Письма в ЖЭТФ, том 115, вып. 8, с. 528 – 531 © 2022 г. 25 апреля

# Вынужденное комбинационное рассеяние в суспензиях вируса мозаики альтернантеры и X-вируса картофеля в диапазоне частот 1–15 ГГц

*А. Ф. Бункин*[+], *А. Н. Федоров*[+], *М. А. Давыдов*[+1)], *М. В. Архипенко*[*], *Н. А. Никитин*[*], *С. М. Першин*[+]

[+]*Институт общей физики им. А. М. Прохорова РАН, 119991 Москва, Россия*

[*]*Биологический факультет МГУ им. М. В. Ломоносова, 119234 Москва, Россия*

Поступила в редакцию 10 марта 2022 г.
После переработки 16 марта 2022 г.
Принята к публикации 16 марта 2022 г.

В суспензиях вируса мозаики альтернантеры и X-вируса картофеля были рассчитаны и измерены спектры низкочастотного вынужденного комбинационного рассеяния (ВКР). Расхождение расчетных и измеренных величин частотного сдвига линий рассеяния для X-вируса картофеля обусловлено, по нашему мнению, различием механических свойств вирусов, в частности модуля Юнга, в нативной среде и при измерениях на атомно-силовом микроскопе. В спектрах ВКР данных вирусов зафиксированы различия, позволяющие их идентифицировать.

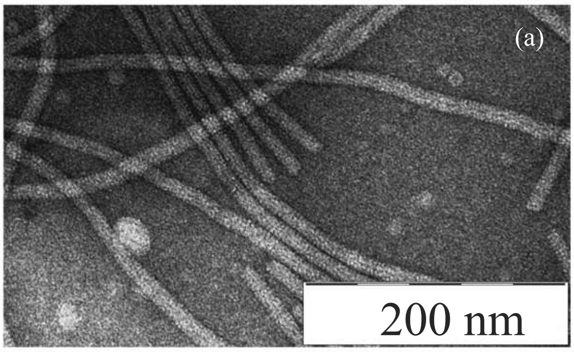
DOI: 10.31857/S1234567822080109

**Введение.** Изучение вирусных частиц (вирионов) необходимо, в первую очередь, для разработки методов воздействия с целью разрушить их молекулярную структуру. Одним из возможных приемов является резонансная "раскачка" вирионов на собственных частотах. Важно, что при данном подходе не затрагивается окружение частицы, на которую осуществляется воздействие, так как данное воздействие является селективным. Также отметим, что стандартные спектроскопические методы непригодны для решения поставленной задачи, поскольку характерные собственные частоты наночастиц вирусов лежат в диапазоне $\sim$ 1–60 ГГц [1, 2] и по этой причине суспензии вирусов недоступны для спектроскопии спонтанного комбинационного рассеяния света, ИК и СВЧ спектроскопии. Учитывая однозначную связь между собственными акустическими частотами вирусов и их морфологией, вынужденное комбинационное рассеяние света (ВКР) представляется перспективным методом для их идентификации и может быть использовано для разработки новых медицинских и биологических технологий. Использованная в данной работе методика измерений позволяет экспериментально определить собственные частоты акустических колебаний образцов фитовирусов. Ранее рядом авторов (например, [3, 4]) были получены важные результаты в области спектроскопии низкочастотного вынужденного комбинационного рассеяния в диапазоне частот, смещенных относительно линии возбуждающего лазерного излучения на величины порядка десятков гигагерц.

Целью настоящей работы является измерение собственных частот, близких по морфологии наночастиц вирусов в недоступном для других спектроскопических методов диапазоне 1–15 ГГц.

