

14.1

## Оценка размеров вирусных частиц SARS-CoV-2 на основе данных малоуглового рентгеновского рассеяния

© А.Т. Табаров<sup>1</sup>, Д.А. Крылов<sup>1</sup>, О.В. Андреева<sup>1</sup>, А.В. Смирнов<sup>1</sup>, Д.М. Даниленко<sup>2</sup>, В.В. Виткин<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Университет ИТМО, Санкт-Петербург, Россия

<sup>2</sup> Научно-исследовательский институт гриппа им. А.А. Смородинцева, Санкт-Петербург, Россия

E-mail: a\_t\_tabarov@itmo.ru

Поступило в Редакцию 18 декабря 2023 г.

В окончательной редакции 25 февраля 2024 г.

Принято к публикации 26 февраля 2024 г.

С помощью малоуглового рентгеновского рассеяния определена парная корреляционная функция вирусных частиц SARS-CoV-2, на основе которой получен средний или наиболее вероятный диаметр вирусной частицы SARS-CoV-2 ( $112 \pm 5$  nm). Обсуждается влияние спайк-белков, которые создают на поверхности вируса разрыхленную структуру, на результаты определения размера вирусных частиц. Полученные результаты представляют интерес для разработки новых методов диагностики коронавирусной инфекции.

**Ключевые слова:** вирусы, малоугловое рассеяние, рентген, синхротронные исследования.

DOI: 10.61011/PJTF.2024.11.57902.19848

Классические методы диагностики вирусных заболеваний (SARS-CoV-2), такие как ПЦР-тесты, оказались неэффективными в условиях массового заражения [1]. В настоящее время проводятся исследования новых методов диагностики, включая поверхностно-усиленную рамановскую спектроскопию (surface-enhanced Raman spectroscopy, SERS) [2]. Для создания селективной SERS-подложки важно знать размер вирусных частиц [3], который сложно точно измерить с использованием метода электронной микроскопии (ЭМ). Результаты измерения размеров вирусных частиц методом ЭМ, приведенные в литературе, охватывают широкий диапазон значений: 60–140 nm [4] или 50–200 nm [5].

В настоящей работе использовался метод малоуглового рентгеновского рассеяния (МУРР) для исследования суспензии, содержащей инактивированные вирусные частицы, который позволяет оценить их размер и другие параметры [6,7]. В исследовании использовалась генетическая линия коронавируса CL.1 штамма hCoV-19/Russia/PER-RII-MH117274/2022. После культивации в образцы с вирусами добавляли раствор формалина и бета-пропиолактона (БПЛ) в разном соотношении: 1:1000, 1:500, 1:250. Примеры изображений исследуемых вирусов, полученные методом ЭМ, приведены на рис. 1. Концентрация белков вируса в образцах измерялась по методу Лоури. Исследовались шесть образцов вирус-содержащей суспензии (см. таблицу).

Эксперимент проводился на станции „БиоМУР“ „КИСИ-Курчатов“ с использованием синхротронного излучения ускорителя „Сибирь-2“. Регистрация рентгенограмм осуществлялась с использованием двухкоординатного детектора DECTRIS Pilatus3 1M на расстоянии 2500 mm. Расстояние образец–детектор было точно откалибровано с помощью программы Fit2D на бегнате серебра. Интенсивность рассеяния измерялась в

диапазоне  $0.04 < s < 1.5 \text{ nm}^{-1}$ , где  $s$  — модуль вектора рассеяния.

