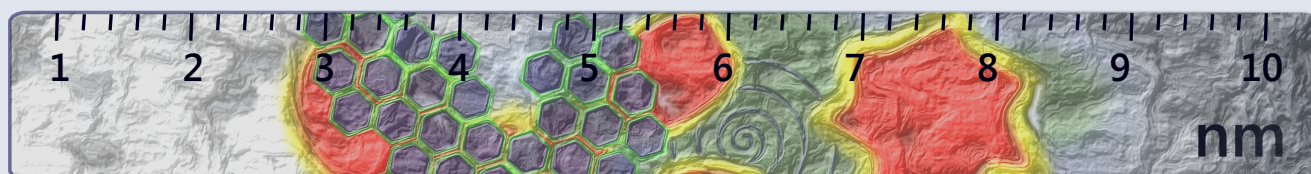


Современные достижения бионаноскопии

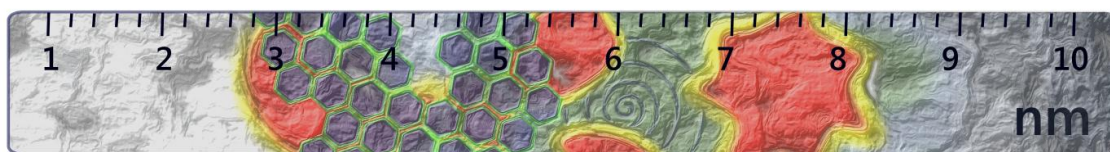


Сборник тезисов

Четвертая международная конференция
15-18 июня 2010 г., Москва
физический факультет МГУ

Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова
Москва-2010

Современные достижения бионаноскопии



Четвертая международная конференция

15 – 18 июня 2010 года

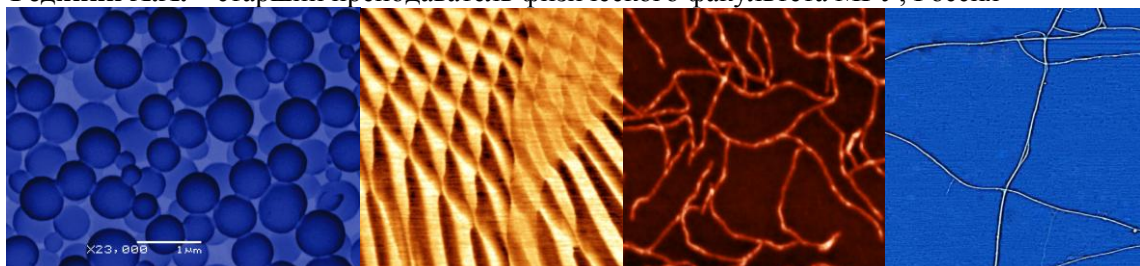
Физический факультет МГУ имени М.В. Ломоносова

Программный комитет:

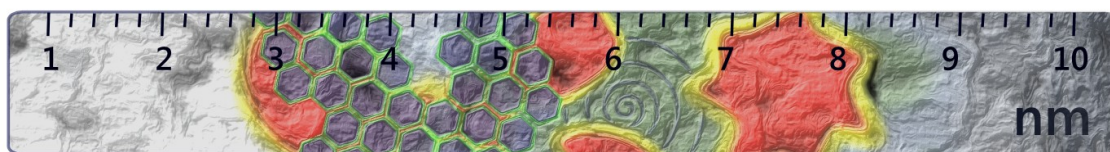
Атабеков И.Г. – академик РАН, Россия
Кирпичников М.П. - академик РАН, Россия
Лунин В.В. – академик РАН, Россия
Скулачев В.П. – академик РАН, Россия
Третьяков Ю.Д. – академик РАН, Россия
Хохлов А.Р. – академик РАН, Россия
Гудилин Е.А. – член-корр. РАН, Россия
Курочкин И.Н. – профессор, Россия
Панов В.И. – профессор, Россия
Шайтан К.В. – профессор, Россия
Яминский И.В. – профессор, Россия
Kim T.S. – Professor, KIST, Korea
Lyubchenko Y.L. – Professor, Nebraska Medical Center, USA
Magonov S.N. – Research Scientist, Agilent, USA
Zinoviev K.E. – Research Scientist, Spain

Организационный комитет:

Яминский И.В. – профессор МГУ, Россия (председатель)
Ахаев Д.Н. – доцент биологического факультета МГУ, Россия
Бонарцев А.П. – научный сотрудник биологического факультета МГУ, Россия
Дубровин Е.В. – научный сотрудник физического факультета МГУ, Россия (ответственный секретарь)
Клячко Н.Л. – профессор химического факультета МГУ, Россия
Кузьмина Н.В. – студент физического факультета МГУ, Россия
Скулачев М.В. – ведущий научный сотрудник НИИФХБ МГУ
Сушко А.Д. – научный сотрудник Центра перспективных технологий, Россия
Тимошенко В.Ю. – профессор физического факультета МГУ, Россия
Федянин А.А. – старший преподаватель физического факультета МГУ, Россия



Современные достижения бионаноскопии



Программа четвертой международной конференции

«Современные достижения бионаноскопии»

1-й день (вторник, 15 июня 2010 года)

9:30 – 10:00	Регистрация участников.
10:00 – 10:05	Яминский И.В. Вступительное слово.
10:05 – 10:45	Lubchenko Y.L. AFM to study of DNA and protein-DNA complexes.
10:45 – 11:05	Zivkovic J. Force spectroscopy on RNA systems.
11:05 – 11:35	Kim S.K. Protein interaction analysis with a PZT thin-film microcantilever and a quartz crystal microbalance.

Кофе-брейк

11:50 – 12:10	Касьяненко Н.А. Изучение комплексов ДНК с биологически активными соединениями методом атомно-силовой микроскопии.
12:10 – 12:30	Карпова О.В. Искусственные вирусоподобные частицы, полученные на основе фитовирусов.
12:30 – 12:50	Касьяненко Н.А. Наноструктуры на основе ДНК. Генные векторы и нанопроволоки.
12:50 – 13:10	Афанасьев А.Е. Оптические антенны и их исследование методами атомно-силовой микроскопии.
14:00 – 15:00	Стендовая сессия.
15:15 – 17:15	Практикум по зондовой микроскопии.

2-й день (среда, 16 июня 2010 года)

10:00 – 10:20	Тихомиров А.А. Новые разработки НТ-МДТ.
10:20 – 11:00	Галлямов М.О. Современные методы микроскопии высокого разрешения в исследованиях полимерных структур.
11:00 – 11:20	Рашкович Л.Н. Атомно-силовая микроскопия и элементарные акты процесса кристаллизации в растворе (на примере кристалла лизоцима).
11:20 – 11:40	Будник О.П. АСМ-исследование ионно-имплантированных каналов в биосенсоре на основе алмаза.

Кофе-брейк

12:10 – 12:30	Крупенин В.А. Зарядовый сенсор на основе кремниевого нанопроволода.
12:30 – 12:50	Яминский И.В. Сенсоры на основе кантилеверов.
12:50 – 13:10	Куручкин И.Н. Наноаналитические и биосенсорные платформы для проведения иммуноанализа и определения активности ферментов.

- 13:10 – 13:30 Юсипович А.И., Максимов Г.В. Использование метода лазерной интерференционной микроскопии для визуализации живых клеток в условиях *in vitro*.
- 14:20 – 15:20 Стендовая сессия.
- 15:35 – 17:35 Практикум по зондовой микроскопии.

3-й день (четверг, 17 июня 2010 года)

- 10:00 – 10:20 Турчанинов М.А. Особенности кристаллизации расплава углерода на различных гранях высокоориентированного графита.
- 10:20 – 10:40 Образцова Е.А. Атомно-силовая микроскопия наноструктур на примере кластеров графена.
- 10:40 – 11:00 Синецына О.В. Зондовая микроскопия и нанолитография углеродных материалов.
- 11:00 – 11:20 Сафенкова И.В. Изучение взаимодействия антител с вирусом шарки сливы методом атомно-силовой микроскопии.

Кофе-брейк

- 11:50 – 12:10 Филонов А.С. Реализация интернет-практикума по зондовой микроскопии.
- 12:10 – 12:30 Лускинович П.Н. Калибровка атомно-силовых и электронных микроскопов во всем нанометровом диапазоне с субнанометровой погрешностью.
- 12:30 – 12:50 Макарова Д.В. Тестирование биоактивности наночастиц методом компьютерной фазово-интерференционной микроскопии в реальном времени.
- 12:50 – 13:10 Красикова А.В. Атомно-силовая микроскопия хромосом типа ламповых щеток: топография поверхности РНП-матрикса транскрипционных единиц.

Кофе-брейк

- 14:00 – 14:20 Дзюбенко Е.В. Исследование клеток нейронов в культуре при патологии и в норме.
- 14:20 – 14:40 Илин Е.А. Высокочастотный кантилеверный резонатор.
- 14:40 – 14:55 Меньшиков Е.А. Высокоскоростная атомно-силовая микроскопия.
- 14:55 – 15:10 Меньшикова И.П. Исследование динамики нуклеосом методом АСМ
- 15:10 – 15:30 Федянин А.А., Применение метода оптического пинцета в бионаноскопии.
- 15:30 – 15:50 Горелкин П.В. Наномеханическая кантилеверная система – новый инструмент для изучения поверхностных явлений.
- 15:50 – 16:10 Подведение итогов конкурса на лучшее изображение.

Кофе-брейк

- 16:30 – 16:50 Проведение круглого стола по бионаноскопии (первый этаж).
- 16:50 – 17:00 Совместное фото участников.

4-й день (пятница, 18 июня 2010 года)

- 10:00 – 14:00 Ознакомительное посещение лабораторий МГУ имени М.В. Ломоносова или экскурсия на Мосфильм.

СОДЕРЖАНИЕ

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЙ ПРАКТИКУМ СКАНИРУЮЩЕЙ ЗОНДОВОЙ МИКРОСКОПИИ И БИОНАНОСКОПИИ	10
С.Д. Алекперов	
ОПТИЧЕСКИЕ АНТЕННЫ И ИХ ИССЛЕДОВАНИЕ МЕТОДАМИ СКАНИРУЮЩЕЙ ЗОНДОВОЙ МИКРОСКОПИИ.....	11
А.Е. Афанасьев, П.Н. Мелентьев, Д.А. Лапшин, В.И. Балыкин, А.А. Кузин, А.В. Заблоцкий, А.С. Батурин	
АСМ-ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ РЕСТРИКТАЗЫ НА ДНК, АДсорбированную на твердую подложку	13
Д.И. Ахмерова, Н.А. Янькова, А.Д. Сушко, Е.В. Дубровин, И.В. Яминский	
АТОМНО-СИЛОВАЯ МИКРОСКОПИЯ ЧЕЛОВЕЧЕСКИХ СПЕРМАТОЗОИДОВ – МЕТОДИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ	14
Д.В. Багров, М.Л. Семенова, Р.А. Шафеи, К.В. Шайтан	
ЛАМЕЛИ ИЗ РЕКОМБИНАНТНЫХ АНАЛОГОВ БЕЛКОВ ПАУТИНЫ	15
Д.В. Багров, В.В. Мусатова, В.В. Прохоров, Д.В. Клинов, И.И. Агапов, В.Г. Богуш, И.В. Яминский	
ИЗУЧЕНИЕ СТРУКТУРНЫХ ИЗМЕНЕНИЙ МОЛЕКУЛЫ ДНК В КОМПЛЕКСАХ С ЦИС- И ТРАНС-ДИХЛОРОДИАМИНПЛАТИНОЙ МЕТОДОМ АТОМНО-СИЛОВОЙ МИКРОСКОПИИ.....	16
А.А. Богданов, Н.А. Касьяненко	
АСМ-ИССЛЕДОВАНИЕ ИОННО-ИМПЛАНТИРОВАННЫХ КАНАЛОВ В БИОСЕНСОРЕ НА ОСНОВЕ АЛМАЗА.....	17
О.П. Будник	
ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ ЕДИНИЧНЫХ МОЛЕКУЛ ФЕРМЕНТА P450 ВМЗ С ПОМОЩЬЮ АТОМНО-СИЛОВОГО МИКРОСКОПА.....	18
Н.С. Бухарина, Ю.Д. Иванов, Т.О. Плешакова, Н.В. Крохин, А.И. Арчаков	
ИССЛЕДОВАНИЕ ЛИПИДНЫХ БИСЛОЕВ ДИПАЛЬМИТОИЛ ФОСФАТИДИЛХОЛИНА МЕТОДАМИ АТОМНО-СИЛОВОЙ МИКРОСКОПИИ	19
О.В. Грищенкова, Д.В. Багров, Д.А. Давыдов, Ю.М. Ефремов, К.В. Шайтан	
БИОАКТИВНЫЕ СВОЙСТВА ДИОКСИДА ТИТАНА, СФОРМИРОВАННОГО МЕТОДОМ АТОМАРНО-СЛОЕВОГО ОСАЖДЕНИЯ.....	20
А.П. Алехин, И.П. Григал, С.А. Гудкова, А.М. Маркеев, А.С. Митяев	
ИССЛЕДОВАНИЕ КЛЕТОК НЕЙРОНОВ В КУЛЬТУРЕ ПРИ ПАТОЛОГИИ И В НОРМЕ МЕТОДАМИ БИОФИЗИКИ И НАНОБИОТЕХНОЛОГИИ	21
Е.В. Дзюбенко	

СТАБИЛИЗАЦИЯ НАНОЧАСТИЦ ПОЛИЭЛЕКТРОЛИТНЫМИ КОМПЛЕКСАМИ СОПОЛИМЕРА МАЛЕИНОВОЙ КИСЛОТЫ И ЭТИЛЕНА С ХИТОЗАНОМ	23
А.С. Ерофеев, И.В. Яминский, Н.А. Самойлова, М.А. Краюхина	
ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МЕТОДОВ АТОМНО-СИЛОВОЙ МИКРОСКОПИИ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ ЖИВЫХ КЛЕТОК	24
Ю.М. Ефремов, Е.В. Дзюбенко, И.М. Зурина, Д.В. Багров, К.В. Шайтан	
ИНФЕКЦИОННЫЕ ВОЗБУДИТЕЛИ ПОД ИГЛОЙ МИКРОСКОПА: ОТ БАКТЕРИЙ ДО БЕЛКОВЫХ ФОРМ	25
Г.К. Жавнерко, И.В. Парибок, В.Е. Агабеков, С.П. Капитулец, Н.Н. Полещук, П. Фарниа	
ИЗУЧЕНИЕ СТРУКТУРЫ АССОЦИАТОВ ФИБРИНА	26
Е.Г. Завьялова, А.Д. Сушко, А.М. Копылов, И.В. Яминский	
ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ КВАНТОВЫХ ТОЧЕК И РЕАКЦИОННЫХ ЦЕНТРОВ ПУРПУРНЫХ БАКТЕРИЙ <i>Rb. SPHAEROIDES</i> В ЛИПОСОМАХ.....	27
В.Э. Загидуллин, Е.В. Печникова, Е.П. Лукашов, О.С. Соколова, В.З. Пашенко	
ИММОБИЛИЗАЦИЯ НАНОМАТЕРИАЛОВ НА ПОВЕРХНОСТЬ КЛЕТОК И ИХ ХАРАКТЕРИСТИКА МЕТОДАМИ МИКРОСКОПИИ	28
А.И. Замалеева, И.Р. Шарипова, Л.В. Шлыкova, М. Kahraman, М. Culha, Р.Ф. Фахруллин	
FORCE SPECTROSCOPY ON RNA SYSTEMS	29
J. Zivkovic, B. Verberkt, L. Janssen, F. Alvarado, H. A. Neus, S. Speller	
ВЫСОКОЧАСТОТНЫЙ КАНТИЛЕВЕРНЫЙ РЕЗОНАТОР	30
Е.А. Илин, Э. Остершульце	
ИСКУССТВЕННЫЕ ВИРУСОПОДОБНЫЕ ЧАСТИЦЫ, ПОЛУЧЕННЫЕ НА ОСНОВЕ ФИТОВИРУСОВ	31
О.В. Карпова	
НАНОСТРУКТУРЫ НА ОСНОВЕ ДНК: ГЕННЫЕ ВЕКТОРЫ И НАНОПРОВОЛОКИ	32
Н.А. Касьяненко	
ИЗУЧЕНИЕ КОМПЛЕКСОВ ДНК С БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫМИ СОЕДИНЕНИЯМИ МЕТОДОМ АТОМНО-СИЛОВОЙ МИКРОСКОПИИ	33
Н.А. Касьяненко	
PROTEIN INTERACTION ANALYSIS WITH A PZT THIN-FILM MICROCANTILEVER AND A QUARTZ CRYSTAL MICROBALANCE.....	34
Chul Hoon Lee, Sang Kyung Kim, Tae Song Kim	

ИЗУЧЕНИЕ ФИЗИЧЕСКОЙ СОРБЦИИ РИБОНУКЛЕАЗ МЕТОДОМ АТОМНО-СИЛОВОЙ МИКРОСКОПИИ.....	35
О.А. Коновалова, Ф.В. Ширшиков, Н.В. Калачева	
МЕТОДИКА МОДИФИКАЦИИ ПОДЛОЖКИ АНТИТЕЛАМИ ДЛЯ ПОВЫШЕНИЯ СПЕЦИФИЧНОСТИ К БАКТЕРИАЛЬНЫМ ФРАГМЕНТАМ ДЛЯ ДАЛЬНЕЙШЕГО АТОМНО-СИЛОВОГО СКАНИРОВАНИЯ.....	36
С.В. Краевский, Е.В. Дубровин, С.Г. Игнатов, Т.Е. Игнатьюк, Г.Н. Федюкина, И.В. Яминский	
АТОМНО-СИЛОВАЯ МИКРОСКОПИЯ ХРОМОСОМ ТИПА ЛАМПОВЫХ ЩЕТОК: ТОПОГРАФИЯ ПОВЕРХНОСТИ РНП-МАТРИКСА ТРАНСКРИПЦИОННЫХ ЕДИНИЦ.....	37
А.В. Красикова, К.А. Бенкен	
ЗАРЯДОВЫЙ СЕНСОР НА ОСНОВЕ КРЕМНИЕВОГО НАНОПРОВОДА	38
В.А. Крупенин, Д.Е. Преснов, С.В. Амитонов, Ю.С. Ушакова	
НАНОАНАЛИТИЧЕСКИЕ И БИОСЕНСОРНЫЕ ПЛАТФОРМЫ ДЛЯ ПРОВЕДЕНИЯ ИММУНОАНАЛИЗА И ОПРЕДЕЛЕНИЯ АКТИВНОСТИ ФЕРМЕНТОВ.....	39
И.Н. Курочкин	
КАЛИБРОВКА АТОМНО- СИЛОВЫХ И ЭЛЕКТРОННЫХ МИКРОСКОПОВ ВО ВСЕМ НАНОМЕТРОВОМ ДИАПАЗОНЕ С СУБНАНОМЕТРОВОЙ ПОГРЕШНОСТЬЮ	40
П.Н. Лускинович, В.Г. Лысенко, Ю.Л. Николаев	
AFM TO STUDY DYNAMICS OF DNA AND PROTEIN-DNA COMPLEXES	42
Yuri Lyubchenko	
ТЕСТИРОВАНИЕ БИОАКТИВНОСТИ НАНОЧАСТИЦ МЕТОДОМ КОМПЬЮТЕРНОЙ ФАЗОВО-ИНТЕРФЕРЕНЦИОННОЙ МИКРОСКОПИИ В РЕАЛЬНОМ ВРЕМЕНИ	44
Д.В. Макарова, В.Б. Метелин, Э.Г. Щербакова, И.А. Василенко	
ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МЕТОДА ЛАЗЕРНОЙ ИНТЕРФЕРЕНЦИОННОЙ МИКРОСКОПИИ ДЛЯ ВИЗУАЛИЗАЦИИ ЖИВЫХ КЛЕТОК В УСЛОВИЯХ IN VITRO	46
А.И. Юсипович, Г.Г. Левин, Г.В. Максимов	
ВЫСОКОСКОРОСТНАЯ АТОМНО-СИЛОВАЯ МИКРОСКОПИЯ	47
Е.А. Меньшиков, Ю.Л. Любченко	
ИССЛЕДОВАНИЕ ДИНАМИКИ НУКЛЕОСОМ МЕТОДОМ АТОМНО-СИЛОВОЙ МИКРОСКОПИИ.....	50
И.П. Меньшикова, Е.А. Меньшиков, Н.А. Филенко, Ю.Л. Любченко	

АСМ-ИССЛЕДОВАНИЕ КЛЕТОК ТИМУСА ПРИ ОСТРОМ ВОЗДЕЙСТВИИ ИОНИЗИРУЮЩЕГО ИЗЛУЧЕНИЯ	52
И.А. Никитина, М.Н. Стародубцева, А.И. Грицук	
АТОМНО-СИЛОВАЯ МИКРОСКОПИЯ НАНОСТРУКТУР НА ПОДЛОЖКЕ НА ПРИМЕРЕ КЛАСТЕРОВ ГРАФЕНА.....	53
Е.А. Образцова, Е.Д. Образцова, И.В. Яминский	
ПРИМЕНЕНИЕ АТОМНО-СИЛОВОЙ, ЛАЗЕРНОЙ ИНТЕРФЕРЕНЦИОННОЙ МИКРОСКОПИИ И МИКРОСКОПИИ КОМБИНАЦИОННОГО РАССЕЯНИЯ ДЛЯ ВИЗУАЛИЗАЦИИ ЭРИТРОЦИТОВ.....	54
Е.Ю. Паршина, В.Н. Рябокони, Н.А. Браже, А.И. Юсипович, Г.В. Максимов	
ИССЛЕДОВАНИЕ ЗАКОНОМЕРНОСТЕЙ РОСТА ЗОЛОТЫХ НАНОЧАСТИЦ, ИММОБИЛИЗОВАННЫХ НА ПОВЕРХНОСТИ СЛЮДЫ, ПРИ ВОССТАНОВЛЕНИИ ТЕТРАХЛОРОЗОЛОТОЙ КИСЛОТЫ ПЕРОКСИДОМ ВОДОРОДА	55
Ю.С. Пестовский, И.А. Будашов, И.Н. Курочкин	
ВЛИЯНИЕ GMF НА КОНФОРМАЦИЮ ARP2/3-КОМПЛЕКСА.....	56
Е.В. Печникова, М. Gandhi, В.L. Goode, О.С. Соколова	
ДЕТЕКЦИЯ НАНОЧАСТИЦ СЕРЕБРА, ОКСИДА ТИТАНА И ОКСИДА ЦИНКА МЕТОДОМ ЭЛЕКТРОННОЙ МИКРОСКОПИИ.....	57
А.В. Пищальникова, О.С. Соколова	
ТРАНСФОРМАЦИЯ СТРУКТУРЫ ФИБРОНЕКТИНОВОЙ СЕТИ ПРИ ИЗМЕНЕНИИ МЕХАНИЧЕСКОГО НАПРЯЖЕНИЯ В ЭМБРИОНАЛЬНЫХ ТКАНЯХ XENOPUS LAEVIS.....	59
Е.А. Пухлякова	
СОЗДАНИЕ ДНК-ШАБЛОННЫХ СЕРЕБРЯНЫХ НАНОПРОВОЛОК	60
А.О. Пучкова, П.А. Соколов, Н.А. Касьяненко	
ПРАКТИКУМ ПО БИОНАНОСКОПИИ: ВОЗНИКАЮЩИЕ ВОПРОСЫ И ИХ РЕШЕНИЯ.....	61
А.Р. Рахимова	
ЭЛЕМЕНТАРНЫЕ ПРОЦЕССЫ РОСТА КРИСТАЛЛОВ И ВОЗМОЖНОСТИ АТОМНО-СИЛОВОЙ МИКРОСКОПИИ.....	62
Л.Н. Рашкович, Е.В. Петрова	
ВИЗУАЛИЗАЦИЯ ВНУТРЕННЕЙ СТРУКТУРЫ КЛЕТОК МЕТОДАМИ АТОМНО-СИЛОВОЙ МИКРОСКОПИИ.....	63
А.С. Роскошная, Д.В. Багров, Г.Е. Онищенко, А.В. Феофанов, К.В. Шайтан	

ИЗУЧЕНИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ АНТИТЕЛ С ВИРУСОМ ШАРКИ СЛИВЫ МЕТОДОМ АТОМНО-СИЛОВОЙ МИКРОСКОПИИ	64
И.В. Сафенкова, А.В. Жердев, Б.Б. Дзантиев	
СЛОЖНЫЕ ПОВЕРХНОСТИ МЕМБРАН ЭРИТРОЦИТОВ В ПОЛЕ АТОМНО-СИЛОВОГО МИКРОСКОПА «FEMTOSCAN» И ПОСЛЕДУЮЩИЙ ПРОСТРАНСТВЕННЫЙ ФУРЬЕ-АНАЛИЗ ЭТИХ ПОВЕРХНОСТЕЙ.....	66
А.М. Черныш, Е.К. Козлова, О.Е. Гудкова, М.С. Федорова, В.А. Сергунова	
ЗОНДОВАЯ МИКРОСКОПИЯ И НАНОЛИТОГРАФИЯ УГЛЕРОДНЫХ МАТЕРИАЛОВ	68
О.В. Сеницына, Г.Б. Мешков, И.В. Яминский	
РАЗРАБОТКА СПОСОБА ФИКСАЦИИ ДНК НА ПОДЛОЖКУ ИЗ МОНОКРИСТАЛЛА КРЕМНИЯ N-ТИПА И ИССЛЕДОВАНИЕ ЭЛЕКТРОФИЗИЧЕСКИХ СВОЙСТВ СФОРМИРОВАННОЙ ПОВЕРХНОСТИ	69
Н.В. Базлов, П.А. Соколов, А.О. Пучкова, И.Л. Волков, Н.А. Касьяненко	
МЕТРОЛОГИЧЕСКОЕ ОБЕСПЕЧЕНИЕ ИЗМЕРЕНИЙ ГЕОМЕТРИЧЕСКИХ И МЕХАНИЧЕСКИХ ВЕЛИЧИН В НАНОМЕТРОВОМ ДИАПАЗОНЕ МЕТОДАМИ СЗМ.....	70
В.В. Соловьев, К.В. Гоголинский, В.Г. Лысенко, С.А. Кононогов	
ОПЫТ ПРИМЕНЕНИЯ АТОМНО-СИЛОВОЙ МИКРОСКОПИИ В ОНКОЛОГИИ	71
С.С. Сухарев, И.В. Решетов, Е.Н. Славнова	
КОМПЬЮТЕРНОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ КАК СПОСОБ ПОВЫШЕНИЯ ИНФОРМАТИВНОСТИ АТОМНО-СИЛОВОЙ МИКРОСКОПИИ БИОПОЛИМЕРОВ.	72
А.П. Толстова	
АДАПТАЦИЯ А. LAIDLAWII PG8 К НЕБЛАГОПРИЯТНЫМ УСЛОВИЯМ СРЕДЫ: ИССЛЕДОВАНИЕ КЛЕТОК МИКОПЛАЗМЫ МЕТОДОМ АТОМНО-СИЛОВОЙ МИКРОСКОПИИ.....	74
М.В. Трушин, В.М. Чернов, О.А. Коновалова, Е.С. Медведева, М.Н. Давыдова, О.А. Чернова	
ОСОБЕННОСТИ КРИСТАЛЛИЗАЦИИ РАСПЛАВА УГЛЕРОДА НА РАЗЛИЧНЫХ ГРАНЯХ ВЫСОКООРИЕНТИРОВАННОГО ГРАФИТА.....	75
А.Ю. Башарин, М.А. Турчанинов	
FLUORESCENT PROBE AND AFM STUDY OF THE CHANGES IN FINE STRUCTURE AND FUNCTIONAL STATE OF LYMPHOCYTE MEMBRANES EXPOSED TO VARIOUS CONCENTRATIONS OF ZINC	77
D.S. Filimonenko, A.Ya. Khairullina, E.I. Slobozhanina, N.M. Kozlova, V.M. Yasinskii	

РЕАЛИЗАЦИЯ ИНТЕРНЕТ-ПРАКТИКУМА ПО ЗОНДОВОЙ МИКРОСКОПИИ...	79
А.С. Филонов	
АТОМНО-СИЛОВАЯ МИКРОСКОПИЯ ТРОМБОЦИТОВ В ПРЕПАРАТАХ ЦИТАФЕРЕЗНОГО ТРОМБОКОНЦЕНТРАТ	80
С.В. Ходырев, С.А. Орлов	
НОВЫЙ МЕТОД МИКРОХИРУРГИИ ЭМБРИОНОВ МЛЕКОПИТАЮЩИХ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ СИСТЕМЫ «ОПТИЧЕСКИЙ СКАЛЬПЕЛЬ – ОПТИЧЕСКИЙ ПИНЦЕТ»	82
Ю.В. Храмова, М.Л. Семенова, С.А. Сергеев, М.Б. Агранат, М.М. Ракитянский	
ИССЛЕДОВАНИЕ ПРОВОДИМОСТИ МОЛЕКУЛ ДНК	84
Т.И. Шарипов, С.С. Гоц, Р.З. Бахтизин	
РЕКОНСТРУКЦИЯ 3D-СТРУКТУРЫ АКТИН-СВЯЗЫВАЮЩЕГО С-ДОМЕНА РЕКОМБИНАНТНОГО САР-БЕЛКА ПО ДАННЫМ ЭЛЕКТРОННОЙ МИКРОСКОПИИ	85
Г.Г. Шаров, F.A. Chaudhry, B.L. Goode, O.C. Соколова	
СЕНСОРЫ НА ОСНОВЕ КАНТИЛЕВЕРОВ	87
И.В. Яминский	
АСМ-ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ ДНКАЗЫ НА ДНК, АДСОРБИРОВАННУЮ НА ТВЕРДУЮ ПОДЛОЖКУ	89
Н.А. Янькова, Д.И. Ахмерова, А.Д. Сушко, Е.В. Дубровин, И.В. Яминский	
НАНОМЕХАНИЧЕСКАЯ КАНТИЛЕВЕРНАЯ СИСТЕМА – НОВЫЙ ИНСТРУМЕНТ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ ПОВЕРХНОСТНЫХ ЯВЛЕНИЙ	90
П.В. Горелкин, Г.А. Киселев, Д.С. Мухин, Д.В. Колесов, А.С. Ерофеев, И.В. Яминский	
КОНКУРС ИЗОБРАЖЕНИЙ BIOIMAGE	91
СПИСОК УЧАСТНИКОВ КОНФЕРЕНЦИИ	94

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЙ ПРАКТИКУМ СКАНИРУЮЩЕЙ ЗОНДОВОЙ МИКРОСКОПИИ И БИОНАНОСКОПИИ

С.Д. Алекперов

Филиал МГУ им. М.В. Ломоносова в г. Баку
sdalekperov@mail.ru

Современные аналитические методы наноскопии – сканирующая зондовая микроскопия, растровая и просвечивающая электронная микроскопия, а также оптическая микроскопия сверхвысокого разрешения – позволяют получить высокоинформативные экспериментальные данные, которые можно широко использовать в качестве наглядного материала для обучения в высшей и средней школе. Эти методы и приборы являются главными аналитическими инструментами современных нанотехнологий, дающими обширную и детальную информацию об объектах наномира. Для получения, передачи и анализа этих данных имеется аппаратура зондовой микроскопии и многофункциональное программное обеспечение, адаптированные для образовательных целей.



Рис. 1. Вариант организации практикума сканирующей зондовой микроскопии на одно место преподавателя и 8 рабочих мест студентов с реализацией синхронной передачи данных со сканирующего зондового микроскопа ФемтоСкан.

В настоящем докладе проведен анализ возможности использования современных коммуникационных средств создания новых образовательных программ. В частности, обобщен опыт организации лабораторного Интернет-практикума зондовой микроскопии в МГУ им. М.В. Ломоносова. Экспериментальная база практикума состоит из сканирующего зондового микроскопа «ФемтоСкан» и рабочих графических станции с сетевым доступом к управлению микроскопом.

При выполнении лабораторной работы каждый из студентов по очереди самостоятельно проводит измерения на микроскопе, при этом данные отдельных измерений поступают в реальном времени ко всем участникам – студентам и преподавателю – для наблюдения и анализа данных.

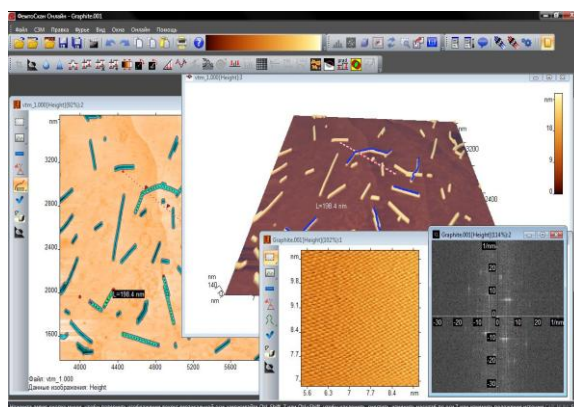


Рис. 2. Рабочее окно программы "ФемтоСкан Онлайн" (Центр перспективных технологий) для обработки данных, получаемых студентами при выполнении работы "Сканирующая зондовая микроскопия вирусов".