**Объекты исследования и методика эксперимента.** В качестве объектов исследования были выбраны: вирус мозаики альтернантеры (ВМАльт, длина вириона $\sim 570$ нм, диаметр $\sim 15$ нм, рис. 1a) в буферном растворе трисаминометана ($(HOCH_2)_3CNH_2 \cdot HCl$, сокращенно Трис-HCl) и вирус со спиральной структурой рода *Potexvirus*, семейства *Alphaflexiviridae* – X-вирус картофеля (ХВК, длина вириона $\sim 515$ нм, диаметр $\sim 13$ нм, рис. 1b) также в Трис-HCl. Данные вирусы представляют собой гибкие нитевидные частицы со спиральной структурой. Геном этих вирусов представлен одноцепочечной молекулой РНК положительной полярности. ВМАльт и ХВК имеют идентичную морфологию и некоторые различия в структуре вирионов, способности белков оболочки полимеризоваться в отсутствии геномной РНК *in vitro*, но общей стратегией экспрессии вируса, например, трансляционной активации генома в составе вириона или вирусного рибонуклеопротеида [5, 6]. Такое сочетание сходств и различий структуры и механизмов

1)e-m: sbs_michail@mail.ru



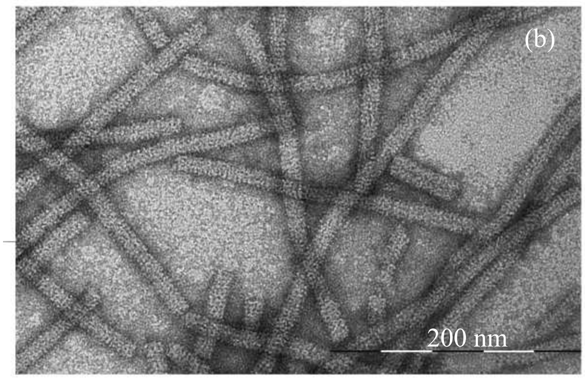




Рис. 1. Фотографии вируса мозаики альтернантеры (a) и X-вируса картофеля (b), полученные с помощью электронного микроскопа

функционирования двух близкородственных видов вирусов сделало их привлекательными объектами исследования.

Возможные частоты сигнала вынужденного рассеяния мы оценивали исходя из указанных размеров вирионов. Известно, что для собственных частот колебаний стержня с распределенной массой, как модели вируса, существует несколько видов колебаний: продольные, поперечные, крутильные. Формула для собственных частот продольных колебаний стержня:

$$\nu_k = \frac{k}{2l}\sqrt{\frac{E}{\rho}}, \quad k = 0, 1, 2..., \tag{1}$$

где $l$ – длина стержня, $E$, $\rho$ – модуль Юнга и плотность материала стержня соответственно. Однако вирусы имеют в своей морфологии различные структурные группы с отличными от других механическими характеристиками, поэтому в формуле для собственных частот вируса как единого целого было бы правильно, на наш взгляд, использовать средние значения модуля Юнга $\langle E\rangle$ и плотности $\langle\rho\rangle$. Тогда формулу (1) можно переписать так:

$$\nu_k = \frac{k}{2l}\sqrt{\frac{\langle E\rangle}{\langle\rho\rangle}}, \quad k = 0, 1, 2... \tag{2}$$

В работе [7] для X-вируса картофеля были определены геометрические размеры (рис. 1b). Вирионы представляют собой гибкие нити с модальными длинами $l$ в диапазоне 470–580 нм [6]. С использованием атомно-силового микроскопа, для данного вируса был измерен средний модуль Юнга $\langle E\rangle$, который оказался равен $8\cdot10^8$ Па [8]. Среднюю плотность можно рассчитать исходя из известной молекулярной массы $M_r = 5.8\cdot10^{-20}$ кг и геометрических размеров вириона – его объема:

$$\langle\rho\rangle = \frac{M_r}{V} \cong 850\,\text{кг/м}^3.$$

Тогда для собственных частот, если вместо средней плотности будет отношение молекулярной массы вириона к его объему:

$$\nu_k = \frac{k}{2l}\sqrt{\frac{\langle E\rangle}{M_r}V}, \quad k = 0, 1, 2... \tag{3}$$

