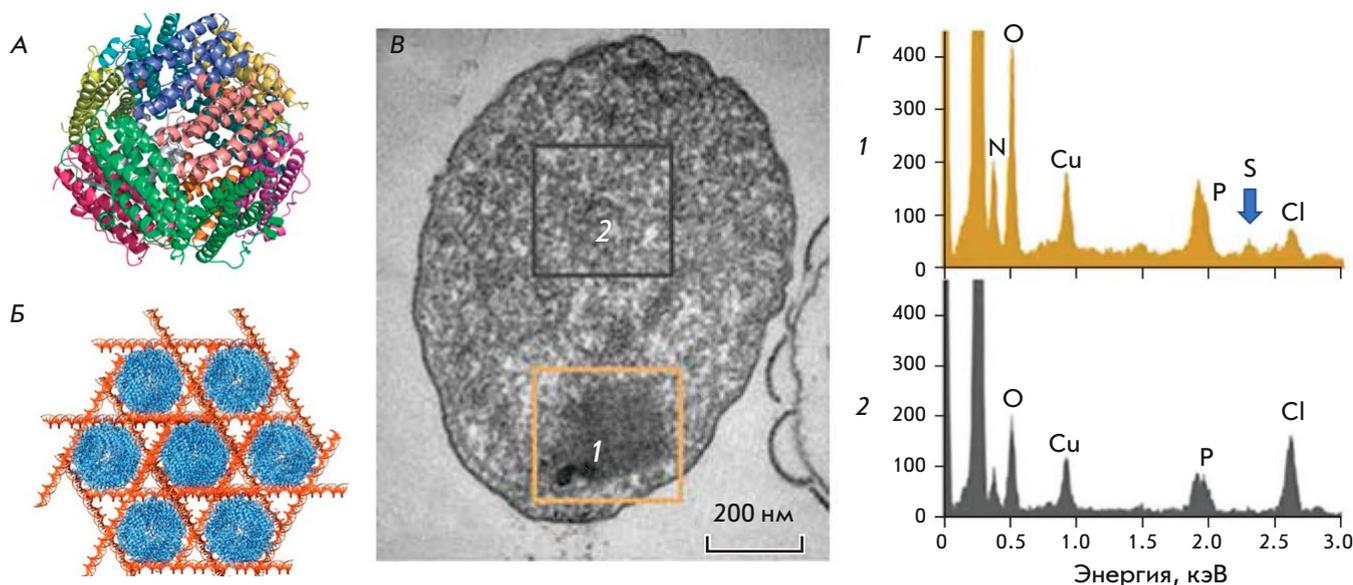


Рис. 4. А – структура белка Dps; Б – модель нанокристаллического массива при образовании комплекса ДНК–Dps, построенная на основе криотомографии из [23] (открытый источник); В – ПЭМ-изображение нанокристаллической конденсированной структуры ДНК–Dps в покоящейся клетке *E. coli*, голодающей в течение 7 мес. (из [20], открытый источник): 1 – нанокристаллический тип конденсации; 2 – контрольная область нуклеоида. Г – спектры ЭДРС из выбранных областей 1 (конденсированный нуклеоид) и 2 (контроль) на предыдущем изображении. Синей стрелкой отмечено положение пика серы в спектре области 1