Технические возможности практикума позволяют проводить дистанционные лабораторные работы с управлением через Интернет. В докладе обсуждены перспективы внедрения экспериментальных Интернет-практикумов, их достоинства и недостатки, перспективы и тенденции их развития. Во время доклада будет проведена демонстрация изображений наноструктур, биологических нанообъектов и наноструктурированных поверхностей материалов, полученных в физическом практикуме для студентов начальных курсов.

Показана эффективность интерактивных онлайн-тестов, позволяющих оценить знания в области современных нанотехнологий. Разработанные онлайн-тесты имеют гибкую структуру, которая позволяет легко изменять содержание теста и редактировать графическую оболочку.

Обсуждена возможность интеграции дистанционного экспериментального обучения с существующими системами теоретического Интернет-образования.

ОПТИЧЕСКИЕ АНТЕННЫ И ИХ ИССЛЕДОВАНИЕ МЕТОДАМИ СКАНИРУЮЩЕЙ ЗОНДОВОЙ МИКРОСКОПИИ

А.Е. Афанасьев^{1,2}, П.Н. Мелентьев¹, Д.А. Лапшин¹, В.И. Балыкин¹,
А.А. Кузин², А.В. Заблоцкий², А.С. Батурин²

¹ Учреждение Российской академии наук Институт спектроскопии РАН

² Московский физико-технический институт

afanasiev@isan.troitsk.ru

Развитие медицины и биологии тесно связано с наличием доступных методов быстрого анализа органических объектов. Одной из важных задач в этой области является быстрый анализ нуклеотидов ДНК. Существующие подходы основаны на ферментативном секвенировании [1]. Оперативный анализ структуры ДНК необходим для применения современных методик лечения и диагностики заболеваний. В этой связи поиск альтернативных методов анализа структуры ДНК, а также развитие методов анализа и детектирования единичных органических молекул, является проблемой, требующей интенсивного изучения [2].

Одним из существенных факторов, ограничивающих развитие новых методов анализа, является отсутствие высокочувствительных сенсоров единичных молекул, позволяющих в режиме реального времени производить анализ образца. Эффективная технология изготовления таких сенсоров является междисциплинарной задачей, объединяющей в себе современную электронику, химию, физику, нанотехнологию и биоинженерию.

Одним из перспективных направлений создания высокочувствительных сенсоров одиночных молекул является использование эффекта гигантского комбинационного рассеяния света (ГКРС) [3]. Увеличение рассеяния молекул происходит за счет локального усиления электромагнитного поля вблизи металлических наноструктур на поверхности твердого тела, обусловленное взаимодействием падающего излучения с поверхностными плазмонами. Поверхностные плазмоны, усиливая локальное электромагнитное поле в нескольких нанометрах от поверхности, обеспечивают увеличение сечения комбинационного рассеяния молекул вблизи поверхности. Изучение свойств поляритонов, и поверхностных плазмонов в частности, интенсивно развивается в последнее время [4]. Так, при реализации металлических структур в виде антенн «bow tie» с характерными размерами в несколько сантиметров экспериментально наблюдалось усиление электромаг-

нитного поля в микроволновом диапазоне длин волн [5]. При масштабировании размеров структур в нанометровый диапазон происходит сдвиг резонанса поверхностных плазмонов в область больших частот, что дает возможность создания антенн, усиливающих электромагнитное излучение в оптическом диапазоне спектра, интересном с точки зрения детектирования молекул.

Исследования единичных молекул методом комбинационного рассеяния, как правило, проводятся с использованием ансамблей металлических наночастиц. Существуют разнообразные методы приготовления ансамбля наночастиц и методов присоединения исследуемых молекул к ним. Многочисленные исследования показали, что усиление комбинационного рассеяния в значительной мере зависит не только от размера и формы наночастиц, но и от вида фрактальных структур, в которых формируются наночастицы. Например, усиление ГКРС вблизи наночастицы из серебра оптимального размера редко превышает величину 10^4 . В тоже время ГКРС молекулы, помещенной между двумя такими наночастицами, расстояние между поверхностями которых сравнимо с молекулярными размерами, может превышать величину 10^{10} .

Исследование влияния формы структур на величину усиления электромагнитного поля и сечение рассеяния молекул является фундаментальной и нерешенной задачей. С другой стороны поиск параметров, обеспечивающих максимальное увеличение сечения рассеяния, необходим для практического построения высокочувствительных сенсоров.

Существенным недостатком разработанных методов исследования ГКРС (как для выяснения его механизма, так и для его применения) является методика приготовления как самих наночастиц, так и их структурирование, необходимое для обеспечения максимального эффекта ГКРС. Образование сложных наноструктур, в большинстве существующих методов, происходит с использованием статистической самосборки, ограничивающей возможные формы структур.

В Институте спектроскопии был предложен альтернативный метод создания наноструктур произвольной формы на поверхности твердого тела на основе методов атомной оптики. Разработанный метод атомно-проекционной литографии основан на использовании атомной камеры обскура [6, 7]. В этом подходе геометрия создаваемых наноструктур может варьироваться в широких пределах, с минимальным характерным размером создаваемых наноструктур до 30 нм. Стоит отметить, что разработанный метод позволяет создавать на поверхности твердого тела упорядоченные или хаотически расположенные структуры из широкого спектра материалов, включая органические.

В данной работе будут представлены результаты проведенных исследований оптических наноантенн, созданных методом атомно-проекционной литографии, для зондирования одиночных атомов и молекул. Оптические наноантенны различной геометрии, состоящие из атомов золота и расположенные на поверхности стекла, характеризовались с помощью атомно-силового микроскопа. На рисунке 1 представлено полученное изображение наноантенн.

Одной из важных характеристик оптических наноантенн, для рассматриваемого приложения, является степень резонансного усиления падающего электромагнитного поля. Для того, чтобы получить соответствующую характеристику необходимо найти решения уравнений Максвелла в трехмерном пространстве, или экспериментально провести зондирование локального поля вблизи отдельной наноантенны. В ходе исследований проводилось решение уравнений Максвелла в трехмерном пространстве методом конечных разностей во временной области (FDTD) [8]. Расчеты проводились для наноструктур вида «bow tie» из атомов Au и Ag в широком диапазоне спектра возбуждающего излучения. В результате были получены значения параметров, определяющих оптические свойства наноантен: (1) геометрические размеры структур, (2) форма структур, (3) параметры возбуждающего излучения (частота, поляризация), (4) коэффициент усиления плотности электромагнитного поля, (5) пространственные размеры локализованного поля. Показано, что атомно-проекционная литография позволяет создавать оптические антенны с коэффициентом усиления плотности электромагнитного поля вплоть до 5000.

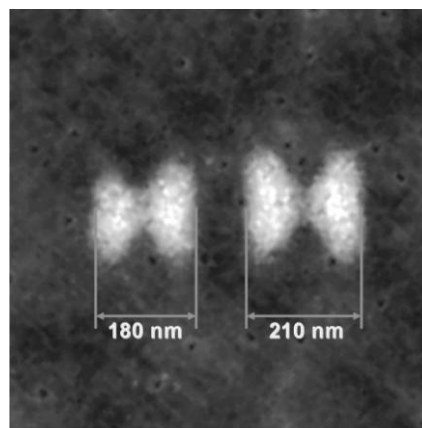


Рис. 1. Изображение структур из атомов Au на поверхности стекла в виде оптической антенны «bow tie».

Исследование распределения ближнего поля лазерного излучения вблизи металлических наноструктур является отдельной задачей микроскопии. Наиболее интересным выглядит метод безапертурной микроскопии ближнего поля. В данном методе локальное распределение поля и его усиление анализируется по рассеянию электромагнитного излучения зондом атомно-силового микроскопа вблизи поверхности твердого тела. Макет такой экспериментальной установки в настоящее время испытывается в Институте спектроскопии РАН.

Основным результатом проведенных исследований является демонстрация возможности создания оптических наноантенн с заданными характеристиками (геометрия, размер, оптические свойства), позволяющими их применение в качестве детекторов единичных атомов и молекул.

Список литературы:

1. Чемерис А.В. и др., Секвенирование ДНК, М., «Наука», 1999.
2. Хартман У., Очарование нанотехнологии, М., «БИНОМ. Лаборатория знаний», 2008.
3. Nie S. and Emory S.R., Science, 275, 1102 (1997).
4. Агранович В.М., Миллс Д.Л., Поверхностные поляритоны, М., «Наука», 1985.
5. Grober G.D. et.al., Appl. Phys. Lett., 70, 1354 (1997).
6. Балькин В.И. и др., Письма в ЖЭТФ, 84, 544 (2006).
7. Melentiev P.N. et.al., Nanotechnology, 20, 235301 (2009).
8. Taflove A., Hagness Susan C., Computational Electrodynamics: The Finite-Difference Time-Domain Method, «Artech House», Boston, 2005.

АСМ-ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ РЕСТРИКТАЗЫ НА ДНК, АДсорБИРОВАННУЮ НА ТВЕРДУЮ ПОДЛОЖКУ

Д.И. Ахмерова¹, Н.А. Янькова¹, А.Д. Сушко²,
Е.В. Дубровин^{2,3}, И.В. Яминский^{1,2,3}

¹Химический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова

²ООО НПП «Центр перспективных технологий»

³Физический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова
dilaro4ka05@rambler.ru

Целью данной работы было изучить влияние фермента на адсорбированный на твердую подложку биополимер на примере модельной системы, где в качестве биополимера используется ДНК, а в качестве фермента – рестриктаза. Особенность задачи состоит в том, что молекулы ДНК прикреплены к поверхности за счет физической адсорбции и не могут свободно находиться в объеме.

В работе использовалась коммерческая лямбда-ДНК компании Fermentas. Нанесение ДНК на слюду производили стандартным способом из раствора ДНК, содержащего одно- и двухвалентные катионы, после чего образец промывали в дистиллированной воде в течение длительного времени [1].

АСМ-изображение молекул лямбда-ДНК приведено на рисунке 1. Это длинные кольцевые молекулы, контурная длина которых превышает 15 мкм.

Обработку поверхности слюды с адсорбированной ДНК проводили нанесением раствора рестриктазы в рестриктазном буфере на подложку и его экспонированием в течение 20 минут, после чего поверхность промывалась дистиллированной водой и высушивалась.

После рестриктазной обработки поверхности на АСМ-изображении большинство молекул ДНК оказываются порезанными, причем в ряде случаев места разрезания хорошо наблюдаются как прерывание контура адсорбированной молекулы (рис. 2).

Измерив длины фрагментов ДНК после рестриктазной обработки, мы обнаружили хорошее совпадение длин с данными, предоставленными производителем. Среднее отклонение от длин, известных по электрофорезу, составило 6%, при этом на поверхности встречались как длинные фрагменты (более 1500 нм), так и короткие (50 нм).

Таким образом, показано, что рестриктаза взаимодействует с ДНК, адсорбированной на твердую подложку, так же, как в пробирке в объеме буферного раствора.

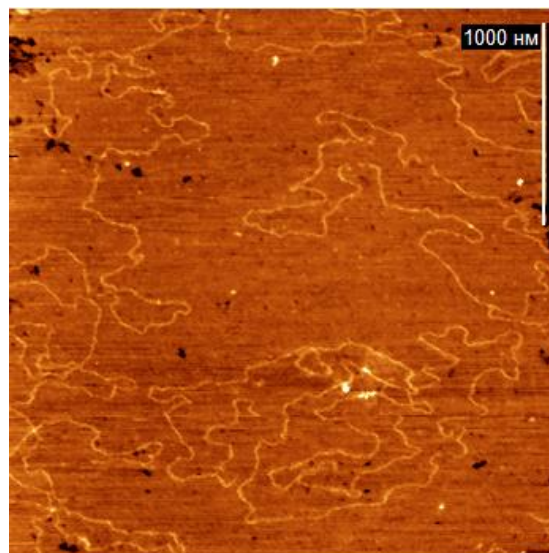


Рис. 1. АСМ-изображение лямбда-ДНК, нанесенной на слюду.

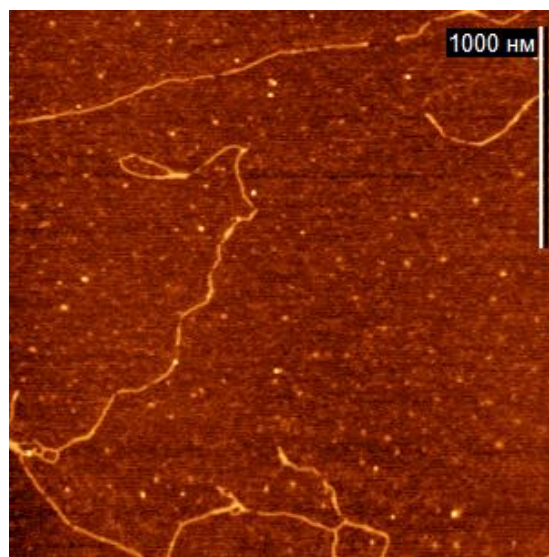


Рис. 2. АСМ-изображение адсорбированной ДНК после экспонирования в раствор рестриктазы.

Работа поддержана программой РФФИ грант 10-04-01574-а и грантом президента МК-5121.2010.2.

Список использованной литературы:

1. Hansma H.G., Laney D.E., Biophysical Journal, 70, 1933-1939 (1996).

АТОМНО-СИЛОВАЯ МИКРОСКОПИЯ ЧЕЛОВЕЧЕСКИХ СПЕРМАТОЗОИДОВ – МЕТОДИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ

Д.В. Багров, М.Л. Семенова, Р.А. Шафеи, К.В. Шайтан

Биологический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова
dbagrov@gmail.com

Описание морфологии сперматозоидов является важнейшим элементом в диагностике и лечении мужского бесплодия [1]. Традиционно для описания морфологии используется оптическая микроскопия. Однако с развитием атомно-силовой микроскопии (АСМ) и расширением спектра ее применений для исследования биологических объектов возникает перспектива использования АСМ и оптической микроскопии как взаимно дополняющих методик в исследовательских и диагностических целях. В частности, в данной работе показано, что АСМ позволяет визуализировать особенности морфологии и структуры сперматозоидов с высоким пространственным разрешением.

Цель данной работы состоит в том, чтобы развить методику исследования сперматозоидов на АСМ: подобрать оптимальный способ приготовления образца, тип кантилевера и режим сканирования. Эксперименты проводились на микроскопе Solver BIO Olympus (ЗАО «НТ-МДТ»).

Было показано, что суховоздушные препараты спермы, традиционно используемые в клинической практике [1], покрыты слоем белка и поэтому оказываются малоинформативными при исследовании на АСМ. Фиксация образца и последующая отмывка дистиллированной водой позволила избавиться от слоя белка и визуализировать элементы клеточной структуры (Рис. 1, 2).

Кантилеверы из кремния лучше подходят для сканирования сперматозоидов, чем кантилеверы из нитрида кремния, поскольку последние искажают края клеток, резко выступающие над подложкой. Это связано с большим углом при вершине. Наиболее качественные изображения были получены в полуконтактном (резонансном) режиме сканирования кремниевыми кантилеверами.

Проведенные эксперименты являются методической основой планируемой работы по выявлению действия различных физических и химических факторов на морфологию сперматозоидов.

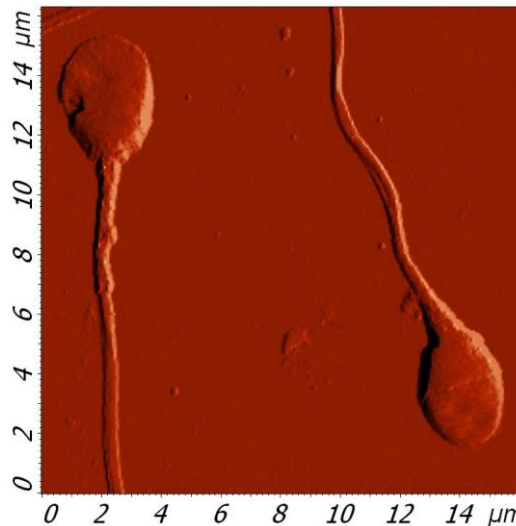


Рис. 1. Изображение сперматозоидов, полученное в полуконтактном режиме. Цвет отражает амплитуду колебаний кантилевера в каждой точке.

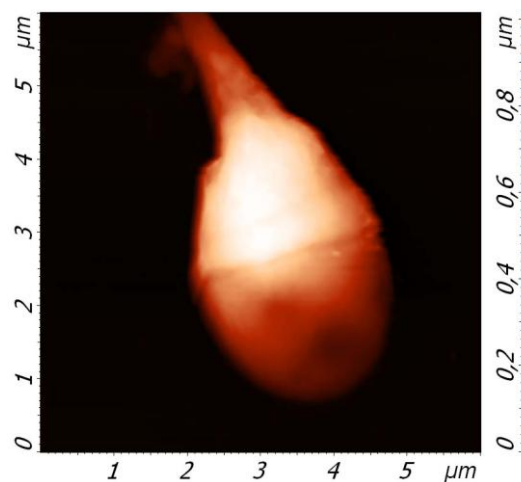


Рис. 2. Увеличенное топографическое изображение сперматозоида, полученное в полуконтактном режиме. Виден край акросомы.

Список литературы:

1. Брагина Е.Е., Абдумаликов Р.А., Руководство по сперматологии, М., СОРЕК, 2002.

Работа выполнена при поддержке ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009 – 2013 годы.

ЛАМЕЛИ ИЗ РЕКОМБИНАНТНЫХ АНАЛОГОВ БЕЛКОВ ПАУТИНЫ

Д.В. Багров¹, В.В. Мусатова¹, В.В. Прохоров², Д.В. Клинов²,
И.И. Агапов¹, В.Г. Богущ³, И.В. Яминский¹

¹Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова,

²Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,

³ГНЦ РФ ГосНИИгенетика

dbagrov@gmail.com

Каркасная нить паутины привлекает интерес исследователей из-за сочетания исключительных механических свойств и высокой биосовместимости. Каркасная нить состоит из двух белков, спидроинов 1 и 2, обладающих у разных пауков сходным строением. Они состоят из периодически повторяющихся блоков, каждый из которых содержит относительно гидрофобный полиаланиновый фрагмент длиной от 5 до 8 остатков, и более гидрофильный фрагмент, обогащенный глицином.

Нами были исследованы рекомбинантные аналоги спидроинов 1 и 2 – белки 1F9 и 2E12 [1]. В воде эти белки способны образовывать нанотрибриллы. В результате растворения рекомбинантных спидроинов в 6M GdmSCN или 10% растворе LiCl в HCOOH были приготовлены разбавленные водные растворы, в которых белок оказывался преимущественно в виде отдельных молекул. При нанесении белков из таких растворов с концентрацией ~5 мкг/мл на слюду на поверхности наблюдались протяженные структуры высотой $(0,6 \pm 0,2)$ нм (рис. 1). Эти структуры были интерпретированы нами как ламели белка, в которых молекулы имеют конформацию плоского зигзага.

При приготовлении образцов из растворов с большей концентрацией белка (~25 мкг/мл) наблюдается второй адсорбированный слой белка в виде протяженных агрегатов, ориентированных по ламелям (рис. 2). Высота этих агрегатов над первым слоем составляет $(1,8 \pm 0,4)$ нм для 1F9 (рис. 2) и $(1,9 \pm 0,4)$ нм для 2E12. Можно полагать, что конформации молекул в первом и во втором слое различны. Предположительно, во втором слое молекулы сохраняют элементы вторичной и/или третичной структуры, которые существовали у них в растворе.

Описанные ламели и агрегаты наблюдаются только при нанесении на слюду свежеприготовленного раствора. При длительном хранении или при интенсивном механическом перемешивании молекулы агрегируют с образованием нанотрибрилл (высотой от 2,5

до 5,5 нм). Таким образом, ламели формируются только из раствора, содержащего белок в виде отдельных молекул.

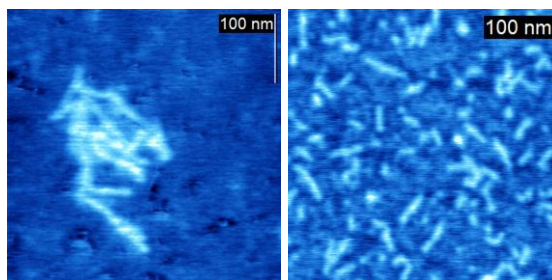


Рис. 1. Ламели из белка 1F9 (слева) и 2E12 (справа). Размер кадров 400×400 нм².

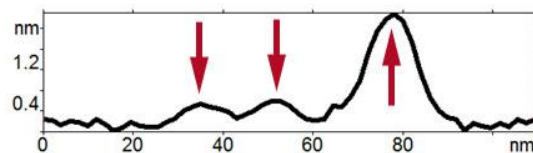
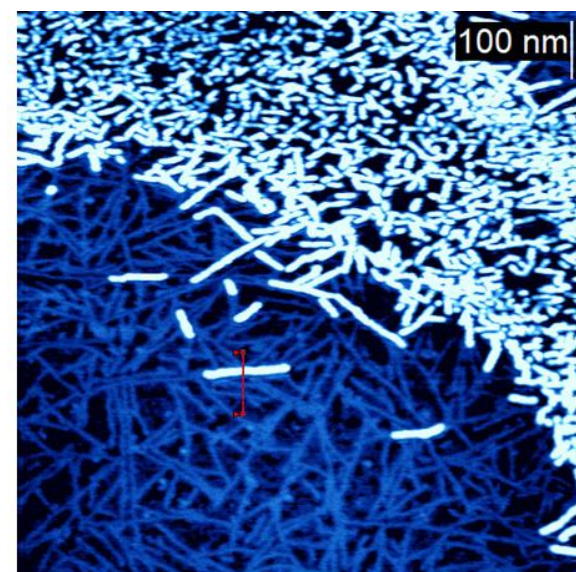


Рис. 2. Первый и второй адсорбированные слои белка 1F9 (они показаны стрелками на графике сечения) имеют разную высоту. Размер кадра 1×1 мкм².

Литература:

1. Bogush V.G., Sokolova O.S. et.al., A novel model system for design of biomaterials based on recombinant analogs of spider silk proteins, *J. Neuroimmune Pharmacol.*, 4, 17-27 (2009).

ИЗУЧЕНИЕ СТРУКТУРНЫХ ИЗМЕНЕНИЙ МОЛЕКУЛЫ ДНК В КОМПЛЕКСАХ С ЦИС- И ТРАНС-ДИХЛОРДИАМИНПЛАТИНОЙ МЕТОДОМ АТОМНО-СИЛОВОЙ МИКРОСКОПИИ

А.А. Богданов, Н.А. Касьяненко

Санкт-Петербургский государственный университет, физический факультет
aleks_aa@mail.ru

Цис-дихлордиамминплатина (II) (цисДДП), в отличие от своего транс-аналога, используется в клинической практике для лечения онкологических заболеваний с 1971 г. Механизм действия цисДДП обусловлен ее взаимодействием с молекулой ДНК в клетке.

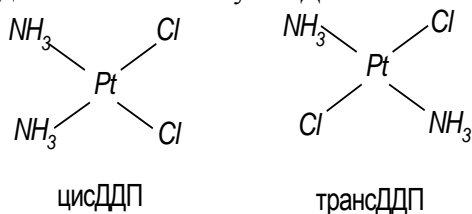


Рис. 1. Структура цис и трансДДП.

В настоящей работе методами атомно-силовой микроскопии (АСМ), кругового дихроизма (КД) и гель-электрофореза изучали структурные изменения молекулы ДНК, вызванные ее взаимодействием с цис и трансДДП. Рассматривали конкурентное связывание этих соединений с ДНК. Использовали плазмидную ДНК pFL44, линейризованную рестриктазой EcoRI.

Анализ АСМ-изображений показал, что при взаимодействии ДНК с цисДДП наблюдается появление изгибов (изломов) цепи. Это связывают, в основном, с образованием бидентатной сшивки между соседними основаниями (обычно гуанинами) одной цепи.

Связывание ДНК с трансДДП не приводит к таким изменениям. Наблюдается тенденция к образованию сшивок как между удаленными участками одной цепи ДНК, так и между отдельными молекулами. Этот результат согласуется с возрастанием оптической анизотропии молекулы ДНК в растворе, индуцированным ее взаимодействием с трансДДП [1]. Расстояние между функциональными группами трансДДП не позволяет ей образовывать бидентатный комплекс с соседними основаниями ДНК. ТрансДДП связывается с макромолекулой, в основном, монодентатно. Бидентатное связывание становится вероятным при вовлечении в координационную сферу платины разнесенных по цепи групп.

Изучали конкуренцию за позицию связывания на ДНК между цис и трансДДП. Системы готовились последовательным добав-

лением соединений в раствор ДНК. Результаты свидетельствуют о связывании транс- и цисДДП по одной и той же позиции.

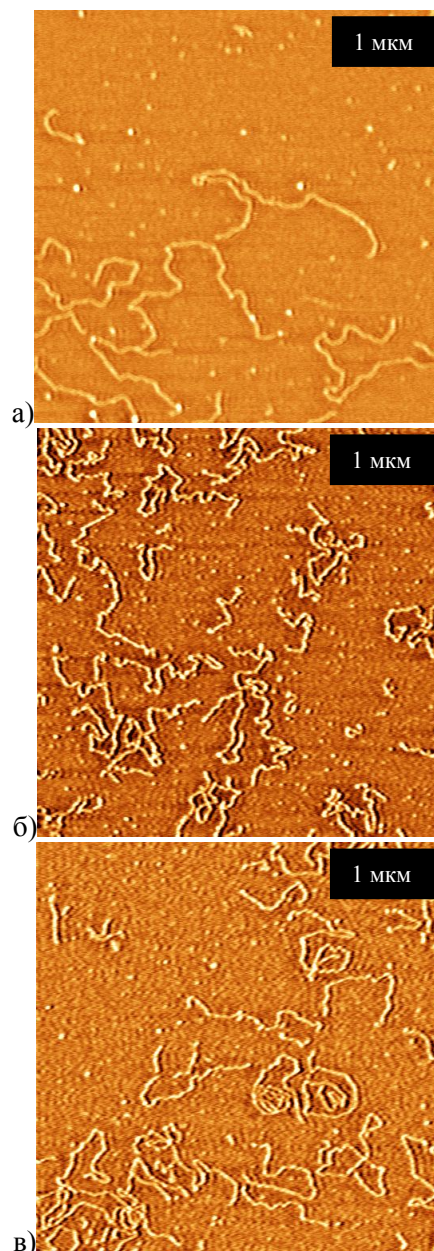


Рис. 2. АСМ-изображения систем: ДНК (а), ДНК+цисДДП(б), ДНК+трансДДП(в).

Список литературы:

1. Касьяненко Н.А., Карымов М.А., Дьяченко С.А., Смoryго Н.А., Фрисман Э.В., Молекулярная биология, 29, 585-594 (1995).

АСМ-ИССЛЕДОВАНИЕ ИОННО-ИМПЛАНТИРОВАННЫХ КАНАЛОВ В БИОСЕНСОРЕ НА ОСНОВЕ АЛМАЗА

О.П. Будник

Институт прикладной оптики НАН Украины
oksanalight@gmail.com

Активно развивающаяся индустрия биоэлектроники требует новых решений для переходов между твердотельным проводником тока и живой клеткой с целью улучшения передачи электрических сигналов. Благодаря своей химической стабильности, биосовместимости, и абсолютной нетоксичности алмаз является очень подходящим материалом для создания биосенсоров [1].

Однако на пути успешного внедрения алмаза в практическое применение остается ряд нерешенных вопросов, таких как оптимизация качества сигнала при его передаче или увеличение времени жизни живых клеток, высеянных на поверхности алмаза. Развитие технологий ионной имплантации позволяет создавать проводящие каналы внутри объема материала [2]. Однако вопросы их корреляции с рельефом поверхности остаются открытыми, в то время как свойства этой границы между биоматериалом и твердым телом являются определяющими для биосенсора.

Образец представлял собой гомоэпитаксиальный монокристаллический алмаз, в приповерхностном слое которого с помощью ионной имплантации были созданы два проводящих канала. Карта (оптический снимок с АСМ-топографией в центре) проведенных топографических и электрических измерений представлена на рис. 1.

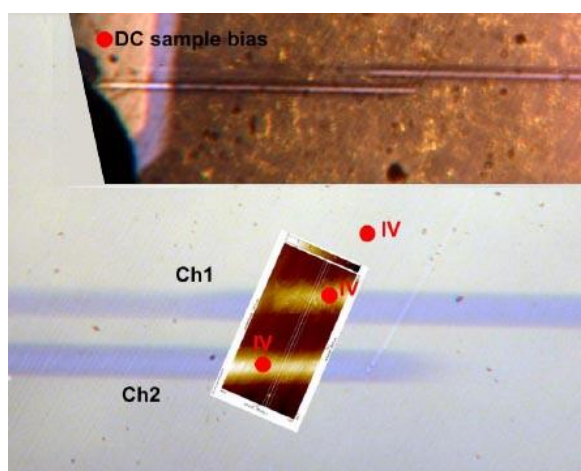


Рис. 1. Карта измерений: Ch1 и Ch2 – имплантированные каналы, IV – точки снятия ВАХ, DC – площадка подачи постоянного смещения.

Особенностью технологии было использование масок с варьируемой толщиной, которые позволяли контролировать глубину залегания канала, а также выводить его конец на поверхность. Имплантация приводит к локальной графитизации алмаза, и сопровождается образованием «валов» на поверхности над каналами. Топографические АСМ карты, снятые в контактном, бесконтактном и прерывистом (tapping) режимах, позволили исследовать корреляцию рельефа с геометрией имплантированных каналов [3].

Электрические характеристики образца были проанализированы с помощью техники электростатической силовой микроскопии (ЭСМ), когда записывались карты распределения потенциалов, а также карты токов. В частности, карта распределения тока для исследуемого образца приведена на рис. 2.

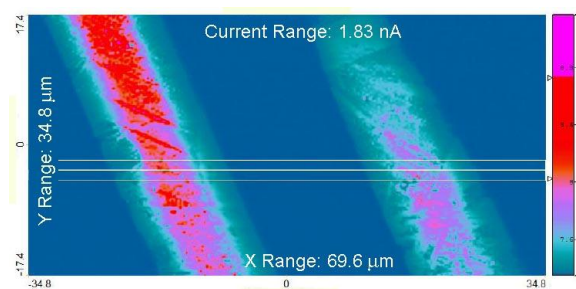


Рис. 2. Карта распределения тока на поверхности образца над каналами.

Данные исследований свидетельствуют об изменениях геометрии материала вдоль канала, связанных с балансом напряжений в кристаллических решетках; обнаруживают особенности в электрических характеристиках каналов и материала над каналами, поврежденного проходящими частичками; а также указывают на зависимость геометрических размеров канала от параметров имплантирующего потока.

Список литературы:

1. Olivero P. et al., *Diamond Relat. Mater.*, 15, 1614 (2006).
2. Ariano P. et al., *The European Physical Journal E* 30, 149–156 (2009).
3. Olivero P. et al., *Diamond & Related Materials*, 18, 870–876 (2009).

ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ ЕДИНИЧНЫХ МОЛЕКУЛ ФЕРМЕНТА P450 BM3 С ПОМОЩЬЮ АТОМНО-СИЛОВОГО МИКРОСКОПА

Н.С. Бухарина, Ю.Д. Иванов, Т.О. Плешакова, Н.В. Крохин, А.И. Арчаков
НИИ Биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича РАМН, Москва
natalie_buharina@list.ru

Атомно-силовой микроскоп (АСМ) позволяет проводить измерения топографии образца в жидкой среде, а его высокое вертикальное разрешение открывает возможность вести мониторинг за конформационными изменениями единичной молекулы фермента. Ранее такой подход использовался в работах [1-3], где проводились наблюдения за флуктуациями высоты белков во время их функционирования. В нашей работе этот подход был развит для проведения мониторинга флуктуации высоты белковой глобулы гемсодержащего фермента P450 BM3 (BM3) в процессе реакции гидроксирования лауриловой кислоты.

Цитохром BM3 является уникальным самодостаточным ферментом, состоящим из гемсодержащего домена P450 и флавопротеина, который катализирует гидроксирование жирных кислот, и был любезно предоставлен профессором А. Мурро (Манчестерский университет, Великобритания).

Иммобилизация белков осуществлялась за счет нековалентной адсорбции молекул на поверхность свежесколотой слюды.

