

УДК ...

СКАНИРУЮЩАЯ ЗОНДОВАЯ МИКРОСКОПИЯ КАК ГЛАВНЫЙ ИНСТРУМЕНТ БИОНАНОСКОПИИ

И.В. Яминский, П.В. Горелкин, А.С. Ерофеев,
О.В. Сеницына, Г.Б. Мешков

Введение

Наблюдение биологических объектов – наиболее увлекательное направление сканирующей зондовой микроскопии [1, 2]. Природа создает основные строительные единицы - нуклеиновые кислоты, белки, полисахариды и другие наноструктуры – с точностью, недостижимой в настоящее время человеком в его производственной деятельности. Не только химический состав этих биомолекул, но и их форма играет в биологии существенную роль. Например, белковая молекула в разных пространственных расположениях может обладать существенно различной ферментативной активностью. Смещение реакционного центра фермента на ничтожные значения может приводить к потере его ферментативной активности. Самые маленькие машины – белки АТФ-синтазы, имеющие неподвижный статор и подвижный ротор – также объекты живой природы. Линейная плотность записи информации в ДНК или РНК находится в области абсолютных рекордов.

Бактериальная клетка – практически минимальная форма живого организма. Ее размер может не превышать нескольких микрон. При этом она во много раз меньше любого искусственного устройства, созданного человеком, способного к перемещению в пространстве или к организации химических реакций.

Сканирующая зондовая микроскопия позволяет заглянуть в мир молекулярной биологии, микробиологии, позволяет выработать практические рекомендации для молекулярной медицины.

Биологические наблюдения в зондовой микроскопии имеют по сравнению с другими приложениями определенные и существенные особенности. Биологические объекты, как имеют пониженную механическую жесткость. Соответственно, это требует применения деликатных способов сканирования их поверхности. Зондовая микроскопия не может наблюдать изолированные биомолекулы, например, свободно плавающие в

буферных растворах, а требует их закрепления на твердой подложке. В связи с этим, методики фиксации конкретных биообъектов должны быть тщательно продуманы, апробированы и проверены на практике. В зондовой микроскопии хорошо известны случаи, когда поспешные и непроверенные действия приводили к большим конфузам. Так, ступени на пиролитическом графите были приняты за молекулы ДНК, при этом наблюдаемые пространственный период ошибочно сопоставлялся с чередованием отдельных пар оснований [3]. В последствии, аккуратно выполненные работы показали, что ДНК-подобные структуры наблюдаются на чистом графите. [4] Выбор подложки играет ключевую роль по ряду причин. Подложка должна оказывать минимальное влияние на конформационное состояние биомолекул и биообъектов. С другой стороны, сцепление с подложкой должно быть достаточного уровня, с тем, чтобы при взаимодействии с зондом микроскопа не происходило открепление от подложки наблюдаемого объекта. Многие объекты молекулярной биологии имеют характерный размер в несколько нанометров, поэтому используемые подложки обязаны иметь шероховатость как минимум на порядок меньше. Традиционные подложки для нано- и микрообъектов биологии – это графит и слюда. Оба этих материала легко скалываются по плоскости спайности, обнажая две абсолютно чистых кристаллических плоских поверхности. Некоторые трудности возникают в необходимости дальнейшей химической обработки этих поверхностей с той целью, чтобы они стали пригодными для адсорбции биомолекул или адгезии больших объектов, например, бактерий.

В настоящем изложении мы рассмотрим вначале методы и результаты наблюдения конкретных объектов, затем остановим Ваше внимание на уникальных возможностях зондовой микроскопии, недостижимых в других методах, - измерениях механических свойств нуклеиновых кислот, белков, вирусных частиц, бактериальных клеток. Посмотрим также достигнутые успехи в наблюдении бо-

лее больших биообъектов на примере наблюдения структуры человеческого волоса. Сделаем небольшой экскурс в технику создания биосенсоров и биочипов.

Но сначала скажем несколько слов о месте зондовой микроскопии среди других аналитических методов высокого разрешения. Надо честно заметить, что растровая и просвечивающая электронная микроскопия, работающая в вакууме, дает более высокое пространственное разрешение при наблюдении нуклеиновых кислот, белковых молекул и вирусных частиц по сравнению с зондовой микроскопией в вакууме или на воздухе. Электронная микроскопия позволяет увидеть упаковку белковых субъединиц оболочки вируса табачной мозаики или вируса полиомиелита. Разрешение такого качества не достигнуто в зондовой микроскопии. Однако при наблюдениях в жидкостях конкурентов у зондовой микроскопии практически нет. В защиту зондовой микроскопии можно сделать и следующее важное замечание. Электронная микроскопия лучше передает ширину объектов, однако измерение высоты весьма затруднено. Напротив, зондовая микроскопия дает непосредственные измерения высоты наблюдаемых объектов. В отличие от электронной микроскопии – данные зондовой микроскопии это трехмерные изображения, в которых присутствуют латеральные размеры, а также и высота. Методы ядерного магнитного резонанса и рентгено-структурного анализа при измерениях на кристаллах также позволяют больше информации о строении биомакромолекул и взаимном расположении отдельных атомов, составляющих биомакромолекулы. Конкурировать на этом поле зондовая микроскопия не может. Однако у зондовой микроскопии нет конкурентов для того случая, когда нужно детально рассмотреть структуру точечного дефекта или дислокации на поверхности кристалла. Методы ядерного магнитного резонанса или рентгено-структурного анализа считывают сигнал, поступающих от многих миллионов одинаковых молекул, и позволяют судить о структуре одной из таких молекул. В этом смысле это методы интегральные (необходимо много молекул), а зондовая микроскопия – метод локальный и может изучать одиночную молекулу или их небольшой ансамбль.

Аппаратура для сканирующей зондовой микроскопии

Современная медицина становится все более и более персонализированной. Методики лечения и новые эффективные терапии неизбежно должны по максимуму соответствовать конкретным особенностям каждого пациента в отдельности. Такие условия формируют высокую потребность в технологических комплексах, способных быстро и всесторонне анализировать биологический материал индивидуального человека на уровне отдельных клеток и биомакромолекул. Таким образом, сканирующая зондовая микроскопия как нельзя кстати подойдет

во многих отраслях современной диагностической медицины. Эффективная интеграция большого количества методов анализа и предельно высокая чувствительность этих методов делает платформу уникальной.

На сегодняшний день атомно-силовая микроскопия – единственный метод, который позволяет продвинуть микрохирургию на наноуровень, удовлетворить возросшие требования к точности, воспроизводимости и автоматизации воздействия на клетки и придать новый импульс развитию клеточных технологий, в том числе и для медицинской практики.

Атомно-силовая микроскопия (АСМ) является современным и перспективным методом, применяемым в научных исследованиях. Основными преимуществами АСМ являются:

- возможность получать трехмерное изображение исследуемых объектов с разрешением до атомарного и молекулярного;
- возможность исследовать объекты, находящиеся в жидкой среде;
- высокая пространственная точность и локализация воздействия методом силовой нанолитографии.

Суть силовой нанолитографии состоит в использовании зонда атомно-силового микроскопа (кантилевера) в качестве инструмента для точечного воздействия на поверхность. Хотя этот метод широко используется для создания микро- и наноразмерных рельефов на неживых объектах (в основном, на синтетических полимерах), на настоящий момент его применение к живым системам ограничивается единичными экспериментами. Поэтому применение АСМ для микрохирургических операций на клетках и клеточных структурах является существенно новым подходом как в отечественной, так и в мировой науке.



Рис. 1. Мультифункциональный сканирующий зондовый микроскоп «ФемтоСкан»

Сканирующие зондовые микроскопы производятся в России, США, Германии, Японии, Китае и других странах. По сути дела, сканирующий зондовый микроскоп стал настольным прибором, используемым в реальных нанотехнологиях, в том числе в таких областях, как материаловедение, биология и медицина.

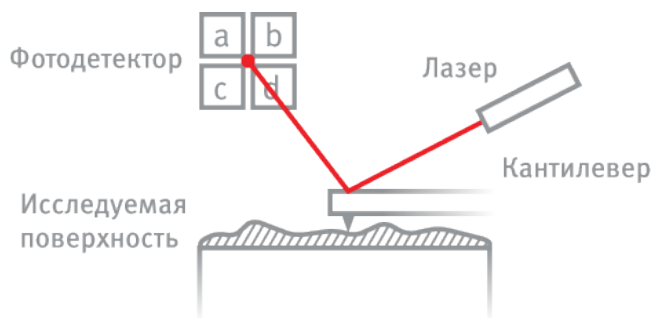


Рис. 2. Принципиальная схема работы атомно-силового микроскопа

На рис. 1. приведено изображение механической системы сканирующего зондового микроскопа ФемтоСкан производства ЗАО «Центр перспективных технологий» и ООО НПП «Центр перспективных технологий» (www.panoscory.ru). В простом контактном режиме зондовый микроскоп можно рассматривать как профилометр с субнанометровым пространственным разрешением (рис. 2).

Повествование о конкретных объектах начнем с рассказа о главной биологической молекуле – дезоксирибонуклеиновой кислоты – ДНК.

Подложки для бионаноскопии.

Графит

Для того чтобы рассмотреть объект на атомном и молекулярном уровне необходимо использовать специальные атомно-гладкие подложки. Для этих целей применяют слоистые кристаллы, при сколе которых получают чистые и гладкие поверхности. Наиболее часто используют кристаллы слюды и графита. У графита есть ряд важных преимуществ, как у подложки:

- он проводит электрический ток, что позволяет исследовать объекты не только методом атомно-силовой микроскопии, но и с помощью сканирующей туннельной микроскопии, сканирующей резистивной микроскопии и др.;
- поверхность графита инертна, из нее не происходит высвобождение ионов при помещении в водные растворы, что может значительно влиять на ионную силу растворов вблизи подложки.

Следует заключить, что графитовая подложка оказывает меньшее воздействие на адсорбированные на ней объекты. Например, измеряемая в атомно-силовой микроскопии высота молекул ДНК на поверхности графита оказывается приблизительно в два раза больше, чем для ДНК, адсорбированных на поверхности слюды [4].