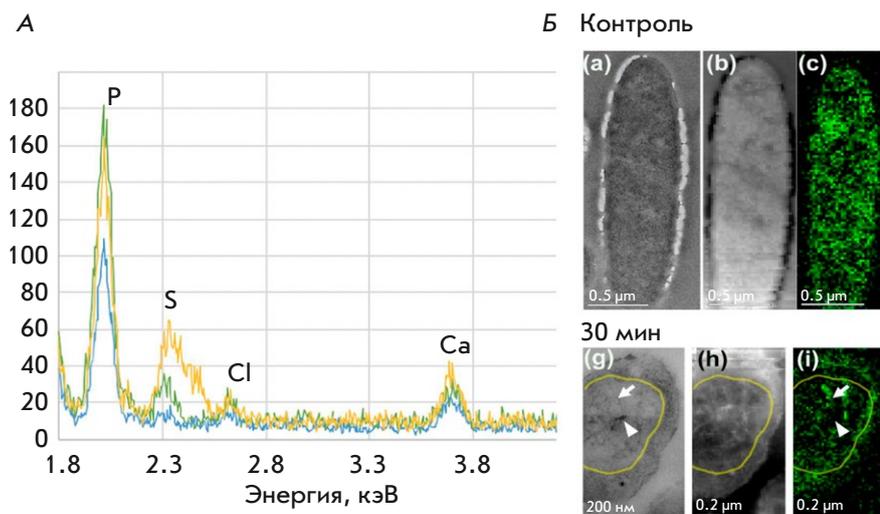


Рис. 5. Изучение элементного строения клеток *P. aeruginosa*, зараженных бактериофагом PhiKZ, методом аналитической микроскопии. А – ЭДРС-спектры контрольных клеток (синий) и через 15 (зеленый) и 30 мин (желтый) после заражения фагом PhiKZ. Наложенные ЭДРС-спектры нормированы по пику углерода (не показан на графике). Пики обозначены следующим образом: P – фосфор; S – сера; Cl – хлор; Ca – кальций. Б – распределение фаговой и бактериальной ДНК в контрольных и инфицированных клетках *P. aeruginosa*. ПЭМ-изображение (а, g); HAADF-изображение (b, h) и спектроскопия потерь энергии электронов (СХПЭЭ) фосфора в псевдодре (с, i). Сигнал фосфора (P) отображен после вычитания фона и коррекции многократного рассеяния с помощью деконволюции Фурье-спектров. Стрелки указывают на ДНК, треугольнички – на участки, не содержащие P; желтой линией отмечена граница псевдодрей (из [25], открытый источник)

нии в клетке как фаговой ДНК, содержание которой увеличивается в процессе заражения, так и ДНК хозяина. Исследование методом ПЦР показало, что значительный уровень бактериальной ДНК сохраняется даже через 40 мин после заражения фагом [25]. Авторы отметили, что через 15 мин после заражения бактериофагом на ЭДРС-спектре появился небольшой пик серы (рис. 5А). Этот пик увеличился через 30 мин после заражения, что может свидетельствовать о реакции бактериальной клетки на стресс повышением синтеза антистрессового белка Dps.

МЕТОД СПЕКТРОСКОПИИ ХАРАКТЕРИСТИЧЕСКИХ ПОТЕРЬ ЭНЕРГИИ ЭЛЕКТРОНОВ (СХПЭЭ)

Метод СХПЭЭ основан на детектировании первичного сигнала, а именно, на измерении энергии, которая теряется частью прошедших через образец электронов в результате возбуждения атомов образца [8]. При регистрации спектров измеряются потери энергии неупругорассеянных электронов, прошедших через образец (рис. 2Б). Соответственно, метод СХПЭЭ учитывает все процессы неупругого рассеяния электронов, включающие коллективные возбуждения валентных электронов (плазмонные возбуждения), возбуждение внутренних оболочек атомов, эмиссию тормозного рентгеновского излуче-

ния с непрерывным спектром (тормозное излучение) и др. [26].

Первичный электрон в колонне просвечивающего электронного микроскопа при прохождении через образец вступает во взаимодействие с электроном внутренней К-оболочки атома образца и отдает ему часть своей энергии (рис. 2Б). При этом электрон, получивший энергию, переходит в возбужденное состояние. Поскольку все энергетические уровни ниже уровня Ферми заняты электронами в основном состоянии, электрон в возбужденном состоянии может перейти только на один из незанятых энергетических уровней выше уровня Ферми [26] (рис. 2). Таким образом, когда падающий электрон, проходя через образец, теряет количество энергии, большее чем ΔE , которое соответствует разнице энергий между К-оболочкой и уровнем Ферми, то вероятность перехода электрона с К-оболочки атома образца на незанятый энергетический уровень выше уровня Ферми резко возрастает. В результате при построении спектра потерь энергии электронов (графика зависимости количества прошедших через образец электронов (интенсивности сигнала) от величины потери энергии) в спектре потерь энергии возникает острый пик, начинающийся со значения ΔE (рис. 2Г). При этом у данного пика имеется «хвост» в области более высоких энер-