Изолированный фермент BM3 может существовать в растворе в виде мономеров и агрегатов, причем мономеры обладают слабой активностью по гидроксированию жирных кислот по сравнению с агрегатами. Поэтому перед измерениями был проведен анализ АСМ-распределения BM3 по высотам, показавший наличие на слюде мономеров с высотами $(1,75 \pm 0,45)$ нм и агрегатов с высотами $(3,95 \pm 2,45)$ нм.

АСМ-измерения амплитуды флуктуаций высоты единичных молекул BM3 были проведены на АСМ Nanoscope IVa (Veeco) в жидкости кантилеверами DNP-S10 (Veeco) в полуконтактном режиме по методу, описанному в [1]. На рис. 1 приведен пример получаемых изображений. Амплитуды флуктуаций высоты молекулы фермента BM3 были получены последовательно в буфере, в присутствии лауриловой кислоты (субстрат), в присутствии субстрата и NADPH (реакция гидроксирования), в присутствии ингибитора фермента 1-фенилимидазола.

Таким образом, были получены зависимости флуктуаций высоты иммобилизованных агрегатов BM3 в различных условиях.

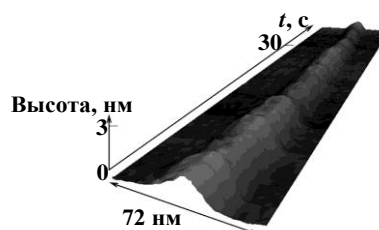


Рис. 1. Временная зависимость АСМ-сечения молекулы BM3.

Было показано, что присутствие субстрата не влияет на флуктуацию высоты BM3, среднее квадратичное значение амплитуды которой с учетом фона от подложки составило $(0,6 \pm 0,1)$ Å. В условиях гидроксирования, при добавлении донора электронов NADPH в инкубационную среду, наблюдалось увеличение амплитуды флуктуаций до значения $(1,4 \pm 0,1)$ Å. При последующем добавлении в инкубационную среду ингибитора BM3 амплитуда флуктуаций уменьшилась до исходного значения $(0,6 \pm 0,1)$ Å.

Для мономеров BM3 амплитуда флуктуаций не изменялась ни при добавлении субстрата, ни при добавлении NADPH, ни при добавлении ингибитора.

Исходя из полученных данных, можно предположить, что мерой каталитической активности фермента может быть амплитуда флуктуаций высоты. Для определения соответствия полученных величин с биологическими функциями фермента проводятся дальнейшие исследования.

Работа была выполнена при поддержке гранта РФФИ 09-04-12113-офи_м., ГК 02.552.11.7060 в рамках ФЦП.

Список литературы:

1. Thomson N.H., et al., Biophys. J., 70, 2421–31 (1996).
2. Radmacher M., et al., Science, 265, 1577–9 (1994).
3. Arnoldi M., et al., Journal of Nanotechnology Online, 1 (2005).

ИССЛЕДОВАНИЕ ЛИПИДНЫХ БИСЛОЕВ ДИПАЛЬМИТОИЛ ФОСФАТИДИЛХОЛИНА МЕТОДАМИ АТОМНО-СИЛОВОЙ МИКРОСКОПИИ

О.В. Грищенко, Д.В. Багров, Д.А. Давыдов, Ю.М. Ефремов, К.В. Шайтан
МГУ им. М.В. Ломоносова
o.grishchenkova@gmail.com

Липидные бислои являются основой биологических мембран и отвечают за множество важнейших процессов в клетках. Изучение свойств и структуры мембран является одной из важнейших задач биофизики и физической химии. Атомно-силовая микроскопия является незаменимым инструментом, позволяющим исследовать топологию липидного бислоя на подложке, а также измерять его механические свойства.

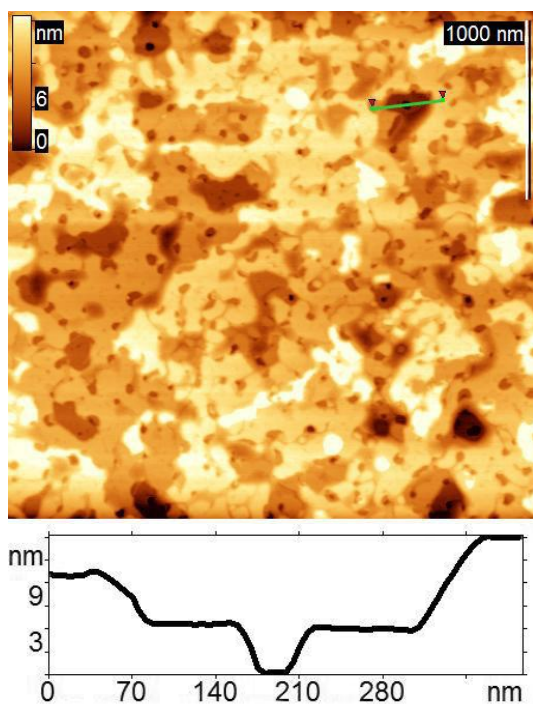


Рис. 1. Изображение множества бислоев DPPC на воздухе и профиль сечения.

В данной работе были исследованы липидные бислои из дипальмитоил фосфатидилхолина (DPPC) на слюде, приготовленные методом слияния липосом. Эксперименты выполнялись на микроскопе Solver PRO-M, обработка изображения проводилась с использованием программы FemtoScan Online.

При сканировании на воздухе поверхность образца покрыта ступенчатыми структурами со средней высотой ($6,6 \pm 0,2$) нм (рис. 1). Каждая ступенька может быть интерпретирована как бислой.

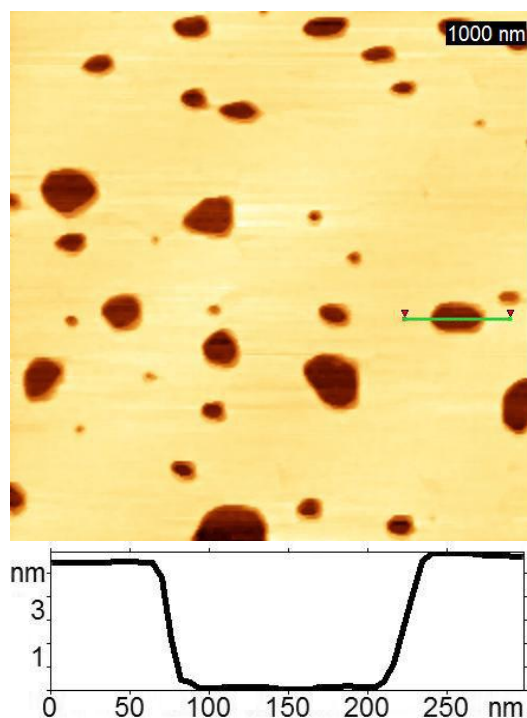


Рис. 2. Изображение липидного бислоя DPPC в воде.

При сканировании в воде наблюдается бислой с дефектами в виде дырок (рис. 2). Было показано, что измеряемая высота бислоя над подложкой зависит от силы сканирования (при сканировании с большей силой она составляет $\sim 3,3$ нм, а при сканировании с меньшей силой возрастает до $\sim 5,7$ нм).

Методом силовой спектроскопии была измерена сила, необходимая для прокола липидного бислоя. Она составила от 1 до 3,5 нН – в зависимости от используемого кантилевера.

БИОАКТИВНЫЕ СВОЙСТВА ДИОКСИДА ТИТАНА, СФОРМИРОВАННОГО МЕТОДОМ АТОМАРНО-СЛОЕВОГО ОСАЖДЕНИЯ

А.П. Алехин, И.П. Григал, С.А. Гудкова, А.М. Маркеев, А.С. Митяев
Московский физико-технический институт
svetlanagudkova@yandex.ru

Диоксид титана кристаллической структуры анатаз является одним из наиболее перспективных материалов для создания биосовместимых покрытий для титановых имплантатов [1]. Метод атомарно-слоевого осаждения (АСО) позволяет конформно наносить диоксид титана на поверхности очень развитого рельефа, которые в последнее время широко применяются в титановых имплантатах.

В ходе работы были выявлены условия АСО, приводящие к росту диоксида титана со структурой анатаз на различных подложках. Полученные покрытия были исследованы методами рентгеновской дифрактометрии, рентгено-фотоэлектронной спектроскопии, атомно-силовой микроскопии (АСМ), растровой электронной микроскопии (РЭМ). На рис. 1 представлено АСМ-изображение поверхности кристаллической пленки TiO_2 толщиной около 20 нм.

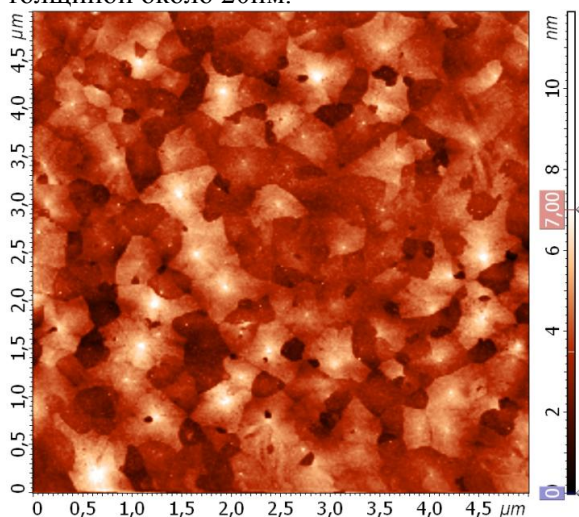


Рис. 1. АСМ-изображение пленки TiO_2 , выращенной на поверхности полированного кремния.

Биоактивные свойства полученной поверхности исследовались путем выдержки образцов титана с покрытием и без покрытия в течение 2 недель в растворе, моделирующем тканевую жидкость [2]. На исходных титановых подложках обнаружено небольшое выпадение соли NaCl , при этом на образцах титана с покрытием TiO_2 (анатаз) об-

разовался гидроксиапатит – основа костной ткани человека. На рис. 2 представлено соответствующее РЭМ-изображение.

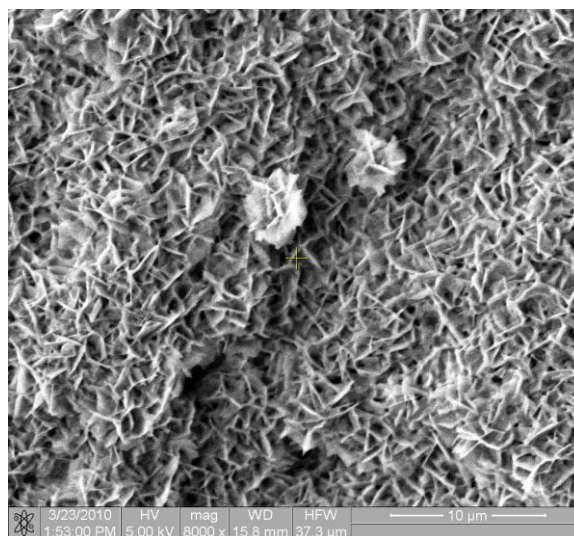


Рис. 2. РЭМ-изображение поверхности гидроксиапатита, образовавшегося на поверхности пленки TiO_2 .

Биоактивные свойства покрытий имплантатов исследовались также путем определения способности клеток остеобластов МС3Т3-Е1 к пролиферации, адгезии и дифференцировке. Способность к дифференцировке клеток контролировалась по изменению количества щелочной фосфатазы на образцах с покрытием и без него.

Спустя 14 дней роста остеобластов в дифференцирующей среде установлено, что активность щелочной фосфатазы на 47% выше, чем на исходной поверхности титана.

Список литературы:

1. Yong B., Uchida M., Kim H.-M., Zhang X., Kokubo T., *Biomaterials*, 25, 1003-1010 (2004).
2. Heinrichs J., Jaumar T., Rooth M. and Enqvist H., *Key Engineering Materials*, 361-363, 689-692 (2008).

Работа проводится в рамках реализации ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009-2013 годы.

ИССЛЕДОВАНИЕ КЛЕТОК НЕЙРОНОВ В КУЛЬТУРЕ ПРИ ПАТОЛОГИИ И В НОРМЕ МЕТОДАМИ БИОФИЗИКИ И НАНОБИОТЕХНОЛОГИИ

Е.В. Дзюбенко

*Кафедра биофизики МГУ им. М.В. Ломоносова
ejeek@yandex.ru*

Современные методы биофизики и микроскопии живых клеток позволяют получать информативные изображения, анализ которых дает возможность изучить морфологические и функциональные характеристики нейрональных клеток в норме и при патологии. В данной работе рассматривается морфология и энергетический статус нервной клетки при повреждении микротрубочек колхицином.

Целью данной работы было исследование дегенерации отростков нервных клеток.

При нейродегенерации происходят изменения в отростках нейронов – аксональная дегенерация [1]. При исследовании данных процессов используют экспериментальные модели глутаматной эксайтотоксичности, депривации ростовых факторов и др. Для рассмотрения происходящих при этом изменений цитоскелета мы использовали колхицин для дестабилизации сети микротрубочек. Колхицин образует комплексы с мономерами тубулина, дестабилизирует динамику + конца микротрубочек и приводит к масштабным изменениям цитоскелета [2]. Использование колхицина позволяет избежать комплексного ответа клетки на воздействие и тем самым выделить эффект повреждения микротрубочек, в отличие от других, более комплексно действующих моделей нейродегенерации.

Объектом исследования служили:

1. органотипичная культура спинномозговых ганглиев эмбрионов курицы на желатиновой подложке,
2. нейроны диссоциированной культуры спинномозговых ганглиев эмбрионов курицы на полиорнитин –ламининовой подложке,
3. клетки нейрональной культуры РС12, адгезированные на поли-L-лизине.

С помощью конфокальной микроскопии выявлены изменения морфологии цитоскелета нервных клеток, происходящие при инкубации с колхицином. Нарушается упорядоченность сети микротрубочек, образуются агрегаты тубулина на периферии тела клетки и в отростках. Происходит нарушение активной сети, образование актоновых гранул по всему объему клетки.

С помощью атомно-силовой микроскопии живых нейронов в среде культивирования рассмотрена нормальная морфология конуса роста нейрона (рис. 1). В процессе сканирования клетка практически не сдвигается, что подтверждают сечения высоты при прямом и обратном проходе кантилевера.

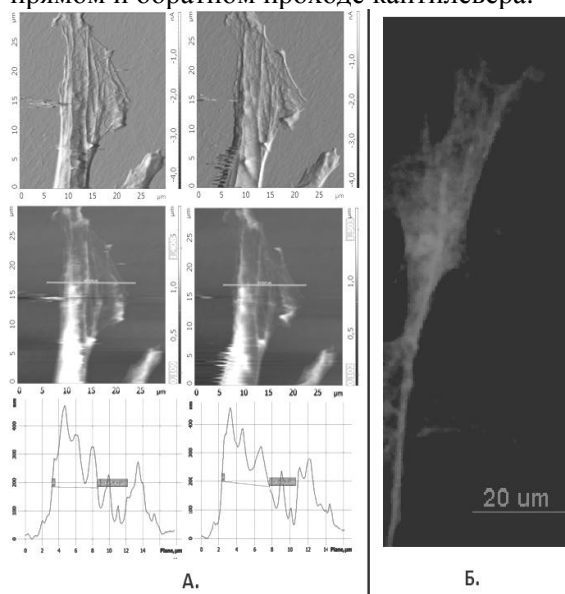


Рис. 1. А – морфология конуса роста нейрона, выявленная с помощью АСМ при прямом (слева) и обратном (справа) проходе кантилевера, Б – конфокальная микроскопия аналогичного конуса роста при иммуноцитохимическом окрашивании на тубулин микротрубочек (DM1A+ Alexa594).

Выявляются также упорядоченные структуры цитоскелета. Иммуноцитохимическое окрашивание на микротрубочки является косвенным подтверждением того, что обнаруженные структуры являются цитоскелетом (рис. 1, Б).

Рассмотрено изменение морфологии нейрита после добавления колхицина при сканировании на АСМ в режиме реального времени (рис. 2). Формирующееся на нейрите вздутие, возможно, соответствует агрегатам тубулина, замеченным в нейритах при иммуноцитохимическом окрашивании.

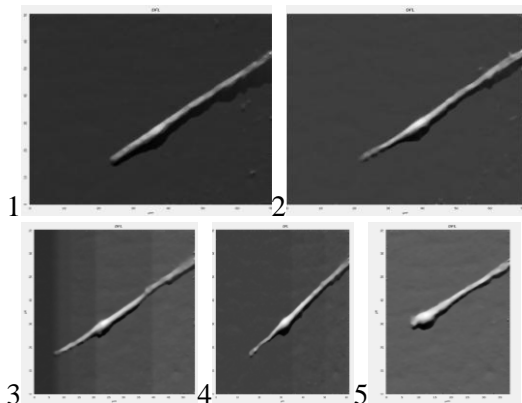


Рис. 2. Изменение морфологии нейрита живой нервной клетки после добавления колхицина. Сканирование на АСМ в режиме реального времени в среде культивирования:

1. До добавления,
2. 10 мин инкубации,
3. 20 мин,
4. 30 мин,
5. 40 мин.

Далее рассматривали влияние дестабилизации микротрубочек на энергетический статус нейрональных клеток РС 12, для чего проводили окрашивание митохондрий родамином 123 в живых клетках. Получали флуоресцентные изображения живых клеток с помощью конфокального микроскопа. Изображения обрабатывали и обсчитывали в программе ImageJ (NIH, USA).

Потенциалчувствительный краситель родамин 123 накапливается в митохондриях пропорционально их мембранному потенциалу. При этом выявляются отдельные митохондрии в отростке нейрона (рис. 3).

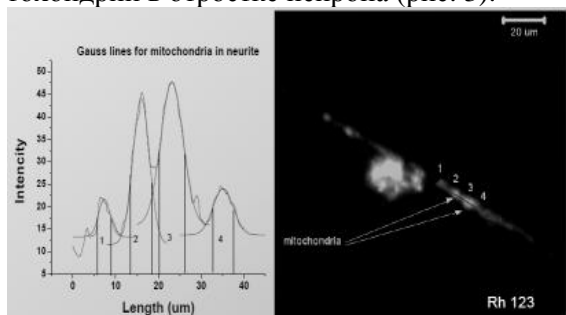


Рис. 3. Флуоресценция отдельных митохондрий в отростке нейрона, потенциалчувствительный краситель Родамин 123.

Измерен профиль интенсивности флуоресценции вдоль указанной на рисунке линии. Пики флуоресценции на профиле соответствуют отдельным митохондриям. После аппроксимации функцией Гаусса по полуширине пика оценили линейные размеры митохондрий: 3 – 6 мкм.

При инкубации нейрональных клеток с колхицином флуоресценция родамина заметно и достоверно снижается по амплитуде (рис. 4), а также увеличивается скорость её затухания (рис. 5). Эти данные говорят о нарушении митохондриального потенциала клеток при дестабилизации цитоскелета микротрубочек.

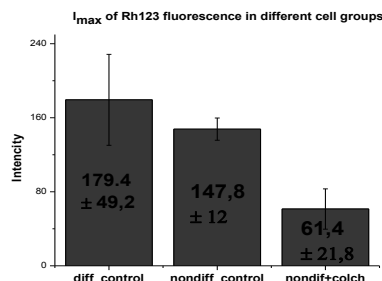


Рис. 4. Амплитуда потенциалзависимой флуоресценции в различных группах нейрональных клеток РС 12.

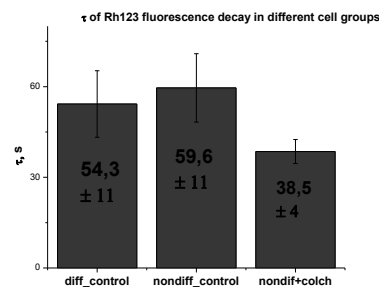


Рис. 5. Время затухания потенциалзависимой флуоресценции в различных группах нейрональных клеток РС 12.

Список литературы:

1. Martin C. Raff, Alan V. Whitmore, John T. Finn, Axonal Self-Destruction and Neurodegeneration, Science, 296, 868 (2002).
2. Mary Ann Jordan & Leslie Wilson. Nature Reviews Cancer, 4, 253-265 (2004).

СТАБИЛИЗАЦИЯ НАНОЧАСТИЦ ПОЛИЭЛЕКТРОЛИТНЫМИ КОМПЛЕКСАМИ СОПОЛИМЕРА МАЛЕИНОВОЙ КИСЛОТЫ И ЭТИЛЕНА С ХИТОЗАНОМ

А.С. Ерофеев¹, И.В. Яминский¹, Н.А. Самойлова², М.А. Краюхина²

¹Физический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова

²Институт элементоорганических соединений им. А.Н. Несмеянова

erofeev@polly.phys.msu.ru

В наноразмерном диапазоне любой материал проявляет уникальные свойства. Очень высокой активностью обладают наночастицы серебра. Применение перевязочных материалов, обработанных раствором, содержащим наночастицы, способствует более эффективному заживлению воспаленных ран, чем при использовании обычных антисептиков.

Наличие магнитных свойств у наночастиц обеспечивает легкость детектирования, выделения и концентрации интересующих биобъектов. Это позволяет использовать наночастицы для высокоспецифичной магнитной сепарации биологических молекул, являющейся значительно менее трудоемкой процедурой, чем фильтрация и центрифугирование.

Наночастицы размером менее 10 нм являются системами, обладающими избыточной энергией и высокой химической активностью. Поэтому вопросы получения наночастиц и процессы их стабилизации рассматриваются в комплексе. В качестве стабилизаторов наночастиц может быть использован класс линейных сополимеров с регулярно чередующимися звеньями электролитной и неэлектролитной природы, например, водорастворимые сополимеры на основе двухосновной малеиновой кислоты и этилена. Для повышения гемосовместимых и антимикробных свойств поверхностей можно использовать гидрофильные бислойные и мультислойные полимерные покрытия на основе интерполиэлектrolитных комплексов (ИПЭК).

Целью данной работы является изучение особенностей нуклеации наночастиц сополимерами малеиновой кислоты с этиленом и их интерполиэлектrolитными комплексами с хитозаном с помощью метода атомно-силовой микроскопии.

В данной работе был изучен характер распределений агрегатов сополимеров малеиновой кислоты с этиленом со стабилизированными наночастицами серебра и магнетита и ИПЭК этого сополимера с хитозаном со стабилизированными наночастицами серебра и магнетита. Было выявлено, что с образовани-

ем ИПЭК происходит уменьшение размеров агрегатов [1]. В ходе работы было показано, что сополимеры малеиновой кислоты с этиленом и их ИПЭК с хитозаном можно использовать в роли стабилизатора наночастиц серебра (средний размер 3 нм), а также наночастиц магнетита (средний размер не превышает 10 нм).

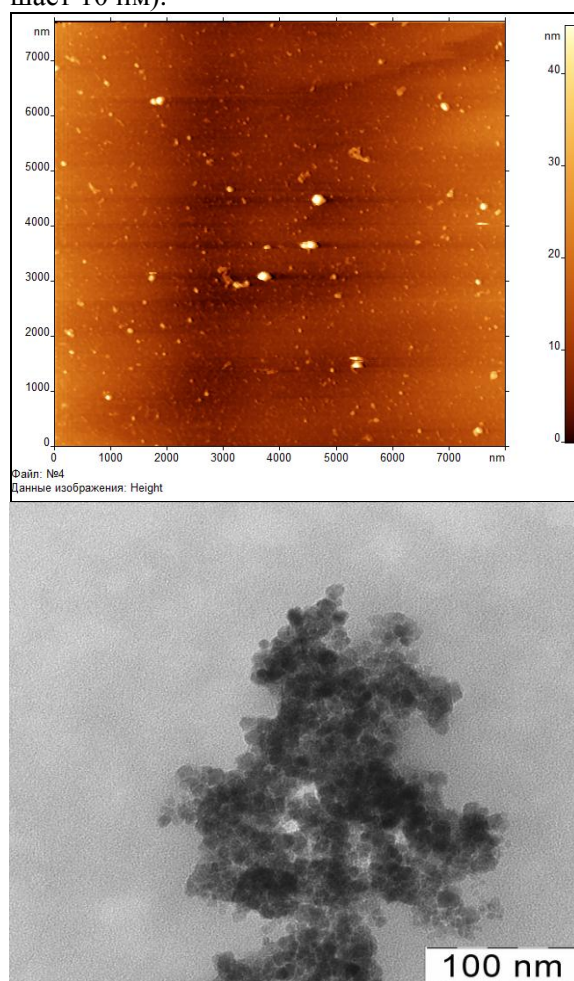


Рис. 1. ИПЭК сополимера с хитозаном, содержащий наночастицы магнетита (вверху). Электронная микрофотография сополимера со стабилизированным магнетитом (внизу).

Список литературы:

1. Краюхина М.А., Самойлова Н.А., Ерофеев А.С. и др., Высокомолекулярные соединения, 52, 1-9 (2010).

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МЕТОДОВ АТОМНО-СИЛОВОЙ МИКРОСКОПИИ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ ЖИВЫХ КЛЕТОК

Ю.М. Ефремов, Е.В. Дзюбенко, И.М. Зурина, Д.В. Багров, К.В. Шайтан

МГУ им. М.В. Ломоносова

yuefa2111@mail.ru

Возможность исследовать живые объекты, находящиеся в физиологическом окружении – важнейшее преимущество АСМ перед другими методами микроскопии, в частности, перед электронной микроскопией. В то же время, изучение живых клеток на АСМ это технически и методически сложное направление, поскольку живые клетки – очень мягкие, они требуют особых условий для поддержания жизнеспособности и, самое важное, должны быть прочно связаны с подложкой. Поэтому для сканирования живых клеток необходимо тщательно выбирать способ приготовления образца и режим работы.

Цель данной работы – развитие методик работы с живыми клетками на АСМ. В качестве объектов исследования были выбраны два типа клеток: фибробласты, выделенные из подкожной жировой ткани мыши, и клетки органотипической культуры спинномозговых ганглиев (СМГ), выделенные из эмбрионов цыплят.

Было показано, что клетки СМГ, выращенные на желатине, адсорбированы достаточно надежно и подходят для проведения измерений на АСМ. Были получены изображения живых клеток СМГ в среде культивирования в контактном и полуконтактном режимах, проведены измерения модуля Юнга методом силовой спектроскопии. Для обработки силовых кривых и вычисления модуля Юнга использовалась модель Герца в модификации Снеддона [1]. Выбранный способ оценки модуля Юнга корректен, и при замене кантилевера вариации среднего значения составляют менее 5%. Показано образование углублений на поверхности фиксированных высушенных клеток СМГ, которые не наблюдаются на живых клетках (рис. 1).

Были сопоставлены изображения и значения модуля Юнга фибробластов, выращенных на разных подложках (рис. 2). Обнаружено различие в распределении значений модуля Юнга между фибробластами, выращенными на желатине и на фибронектине – это отражает зависимость организации цитоскелета от подложки. Из карты распределения локального модуля Юнга для фибробластов следует, что в области над периферией

тела клетки модуль упругости больше, чем над центром клетки.

Работа выполнена при поддержке ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009 – 2013 годы, ГК № П717.

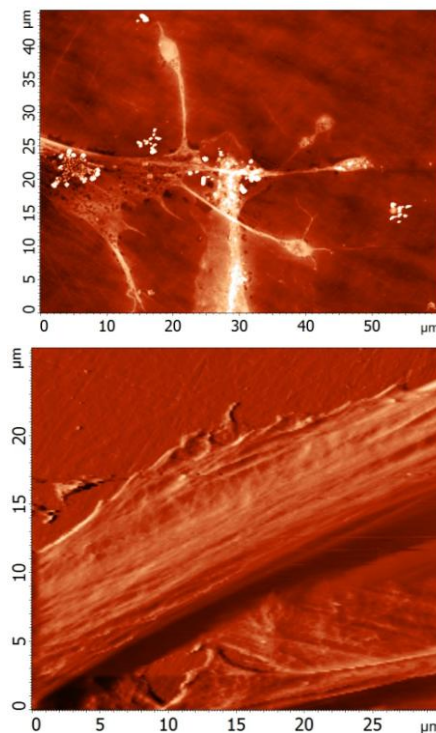


Рис. 1. Изображения нейронов: сверху – фиксированные клетки, внизу – живая клетка в жидкости.

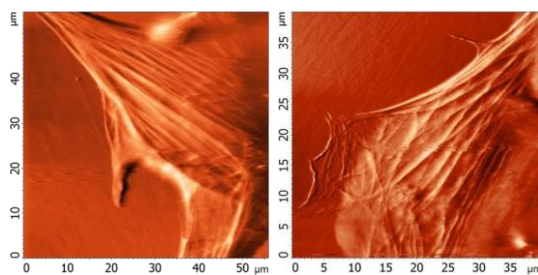


Рис. 2. Изображения фибробластов на фибронектине (слева) и на желатине (справа).

Список литературы:

1. Rotsch C., Jacobson K., Radmacher M., Dimensional and mechanical dynamics of active and stable edges in motile fibroblasts investigated by using atomic force microscopy, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 96, 921-926 (1999).

ИНФЕКЦИОННЫЕ ВОЗБУДИТЕЛИ ПОД ИГЛОЙ МИКРОСКОПА: ОТ БАКТЕРИЙ ДО БЕЛКОВЫХ ФОРМ

Г.К. Жавнерко¹, И.В. Парибок¹, В.Е. Агабеков¹, С.П. Капитулец²,
Н.Н. Полещук², П. Фарниа²

¹Институт химии новых материалов НАН Беларуси
²РНПЦ Эпидемиологии и микробиологии Минздрава РБ
zhavn@ichnm.basnet.by

В настоящее время метод атомно-силовой микроскопии (АСМ) является одним из наиболее эффективных инструментов исследования структуры и свойств как индивидуальных белков, так и клеточных структур. АСМ может быть использована в медицине для выявления самых различных возбудителей инфекционных заболеваний либо для подтверждения ранее установленного диагноза. Применение метода АСМ при изучении антибиотикорезистивных форм туберкулеза (*Mycobacterium tuberculosis*) позволило выявить наличие бактерий округлой формы наряду с традиционными палочковидными бактериями. С помощью данных силовой спектроскопии установлено, что трансформация формы бактерий, вызванная присутствием антибиотиков, приводит к формированию «жесткой» защитной оболочки. Происходит также изменение поверхностного заряда клеточной мембраны, поскольку бактерии округлой формы менее прочно удерживаются на иммобилизирующем подслое положительно заряженного полиэтиленimina и легко перемещаются по поверхности иглой микроскопа.

С использованием методов АСМ и микроконтактной печати показана возможность диагностики возбудителей белковой природы и выявления прионных инфекций. Осуществлена управляемая фиксация и концентрирование инфекционного агента PrP27-30 из анализируемой пробы на микронных участках поверхности модифицированного кремния. Микроструктурированные пленки бычьего сывороточного альбумина (БСА) были использованы для локального блокирования неспецифической адсорбции белков, что обеспечивало эффективную иммобилизацию анти-PrP моноклональных антител 3F4 (МАТ) в промежутки между полосами БСА. Анализ АСМ-изображений, полученных после иммобилизации МАТ на поверхность гидрофильного кремния, показал, что высота полос иммобилизованных антител лишь незначительно ниже, чем для БСА (~ 0,1 нм). После взаимодействия МАТ с PrP27-30

(рис. 1) наблюдались узкие полосы белковых комплексов «МАТ-PrP27-30», превышающие уровень полос БСА в среднем на $(1,6 \pm 0,2)$ нм (рис. 2).

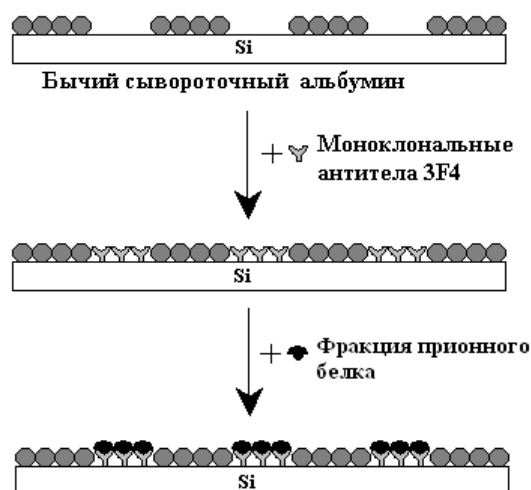


Рис. 1. Схема управляемой фиксации PrP27-30.