И основная частота колебаний ($k = 1$) равна:

$$\nu_k = \frac{k}{2l}\sqrt{\frac{\langle E\rangle}{M_r}V} \cong 1\,\text{ГГц}.$$

Правый сомножитель в формуле собственных частот:

$$c = \sqrt{\frac{\langle E\rangle}{M_r}V} \cong 1100\,\text{м/с}$$

является скоростью звука в механической модели вируса. Используя (3), можно оценить частоты следующих четырех гармоник как 2–5 ГГц с шагом $\sim 1$ ГГц.

Суспензии вирусов с концентрацией $C_{\text{altMV}} = 8.8\cdot10^{13}\,\text{см}^{-3}$ (ВМАльт) и $C_{\text{PVX}} = 6.6\cdot10^{13}\,\text{см}^{-3}$ (ХВК) были залиты в идентичные кварцевые кюветы Cell, рабочей длиной 20 мм. Кюветы поочередно размещали на установке (рис. 2). Излучение второй гармоники $\text{YAG:Nd}^{3+}$ лазера, работающего в одночастотном режиме (длина волны излучения $\lambda = 532$ нм, ширина линии излучения $\Delta\nu \sim 0.005\,\text{см}^{-1}$; длительность импульса излучения $t \sim 10$ нс, энергия в импульсе $E_{\text{p}}$ – до 25 мДж; нестабильность по энергии импульса $\sim$5–7 %) фокусировали линзой $f_1$ с фокусным расстоянием $\sim 15$ мм в середину кюветы Cell. Возбуждаемое в кювете вынужденное рассеяние поступало для регистрации на интерферометр Фабри–Перо ($\text{F-P}_1$, область дисперсии $0.5\,\text{см}^{-1}$). После интерферометра оптический сигнал попадал на CMOS камеру и затем обрабатывался на компьютере

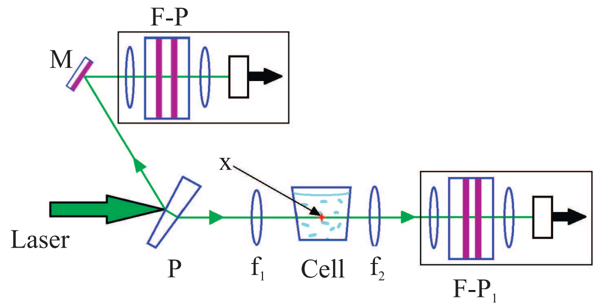



Рис. 2. (Цветной онлайн) Принципиальная схема измерений. Laser – одночастотный лазер; Cell – кювета со скошенными окнами с исследуемым веществом; $f_1$ = 15 мм, $f_2$ = 30 мм – софокусные линзы; x – область перетяжки лазерного пучка в середине кюветы; P – клиновидная поворотная пластина; M – глухое поворотное зеркало; F-$P_1$ – интерферометр Фабри–Перо с оптической системой, предназначенный для регистрации спектров ВКР; F-P – интерферометр Фабри-Перо с оптической системой, предназначенный для контроля спектра излучения лазера

в программной среде LABVIEW. Спектральный состав излучения лазера контролировали с помощью интерферометра Фабри–Перо (F-P, область дисперсии 1 см$^{-1}$). В процессе измерений энергию лазерного импульса поддерживали на уровне $\sim$ 23 мДж. Геометрия установки была единa для всего цикла измерений. Измерения проводили при комнатной температуре.

