

УДК 616.981.51:621.385.833

Н.П.Коннов<sup>1</sup>, Ю.П.Волков<sup>1</sup>, А.Ю.Корсакова<sup>1</sup>, Т.В.Данилова<sup>2</sup>, Н.И.Микшис<sup>1</sup>, А.О.Мантуров<sup>2</sup>,  
О.С.Кузнецов<sup>1</sup>, Ю.А.Попов<sup>1</sup>, М.Н.Киреев<sup>1</sup>

## ТРАНСМИССИОННАЯ ЭЛЕКТРОННАЯ И СКАНИРУЮЩАЯ СИЛОВАЯ МИКРОСКОПИЯ БЕЛКОВ S-СЛОЯ СИБИРЕЯЗВЕННОГО МИКРОБА

<sup>1</sup>Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», Саратов;  
<sup>2</sup>Саратовский государственный технический университет

Проведено исследование белков S-слоя сибиреязвенного микроба методами трансмиссионной электронной (ТЭМ) и сканирующей атомно-силовой микроскопии (АСМ). Для анализа скрытого изображения структуры белков применен метод прямого преобразования Фурье, показавший строго выраженную периодичность и волнообразную симметрию наноструктур исследуемого объекта. АСМ позволила наблюдать трехмерную наноструктурную организацию белков.

Последние два десятилетия исследователи, работающие в области микробиологии и инфекционной иммунологии, уделяют пристальное внимание S-слоям как грамположительных, так и грамотрицательных микроорганизмов [3, 7, 9, 12, 13].

Такой интерес обусловлен тем, что S-слои, составляющие приблизительно 10 % бактериального белка, являются компонентами сложной поверхностной клеточной организации, функциональная роль которых определяется специфическим взаимодействием с ассоциированными надмолекулярными структурами.

S-слой представлен протеиновыми или гликопротеидными субъединицами, регулярно расположенными на поверхности клетки, их молекулярная масса колеблется от 40 до 200 кДа [5]. Субъединицы S-слоя располагаются с высокой плотностью (до  $5 \cdot 10^5$  на клетку) на поверхности бактерий в виде паракристаллических моно- или многослойных сетей, имеющих гексагональную (р6), тетрагональную (р4) или наклонную (р2) симметрию [8].

Существенный вклад в изучение тонкой организации S-слоев внесли исследования с использованием методов ТЭМ [6, 9, 13] и АСМ [4].

Современные ТЭМ достигают разрешения 0,19–0,2 нм, однако биологические объекты не могут исследоваться с таким разрешением, поскольку они слабо рассеивают и поглощают электроны. Необходимость их фиксации, контрастирования, неоднородное проникновение контрастирующего вещества внутрь структуры, его деформирующее действие, неустраняемые приборные ограничения (связанные со сферической аберрацией), являются препятствиями изучения наноструктур биологических объектов.

Необходимость в высоком разрешении привела к разработке новых приемов и методов. Особое место занимают вопросы трактовки электронно-микроскопических изображений, для чего разработаны физические и математические методы обработки информации [2, 3]. Наиболее распространенным является метод преобразования Фурье, представляющий распределение амплитуд изображения исследуемого объекта в виде суммы пространственных гармонических колебаний, отличающихся перио-

дом, амплитудой и фазой. Это позволяет обнаруживать и выделять скрытые периодичности в исследуемом объекте, что особенно важно для изучения паракристаллических структур типа S-слоев.

Здесь мы ограничимся лишь кратким изложением преобразования Фурье, применимым к изучению белков S-слоя сибиреязвенного микроба.

Исследование белков S-слоя сибиреязвенного микроба проводилось на бесплазмидном протеазо-негативном производном вакцинного штамма *B. anthracis* Sterne 34F2 ΔT (Prt<sup>-</sup>). Выделение и очистку белка Sap проводили согласно процедуре J.Farchaus *et al.* [11]. Белок EA1 выделяли по модифицированной методике J.Ezzell и G.Abshire [10]. Перед электронной микроскопией дополнительно проводили диализ очищенных препаратов белков Sap и EA1, против 10 объемов раствора: 10 мМ  $K_2HPO_4$ - $KH_2PO_4$ ; 2 мМ ЭДТА; 0,1 мМ фенилметилсульфонилфторид (ФМСФ) pH 8,0 – в течение 12 ч при температуре 4 °С, затем диализовали против 70 объемов раствора: 5 мМ ацетата натрия; 1 мМ ЭДТА; 0,1 мМ ФМСФ (pH 5,0) – в течение 12 ч при температуре 4 °С. Очищенный диализом препарат центрифугировали 30 мин при 12000 об/мин и температуре 5 °С, осадок ресуспендировали в диализном буфере и разводили 1:10 тем же буфером. Подготовленный таким образом препарат наносили на сетку с углеродной подложкой и высушивали в течение 15–20 мин. Окрашивали 1,5 % раствором фосфорно-вольфрамовой кислоты (ФВК) или 2 % раствором уранил-ацетата в течение 1,5–2 мин. Препараты просматривали на электронном микроскопе Hitachi HU-12A (Япония). При изучении белков с помощью АСМ изучаемый материал наносился на свежий скол слюды. После подсыхания белка препарат сканировался в режиме постоянной силы ( $2,6 \cdot 10^{-9}$  Н).