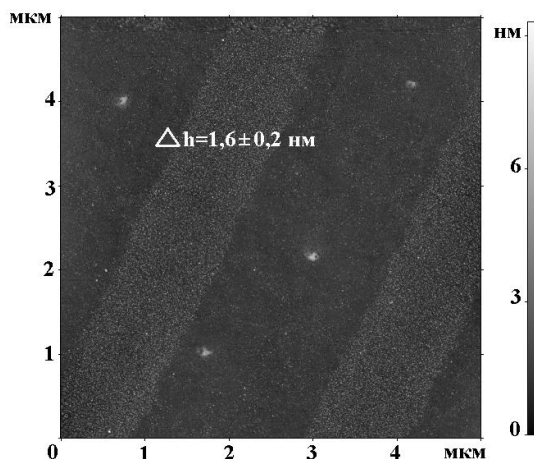


Рис. 2. АСМ-изображение микроструктурированной пленки БСА/МАТ на кремнии после иммобилизации PrP27-30.

Таким образом, прием концентрирования возбудителей инфекций на локальных участках поверхности может быть использован для их прижизненной диагностики.

ИЗУЧЕНИЕ СТРУКТУРЫ АССОЦИАТОВ ФИБРИНА

Е.Г. Завьялова^{1,3}, А.Д. Сушко², А.М. Копылов¹, И.В. Яминский^{1,2}

¹ Химический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова

² Центр перспективных технологий, ³ АПТО-ФАРМ

zlenka2006@rambler.ru

Одним из свойств крови является её способность к гелеобразованию, или свертыванию. В человеческом теле такое изменение агрегатного состояния крови вызывается повреждением либо разрывом тканей и осуществляется за счет плазматических белков, тромбоцитов и тканевых составляющих. Система свертывания крови, в основном, состоит из трипсиноподобных сериновых протеаз, которые последовательно активируют друг друга, что приводит к образованию активного α -тромбина. Этот фермент гидролизует фибриллярный белок фибриноген, растворенный в крови, с образованием фибрина, который способен самоассоциироваться: формируются длинные разветвленные нити, формирующие плотную сеть – основу тромба (см. рис. 1).

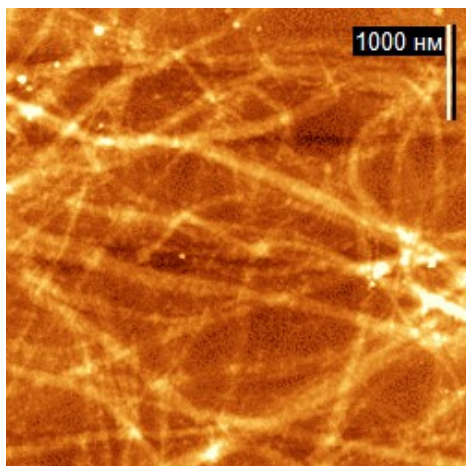


Рис. 1. АСМ-изображение фибриновой сети, образованной в результате добавления тромбина к раствору фибриногена.

Цель настоящего исследования – изучить первые стадии образования фибриновых ассоциатов при помощи АСМ.

Общепринятая модель образования фибриновых нитей включает ассоциацию молекул фибрина в дугтяжевые нити - протофибриллы, которые затем агрегируют с образованием фибрилл.

При концентрации фибриногена 0,2-2 мкМ быстро образуются крупные фибриллы с выраженной поперечной полосатостью (рис. 2) с периодом около 22 нм. Этот феномен ранее был показан в экспериментах

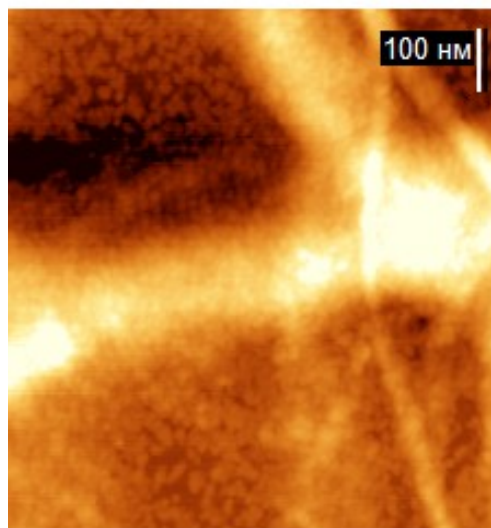


Рис. 2. Периодическая структура на поверхности фибриллы.

по ПЭМ, нам впервые удалось визуализировать периодичность структуры фибрилл в АСМ. Однако структуру первичных нитей фибрина в этих экспериментах установить не удается из-за значительной сорбции белка.

Исследованы разбавленные растворы фибриногена (20 нМ), в которых ферментативная реакция и ассоциация фибрина идет медленнее. Впервые удалось наблюдать тонкие нити, представляющие собой как одно-, так и дугтяжевые ассоциаты фибрина.

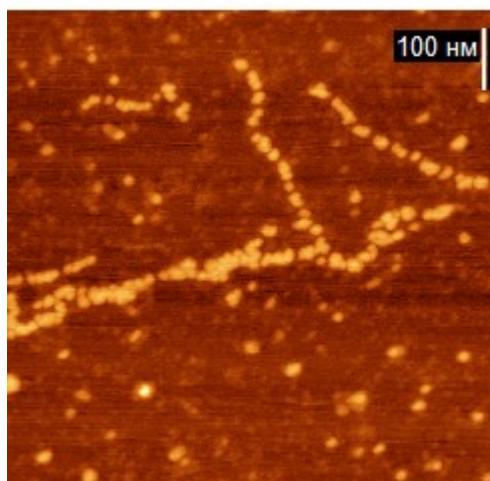


Рис. 3. Протофибриллы, образующиеся из разбавленных растворов фибриногена под действием тромбина.

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ КВАНТОВЫХ ТОЧЕК И РЕАКЦИОННЫХ ЦЕНТРОВ ПУРПУРНЫХ БАКТЕРИЙ *Rb. Sphaeroides* В ЛИПОСОМАХ

В.Э. Загидуллин¹, Е.В. Печникова², Е.П. Лукашов¹, О.С. Соколова^{2,3},
В.З. Пашенко¹

¹МГУ им. М.В. Ломоносова, Биологический факультет, кафедра биофизики

²Институт кристаллографии им. А.В. Шубникова

³МГУ им. М.В. Ломоносова, Биологический факультет, кафедра биоинженерии
vad-zag@yandex.ru

Квантовые точки представляют собой полупроводниковые нанокристаллы, обладающие, во-первых, высоким квантовым выходом флуоресценции, а во-вторых, регулируемым при синтезе положением полосы флуоресценции.

Все эти свойства делают их перспективными кандидатами на роль искусственных антенных комплексов для фотосинтетических реакционных центров. Исследования по взаимодействию и миграции энергии в растворах показали перспективность подобного подхода, поэтому нами было изучено взаимодействие квантовых точек и реакционных центров в липосомах, как перспективной среды для построения гибридных конструкций [1].

Для первичного подтверждения связывания квантовых точек с липосомами был использован метод агарозного фореа.

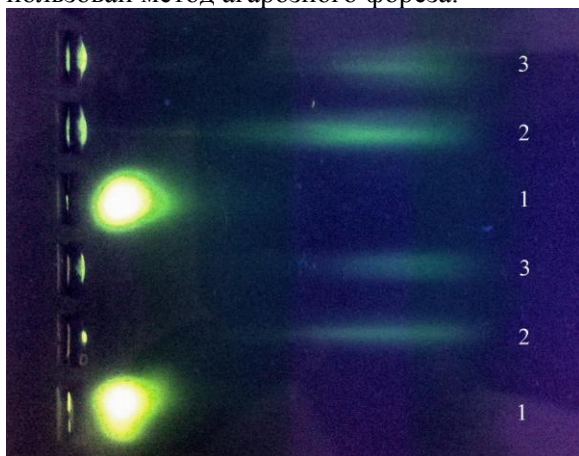


Рис. 1. Агарозный фореа 1. Раствор квантовых точек 2. Препарат липосом и квантовых точек 3. Препарат липосом, квантовых точек и реакционных центров пурпурных бактерий.

Было обнаружено, что фракция свободных квантовых точек, находящаяся в растворе, не обнаруживается в препаратах с липосомами, что свидетельствовало о связывании квантовых точек с липидным окружением. Препарат липосом с квантовыми точками и реакционными центрами демонстрировал такое

же распределение квантовых точек, которые, однако, подверглись тушению. Таким образом, можно говорить о взаимодействии между квантовыми точками и реакционными центрами. Для определения характера их взаимодействия был применен метод просвечивающей криоэлектронной микроскопии [2].

Исследования были проведены на двух препаратах липосом, приготовленных методами диализа и экстракции.

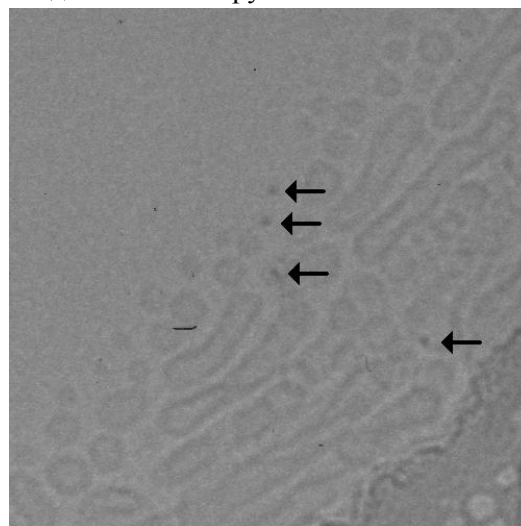


Рис. 2. Препарат квантовых точек (отмечены стрелками) в липосомах, полученный методом просвечивающей криоэлектронной микроскопии.

Результаты исследований показали, что в первом случае получают однослойные липосомы, обладающие небольшими размерами с большой дисперсией. Включение квантовых точек в состав липосом, происходит, предположительно, путем диффузии внутрь липидного бислоя.

Список литературы:

1. Al-Jamal W.T., Al-Jamal K.T., Bomans P.H., Frederik P.M., Kostarelos K., Small Journal, 4, 1406-1425 (2008).
2. Moschetta A., Frederik P.M., Portincasa P., vanBerge-Henegouwen G.P., van Erpecum K.J., J. Lipid Res., 43, 1046-1053 (2002).

ИММОБИЛИЗАЦИЯ НАНОМАТЕРИАЛОВ НА ПОВЕРХНОСТЬ КЛЕТОК И ИХ ХАРАКТЕРИСТИКА МЕТОДАМИ МИКРОСКОПИИ

А.И. Замалеева, И.Р. Шарипова, Л.В. Шлыкова, М. Kahraman,
М. Culha, Р.Ф. Фахруллин

Казанский (Приволжский) федеральный университет
alsu130ksu@mail.ru

Изучение взаимодействия живых клеток с наноматериалами представляет особый интерес и обусловлено это тем, что гибридные системы, полученные на основе наноматериалов и живых клеток, могут использоваться для выявления токсичности наноматериалов, для направленного изменения свойств клеток, регуляции их физиологической активности, визуализации клеточных органелл и высокоточной идентификации живых клеток.

В данной работе описан метод иммобилизации наноматериалов (НМ) на поверхность клеток. Мы применили метод послойного нанесения противоположно заряженных полиэлектролитов поли (аллиламин гидрохлорида) (ПАГ) и поли (стирол сульфоната) (ПСС) для формирования на поверхности клеток многослойной пленки, содержащей слой наноструктур (наночастиц благородных металлов, магнитных наночастиц или углеродных нанотрубок). Объектами исследования явились клетки эукариот (дрожжи *S. cerevisiae*, конидии *T. asperellum*, водоросли *C. pyrenoidosa*) и прокариот (бактерии *E. coli*).

Для характеристики клеток, модифицированных НМ, были применены методы оптической (ОМ), электронной просвечивающей (ПЭМ), электронной сканирующей (СЭМ) и атомно-силовой микроскопии (АСМ). Первичным индикатором успешного включения НМ в пленочные слои служило изменение окраски суспензии модифицированных клеток, фиксируемое при помощи ОМ.

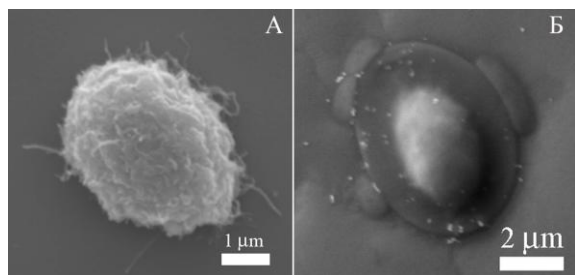


Рис. 1. СЭМ. Изображения дрожжей, модифицированных углеродными нанотрубками (А) и серебряными наночастицами (Б).

СЭМ показала адсорбцию как единичных наноструктур, так и их агрегатов на поверх-

ности клеток (рис. 1), но эффективность покрытия модифицированных клеток наноматериалами различалась у разных типов клеток, что свидетельствует о дискретном значении поверхностного заряда клеток и о наличии специфических участков связывания НМ.

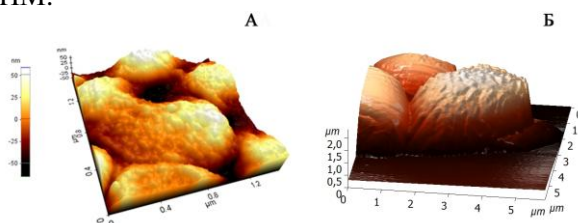


Рис. 2. АСМ-изображения клеток *E. coli* (А) и *T. asperellum* (Б), модифицированных золотыми наночастицами.

Детально поверхность модифицированных НМ клеток была изучена с помощью АСМ. Показано, что после иммобилизации НМ, топография становится шероховатой и неровной, четко виден характер распределения и агрегирования наночастиц, что затруднительно при визуализации клеток с использованием СЭМ (рис. 2).

Методом ПЭМ на тонких срезах показано наличие слоя наночастиц на поверхности модифицированных клеток и отсутствие их в цитоплазме (рис. 3).

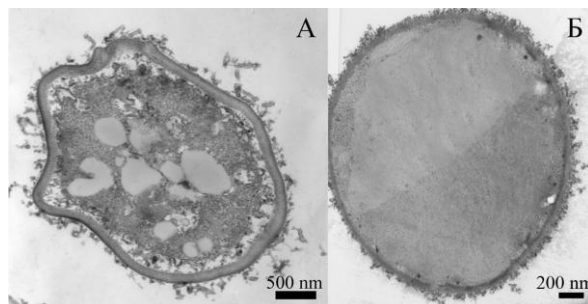


Рис. 3. ПЭМ. Изображения дрожжей, модифицированных углеродными нанотрубками (А) и серебряными наночастицами (Б).

Таким образом, в данной работе показана возможность использования методов оптической микроскопии, СЭМ, ПЭМ и АСМ для оценки эффективности иммобилизации НМ на поверхности клеток.

FORCE SPECTROSCOPY ON RNA SYSTEMS

J. Zivkovic¹, B. Verberkt², L. Janssen², F. Alvarado¹, H. A. Heus², S. Speller¹

¹ SPM Group, IMM, Radboud University Nijmegen, NL

² Department of Biophysical Chemistry, IMM, Radboud University Nijmegen, NL
j.zivkovic@science.ru.nl

In recent years, single molecule force spectroscopy using the atomic force microscope (AFM) has been successfully applied to obtain binding parameters and explore the energy landscape of biomolecular interaction. By attaching complementary biomolecules on a solid support and to an AFM cantilever, unbinding forces between individual partners can be measured, from which relevant kinetic parameters of bond dissociation can be derived. In this work, we apply AFM-based single molecule force spectroscopy (AFM-SMFS) to measure the interaction between the regulator of HIV-1 replication, Rev protein and its target viral mRNA sequence, Rev Responsive Element (RRE) and investigate the influence of the blocking agent neomycin.

RNA molecules and RNA – protein complexes play essential roles in nearly every aspect of cellular development. In addition, RNA serves as genome of many viruses, such as HIV-1, whose replication cycle depends strongly on two sequence specific RNA – protein interactions: TAR – TAT and RRE – Rev^[1,2,3]. By targeting the RNA moiety, the specificity of these interactions can provide new leads for drug discovery with the rationale to find small molecules that crucial formation of RNA – protein complexes crucial for viral replication.

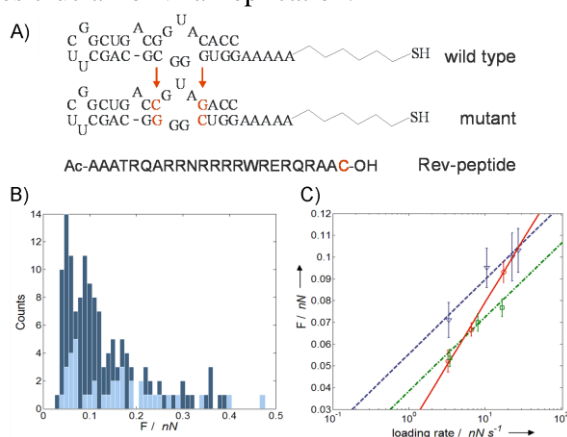


Fig. 1. A) RNA and peptide sequences used in the experiment. B) Force distribution in absence (dark blue) and presence (light blue) of neomycin C) Dynamic force plot for wild type and mutant RRE: triangles-wtRRE (20nm), circles-wtRRE(50nm), squares-mutRRE (50nm).

In the experimental setup, RRE sequences and Rev peptide (Fig. 1A) were immobilized to the surface and cantilever via polymer linkers (PEG) using thiol chemistry^[4,5]. The interaction of RRE

with Rev peptide was probed for several retract velocities and trigger values. The final force distribution often showed a long tail at higher forces and few maxima. Dynamic force plots showed linear dependence of the logarithm of loading rate in accordance with the single barrier picture. From the extrapolation to zero force and slope of the linear fit, the natural off rate k_{off} and potential barrier width x_b could be extracted. The obtained values for wild type RRE were $k_{\text{off}} = 1.6 \pm 0.7 \text{ s}^{-1}$ and $k_{\text{off}} = 5 \pm 2 \text{ s}^{-1}$ (trigger 20nm and 50nm respectively) and $x_b = 2.8 \pm 0.2 \text{ \AA}$ in both cases. In the presence of neomycin the number of observed binding events was significantly reduced. However, even with a 5×10^4 over K_D excess of neomycine, which in bulk equilibrium experiments would irreversibly dissociate Rev peptide from RNA, not all binding events could be prevented. This indicates the dynamic escape of the complex due to non-equilibrium character of the measurement and formation of ternary complex.

Control measurements on the mutated RRE stem loop yielded a higher $k_{\text{off}} = 17 \pm 5 \text{ s}^{-1}$ and lower $x_b = 1.66 \pm 0.05 \text{ \AA}$. Assuming the on rate $10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ^[6], the equilibrium dissociation constant K_D can be estimated to 16 – 50 nM for wild type and $K_D = 170 \text{ nM}$ for the mutant interaction. These results agree well with previously published data on comparable RRE-Rev peptide system^[6,7].

Reference List:

1. Pollard V.W., Malim M.H., Annu. Rev. Microbiol., 52,491-532 (1998).
2. Zapp M.L., Green M.R., Nature, 342, 714-716 (1989).
3. Luedtke N.W., Tor Y., Biopolymers, 70, 103-119 (2003).
4. Eckel R. et al., Angew. Chem., 44, 3921-3924 (2005).
5. Dufrêne Y.F., Hinterdorfer P., Nat. Methods, 3, 347-351 (2006).
6. Lacourciere K.A., Stivers J.T., Marino J.P., Biochemistry, 39, 5630-5641 (2000).
7. Brice P.C. et al., Nucleic Acid Res. 27, 2080-2085 (1999).

ВЫСОКОЧАСТОТНЫЙ КАНТИЛЕВЕРНЫЙ РЕЗОНАТОР

Е.А. Илин, Э. Остершультце

Технический университет города Кайзерслаутерн, Германия, Nano+Bio Center

Микрорезонаторы широко используются в различных областях таких, как детектирование массы [1 – 3], газа, измерения вязкости. Кремниевый кантилевер – самый известный пример микрорезонатора.

Основная резонансная частота колебаний и добротность Q стандартных кантилеверов лежит в пределах 10 – 500 кГц и 100 – 200 соответственно.

Повышение резонансной частоты и добротности часто влечет за собой улучшение чувствительности в случае перечисленных выше измерений.

Обычно, для достижения высокой (~МГц) резонансной частоты необходимо миниатюризация размеров микрорезонатора [4, 5]. Этот процесс ограничен технологическими производственными возможностями.

Наша группа рассматривает возможность изготовления высокочастотных резонаторов на базе недорогих стандартных кантилеверов. Идея заключается в модификации готового кантилевера, приводящего к образованию двух связанных резонаторов: одного – низкочастотного, другого – высокочастотного.

Первые прототипы были реализованы на основе кантилеверов NanoSensors TAP 300. Модификация заключается в прорезании отверстия между балкой кантилевера и его иглой (см. рис. 1), образуя тем самым новый резонатор – иглу. В данном случае кантилевер выступает в роли держателя для резонансной иглы.

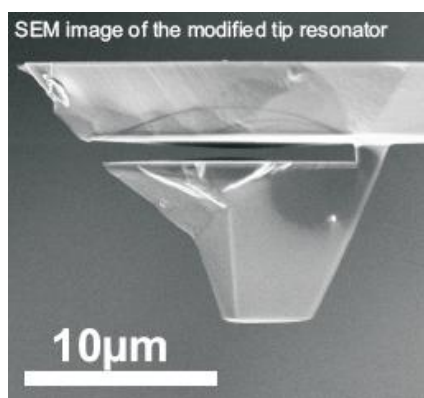


Рис. 1. Изображение модифицированной иглы микрорезонатора в сканирующем электронном микроскопе.

Резонансная частота иглы в диапазоне 2–3 МГц и добротность 900–1000 при нормальных условиях была получена таким образом. Спектры не модифицированного и модифицированного кантилевера с резонансной частотой 2,012 МГц приведены на рис. 2. Для верификации колебаний иглы использовался гетеродинный интерферометр. С его помощью была измерена амплитуда колебаний иглы и балки на поверхности кантилевера.

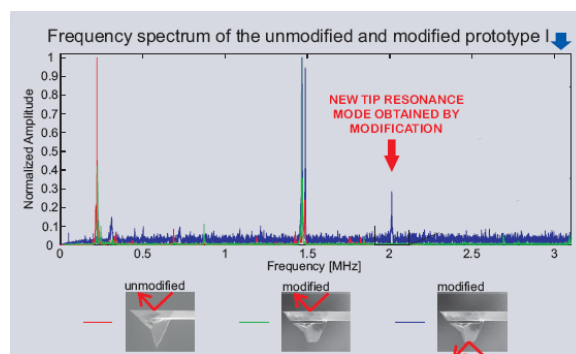


Рис. 2. Резонансный спектр не модифицированного кантилевера (красная линия); спектр балки модифицированного кантилевера (зеленая линия); спектр иглы модифицированного кантилевера (синяя линия).

В данной работе был получен опытный образец микрокантилеверного резонатора высокой частоты и добротности, что позволит значительно увеличить чувствительность измерений.

1. Craighead H.G., *Nanoelectromechanical Systems*, Science, 1532, 290 (2000).
2. Ekinici K.L., Roukes M.L., *Rev. Sci. Instrum.*, 76, 061101 (2005).
3. Kehrbrusch J., Ilin E.A., Hullin M., Oesterschulze E., *Appl. Phys. Lett.*, 93, 023102 (2008).
4. Sarid D., *Scanning Force Microscopy*, Oxford University Press (1994).
5. Sader J.E., *J. Appl. Phys.*, 84, 64 (1998).

ИСКУССТВЕННЫЕ ВИРУСОПОДОБНЫЕ ЧАСТИЦЫ, ПОЛУЧЕННЫЕ НА ОСНОВЕ ФИТОВИРУСОВ

О.В. Карпова

Биологический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова, кафедра вирусологии
okar@genebee.msu.su

Вирусы, в том числе и вирусы растений, являются нанобиочастицами, которые построены из нуклеиновой кислоты (ДНК или РНК) и одного или нескольких видов многократно повторяющихся белковых молекул, формирующих оболочку вируса (капсиды). Механизмы самосборки вирионов могут стать новым принципиальным подходом для конструирования искусственных вирусоподобных частиц (ВПЧ) с полезными свойствами и размерами от нескольких десятков до нескольких сотен нанометров. Сборка белка оболочки (БО) вируса в вирусоподобную частицу может происходить как в присутствии нуклеиновой кислоты, так и без нее, при этом образуются «пустые» белковые капсиды. Можно использовать как внешнюю поверхность капсидов с целью ее модификации нужными соединениями, так и внутреннюю – с целью упаковки в капсиды различных материалов. При этом следует особо отметить, что капсиды вирионов фитовирусов можно подвергать как генетическим, так и химическим изменениям.

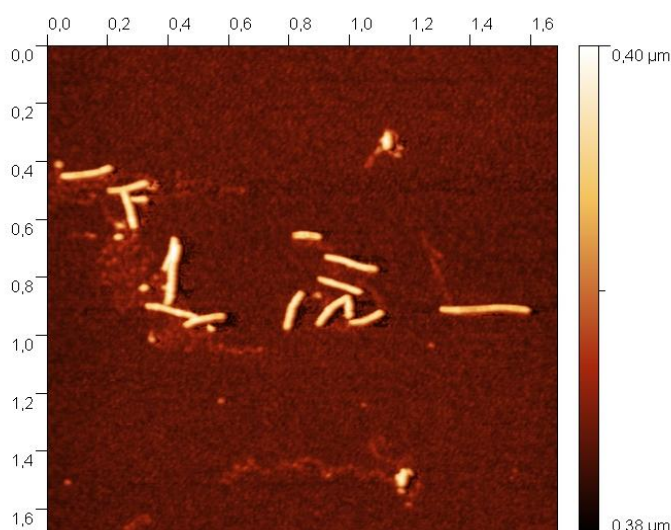


Рис. 1. Искусственные вирусоподобные частицы, полученные из БО X-вируса картофеля (ХВК) и РНК вируса табачной мозаики (ВТМ).

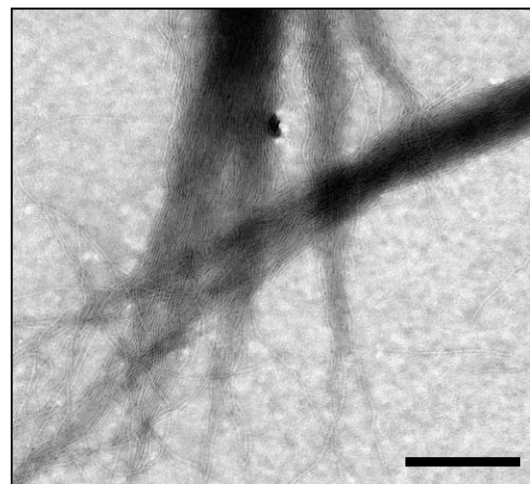


Рис. 2. Искусственные вирусоподобные частицы, полученные из БО вируса мозаики альтернантеры (ВМАльт) в отсутствие РНК. Электронная микроскопия.

Искусственные ВПЧ могут быть использованы для получения наноконтейнеров, магнитных наночастиц, в качестве платформы для презентации эпитопов патогенов с целью получения нового типа вакцин и диагностических антител и т.п. Возможность разборки и реконструкции искусственных вирусоподобных частиц под воздействием различных факторов позволит использовать их для доставки функциональных молекул в клетки-мишени. Биобезопасность применения фитовирусов обусловлена отсутствием общих патогенов у растений и человека. Кроме того, фитовирусы и их компоненты можно получать в достаточных количествах без особых затрат.

На основе фитовирусов сконструированы искусственные ВПЧ, содержащие гетерологичный генетический материал. Показана возможность контролируемой разборки ВПЧ на составляющие части под действием вирусного транспортного белка. Получены ВПЧ, состоящие только из БО фитовируса. Изучены структура и свойства полученных искусственных ВПЧ.

НАНОСТРУКТУРЫ НА ОСНОВЕ ДНК: ГЕННЫЕ ВЕКТОРЫ И НАНОПРОВОЛОКИ

Н.А. Касьяненко

*Физический факультет Санкт-Петербургского государственного университета
nkasyanenko@mail.ru*

Молекула ДНК в настоящее время является признанным объектом для создания наноструктур, находящихся применение не только в медицине и фармакологии, но и в нанoeлектронике. Основную роль при построении таких систем играет принцип комплементарности азотистых оснований, обеспечивающий самосборку двух- и трехмерных наноконструкций. Особенности строения и зарядовые свойства ДНК обеспечивают также возможность формирования различных самоорганизующихся структур в водных растворах путем изменения свойств растворителя. Конформационные переходы, индуцированные изменением электростатических взаимодействий в растворах ДНК, лежат в основе многих процессов, используемых при создании наноструктур (наномоторов, нанопереключателей и др.). В частности, при создании генных векторов с участием синтетических поликатионов используется способность интерполиэлектролитных комплексов при определенных условиях обратимо переходить в компактное состояние без изменения вторичной структуры ДНК. При создании нанопроволок на основе ДНК используют способность макромолекулы образовывать комплексы с ионами металлов в растворе. Для эффективного использования полимеров в новых технологиях необходимо изучить молекулярный механизм взаимодействия компонентов. В связи с этим наряду с микроскопией, развитие которой и послужило во многом толчком к появлению новых технологий, важную роль играет использование традиционных методов исследования макромолекул.

В докладе рассмотрены условия формирования и результаты исследования наноструктур (генных векторов, самоорганизующихся структур, нанопроволок) на основе ДНК. Проводится сопоставление изображений, полученных с помощью атомно-силового микроскопа NanoScope 4a, с данными, полученными другими методами.

Кроме поверхности свежесколотой слюды, традиционно используемой для фиксации ДНК из раствора, возможно применение специально подготовленной поверхности кремния. Это открывает новые перспективы для использования ДНК в нанoeлектронике. Рассмотрены результаты фиксации ДНК и других полиионов на поверхности монокристаллов кремния n- и p-типа, а также металлизация ДНК, приводящая к появлению кластеров серебра на макромолекуле.

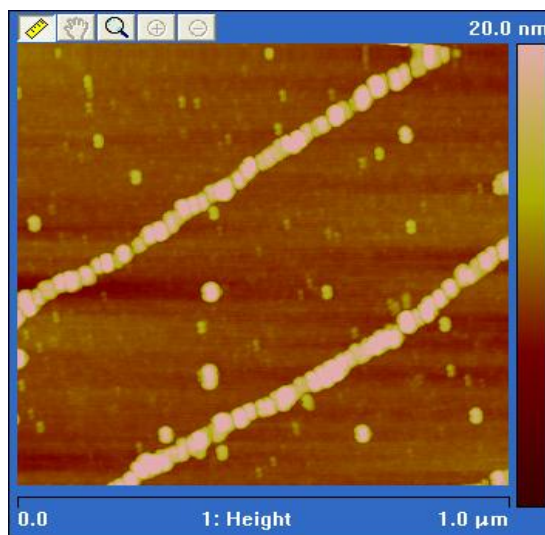


Рис. 1. Нити ДНК на поверхности кремния, покрытые кластерами Ag^0 (металлизация ДНК и АСМ-изображение выполнены студенткой 5 курса физического факультета СПбГУ Пучковой А.О.).

ИЗУЧЕНИЕ КОМПЛЕКСОВ ДНК С БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫМИ СОЕДИНЕНИЯМИ МЕТОДОМ АТОМНО-СИЛОВОЙ МИКРОСКОПИИ

Н.А. Касьяненко

*Физический факультет Санкт-Петербургского государственного университета
nkasyanenko@mail.ru*

Метод атомно-силовой микроскопии широко применяется для анализа конформационных изменений молекулы ДНК при образовании комплексов с различными биологически активными соединениями. При этом возникает вопрос о правомерности использования АСМ-изображений для выводов о конформации макромолекул в растворах, из которых производится фиксация. Кроме того, при исследовании таких систем в ряде случаев образуются сложные надмолекулярные структуры, исследование которых традиционными методами, предполагающими проведение концентрационных исследований, не вполне корректно. Атомно-силовая микроскопия при этом является одним из наиболее подходящих способов рассмотрения таких систем.

В докладе проводится сопоставление экспериментальных данных, полученных методами низкоградиентной вискозиметрии, динамического светорассеяния, двойного лучепреломления в потоке, кругового дихроизма, электрофореза, спектрофотометрии с результатами, полученными при использовании атомно-силового микроскопа NanoScope 4a (Veeco).

Анализ комплексообразования ДНК с ионами металлов, координационными соединениями платины, палладия, кобальта и рутения, синтетическими поликатионами и другими биологически активными соединениями показал, что в целом использование метода атомно-силовой микроскопии для анализа размеров и формы ДНК в таких системах вполне обосновано.