**Результаты измерений.** Установлено, что в спектре излучения, распространяющегося “вперед”, появились дополнительные линии, которые мы интерпретировали как линии низкочастотного вынужденного комбинационного рассеяния (табл. 1):

**Таблица 1.** Результаты измерений спектров ВКР частот вирусов

| Наименование вируса | Величина сдвига частоты вынужденного рассеяния, ГГц | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| ВМАльт | 1.5 | 4.7 | 5.1 | 8.7 | 10.5 |
| ХВК | 2.9 | 4.4 | | 9.3 | 11.3 |

Характерные спектры, полученные с помощью интерферометра F-$P_1$, приведены на рис. 3a, b. Из этих рисунков видно, что некоторые спектральные линии, несмотря на то, что они мало выделяются на уровне шумов, стабильно повторяются в разных порядках интерференции, в отличие от шумовых составляющих. Поэтому мы идентифицировали данные линии как линии ВКР.

Расхождение расчетных и измеренных результатов можно объяснить следующим образом. Сложная биологическая конструкция вириона предполагает пространственные неоднородности его механических параметров. Поэтому использование средних значений динамических характеристик вирусной молекулы могло привести к отличию наблюдаемых в эксперименте собственных частот акустических колебаний и расчетных оценок. Далее, известно (например, [9–11]), что скорость звука в микробиологических объектах, в частности, в ДНК и лизосомах, лежит в пределах 1900–4200 м/с, поэтому наша оценка выглядит заниженной. Кроме того, расхождение может быть связано с тем, что физико-механические характеристики вириона в естественной или модельной (суспензия вирусов в Трис-HCl) среде отличны от свойств вириона, расположенного на подложке при его исследовании зондом атомно-силового микроскопа.

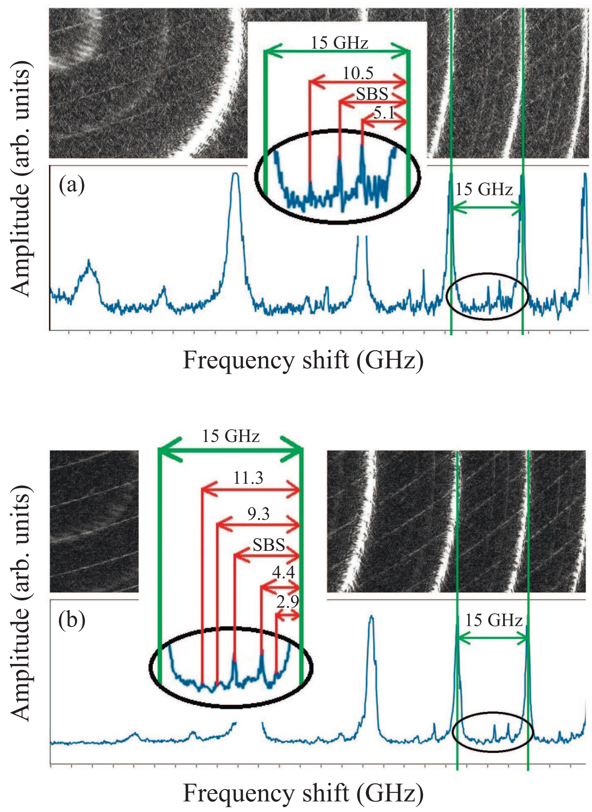



Рис. 3. (Цветной онлайн) Примеры спектров ВКР в суспензиях вирусов, полученные с помощью интерферометра Фабри–Перо. На вставках: 15 ГГц – область дисперсии интерферометра; SBS – ВРМБ – “вперед” – линия вынужденного рассеяния Мандельштама–Бриллюэна [12]. (a) – Интерферограмма спектра вынужденного рассеяния в суспензии вируса ВМАльт. Здесь на вставке: 5.1; 10.5 ГГц – линии ВКР. (b) – Интерферограмма спектра вынужденного рассеяния в суспензии вируса ХВК. Здесь на вставке: 2.9; 4.4; 9.3; 11.3 ГГц – линии ВКР

**Заключение.** Проведенные эксперименты показали, что низкочастотное вынужденное комбинационное рассеяние позволяет эффективно исследовать спектры собственных частот наночастиц вирусов при их малых концентрациях в водных суспензиях, т.е. в нативной среде. Значения измеренных частот неплохо согласуются с простыми модельными расчетами, позволяющими в первом приближении провести отнесение частот к собственным модам колебаний аксиально-симметричного вируса, рассматриваемого как упругий стержень. Эксперименты показали, что два исследованных типа вируса, имеющих сходную морфологию и размеры, тем не менее имеют разные собственные моды акустических колебаний в диапазоне 1–15 ГГц, которые проявляются в спектрах ВКР, что позволяет рассматривать этот подход как перспективную методику в медицинских и биологических приложениях.