гий. Благодаря такой форме, пик в спектре потерь энергии называют краем (поглощения). Поскольку пороговая энергия края является определенной для каждого химического элемента, то по значению ΔE в спектре потерь можно проводить идентификацию элементов в образце [8], а также элементный анализ и отслеживать состояние химической связи и расстояние между атомами образца, измеряя интенсивность характерных потерь энергии электронов (рис. 2Г). Метод СХПЭЭ, как правило, предназначен для работы со спектрами тонкой структуры элементов, определения природы химических связей и полосы проводимости веществ.

Элементный анализ методом СХПЭЭ обычно проводят с использованием постколлоидного энергетического фильтра (рис. 1А) (например, GIF Quantum ER, Gatan, США). В таком случае можно говорить об энергетически фильтруемой просвечивающей электронной микроскопии (ЭФПЭМ). Ввиду ограничения по толщине образцов, анализируемых этим методом [26], при проведении элементного анализа методом СХПЭЭ чаще всего используют ультратонкие срезы образцов. Спектры СХПЭЭ регистрируют от выбранных участков образца в диапазоне энергий от 100 до 600 эВ в темнопольном сканирующем режиме с использованием HAADF-детектора. В указанный диапазон энергий входят наиболее интенсивные пики биологически значимых элементов P, N, O и Ca, выявляемых в спектрах потерь энергии электронов.

Недавно картирование методом СХПЭЭ использовали для визуализации фаговой ДНК в псевдоядре, образованном при заражении бактерий гигантским бактериофагом phiKZ [25]. Распределение ДНК в цитоплазме бактерий оценивали, используя сигнал фосфора, который был наложен на HAADF-изображение клетки (рис. 5Б). Все исследуемые клетки содержат сигнал фосфора, но его пространственное распределение различается в зависимости от времени после заражения. В неинфицированных клетках сигнал фосфора был равномерно распределен по всей цитоплазме, что отражает диффузное расположение нуклеоида (рис. 5Б (с)). Такое же равномерное распределение фосфора (положение нуклеоида) обнаружено в цитоплазме на 15-й мин после заражения; но при этом общая интенсивность сигнала была выше, чем в контрольных клетках. Через 30 мин после заражения псевдоядра становились почти сферическими и перемещались ближе к центру клетки, что показано и в ряде других работ [27, 28]. При этом паттерн распределения фосфора значительно изменялся и выявлялась сложная структура сети фаговой ДНК внутри псевдоядра (рис. 5Б (i)).

ИДЕНТИФИКАЦИЯ И КАРТИРОВАНИЕ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ В ВИРУСАХ

В настоящее время особый интерес вызывает проверка возможности картирования нуклеиновых кислот на примере значительно более мелких объектов – вирусов и бактериофагов. Ранее были опубликованы результаты нескольких исследований, в которых проведен элементный анализ отдельных вирионов [19, 29, 30]. Первое такое исследование было проведено в 1980 году [19]. Фосфор картировали на срезах залитых в эпоксидную смолу частиц вируса лейкоза мышей (MuLV, murine leukemia virus). Авторам удалось зарегистрировать сигнал фосфора, входящего в состав липидов вирусной мембраны. В 1998 году [29] опубликовали исследование срезов клеток, зараженных коронавирусом трансмиссивного гастроэнтерита. Авторы утверждают, что им удалось зарегистрировать сигнал фосфора от отдельных вирусных частиц внутри клеток, однако качество представленных изображений оставляет желать лучшего, и они допускают неоднозначную интерпретацию. В более поздней работе [30] было описано элементное картирование целых вирионов бактериофага лямбда в составе пленок. Все эти эксперименты выполнены с использованием метода ЭФПЭМ.