При просмотре препаратов белка в ТЭМ обнаруживались мелкие решетчатые структуры размером  $7 \times 9$  нм со строго выраженной наклонной симметрией (рис. 1, а, б).

Для более детального исследования пространственной наноструктурной организации изображения белков S-слоя был применен метод прямого преобразования Фурье, позволяющий выявить

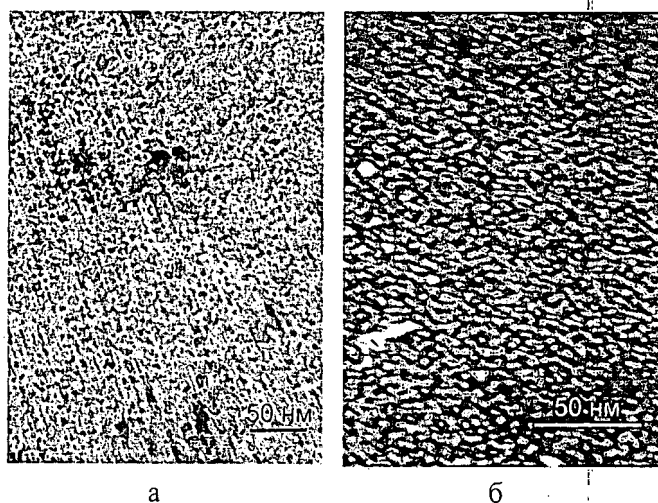


Рис. 1. Электронограммы препаратов белков Sap (а) и EA1 (б), выделенных из штамма *B. anthracis* Sterne 34F2 ΔT (Ргг) после диализа и негативного контрастирования

скрытое изображение в исследуемом объекте. Фрагмент исходного изображения белка (рис. 1, а) был отсканирован и представлен в виде точечного рисунка  $S_1$  с разрешением  $2200 \times 1846$  точек на дюйм. Цвет каждой точки соответствовал определенному значению интенсивности в диапазоне от 0 до 255 (от черного цвета к белому). Каждая строка полученного точечного рисунка рассматривалась как дискретная последовательность  $X_i$ . Путем поворота  $S_1$  на 90 градусов было получено изображение  $S_2$ .

Для изображений  $S_1$  и  $S_2$  был рассчитан Фурье-спектр мощности, определенный как

$$G_{cp} = \frac{1}{M} \sum_{i=0}^{M-1} G_i$$

где  $G_i$  – Фурье-спектр мощности  $i$ -й строки,  $M$  – количество строк в изображении.

$$G_i(k) = \sum_{n=0}^{N-1} x_i(n) e^{-j(2\pi/N)nk}, \quad (k = 0, 1, 2, \dots, N-1)$$

где  $G_i(k)$  – значение  $k$ -й составляющей спектра  $i$ -й строки,  $N$  – количество точек в строке,  $x_i(n)$  – значение  $n$ -й составляющей  $i$ -й строки.

Полученные спектры мощности изображений  $S_1$  и  $S_2$  представлены на рис. 2. По горизонтали от-

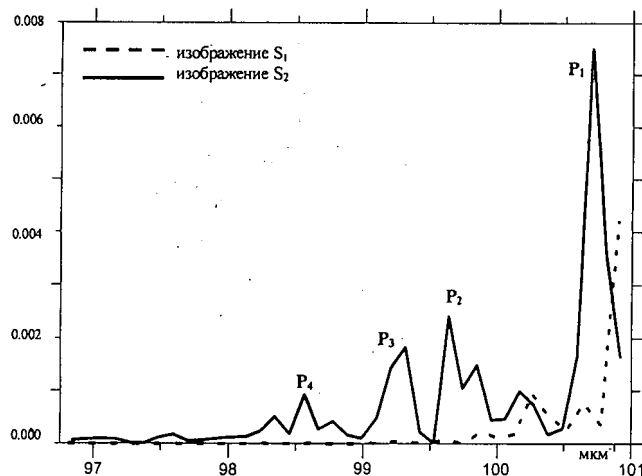


Рис. 2. График спектров мощности изображений  $S_1$  и  $S_2$

ложено значение пространственной частоты в  $\text{мкм}^{-1}$ . Полученные величины соответствуют характерным линейным размерам рассматриваемого объекта.

