

БИОМЕДИЦИНСКИЕ И БИОСЕНСОРНЫЕ ПРИЛОЖЕНИЯ СКАНИРУЮЩЕЙ ЗОНДОВОЙ МИКРОСКОПИИ

И.В. Яминский, проф. каф. физич. фак. МГУ им. М.В. Ломоносова, д-р физ.-мат. наук,
yaminsky@nanoscopy.net

О.В. Синицына, науч. сотр. Института элементоорганических соединений РАН,
канд. хим. наук, sinitsyna@gmail.com

Г.Б. Мешков, науч. сотр. физич. фак. МГУ им. М.В. Ломоносова, канд. физ.-мат. наук,
meshkov@polly.phys.msu.ru

А.С. Ерофеев, науч. сотр. физич. фак. МГУ им. М.В. Ломоносова, канд. физ.-мат. наук,
erofeev@polly.phys.msu.ru

П.В. Горелкин, науч. сотр. хим. фак. МГУ им. М.В. Ломоносова, канд. физ.-мат. наук,
peter.gorelkin@gmail.com

В настоящей работе представлены данные по изучению нуклеиновых кислот, белков, бактерий, клеток и тканей животных с помощью сканирующей зондовой микроскопии. Продемонстрированы возможности сканирующих зондовых микроскопов и атомных весов по регистрации сверхмалых количеств химических и биологических веществ (на уровне отдельных молекул) в газовых и жидких средах.

Ключевые слова: сканирующая зондовая микроскопия, атомно-силовая микроскопия, сканирующая туннельная микроскопия, биомакромолекулы, ДНК, РНК, белки, бактериальные клетки, атомные весы, клетки животных, наносенсоры.

BIOMEDICAL APPLICATIONS AND BIOSENSOR SCANNING PROBE MICROSCOPY

I.V. Yaminsky, Professor Department, Physics Faculty of Lomonosov Moscow State University, Ph.D. of Physics and Mathematics, yaminsky@nanoscopy.net

O.V. Sinitsina, Scientific Researcher, RAS Institute of Elementary Organic Compounds, Doctor of Chemistry, sinitsyna@gmail.com

G.B. Meshkov, Scientific Researcher, Physics Faculty of Lomonosov Moscow State University, Doctor of Physics and Mathematics, meshkov@polly.phys.msu.ru

A.C. Yerofeyev, Scientific Researcher, Physics Faculty of Lomonosov Moscow State University, Doctor of Physics and Mathematics, erofeev@polly.phys.msu.ru

P.V. Gorelkin, Scientific Researcher, Chemical Faculty of Lomonosov Moscow State University, Doctor of Physics and Mathematics, peter.gorelkin@gmail.com

This article presents results of analysis of nucleic acids, proteins, bacteria, cells and tissues of animals using a scanning probe microscopy. Capabilities of scanning probe microscopes and atomic weights registration ultrasmall amounts of chemical and biological substances (at the level of individual molecules) in gaseous and liquid media.

Key words: scanning probe microscopy, atomic force microscopy, scanning tunneling microscopy, biomacromolecules, DNA, RNA, proteins, bacterial cells, atomic scales, animal cells, nanosensors.

Наблюдение биологических объектов — наиболее увлекательное направление сканирующей зондовой микроскопии [1]. Природа создает основные строительные единицы — нук-

леиновые кислоты, белки, полисахариды и другие наноструктуры — с точностью, недостижимой в настоящее время человеком в его производственной деятельности. Не только химический состав этих биомакромолекул, 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 «биомашин» — белки АТФ-синтазы, имеющие неподвижный статор и подвижный ротор. 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, выработать практические рекомендации для молекулярной медицины. Биологические наблюдения в зондовой микроскопии имеют по сравнению с другими приложениями определенные и существенные особенности. Биологические объекты, как правило, имеют пониженную механическую жесткость. Соответственно, это требует применения деликатных способов сканирования их поверхности. Зондовая микроскопия не может наблюдать изолированные биомакромолекулы, 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 наблюдаемый пространственный период ошибочно сопоставлялся с чередованием отдельных пар оснований [2]. Впоследствии аккуратно выполненные работы показали, что ДНК-подобные структуры наблюдаются на чистом графите [3]. Выбор подложки играет ключевую роль по ряду причин. Подложка должна оказывать минимальное влияние на конформационное состояние биомакромолекул и биообъектов. С другой стороны, сцепление с подложкой должно быть достаточного уровня, 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 биомакромолекул или адгезии больших объектов, например, бактерий.

В настоящей статье мы рассмотрим вначале методы и результаты наблюдения конкретных объектов, затем остановимся на рассмотрении уникальных возможностей зондовой микроскопии, недостижимых в других методах, — измерениях механических свойств нуклеиновых кислот, белков, вирусных частиц, бактериальных клеток. Посмотрим также достигнутые успехи в наблюдении более 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 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 дают 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 сигналы поступающие от многих миллионов одинаковых молекул, что позволяет 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 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. Для этих целей как нельзя кстати подходит сканирующая зондовая микроскопия. Эффективная интеграция большого количества методов анализа и предельно высокая чувствительность этих методов делает платформу уникальной и необходимой во многих отраслях современной диагностической медицины.

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.

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.

На рис. 1. приведено изображение механической системы сканирующего зондового микроскопа «ФемтоСкан» производства ЗАО «Центр перспективных технологий» и ООО НПП «Центр перспективных технологий» (www.nanoscopy.ru).

В простом контактном режиме зондовый микроскоп можно рассматривать как профилометр с субнанометровым пространственным разрешением (рис. 2).



Рис. 1. Мультифункциональный сканирующий зондовый микроскоп «ФемтоСкан»

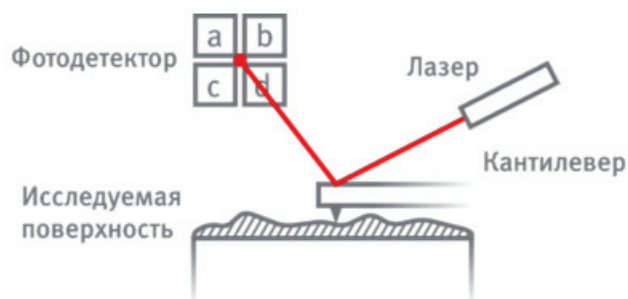


Рис. 2. Принципиальная схема работы атомно-силового микроскопа

Дезоксирибонуклеиновая кислота (ДНК). Повествование о конкретных объектах начнем с рассказа о главной биологической молекуле — ДНК.