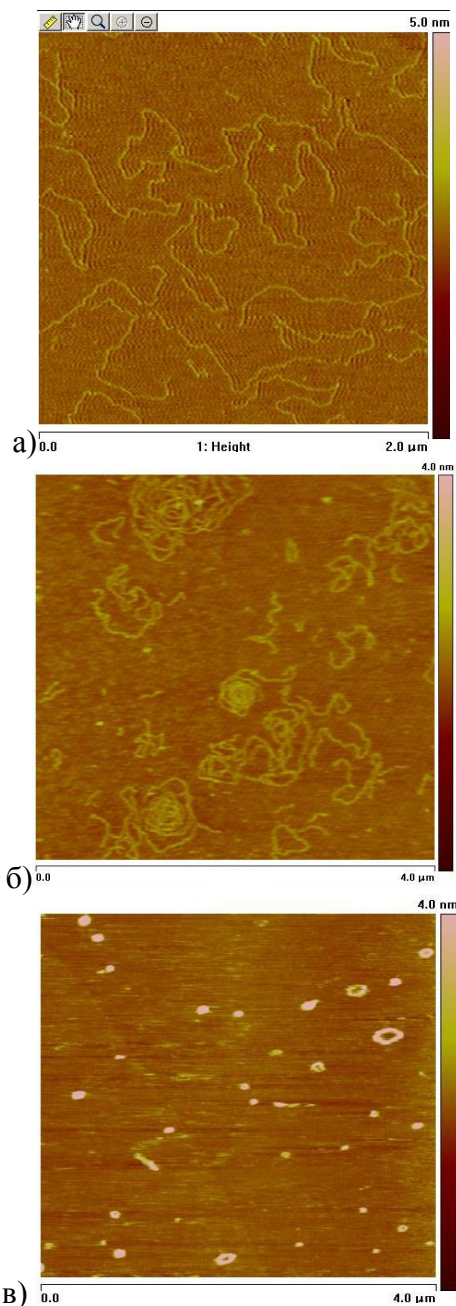


Рис. 1. АСМ-изображения ДНК, нанесенной на подложку из раствора в 0,005 М NaCl, при добавлении 5×10^{-4} моль/л $MgCl_2$ (а) и при добавлении $LaCl_3$, $C(La) = 2 \cdot 10^{-6}$ (б) и $4 \cdot 10^{-6}$ моль/л (в), $C(ДНК) = 10^{-4} \%$.

PROTEIN INTERACTION ANALYSIS WITH A PZT THIN-FILM MICROCANTILEVER AND A QUARTZ CRYSTAL MICROBALANCE

Chul Hoon Lee^{1,2}, Sang Kyung Kim¹, Tae Song Kim¹

¹*Korea Institute of Science and Technology,*

²*Korea University*

tskim@microsystem.re.kr

PZT thin-film microcantilever achieved a miniaturization through the integration of the circuit and both optical and electrical measurements. Although their Q-factor is small, the sensitivity was better than the other bulk sensors due to their micro-sized resonant part. In addition, the variation to environmental temperature is relatively minor compared to quartz crystal microbalances (QCM). It helps to analyze subtle deviation of sensor surface from minutes of protein binding.

However, in dynamic mode, the resonance behavior analysis of microcantilever has a lot of the room of debate. The interpretation about the non-linear modulus induced by the viscoelasticity change of the immobilized layer wasn't proved clearly.

The QCM-D technology is known to provide information on both frequency and dissipation change of the immobilized layer which can be used to assess conformational changes which the molecules may undergo as well as the quantitation of the bound protein. Therefore we compared the protein interaction analysis of microcantilever with QCM's.

In this paper, the resonance behavior analysis for monitoring of the interactions between thrombin and aptamer was established as well as the optimal conditions of effective immobilization.

In MiCan resonator, the electrical measurement apparatus, as the concentration of the thrombin is increased, the tendency that the resonance frequency change is increased but a difficulty is in a quantitation. The resonance frequency reduced about 5, 50, 60Hz in the thrombin concentration of 2, 5, 10 $\mu\text{g/ml}$ respectively. At this time, the concentration curve is saturated and the non-linearities characteristic was shown.

In quartz crystal microbalance (QCM), as the concentration of the thrombin is increased, the resonance frequency change is increased quantitatively. The resonance frequency reduced about 2.5, 4.5, 7.5 Hz in the thrombin concentration of 2, 5, 10 $\mu\text{g/ml}$ respectively.

These studies will present the appropriate application area of the cantilever and quartz crystal microbalance (QCM) according to the characteristic of the target protein.

Keywords: Piezoelectric sensor, Microcantilever, QCM, Protein-interaction, Thrombin, Aptamer

ИЗУЧЕНИЕ ФИЗИЧЕСКОЙ СОРБЦИИ РИБОНУКЛЕАЗ МЕТОДОМ АТОМНО-СИЛОВОЙ МИКРОСКОПИИ

О.А. Коновалова, Ф.В. Ширшиков, Н.В. Калачева
Казанский государственный университет им. Ульянова-Ленина
E-mail: olga.konovalova@bk.ru

Значительную роль в проявлении биологической активности РНКаз играют электростатические силы, за счет которых происходит связывание этих ферментов с отрицательно заряженными участками плазматической мембраны и нуклеиновых кислот [1, 2, 3]. В связи с этим, изучение РНКаз с точки зрения их физико-химических свойств, влияющих на адсорбцию и дальнейшее взаимодействие их с поверхностью клетки и внутриклеточными структурами, представляется весьма перспективным.

Цель настоящей работы заключалась в сравнении физической адсорбции панкреатической РНКазы А и РНКазы *Bacillus intermedius* на отрицательно заряженной поверхности слюды с помощью метода АСМ. Процесс моделировал адсорбцию РНКаз на плазматической мембране клетки в физиологических условиях.

Визуализацию процесса адсорбции РНКазы А и РНКазы *Bacillus intermedius* на слюде проводили на воздухе при комнатной температуре в полуконтактном режиме на АСМ Solver P47H (ЗАО «НТ-МДТ») кремниевыми кантилеверами NSG10S (ЗАО «НТ-МДТ»), используя 3 методики сканирования: постоянной амплитуды, фазового контраста и сигнала рассогласования.

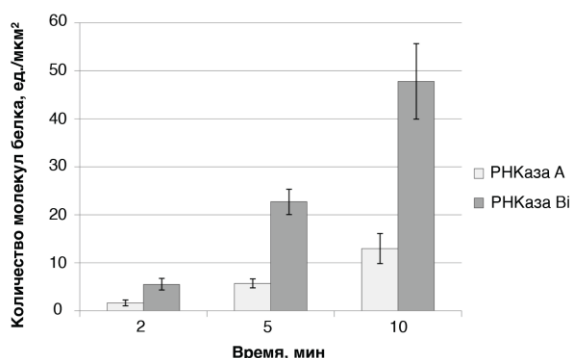


Рис. 1. Количество молекул РНКаз, адсорбированных на слюде, в зависимости от времени. Концентрация белка 50 мкг/мл.

Анализ АСМ-изображений слюды с адсорбированными на ней РНКазами показал, что с увеличением времени взаимодействия количество адсорбированного белка на единицу площади поверхности слюды возраста-

ло для обоих ферментов. При этом РНКазы *Bacillus intermedius* адсорбировалась в 3-4 раза эффективнее, чем панкреатическая РНКазы А (рис. 1). Адсорбция РНКазы *Bacillus intermedius* на слюде сопровождалась образованием димерных и олигомерных форм молекул. Полученные АСМ-изображения представлены на рис. 2.

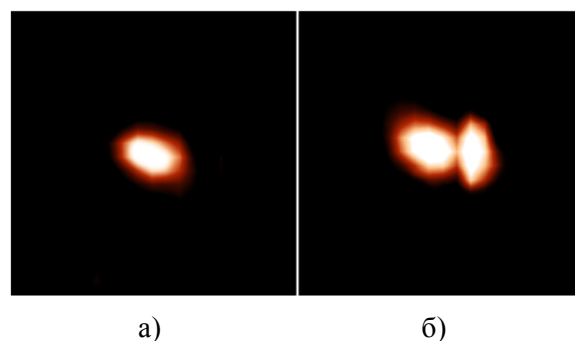


Рис. 2. АСМ-изображения мономерной (а) и димерной формы (б) молекул РНКазы *Bacillus intermedius*, адсорбированных на слюде. Время взаимодействия со слюдой 2 минуты. Размер кадров $0,2 \times 0,2$ мкм².

Рассчитаны суммарный заряд и дипольный момент для панкреатической РНКазы А и РНКазы *Bacillus intermedius* при физиологическом значении рН. Суммарные заряды панкреатической РНКазы А и РНКазы *Bacillus intermedius* существенно не отличаются. Значение дипольного момента молекулы РНКазы *Bacillus intermedius* значительно ниже, чем у панкреатической РНКазы А, что свидетельствует о более равномерном распределении заряда на поверхности РНКазы *Bacillus intermedius*. Обсуждается зависимость физической сорбции рибонуклеаз от дипольного момента, суммарного заряда и распределения его на поверхности белковой глобулы.

Список литературы:

1. Калачева Н.В., Нарулина А.В., Куриненко Б.М., Цитология, 49, 296-300 (2007).
2. Ильинская О.Н., Макаров А.А., Молекулярная биология, 39, 1-11 (2005).
3. Gotte G. The Journal of Biological Chemistry, 279, 36670-36679 (2004).

МЕТОДИКА МОДИФИКАЦИИ ПОДЛОЖКИ АНТИТЕЛАМИ ДЛЯ ПОВЫШЕНИЯ СПЕЦИФИЧНОСТИ К БАКТЕРИАЛЬНЫМ ФРАГМЕНТАМ ДЛЯ ДАЛЬНЕЙШЕГО АТОМНО-СИЛОВОГО СКАНИРОВАНИЯ

С.В. Краевский¹, Е.В. Дубровин², С.Г. Игнатов³, Т.Е. Игнатюк²,
Г.Н. Федюкина³, И.В. Яминский²

¹ Институт теоретической экспериментальной физики им. А.И. Алиханова

² Физический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова

³ ГНЦ Прикладной Микробиологии и Биотехнологии

skraevsky@mail.ru

Специфичная избирательность антител является основой большинства современных методов детектирования патогенных бактерий. Общемировая тенденция к миниатюризации биосенсоров [1], а также дороговизна моноклональных антител предъявляет новые требования к методам детектирования патогенов.

В данной работе представлена методика приготовления аффинной поверхности на основе антител, которая вкупе с АСМ может быть положена в основу методики детектирования не только цельных бактерий, но и их фрагментов, что крайне важно при работе с высоко патогенными клетками.

Подложка готовилась следующим образом. Активированная в тлеющем разряде свежесколотая слюда погружалась в раствор белка G. Он закреплялся на поверхности полярными группами, таким образом, что гидрофобный конец оставался свободным и смотрел наружу. Далее подложку погружали в раствор антител, что приводило к гидрофобному связыванию свободного конца белка G и тяжелой цепи антител. Легкие цепи же оставались свободными и активными.

Концентрации белка G и антител подбирались исходя из «царапающих» экспериментов. Было определено, что при концентрациях 0,3 мг/мл и 0,2 мг/мл для белка G и антител соответственно они образуют монослой толщиной около 5 нм.

Полученные таким способом аффинные поверхности обладают большой специфичностью по отношению к своим антигенам. На рис. 1. представлены АСМ-изображения поверхности, приготовленной по описанной выше методике с антителами к *Escherichia coli*, после погружения в суспензию фрагментов клеток *Bacillus subtilis* (а) и в суспензию фрагментов клеток *Escherichia coli* (б). Можно наблюдать существенную разницу в ад-

сорбции «родных» фрагментов по отношению к контрольному эксперименту.

Таким образом, предложенная методика модификации подложек сохраняет активность антител и может быть положена в основу создания биосенсоров.

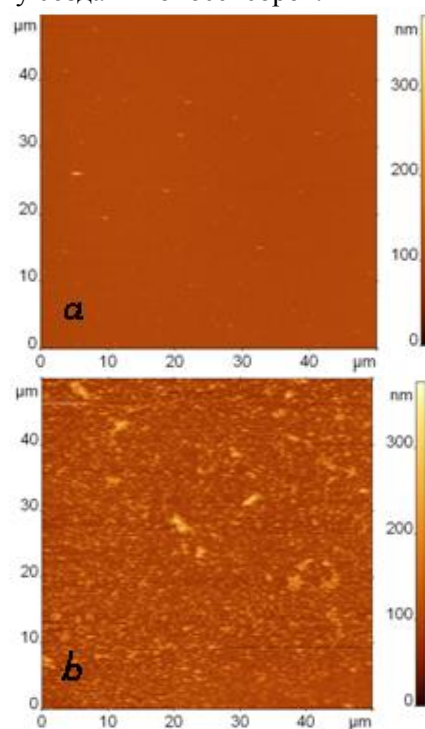


Рис. 1. АСМ-изображения поверхностей, модифицированных белком G и антителами к *Escherichia coli*, экспонированных в суспензию, содержащую фрагменты клеток *Bacillus subtilis* с концентрацией по целым клеткам 10^8 клеток/мл (а), суспензию, содержащую разрушенные фрагменты клеток *Escherichia coli* концентрацией (по целым клеткам) 10^8 клеток/мл (б).

Список литературы:

1. Sara Rodriguez-Mozaz, Maria J. Lopez de Alda, Damia Barcelo, Analytical and Bioanalytical Chemistry, 386, 4, 1025-1041 (2006).

АТОМНО-СИЛОВАЯ МИКРОСКОПИЯ ХРОМОСОМ ТИПА ЛАМПОВЫХ ЩЕТОК: ТОПОГРАФИЯ ПОВЕРХНОСТИ РНП-МАТРИКСА ТРАНСКРИПЦИОННЫХ ЕДИНИЦ

А.В. Красикова, К.А. Бенкен

*Санкт-Петербургский государственный университет
spbchromas@gmail.com*

Детальное понимание закономерностей функционирования эукариотического генома требует точных знаний о пространственной организации транскрипционно активного и неактивного хроматина в клеточном ядре. Благодаря гигантским размерам и выраженной хромомерно-петлевой морфологии хромосомы типа ламповых щеток (ЛЩ), обнаруживаемые в растущих ооцитах большинства животных, представляют собой удобную модель для анализа структуры и функции мейотических бивалентов, изучения принципов пространственной организации хроматина, а также процессов синтеза и созревания РНК.

Большинство исследований хромосом-ЛЩ проведено с использованием методов световой микроскопии. Часть работ выполнена с применением методов трансмиссионной электронной микроскопии ультратонких срезов или диспергированных по методу Миллера хромосом и сканирующей электронной микроскопии хромосом с предварительным контрастированием тяжелыми металлами. В настоящей работе топография поверхности хромосом типа ЛЩ была впервые проанализирована с помощью атомно-силового микроскопа, что позволило, с одной стороны, визуализировать генетический материал ооцита с очень высоким разрешением и, с другой стороны, свести к минимуму артефакты, вызванные предварительными обработками внутриядерных структур.

Препараты микрохирургически изолированных из ооцитов курицы хромосом типа ламповых щеток готовили по стандартным протоколам. Сканирование проводили на микроскопе NTEGRA Aura (фирмы NT-MDT) в полуконтактном режиме на воздухе с использованием кремниевых зондов NSG01 и NSG10.

По сравнению с метафазными хромосомами, с помощью атомно-силовой микроскопии (АСМ) в хромосомах-ЛЩ можно легко распознать более плотные хромомеры, простые и сложные латеральные петли и их РНП-матрикс, а также ассоциированные с

осью хромосом структуры, не содержащие нити хроматина.

В ЛЩ видна разница между строением хроматина в хромомерах и структурой РНП-матрикса латеральных петель хромосом. По данным АСМ, основная структурная единица РНП-матрикса – это гранула размером в диапазоне от 30 нм до 100 нм, представляющая собой, по всей видимости, РНП-частицу. Эти гранулы формируют линейные комплексы, которые удлиняются по мере удаления от начала транскрипционной единицы, и соответствуют, по-видимому, перихроматиновым РНП-фибриллам.

С помощью АСМ визуализирована пространственная организация синтезируемых транскриптов, ассоциированных с матрицей ДНК, которые «окутывают» оси латеральных петель хромосом. Детальный анализ РНП-матрикса латеральных петель с помощью АСМ выявил в некоторых транскрипционных единицах кольцевые структурные элементы размером около 250 нм, состоящие из комплексов РНП-частиц.

В результате проведенного анализа хромосом-ЛЩ с высоким разрешением охарактеризован рельеф поверхности транскрипционной единицы и скопления фибриллярных структур на самом конце открытой петли в терминальных районах хромосом. Результаты сканирования поверхности хромосом-ЛЩ позволили обнаружить существенные отличия трёхмерной структуры РНП-матрикса простых латеральных петель и так называемых «глыбчатых петель», характерных для ряда хромосом. Эти отличия могут быть обусловлены необычной природой «глыбчатых петель», которые формируются в результате транскрипции сателлитной ДНК и содержат транскрипты некодирующих белки tandemно повторяющихся последовательностей.

Таким образом, применение бионаноскопических методов анализа топографии ЛЩ позволяет заполнить некоторые пробелы в сведениях об организации транскрипционно-активных хромосом, полученных с помощью методов световой и электронной микроскопии.

ЗАРЯДОВЫЙ СЕНСОР НА ОСНОВЕ КРЕМНИЕВОГО НАНОПРОВОДА

В.А. Крупенин¹, Д.Е. Преснов², С.В. Амионов¹, Ю.С. Ушакова³

1- Физический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова, лаборатория криоэлектроники
2- Научно-Исследовательский Институт Ядерной Физики МГУ им. М.В. Ломоносова
3- Химический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова, кафедра химической энзимологии
vladimir.krupenin@phys.msu.ru

Развитие методов производства наноразмерных структур и объектов за последние годы позволяет изготавливать и исследовать широкий спектр оригинальных устройств сверхмалых размеров. Один из таких ярких примеров — полевой транзистор на основе кремниевого нанопровода. Он может быть использован как для физических измерений в составе электронных схем, так и для построения сенсоров в биологии и медицине [1-4]. Чувствительность транзистора достигает такого уровня, что становится возможным определение отдельных вирусов или молекул [2].

Для изготовления структур использовался кремний на изоляторе (КНИ), обладающий следующими характеристиками: толщина верхнего (рабочего) слоя кремния — 100 нм, изолирующий диэлектрик — SiO_2 толщиной 200 нм. Толщина поддерживающей кремниевой пластины составляла 700 мкм. Оба слоя кремния были допированы бором (п-тип), удельное сопротивление составляло величину 7-12 Ом·см. Структуры изготавливались с использованием процессов электронной литографии и реактивно-ионного травления верхнего слоя кремния через металлическую маску (рис. 1).

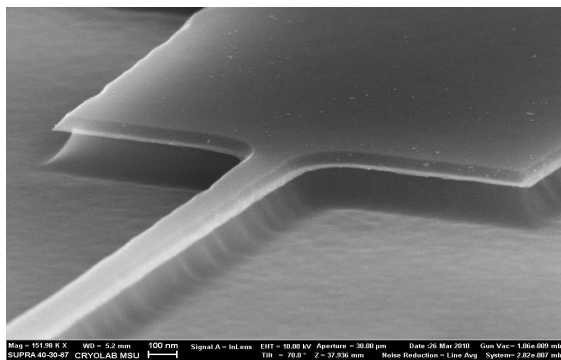


Рис. 1. Микрофотография структуры нанопровода.

Для формирования контактных площадок и покрывающего их изоляционного слоя для проведения измерений в жидкости применялась как оптическая, так и электронная литография с совмещением. В качестве материала

использовался тонкий (30 нм) слой титана (рис. 2).

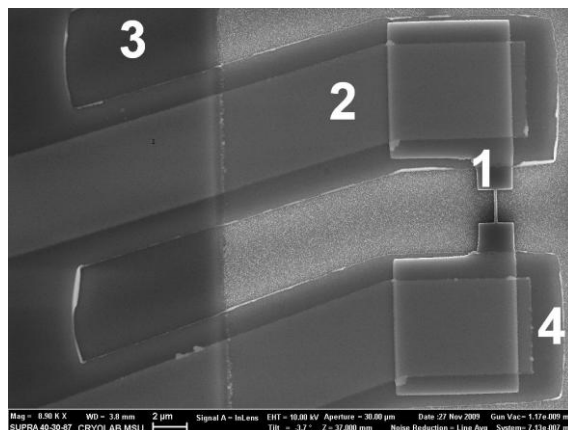


Рис. 2. Микрофотография готовой структуры. 1 - нанопровод и контактные площадки; 2 - металлические подводящие провода; 3,4 - слои изолирующего диэлектрика для измерений в жидкостной среде.

Измерения характеристик транзистора происходили в режиме задания напряжения между стоком и истоком транзистора и измерении тока через нанопровод при различных напряжениях на подложке-затворе транзистора. Измерения в жидкости продемонстрировали чувствительность сенсора к изменению pH буферных растворов в диапазоне 5-8.

Работа поддержана грантом РФФИ 09-02-12238 офи-м.

Список литературы:

1. Cui Y., Wei O., Park H., Lieber C.M., Science, 293, 1289 (2001).
2. Patolsky F., Zheng G., Hayden O., Lakadamyali M., Zhuang X., Lieber C.M., PNAS, 101, 14017 (2004).
3. Curreli M., Zhang R., Ishikawa F.N., Chang H.-K., Cote R.J., Zhou C., Thompson M.E., IEEE Trans. Nanotechnol., 7, 651 (2008).
4. Stern E., Steenblock E.R., Reed M.A., Fahmy T.M., Nano Letters, 8, 3310 (2008).

НАНОАНАЛИТИЧЕСКИЕ И БИОСЕНСОРНЫЕ ПЛАТФОРМЫ ДЛЯ ПРОВЕДЕНИЯ ИММУНОАНАЛИЗА И ОПРЕДЕЛЕНИЯ АКТИВНОСТИ ФЕРМЕНТОВ

И.Н. Курочкин

*Химический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова
ikur@genebee.msu.su*

Исследованы возможности применения электрохимических биосенсорных систем на основе нанопленок полиэлектролитов и ферментов для целей экологического мониторинга ингибиторов холинэстераз и высокопроизводительного анализа эстераз крови. Проведено изучение характера влияния химического состава и структурной организации используемых полиэлектролитов, а также физико-химических условий формирования полимерных и белковых пленок на аналитические и эксплуатационные характеристики получаемых амперометрических биосенсоров.

Использование технологии послойного нанесения полиэлектролитов позволяет объединить в одной структуре на поверхности электрохимической сенсорной матрицы полимерные молекулы, ферменты, наночастицы медиатора, углеродные и белковые нанотрубки. Таким образом, открываются возможности по созданию портативных высокоточных мультимодальных систем диагностики *in vitro*.

Рассмотрены примеры использования разработанных биосенсорных систем для контроля токсичности воды на водозаборных станциях Санкт-Петербурга.

Спектроскопия комбинационного рассеяния (Raman spectroscopy) как химико-аналитический метод обладает рядом несомненных преимуществ. Первое, этот метод неdestructивный. Второе, спектры комбинационного рассеяния отражают колебательные движения атомов, с высокой специфичностью характеризующие анализируемые химические соединения. Третье, возможность проведения одновременного анализа большого количества различных соединений.

Главным ограничением широкого использования спектроскопии комбинационного рассеяния для аналитических целей является его низкая чувствительность. В 1974 году в работе Мартина Флейшмана и соавторов было показано, что эффективность получения спектров комбинационного рассеяния может быть повышена в миллионы раз и более при адсорбции анализируемого соединения на

поверхности наночастиц металлов. Это явление получило название Surface-enhanced Raman Scattering (SERS).

Проведен анализ литературных данных по использованию метода SERS для определения активности и стереоселективности липаз, эстераз и протеаз. Показано, что для предложенного формата анализа достаточно 500 молекул фермента. Описан метод определения ультранизких концентраций щелочной фосфатазы (ALP) на уровне фемтомолярных концентраций. Предел обнаружения ALP, достигнутый при использовании метода SERS, фактически на порядок ниже пределов обнаружения, достигаемых с использованием электрохимических и биосенсорных методов.

Таким образом, на сегодняшний день SERS как аналитическая платформа демонстрирует наименьшие значения пределов обнаружения ферментов, их субстратов и продуктов. Можно заключить, что развитие метода SERS в целях определения активности ферментов является одним из самых перспективных направлений в области создания современных средств молекулярной диагностики и функциональной протеомики.

Проведен анализ возможностей использования наноаналитической платформы на основе методов сканирующей зондовой микроскопии для проведения многопараметрического анализа с использованием антител. Эффективность разработанной наноаналитической платформы продемонстрирована на примерах определения риккетсий, бактериальных и вирусных возбудителей особо опасных инфекционных заболеваний, а также крупных белковых антигенов.

КАЛИБРОВКА АТОМНО-СИЛОВЫХ И ЭЛЕКТРОННЫХ МИКРОСКОПОВ ВО ВСЕМ НАНОМЕТРОВОМ ДИАПАЗОНЕ С СУБНАНОМЕТРОВОЙ ПОГРЕШНОСТЬЮ

Ц.Н. Лускинович, В.Г. Лысенко, Ю.Л. Николаев
ЗАО «Техносистема Н»

Всероссийский научно-исследовательский институт метрологической службы
Московский государственный университет приборостроения и информатики
nanofactory@mail.ru

Динамические меры предназначены для калибровки сканирующих зондовых и электронных микроскопов, нанотехнологических установок, сенсоров механических перемещений.

Динамическая мера обеспечивает линейное перемещение поверхности, управляемое электрическим напряжением, относительно основания. Пьезоматериалы с обратным пьезоэффектом, применяемые в динамических мерах, характеризуются почти полным отсутствием гистерезиса и крипа.

Выпускаются 2 типа динамических мер, обеспечивающих вертикальное или горизонтальное перемещение соответственно (рис. 1-3). В отличие от традиционных статических мер длины точность калибровки динамическими не зависит от технологически погрешностей процесса обработки поверхности.



Рис. 1. Комплект динамических мер для вертикального и горизонтального перемещения с кабелями и разъемами в транспортном контейнере.

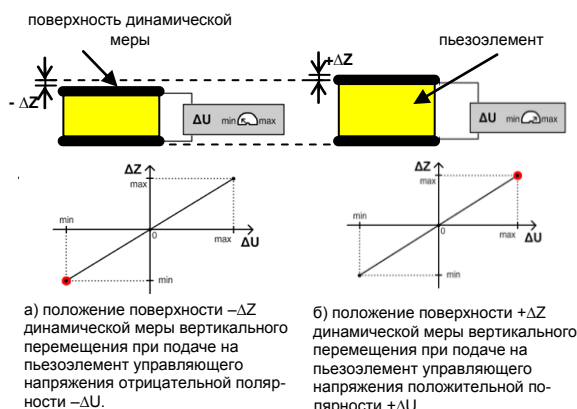
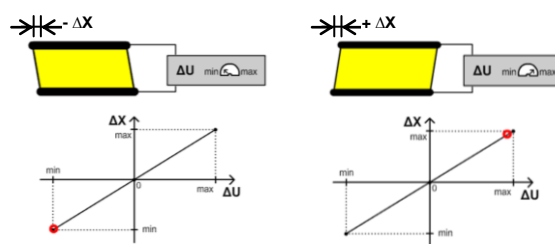


Рис. 2. Перемещение по вертикали.



а) положение поверхности $-\Delta X$ динамической меры горизонтального перемещения при подаче на пьезоэлемент управляющего напряжения отрицательной полярности $-\Delta U$.

б) положение поверхности $+\Delta X$ динамической меры горизонтального перемещения при подаче на пьезоэлемент управляющего напряжения положительной полярности $+\Delta U$.

Рис. 3. Перемещение по горизонтали.

Выпускаются также бескорпусные динамические меры, размеры и фотографии которых приведены на рисунках 4, 5.

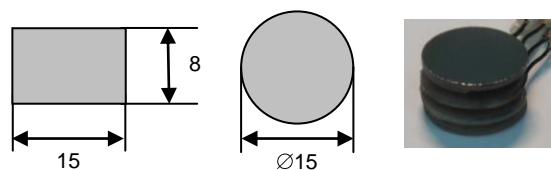


Рис. 4. Бескорпусная мера вертикального перемещения.

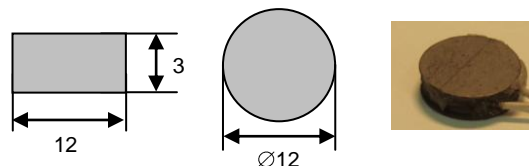


Рис. 5. Бескорпусная мера горизонтально-го перемещения.

Преимущества динамической меры:

- Работа практически в любых условиях, а не только в гермозонах и вакууме.
- Перемещение во всем нанометровом диапазоне 1-100 нм. Величина перемещения равна величине калибровки с погрешностью менее долей нанометра и прямо пропорциональна величине управляющего напряжения (рис. 6).
- Реальный срок службы динамической меры превышает десятки лет, т.к. величина перемещения поверхности не зависит от формы и состояния ее поверхности.
- Калибровка одной динамической мерой различных длин, вместо применения нескольких

статических мер, что повышает точность, обеспечивает экономию средств и сокращает время калибровки.

- Измерение времени реакции измерительной системы.

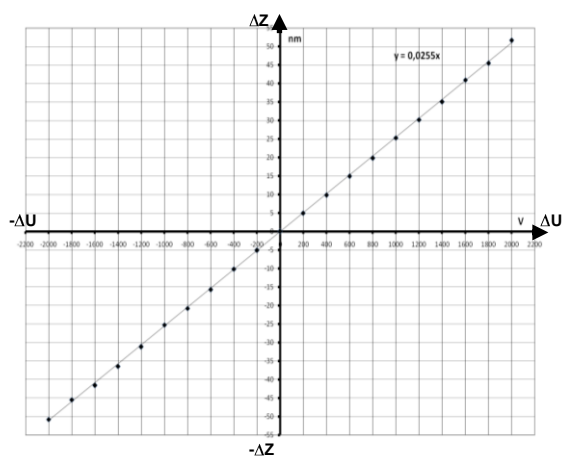


Рис. 6. Пример калибровочного графика зависимости величины амплитуды импульсов перемещения поверхности динамической меры вертикального перемещения от амплитуды импульсов управляющего напряжения в диапазоне от -2000 вольт до + 2000 вольт.

Измерение перемещений в нанометровом диапазоне с субнанометровой погрешностью производится оптическим интерферометром, фотография оптического блока которого приведена на рис. 7.



Рис. 7. Фотография оптического блока.

Компактность и высокая жесткость конструкции выпускаемых оптических интерферометров позволяет использовать их в условиях повышенных акустических и сейсмических воздействий. Выпускаемый многомодовый интерферометр характеризуется низким уровнем шумов до 0,1 - 0,3 нм, типичные значения которых приведены на рис. 8.

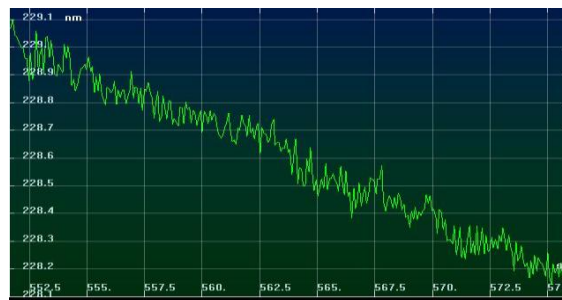


Рис. 8. График уровня шумов интерферометра.

Сочетание приборов:

- динамической меры, диапазон перемещения поверхности которой (производимого с субнанометровой погрешностью) перекрывает нанометровый диапазон;
- источника управляемого напряжения и системы сбора и обработки информации на его основе;
- оптического интерферометра нанометрового диапазона с субнанометровой погрешностью

открывает возможности использования их в качестве взаимопроверяющих приборов. Данные приборы могут использоваться автономно и встраиваться в другие установки.

Пример одного из сочетаний приборов комплекса «Нанотестер», предназначенного для измерений и калибровки в нанометровом диапазоне с субнанометровой погрешностью, приведен на рис. 9.



Рис. 9. Комплект приборов «Нанотестер» в составе динамической меры, источника управляемого напряжения, оптического интерферометра и компьютера.

Список литературы:

1. Тычинский В.П., Сверхразрешение и сингулярности в фазовых изображениях, УФН, 178:11, 1205–1214 (2008).
2. Tychinsky V.P., Kretushev A.V., Luskovich P.N. arXiv:physics/0608093.

AFM TO STUDY DYNAMICS OF DNA AND PROTEIN-DNA COMPLEXES

Yuri Lyubchenko

*Department of Pharmaceutical Sciences, University of Nebraska Medical Center
ylyubchenko@unmc.edu*

Summary: In this lecture, I will review recent research projects in the lab dealing with the study of dynamics of DNA and protein-DNA complexes and employing single molecule imaging techniques, primarily time-lapse AFM (see reviews [1-3] and references therein). The DNA dynamics projects will be illustrated by the study of dynamics and branch migration of DNA Holliday junctions. Our advances in the study of protein-DNA complexes will be illustrated by the work on imaging of dynamics and unwrapping of nucleosomes. The use of the high-speed AFM will be briefly discussed.