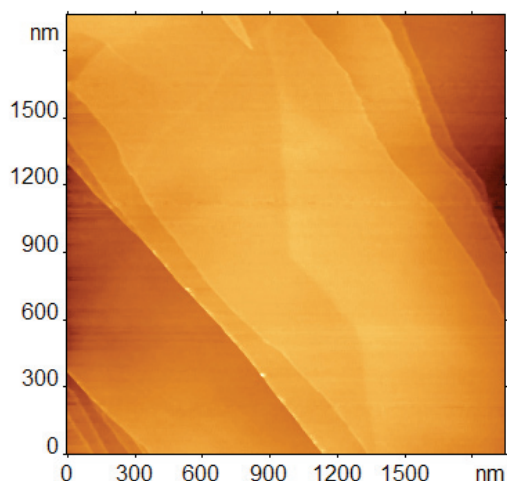


Рис. 3. АСМ-изображение ступеней скола

Однако, в отличие от слюды, подложки из графита оказываются менее совершенными, что проявляется в увеличении частоты встречаемости кристаллических дефектов на поверхности скола. Поэтому очень важно, используя графит в медико-биологических исследованиях, иметь представления об основных типах дефектов на поверхности графита, чтобы исключить возможность ошибочной интерпретации изображений. Далее приведем краткую характеристику дефектов, встречаемых на поверхности сколов графита. Вначале расскажем о дефектах, проявляющихся на топографических изображениях, а затем о плоских дефектах, которые не создают рельефа на поверхности, но способны повлиять на процесс адсорбции биообъектов.

Ступени скола

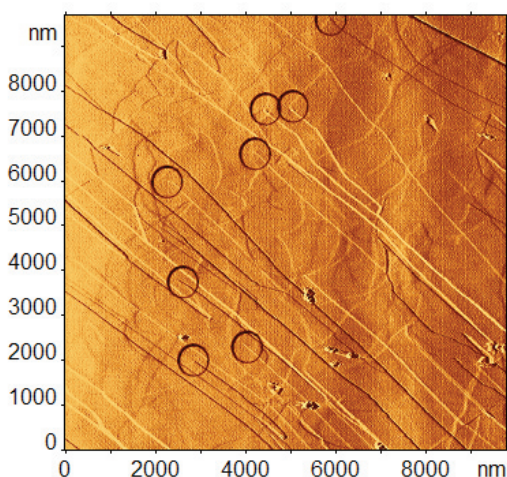


Рис. 4. АСМ-изображение дислокации.

Применен фильтр подсветки.

Кружками обведены места обрыва ступеней скола

К наиболее распространенным дефектам поверхности графита следует отнести ступени скола (рис. 3). Данные ступени имеют одинаковое направление, которое совпадает с направлением скола.

Для образцов высокоориентированного пиролиитического графита (ВОПГ) с мозаичностью 0.4° и 0.8° протяженность ступеней скола на единицу площади поверхности составляет $1-3 \text{ мкм}^{-1}$. Чем меньше угол мозаичности ВОПГ, тем меньше высота ступеней скола. Для ВОПГ с мозаичностью 0.4° доля однослойных ступеней $\sim 50\%$, для ВОПГ с мозаичностью 0.8° доля однослойных ступеней $\sim 35\%$.

Винтовые дислокации

Часть ступеней скола обрываются в центре террас графита. Причиной является выход винтовых дислокаций на поверхность, линии которых направлены перпендикулярно поверхности. На рис. 4 винтовые дислокации обведены кружочками. Интересно отметить, что часто от винтовой дислокации берет свое начало краевая дислокация, линия которой лежит в глубине под несколькими атомными слоями графита. Возможность наблюдения перехода винтовой дислокации в краевую говорит о небольшой протяженности винтовых дислокаций вглубь графита.

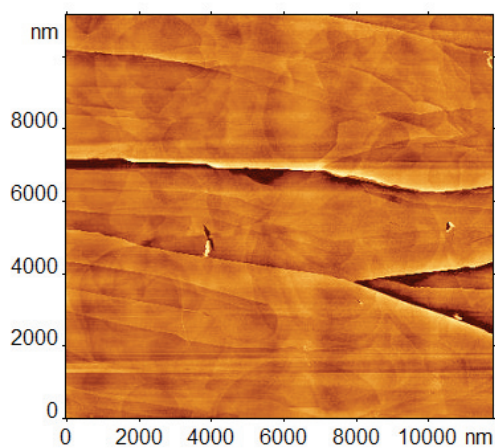


Рис. 5. АСМ-изображение системы краевых дислокаций. Из изображения вычтен сплайн поверхности для удаления крупного рельефа

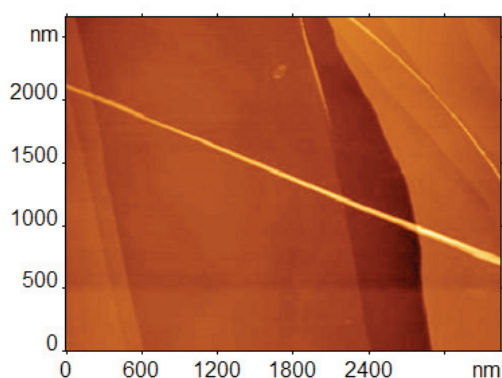


Рис. 6. АСМ-изображение структур в виде волокон

Краевые дислокации видны на АСМ, СТМ и СРМ изображениях в виде ступеней, которые соответствуют обрывам атомных слоев графита под поверхностью. В отличие от ступеней скола, линии краевых дислокаций имеют причудливую форму и, как правило, замкнуты в петли. Приповерхностная структура ВОПГ хорошо видна при удалении

крупных деталей рельефа поверхности путем вычитания сплайна поверхности из изображений (рис. 6). Размеры петель варьируются в широких пределах: от нескольких десятков нанометров до нескольких микрометров.

Во многих случаях высоты краевых дислокаций составляют менее 0.3 нм , что меньше межслоевого расстояния в графите. Это связано с удалением краевых дислокаций от поверхности. Сглаживание рельефа поверхности происходит сравнительно медленно. В АСМ экспериментах наблюдались краевые дислокации, лежащие на глубине более 4 нм . Поверхностная плотность краевых дислокаций для графита с мозаичностью 0.4° и 0.8° составляет $\sim 1 \text{ мкм}^{-1}$.

Волокна

Достаточно редко на сколах ВОПГ наблюдаются структуры в виде волокон. На рис. 5 показана пара волокон с поперечными размерами порядка 10 нм . Диаметр волокон не является постоянным и уменьшается ближе к концу волокон. Если волокно оказалось под поверхностью скола, то в месте его прохождения изгибаются поверхностные атомные слои. В области прохождения волокон верхние атомные слои могут искривляться на десятки нанометров по высоте, при этом ширина искривленной области может составлять более одного микрометра.

Звезды

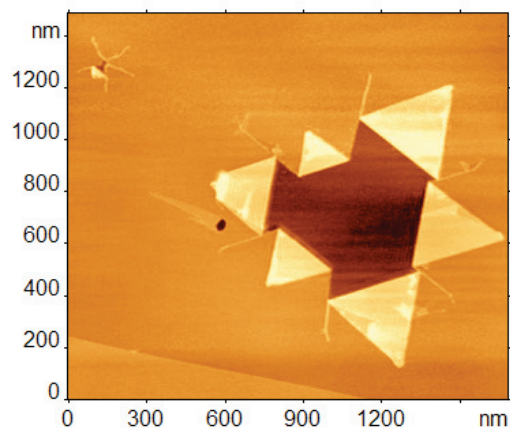


Рис. 7. АСМ-изображение звезды. В верхнем левом углу видна нераскрывшаяся звезда

Одним из самых необычных дефектов на поверхности графита являются звезды (рис. 7). Есть несколько версий образования подобных дефектов. Игла при подводе врезается в поверхность ВОПГ, затем резко отводится, и вместе с ней поднимаются верхние слои, до тех пор, пока упругая энергия их деформации не превысит энергию образования трещин. Однако эксперименты по вдавливанию острия иглы в поверхность приводили к образованию кратера со значительно менее упорядоченной структурой. Согласно другой гипотезе, звезды образуются при скалывании ВОПГ, в местах, где структура графита сильно напряжена (сжатая пора, включение другой фазы с сильно отличающимися механическими характе-

ристиками). Упругая энергия дефекта идет в дальнейшем на развитие трещин и загиб лепестков. В пользу второй версии говорит то обстоятельство, что на кадрах может присутствовать сразу несколько звезд.

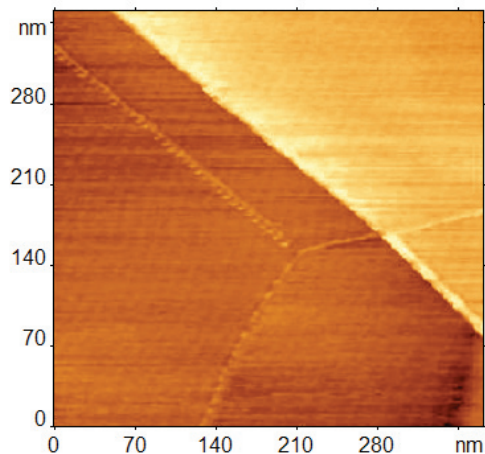


Рис. 8. СТМ-изображение стыка трех зерен

Межзеренные границы

ВОПГ является поликристаллом, для которого оси с всех кристаллитов ориентированы одинаково, однако в плоскости поверхности ориентация кристаллитов произвольна. Размеры кристаллитов составляют ~ 10 мкм, поэтому стыки зерен могут встречаться достаточно часто. Межзеренные границы наблюдаются с помощью СТМ в виде нитей с высотой в интервале от 0.1 нм до 0.3 нм и диаметром 2-5 нм. В АСМ межзеренные границы наблюдаются редко, так как во многих случаях их структура является плоской. Межзеренные границы могут наблюдаться с помощью микроскопии латеральных сил.

Интересно отметить, что ступени скола не прерываются, проходя через межзеренную границу. На рис. 8 показан стык трех зерен. В области стыка границы встречаются под углами близкими к 120° . Межзеренные границы имеют периодическую структуру. Чем больше угол поворота между соседними зернами, тем меньше период границы. На поверхности графита наблюдались границы с периодом до 25 нм.