С момента создания туннельного и атомно-силового микроскопа взгляды ученых 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 [4].

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. 3 и 4). 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 модифицируют небольшими концентрациями органических веществ: аминопропилтриэтоксисиланом или силатраном. Такая модифицированная поверхность слюды на изображениях дает незначительный фон, не препятствуя получению качественных изображений ДНК.

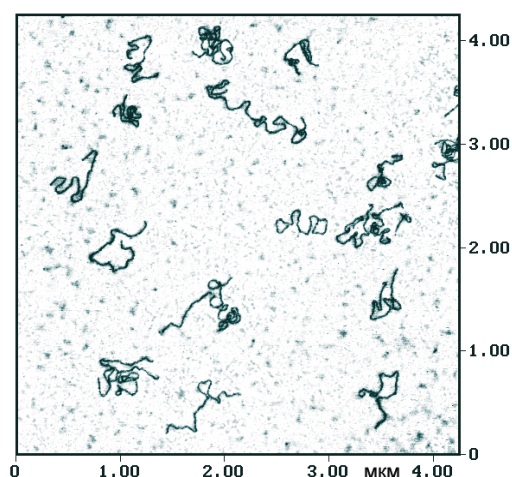


Рис. 3. Молекулы ДНК, осажденные на поверхности слюды в присутствии 1М NiCl_2 . Наблюдения М.О. Галлямова и др.

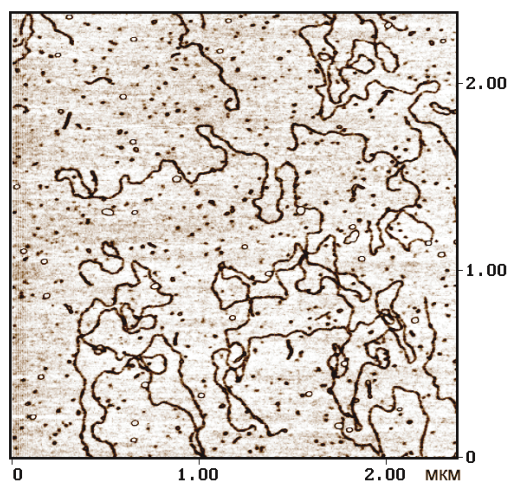


Рис. 4. Молекулы ДНК, осажденные на поверхности слюды в присутствии уранилацетата. Наблюдения М.О. Галлямова

Атомно-силовая микроскопия позволяет наблюдать конформационные состояния биомакромолекул в растворах, в частности, ДНК [5]. При этом надо помнить, что для наблюдения геометрии биомакромолекулы ее необходимо закрепить на подложке. Другими словами, мы наблюдаем конформацию не свободно плавающей в растворе молекулы, а закрепленной на межфазной границе жидкость – твердое тело (рис. 5). Поэтому при интерпретации результатов надо быть уверенным, что подложка оказывает минимальное воздействие.

Рибонуклеиновая кислота (РНК). РНК является более сложным объектом для наблюдения, в связи с тем, что менее жесткая молекула требует более деликатного выделения и нанесения на подложку. В одном из первых наблюдений вирусной РНК [6] для устранения возможных артефактов была использована схема рассмотрения сначала РНК-содержащих вирусных частиц (вирус табачной мозаики), промежуточных стадий частичного разрушения белковой оболочки (рис. 6) и наблюдения свободных концов молекул РНК и момен-

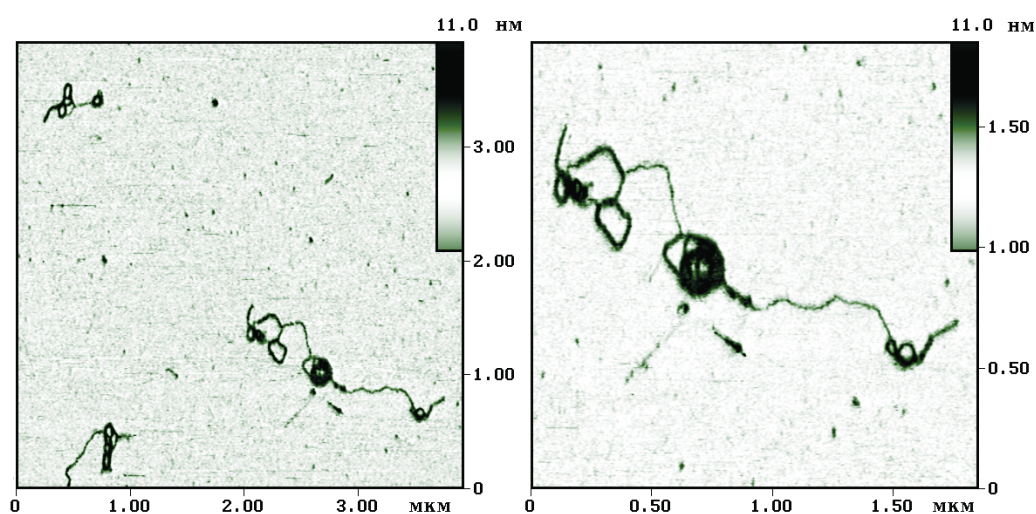


Рис. 5. Наблюдение ДНК в водном растворе изопропанола (50 %). Левый и правый кадр получены с интервалом в несколько минут

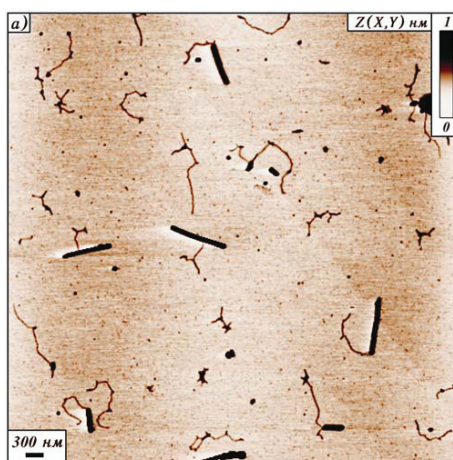


Рис. 6. Частично разрушенные частицы вируса табачной мозаики с выступающими свободными концами РНК. Наблюдения М.О. Галлямова и др.