1. Dynamics of DNA Holliday Junctions: Structural Transitions and Branch Migration

Introduction:

Recombinational DNA or Holliday junctions (HJs) (also called four-way DNA junctions), are central intermediates for DNA recombination, double strand break repair and are formed transiently during the stalling of DNA replication. A zipper-type model for branch migration of Sigal and Alberts is very attractive, yet no direct experimental data proving this model have been obtained. Moreover, recent kinetic studies of HJ branch migration do not support this model. Despite tremendous effort to unravel the structure and dynamics of this critical DNA intermediate, our knowledge about the molecular mechanisms of DNA strand transfer (branch migration) is quite limited. A great deal of information on the structure of Holliday junctions has been obtained from studies of synthetic (primarily immobile) four-way junctions. However, these data are not yet sufficient for understanding the molecular mechanism of branch migration.

Results and Conclusions:

We applied single molecule time-lapse AFM imaging to follow the nanoscale dynamics Holliday junction capable of branch migration (Fig. 1). These experiments showed that none of folded conformations of the junction including the Alberts-Sigal model with the parallel orientation of exchanging arms supports branch migration.

The combination of single molecule AFM and fluorescence methods enabled us to show directly and unambiguously that transition of the junction into unfolded opened square conformation is required for branch migration. Importantly, the branch migration process is not a smooth translocation of the junction. Rather, the junction undergoes structural transition between folded and unfolded conformation, so the branch migration phase occurs during the time period in which the

junction adopts unfolded HJ conformation. Single-molecule Fluorescence Resonance Energy

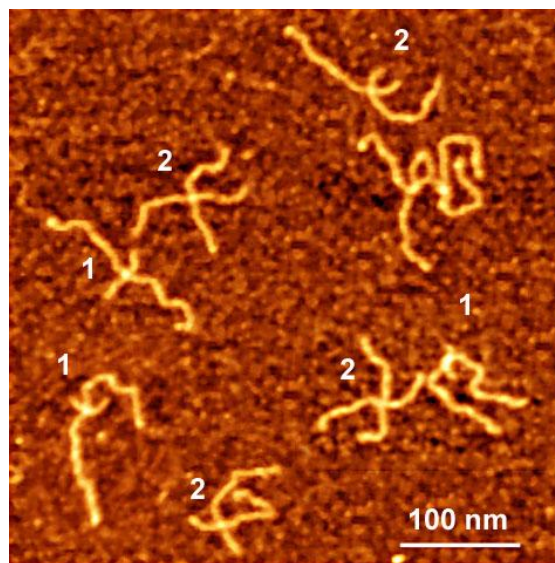


Fig. 1. AFM images of the Holliday junctions.

Transfer (smFRET) studies of a mobile HJ reveal a stepwise pattern for branch migration in which the fast steps of the process appear on time trajectories as hops between plateaus where the junction resides for relatively long times.

2. Dynamics of Nucleosomes Revealed by Time-Lapse Atomic Force Microscopy

In this project we applied atomic force microscopy (AFM) -- primarily time-lapse imaging -- to directly probe the dynamics of nucleosomes at the nanometer scale.

Introduction: A fundamental challenge of regulation of gene activity is the accessibility of DNA within nucleosomes because the DNA is tightly wrapped around the histone core. Studies performed over the past decade led to the discovery of a class of proteins that unwrap the DNA from the histone core to provide the access to the DNA regions inside the nucleosome. This led to the view in which nucleosomes themselves

are considered rather stable particles with limited dynamics.

Recent studies performed with the use of various techniques, including single molecule approaches, led to the realization that nucleosomes are quite dynamic rather than static systems. Direct data are needed to reconcile these conflicting views. Specifically, if the nucleosomes are dynamic, the following critical questions need to be answered. What is the range of the local dynamics of nucleosomes? Is a non-ATP dependent unwrapping of nucleosomes possible? What are the factors facilitating the large scale opening and unwrapping of nucleosomes?

Results:

The AFM images of nucleosomes (Fig. 2)

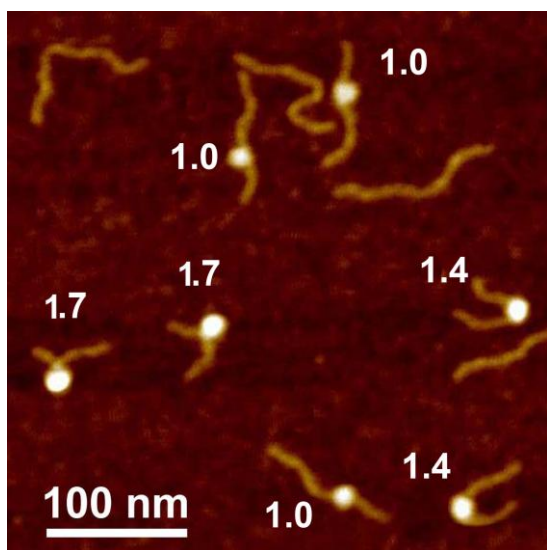


Fig. 2. AFM images of mononucleosomes.

illustrate high dynamics of this fundamental unit of chromatin. DNA on these images makes various turns around the histone core. For example, nucleosomes marked 1, 2 and 3 have 1.7, 1.4 and 1.0 turns of DNA wrapped around the core particle. Thus, high-resolution AFM imaging of nucleosomes in air revealed the structural heterogeneity of the particles and the researchers hypothesize that this heterogeneity reflects inherent dynamics of nucleosome.

To test this hypothesis and look directly at the dynamics of nucleosome in solution, we employed the AFM capability to perform imaging in aqueous solutions using time-lapse imaging of non-dried nucleosome samples. Using time-lapse AFM imaging, we were able--for the first time--to observe spontaneous, protein-free unwrapping of the nucleosomes. The unwrapping occurs from the ends of the nucleosomes, allowing for exposure of DNA regions as large as dozens base pairs and leading to a complete unfolding of nucleosomes. Figure 3 illustrates the unwrapping process. Here an initially fully-wrapped nucleosome (1) undergoes partial

unwrapping (2) followed by a complete unwrapping and dissociation of the histones from the DNA (3).

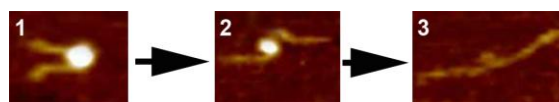


Fig. 3. Time lapse imaging of the nucleosome unwrapping.

Conclusions:

These studies highlighted the role of electrostatic interactions on the unwrapping process. The electrostatic interactions between positively charged histone octamer and negatively charged DNA are major contributors to the stability of the structure of nucleosomes. However, transiently unwrapped DNA segments can be trapped by electrostatic interactions with the positively charged surface outside the nucleosome. These trapped states increase the probability for the next unwrapping step shifting the equilibrium of the unwrapping/wrapping dynamics towards unwrapping that eventually may lead to full unwrapping of the nucleosome. The described scenario has been realized in the AFM experiments in which positively charged surface was created. Based on this data we hypothesize that interaction of chromatin with surfaces within the cell including the surfaces of remodeling proteins can contribute to the chromatin dynamics providing the accessibility to the DNA regions.

References:

1. Lyubchenko Y.L., Shlyakhtenko L.S., Potaman V.P., Sinden R.R. Global and Local DNA Structure and Dynamics. Single molecule studies with AFM, *Microsc. Microanal.*, 8, 170-171 (2002).
2. Lyubchenko Y.L. DNA structure and dynamics: an atomic force microscopy study, *Cell Biochem Biophys*, 41, 75-98 (2004).
3. Lyubchenko Y.L., Shlyakhtenko L.S., AFM for analysis of structure and dynamics of DNA and protein-DNA complexes, *Methods*, 47, 206-213 (2009).

This work was supported by grants from NIH (GM 062235, 1S10 RR023400), NSF (PHY 0615590 EPS-0701892) and NATO (Sfp-983204).

ТЕСТИРОВАНИЕ БИОАКТИВНОСТИ НАНОЧАСТИЦ МЕТОДОМ КОМПЬЮТЕРНОЙ ФАЗОВО-ИНТЕРФЕРЕНЦИОННОЙ МИКРОСКОПИИ В РЕАЛЬНОМ ВРЕМЕНИ

Д.В. Макарова, В.Б. Метелин, Э.Г. Щербакова, И.А. Василенко
ФГУ Российский Геронтологический научно-клинический центр Росздрава
ГОУ ДПО Российская Академия последипломного образования
svia@rambler.ru

Изменение дисперсности влияет на физико-химические свойства вещества: адгезивность, сорбционную активность, структурируемость, токсичность и т.п. Увеличение отношения площади поверхности к объему наночастиц приводит к их способности более интенсивно взаимодействовать с окружающей средой. Активное развитие нанотехнологий и их внедрение в практику, а также информация о потенциальных факторах риска, связанных с наноматериалами, определяют необходимость решения вопросов нанобиобезопасности.

Известно, что лизоцим (N-ацетилмурамил-гидролаза или мурамидаза) (ЛМ) является одним из важнейших защитных факторов живых организмов, обладающим широким спектром общебиологического действия. Реализация многочисленных функций лизоцима осуществляется благодаря взаимодействию лизоцима с макрофагами и лимфоцитами, индукции выработки ими высокоактивных клеточных медиаторов.

В настоящей работе мы попытались в условиях экспериментов *in vitro* оценить протективный эффект ЛМ при воздействии нанопорошков вольфрама на лимфоциты периферической крови человека с использованием оптико-геометрических показателей ядерных структур живых функционирующих клеток.

Объектом исследования служили Т-лимфоциты периферической крови здоровых добровольцев. В экспериментах использовали ЛМ в конечной концентрации 1 мкг/мл, 5 мкг/мл и 10 мкг/мл и промышленно выпускаемый порошок вольфрама с размером частиц 1,2 мкм (W) и 60 нм (нано-W₆₀), полученный плазменным методом, в конечной концентрации 5 мг/мл. Клетки инкубировали с каждым из препаратов при температуре 37°C в течение 60 минут. Для оценки протективного эффекта лимфоциты сначала обрабатывали ЛМ, а затем подвергали воздействию W и нано-W₆₀. Контролем служили интактные клетки. Исследование морфофункционального состояния ядер Т-лимфоцитов про-

водили с использованием отечественного компьютерного лазерного фазово-интерференционного микроскопа “Цитоскан” (МГИРЭА, Москва) [2]. Оценивали оптико-геометрические показатели каждой клетки и всей выборки в целом. Статистический анализ экспериментальных и клинических данных проводили с помощью алгоритмов среды MatLab и математического пакета Statistica 6.

Использование компьютерной фазово-интерференционной микроскопии (КФМ) позволяет регистрировать детальные изменения фазовых параметров лимфоцитов, непосредственно связанных с уровнем их функциональной активности (рис. 1) [1]. Известно, что ядерный хроматин способен к сложным структурным превращениям, изменяющим его физико-химические свойства. При этом такие параметры как рефрактерность, анизотропия отражают его структурную упорядоченность. Снижение значения коэффициента преломления может свидетельствовать о явлениях деспирализации хроматина, сопровождающихся ослаблением химических связей комплекса ДНК – гистон в ядре клетки. Данный факт указывает на биологическую активацию хроматина – предпосылку матричной активности ДНК. И, наоборот, при снижении активности клетки в ядре происходит перераспределение и уплотнение хроматина, заметное увеличение его рефрактерности.

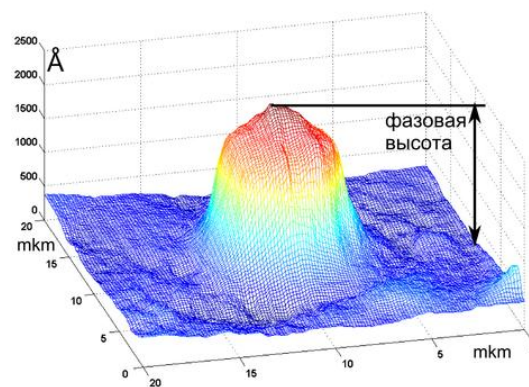


Рис. 1. Трехмерная реконструкция фазового изображения Т-лимфоцита.

Ранее проведенными исследованиями было доказано, что фазовая высота (ФВ) является критерием метаболической и пролиферативной активности лимфоцитов периферической крови [3]. Так, уменьшение значения коэффициента преломления (и соответственно высоты и объема клеток) может свидетельствовать о процессах деспирализации хроматина, что указывает на его биологическую активацию. И, наоборот, при снижении активности клетки в ядре происходит перераспределение и уплотнение хроматина, сопровождающееся возрастанием ФВ.

Под воздействием ЛМ мы наблюдали незначительную активацию лимфоцитов. Так, после инкубации клеток с ЛМ в конечной концентрации 1 мкг/мл ФВ снижалась на 6%, а при увеличении концентрации до 10 мкг/мл – на 9% по сравнению с интактными лимфоцитами.

Поскольку усредненные данные не всегда демонстрируют реальные изменения, в качестве критерия морфофункционального состояния ядер лимфоцитов мы использовали индекс функциональной активности ядра (FAN), представляющий величину, обратно пропорциональную фазовой высоте каждой клетки в выборке, характеризующей конформационное состояние нуклеолярных белков и степень деконденсации хроматина. FAN вычисляли по формуле: $FAN = (3 \cdot n_3 + 2 \cdot n_2 + n_1 + 0 \cdot n_0) / n$, где: n_3 – количество клеток с ФВ $\leq 1,5$ мкм; n_2 – с ФВ 1,5–2 мкм; n_1 – с ФВ 2–2,5 мкм; n_0 – с ФВ $> 2,5$; n – число клеток в выборке.

Анализ полученных данных продемонстрировал достоверное увеличение функциональной активности ядер лимфоцитов, особенно при воздействии ЛМ в концентрации 10 мкг/мл (1,48 против 1,26, $p < 0,05$). Данный факт служит подтверждением прямого нуклеотропного действия ЛМ на Т-лимфоциты периферической крови, проявляющегося изменением конформационного состояния их ядер. Максимальный эффект достигается при воздействии ЛМ в концентрации 10 мкг/мл.

После инкубации с порошком W средние в популяции оптико-геометрические показатели Т-клеток оказались равными ($6,8 \pm 1,0$) мкм в диаметре, ($19,5 \pm 3,0$) мкм по периметру, высотой ($2,4 \pm 0,4$) мкм, площадью ($28,1 \pm 10,9$) мкм², и объемом ($33,1 \pm 12,1$) мкм³, соответственно; а при воздействии нано-W₆₀ ($6,5 \pm 1,7$) мкм, ($19,0 \pm 4,2$) мкм, ($2,4 \pm 0,4$) мкм, ($26,4 \pm 12,9$) мкм², ($28,6 \pm 13,9$) мкм³ против ($7,1 \pm 1,5$) мкм, ($20,8 \pm 4,0$) мкм, ($2,1 \pm 0,4$) мкм, ($31,5 \pm 13,5$) мкм²,

($32,2 \pm 15,3$) мкм³ в контрольной группе, соответственно. FAN Т-лимфоцитов, подвергнутых воздействию нано-W₆₀ снижался до 1,02 против 1,26 ($p < 0,05$). При этом под влиянием порошка нано-W₆₀ в популяции Т-лимфоцитов резко уменьшалось содержание наиболее активных клеток с минимальной высотой (ФВ $< 1,5$ мкм) и увеличивался процент лимфоцитов с ФВ $> 2,5$ мкм. Полученные результаты свидетельствуют о способности вольфрама ингибировать активность Т-клеток, причем эффект супрессии более выражен при воздействии нано-W₆₀.

Проведение предварительной инкубации лимфоцитов с физиологическими концентрациями лизоцима в экспериментах *in vitro* продемонстрировало протективный нуклеотропный эффект ЛМ на фоне супрессивного воздействия наночастиц W.

Таким образом, морфометрический анализ динамики клеточных показателей лимфоцитов периферической крови позволил количественно оценить супрессивное влияние частиц вольфрама. При этом нанодисперсный вольфрам оказался способным к более интенсивному взаимодействию с функциональными компонентами клеток (мембранами, органеллами, ядерными структурами). Детальное изучение характера этих взаимодействий может стать основой для создания системы норм безопасности производства и применения нанотехнологий нового поколения. Использование КФМ позволяет количественно и с большой точностью определить уровень функциональной активности ядер лимфоцитов, а показатель FAN является наиболее информативным для представления иммуномодулирующего нуклеотропного действия ЛМ и других биологически активных веществ.

Список литературы:

1. Василенко И.А., Кардашова З.З., Тычинский В.П., и др., Клеточная диагностика: возможности витальной компьютерной микроскопии. Вестник последипломного медицинского образования, 3-4, 64-68, (2009).
2. Тычинский В.П. Динамическая фазовая микроскопия: возможен ли «диалог» с клеткой? Успехи физических наук, 177(5), 535-552, (2007).
3. Tychinsky V.P., Kretushev A.V., Vyshenskaya T. V., Tikhonov A.N. Coherent phase microscopy in cell biology: visualization of metabolic states. Biochim. Biophys. Acta, 1708, 362-366 (2005).

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МЕТОДА ЛАЗЕРНОЙ ИНТЕРФЕРЕНЦИОННОЙ МИКРОСКОПИИ ДЛЯ ВИЗУАЛИЗАЦИИ ЖИВЫХ КЛЕТОК В УСЛОВИЯХ IN VITRO

А.И. Юсипович, Г.Г. Левин*, Г.В. Максимов
Биологический факультета МГУ им. М.В. Ломоносова
*Всероссийский НИИ оптико-физических измерений
yavor@pisem.net

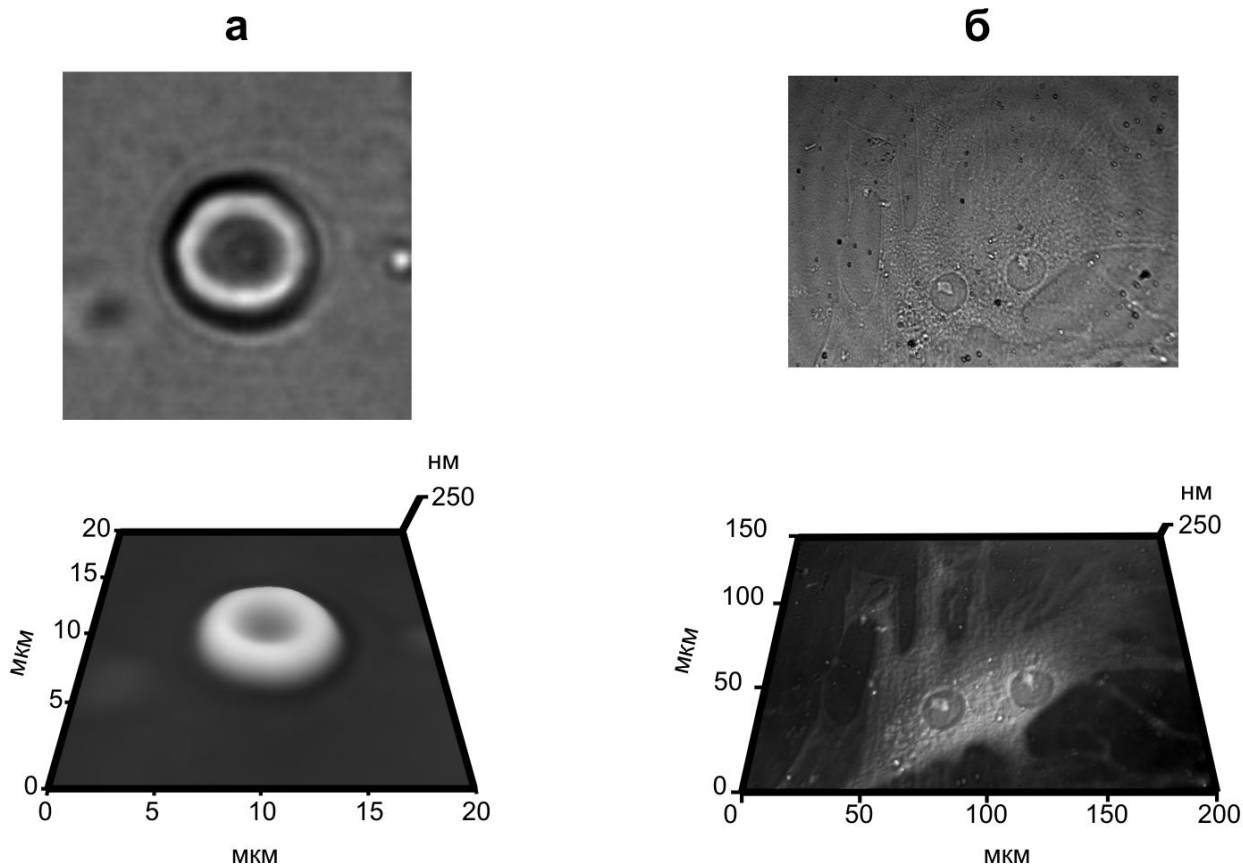


Рис. 1. Обычные световые (верхний ряд) и фазовые (нижний ряд) изображения эритроцита человека (а) и делящегося фибробласта (б)

Обсуждаются достоинства и особенности применения метода лазерной интерференционной микроскопии (ЛИМ) при исследовании клеток в условиях *in vitro*. Метод ЛИМ позволяет получать изображения мало контрастных полупрозрачных биологических объектов без использования красителей, кроме того с помощью ЛИМ также возможно количественно оценивать оптическую разность хода (ОРХ) в каждой точке объекта. Величина ОРХ в точке пропорциональна толщине клетки и разнице показателя преломления объекта и окружающей среды в данной точке объекта. Изменение величины ОРХ на различных участках объекта (фазовое изображение) позволяет регистрировать не только диаметр и площадь, аналогично дру-

гим видам оптической микроскопии, но и распределение и количество вещества в объекте, а также, при соблюдении некоторых условий, толщину и объем биологических объектов.

Дается краткая теория метода ЛИМ, рассмотрены особенности отображения различных биологических объектов при помощи ЛИМ. Выводы проиллюстрированы изображениями различных типов клеток и тканей (эритроциты, тучные клетки, нервное волокно и другие), обсуждается возможность использовать совмещенные с персональным компьютером ЛИМ микроскопы в качестве автоматического анализатора изображений.

ВЫСОКОСКОРОСТНАЯ АТОМНО-СИЛОВАЯ МИКРОСКОПИЯ

Е.А. Меньшиков, Ю.Л. Любченко
University of Nebraska Medical Center, Omaha, USA
emenshikov@gmail.com

Возможность наблюдения биологических процессов в реальном времени методом атомно-силовой микроскопии (АСМ) являлась одной из самых волнующих перспектив данной методики с момента ее создания. Традиционная атомно-силовая микроскопия, обладая высоким латеральным разрешением, не позволяет получать последовательные АСМ-изображения на временах, сравнимых с характерными временами динамики биологических систем. Последние достижения в области быстрого сканирования биологических объектов позволили визуализировать динамические процессы ДНК-белковых комплексов на миллисекундных временах [1-3].

История развития быстросканирующей микроскопии берет свое начало с 1996 года. Первый быстросканирующий АСМ был представлен группой S. Quate [4]. Предложенный пьезоманипулятор позволял производить сканирование с высокой скоростью, однако высокая жесткость кантилевров не давала возможность работать с биологическими объектами. Прорывом в развитии быстросканирующего АСМ для биологии стала работа группы P. Hansma [5], в которой для увеличения скорости сканирования (до 0,5 кадров в сек) было предложено использовать короткие кантилеверные консоли, что существенно увеличивало их резонансную частоту в соответствии с формулой: $\omega_0 \sim \sqrt{\frac{E}{\rho}} \cdot \frac{t}{L^2}$,

где E — модуль Юнга, ρ — плотность, L, t — длина и толщина балки кантилевера соответственно. В дальнейшем группой T. Ando [1, 2] были развиты идеи коротких кантилеверных консолей, а также предложены схемы быстрого сканера и электроники для обработки получаемых данных.

Современная высокоскоростная атомно-силовая микроскопия основана на четырех основных принципах: (1) короткие кантилеверные консоли с высокой резонансной частотой и низкой константой жесткости, (2) сканеры с высокой резонансной частотой, (3) активное подавление механических вибраций сканера, (4) быстрая обратная связь.

Принципиальная схема быстросканирующего АСМ приведена на рис. 1. Для измерения отклонений коротких кантилеверных консолей требуется специальный дизайн оптической системы контроля отклонений, главной особенностью которого является фокусирование лазерного луча на кантилевер (3) при помощи объектива (9), который также используется и для коллимирования луча, отраженного от кантилевера. Падающий и отраженный лучи разделяются по поляризации делительной (12) и четвертьволновой пластинами (11). Отраженный от кантилевера луч направляется на двухсекционный фотодиод (15). Кантилевер, закрепленный на стеклянной пластине, ориентирован зондом вверх и направлен к образцу, закрепленному на стеклянном цилиндрическом объектном столике (2), который в свою очередь закреплен на сканере (1).

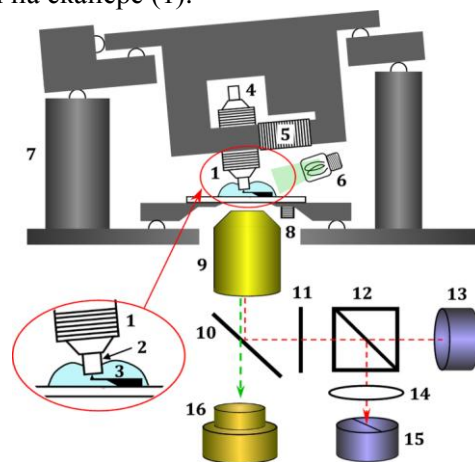


Рис. 1. Схематическое устройство быстросканирующего АСМ. Z-пьезосканер (1), объектный столик (2), кантилевер (3), противовес Z-пьезосканера (4), X-пьезосканер (5), подсветка (6), шаговый двигатель (7), пьезоэлемент для возбуждения колебаний кантилевера (8), объектив (9), зеркало (10), четвертьволновая пластина (11), поляризационный делитель (12), лазер (13), линза (14), двухсекционный фотодиод (15), камера (16).

Сканер для быстросканирующего АСМ состоит из сопряженных пьезоманипуляторов и возвратных пружин. Y-сканер перемещает X-сканер, в свою очередь X-сканер перемещает Z-сканер (1), а z-сканер переме-

щает объектный столик (2). X- и Y-пьезоманипуляторы сопряжены с возвращающимися пружинами. Максимальные X- и Y-смещения составляют 2-3 мкм. По сравнению с X- и Y-пьезоманипуляторами Z-сканер, имеет большую скорость сканирования. Его резонансная частота составляет 170-370 кГц, однако максимальное смещение ограничено 1-2 мкм [2]. Для компенсации импульсов, вызванных смещениями z-сканера, используется контрбалансный пьезоманипулятор (4), смещающийся в направлении противоположном к z-сканеру.

Современные коммерческие кантилеверы (3) для быстрого сканирования примерно в 10 раз меньше традиционных (длина 6-10 мкм, ширина 2 мкм, толщина 90 нм), что при константе жесткости 0,1-0,2 Н/м обеспечивает резонансную частоту в жидкости 600 кГц–1,2 МГц [6] и позволяет получать изображения со скоростью ~25 кадров в секунду без существенного влияния на исследуемые биологические системы.

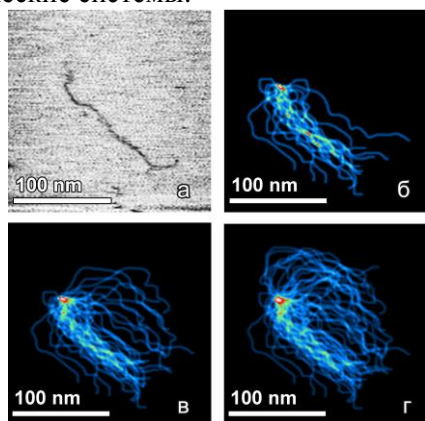


Рис. 2. (а) Одиночный кадр высокоскоростного АСМ-изображения, полученного при скорости 3 кадра в секунду. Наложенные последовательно полученные кадры положений ДНК на подложке. (б)-20 кадров; (в)-40 кадров (г)-60 кадров.

Одной из важных процедур при исследовании биологических объектов является процедура модификации подложки для нанесения образца. При оптимальной модификации образец должен обладать значительной подвижностью и в то же время не покидать область сканирования. Для выявления оптимальной модификации поверхности слюды для высокоскоростного АСМ исследовали сегментативную подвижность ДНК (491 пара оснований), нанесенную на свежеисколотую слюду и слюду, предварительно модифицированную 1-(3-аминопропил) силатраном (АПС). 2 мкл раствора ДНК в 10 мМ HEPES буфере, содержащем 5 мМ Mg^{2+} наносили на

подложки, выдерживали 2 мин, промывали и исследовали в том же самом буфере на быстросканирующем АСМ (RIBM Co., Япония). Скорость сканирования составляла 3 кадра в секунду. Единичный кадр полученных АСМ-фильмов приведен на рис. 2а. Форма молекул ДНК отражает их гибкость и согласуется с традиционными АСМ-изображениями. На рис. 2 (б-г) приведены наложения конформаций ДНК на 20, 40 и 60 последовательных кадрах, соответственно. Данные показывают, что ДНК обладает сегментной подвижностью как при нанесении на свежеисколотую слюду, так и на слюду, модифицированную АПС. Однако модификация АПС представляется более оптимальной, т.к. позволяет получать более контрастные АСМ-изображения ДНК и ДНК-белковых комплексов.

Возможности быстросканирующего АСМ для исследования динамики ДНК-белковых комплексов продемонстрированы на примере наблюдения динамики нуклеосом – единичных структурных элементов хроматина. Изучение динамики нуклеосом представляет большой интерес в связи с необходимостью понимания процессов динамики хроматина для возможности диагностирования и предотвращения генетических заболеваний.

В работе исследовали нуклеосомы, состоящие из октамера, образованного человеческими гистонами H2A, H2B, H3, H4 (фирма New England Biolabs Inc) и ДНК-специфичной последовательности 601, делающей 1,7 оборота вокруг октамера. Поведение нуклеосом на модифицированной АПС слюде изучали при помощи быстросканирующего АСМ в буферном растворе при низкой ионной силе (10 мМ HEPES, 4 мМ $MgCl_2$). Скорость сканирования составляла 1 кадр в секунду.

В процессе жизни нуклесом наблюдали обратимый отрыв цепи ДНК от гистонового октамера с последующим присоединением к нему, что указывало на так называемый процесс “дыхания” (рис. 3). Изменение структуры нуклесом в процессе “дыхания” было проанализировано на основании измерений длин свободных концов ДНК (рук) и определения степени намотки ДНК вокруг гистонового октамера.

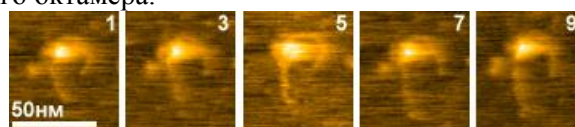


Рис. 3. АСМ-кадры “дыхания” нуклеосомы, полученные при скорости 1 кадр в секунду.

Показано, что наряду с “дыханием” в процессе жизни нуклеосом наблюдаются следующие процессы:

- разворачивание нуклеосом с потерей гистоновых октамеров, сопровождающееся движением рук (рис. 4),
- смещение гистонического октамера вдоль цепи ДНК (слайдинг) (рис. 5),
- выход октамера из нуклеосомы без движения рук ДНК вследствие увеличения петли ДНК вокруг гистонического кора (рис. 6).

Процесс разворачивания нуклеосомы (рис. 4) сопровождается движением одной или обеих рук, что приводит к уменьшению степени накрутки цепи ДНК вокруг гистонического октамера. В процессе раскручивания нуклеосома теряет гистоновый октамер или его часть. Наблюдаемый механизм разворачивания нуклеосом хорошо согласуется с ранее полученными данными [7].

Процесс смещения гистонического октамера вдоль цепи ДНК представлен на рис. 5. На основании анализа изменения длин рук ДНК в нуклеосоме на последовательных АСМ-кадрах показано, что степень намотки ДНК вокруг гистонического октамера остается неизменной в процессе его движения, что указывает на возможность слайдинга.

Процесс выхода гистонического октамера из нуклеосомы показан на рис. 6. На рис. 6 отчетливо видно увеличение петли вокруг гистонического октамера, сопровождающееся его вылетом, после чего на следующем АСМ-изображении (рис. 6г) видна только петля ДНК, которая релаксирует со временем (рис. 6е). Отметим, что основным фактором стабильности нуклеосом является электростатическое взаимодействие отрицательно заряженной цепи ДНК и положительно заряженного гистонического октамера. При увеличении петли происходит ослабление взаимодействия октамера с молекулой ДНК, что приводит к выходу октамера, который впоследствии диссоциирует от положительно заряженной поверхности из-за электростатического отталкивания.