Работа была поддержана грантами Российского фонда фундаментальных исследований # 20-02-00172, 21-34-70004 мол_а_мос, Российского научного фонда # 22-22-00153.

1. V. Tcherniega, S. M. Pershin, A. F. Bunkin, E. K. Donchenko, O. V. Karpova, A. D. Kudryavtseva, V. N. Lednev, T. V. Mironova, M. A. Shevchenko, M. A. Strokov, and K. I. Zemskov, Laser Phys. Lett. **15**, 095603 (2018); http//doi.org/10.1088/1612-202X/aad28d.
2. A. F. Bunkin, M. A. Davydov, A. N. Fedorov, M. V. Arkhipenko, V. B. Oshurko, and S. M. Pershin, JETP Lett. **113**(11), 733 (2021); DOI 10.1134/S0021364021110047.
3. M. V. Arkhipenko, A. F. Bunkin, M. A. Davydov, O. V. Karpova, V. B. Oshurko, S. M. Pershin, V. N. Streltsov, and A. N. Fedorov, JETP Lett. **109**, 578 (2019); DOI 10.1134/S0370274X19090054.
4. O. V. Karpova, M. V. Arkhipenko, S. M. Pershin, M. A. Karpov, A. D. Kudryavtseva, T. V. Mironova, V. I. Savichev, M. A. Shevchenko, N. V. Tcherniega, and S. F. Umanskaya, Journal of Russian Laser Research **42**(1), 106 (2021); DOI 10.1007/s10946-020-09935-0.
5. E. K. Donchenko, E. V. Pechnikova, M. Yu. Mishyna, T. I. Manukhova, O. S. Sokolova, N. A. Nikitin, J. G. Atabekov, and O. V. Karpova, PloS one **12**(8), e0183824 (2017); doi.org/10.1371/journal.pone.0183824.
6. E. Petrova, N. Nikitin, A. Protopopova, M. Arkhipenko, I. Yaminskii, O. Karpova, and J. Atabekov, Biochimie **95**(12), 2415 (2013); DOI 10.1016/j.biochi.2013.09.004.
7. J. Atabekov, E. Dobrov, O. Karpova, and N. Rodionova, Molecular plant pathology **8**(5), 667 (2007); DOI 10.1111/j.1364-3703.2007.00420.x.
8. А. Д. Сушко, Е.В. Дубровин, И. В. Яминский, Ю. Ф. Дрыгин, Наноиндустрия **6** (2008).
9. M. B. Hakim, S. Lindsay, and J. Powell, Biopolymers **23**(7), 1185 (1984); https://doi.org/10.1002/bip.360230704.
10. S. Speziale, F. Jiang, C. L. Caylor, S. Kriminski, C.-S. Zha, R. E. Thorne, and T. S. Duffy, Biophys J. **85**(5), 3202 (2003); DOI 10.1016/S0006-3495(03)74738-9.
11. M. R. Johnson and G. J. Kearley, Experimental Methods in the Physical Sciences **44**, 415 (2013); https://doi.org/10.1016/ B978-0-12-398374-9.00007-3.
12. V. S. Gorelik, A. F. Bunkin, M. A. Davydov, A. N. Fedorov, S. M. Pershin, A. Yu. Pyatyshev, and M. Wu, Appl. Phys. Lett. **117**, 141101 (2020); DOI 10.1063/5.0024816.