тов окончательного освобождения РНК от белковой оболочки под действием мочевины (рис. 7). Весьма полезную информацию для молекулярной биологии дали исследования комплексообразования РНК с различными белками, в частности, транспортными.

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. Различить упаковку цепей в небольших белках, например, лизоциме (молекулярная масса 14 кД) до сих пор не удавалось. Известен ряд работ, где надежно выявлялись отличия белковых мономеров от димеров и мультимеров (рис. 8) [7].

Зондовую микроскопию можно использовать для регистрации биоспецифического связывания антиген – антитело. Измерения размеров отдельных частиц и достигаемая точность

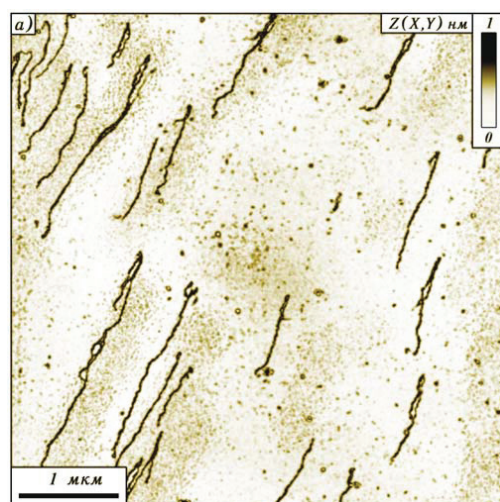


Рис. 7. Полностью освобожденные молекулы РНК. Удаление белковой оболочки частиц вируса табачной мозаики выполнено с помощью диметилсульфоксида.

Наблюдения М.О. Галлямова и др.

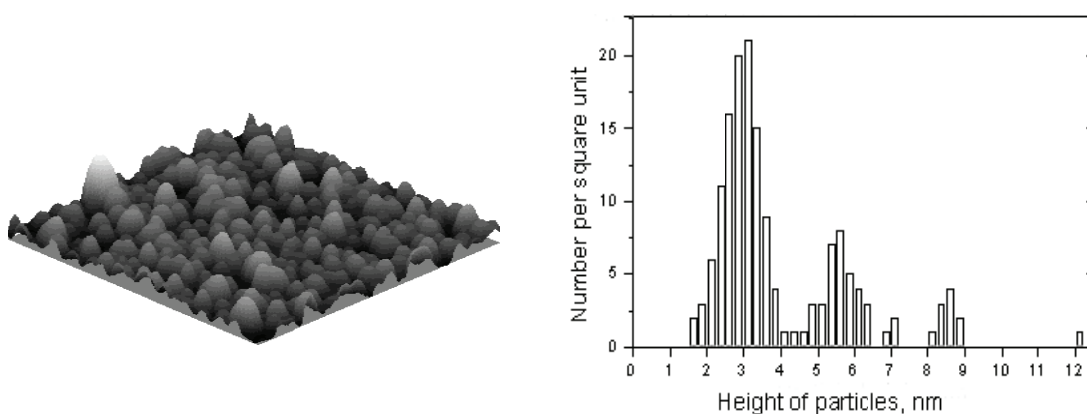


Рис. 8. Трехмерное изображение молекул цитохрома Р450 в олигомерной форме, адсорбированных на поверхности слюды. В распределении частиц по высоте присутствует три максимума, соответствующих: 1) мономерным частицам (высота 3 нм), октамерам (высота 5,5 нм) и комплексам из 12–30 белковых молекул (высота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

позволяют отделить одиночные антитела и антигены от их комплексов. Зондовая микроскопия позволяет получить информацию о характере агрегирования белков и связывания с нуклеиновыми кислотами. В работе [8], например, по полученным изображениям определен характер связывания транспортного белка с вирусной РНК (рис. 9).

Кристаллы. При наблюдении белковых кристаллов в насыщенных растворах проявляется существенное достоинство зондовой микроскопии в биологии: возможность наблюдения динамики процессов в жидких средах, естественной среде для многих биологических объектов (рис. 10). Проведенные измерения позволили зарегистрировать кинетику роста дислокационных холмов и двумерных зародышей для многих белковых кристаллов на уровне отдельных молекул или строительных единиц [9, 10].

Например, для кристалла лизоцима (рис. 11) были измерены скорости движения ступеней и изломов, вероятности присоединения и отсоединения строительных единиц, зависимости кинетических параметров от различных факторов (температуры, пересыщения и др.) [11].

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 [12] было обнаружено явление реконструкции поверхности, когда упаковка белковых молекул на поверхности кристалла отличается от объемной структуры (рис. 12).

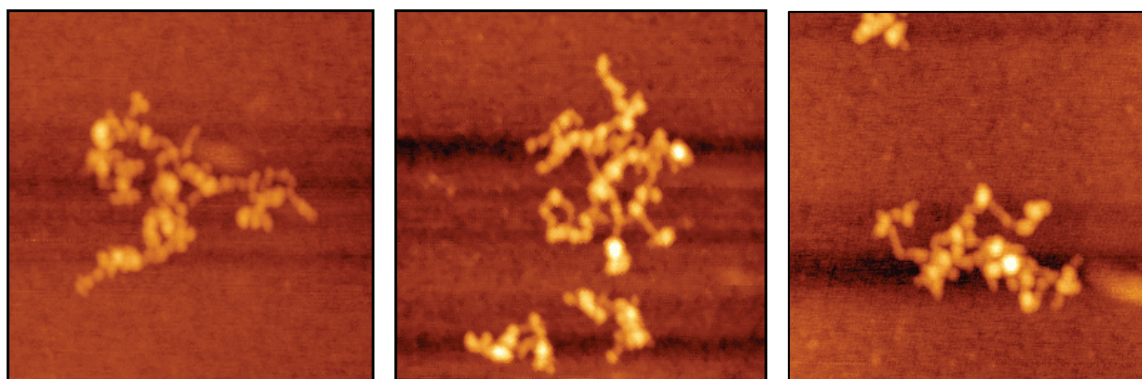


Рис. 9. Кооперативное неспецифическое связывание транспортного белка с вирусной РНК

