

## ОПТИКА И ЛАЗЕРНАЯ ФИЗИКА

УДК 535.361

МЕТОД ЧАСТОТНОГО КАРТИРОВАНИЯ ВИРУСА  
НА ПРИМЕРЕ ТАБАЧНОЙ МОЗАИКИ

А. Ф. Бункин, М. А. Давыдов, А. Н. Федоров

*В экспериментах по вынужденному неупругому рассеянию лазерного излучения в жидкой суспензии наночастиц вирусов зафиксирован набор собственных колебательных мод вируса табачной мозаики в диапазоне частот 4–50 ГГц. Предложено использовать полученные таким способом данные для оптической экспресс-идентификации вирусов.*

**Ключевые слова:** неупругое рассеяние света, спектр акустических частот, вирусы растений.

*Введение.* Биологические методы идентификации вирусов. Одной из актуальных проблем современной вирусологии является улучшение методов обнаружения и идентификации вирусов. Однако прямое обнаружение вирусов сопряжено с рядом трудностей, связанных, во-первых, с низкой концентрацией вирусов, которые не могут размножаться в окружающей среде, а во-вторых, с огромным разнообразием фитопатогенов.

Основой современной диагностики в практической вирусологии для идентификации вирусов являются молекулярно-генетические методы. Они позволяют определить молекулярную структуру вирусных частиц. Сюда относятся полимеразная цепная реакция (ПЦР) и анализ нуклеотидных последовательностей генома, кодирующих белки (секвенирование) [1]. Однако данные методы являются достаточно долгими, дорогими и требуют лабораторных условий для проведения исследования. Существуют также экспресс-методы, из которых можно упомянуть диагностику на основе ДНК-микрочипов [2], обеспечивающую возможность параллельного обнаружения всех фитопатогенов в одном образце тестируемой культуры. ДНК-микрочипы – это небольшие пластинки, на которые прикреплены фрагменты ДНК со строго определенной последовательностью нуклеотидов и “координатами” на пластинке. Для “полевых” иссле-

дований более практичным является использование иммунохроматографических тест-систем [3]. Методика основана на протекании через мембраны исследуемого образца под действием капиллярных сил, которые запускают иммунохимические взаимодействия, приводящие к видимому окрашиванию контрольных линий. Этот подход позволяет достаточно быстро идентифицировать вирус. Однако, также как и в методе ДНК-микрочипов, детектирование направлено только на обнаружение целевого вируса. Это означает, что если в образце есть несколько вирусов – используются разные тест-полоски на отдельные вирусы.

Как видно из краткого обзора, не существует универсального метода идентификации вирусов. Альтернативным подходом является метод низкочастотного вынужденного рассеяния лазерного излучения в жидких суспензиях вирусов, эффективность которого продемонстрирована в ряде недавних работ (см. напр., [6, 7]). Данная ситуация вызывает необходимость в постановке экспериментов по измерению частот резонансов вынужденного низкочастотного рассеяния лазерного излучения, присущих наночастицам вирусов в жидких суспензиях, с целью создания базы данных для их последующей идентификации.

Т а б л и ц а 1

Механические свойства вирионов

	Модуль Юнга $E$ [8], Па	Длина $\langle l \rangle$ , нм	Масса $m$ , кг	Объём $V$ , м <sup>3</sup>	Плотность $\rho$ , кг/м <sup>3</sup>
Вирион ВТМ	$4 \cdot 10^9$	300	$6.64 \cdot 10^{-20}$	(300×18 нм) $7.60 \cdot 10^{-23}$	870
Вирион ХВК	$7 \cdot 10^8$	515	$5.81 \cdot 10^{-20}$	(515×13.5 нм) $7.92 \cdot 10^{-23}$	730

*Выбор объекта исследований и результаты измерений.* Взаимодействие вириона, имеющего постоянный либо наведённый дипольный момент, с электромагнитным лазерным импульсом носит стрикционный характер. В упрощённой механической модели, выбранные вирионы представляют собой упругий цилиндрический стержень. Сила, действующая на связанные заряды вириона, направлена вдоль его оси симметрии, поэтому для оценки собственных частот рассмотрим продольные колебания стержня без учёта потерь на трение по формуле [5]:

$$\nu_n = \frac{n}{2l} \sqrt{\frac{E}{\rho}}, \quad (1)$$

здесь  $l$  – длина стержня;  $E$  – модуль Юнга;  $\rho$  – плотность стержня,  $n = 1, 2, 3 \dots$  – номер продольной колебательной моды. С использованием данных, представленных в табл. 1, получаем: основная частота для вируса табачной мозаики (ВТМ) –  $\nu_{1 \text{ ВТМ}} \sim 3.6$  ГГц.