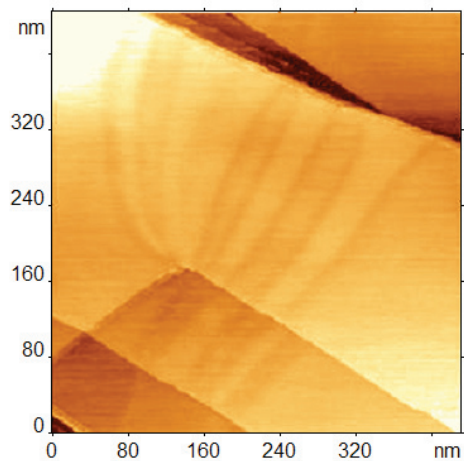


Рис. 9. СТМ-изображение дислокационных рядов

Дислокационные ряды

В местах прохождения дислокационных рядов на поверхности ВОПГ изменения высоты поверхности не происходит, поэтому, обычно, в атомно-силовой микроскопии данные дефекты не наблюдаются. Однако если проводить измерения в СТМ или СРМ, то на атомно-гладких террасах можно обнаружить структуры в виде набора полос. Пример показан на рис. 9. Возникновение данных дефектов связано с деформацией графита. На недеформированной поверхности ВОПГ дислокационные ряды наблюдаются редко. Если перед съемкой изогнуть тонкий кусочек графита, то содержание дислокационных рядов значительно возрастет.

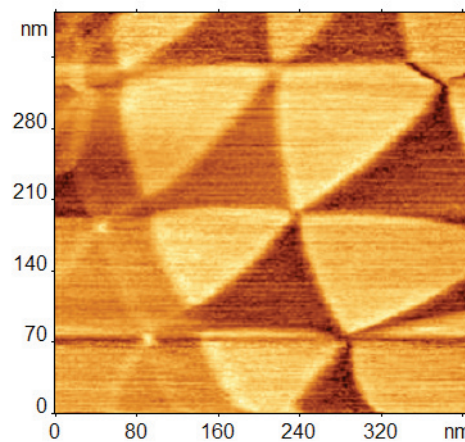


Рис. 10. СРМ-изображение дислокационной сетки

Дислокационный ряд состоит из двух частичных дислокаций, между которыми расположен дефект упаковки. Ширина полос обычно составляет от 15 до 65 нм. В местах закрепления на ступенях или межзеренных границах дислокационные полосы расширяются до 60-70 нм. В СТМ дислокационным рядам соответствует высота от 0.08 нм до 0.18 нм. Контраст дислокационных рядов может инвертироваться, то есть область дефекта упаковки может быть как выше, так и ниже соседних с полосой областей. Этот эффект пока не нашел своего объяснения, предполагается, что он может быть связан с изменением состояния кончика иглы в процессе сканирования. Во многих случаях дислокационные ряды наблюдаются целыми группами с периодом от 26 нм до 170 нм.

Дислокационные сетки

Дислокационные сетки образуются в месте пересечения дислокационных рядов с двумя различными направлениями. Как и дислокационные ряды, дислокационные сетки не наблюдаются в АСМ, но могут быть обнаружены с помощью СТМ и СРМ. Дислокационная сетка состоит из треугольников. Стороны треугольников соответствуют частичным дислокациям, разграничивающим области дефекта упаковки от областей бездефектного графита. Треугольники, содержащие дефект упаковки, имеют вогнутые границы. Во время сканирования контраст дислокационных сеток может инвертироваться, также как и

для дислокационных рядов. Например, на рис. 10 дефектам упаковки соответствуют темные треугольники. Как правило, на СТМ изображениях высота треугольников составляет меньше 1 нм.

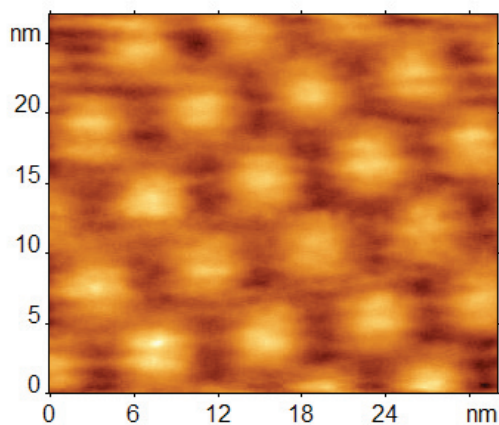


Рис. 11. СТМ-изображение муара

Муары

Гексагональные сверхрешетки (муары) образуются при повороте атомных слоев графита относительно друг друга. Области со сверхрешеткой в большинстве случаев ограничены ступенями скола и межзеренными границами. Чем меньше угол поворота атомных слоев графита относительно друг друга, тем больше период муара.

Симметрия муаров полностью соответствует симметрии кристаллической решетки графита. Муары могут наблюдаться с помощью СТМ и СРМ. В АСМ муары не видны, так как поверхность остается плоской. Для СТМ изображений характерны высоты муаров от 0.05 нм до 0.7 нм и периоды от 1.7 нм до 44 нм.

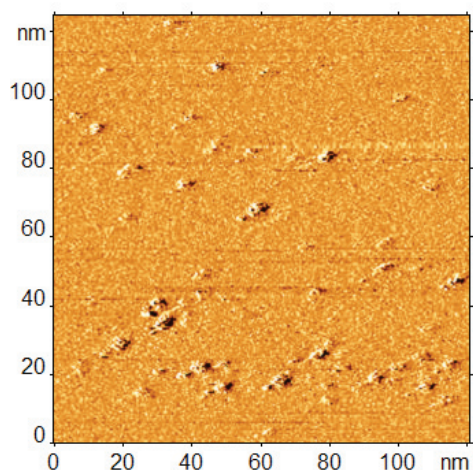


Рис. 12. СТМ-изображение точечных дефектов

Точечные дефекты

Различные оценки показывают, что на поверхности ВОПГ различного качества концентрация точечных дефектов в нормальных условиях может составлять от 0 мкм⁻² до 20 мкм⁻². Дефекты проявляются яркими пятнами на СТМ-изображениях. При приближении иглы к по-

верхности, дефекты оказываются невидимыми, так как в данных условиях основной вклад в туннелирование вносят объемные состояния графита.

Локальная плотность состояний вблизи участка поверхности с пропущенным атомом (вакансией) возрастает, поэтому вакансии могут быть легко визуализированы с помощью СТМ, но для АСМ, работающего на воздухе при комнатной температуре, они невидимы. На рис. 12 показаны точечные дефекты, созданные на поверхности графита методом локального анодного окисления.

ДНК

С момента создания туннельного и атомно-силового микроскопа взгляды ученых естественно обратились на наблюдения главнейшей молекулы в биологии – ДНК. Первоначальные попытки наблюдений с помощью туннельного микроскопа были плохо воспроизводимы и не лишены серьезных артефактов. Проблемы туннельной микроскопии были не только в используемой подложке – графите, не обладающем необходимой адсорбционной способностью, но и в более глубоких вопросах туннелирования электронов вблизи поверхности ДНК. Интересно заметить, что при надежном закреплении ДНК на модифицированной поверхности графита она видна в отрицательном контрасте, то есть как углубление, а не возвышение, как происходит для большинства объектов с конечной электропроводностью [5].

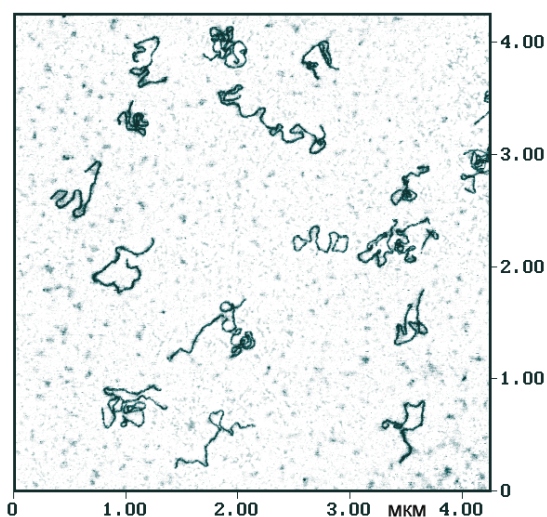


Рис. 13. Молекулы ДНК, осажженные на поверхности слюды в присутствии 1M NiCl₂. Наблюдения М.О. Галлямова и др.

Когда был применен атомно-силовой микроскоп и позаимствованы из электронной микроскопии методы осаждения ДНК на поверхности слюды, то были получены результаты высокой воспроизводимости и информативности (рис. 13, 14). В водном растворе и ДНК и поверхность свежесколотой слюды имеют отрицательный заряд и между ними возникают силы кулоновского отталкивания. Вследствие этого необходимо использовать растворы двухвалентных ионов для гашения отрицательного

заряда. Хорошие результаты дают эксперименты, когда слюду модифицирует небольшими концентрациями органических веществ: аминопропилтриэтоксисилоном или силатраном. Такая модифицированная поверхность слюды на изображениях дает незначительный фон, не препятствуя получению качественных изображений ДНК.

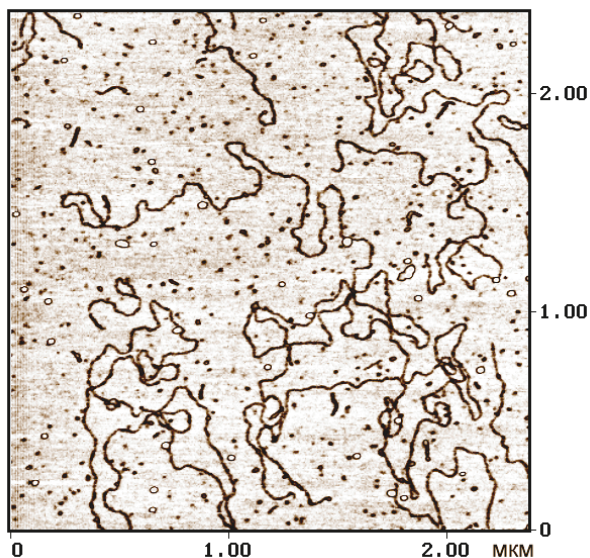


Рис. 14. Молекулы ДНК, осажденные на поверхности слюды в присутствии уранилацетата. Наблюдения М.О. Галлямова

Атомно-силовая микроскопия позволяет наблюдать конформационные состояния биомолекул в растворах, в частности, ДНК [6]. При этом надо помнить, что для наблюдения геометрии биомолекулы ее необходимо закрепить на подложке. Другими словами, мы наблюдаем конформацию не свободно плавающей в растворе молекулы, а закрепленной на межфазной границе жидкость-твердое тело. Поэтому при интерпретации результатов надо быть уверенным, что подложка оказывает минимальное воздействие.