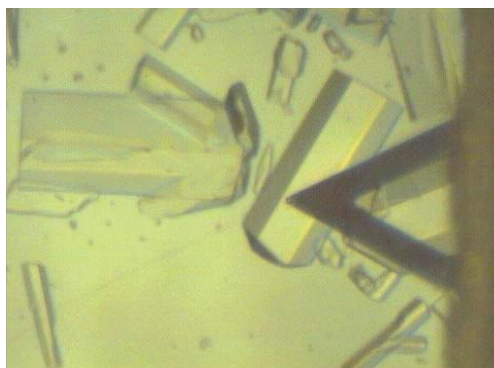


Рис. 10. Оптическое изображение растущего кристалла лизоцима и кантилевера (темный треугольник в правой части фотографии) в процессе сканирования поверхности кристалла

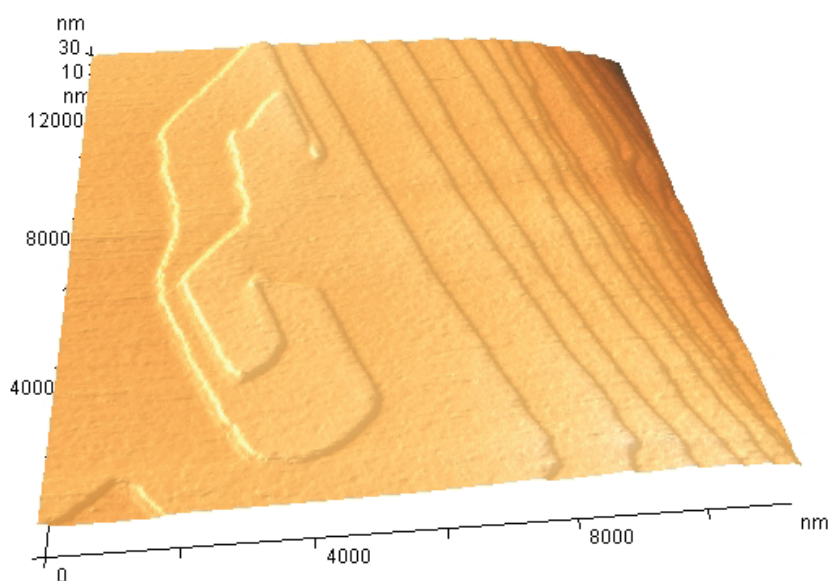


Рис. 11. Изображение двухзаходовой винтовой спирали растущего кристалла лизоцима. Наблюдение в насыщенном растворе

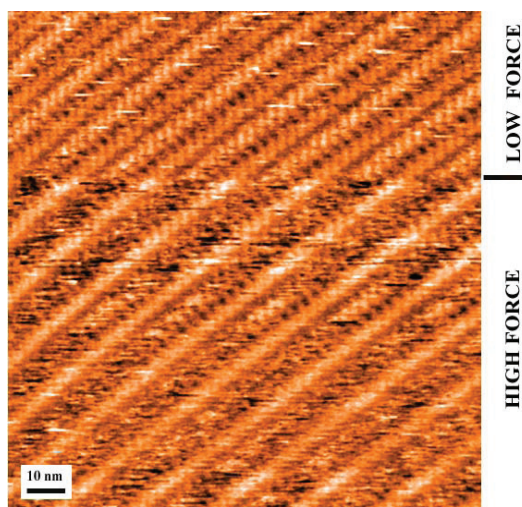


Рис. 12. Соседние ряды белковых молекул видны в различном контрасте, который зависит от величины приложенной силы. В объеме эти ряды считаются эквивалентными. Размер кадра $130 \times 130 \text{ нм}^2$. Наблюдения в жидкости

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.

Процессы кристаллизации наблюдали для различных вирусов (рис. 13) [13, 14]. 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 экспериментов, как это продемонстрировано на рис. 14.

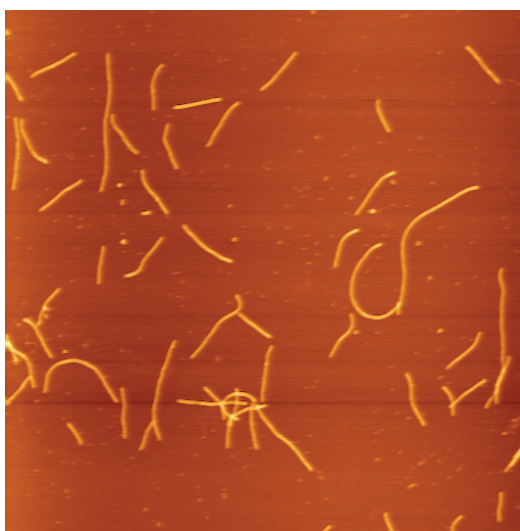


Рис. 13. Изображения X вируса картофеля.
Частицы расположены на слюде. Размер кадра $3 \times 3 \text{ мкм}^2$