В более поздних работах для элементного картирования было предложено использовать сканирующую просвечивающую электронную микроскопию в сочетании с электронной микроскопией с энергетической фильтрацией (СПЭМ-СХПЭЭ) [31]. Эта оригинальная методика позволяет получать изображения при меньшей дозе электронов, чем традиционная ЭФПЭМ. Данный подход значительно повышает чувствительность метода за счет применения комплексного СПЭМ-СХПЭЭ-анализа и использования охлаждающего держателя образцов для минимизации радиационного повреждения. Охлаждающий держатель образцов для ПЭМ может поддерживать наблюдаемый образец при температуре жидкого азота, что уменьшает повреждение образца электронным пучком и позволяет изучать структуру при низких температурах. Это особенно важно для биологических образцов [32].

С помощью метода СПЭМ-СХПЭЭ были исследованы различные ДНК- и РНК-содержащие вирусы. Оказалось, что контрастирование образца 2% молибдатом аммония вместо ацетата урана позволяет более точно определить положение пика поглощения фосфора (граница поглощения вблизи 132 эВ), так как пик поглощения урана (граница поглощения 96 эВ) находится вблизи пика поглощения фосфора и мешает вычитанию фона. Пик поглощения молибдена характеризуется границей поглощения около 400 эВ.

При тестировании метода СПЭМ-СХПЭЭ исследовали содержание нуклеиновой кислоты внутри капсида гигантского фага phiEL. Диаметр капсида этого бактериофага равен 145 нм [33], а его геном состоит из 211 т.п.н. [34], то есть он содержит 422 тыс. атомов фосфора в составе двухцепочечной ДНК. В этой работе удалось картировать расположение ДНК в капсиде бактериофага и продемонстрировать наличие в нем внутреннего тела – белкового образования, на которое намотана геномная ДНК (рис. 6В,Г) [31].

Метод СПЭМ-СХПЭЭ использовали также для исследования содержания фосфора в очищенных инактивированных частицах SARS-CoV-2, входящих в состав вакцины КовиВак (производства ФГБНУ «Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М.П. Чумакова РАН») [35]. SARS-CoV-2 – это вирус диаметром около 200 нм, геном которого представлен одноцепочечной РНК длиной примерно 30 т.п.н. Таким образом, содержание фосфора в капсиде SARS-CoV-2 как минимум в 5 раз меньше, чем у гигантского бактериофага (с учетом наличия у вируса липидной оболочки). Использование методики элементного анализа состава предоставленных вирионов (СПЭМ-СХПЭЭ) позволило подтвердить присутствие в них нуклеиновой кислоты. На рис. 7А представлены ПЭМ-изображение вириона и соответствующая ему карта локального распределения фосфора. Сигнал фосфора регистрировался только от внутренней части вириона, но не от подложки вне него (рис. 7Б). Представляется более вероятным, что источником сигнала фосфора является РНК, а не липидная оболочка вируса, так как сигнал неравномерно распределен по вириону, что показано и в предыдущих работах [36].

Наконец, применение метода СПЭМ-СХПЭЭ позволило выявить распределение значительно меньшего количества РНК внутри очищенных инактивированных вирионов клещевого энцефалита (ВКЭ) [37]. Нуклеокапсиды ВКЭ имеют диаметр 50 нм, а геномная одноцепочечная РНК содержит всего лишь около 11 т.п.н. (рис. 8А). Все вирионы, использованные в этом эксперименте, демонстрировали сигнал фосфора (рис. 8Б), максимальный в центральной части вириона, но не на периферии. Это косвенно свидетельствует о том, что источником сигнала в данном случае был фосфор из РНК. Подобное неравномерное распределение фосфорного сигнала наблюдалось также в вирионах SARS-CoV-2 (рис. 7А) и капсидах бактериофагов phiEL (рис. 6). Изученные вирионы ВКЭ отличались по интенсивности сигнала (рис. 8Б). Можно предположить, что вирионы с очень низким сигналом фос-