РНК

РНК является более сложным объектом для наблюдения, в связи с тем, что менее жесткая молекула, требует более деликатного выделения и нанесения на подложки. В одном из первых наблюдений вирусной РНК [7] для устранения возможных артефактов была использована схема рассмотрения сначала РНК-содержащих вирусных частиц (вирус табачной мозаики), промежуточных стадий частичного разрушения белковой оболочки (рис. 16) и наблюдения свободных концов молекул РНК и моментов окончательного освобождения РНК от белковой оболочки под действием мочевины (рис. 17). Весьма полезную информацию для молекулярной биологии дали исследования комплексообразования РНК с различными белками, в частности, транспортными.

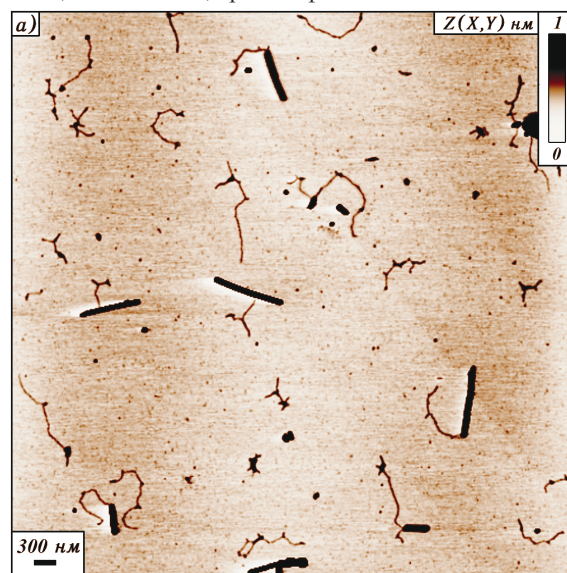


Рис. 16. Частично разрушенные частицы вируса табачной мозаики с выступающими свободными концами РНК. Наблюдения М.О. Галлямова и др.

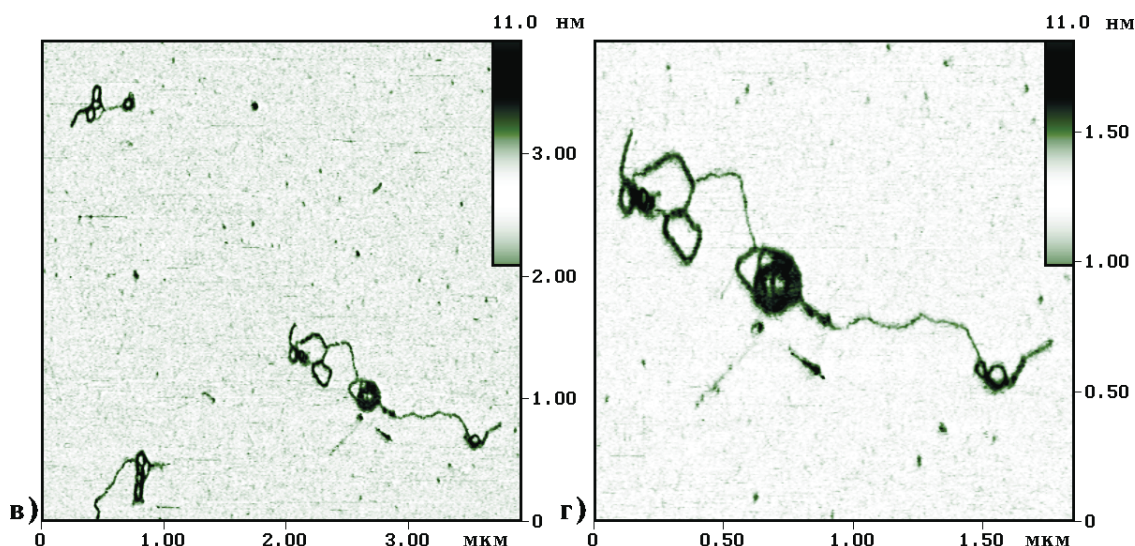


Рис. 15. Наблюдение ДНК в водном растворе изопропанола (50%). Левый и правый кадр получены с интервалом в несколько минут

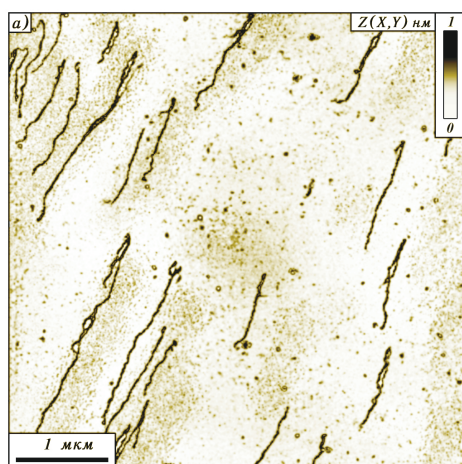


Рис. 17. Полностью освобожденные молекулы РНК. Удаление белковой оболочки частиц вируса табачной мозаики выполнено помощью диметилсульфоксида. Наблюдения М.О. Галлямова и др.

Белки

Одиночные молекулы и комплексы

Размеры отдельных белковых молекул сравнимы с радиусом закругления зонда атомно-силового микроскопа. Субмолекулярное пространственное разрешение удается получить на белках высокой молекулярной массы. Разрешить упаковку цепей в небольших белках, например, лизоциме (молекулярная масса 14 кД) до сих пор не удавалось. Известен ряд работ, где надежно удавалось отличить белковые мономеры от димеров и мультимеров (рис. 18, [8]).

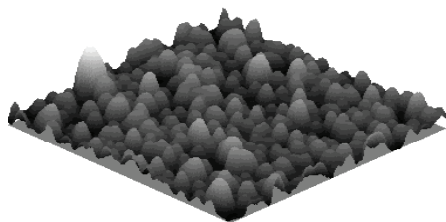
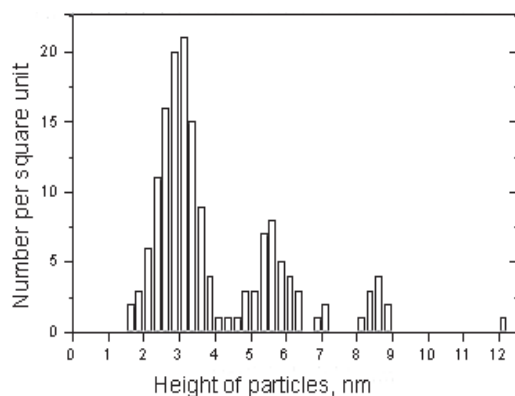


Рис. 18. Трехмерное изображение молекул цитохрома Р450 в олигомерной форме, адсорбированных на поверхности слюды. В распределении частиц по высоте присутствует три максимума, соответствующих: 1) мономерным частицам (высота 3 нм), октамерам (высота 5,5 нм), и комплексам из 12-30 белковых молекул (высота около 8,5 нм)

Зондовую микроскопию можно использовать для регистрации биоспецифического связывания антиген-

антитело. Измерения размеров отдельных частиц и достигаемая точность позволяет отделить одиночные антитела и антигены от их комплексов. Зондовая микроскопия позволяет получить информацию о характере агрегирования белков и связывания с нуклеиновыми кислотами. В работе [9], например, определен по полученным изображениям характер связывания транспортного белка с вирусной РНК (рис. 19).

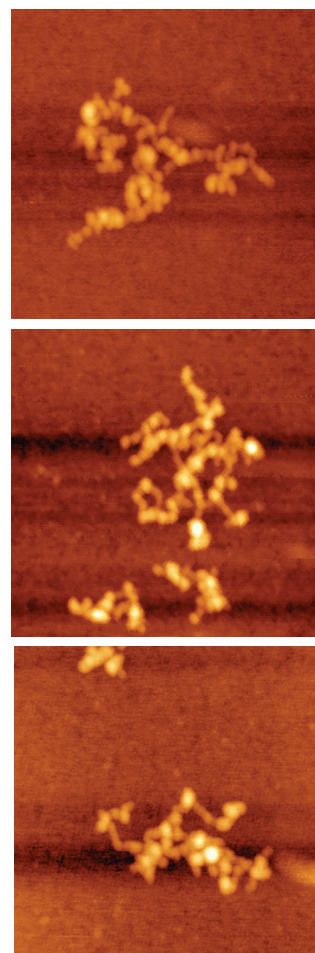


Рис. 19. Кооперативное неспецифическое связывание транспортного белка с вирусной РНК

Кристаллы

При наблюдении белковых кристаллов в насыщенных растворах проявляется существенное достоинство зондовой микроскопии в биологии, а именно, возможность наблюдения динамики процессов в жидких средах, естественной среде для многих биологических объектов. Проведенные измерения позволили зарегистрировать кинетику роста дислокационных холмов и двумерных зародышей для многих белковых кристаллов на уровне отдельных молекул или строительных единиц [10,11]. Например, для кристалла лизоцима были измерены скорости движения ступеней и изломов, вероятности присоединения и отсоединения строительных единиц, зависимости кинетических параметров от различных факторов (температуры, пересыщения и др.) [12].

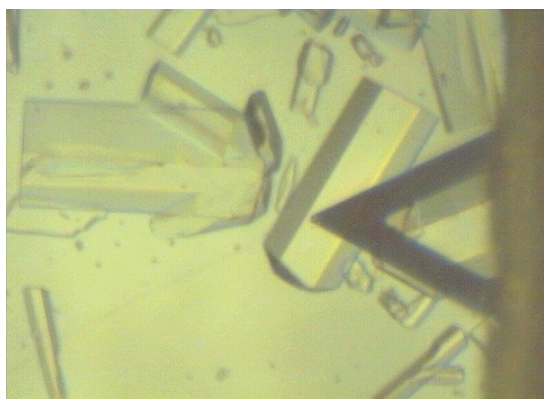


Рис. 20. Оптическое изображение растущего кристалла лизоцима и кантилевера (темный треугольник в правой части фотографии) в процессе сканирования поверхности кристалла

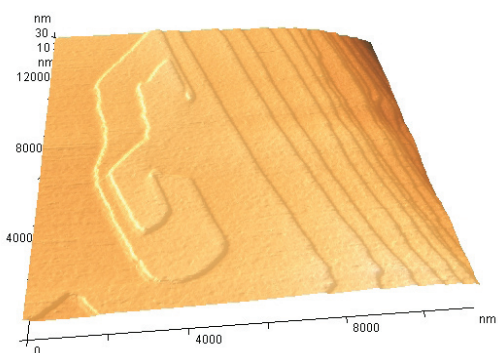


Рис. 21. Изображение двухзаходовой винтовой спирали растущего кристалла лизоцима. Наблюдение в насыщенном растворе

Атомно-силовая микроскопия позволяет наблюдать структуру поверхности растущего кристалла с молекулярным разрешением. Изучать упаковку молекул вблизи точечных дефектов, что является недоступным для других методов высокого разрешения. В работе [13] было обнаружено явление реконструкции поверхности, когда упаковка белковых молекул на поверхности кристалла отличается от объемной структуры.