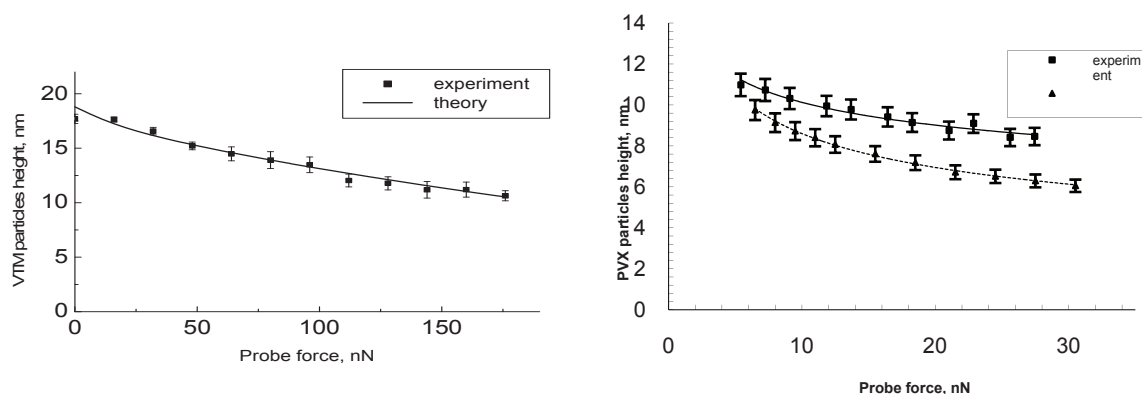
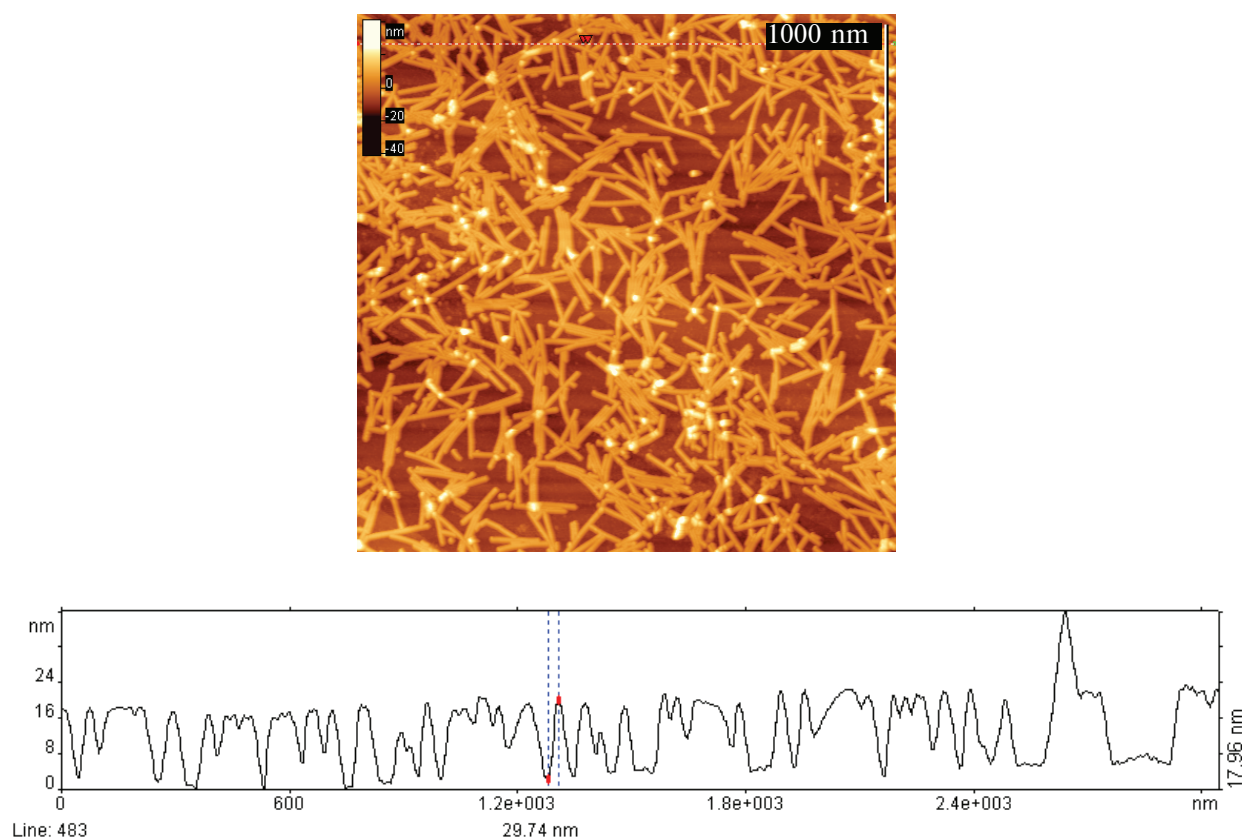


Рис. 14. Зависимость наблюдаемой высоты вирусных частиц от приложенной силы: данные для вируса табачной мозаики — слева, для X вируса картофеля — справа. Теоретические кривые получены в приближении модели Герца. На правом рисунке — верхняя кривая соответствует intactной (неповрежденной) частице, нижняя кривая — вирус с разрушенной РНК с помощью белка РНК-азы

Полезно заметить, что вирус табачной мозаики можно использовать в качестве тестовой структуры [15], как для калибровки атомно-силового микроскопа по Z-перемещению, так и в качестве эталона жесткости (рис. 15).



**Рис. 15. Изображение частиц вируса табачной мозаики на поверхности графита.
Внизу — поперечное сечение, указывающее на высокую однородность частиц по высоте**

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 [16].

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 ее удаления с помощью промокательной 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).

Атомно-силовая микроскопия дает трехмерные изображения бактериальных клеток (рис. 16, 17). Данные атомно-силовой микроскопии могут служить дополнительным информативным критерием при составлении определителей бактерий.

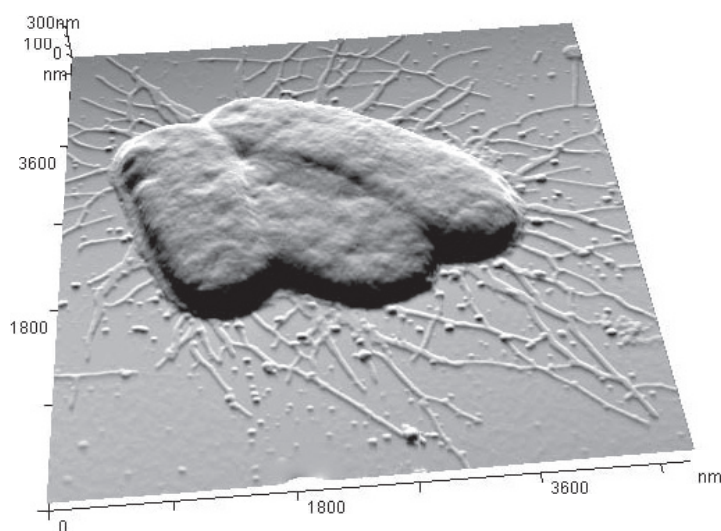


Рис. 16. Трехмерное изображение бактерий *Escherichia coli* на поверхности слюды. Наблюдения на воздухе

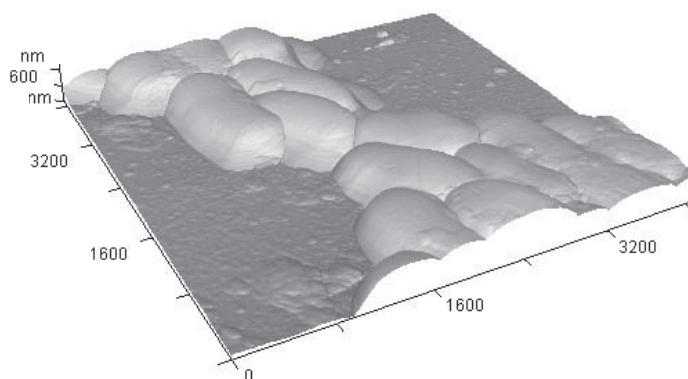


Рис. 17. Изображение бактерий *Helicobacter pilory*

При наблюдении в жидкости контраст получаемых изображений падает, что естественно и объясняется наличием подвижных полимерных цепей наружной мембраны. На рис. 18 приведено изображение бактериальных клеток *E.coli* в буферном растворе [17].