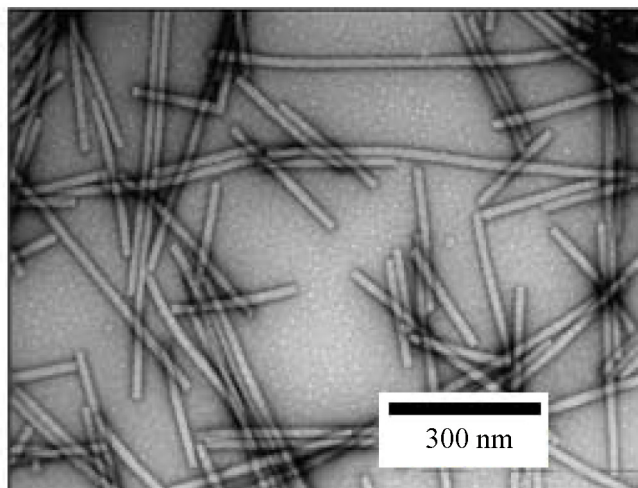


Рис. 1: Фотография вирионов ВТМ [6], полученная с помощью электронного микроскопа.

В качестве объекта исследования нами были использованы ТРИС-суспензии вируса табачной мозаики (ВТМ, рис. 1) с концентрациями  $0.5 \cdot 10^{12} \text{ см}^{-3}$ ,  $1.0 \cdot 10^{12} \text{ см}^{-3}$  и  $2.0 \cdot 10^{12} \text{ см}^{-3}$ . Характеристики образцов описаны в [4]. Суспензии были залиты в идентичные кварцевые кюветы (Cell), размещаемые на установке (рис. 2). Излучение второй гармоники одночастотного YAG:Nd<sup>3+</sup> лазера (длина волны  $\lambda = 532$  нм, ширина линии излучения  $\delta\nu \sim 0.005 \text{ см}^{-1}$ , длительность импульса  $t_l \sim 10$  нс, энергия в импульсе  $E_l$  – до 40 мДж, нестабильность по энергии импульса  $\sim 5\text{--}7\%$ ) фокусировали линзой (Lens 1,  $f \sim 15$  мм либо  $f \sim 30$  мм) в середину кюветы Cell. В процессе измерений энергию лазерного импульса увеличивали от  $\sim 1$  мДж до  $\sim 40$  мДж. Энергию лазерных импульсов контролировали калориметром ИМО-2N. Возбуждаемое в кювете рассеяние отводили для регистрации на интерферометры Фабри–Перо (Fabri–Perot 1, 2) с помощью клиновидной стеклянной пластинки (Beamsplitter) и зеркала (Mirror 2). Интерферограммы регистрировали фотокамерами (CMOS 1, 2). Обработку изображения с фотокамер осуществляли оригинальной программой, написанной в среде LabView. Образец спектра вынужденного рассеяния в суспензии ВТМ, полученный в [6], представлен на рис. 3. Здесь зафиксирована только одна линия рассеяния, что обусловлено поиском оптимальной интенсивности лазерного излучения. Путем изменения интенсив-

ности лазерного излучения был получен ряд других линий. Геометрия установки была одина для всего цикла измерений. Измерения проводили при комнатной температуре.