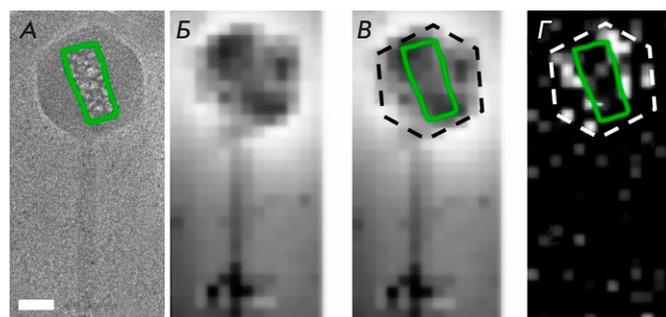


Рис. 6. Расположение внутреннего тела в бактериофаге phiEL показано с помощью картирования фосфора. А – полученное с помощью криоэлектронной микроскопии изображение бактериофага phiEL, облученного высокой дозой электронов. Область внутреннего тела выделена линией зеленого цвета. Масштабный отрезок – 50 нм. Б, В – темнопольное изображение в высокоугловых рассеянных электронах (HAADF) бактериофага phiEL. Границы капсида отмечены пунктирной линией черного цвета, область внутреннего тела выделена линией зеленого цвета (В). Г – карта распределения фосфора. Интенсивность пикселей отражает уровень сигнала элемента в спектрах характеристических потерь энергии электронами. Границы капсида отмечены пунктирной линией белого цвета; внутреннее тело показано линией зеленого цвета (из [31], воспроизведено с разрешением)

фора (рис. 8Б) утратили РНК или структура РНК в них разупорядочена в результате инактивации формальдегидом [38].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Просвечивающая электронная микроскопия (ПЭМ) позволяет раскрыть сложность структуры клеток с нанометровым разрешением, но интерпретация макромолекулярной функциональности затруднена из-за сложности распознавания изображений с неидентифицированным молекулярным содержанием. Если дополнить ПЭМ энергодисперсионным рентгеновским анализом (ЭДРС), позволяющим анализировать данные на основе элементного состава, то эндогенные везикулы, различные метки (наночастицы на основе золота или кадмия), а также нуклеиновые кислоты можно проанализировать с ультраструктурным разрешением. Комплексный СПЭМ-СХПЭЭ-анализ и использование охлаждающего держателя образцов для минимизации радиационного повреждения позволяют картировать содержание фосфора (а, следовательно, расположение нуклеиновых кислот) в нанометровых объектах (50–200 нм), в том числе в инактивированных вирусах. Данный метод успешно применен для визуализации межмолекулярных взаимодействий и де-

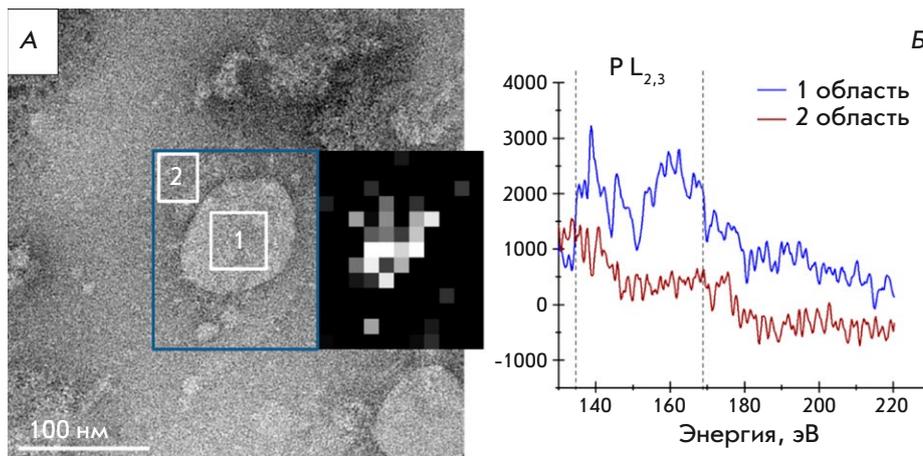


Рис. 7. Изображение инактивированного вириона SARS-CoV-2 и анализ его элементного состава. А – карта распределения фосфора, совмещенная с ПЭМ-изображением. Б – графики СХПЭЭ-спектров, полученные от вириона (область 1 на изображении (7А)) и от участка подложки вне него (область 2 на изображении (7А)) (из [35], воспроизведено с разрешением)