Атомно-силовая микроскопия позволяет надежно зарегистрировать структурные изменения, происходящие на поверхности наружной мембраны клеточной стенки. На рис. 19 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 О-специфических боковых цепей липополисахаридов.

Эти цепи на поверхности клетки дают ламелярную структуру, по общей морфологии существенно отличной от структуры поверхности исходной родительской клетки [18].

Клетки высших организмов. Имеются определенные трудности в наблюдении клеток высших организмов [19]. Клетки животных и растений не обладают высокой механической жесткостью. Взаимодействие с зондом во время сканирования приводит к их деформации и увеличению области контакта зонд – поверхность клетки, что соответственно снижает дос-

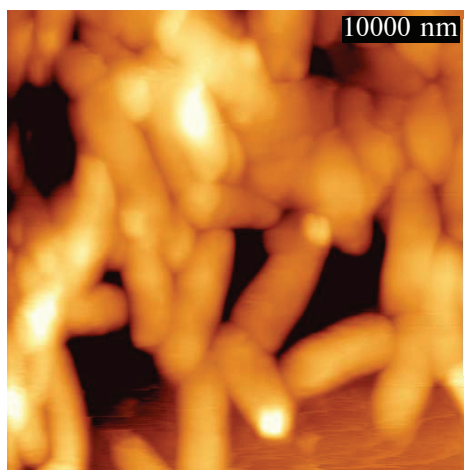


Рис. 18. Изображения бактериальных клеток *Escherichia coli* JM109 получено в буферном растворе. Клетки иммобилизованы на поверхности слюды с помощью полилизина

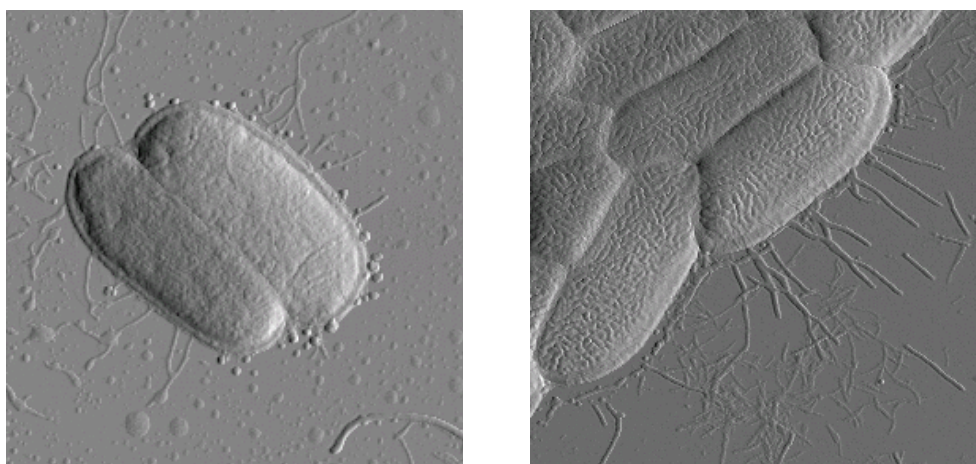


Рис. 19. Наблюдение структурных различий морфологии поверхности родительской и трансдуктантной бактерии, наследующей ген возбудителя дизентерии — бактерии *Shigella flexneri*, отвечающий за синтез боковых цепей липополисахаридов

тигаемое 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.

Зондовая микроскопия позволяет наблюдать динамические процессы, происходящие с клетками. Например, удалось визуализировать движение остеобластов мышей по поверхности стеклянной подложки [20]; 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

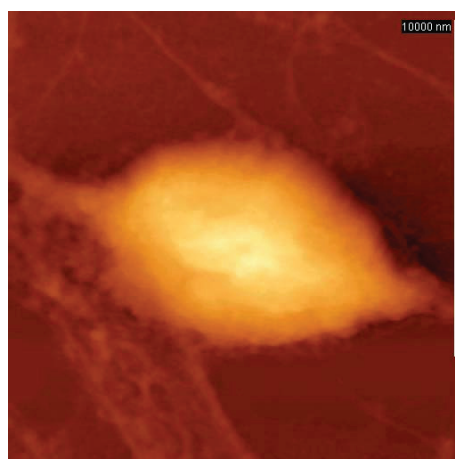


Рис. 20. Изображение нейрона. Размер кадра 13,6 x 13,6 мкм²

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.

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. 21 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 трех-

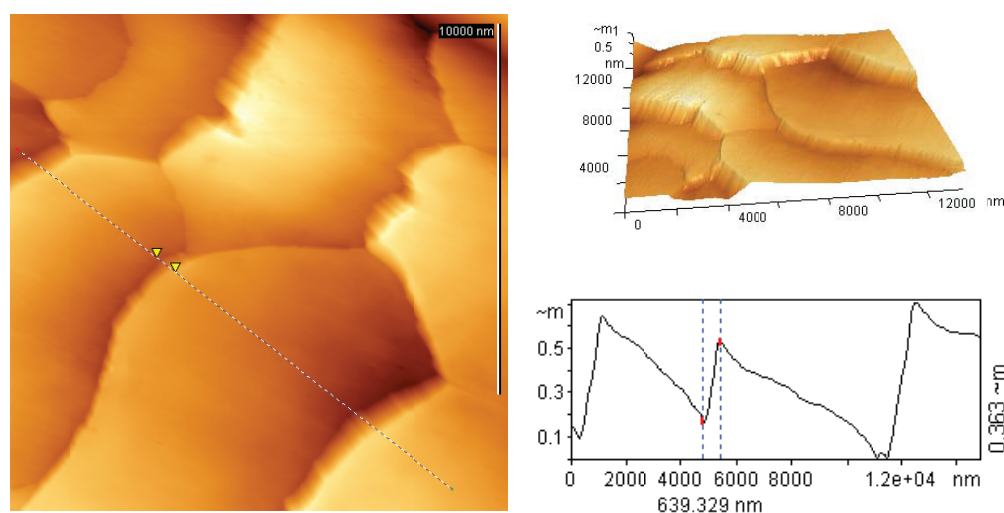


Рис. 21. Структура поверхности человеческого волоса: топография, трехмерное изображение, и профиль сечения

мерных 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 времени. Зондовая микроскопия позволяет прямым образом измерить величину механической жесткости объекта, определить силу адгезии, зарегистрировать вариации коэффициента трения — получить трехмерную карту фрикционных свойств поверхности.