Обнаруженные закономерности уточняют молекулярный механизм динамики нуклеосом и позволяют выдвинуть новые гипотезы о механизме действий модифицирующих белков (remodeling factors) в динамике хроматина.

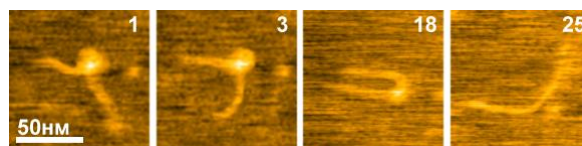


Рис. 4. Последовательные АСМ-кадры разворачивания нуклеосомы, полученные при скорости 1 кадр в секунду.

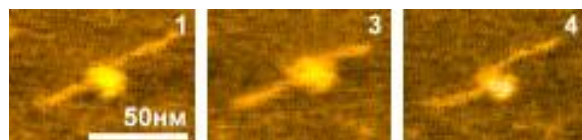


Рис. 5. Последовательные АСМ-кадры слайдинга октамера, полученные при скорости 1 кадр в секунду.

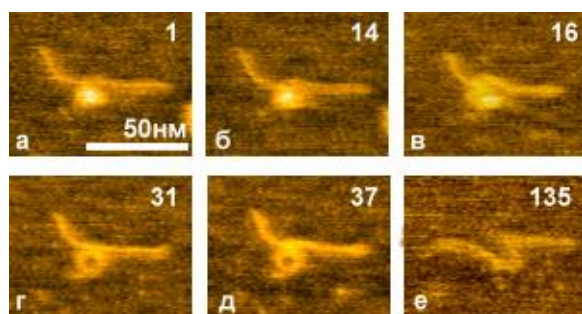


Рис. 6. Последовательные АСМ-кадры выхода гистонического октамера из нуклеосомы, полученные при скорости 1 кадр в секунду.

Список литературы:

1. Ando T., Kodera N., Takai E., Maruyama D., Saito K., Toda A., Proc. Natl. Acad. Sci. U S A, 98, 12468-12472 (2001).
2. Ando T., Uchihashi T., Fukuma T., Prog. Surf. Sci., 83, 337-437 (2008).
3. Shibata M., Yamashita H., Uchihashi T., Kandori H., Ando T., Nat. Nanotechnol., 5, 208-212 (2010).
4. Manalis S. R., S. C. Minne, Quate a. C. F., Appl. Phys. Lett., 68, 871-873 (1996).
5. Walters D. A., Cleveland J. P., Thomson N. H., Hansma P. K., Wendman M. A., Gurley G., Elings V., Rev. Sci. Instrum., 67, 3583-3590 (1996).
6. Kitazawa M., Shiotani K., Toda A., Jpn. J. Appl. Phys., 42, 4844-4847 (2003).
7. Shlyakhtenko L.S., Lushnikov A. Y., Lyubchenko Y. L., Biochemistry, 48, 7842-7848 (2009).

ИССЛЕДОВАНИЕ ДИНАМИКИ НУКЛЕОСОМ МЕТОДОМ АТОМНО-СИЛОВОЙ МИКРОСКОПИИ

И.П. Меньшикова, Е.А. Меньшиков, Н.А. Филенко, Ю.Л. Любченко
University of Nebraska Medical Center, Omaha, USA
ira.menshikova@gmail.com

Возросший в последнее время интерес к изучению динамики нуклеосом, являющихся структурными единицами хроматина, отражает высокую актуальность проблемы исследования динамики хроматина в связи с пониманием механизма регуляции активности генов. Разработка подходов, с помощью которых возможно контролировать динамику хроматина, позволит предупредить развитие многих генетических заболеваний, а также понять механизм структурных изменений, происходящих в хроматине в ходе развития клетки и под воздействием различных внешних агентов.

Нуклеосомы образованы совместной упаковкой нити ДНК с гистоновыми белками H2A, H2B, H3 и H4. Она состоит из ядра, представляющего собой гистоновый октамер, образованный парой гистонов каждого вида, и молекулы ДНК, делающей 1,67 оборота вокруг октамера. Возросшее в последнее время количество работ, указывающих на динамику нуклеосом во времени [1], отражает необходимость детального исследования данного вопроса и понимания механизмов, определяющих стабильность нуклеосом.

Данная работа посвящена исследованию стабильности нуклеосом в растворе. При сборке нуклеосом использовали ДНК специфичной последовательности 601, обеспечивающей специфичность связывания гистонового кодра, и человеческие гистоны H2A, H2B, H3 и H4 (фирма New England Biolabs Inc). Сборку нуклеосом осуществляли согласно описанной ранее методике [2]. Поведение нуклеосом в буферном растворе при низкой ионной силе (10 mM HEPES, 4 mM MgCl₂) исследовали с помощью метода атомно-силовой микроскопии (АСМ) путем осаждения нуклеосом из раствора на поверхность слюды через различные промежутки времени (рис. 1). Для увеличения адсорбционной способности слюды предварительно модифицировали 1-(3-аминопропил) силатраном (АПС). О стабильности нуклеосом в растворе судили путем оценки на АСМ-изображениях соотношения числа нуклеосом к числу свободных молекул ДНК, появление

которых свидетельствовало о распаде нуклеосом.

В соответствии с ранними наблюдениями, время жизни нуклеосом зависит от их концентрации. Так, распад нуклеосом в растворе концентрации 50 нг/мкл начинался после 4 месяцев. В то время как разбавление данного раствора в 500 раз (до конечной концентрации 0,1 нг/мкл) приводило к резкому снижению их стабильности: распад нуклеосом и появление молекул свободной ДНК наблюдали уже через 5 мин с момента разбавления (рис. 1б), а через 30 мин на АСМ-изображениях присутствовали только молекулы ДНК (рис. 1в).

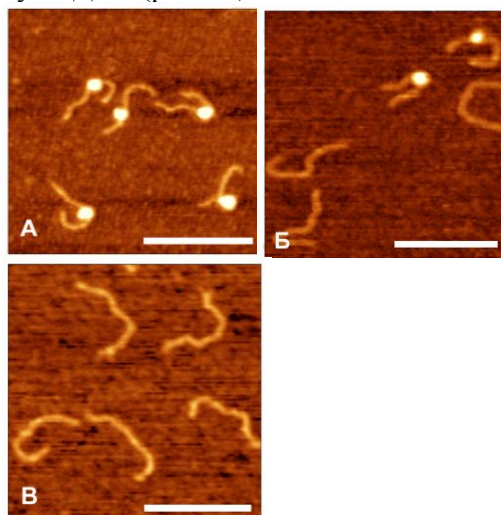


Рис. 1. АСМ-изображения нуклеосом, нанесенных на слюду (а) сразу после разбавления раствора (до концентрации 0,1 нг/мкл), (б) через 5 и (в) через 30 мин хранения данного раствора при 0°C. (Масштабный отрезок соответствует 100 нм).

Впервые нами обнаружено, что добавление цвиттер-ионных поверхностно-активных веществ (ПАВ), таких как 3-[(3-холанидопропил)диметиламмоний]-1-пропансульфонат (3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate, CHAPS) в раствор нуклеосом повышает их стабильность (структура соединения представлена на рис. 2). Так, время жизни нуклеосом в растворе концентрации 0,1 нг/мкл в присутствии 0,1 вес.% CHAPS увеличивается с 30 мин до 4 дней.

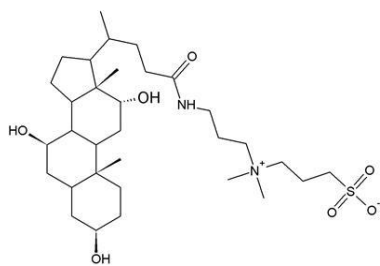


Рис. 2. Структурная формула 3-[(3-холанидопропил)диметиламмоний]-1-пропансульфоната (CHAPS).

Для изучения влияния CHAPS на структуру нуклеосом были приготовлены два раствора нуклеосом концентрации 0,1 нг/мкл каждый, и к одному из них был добавлен 0,1 вес.% CHAPS. Данные растворы нуклеосом, выдержанные при 0°C в течение различных промежутков времени (0 мин – 7 дней), депозировали на модифицированную АПС слюду (рис. 3) и оценивали такие структурные параметры нуклеосом, как объем и степень намотки ДНК вокруг гистонового октамера. Сравнение структурных параметров нуклеосом, осажденных на слюду из растворов, содержащих или не содержащих CHAPS, сразу же после их приготовления, показало, что присутствие цвиттер-ионного ПАВ не приводит к изменению структуры нуклеосом.

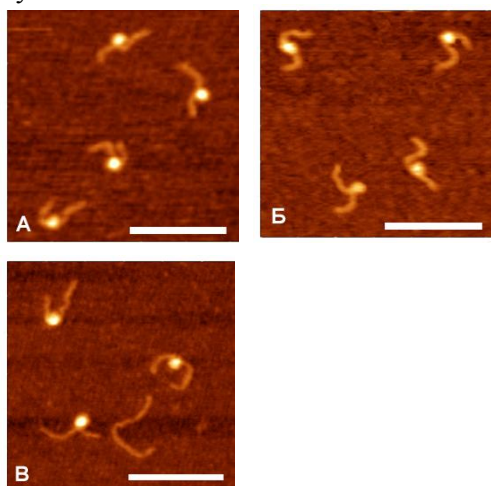


Рис. 3. АСМ-изображения нуклеосом, нанесенных на слюду (а) сразу после разбавления (до концентрации 0,1 нг/мкл) раствора, содержащего CHAPS, (б) через 30 мин и (в) 2 дня хранения раствора при 0°C. (Масштабный отрезок соответствует 100 нм).

Аналогичное сравнение структурных параметров нуклеосом, осажденных из этих же растворов через различные промежутки времени, показало, что уменьшение во времени объема нуклеосом и степени намотки ДНК вокруг гистонового октамера в растворах,

содержащих CHAPS, происходит медленнее по сравнению с растворами, CHAPS не содержащими (рис. 3). Таким образом, присутствие CHAPS в растворе нуклеосом замедляет процесс их распада и повышает их стабильность в растворе.

Следует отметить, что NaCl оказывает противоположное действие. NaCl в высокой концентрации (300 мМ и более) ускоряет процесс распада нуклеосом.

Кроме того нами было обнаружено, что в присутствии CHAPS уменьшается специфичность связывания нуклеосом к последовательности ДНК. В результате возникают “неспецифические” нуклеосомы, характеризующиеся смещением октамера на один из концов ДНК (рис. 3). Анализ показал, что доля “неспецифических” нуклеосом во времени растет с увеличением концентрации CHAPS.

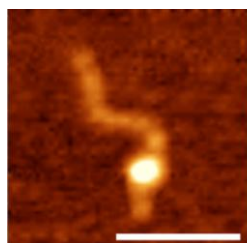


Рис. 4. АСМ-изображение неспецифической нуклеосомы. (Масштабный отрезок соответствует 50 нм).

Высокоскоростная атомно-силовая микроскопия была использована для понимания динамики нуклеосом. С помощью данного метода, позволяющего визуализировать динамику нуклеосом, показан процесс превращения нуклеосом “стандартного вида” в “неспецифические” нуклеосомы в присутствии CHAPS, указывающий на возможность слайдинга гистонового октамера вдоль последовательности ДНК. Дополнительно проанализирована динамика процесса распада “неспецифических” нуклеосом. Перспективы этих исследований обсуждаются в докладе.

Список литературы:

1. Kelbauskas L., Chan N., Bash R., DeBartolo P., Sun J., Woodbury N., Lohr D., *Biophys. J.*, 94, 147–158 (2008).
2. Shlyakhtenko L.S., Lushnikov A. Y., Lyubchenko Y. L., *Biochemistry*, 48, 7842–7848 (2009).

АСМ-ИССЛЕДОВАНИЕ КЛЕТОК ТИМУСА ПРИ ОСТРОМ ВОЗДЕЙСТВИИ ИОНИЗИРУЮЩЕГО ИЗЛУЧЕНИЯ

И.А. Никитина, М.Н. Стародубцева, А.И. Грицук

Гомельский государственный медицинский университет, Гомель, Беларусь
nikkitina@gmail.com

Анализ взаимосвязи структурных и функциональных изменений клеток после облучения позволяет более глубоко раскрыть закономерности развития клеточной патологии при воздействии ионизирующих излучений.

Оценку состояния клеток тимуса проводили на 3 и 10 сутки после острого γ -облучения в дозе 1 Гр. После выделения тимоциты инкубировались при комнатной температуре в течение 1 часа, фиксировались 1% глутаровым альдегидом (20 мин), однократно промывались в фосфатном буфере и троекратно – в дистиллированной воде. АСМ-исследования поверхности клеток проводили на атомно-силовом микроскопе «НТ-206» («Микро-ТестМашина», Беларусь) в режиме топографии, область сканирования 9×9 $\mu\text{м}$. Обработка полученных данных осуществлялась с помощью программ SurfaceExplorer («Микро-ТестМашина», Беларусь) и ImageJ.

Полученное с помощью АСМ трехмерное изображение адгезированного интактного тимоцита (рис. 1) свидетельствует о куполообразной форме этих клеток, поверхность относительно ровная и гладкая. В области контакта с подложкой различимы ламеллоподии – тонкие, листоподобные выпячивания и пальцеобразные структуры – филоподий.

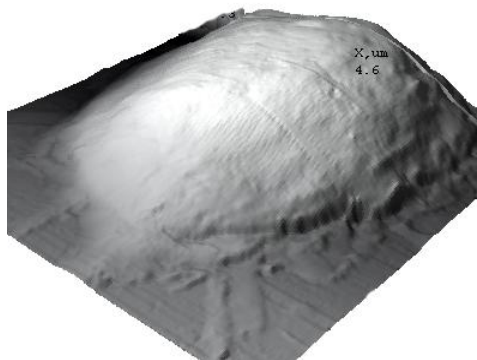


Рис. 1. Типичное АСМ-изображение тимоцита крысы.

Воздействие ионизирующего облучения в дозе 1 Гр приводит к изменению ряда морфологических показателей тимоцитов (рис. 2, 3). Так, на третьи сутки после облучения происходит уменьшение диаметра клеток с

($7,81 \pm 0,78$) до ($6,17 \pm 1,02$) $\mu\text{м}$ ($p < 0,05$). Вследствие чего в 3,5 раза уменьшается объем тимоцитов и вдвое – общая площадь поверхности. Наряду с изменением морфологических признаков, тимоциты утрачивают способность к образованию филоподий.

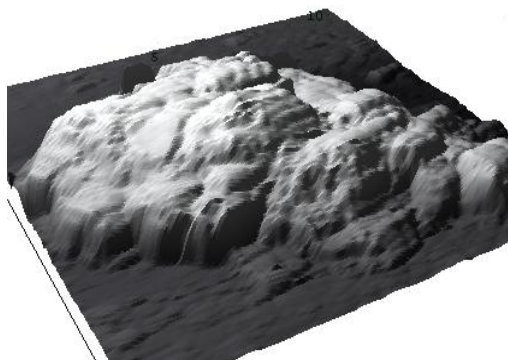


Рис. 2. Типичное АСМ-изображение тимоцита крысы на 3 сутки после облучения.

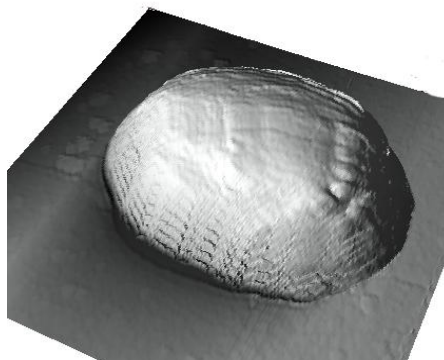


Рис. 3. Тимоцит крысы на 10 сутки после облучения.

К 10-суткам в тимусе активируются процессы восстановительного постлучевого лимфоцитопоэза. В эти сроки по ряду изученных признаков тимоциты облученных животных сходны с контрольными клетками (рис. 3), но их объем, хотя и возрастает до ($50,12 \pm 13,20$) $\mu\text{м}^3$, против ($66,02 \pm 11,44$) в контроле, но остается достоверно более низким ($p < 0,05$). Кроме этого не восстанавливается способность тимоцитов к образованию филоподий, то есть к направленному передвижению, что является характерным свойством клеток иммунной системы.

АТОМНО-СИЛОВАЯ МИКРОСКОПИЯ НАНОСТРУКТУР НА ПОДЛОЖКЕ НА ПРИМЕРЕ КЛАСТЕРОВ ГРАФЕНА

Е.А. Образцова¹, Е.Д. Образцова², И.В. Яминский³

1 – Институт биоорганической химии им. ак. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН

2 – Институт общей физики РАН

3 – Физический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова

kobr@polly.phys.msu.ru

Интенсивное развитие физики наноматериалов и наноструктур требует надежных методов характеристики таких материалов. В данном сообщении будут рассмотрены типичные артефакты, встречающиеся при исследовании наночастиц, нанесенных на подложку, методом атомно-силовой микроскопии а также условия эксперимента, позволяющие получить достоверные результаты. В

качестве примера будут представлены результаты визуализации кластеров графена – слоя гексагонально упакованных атомов углерода.

Работа поддержана грантами РФФИ 10-02-00792, президента РФ МК-2921.2010.2 и программой РАН «фундаментальная оптическая спектроскопия и ее приложения».

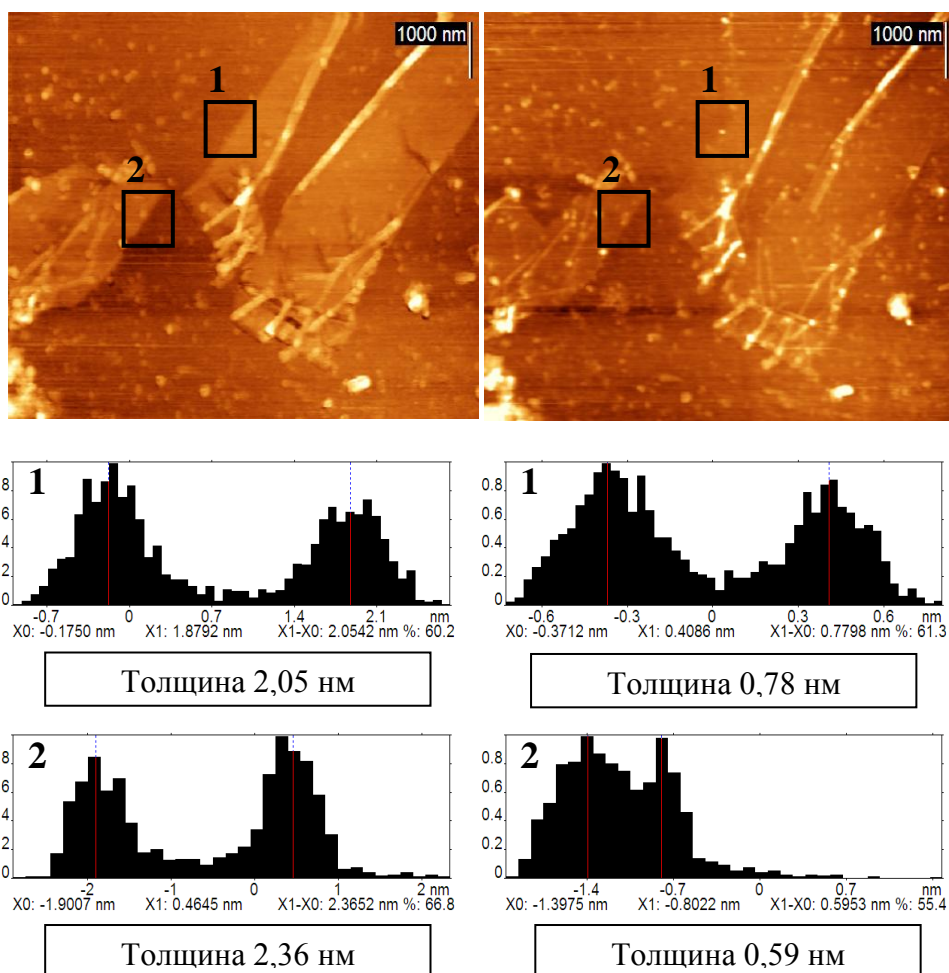


Рис. 1. АСМ-изображение частицы, охарактеризованной с помощью спектроскопии комбинационного рассеяния как однослойный графен, полученное (1) - при сканировании “на отрыве”; (2) - после повышения силы взаимодействия зонда с образцом. В первом случае средняя толщина наблюдаемых частиц составила $(2,1 \pm 0,3)$ нм. Во втором случае средняя толщина частиц составила $(0,7 \pm 0,2)$ нм.

ПРИМЕНЕНИЕ АТОМНО-СИЛОВОЙ, ЛАЗЕРНОЙ ИНТЕРФЕРЕНЦИОННОЙ МИКРОСКОПИИ И МИКРОСКОПИИ КОМБИНАЦИОННОГО РАССЕЯНИЯ ДЛЯ ВИЗУАЛИЗАЦИИ ЭРИТРОЦИТОВ

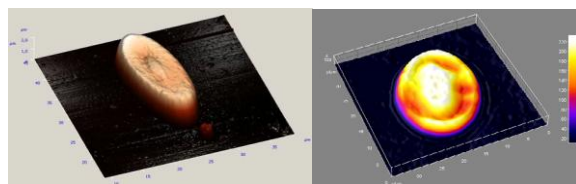
Е.Ю. Паршина, В.Н. Рябоконт^{*}, Н.А. Браже, А.И. Юсипович, Г.В. Максимов

Биологический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова

^{*}ЗАО "НТ-МДТ"

parshinae@gmail.com

Актуальной задачей современной биологии является разработка комплексных методов микроскопического исследования клеток, позволяющих исследовать не только морфологию клеточных структур, но и функциональные особенности внутриклеточных компонентов. В данной работе обсуждаются достоинства и особенности комплексного применения методов атомно-силовой микроскопии (АСМ), лазерной интерференционной микроскопии (ЛИМ) и микроскопии комбинационного рассеяния (МКР) при исследовании ядерных эритроцитов. Используемые в работе методы позволяют получить взаимодополняющую информацию о внутриклеточном содержимом, что позволяет судить о функциональном состоянии клетки. Метод АСМ применяется для определения геометрических размеров и рельефа клеток. Особенностью метода ЛИМ является возможность исследования мало контрастных биологических объектов без использования красителей, кроме того, ЛИМ позволяет количественно оценить содержание вещества с известным показателем преломления в данной точке объекта. МКР позволяет исследовать не только распределение вещества в клетке, но и по особенностям спектра КР регистрировать изменения конформации исследуемых молекул. В данной работе были получены АСМ-изображения ядерных эритроцитов (эритроцит лягушки, *Rana temporaria*) (рис. 1а) и изображения распределения вещества методом ЛИМ (рис. 1б).



а б

Рис. 1. Изображения ядерного эритроцита полученные методами АСМ (а) и ЛИМ (б).

Были зарегистрированы спектры КР, соответствующие спектрам гемопорфирина гемоглобина (рис. 3), позволяющие судить о конформации гемопорфирина. Использование сканирующей системы позволяет регистрировать спектры комбинационного рассеяния в каждой точке объекта (рис. 4).

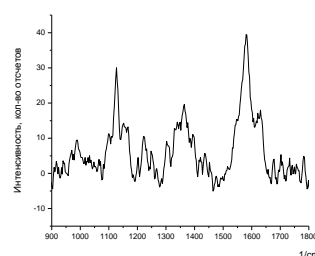


Рис. 3. Спектр комбинационного рассеяния гемопорфирина гемоглобина.

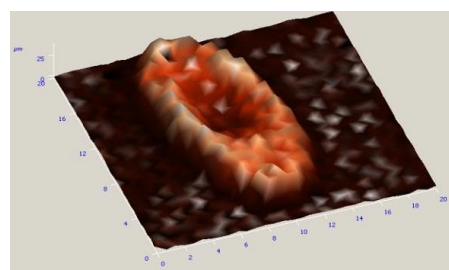


Рис. 4. Распределение гемоглобина в ядерном эритроците (МКР).

Итак, использование методов АСМ, ЛИМ и МКР позволяет не только выявить изменения геометрии и перераспределение компонентов цитоплазмы эритроцита, но и охарактеризовать распределение и конформацию гемопорфирина гемоглобина. Визуализация распределения органелл и белков плазмы, в частности, гемоглобина, позволит получить важную информацию о функционировании клетки и может быть использована для изучения механизмов переноса кислорода эритроцитами.

Работа выполнена с использованием Зондовой нанолaborатории ИНТЕГРА Спектра компании НТ-МДТ (Россия, г. Зеленоград).

ИССЛЕДОВАНИЕ ЗАКОНОМЕРНОСТЕЙ РОСТА ЗОЛОТЫХ НАНОЧАСТИЦ, ИММОБИЛИЗОВАННЫХ НА ПОВЕРХНОСТИ СЛЮДЫ, ПРИ ВОССТАНОВЛЕНИИ ТЕТРАХЛОРЗОЛОТОЙ КИСЛОТЫ ПЕРОКСИДОМ ВОДОРОДА

Ю.С. Пестовский¹, И.А. Будашов^{1,2}, И.Н. Курочкин¹

¹*Химический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова*

²*Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН
organics@mail.ru*

Ферментативная генерация восстановителя ионов металла позволяет проводить синтез золотых наночастиц заданного размера. Высокая интенсивность светорассеяния, характерная для золотых наночастиц, делает их ценным инструментом для биоаналитических методов. Значительные перспективы открывает также их биомедицинское применение. Ферментативная генерация восстановителя может быть использована как метод высокопроизводительного анализа ферментативной активности. Однако использование ферментативной генерации восстановителя сопряжено с рядом проблем, примерами которых являются повышенный и невоспроизводимый фон, а также трудность контроля скорости процесса с высокой точностью.

Для исследования механизма генерации и трансформации металлических наночастиц с использованием ферментативной генерации восстановителя вначале необходимо исследование более простого модельного процесса. В качестве такого процесса нами была выбрана автометаллография. В данном методе восстановитель добавляется в раствор в реакционноспособной форме. В качестве восстановителя нами был выбран пероксид водорода, который может генерироваться многочисленными оксидоредуктазами, в частности, глюкозооксидазой. Для исследования процесса был использован метод атомно-силовой микроскопии, позволяющий делать выводы о высоте образовавшихся объектов, характере их распределения по высоте и общем количестве.

Исследование закономерностей роста золотых наночастиц, иммобилизованных на поверхности слюды, проводили по следующей схеме: модификация поверхности слюды аминогруппами путем ее обработки аминопропилтриэтоксисиланом; иммобилизация золотых наночастиц (коммерчески доступные золотые наночастицы со средним диаметром 10 нм, не имеющие белковой оболочки), используемых в качестве зародышей, за счет электростатического взаимодействия

отрицательно заряженной поверхности наночастиц с аминогруппами на поверхности слюды; исследование АСМ-изображений поверхности, полученной в ходе проведения реакции восстановления тетрахлорзолотой кислоты пероксидом водорода. Для обработки АСМ-изображений производили выделение объектов методом секущей плоскости и вычисляли их распределение по высоте.

Для изучения влияния концентрации пероксида водорода на морфометрические характеристики растущих наночастиц были получены АСМ-изображения иммобилизованных наночастиц, проинкубированных с растворами, содержащими пероксид водорода в различных концентрациях ($2 \cdot 10^{-6}$ М – $2 \cdot 10^{-2}$ М) в присутствии $2 \cdot 10^{-4}$ М HAuCl_4 в течение 10 мин. На основе полученных АСМ-изображений были построены гистограммы распределения объектов по высоте. При повышении концентрации пероксида водорода средний размер фракции объектов выше 8 нм возрастает при сохранении общего числа частиц во фракции.

С целью более детального исследования закономерностей роста золотых наночастиц была изучена динамика данного процесса при фиксированной концентрации тетрахлорзолотой кислоты ($2 \cdot 10^{-4}$ М) и трех концентрациях пероксида водорода ($5 \cdot 10^{-5}$ М, $6 \cdot 10^{-4}$ М, $2 \cdot 10^{-2}$ М). Положение максимума на гистограммах распределения объектов по высоте с увеличением времени реакции смещается в область больших высот частиц, в то время как количество объектов остается постоянным.

Таким образом, образования дополнительных центров роста золотых наночастиц на поверхности слюды не происходит, поэтому внесенные зародыши могут быть использованы как индикаторы концентрации пероксида водорода и, следовательно, концентрации фермента, катализирующего его образование. Регистрируемый рост золотых наночастиц существенно замедляется при временах проведения процесса более 15 мин.

ВЛИЯНИЕ GMF НА КОНФОРМАЦИЮ ARP2/3-КОМПЛЕКСА

Е.В. Печникова¹, М. Gandhi², В.Л. Goode², О.С. Соколова^{1,3}

¹ Институт кристаллографии РАН

² Brandeis University, USA

³ Биологический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова
eugenia.pechnikova@gmail.com

Динамическое перераспределение актина в клетке регулируются актин-связывающими белками. Arp2/3-комплекс имеет ключевое значение при ветвлении актиновых филаментов и образовании лидирующего края. Молекула Arp2/3-комплекса состоит из 7 субъединиц (рис. 1) и может находиться в 3 конформациях: открытой, промежуточной и закрытой. В процессе активации две субъединицы комплекса Arp2 и Arp3 сближаются (закрытая конформация) и дают начало дочерней боковой цепи, образующей с материнской угол в 70° [1]. Недавно открытый белок GMF способен связываться непосредственно с Arp2/3-комплексом, инактивируя его. Как следствие, экспрессия GMF приводит к образованию неветвящихся микрофиламентов [2].

Для определения возможного места связывания GMF Arp2/3-комплексом, а также для установления конформационных изменений в Arp2/3-комплексе, происходящих в результате этого взаимодействия, использовали метод электронной микроскопии макромолекул с негативным контрастированием 1% формил ацетатом. Изображения получали на микроскопе Теспаи G12 с ускоряющим напряжением 120 кВ, в режиме низкой дозы, с увеличением $\times 52000$. Отдельные изображения молекул вырезали с помощью программы boxer и классифицировали с помощью программы IMAGIS. Проекционные изображения контрольных изолированных Arp2/3-комплексов включали только 2 основных класса (рис. 2): открытый (а) и промежуточный (б). Изображения комплекса Arp2/3 с GMF включали 3 класса (рис. 3): открытый, гомологичный контрольному (а), открытый с измененным положением субъединицы p18 (б) и класс с невыраженной субъединицей p18 (в). Таким образом, при связывании с лигандом (GMF) наблюдается появление новых классов, не наблюдающихся в контроле.

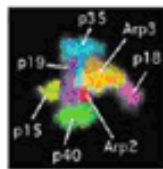


Рис. 1. Arp2/3.

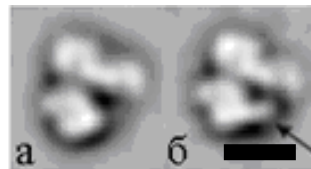


Рис. 2. Arp2/3 (контроль).

Масш. отрезок – 10 нм.

Сравнивая проекционные изображения, можно определить место присоединения GMF. Длинный отросток, образованный Arp3 и p18, имеет утолщение в соответствующем месте (рис. 2 б, стрелка), образованное дополнительной электронной плотностью связанного GMF. При связывании GMF с Arp3 субъединицей, наблюдается конформационное изменение, поворачивающее Arp3 и отдаляющее ее от Arp2. Это изменение приводит к инактивации Arp2/3-комплекса, что подтверждается отсутствием промежуточной конформации. Наличие дополнительного класса изображений (в) по сравнению с контролем объясняется тем, что конформация комплекса меняется, и молекулы могут осаждаться на подложку в дополнительной ориентации.



Рис. 3. Arp2/3-GMF-комплекс. Масштабный отрезок – 10 нм.

Список литературы:

1. Rodal A.A., Sokolova O., Robins D.B., Daugherty K.M., Hippenmeyer S., Riezman H., Grigorieff N., Goode B.L., Nat. Struct Mol. Biol., 12(1), 26-31 (2005).
2. Marushige Y., Marushige K., Okazaki D.L., Koestner A., Anticancer Res., 9(4), 1143-8 (1989).