На графике спектра мощности  $S_2$  отчетливо выражены локальные максимумы  $P_1, P_2, P_3, P_4$  в диапазонах  $100,2-100,7; 99,6-99,8; 99,2-99,4; 98,2-98,6 \text{ мкм}^{-1}$ .

Изображение  $S_2$  было подвергнуто полосовой фильтрации в диапазонах частот, соответствующих локальным максимумам. Полученные в результате фильтрации изображения представлены на рис. 3.

ТЭМ-исследование белков S-слоя сибиреязвенного микроба, с использованием преобразования Фурье, дает наглядную картину их наноструктур со строго выраженной периодичностью и волнообразной симметрией.

АСМ является уникальным прибором, дающим трехмерное изображение поверхности неконтрастированных биологических объектов с нанометровым разрешением в условиях, близких к таковым *in vivo* [1]. На АСМ-изображениях отчетливо видны параллельные ряды упорядоченных линейных цепочек белков с высотами 2–3 нм для белка Sap (рис. 4, а) и 7–8 нм для EA1 (рис. 4, б).

Таким образом исследование белков сибиреязвенного микроба методами ТЕМ и АСМ показало хорошую корреляцию, симметричность и упорядо-

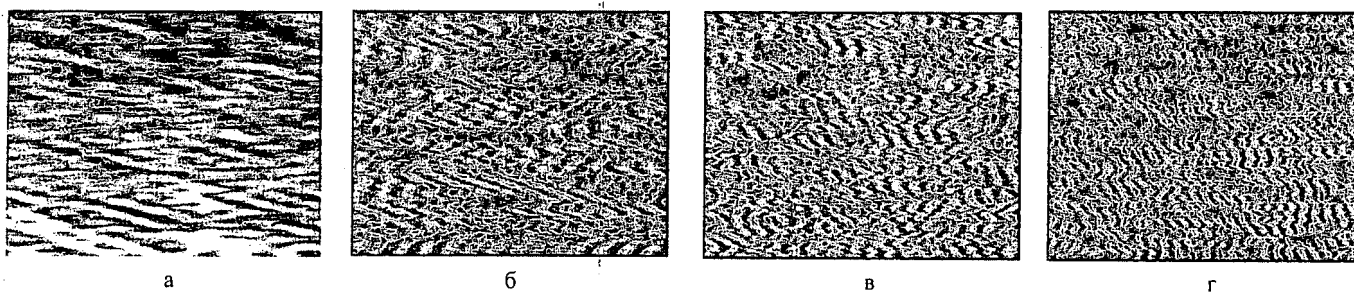


Рис. 3. Результат полосовой фильтрации изображения  $S_2$  в диапазоне частот:

- а)  $100,2-100,7 \text{ мкм}^{-1}$  (локальный максимум  $P_1$  на рис. 2); б)  $99,6-99,8 \text{ мкм}^{-1}$  (локальный максимум  $P_2$  на рис. 2); в)  $99,2-99,4 \text{ мкм}^{-1}$  (локальный максимум  $P_3$  на рис. 2); г)  $98,2-98,6 \text{ мкм}^{-1}$  (локальный максимум  $P_4$  на рис. 2)

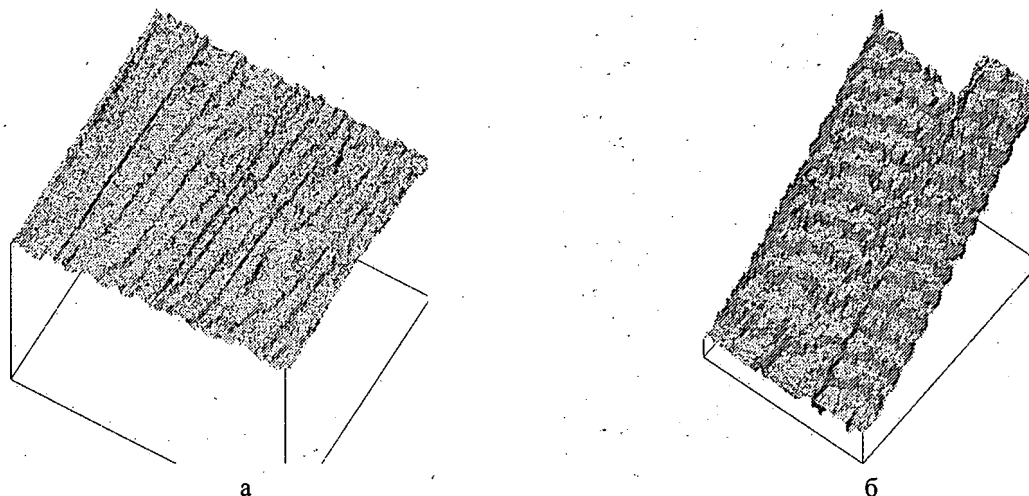


Рис. 4. АСМ-изображение препаратов белков Sap (а) и EA1 (б),

выделенных из штамма *B. anthracis* Sterne 34F2 ΔT (Pr<sup>+</sup>) после диализа и высушивания на поверхности слюды (сила взаимодействия острия и поверхности 2,6 нН). Размеры участков сканирования составляют 60×60 нм (а) и 100×500 нм (б)