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 биомакромолекулы. 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 [21].

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 [22], белка [23] и даже отдельного атома [24].

Высокой чувствительностью обладают кантилеверы камертонного типа [25] и специально изготовленные кантилеверы из пьезоматериалов. Резонансные методы измерения, как правило, обладают более высокой чувствительностью по сравнению со статическими методами. Поэтому любопытен тот факт, что именно конструкции статических биосенсоров оказываются весьма привлекательными для медицинских приложений [26]. 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. 22) [27], если физический принцип построения такого кантилевера прозрачен, то биоло-

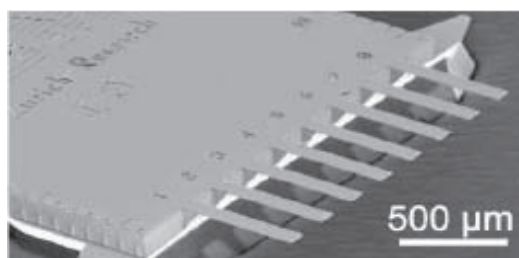


Рис. 22. Система из 8 кантилеверов с различными покрытиями может быть использована в качестве ключевого элемента химического или биологического сенсора

гические 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 персонифицированной 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 гг., проект 2012-1.5-12-000-2008-002 (и номер соглашения 14.U02.21.1235).

Список литературы

1. Сканирующая зондовая микроскопия биополимеров / Под ред. И.В. Яминского, Москва, Изд. «Научный мир», 1997. 88 с.
2. Dunlap D.D., Bustamante C. // Images of single-stranded nucleic acids by scanning tunneling microscopy, Nature. 342 204–206 (1989).
3. Clemmer C.R., Beebe T.P. Graphite: A mimic for DNA and other biomolecules in scanning tunneling microscopes studies // Science. 251, pp. 640–642 (1991).
4. 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).
5. 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, № 7, с. 88–91 (2000).
6. Drygin Yu.F., Bordunova O.A., Gallyamov M.O., Yaminsky I.V. Atomic Force Microscopy Examination of TMV and Virion RNA // FEBS letters, 425, pp. 217–221 (1998).
7. 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.

8. Kiselyova O.I., Yaminsky I.V., Karger E.M., Frolova O.Yu., Dorokhov Y.L. and Atabekov J.G. Visualization by atomic force microscopy of tobacco mosaic virus movement protein-RNA complexes formed in vitro // *Journal of General Virology*, 82, pp. 1503–1508 (2001).
9. 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, pp. 471–488, (1999).
10. 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), pp. 11736–11743, (1996).
11. Yaminsky I.V., Gvozdev N.V., Sil'nikova M.I. and Rashkovich L.N. Atomic Force Microscopy Study of Lysozyme Crystallization // *Crystallography Reports*, vol. 47, Suppl. 1, pp. S149–S158 (2002).
12. Гвоздев Н.В., Рашкович Л.Н., Яминский И.В. Атомно-силовая микроскопия грани (010) кристаллов ромбического лизоцима // *Поверхность. Рентгеновские, синхротронные и нейтронные исследования*, 2000, № 8, с. 73–77.
13. 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), pp. 2778–2781 (1995).
14. 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, pp. 184–196 (1995).
15. 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, в печати.
16. Горелкин П., Калинина Н., Лав А., Макаров В., Тальянский М., Яминский И. Синтез наночастиц с использованием растений. *Наноиндустрия*, № 7, 2012.
17. Bolshakova A.V., Kiselyova O.I., Filonov A.S., Frolova O.Yu., Lyubchenko Yu.L. and Yaminsky I.V. Comparative studies of bacteria with atomic force microscopy operating in different modes // *Ultramicroscopy*, 68 (1–2), pp. 121–128 (2001).
18. 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*, no. 6, pp. 15–18 (1997).
19. Боровик А.С., Тарасова О.С., Большакова А.В., Яминский И.В. Использование атомно-силовой микроскопии для изучения живых клеток // *Успехи современной биологии*, 120(2), pp. 217–224 (2000).
20. Kuznetsov Y.G., Malkin A.J., McPherson A. // *J. Struct. Biol.* 1997, vol. 120, p. 180
21. 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.
22. 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).
23. Naik A.K., Hanay M.S., Hiebert W.K., Feng X.L., Roukes M.L. Towards single-molecule nanomechanical mass spectrometry. *Nature Nanotechnology* 4, pp. 445–450 (2009)
24. Jensen K., Kim Kwanpyo, Zettl A. An atomic-resolution nanomechanical mass sensor. *Nature Nanotechnology* 3, pp. 533–537 (2008).
25. Giessibl F.J., Principle of NC-AFM. Noncontact Atomic Force Microscopy, eds. Seizo Morita and Roland Wiesendanger, Ernst Meyer, Springer, Chap. 211–46 (2002).
26. 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.
27. Battiston F.M., Ramsteyer J.–P., Lang H.P., Baller M.K., Gerber Ch., Gimzewski G.K., Meyer E., Guntherodt H.–J. A chemical sensor based on a microfabricated cantilever array with simultaneous resonance – frequency and bending readout // *Sensors and Actuators B* 77 (2001) pp. 122–131.