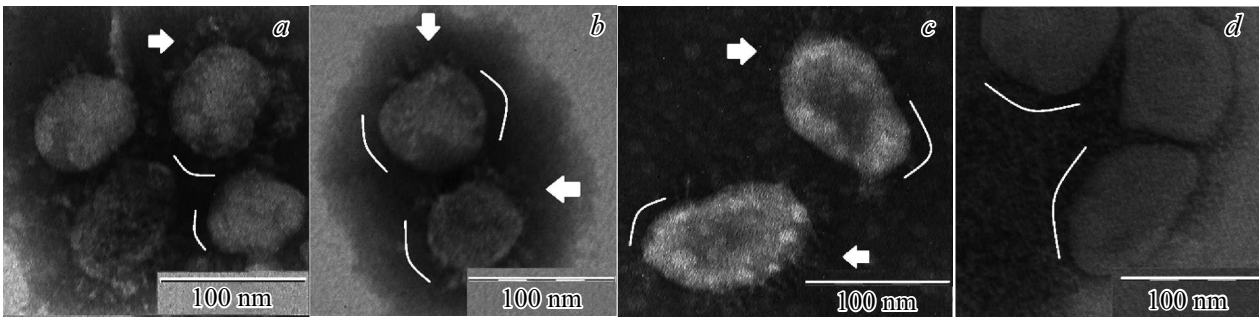
Для каждого из шести образцов проводилось 12 измерений кривых МУРР с экспозицией 600 s каждое. Обработка данных, включая усреднение кривых рассеяния и вычитание сигнала от буфера, проводилась с использованием ПО „Primus“ из специализированного программного пакета „ATSAS“ [8]. Размер вирусных частиц вычислялся двумя способами: на основе парной корреляционной функции ( $D_{\max}$ ) и радиуса инерции ( $R_g$ ).

Кривые анализировались при помощи инструмента „Распределение по расстояниям“ (Distance distribution, PRIMUS [9]) в монодисперсном режиме. Монодисперсный режим предполагает, что исследуемая система состоит из частиц одинаковой (необязательно шарообразной) формы и размера. Это является допущением, так как в суспензии помимо шарообразных вирусов находятся грушеобразные оторвавшиеся поверхностные белки (спайк-белки), размер которых значительно меньше размера самих вирусов. В монодисперсном режиме инструмент „Распределение по расстояниям“ позволяет найти парную корреляционную функцию  $p(r)$  [6]:

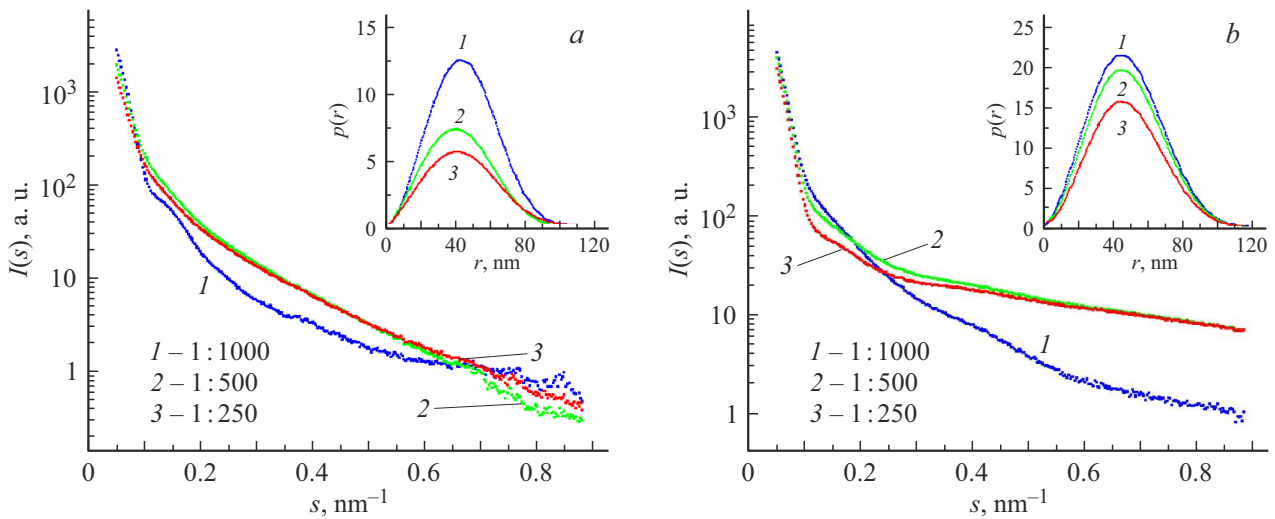
$$p(r) = \frac{r^2}{2\pi^2} \int_0^{D_{\max}} s^2 I(s) \frac{\sin(sr)}{sr} ds, \quad (1)$$

где  $r$  — расстояние между двумя частицами,  $I(s)$  — интенсивность экспериментального рассеянного излучения.