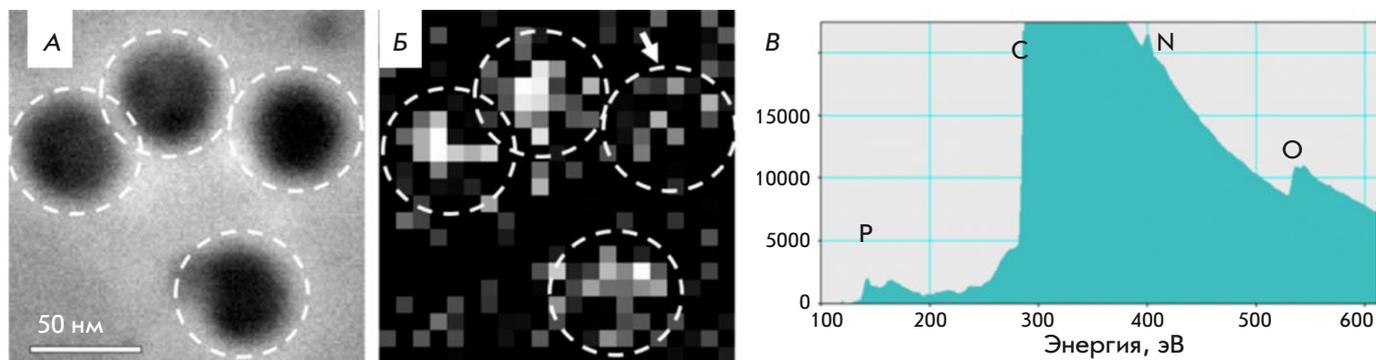


Рис. 8. СПЭМ-СХПЭЭ-анализ ВКЭ. А – СПЭМ-изображение вирионов вируса клещевого энцефалита; Б – карта распределения фосфорных СХПЭЭ-сигналов в том же образце; белые пунктирные линии обозначают границы вирионов, а стрелка указывает на вирион с низким фосфорным сигналом. В – СХПЭЭ-спектр от одного репрезентативного вириона. Буквами обозначены положения краев спектра для соответствующих элементов: Р – фосфор, С – углерод, N – азот и О – кислород (из [37], открытый источник)

текции изменений, происходящих с ДНК в клетке при вирусном заражении. Построение элементных карт фосфора в вирионах наноразмера происходит на пределе обнаружения для метода СХПЭЭ, поэтому получаемые данные, как правило, имеют низкое отношение сигнал/шум. Однако даже в этом случае метод СХПЭЭ подтверждает присутствие РНК в большинстве исследованных частиц и прекрасно согласуется с результатами других работ [38].

Элементное картирование может быть применено для получения объективной биомедицинской информации, так как при исследовании этим методом вирусоподобных частиц, разрабатываемых в качестве компонентов новых вакцин, наличие сигнала фосфора не выявляется. Можно предположить, что применение элементного картирования позволит в дальнейшем проводить экспериментальный анализ вирусов и вирусоподобных частиц и сделает

аналитическую электронную микроскопию перспективным инструментом тестирования биомедицинской продукции. ●

Авторы приносят благодарности коллегам, без которых ряд цитируемых работ не был бы опубликован: А.М. Егорову, Т.В. Гребенниковой, Ю.Ф. Крупянскому, Д.И. Осолодкину, М.В. Буркальцевой, В.Н. Крылову, М.В. Якуниной.

Аналитическая электронная микроскопия проводилась на базе ЦКП «Электронная микроскопия в науках о жизни» МГУ (УНУ «Трехмерная электронная микроскопия и спектроскопия»).