References

1. *Skanirovushchaya zondovaya mikroskopiya biopolimerov. Pod red. I.V. Yaminskogo* (1997) [Scanning probe microscopy of biopolymers. Ed. I.V. Yaminsky]. *Izd. «Nauchnyy mir»* [«Scientific World» Publishers]. Moscow, p. 88.
2. Dunlap D.D., Bustamante C. (1989) Images of single-stranded nucleic acids by scanning tunneling microscopy. *Nature*. 342, pp. 204–206.
3. Clemmer C.R., Beebe T.P. (1991) Graphite: A mimic for DNA and other biomolecules in scanning tunneling microscopes studies. *Science*. 251, pp. 640–642.
4. Klinov D.V., Dubrovin E.V., Yaminsky I.V. (2003) 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.
5. Gallyamov M., Pyshkina O., Sergeev V., Yaminsky I. (2000) *Kondensatsiya DNK T4 v vodno-spirovnykh sredakh* [T4 DNA condensation in aqueous-alcoholic media]. *POVERKhNOST'. Rentgenovskie, sinkhrotronnye i neytronnye issledovaniya* [Surface. X-ray, synchrotron and neutron studies], no. 7, pp. 88–91.
6. Drygin Yu. F., Bordunova O.A., Gallyamov M.O., Yaminsky I.V. (1998) Atomic Force Microscopy Examination of TMV and Virion RNA. *FEBS letters*, 425, pp. 217–221.
7. Kiselyova O.I., Yaminsky I.V. (2003) 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, pp. 217–230.
8. Kiselyova O.I., Yaminsky I.V., Karger E.M., Frolova O.Yu., Dorokhov Y.L. and Atabekov J.G. (2001) Visualization by atomic force microscopy of tobacco mosaic virus movement protein-RNA complexes formed in vitro. *Journal of General Virology*, 82, pp. 1503–1508.
9. Malkin A.J., Kuznetsov Yu.G., McPherson A. (1999) In situ atomic force microscopy studies of surface morphology, growth kinetics, defect structure and dissolution in macromolecular crystallization - *Journal of Crystal Growth*, 196, pp. 471–488.
10. Malkin A.J., Kuznetsov Yu.G., Glantz W., McPherson A. (1996) Atomic force microscopy studies of surface morphology and growth kinetics in thaumatin crystallization. *J. Phys. Chem.*, 100 (28), pp. 11736–11743.
11. Yaminsky I.V., Gvozdev N.V., Sil'nikova M.I. and Rashkovich L.N. (2002) Atomic Force Microscopy Study of Lysozyme Crystallization. *Crystallography Reports*, vol. 47, Suppl. 1, pp. S149–S158.
12. Gvozdeff N., Rashkovich L., Yaminsky I. (2000) *Atomno-silovaya mikroskopiya grani (010) kristallov rombicheskogo lizotsima* [Atomic force microscopy (010) face of orthorhombic lysozyme crystals]. *POVERKhNOST'. Rentgenovskie, sinkhrotronnye i neytronnye issledovaniya* [Surface. X-ray, synchrotron and neutron studies], no. 8, pp. 73–77.
13. Malkin A.J., Land T.A., Kuznetsov Yu.G., McPherson A., DeYoreo J.J. (1995) Investigation of virus crystal growth mechanisms by in situ atomic force microscopy. *Phys. Rev. Lett.*, 75 (14), pp. 2778–2781.
14. Kuznetsov Yu.G., Malkin A.J., Greenwood A., McPherson A. (1995) Interferometric studies of growth kinetics and surface morphology in macromolecular crystal growth: canavalin, thaumatin, and turnip yellow mosaic virus. *Journal of Structural Biology*, 114, pp. 184–196.
15. Dubrovin E., Kirikova M., Novikov V., Drygin Y., Yaminsky I. (2004) *Izuchenie osobennostey adsorbtzii virusa tabachnoy mozaiki metodom atomno-silovoy mikroskopii. Kolloidnyy zhurnal, v pechati* [Study of features of the adsorption of tobacco mosaic virus by atomic force microscopy. *Colloid Journal*, in press]
16. Gorelkin P., Kalina N., Lav A., Makarov V., Tal'yanskiy M., Yaminsky I. (2012) *Sintez nanochastits s ispol'zovaniem rasteniy* [Synthesis of nanoparticles using the plants]. *Nanoindustriya* [Nanotech], no. 7.
17. Bolshakova A.V., Kiselyova O.I., Filonov A.S., Frolova O.Yu., Lyubchenko Yu.L. and Yaminsky I.V. (2001) Comparative studies of bacteria with atomic force microscopy operating in different modes. *Ultramicroscopy*, 68 (1–2), pp. 121–128.
18. Yaminsky I.V., Demin V.V., Bondarenko V.V. (1997) The differences in cellular surface of hybrid bacteria *Escherichia coli* K12, inheriting *rfa-a3,4* gene of *Shigella flexneri* as revealed by atomic force microscopy. *J. microbiology, epidemiology and immunology*, no. 6, pp. 15–18.

19. Borovik A., Tarasova O., Bolshakov A., Yaminsky I. (2000) *Ispol'zovanie atomno-silovoy mikroskopii dlya izucheniya zhivyykh kletok* [Using atomic force microscopy to the study of living cells]. *Uspekhi sovremennoy biologii* [Advances in modern biology], no. 120(2), pp. 217–224.
20. Kuznetsov Y.G., Malkin A.J., McPherson A. (1997) *J. Struct. Biol.*, vol. 120, p. 180
21. Kiselev G.A., Yaminsky I.V. (2003) Scanning Probe Microscopy of Biomacromolecules: Instrumentation and Experiments. In «Frontiers of Multifunctional Integrated Nanosystems», Ed. by E. Buzaneva, P. Schraff. Kluwer Academic Publishers, pp. 221–228.
22. Burg T.P., Godin M., Knudsen S.M., Shen W., Carlson G., Foster J.S., Babcock K., Manalis S.R. (2007) Weighing of biomolecules, single cells and single nanoparticles in fluid. *Nature* 446, 1066–1069.
23. Naik A.K., Hanay M.S., Hiebert W.K., Feng X.L., Roukes M.L. (2009) Towards single-molecule nanomechanical mass spectrometry *Nature Nanotechnology* 4, pp. 445–450.
24. Jensen K., Kim Kwanpyo, Zettl A. (2008) An atomic-resolution nanomechanical mass sensor. *Nature Nano-technology* 3, pp. 533–537.
25. Giessibl F.J. (2002) Principle of NC-AFM. *Noncontact Atomic Force Microscopy*, eds. Seizo Morita and Roland Wiesendanger, Ernst Meyer, Springer, Chap. 211–46.
26. 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.
27. Battiston F.M., Ramsteyer J.–P., Lang H.P., Baller M.K., Gerber Ch., Gimzewski G.K., Meyer E., Guntherodt H.–J. (2001) A chemical sensor based on a microfabricated cantilever array with simultaneous resonance – frequency and bending readout. *Sensors and Actuators*, vol. 77, pp. 122–131.