Функция  $p(r)$  позволяет оценивать наибольший размер  $D_{\max}$  частицы из условия  $p(r) = 0$  при  $r > D_{\max}$ . Также по виду функции  $p(r)$  можно судить о форме образца. В том случае, когда график функции  $p(r)$  со-



**Рис. 1.** Изображения инактивированных вирусов, полученные методом электронной микроскопии. *a* — инаktivация формалином 1:1000; *b* — инаktivация формалином 1:250; *c* — инаktivация БПЛ 1:1000; *d* — инаktivация БПЛ 1:250. Стрелками показаны участки с сохранившимися поверхностными белками. Линиями указаны участки, на которых вирусы утратили поверхностные белки. Формалин частично сшивает поверхностные белки, а частично приводит к их отрыву, в то время как БПЛ сильнее влияет на отрыв белков и изменение морфологии вируса.



**Рис. 2.** Зависимость логарифма интенсивности рассеянного излучения  $I(s)$  от модуля вектора рассеяния и парные корреляционные функции (на вставках). *a* — образцы, инаktivированные формалином; *b* — образцы, инаktivированные БПЛ. Участок кривой  $0.04 < s < 0.1 \text{ nm}^{-1}$  — рассеяние от крупных частиц вирусов, на участке кривой  $0.1 < s < 0.88 \text{ nm}^{-1}$  проявляется вклад от оторвавшихся белков меньшего размера. Интенсивность рассеяния от белков увеличивается с увеличением доли инаktivирующего агента в образце.

ответствует однородному шару, его радиус будет равен

$$R_D = \frac{D_{\max}}{2}. \quad (2)$$

Функция  $p(r)$  была построена для всех образцов. Для каждого образца использовалось 286 точек в диапазоне модуля вектора рассеяния  $0.04 < s < 0.88 \text{ nm}^{-1}$ .

Программа GNOM из программного пакета („ATSAS“) позволила определить радиус инерции  $R_g$ . Радиус однородного шара  $R_I$  и его радиус инерции  $R_g$  связаны простым соотношением [6]:

$$R_I = \sqrt{\frac{5}{3}} R_g. \quad (3)$$

Размеры вирусных частиц оцениваются из функции парных расстояний  $p(r)$  (формула (1)) и из радиуса инерции (формула (3)).

В результате интегрирования двумерных картин рассеяния нами были получены кривые рассеяния (рис. 2), которые представляют собой зависимость интенсивности рассеянного излучения  $I(s)$  от модуля вектора рассеяния  $s$ . Смещение вверх кривой интенсивности в правой части графика, соответствующей более мелким структурам, отражает увеличение относительной доли отделившихся поверхностных белков в суспензии. Таким образом, на интенсивность рассеянного излучения влияет степень инаktivации образцов. Найденные значения радиуса вирусных частиц приведены в таблице. В результате проведенного исследования был определен средний или наиболее вероятный размер (диаметр) вирусной частицы SARS-CoV-2:  $112 \pm 5 \text{ nm}$ . Полученные данные позволят в будущем создать селективные SERS-подложки с высоким коэффициентом усиления и по-

Результаты измерения радиуса вирусных частиц  $R_D$  и  $R_I$  на основе  $D_{\max}$  и  $R_g$ 

№ п/п	Образец	Степень инактивации	Концентрация белка, mg/ml	$D_{\max}$ , nm	$R_D$ , nm	$R_g$ , nm	$R_I$ , nm
1	CL.1 Form.	1:1000	1.61	117	58.5	35.9	46.4
2	CL.1 Form.	1:500	1.77	115	57.5	35.9	46.3
3	CL.1 Form.	1:250	1.58	114	57.0	35.8	46.2
4	CL.1 BPL	1:1000	1.8	105	52.5	34.3	44.3
5	CL.1 BPL	1:500	2.24	110	55.0	33.8	43.6
6	CL.1 BPL	1:250	1.97	110	55.0	33.5	43.2
Среднее значение				$112 \pm 5$	$56 \pm 2$	$35 \pm 1$	$45 \pm 2$

Примечание. Инактивация штамма коронавируса CL.1 проводилась формалином (Form.) и БПЛ (BPL). Указано соотношение инактиватора и вирусодержащей суспензии. В последней строке представлены средние значения радиусов с учетом среднеквадратичного отклонения и программной ошибки.