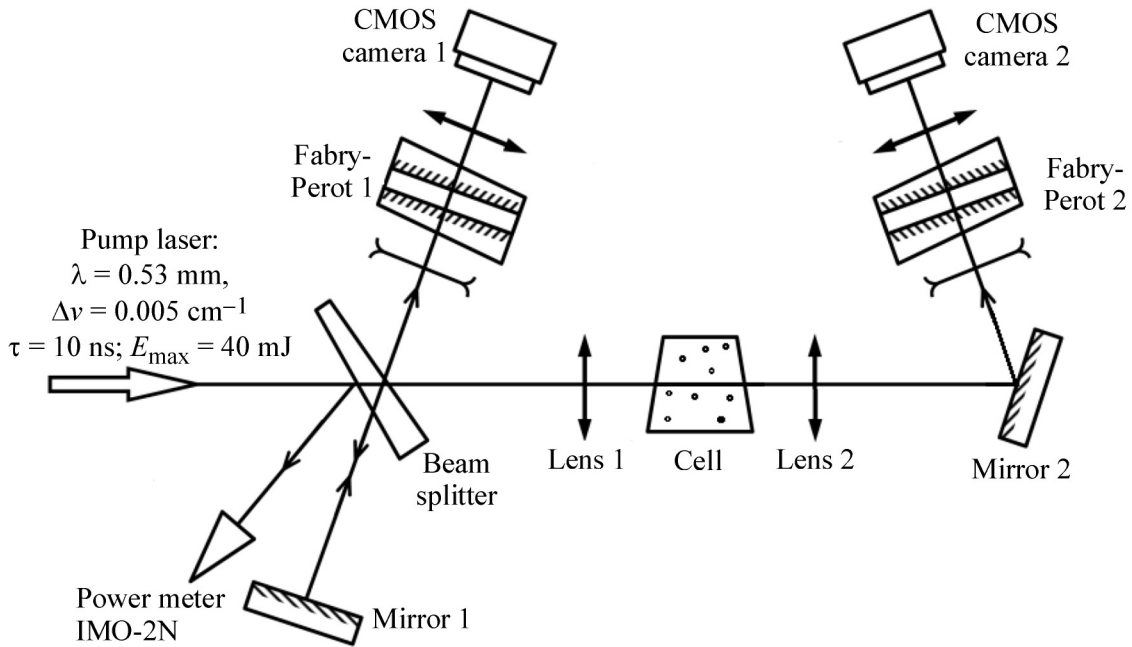


Рис. 2: Схема эксперимента: *Beamsplitter* – клиновидная делительная пластинка (стекло К-8); *Mirror 1*, *Mirror 2* – поворотные зеркала; *Lens 1*, *Lens 2* – софокусные линзы  $f = 30 \text{ мм}$ ; *Cell* – кварцевая кювета с исследуемой суспензией; *Fabry-Perot 1*, *Fabry-Perot 2* – интерферометры Фабри–Перо с фокусирующей оптикой (область дисперсии у каждого –  $2.5 \text{ см}^{-1}$ ); *CMOS 1*, *CMOS 2* – фотокамеры; *Power meter IMO-2N* – измеритель энергии лазера.

Результаты измерений приведены в табл. 2. Полученный в [6] набор собственных частот ВТМ удалось существенно дополнить: в отличие от ранее полученного спектра, в котором присутствовали только частоты “верхнего” края диапазона ( $\sim 44$  и  $\sim 31$  ГГц, подчеркнутые в табл. 2), новый спектр расширен частотами “нижнего” и “среднего” поддиапазонов, а также дополнен “верхний” поддиапазон (табл. 2). В качестве контрольного была исследована ТРИС-суспензия сходного по морфологии X-вируса картофеля (ХВК, табл. 1, 3, [7]). Из полученных экспериментальных данных следует, что основные частоты колебаний вирионов ВТМ (4.7 ГГц) и ХВК (2.9 ГГц) как по порядку величины, так и по ранжиру значений сходны с оценками по формуле (1). Сравнение спектров, приведенных в табл. 2 и 3, позволяет, на наш взгляд, надежно идентифицировать исследованные образцы.

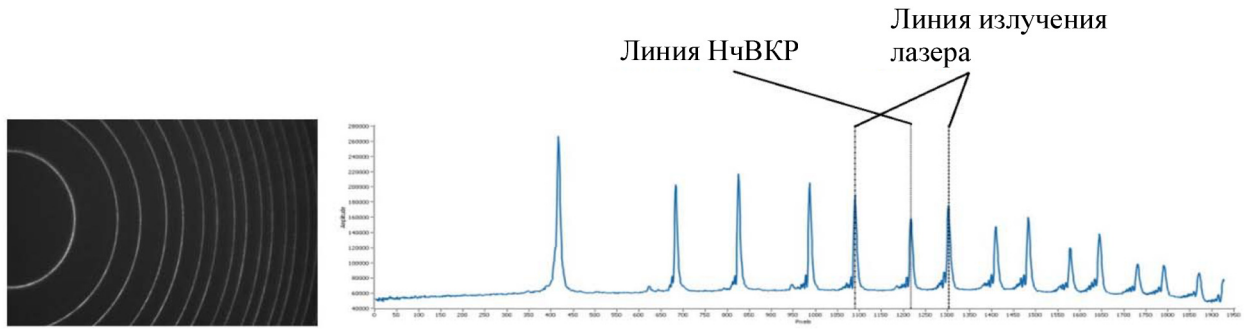


Рис. 3: Интерферограмма излучения лазера и сигнала НЧВКР в направлении “назад” в суспензии ВТМ, величина стокового сдвига частоты рассеянного излучения  $\Delta\nu \sim 1.046 \text{ см}^{-1} = 31.38 \text{ ГГц}$  [6].