Работа поддержана грантом РФФ № 19-74-30003.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Philimonenko V.V., Philimonenko A.A., Šloufová I., Hrubý M., Novotný F., Halbhuber Z., Krivjanská M., Nebesářová J., Šlouf M., Hozák P. // *Histochem. Cell. Biol.* 2014. V. 141. № 3. P. 229–239. doi: 10.1007/s00418-013-1178-6.
2. Turk M., Baumeister W. // *FEBS Lett.* 2020. V. 594. № 20. P. 3243–3261. doi: 10.1002/1873-3468.13948.
3. Nakane T., Kotecha A., Sente A., McMullan G., Masiulis S., Brown P.M.G.E., Grigoras I.T., Malinauskaitė L., Malinauskas T., Miehlung J., et al. // *Nature.* 2020. V. 587. № 7832. P. 152–156. doi: 10.1038/s41586-020-2829-0.
4. Yip K.M., Fischer N., Paknia E., Chari A., Stark H. // *Nature.* 2020. V. 587. № 7832. P. 157–161. doi: 10.1038/s41586-020-2833-4. Epub 2020 Oct 21. PMID: 33087927.
5. Martin J.S., Renshaw S.A. // *Biochem. Soc. Trans.* 2009. V. 37. Pt 4. P. 830–837. doi: 10.1042/BST0370830.
6. Hell S.W. // *Angew. Chem. Int. Ed Engl.* 2015. V. 54. № 28. P. 8054–8066. doi: 10.1002/anie.201504181.
7. Frank J. // *Angew. Chem. Int. Ed Engl.* 2018. V. 57. № 34. P. 10826–10841. doi: 10.1002/anie.201802770.
8. Egerton R.F. // *Rep. Progr. Phys.* 2009. V. 72. № 1. P. 016502.
9. Brydson R., Brown A., Benning L.G., Livi K. // *Rev. Mineral Geochem.* 2014. V. 78. P. 219–269.
10. Warley A. // *J. Microscopy.* 2016. V. 261. № 2. P. 177–184.
11. Bird R.P., Eskin N.A.M. // *Adv. Food. Nutr. Res.* 2021. V. 96. P. 27–88. doi: 10.1016/bs.afnr.2021.02.001.
12. Васильева С.Г., Зайцев П.А., Баулина О.И., Лобакова Е.С., Соловченко А.Е., Горелова О.А. // *Российские нанотехнологии.* 2023. Т. 18. № 1. С. 53–62. doi: 10.56304/S1992722323010168.
13. Bazett-Jones D.P., Hendzel M.J. // *Methods.* 1999. V. 17. № 2. P. 188–200. doi: 10.1006/meth.1998.0729.
14. Brintlinger T.H., Buckhout-White S., Bassim N.D., Mathur D., Samanta A., Robinson J.T., Idrobo J.C., Stroud R.M., Goldman E.R., Ancona M.G. // *ACS Appl. Nano Materials.* 2020. V. 3. № 2. P. 1123–1130.
15. Scott J.F. // *Biochim. Biophys. Acta.* 1948. V. 2. P. 1–6.
16. Scotuzzi M., Kuipers J., Wensveen D.I., de Boer P., Hagen K.C., Hoogenboom J.P., Giepmans B.N. // *Sci. Rep.* 2017. V. 7. P. 45970. doi: 10.1038/srep45970.
17. Shebanova A., Ismagulova T., Solovchenko A., Baulina O., Lobakova E., Ivanova A., Moiseenko A., Shaitan K., Polshakov V., et al. // *Protoplasma.* 2017. V. 254. № 3. P. 1323–1340. doi: 10.1007/s00709-016-1024-5.
18. Aronova M.A., Kim Y.C., Harmon R., Sousa A.A., Zhang G., Leapman R.D. // *J. Struct. Biol.* 2007. V. 160. № 1. P. 35–48. <https://doi.org/10.1016/j.jsb.2007.06.008>
19. Ottensmeyer F.P., Andrew J.W. // *J. Ultrastruct. Res.* 1980. V. 72. № 3. P. 336–348. [https://doi.org/10.1016/s0022-5320\(80\)90069-6](https://doi.org/10.1016/s0022-5320(80)90069-6)
20. Loiko N., Danilova Y., Moiseenko A., Kovalenko V., Tereshkina K., Tutukina M., Galina El-Registan G., Sokolova O., Krupyanskiy Y. // *PLoS One.* 2020. V. 15. № 10. P. e0231562. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0231562>