высить эффективность методов диагностики COVID-19. Несовпадение радиуса  $R_I$ , рассчитанного из радиуса инерции  $R_g$ , и радиуса  $R_D$ , определенного по функции парных расстояний  $p(r)$ , обусловлено в основном наличием белков, которые создают на поверхности вируса разрыхленную структуру. Радиус  $R_I$ , рассчитанный из радиуса инерции  $R_g$ , являющегося нормированной интегральной характеристикой, в меньшей степени отражает наличие у вирусов поверхностных белков, чем  $R_D$ , определенный по функции парных расстояний  $p(r)$ .

## Благодарности

Авторы признательны Э.В. Штыковой за ценные советы и замечания.

## Финансирование работы

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования РФ (проект 075-15-2021-1349).

## Конфликт интересов

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

## Список литературы

- [1] J.N. Kanji, N. Zelyas, C. MacDonald, K. Pabbaraju, M.N. Khan, A. Prasad, J. Hu, M. Diggle, B.M. Berenger, G. Tipples, *Virology*, **18** (1), 13 (2021). DOI: 10.1186/s12985-021-01489-0
- [2] A. Tabarov, V. Vitkin, O. Andreeva, A. Shemanaeva, E. Popov, A. Dobroslavin, V. Kurikova, O. Kuznetsova, K. Grigorenko, I. Tzibizov, A. Kovalev, V. Savchenko, A. Zheltuhina, A. Gorshkov, D. Danilenko, *Biosensors*, **12** (12), 1065 (2022). DOI: 10.3390/bios12121065
- [3] Y.Y. Lin, J.D. Liao, M.L. Yang, C.L. Wu, *Biosensors Bioelectron.*, **35** (1), 447 (2012). DOI: 10.1016/j.bios.2012.02.041

- [4] N. Zhu, D. Zhang, W. Wang, X. Li, B. Yang, J. Song, X. Zhao, B. Huang, W. Shi, R. Lu, P. Niu, F. Zhan, X. Ma, D. Wang, W. Xu, G. Wu, G.F. Gao, D. Phil, W. Tan, *New Engl. J. Med.*, **382** (8), 727 (2020). DOI: 10.1056/NEJMoa2001017
- [5] D. Kota, *Int. J. Collab. Res. Intern. Med. Public Health*, **13** (6), 1 (2021). <https://www.iomcworld.org/articles/coronavirus-and-its-structure-80809.html>
- [6] Д.И. Свергун, Л.А. Фейгин, *Рентгеновское и нейтронное малоугловое рассеяние* (Наука, М., 1986). [L.A. Feigin, D.I. Svergun, *Structure analysis by small-angle X-ray and neutron scattering* (Plenum Press, N.Y., 1987). DOI: 10.1007/978-1-4757-6624-0].
- [7] Э.В. Штыкова, М.В. Петухов, Н.В. Федорова, А.М. Арутюнян, Е.В. Скурат, Л.В. Кордюкова, А.В. Моисеевко, А.Л. Ксенофонтов, *Биохимия*, **86** (2), 274 (2021). DOI: 10.31857/S0320972521020111 [E.V. Shtykova, M.V. Petukhov, N.V. Fedorova, A.M. Arutunyan, A.M. Skurat, L.V. Kordukova, A.V. Moiseevko, A.L. Ksenofontov, *Biochemistry (Moscow)*, **86** (2), 230 (2021). DOI: 10.1134/S0006297921020115].
- [8] K. Manalastas-Cantos, P.V. Konarev, N.R. Hajizadeh, A.G. Kikhney, M.V. Petoukhov, D.S. Molodenskiy, D. Franke, *J. Appl. Cryst.*, **54** (1), 343 (2021). DOI: 10.1107/S1600576720013412
- [9] P.V. Konarev, V.V. Volkov, A.V. Sokolova, M.H. Koch, D.I. Svergun, *J. Appl. Cryst.*, **36** (5), 1277 (2003). DOI: 10.1107/S0021889803012779