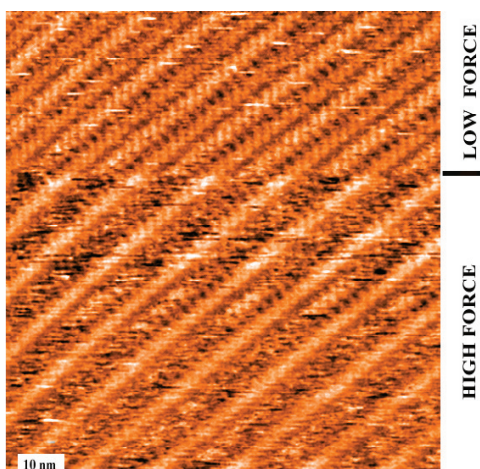


Рис. 22. Соседние ряды белковых молекул видны в различном контрасте, который зависит от величины приложенной силы. В объеме эти ряды считаются эквивалентными. Размер кадра 130 x 130 нм². Наблюдения в жидкости

Вирусы

Хотя разрешение зондовой микроскопии при исследовании вирусов проигрывает электронной микроскопии, большая легкость в приготовлении образцов оправдывает применение зондовой микроскопии для качественного анализа морфологии вирусов. И все-таки основное применение методов зондовой микроскопии в вирусологии следует искать не в определении строения вирусов, а в изучении процессов происходящих с ними.

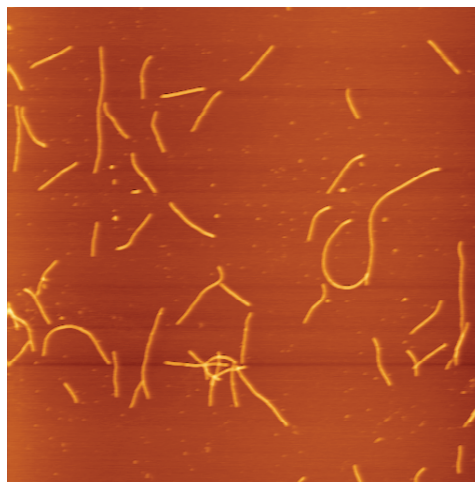


Рис.23. Изображения X вируса картофеля. Частицы расположены на слюде. Размер кадра 3 x 3 мкм²

Процессы кристаллизации наблюдали для различных вирусов [14,15]. Этапы разрушения белковой оболочки вируса табачной мозаики с освобождением вирусной РНК

зарегистрированы в [5]. Атомно-силовая микроскопия позволяет определять механические свойства наноструктур, так для вирусных частиц были определены значения модуля Юнга при его поперечном сжатии с помощью зонда. Оценочное значение модуля Юнга вируса табачной мозаики составляет величину $E \approx 3 \div 4 \cdot 10^9$ Па, X вируса картофеля обладают меньшей жесткостью $E \approx 8 \cdot 10^8$ Па. В случае применения простых расчетов, основанных модели деформации Герца, получается хорошее согласие с экспериментами, как это продемонстрировано на рис. 24.

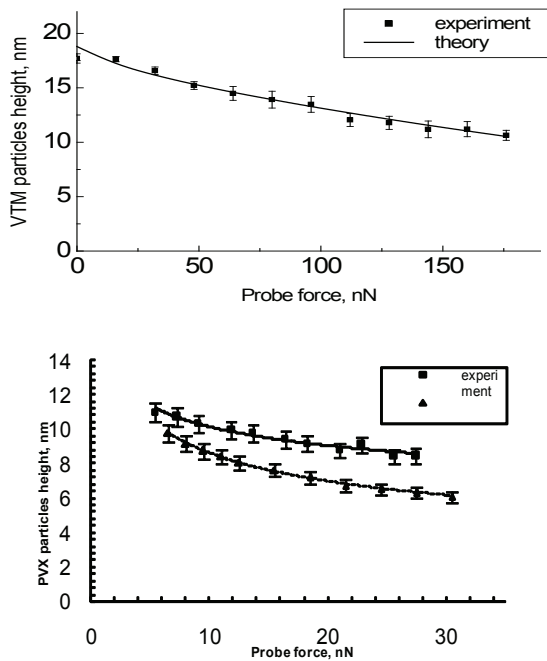


Рис. 24. Зависимость наблюдаемой высоты вирусных частиц от приложенной силы: данные для вируса табачной мозаики – слева, для X вируса картофеля – справа. Теоретические кривые получены в приближении модели Герца. На правом рисунке – верхняя кривая соответствует интактной (неповрежденной) частице, нижняя кривая – вирусу с разрушенной РНК с помощью белка РНК-азы

Полезно заметить, что вирус табачной мозаики можно использовать в качестве тестовой структуры [16],

как для калибровки атомно-силового микроскопа по Z-перемещению, так и в качестве эталона жесткости.

Недавно было показано, что вирусные частицы могут быть удачным средством доставки наночастиц в ткани человека. Вирусные частицы нашли неожиданное удачное применение в создании новых подходов к экологически безопасному производству наночастиц с использованием растений [17].

Бактериальные клетки

Бактерии можно считать практически идеальным объектом для зондовой микроскопии. Бактерии имеют микронные размеры. Поэтому легко можно наблюдать как бактериальные клетки и их колонии целиком, так и детально изучать отдельные фрагменты клеток [1]. Бактериальные клетки имеют жесткий полимерный каркас, поэтому не претерпевают деформаций при сканировании их поверхности зондом микроскопа. Для наблюдения бактерий на воздухе процедура приготовления тривиальна проста. Выращенные на питательной среде клетки переносят в дистиллированную воду до достижения концентрации около 10^9 /мл. Каплю в несколько мкл помещают на поверхность свежесколотой слюды. Вода смачивает слюду, образуя тонкую пленку. После испарения воды (или её удаления с помощью промокающей бумаги), клетки осаждаются на подложке одиночным образом или формируя монослойные покрытия. В экспериментах показано, что краткосрочное помещение бактерий в дистиллированную воду не приводит к их лизису (разрушению).

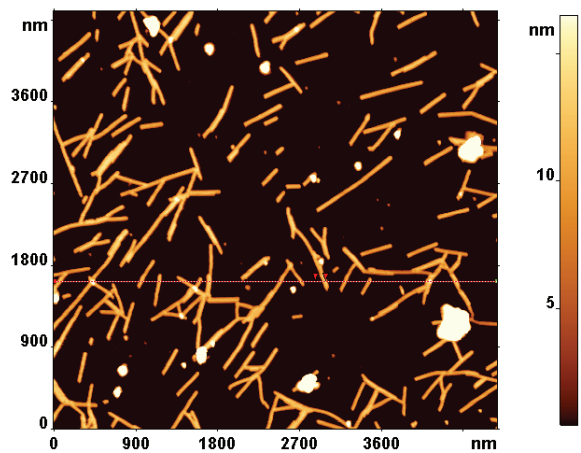
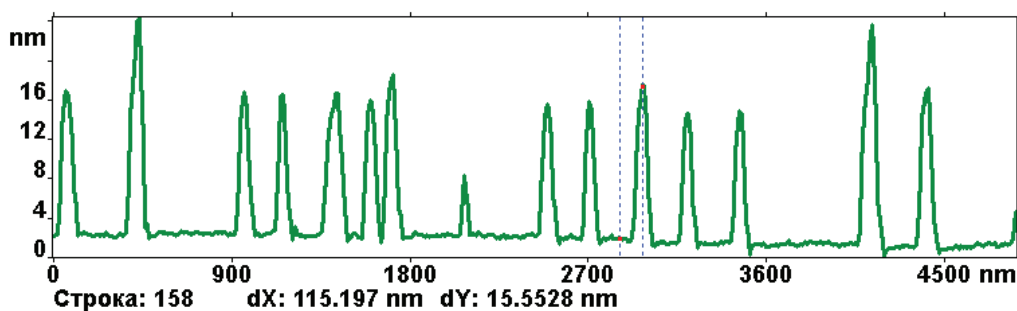


Рис. 25. Изображение частиц вируса табачной мозаики на поверхности слюды. Внизу – поперечное сечение, указывающее на высокую однородность частиц по высоте



Атомно-силовая микроскопия дает трехмерные изображения бактериальных клеток (рис. 26, 27). Данные атомно-силовой микроскопии могут служить дополнительным информативным критерием при составлении определителей бактерий.