Т а б л и ц а 2

Спектр собственных частот вируса табачной мозаики в ТРИС-суспензии

Величина сдвига частоты, ГГц	4.7	5.1	9.7	10.6	11.3	11.9	13.5	20	<u>31.38</u>	33.8	41	<u>44.1</u>	49.5
------------------------------	-----	-----	-----	------	------	------	------	----	--------------	------	----	-------------	------

Т а б л и ц а 3

Спектр собственных частот X-вируса картофеля в ТРИС-суспензии

Величина сдвига частоты, ГГц	2.9	4.4	9.3	11.3	24.4	28.0	31.0	48.5	50.0	58.0
------------------------------	-----	-----	-----	------	------	------	------	------	------	------

Таким образом, использование полученных в экспериментах резонансных частот наночастиц вирусов приводит к созданию новой технологии частотного картирования вирусов в прозрачной для лазерного излучения жидкой суспензии. Основой метода является наработка базы данных исследуемых вирусов, а именно: получение набора собственных колебательных мод в заданном диапазоне частот (модальный анализ). Для проведения первоначального картирования необходимо провести отдельную процедуру выделения частиц вируса для последующей диагностики. В дальнейшем производится сравнение измеренных акустических частот исследованных образцов с базой данных вирусов. Для увеличения точности идентификации вируса, частотный диапазон исследования может быть расширен.

*Заключение.* Метод частотного картирования вируса может являться как основным физическим методом для идентификации вируса, так и дополнительным к биологическим методам. При совершенствовании лабораторной установки, её миниатюризации и дополнением биологической процедуры выделения целевого фитопатогена (вируса), метод частотного картирования может быть использован как экспресс-метод в “полевых” условиях. Селективность метода частотного картирования обеспечивается набором собственных уникальных колебательных мод, присущих только данному типу вируса. Совершенствование программной части обработки полученной информации даст возможность надёжно идентифицировать каждый вирус в образце, содержащем несколько различных типов вирусов. Стоит также отметить, что данный подход является независимым небиологическим методом идентификации вирусов.

## Л И Т Е Р А Т У Р А

- [1] С. Б. Радзениеце, М. Т. Упадышев, А. А. Чердакли, Садоводство и виноградарство, № 3, (2020). doi.org/10.31676/0235-2591-2020-3-44-50.
- [2] В. Б. Бородулин, О. В. Шевченко, А. А. Свистунов и др., Известия вузов, Северокавказский регион, Естественные науки, № 1, (2012). ISSN: 0321-3005.
- [3] Н. А. Бызова, И. В. Сафенкова, С. Н. Чирков и др., Прикладная биохимия и микробиология **45**(2), 225 (2009). ISSN: 0555-1099.
- [4] Е. А. Трифонова, Н. А. Никитин, М. П. Кирпичников и др., Вестн. Моск. Университета, сер. 16, Биология, № 4, 46 (2015).
- [5] Стрэтт Дж. В. (Рэлей), *Теория звука*, пер. с англ., т. 1, 2 изд. (М., 1955).
- [6] M. V. Arkhipenko, A. F. Bunkin, M. A. Davydov, et al., Bulletin of the Russian Academy of Sciences: Physics **45**, 334 (2018). DOI: 10.3103/S1068335618110027.
- [7] A. F. Bunkin, M. A. Davydov, A. N. Fedorov, et al., Bulletin of the Russian Academy of Sciences: Physics **87**, S71 (2023). doi.org/10.1134/S106287382370483X.
- [8] И. А. Голутвин, Н. С. Насикан, Т. Е. Игнатюк, Препринт ИТЭФ 18-03 (М., 2003).

Поступила в редакцию 7 мая 2024 г.

После доработки 26 июня 2024 г.

Принята к публикации 27 июня 2024 г.