ченность наноструктуры образуемых ими слоев. Полученные данные согласуются с результатами, приведенными в статье [9].

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Байбури В.Б., Волков Ю.П., Коннов Н.П. Многофункциональный комплекс сканирующей зондовой микроскопии и его применение. – Саратов: Изд-во Саратов. ун-та, 1998. – 120 с. – 2. Вайнштейн Б.К. Электронная микроскопия атомного разрешения // УФН. – 1987. – Т. 152. – С. 75–122. – 3. Иваницкий Г.Р., Кринский В.И., Сельков Е.Е. Математическая биофизика клетки. – М.: Наука. – 1978. – 308 с. – 4. Коннов Н.П., Байбури В.Б., Волков Ю.П. и др. // Пробл. особо опасных инф. – 2002. – Вып. 1(83). – С. 90–96. – 5. Северина Л.О. // Микробиология. – 1995. – Т. 64, № 6. – С. 725–733. – 6. Austin J.W., Stewart M., Murray R. // J. Bacteriol. – 1990. – Vol. 172, N 2. – P. 808–817. – 7. Bahl H., Scholz H., Bayan N. *et al.* // FEMS Microbiol. Rev. – 1997. – Vol. 20. – P. 47–98. – 8. Caston J.R., Berenguer J., Kocsis E. *et al.* // J. Struct. Biology. – 1994. – Vol. 113, N 2. – P. 164–176. – 9. Couture-Tosi E., Delacroix H., Mignot T. *et al.* // J. Bacteriol. – 2002. – Vol. 184, N 23. – P. 6448–6456. – 10. Ezzell J., Abshire T. // Infect. Immun. –

1988. – Vol. 56, N 2. – P. 349–356. – 11. Farchaus J., Ribot W., Downs M. *et al.* // J. Bacteriol. – 1995. – Vol. 177. – P. 2481–2489. – 12. Mock M., Fouet A. // Microbiol. Rev. – 2001. – Vol. 55. – P. 647–671. – 13. Sleytr U., Messner P. // J. Bacteriol. – 1998. – Vol. 170. – P. 2891–2897.

N.P.Konnov, Yu.P.Volkov, A.Yu.Korsakova, T.V.Danilova, N.I.Mikshis, A.O.Manturov, O.S.Kuznetsov, Yu.A.Popov, M.N.Kireyev

#### Transmission Electron and Scanning Power Microscopic Studies of Bacillus anthracis S-Layer Proteins

Russian Anti-Plague Research Institute "Microbe", Saratov;  
Saratov State Technical University

S-layer proteins of the anthrax pathogen were studied using the methods of transmissive electron microscopy (TEM) and scanning atom-power microscopy (APM). To analyse the hidden image of the protein structure, the direct Fourier transform method was used which elucidated strictly expressed periodic nature and wave-like symmetry of the nanostructures. Three-dimensional nanostructural organization of the proteins could be seen by means of the APM procedure.

Поступила 15.03.04.

УДК 616.932:616.988.21

В.В.Лобанов, В.В.Сухарь, Н.И.Пасюкова, А.В.Миронова

### ГИДРОФОБНОСТЬ *VIBRIO CHOLERAЕ* И КОЛОНИЗАЦИЯ КИШЕЧНИКА

Ростовский-на-Дону научно-исследовательский противочумный институт

Представлены данные, свидетельствующие о множественности факторов, причастных к колонизации кишечника холерными вибрионами. Адгезию и колонизацию во многом определяют их гидрофобные свойства. Прилипание вибрионов к эпителию тонкой кишки осуществляют, видимо, пили адгезии, а к слизи – гидрофобные группировки липополисахарида. R-мутанты, вследствие высокой чувствительности к комплементу, не способны размножаться в тонком кишечнике новорожденных мышей и крольчат, но способны задерживаться в толстой кишке, по крайней мере, 24 ч.

Колонизация тканей животных микроорганизмами является важным моментом инфекционного процесса. При кишечных инфекциях она начинается

с адгезии бактерий к слизи и затем к тканям-мишеням, что позволяет относить адгезины к факторам патогенности [4, 5]. Для неинвазивных энтеропато-