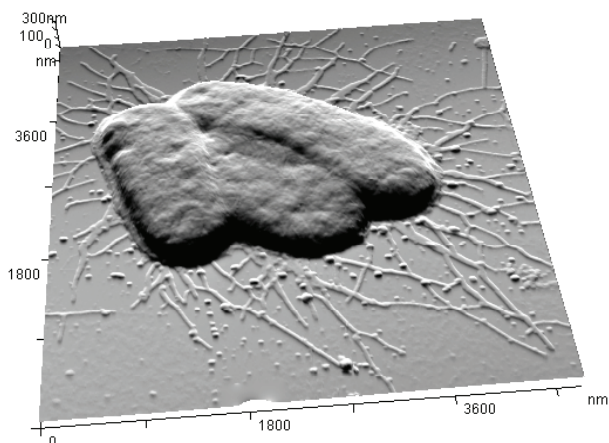


Рис. 26. Трехмерное изображение бактерий *Escherichia coli* на поверхности слюды. Наблюдения на воздухе

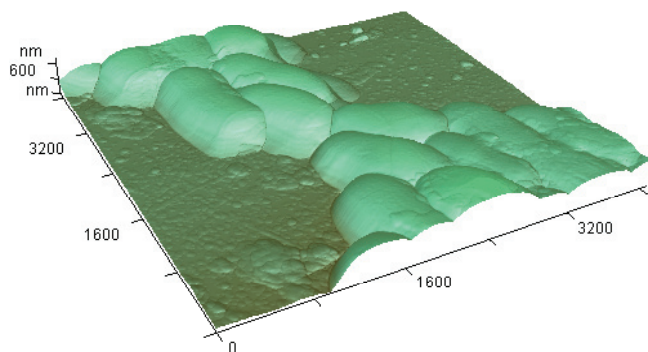


Рис. 27. Изображение бактерий *Helicobacter pylori*

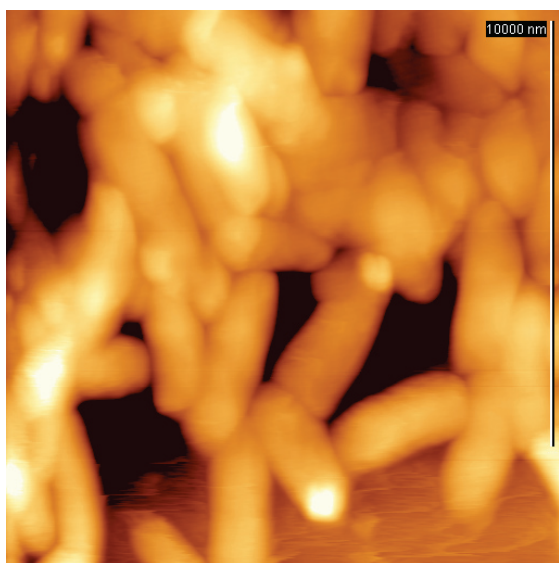


Рис. 28. Изображения бактериальных клеток *Escherichia coli* JM109 получено в буферном растворе. Клетки иммобилизованы на поверхности слюды с помощью полилизина

При наблюдении в жидкости контраст получаемых изображений падает, что естественно и объясняется наличием подвижных полимерных цепей наружной мембраны. Изображение бактериальных клеток *E.coli* в буферном растворе приведен на рис. 28. [18].

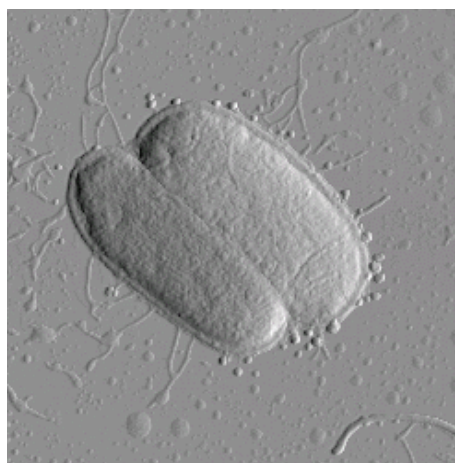
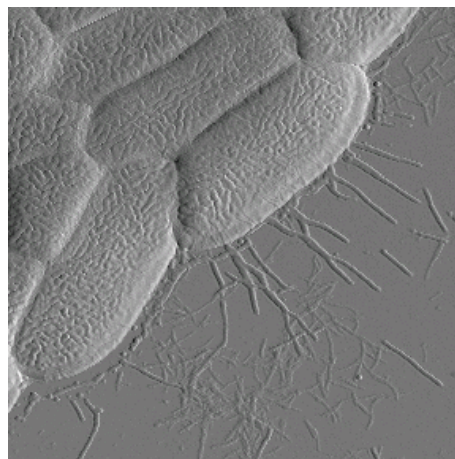


Рис.29. Наблюдение структурных различий морфологии поверхности родительской и трансдуктантной бактерии, наследующей ген возбудителя дизентерии – бактерии *Shigella flexneri*, отвечающий за синтез боковых цепей липополисахаридов

Атомно-силовая микроскопия позволяет надежно регистрировать структурные изменения, происходящие на поверхности наружной мембраны клеточной стенки. На рис. 29. слева представлены изображения родительской бактерии *Escherichia coli*, правое изображение соответствует генно-модифицированной бактерии: в ДНК исходной бактерии был вставлен ген *gfb-a3,4*, отвечающий за синтез O-специфических боковых цепей липополисахаридов. Эти цепи на поверхности клетки дают ламелярную структуру, по общей морфологии существенно отличной от структуры поверхности исходной родительской клетки [19].

Клетки высших организмов

Имеются определенные трудности в наблюдении клеток высших организмов [20]. Клетки животных и растений не обладают высокой механической жесткостью. Взаимодействие с зондом во время сканирования при-

водит к их деформации и увеличению области контакта зонд — поверхность клетки, что соответственно снижает достигаемое пространственное разрешение. С другой стороны, правда, зондовая микроскопия дает уникальную возможность измерения не только самой механической жесткости отдельных клеток, но и ее адгезивных и фрикционных свойств.

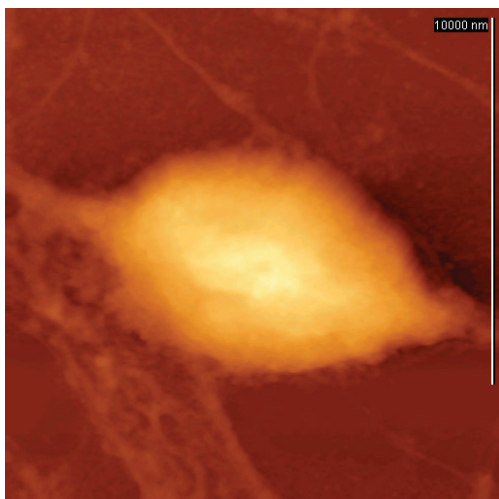


Рис. 30. Изображение нейрона. Размер кадра 13,6 x 13,6 мкм2

Зондовая микроскопия позволяет наблюдать динамические процессы, происходящими с клетками. Например, удалось визуализировать движение остеобластов мышей по поверхности стеклянной подложки [21]; процесс образования агрегатов этих клеток и агрегацию фибробластов куриных эмбрионов; были получены серии АСМ-изображений первичных остеобластов мышей в процессе клеточного деления; были исследованы изменения клеточной поверхности, сопутствующие апоптозу клеток остеосаркомы. Интересно отметить, что сканирование клеточной поверхности острием зонда позволяет также визуализировать и некоторые детали внутреннего строения клетки. На изображении поверхности клетки можно различить расположенные под мембраной элементы цитоскелета, на изображении делящегося остеобласта отчетливо видно раздваивающееся клеточное ядро.

Помимо морфологического анализа с нанометровым пространственным разрешением возможно определять механические параметры мембраны клеток, с помощью оптических меток находить расположение клеточных рецепторов. Зондовая микроскопия находит применение в различных областях микроскопии в диагностических целях, например, в реаниматологии [28]. Недавно нами впервые прямым методом зондовой микроскопии был показан характер повреждения (образования нанопор) стенок эритроцита при электропорации различной интенсивности.

Исследования проводились цельной венозной крови человека. Кровь (1,2 мл) помещали в кварцевую кювету с титановыми электродами, расстояние между которыми составляло 15 мм. На электроды подавали импульс элек-

трического поля. В качестве источника калиброванного импульсного электрического поля использовали клинический дефибриллятор «Liferak» 7 (США). Напряженность поля в растворе $E=1100$ В/см, длительность импульса 10 мс. При таких параметрах импульса наведенный трансмембранный потенциал превышал пороговый потенциал (пор) пробоя мембраны (пор = 300 – 500 мВ), и происходила их необратимая электропорация. Уменьшение числа эритроцитов вследствие гемолиза, а, следовательно, эффект электропорации, оценивали по кинетической кривой - зависимости $D(t)$, где D – оптическая плотность суспензии крови. Кинетические кривые гемолиза эритроцитов описывались экспоненциальной функцией:

$$D(t) = D_0 \exp(-\beta t) + D_1, \quad (1)$$

где β – константа скорости уменьшения числа эритроцитов, D_1 – остаточный уровень клеток, $D_0 + D_1$ – начальное число эритроцитов.

Исследование структуры поверхности эритроцитов до и после действия импульсного электрического поля проводили на мазках крови, сделанных по стандартной методике при комнатной температуре.

Изображения поверхностей мембран получали с помощью атомного силового микроскопа «ФемтоСкан», созданного в ООО НПП «Центр перспективных технологий». Сканирование проводили на кафедре полимеров и кристаллов физического факультета МГУ им М.В.Ломоносова. На рис. 31 представлены эритроциты в мазке: объемное изображение эритроцита и его профиль.

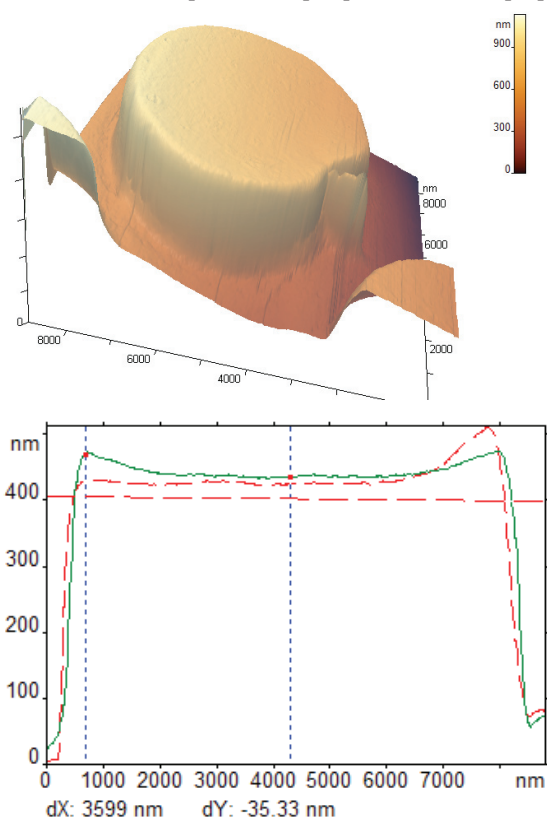


Рис. 31. Данные сканирующей зондовой микроскопии, топография и профиль поверхности эритроцита