21. Antipov S.S., Tutukina M.N., Preobrazhenskaya E.V., Kondrashov F.A., Patrushev M.V., Toshchakov S.V., Dominova I., Shvyreva U.S., Vrublevskaia V.V., Morenkov O.S., et al. // *PLoS One.* 2017. V. 12. № 8. P. e0182800.
22. Minsky A., Shimoni E., Frenkiel-Krispin D. // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2002. V. 3. № 1. P. 50–60.
23. Kamyshinsky R., Chesnokov Yu., Dadinova L., Mozhaev A., Orlov I., Petoukhov M., Orekhov A., Shtykova E., Vasiliev A. // *Biomolecules.* 2019. V. 10. № 1. P. 39.
24. Frenkiel-Krispin D., Minsky A. // *J. Struct. Biol.* 2006. V. 156. № 2. P. 311–319.
25. Danilova Y.A., Belousova V.V., Moiseenko A.V., Vishnyakov I.E., Yakunina M.V., Sokolova O.S. // *Viruses.* 2020. V. 12. № 10. P. 1197. doi: 10.3390/v12101197.
26. Ойкава Т., Синдо Д. Аналитическая просвечивающая электронная микроскопия. М.: Техносфера, 2006. 256 с.
27. Mendoza S.D., Nieweglowska E.S., Govindarajan S., Leon L.M., Berry J.D., Tiwari A., Chaikerasak V., Pogliano J., Agard D.A., Bondy-Denomy J. // *Nature.* 2020. V. 577. P. 244–248.
28. Chaikerasak V., Nguyen K., Khanna K., Brilot A.F., Erb M.L., Coker J.K.C., Vavilina A., Newton G.L., Buschauer R., Pogliano K., et al. // *Science.* 2017. V. 355. P. 194–197.
29. Quintana C., Marco S., Bonnet N., Risco C., Gutiérrez M.L., Guerrero A., Carrascosa J.L. // *Micron.* 1998. V. 29. № 4. P. 297–307. doi: 10.1016/s0968-4328(98)00011-0.
30. Nevsten P., Evilevitch A., Wallenberg R. // *J. Biol. Phys.* 2012. V. 38. № 2. P. 229–240. doi: 10.1007/s10867-011-9234-8.
31. Трифонова Т.С., Моисеенко А.В., Буркальцева М.В., Шабурова О.В., Шайтан А.К., Крылов В.Н., Соколова О.С. // *Вопросы вирусологии.* 2021. Т. 66. № 6. С. 434–441. doi: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-80>.
32. Mishyna M., Volokh O., Danilova Ya., Gerasimova N., Pechnikova E., Sokolova O.S. // *Micron.* 2017. V. 96. P. 57–64.
33. Sokolova O.S., Shaburova O.V., Pechnikova E.V., Shaytan A.K., Krylov S.V., Kiselev N.A., Krylov V.N. // *Virology.* 2014. V. 468–470. P. 472–478. doi: 10.1016/j.virol.2014.09.002.
34. Cornelissen A., Hardies S.C., Shaburova O.V., Krylov V.N., Mattheus W., Kropinski A.M., Lavigne R. // *J. Virol.* 2012. V. 86. № 3. P. 1844–1852. doi: 10.1128/JVI.06330-11.
35. Bagrov D.V., Glukhov G.S., Moiseenko A.V., Karlova M.G., Litvinov D.S., Zaitsev P.A., Kozlovskaya L.I., Shishova A.A., Kovpak A.A., Ivin Y.Y., et al. // *Microscopy Res. Technique.* 2022. V. 85. № 2. P. 562–569.
36. Klein S., Cortese M., Winter S.L., Wachsmuth-Melm M., Neufeldt C.J., Cerikan B., Stanifer M.L., Boulant S., Bartenschlager R., Chlanda P. // *Nat. Commun.* 2020. V. 11. P. 5885. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-19619-7>
37. Moiseenko A.V., Bagrov D.V., Vorovitch M.F., Uvarova V.I., Veselov M.M., Kashchenko A.V., Ivanova A.L., Osolodkin D.I., Egorov A.M., Ishmukhametov A.A., et al. // *Biomedicines.* 2022. V. 10. P. 2478. <https://doi.org/10.3390/biomedicines10102478>
38. Moiseenko A., Zhang Y., Vorovitch M.F., Ivanova A.L., Liu Z., Osolodkin D.I., Egorov A.M., Ishmukhametov A.A., Sokolova O.S. // *Emerging Microbes & Infections.* 2024. V. 13. № 1. P. 2290833.