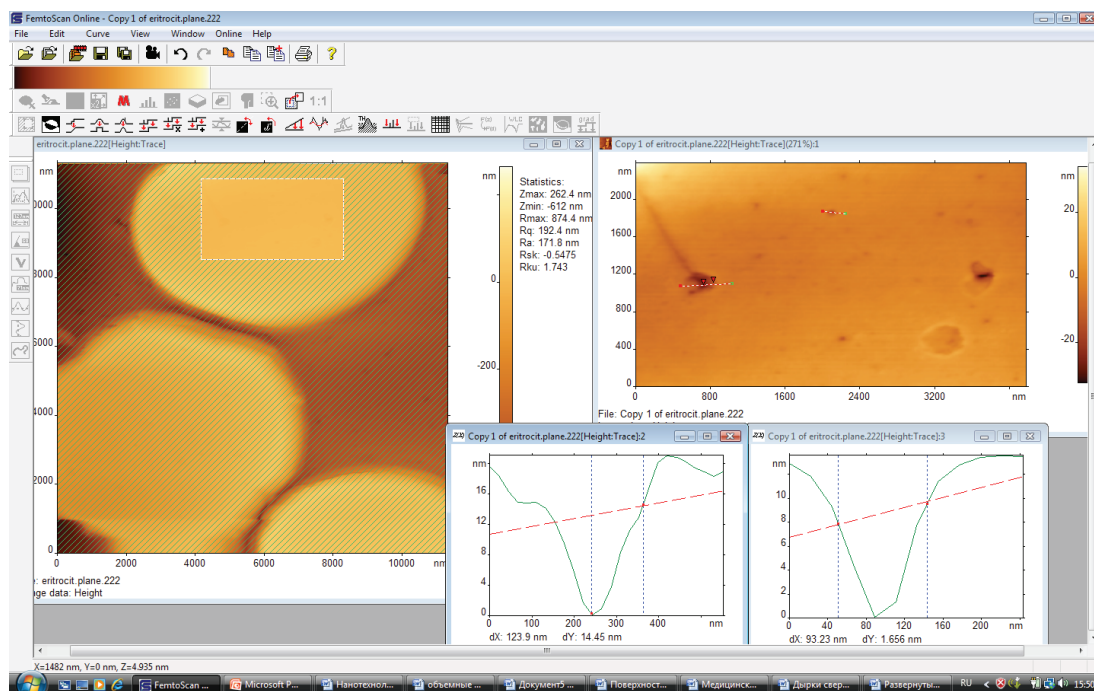


Рис. 32. Рабочее окно программного обеспечения ФемтоСкан: изображение поверхности эритроцитов после электропорации – слева, вид одиночных пор и соответствующие сечения – справа

Эритроцит в мазке лежит на стеклянной подложке и имеет форму дискоцита. Его радиус составляет 3600 нм, высота бортика – 460 нм, перепад от максимально высокой точки до впадины – 35 нм. Это показано на профиле в точках установки первого и второго курсоров.

На рис. 32 представлены эритроциты (слева) и увеличенный фрагмент одного из них (справа) после пробоя импульсом с энергией 112 Дж в изображении компьютерной программы «ФемтоСкан Онлайн». На этих изображениях представлены шкалы размеров по осям и квазицветовые шкалы размера по глубине. На увеличенном фрагменте с помощью красных и зелёных курсоров установлены линии измерения профиля пор. Ниже этого фрагмента показаны эти профили. Красный пунктир – средняя по поверхности. Левый профиль относится к левой, нижней поре, а правый – к правой, верхней. На первом профиле курсоры установлены в средней и нижней (самой глубокой) точке поры, позволяя измерить её глубину. На правом профиле показан диаметр поры. На данном примере глубина поры – 14 нм, а диаметр – 93 нм.

Поверхность даже небольшого фрагмента мембраны эритроцита изначально не является плоской. На ней можно показать шероховатости, впадины, наклоны плоскости в разных направлениях. В структуре мембраны имеются и поры. Эти мелкие поры существуют в мембране как результат неоднородности структуры. Кроме того, они могут возникать в результате фазового перехода мембраны из жидко-кристаллического состояния в гель фазу, так как температура крови в наших экспериментах выбиралась около 20 °С, что ниже точки фазового перехода.

Другие биологические объекты

Зондовая микроскопия позволяет изучать различные другие объекты биологического происхождения – ткани животных, поверхности костей, структуру эмали зубов, поверхностей ногтей и пр. Существенные возможности могут быть достигнуты при наблюдении поверхности листьев и стеблей живых растений.

На рис. 33. приведено трехмерное изображение фрагмента поверхности человеческого волоса. Любопытно заметить, что визуально наблюдаемые более качественные волосы и на микроуровне имеют более совершенную структуру с меньшим количеством дефектов.

Все предыдущее изложение касалось в первую очередь применений зондовой микроскопии для определения морфологии поверхности биологических объектов, получения трехмерных изображений и количественных размеров. Основные данные при изучении кинетики процессов - это цепочки меняющихся во времени трехмерных изображений, например, картины поверхности растущего кристалла.

Другой и весьма важный аспект зондовой микроскопии - это измерение совокупности механических свойств биологических объектов. Эта строгая физическая информация является новой для биологической науки, и ее осмысление в сфере биологических задач, а главное, для практического использования требует своего времени. Зондовая микроскопия позволяет прямым образом измерить величину механической жесткости объекта, определить силу адгезии, зарегистрировать вариации коэффициента трения – получить трехмерную карту фрикционных свойств поверхности.

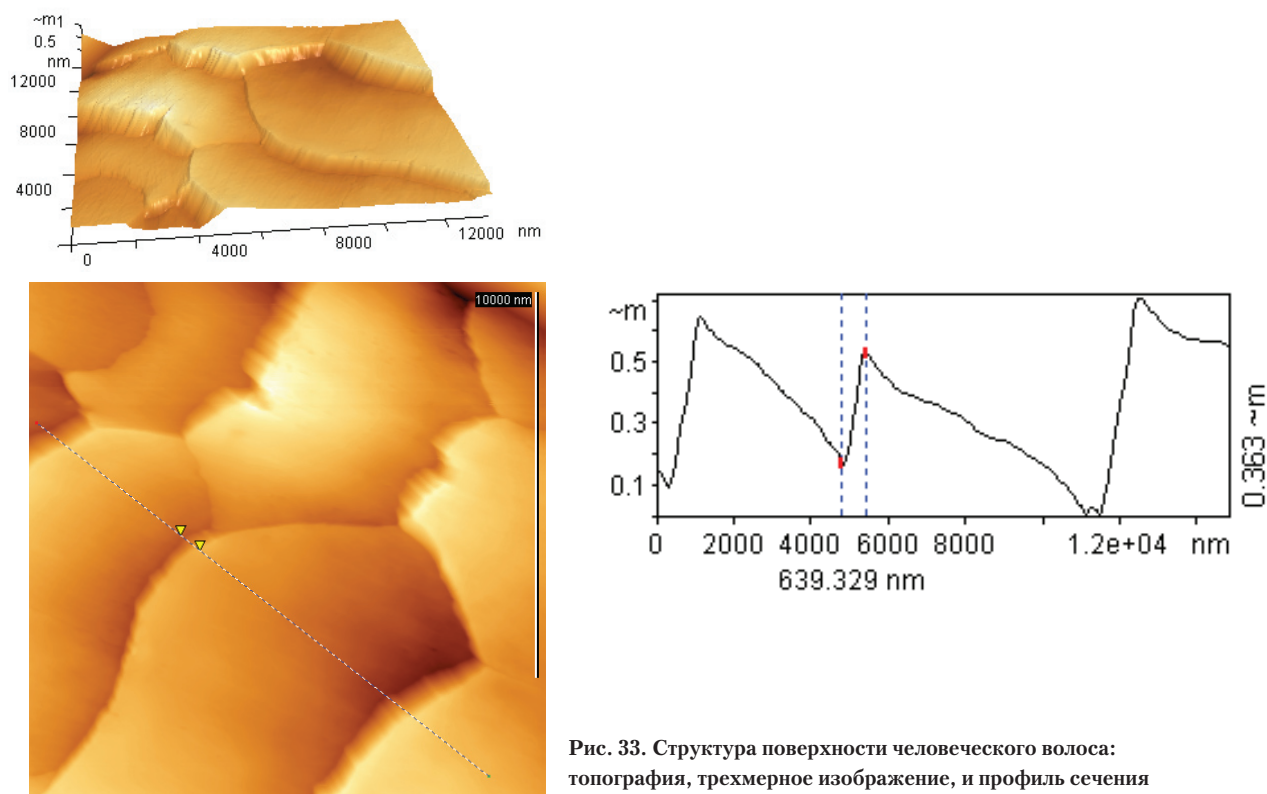


Рис. 33. Структура поверхности человеческого волоса: топография, трехмерное изображение, и профиль сечения

Прямые измерения с ДНК (один из ее концов прикреплен к подложке, другой связан с подвижным зондом атомно-силового микроскопа) позволили оценить величину силу химической связи в одиночной биомолекуле. Двухцепочечная молекула ДНК разрывается при приложении силы в 100 пН (10^{-10} Н). Атомно-силовая микроскопия позволяет измерить динамику разворачивания одиночной белковой глобулы в линейную цепочку аминокислотных остатков. Сканирования бактериальных монослойных пленок показали, что бактерии *Arthrobacter Globophormis* в мумифицированной форме более хрупки, чем в вегетативной форме. Обычные живые бактерии могут выдерживать силы при сканировании на уровне 10^{-6} Н, что на несколько порядков выше значений сил, традиционных для сканирования на воздухе. При этих силах мумифицированные бактерии разрушались полностью.

Биологические сенсоры

С самого начала атомно-силовая микроскопия привлекала к себе как новая возможность создания уникальных биологических сенсоров. Вес одной бактерии около 10^{-13} Н. Такая сила обеспечит дополнительный прогиб кантилевера с жесткостью 0,06 Н/м на 1,6 пм ($1,6 \cdot 10^{-12}$ м), что находится на уровне предельного разрешения микроскопа по силе, работающего в контактном режиме. Однако, если использовать режим работы микроскопа, когда в кантилевер совершает колебания на резонансной частоте, и частота этих колебаний чувствительна к массе кантилевера, можно измерить массу одной бактерии, как это

сделано на примере кишечной палочки (*Escherichia coli*). По этому принципу строят химические и биологические сенсоры. Масса химического реагента или биологического объекта, присоединившись к кантилеверу изменяет частоту его резонансных колебаний [22]. Измерение сдвига резонансной частоты позволяет судить о массе адсорбированного вещества. Измерения массы наночастиц производят, как правило, на специализированных приборах – атомных весах. В них используется лазерно-оптическая система, как в АСМ, однако для их работы нет необходимости использовать кантилеверы с иглой. Ключевая деталь большинства весов – упругий элемент. В весах для измерения массы хорошо работает геометрический принцип. Чем миниатюрнее весы, тем меньшие массы можно взвешивать. Если идти этим путем, то можно определить массу одной бактерии [23], белка [24] и даже отдельного атома [25].



Рис. 34. Система из 8 кантилеверов с различными покрытиями может быть использована в качестве ключевого элемента химического или биологического сенсора

Высокой чувствительностью обладают кантилеверы камертонного типа [26] и специально изготовленные кантилеверы из пьезоматериалов. Резонансные методы измерения, как правило, обладают более высокой чувствительностью по сравнению со статическими методами. Поэтому весьма любопытен тот факт, что именно конструкции статических биосенсоров оказываются весьма привлекательными для медицинских приложений [27]. Суть метода состоит в следующем. Поверхность одной из сторон кантилевера покрывают монослойной пленкой адсорбирующего вещества с биоспецифическим связыванием. Эта пленка обладает определенным значением поверхностного натяжения. При помещении такого кантилевера в биологическую жидкость на его поверхности может произойти биоспецифическое связывание, при этом адсорбция биологического материала на поверхности кантилевера приводит к изменению поверхностного натяжения пленки и соответствующему изгибу кантилевера. Для создания химических и биологических сенсоров используют кантилеверы с низкой механической жесткостью (рис. 34, [28]) Если физический принцип построения такого кантилевера прозрачен, то биологические аспекты построения такого сенсора гораздо более сложны. Необходим синтез и создания биологически активного покрытия с биоспецифическим связыванием. Кроме того, желательно, чтобы такой биосенсор был

многократного использования. А это значит, что при промывке он должен восстанавливать свои функции по адсорбции конкретного биовещества. Создание конкретного биосенсора лежит в основном в плоскости решения биологических проблем, а не вопросов, относящихся непосредственно к технике атомно-силовой микроскопии.

Заключение

Сканирующая зондовая микроскопия делает первые, но очень уверенные шаги в области биомедицинских и биосенсорных приложений.

Сочетая сканирующую зондовую микроскопию с другими аналитическими методами, становится реальным существенное продвижение на пути к решению задач персонализированной медицины, которая должна учитывать особенности строения индивидуального человека на молекулярном уровне.

Настоящая работа выполнена при поддержке федеральной целевой программы «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009 – 2013 годы, проект 2012-1.5-12-000-2008-002 (номер соглашения 14.U02.21.1235), ФЦП «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2007-2013 годы» (государственные контракты 14.512.11.0026 и 16.512.11.2265).

Список литературы:

1. Сканирующая зондовая микроскопия биополимеров / Под ред. **И.В. Яминского**, Москва, Изд. «Научный мир», 1997. - 88 с.
2. **Яминский И.В.** Современные достижения бионаноскопии // Мир физики и техники. Успехи наноинженерии: электроника, материалы, структуры. Под редакцией Дж. Дэвиса М. Томпсона. Техносфера, 2011, с. 355-372.
3. **Dunlap D.D., Bustamante C.** // Images of single-stranded nucleic acids by scanning tunneling microscopy, Nature. 342 204–206 (1989).
4. **Clemmer C.R., Beebe T.P.** Graphite: A mimic for DNA and other biomolecules in scanning tunneling microscopes studies // Science. 251 640–642 (1991).
5. **Klinov D.V., Dubrovin E.V., Yaminsky I.V.** Scanning Probe Microscopy of DNA on Mica and Graphite // AIP Conference Proceedings Volume No. 696 (STM'03, Eindhoven University of Technology, July 21-25, 2003 Eindhoven, the Netherlands), pp. 452-456 (2003).
6. **Галлямов М.О., Пышкина О.А., Сергеев В.Г., Яминский И.В.** Конденсация ДНК Т4 в водно-спиртовых средах // ПОВЕРХНОСТЬ. Рентгеновские, синхротронные и нейтронные исследования. 2000. №7. С. 88-91.
7. **Drygin Yu.F., Bordunova O.A., Gallyamov M.O., I. Yaminsky V.** Atomic Force Microscopy Examination of TMV and Virion RNA // FEBS letters, 425, 217-221 (1998).
8. **Kiselyova O.I., Yaminsky I.V.** Atomic force microscopy of protein complexes. In "Atomic Force Microscopy: Biomedical Methods and Applications" (Methods in Molecular Biology, vol. 242), Ed. by P.C. Braga, D. Ricci. Humana Press, 2003, pp. 217-230.
9. **Kiselyova O.I., Yaminsky I.V., Karger E.M., Frolova O.Yu., Dorokhov Y.L., Atabekov J.G.** Visualization by atomic force microscopy of tobacco mosaic virus movement protein-RNA complexes formed in vitro // Journal of General Virology, 82, 1503-1508 (2001).
10. **Malkin A.J., Kuznetsov Yu.G., McPherson A.** In situ atomic force microscopy studies of surface morphology, growth kinetics, defect structure and dissolution in macromolecular crystallization - Journal of Crystal Growth, 196, 471-488, (1999).
11. **Malkin A.J., Kuznetsov Yu.G., Glantz W., McPherson A.** Atomic force microscopy studies of surface morphology and growth kinetics in thaumatin crystallization - J. Phys. Chem., 100 (28), 11736-11743, (1996).
12. **Yaminsky V., Gvozdev N.V., Sil'nikova M.I., Rashkovich L.N.** Atomic Force Microscopy Study of Lysozyme Crystallization // Crystallography Reports, Vol. 47, Suppl. 1, pp. S149–S158 (2002).
13. **Гвоздев Н.В., Рашкович Л.Н., Яминский И.В.** Атомно-силовая микроскопия грани (010) кристаллов ромбического лизоцима // Поверхность. Рентгеновские, син-

- хротронные и нейтронные исследования. – 2000. – № 8. – С. 73-77.
14. **Malkin A.J., Land T.A., Kuznetsov Yu.G., McPherson A., DeYoreo J.J.** Investigation of virus crystal growth mechanisms by in situ atomic force microscopy - *Phys. Rev. Lett.*, 75 (14), 2778-2781, (1995).
15. **Kuznetsov Yu.G., Malkin A.J., Greenwood A., McPherson A.** Interferometric studies of growth kinetics and surface morphology in macromolecular crystal growth: canavalin, thaumatin, and turnip yellow mosaic virus - *Journal of Structural Biology*, 114, 184-196, (1995).
16. Дубровин Е.В., Кирикова М., Новиков В.К., Дрыгин Ю.Ф., Яминский И.В. Изучение особенностей адсорбции вируса табачной мозаики методом атомно-силовой микроскопии. // Коллоидный журнал. – 2004.
17. Горелкин П., Калинина Н., Лав А., Макаров В., Тальянский М., Яминский И. Синтез наночастиц с использованием растений // Наноиндустрия. – 2012. – №7.
18. **Bolshakova A.V., Kiselyova O.I., Filonov A.S., Frolova O.Yu., Lyubchenko Yu.L., Yaminsky I.V.** Comparative studies of bacteria with atomic force microscopy operating in different modes // *Ultramicroscopy*, 68 (1-2), 121-128 (2001).
19. **Yaminsky I.V., Demin V.V., Bondarenko V.V.** The differences in cellular surface of hybrid bacteria *Escherichia coli* K₁₂, inheriting *rfb-a3,4* gene of *Shigella flexneri* as revealed by atomic force microscopy. *J. microbiology, epidemiology, and immunology*, N 6, 15-18 (1997).
20. **Боровик А.С., Тарасова О.С., Большакова А.В., Яминский И.В.** Использование атомно-силовой микроскопии для изучения живых клеток // *Успехи современной биологии*. – 2000. – 120(2). – С. 217-224.
21. **Kuznetsov Y.G., Malkin A.J., McPherson A.** // *J. Struct. Biol.* 1997. V.120, P.180.
22. **Kiselev G.A., Yaminsky I.V.** Scanning Probe Microscopy of Biomacromolecules: Instrumentation and Experiments. In "Frontiers of Multifunctional Integrated Nanosystems", Ed. by E. Buzaneva, P. Schraff. Kluwer Academic Publishers, 2003, pp. 221-228.
23. **Burg T.P., Godin M., Knudsen S.M., Shen W., Carlson G., Foster J.S., Babcock K., Manalis S.R.** Weighing of biomolecules, single cells and single nanoparticles in fluid. *Nature* 446, 1066-1069 (26 April 2007).
24. **Naik K., Hanay M.S., Hiebert W.K., Feng X.L., Roukes M.L.** Towards single-molecule nanomechanical mass spectrometry *Nature Nanotechnology* 4, 445 - 450 (2009)
25. **Jensen K., Kim Kwanpyo, Zettl A.** An atomic-resolution nanomechanical mass sensor. *Nature Nanotechnology* 3, 533 - 537 (2008).
26. **Giessibl F.J.** Principle of NC-AFM. Noncontact Atomic Force Microscopy, eds. Seizo Morita and Roland Wiesendanger, Ernst Meyer, Springer, Chap. 211-46, (202).
27. **Hegner M., Arntz Y.** Advanced Biosensing Using Micromechanical Cantilever Arrays. *Methods in Molecular Biology*, vol.242: Atomic Force Microscopy: Biomedical Methods and Applications. Ed. by P.C. Braga and D. Richi. Humana Press Inc. Totowa, NJ – pp. 39-49.
28. **F. M. Battiston, J. – P. Ramsteyer, H.P. Lang, M.K. Baller, Ch. Gerber, G.K. Gimzewski, E. Meyer, H. – J. Guntherodt.** A chemical sensor based on a microfabricated cantilever array with simultaneous resonance – frequency and bending readout. // *Sensors and Actuators B* 77 (2001) 122 – 131
29. **Мороз В.В., Черныш А.М., Яминский И.В., Козлова Е.К., Киселёв Г.А., Филонов А.С., Богушевич М.С., Гудкова О.Е.** Перспективы применения методов атомно-силовой микроскопии в реаниматологии // *Общая реаниматология*. – 2008. – IV. – С.51-54.