ДЕТЕКЦИЯ НАНОЧАСТИЦ СЕРЕБРА, ОКСИДА ТИТАНА И ОКСИДА ЦИНКА МЕТОДОМ ЭЛЕКТРОННОЙ МИКРОСКОПИИ

А.В. Пищальникова, О.С. Соколова

МГУ им. М.В. Ломоносова

bionasty@gmail.com

Современные косметические средства, парфюмерия, продукция бытовой химии, дезинфекционные средства могут содержать наномульсии и микровизукулы, а также разнообразные наночастицы (НЧ), например, серебро (Ag), оксид титана (TiO_2), оксид цинка (ZnO). В наноразмерном состоянии многие вещества приобретают новые свойства и становятся в биологическом отношении весьма активными. Это, с одной стороны, открывает новые возможности использования наноматериалов в области биоимедицины, фармакологии. С другой стороны, высокая биологическая активность наночастиц несет в себе и потенциальные риски возникновения нежелательных токсических эффектов. Изучение и детекция наночастиц, находящихся в парфюмерии и бытовой химии представляет особый интерес в связи с тем, что их проникновение в организм может происходить не только через кожу, но и через легкие, путем вдыхания аэрозоля.

Одним из важнейших инструментов детекции и исследования различных характеристик НЧ является электронная микроскопия. Разрешающая способность современных методов электронной микроскопии позволяет детектировать и визуализировать многие типы НЧ и характеризовать такие их параметры, как форма, размер, ультраструктура, дисперсность, агрегированность, массовая концентрация, а также осуществлять элементный анализ образца.

В данной работе были разработаны электронно-микроскопические методы для детекции и исследования НЧ Ag, TiO_2 и ZnO . Характеристика размеров и формы НЧ осуществлялась методом просвечивающей электронной микроскопии. Идентификация кристаллической структуры НЧ проводилась методом дифракции электронов, а регистрация химического состава и оценка концентрации проводилась методом рентгеноспектрального микроанализа (РМА). Методом просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ) были проведены исследования охарактеризованы размер и форма различных НЧ коллоидного серебра («Арговит» (концентрация 8-10 мг/мл), «Агбион» (концентрация 2 мг/мл)) (рис.1), а

также НЧ оксида титана и цинка, находящихся в креме (рис. 1).

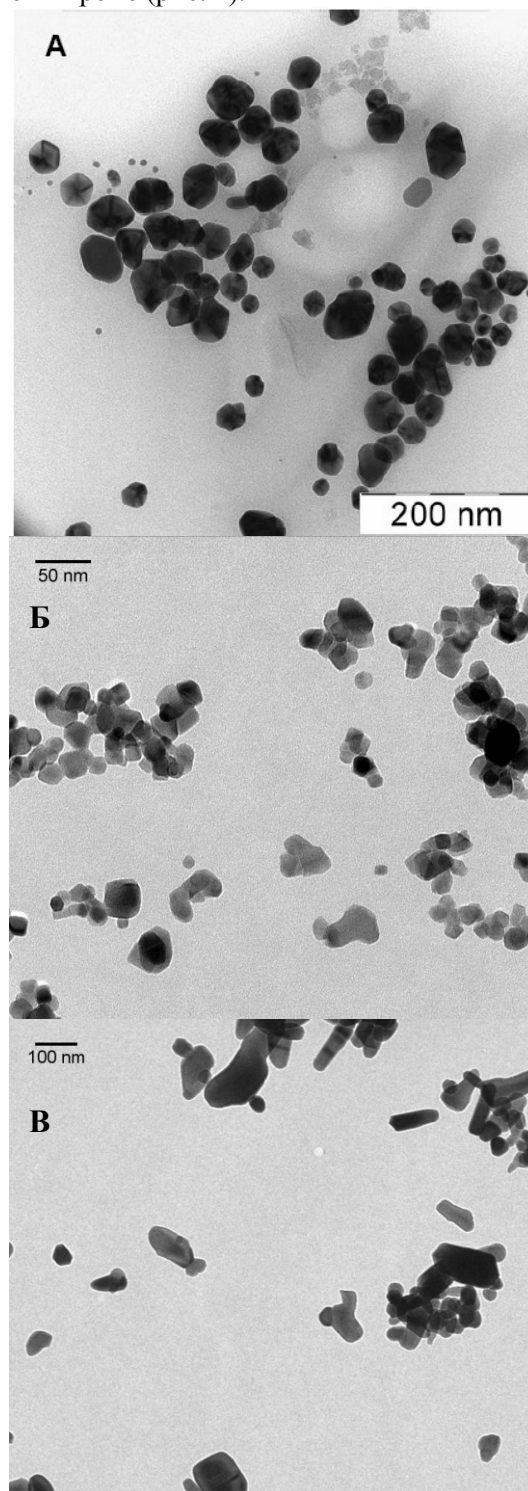


Рис. 1. ПЭМ-изображение наночастиц серебра (А), диоксида титана (Б) и оксида цинка (В).

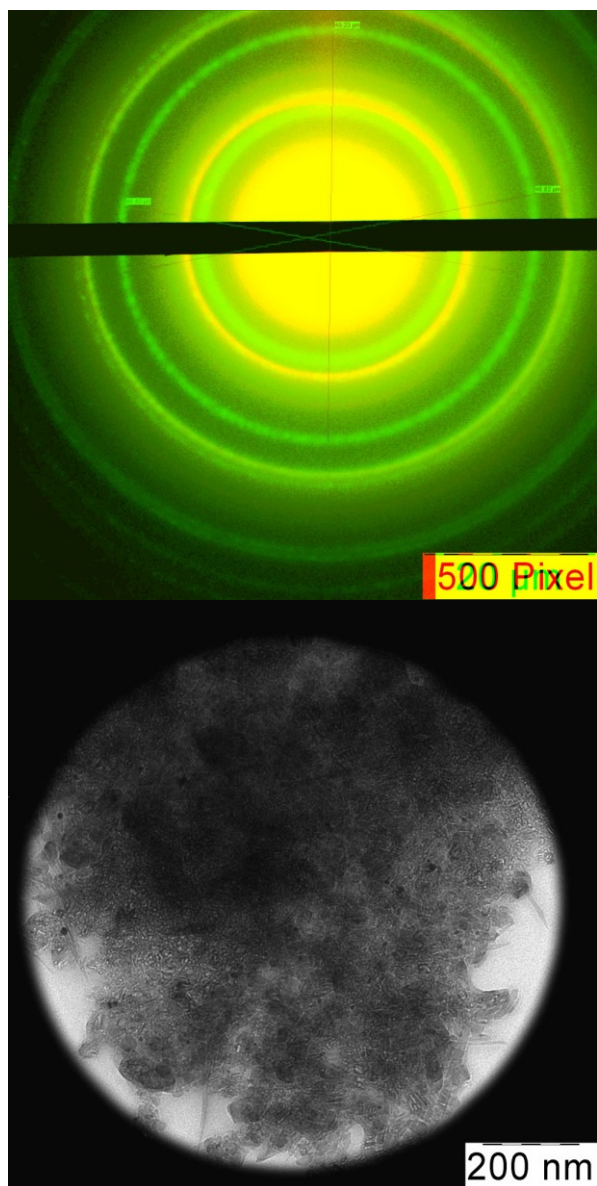


Рис. 2. Дифракционная картина НЧ Ag (Арговита) (показана желтым), наложенная на эталонную дифракционную картину Au (зеленый). Снизу приведено место, с которого была снята дифракция.

Было показано, что с помощью метода ПЭМ можно проводить качественный анализ НЧ в пробе – характеризовать их размер и форму. При этом сходимость определения размеров НЧ серебра составляет не менее 76,4 %, воспроизводимость определения размеров – не менее 73%, максимальная погрешность определения размеров НЧ серебра – 4,1 - 6,1 нм. Процедура приготовления образцов для ПЭМ и способ измерения НЧ на ПЗС-камере обеспечивает относительный разброс в значениях размеров частиц не более 28%. Сходимость измерения размеров НЧ диоксида титана и оксида цинка не менее 72 % и 88 %, воспроизводимость измерения размеров НЧ диоксида титана –

99 %, воспроизводимость измерения размеров НЧ оксида цинка – не менее 81 %.

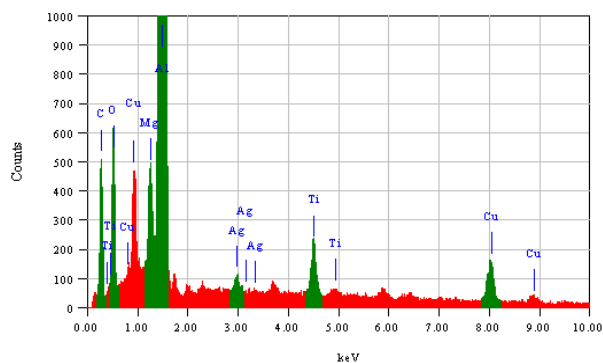


Рис. 3. Элементный спектр TiO_2 в креме.

Идентификация образцов проводилась путем прямого сопоставления дифракционной картины от исследуемого образца с эталонной дифракционной картиной. Сопоставление проводилось с помощью программы ImageJ (рис. 2).

Форма НЧ диоксида титана зависит от типа кристаллической решетки. Диоксид титана существует в двух кристаллических структурах: анатазной и рутильной. Метод электронной дифракции позволяет не только определить диоксид титана в образце, но и выявить тип его кристаллической структуры.

Для подтверждения того, что наблюдаемые НЧ являются оксидами цинка (титана), а также для определения концентрации НЧ в пробе, использовали СЭМ в режиме РМА (рис. 3).

Для оценки концентрации НЧ методом РМА были построены калибровочные кривые для диоксида титана и оксида цинка. Минимальная концентрация, достоверно определяемая методом РМА в образцах парфюмерии – 0,01 - 0,02%. Как правило, в образцах парфюмерии оксиды цинка и титана добавляются в количествах, примерно в 10 раз больших, следовательно, чувствительность метода РМА достаточна для определения оксидов цинка и титана в образцах парфюмерно-косметической продукции.

В результате проделанной работы была произведена разработка ЭМ методов для детекции и исследования наночастиц серебра, диоксида титана и оксида цинка в составе продукции бытовой химии, дезинфекционных средств и парфюмерно-косметических изделий, а также изучены их метрологические характеристики.

ТРАНСФОРМАЦИЯ СТРУКТУРЫ ФИБРОНЕКТИНОВОЙ СЕТИ ПРИ ИЗМЕНЕНИИ МЕХАНИЧЕСКОГО НАПРЯЖЕНИЯ В ЭМБРИОНАЛЬНЫХ ТКАНЯХ *XENOPUS LAEVIS*

Е.А. Пухлякова

Биологический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова, лаборатория биофизики развития
ekaterina24_87@mail.ru

В процессе развития *Xenopus laevis* на внутренней поверхности крыши бластоцеля зародыша образуется внеклеточный фибронектиновый матрикс. Фибронектиновая сеть является субстратом для миграции мезодермальных клеток в процессе гаструляции зародыша. Полимеризация фибронектина - активный клеточный процесс, в котором участвует целый комплекс белков цитоскелета и клеточных контактов. Сборку внеклеточного матрикса в фибриллы связывают с актин-миозиновым сокращением [1]. ВКМ, как и цитоскелет, очень лабильная и динамичная структура. Изменения в структуре цитоскелета передаются на ВКМ и вызывают его перестройку. Однако существует недостаточно экспериментальных доказательств, подтверждающих существование обратной связи между механическими силами и распределением ВКМ.

В работе исследовали влияние внешних механических воздействий (снятие напряжения - релаксация и растяжение) на динамику распределения фибронектиновой сети. В первой серии экспериментов у зародышей *Xenopus laevis* на стадии ранней гаструлы проводили снятие механического напряжения на эпиектодерме [2]. Зародышей фиксировали через 5 - 60 мин после операции. Во второй серии экспериментов у зародышей на стадии ранней гаструлы вырезали крышу бластоцеля и растягивали полученные эксплантаты с помощью стеклянных игл продольно (в переднезаднем направлении) или поперечно и фиксировали образцы через те же временные интервалы. Окраску на фибронектин производили путем двойной окраски антителами и с помощью конфокального микроскопа визуализировали результаты.

Результаты показали, что фибронектиновый матрикс чрезвычайно механочувствителен. Уже через 15 минут после растяжения эмбриональной ткани мы наблюдали ориентацию фибрилл фибронектина по оси растяжения (рис. 1). При проведении операций в растворе, содержащем блокатор миозина-II блебистатин, происходила практически полная разборка внеклеточного матрикса.

После снятия напряжения эмбриональной ткани также наблюдали снижение плотности фибронектиновой сети.

Гиперэкспрессия белков G13, LARG, регулирующих состояние цитоскелета и жесткость эмбриональной ткани, вызывала значительное увеличение плотности внеклеточного матрикса и кластеризацию фибрилл фибронектина.

Таким образом, получены первые экспериментальные доказательства чрезвычайной механочувствительности фибронектинового ВКМ зародышей амфибий. Мы показали, что уже через несколько минут после изменения механического напряжения тканей структура и ориентация фибронектиновой сети сильно изменяется.

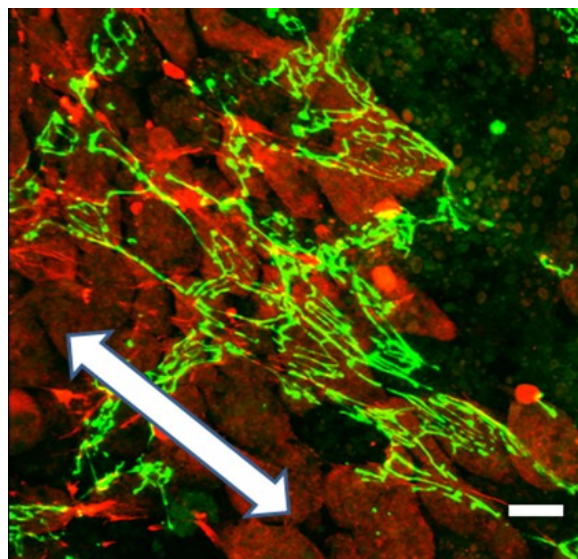


Рис. 1. Ориентация фибрилл фибронектина через 15 мин после растяжения эмбриональной ткани. Стрелка показывает направление растяжения. Масштабный отрезок 20 мкм.

Список литературы:

1. Pankov R. et al. Integrin Dynamics and matrix assembly, *The Journal of Cell Biology*, 148, 1075-1090 (2000).
2. Belousov et al. Effects of relaxation of mechanical tensions upon the early morphogenesis of *Xenopus laevis* embryos, *Int. J. Dev. Biol.*, 34, 409-419 (1990).

СОЗДАНИЕ ДНК-ШАБЛОННЫХ СЕРЕБРЯНЫХ НАНОПРОВОЛОК

А.О. Пучкова, П.А. Соколов, Н.А. Касьяненко

Физический факультет Санкт-Петербургского государственного университета
aorpuchkova@mail.ru

Развитие новых технологий требует решения различных задач, связанных с конструированием наноразмерных устройств. Молекула ДНК может быть использована в этой связи в качестве удобного материала для создания различных структур благодаря уникальной способности к самосборке конструкций на основе принципа комплементарности азотистых оснований. Высокая жесткость макромолекулы и ее уникальные зарядовые свойства дают возможность расширить круг проблем, возможное решение которых связано с использованием ДНК. В частности, она является удобным материалом для создания нанопроволок. Низкая проводимость ДНК при ее иммобилизации на подложке с последующим высушиванием образцов требует металлизации полимера для использования в электронных схемах.

Предложен способ металлизации ДНК восстановленным серебром на подложке после ее фиксации из раствора в присутствии ионов магния. Проводили сравнение процесса металлизации ДНК на свежесколотой слюде и поверхности монокристаллов кремния n- и p-типа. Восстановление серебра после его связывания с ДНК осуществляли в присутствии гидрохинона и без него. Осуществляли проверку состояния вторичной структуры ДНК в растворе в присутствии серебра и гидрохинона методами УФ спектрофотометрии и кругового дихроизма.

Контроль фиксации ДНК на подложках и определение размеров кластеров восстановленного серебра на ДНК осуществляли методами атомно-силовой микроскопии (NanoScope 4a, Veeco, США), сканирующей электронной микроскопии (Zeiss SUPRA 40VP) и при помощи ионного гелиевого микроскопа (Zeiss ORION). В результате были получены вытянутые нанопроволоки длиной до нескольких микрометров, состоящие из однородных кластеров Ag₀ с диаметром около 30 нм.

Так как завершающий этап металлизации ДНК проводится после ее фиксации на подложке, встает вопрос о прочности закрепления макромолекулы на поверхности и возможности дальнейших манипуляций с ней. Из экспериментов с конденсирующими агентами получены данные о возможности изме-

нения конформации уже закрепленной на подложке ДНК.

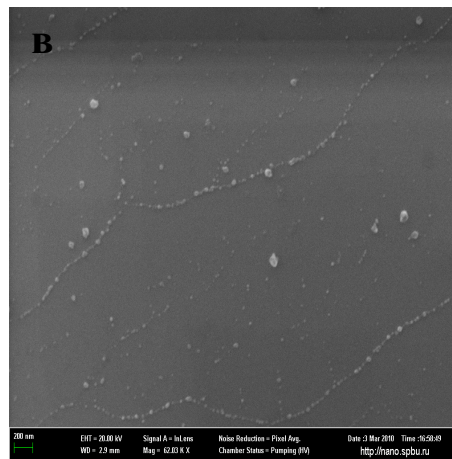
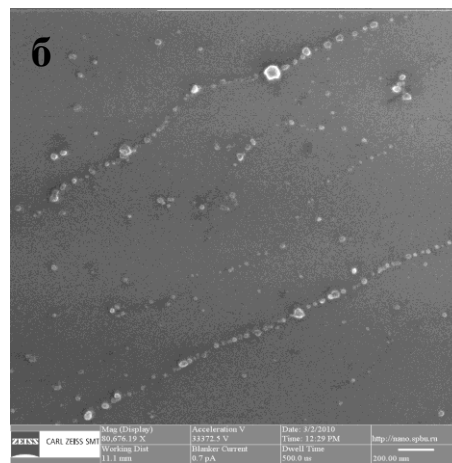
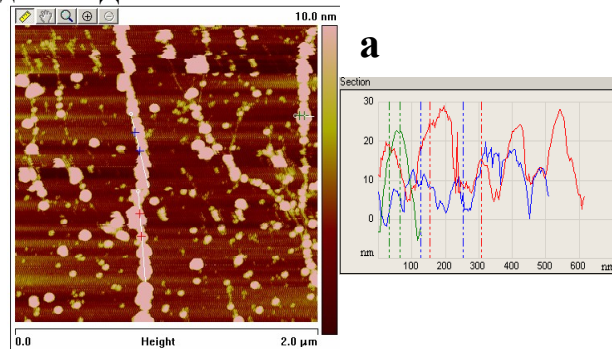


Рис. 1. Изображения серебряных нанопроволок, полученные методами атомно-силовой (а), сканирующей электронной (б) и ионной гелиевой (в) микроскопии. Изображения (б) и (в) получены к. ф.-м. н. Петровым Ю.В. и аспирантом физического факультета СПбГУ Бондаренко А.С.

ПРАКТИКУМ ПО БИОНАНОСКОПИИ: ВОЗНИКАЮЩИЕ ВОПРОСЫ И ИХ РЕШЕНИЯ

А.Р. Рахимова

Химический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова

ООО НПП «Центр перспективных технологий»

alinarar@gmail.com

Зондовая микроскопия является одним из наиболее востребованных и развивающихся методов исследования. Современный многофункциональный сканирующий микроскоп предоставляет богатую информацию о морфологии и свойствах поверхности различных биологических образцов. В качестве примера приведено изображение бактерии *E.coli*, полученное с помощью сканирующего зондового микроскопа (рис. 1).

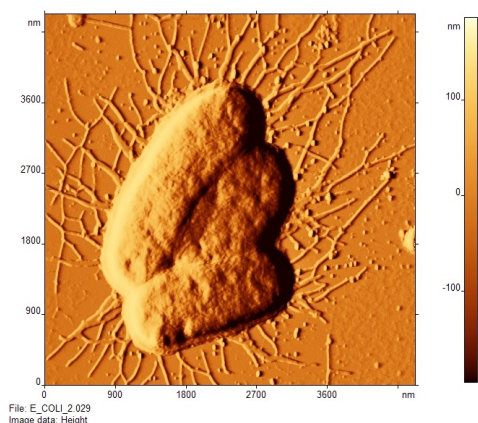


Рис. 1. Изображение бактерии *E.coli*, полученное с помощью СЗМ ФемтоСкан.

Однако на сегодняшний день остается целый ряд нерешенных вопросов, препятствующих широкому применению методов СЗМ для исследования биообъектов и проведению студенческих практикумов по бионаноскопии.

До сих пор открытым остается вопрос о закреплении образцов на подложке. Многие

биообъекты, например белки, очень сложно закрепить на имеющихся подложках, и в связи с этим их исследование с помощью методов зондовой микроскопии существенно затруднено. Очевидна необходимость разработки специальной химической модификации современных подложек для быстрого и удобного анализа конкретных биообъектов, а так же методик их закрепления.

Исследования биологических объектов зачастую необходимо проводить в специфических средах, буферах или насыщенных растворах. Однако имеющиеся на сегодняшний день зонды не приспособлены для такого рода исследований. Необходима разработка химической модификации поверхности кантилевера для проведения измерений в специфических условиях.

Разрешение современных микроскопов зачастую недостаточно для детального исследования биообъектов с малыми линейными размерами.

Программное обеспечение для обработки изображений зондовой микроскопии имеет недостаточно функций для анализа свойств биологических образцов.

Таким образом, появляется необходимость адаптации известных методов для биологических исследований, а так же разработки новых аксессуаров, режимов измерений и функций имеющихся на данный момент микроскопов для быстрого и технологически доступного анализа биообъектов.

ЭЛЕМЕНТАРНЫЕ ПРОЦЕССЫ РОСТА КРИСТАЛЛОВ И ВОЗМОЖНОСТИ АТОМНО-СИЛОВОЙ МИКРОСКОПИИ

Л.Н. Рашкович, Е.В. Петрова

Физический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова
rashk@polly.phys.msu.ru

При кристаллизации в растворе большинство кристаллов растет по дислокационно-механическому механизму, и на растущей поверхности формируются полигонизированные спиральные холмики роста. Прямые ступени, ограничивающие ростовые слои, содержат изломы, к которым присоединяются строительные единицы. Кинетика роста определяется плотностью изломов (ρ , шт/см) и частотами присоединения к излому и отрыва от него строительных единиц (ω^+ и ω^- , с⁻¹).

Зафиксировать изломы в растворе можно лишь для больших строительных единиц. На рис. 1 показаны ступени на гранях кристалла лизоцима. Изломы видны, но определить ρ трудно. Измерить ω невозможно из-за малого временного и пространственного разрешения атомно-силового микроскопа (АСМ).

Теория дает возможность для определения этих величин путем определения корреляционных функций положения участков ступени. Для этого нужно знать координаты всех участков ступени, что позволяет сделать программа ФемтоСкан. При заданном положении (y) на ступени, отключив вертикальную развертку сканера, можно вычислить временную корреляционную функцию:

$$W^2(\Delta t) = \langle [x(t) - x(t+\Delta t)]^2 \rangle = (\chi \Delta t)^{1/2},$$

$$\chi = 2a^6 \omega^- \rho / \pi,$$

Здесь x – координата участка в направлении роста ступени, усреднение ведется для всех t при постоянном значении Δt , a – размер строительной единицы (параметра элементарной ячейки кристалла в случае кубической решетки).

Пространственная корреляционная функция при $t = \text{const}$

$$W^2(\Delta y) = \langle [x(y) - x(y+\Delta y)]^2 \rangle = \Delta y a^2 \rho$$

также может быть вычислена по координатам ступени, если известны χ , частота сканирования и размер кадра. Построив зависимости $W^2(\Delta t)$ и $W^2(\Delta y)$, можно определить искомые ρ и ω^- .

Однако практика показывает, что игла АСМ сильно воздействует на ступень и истинные координаты получить в большинстве случаев невозможно, что хорошо видно на рис. 1б. Интересно отметить, что игла сильнее вырывает молекулы из ступени, когда

соскальзывает с нее, по сравнению с движением навстречу ступени. В режиме прерывистого контакта воздействие иглы столь же сильно, как и в контактном режиме.

Рост кристаллов происходит путем проб и ошибок (Р.Фейнман, 1964) и интенсивность флуктуаций определяет различие в кристаллизации разных веществ. На рис. 2 показан первый сегмент спирали. Его длина не достигла критической, он не начал продвигаться вперед. Изломы отсутствуют, и угол сегмента не размыт, а именно в угле отрыв частиц наиболее вероятен. Это означает, что частота отрыва ω^- сравнима с частотой сканирования. Таким путем можно определить верхнюю границу частоты флуктуаций, нижние границы энергии образования излома и теплоты растворения.

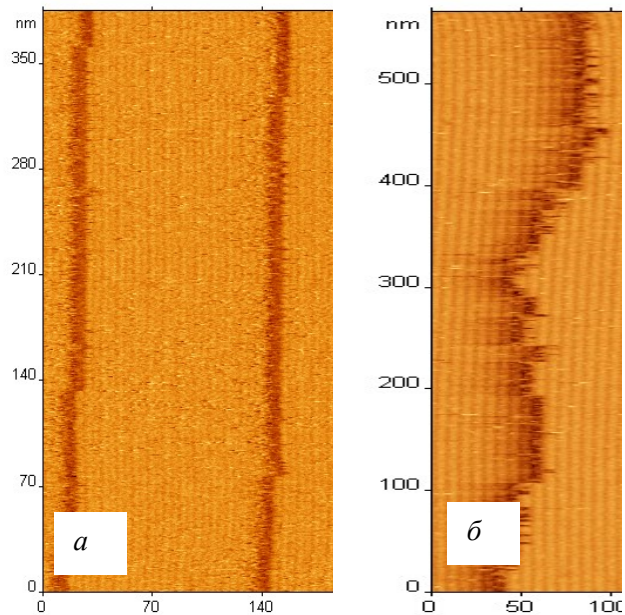


Рис. 1. Ступени на гранях ромбического (а) и моноклинного лизоцима (б).

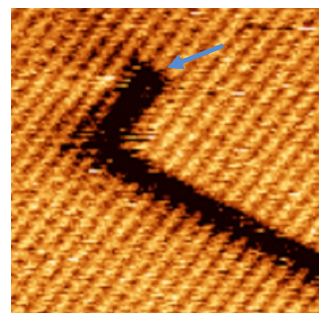


Рис. 2. Сегменты спирали без изломов. Размер кадра 120×120 нм². Стрелкой отмечено место выхода дислокации.

ВИЗУАЛИЗАЦИЯ ВНУТРЕННЕЙ СТРУКТУРЫ КЛЕТОК МЕТОДАМИ АТОМНО-СИЛОВОЙ МИКРОСКОПИИ

А.С. Роскошная, Д.В. Багров, Г.Е. Онищенко, А.В. Феофанов, К.В. Шайтан

*Биологический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова
annarosk@gmail.com*

В гистологии и клеточной биологии микроскопические методы являются основополагающими для исследования клеточных структур. Главными из них являются оптическая микроскопия и просвечивающая электронная микроскопия (ПЭМ) для получения высокого разрешения. Атомно-силовая микроскопия (АСМ) применяется для исследования гистологических препаратов чрезвычайно редко: стандартные способы подготовки образцов для АСМ позволяют исследовать поверхность образца, но не его внутреннюю структуру.

Цель данной работы состоит в развитии экспериментальных методик, которые позволили бы проводить сканирование срезов тканей на АСМ. В основе этих методик лежит сочетание различных режимов АСМ с протоколами иммобилизации исследуемого материала в твердой среде и приготовления срезов, которые применяются для ПЭМ. При этом если для ПЭМ требуется приготовление ультратонкого среза, проникаемого для электронного пучка, то для АСМ значение имеет только сохранность поверхности после резки.

В работе показано, что на поверхности ультратонких срезов и блоков эпоксидной смолы обнаруживаются рельеф и неоднородность свойств, которые соответствуют структуре биологического материала.

Предлагаемые методики визуализации были опробованы на образцах тканей животных (препараты печени и селезенки крыс) и растений (меристема корешка риса), а также на культуре (A549). Исследуемые объекты фиксировались, проходили процедуру обезвоживания, заливки в смолу и приготовления ультратонких срезов. После этого осуществлялось сканирование блоков или срезов на АСМ. На полученных изображениях видна структура клеток: ядерная оболочка и хроматин ядер, плазматическая мембрана, мембраны вакуолярной системы (аппарат Гольджи, везикулы), митохондрии (рис. 1) и другие органеллы. Было показано, что при использовании алмазного ножа поверхность для исследования получается более ровной, а рельеф – более информативным, чем при резке стеклянным ножом.

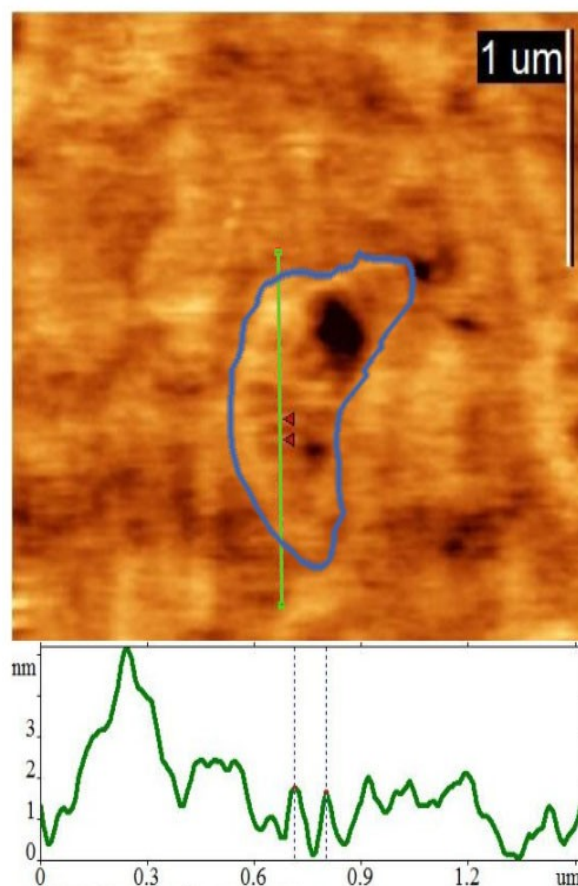


Рис. 1. Изображение митохондрии в препарате культуры клеток. Видны кристы, расстояние между ними ~100 нм.

Исследования срезов на АСМ дают возможность получать изображения, сопоставимые с малым увеличением просвечивающего электронного микроскопа (менее ~25000). Дальнейшее развитие методик позволит использовать АСМ как дополнительный метод для исследования тканей в сочетании с другими видами микроскопии.

ИЗУЧЕНИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ АНТИТЕЛ С ВИРУСОМ ШАРКИ СЛИВЫ МЕТОДОМ АТОМНО-СИЛОВОЙ МИКРОСКОПИИ

И.В. Сафенкова, А.В. Жердев, Б.Б. Дзантиев

Институт биохимии им. А.Н. Баха РАН

irina.safenkova@gmail.ru

Возможности атомно-силовой микроскопии (АСМ) позволяют проводить измерения в водных растворах и получать информацию о межмолекулярных силах взаимодействия на уровне единичных молекул. Лиганд-рецепторные взаимодействия были впервые изучены методом АСМ J.H. Hoh и J.P. Cleveland в 1993 г. [1]. Поливалентные системы пока мало исследованы.

Сложности при описании поливалентных взаимодействий и определении констант обусловлены стехиометрией реакции. Образование комплексов лиганд-рецептор разного состава может приводить к ошибочным результатам при вычислении констант реакции, протекающей в растворе. В связи с этим важное значение имеет разработка подходов к определению силы единичного взаимодействия между поливалентными биомолекулами. Цель работы состояла в количественной характеристике единичных межмолекулярных взаимодействий бивалентного антитела с поливалентным вирусным антигеном.

В качестве поливалентных реагентов были выбраны вирус шарки сливы (ВШС) (предоставлен д.б.н. С.Н. Чирковым, Биологический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова) и моноклональные антитела, специфичные к нему (получены в ЦНИИ туберкулеза РАМН). Вирионы ВШС представляют собой нитевидные частицы длиной 750 нм и диаметром 15 нм, состоящие из одной молекулы РНК и белка оболочки с молекулярной массой 36-38 кДа [2].

Измерения проводили на атомно-силовом микроскопе «SmartSPM» («АИСТ-НТ», Россия) в жидкостной ячейке в 50 мМ К-фосфатном буфере, pH 7,4, с 0,1 М NaCl (ФБС) с использованием нитрид-кремниевых кантилеверов PNP-DB («NanoWord AG», Швейцария).

Поверхность кантилевера модифицировали последовательно 2%-ным раствором APTEС (3-аминопропилтриэтоксисилан) в метаноле и SPDP (N-сукцинимидил 3-(2-пиридилдитио) пропионат) согласно [3]. После этого добавляли антитела, модифицированные малеимидометилциклогексан-1-карбоксии гидроксисукцинимидным эфиром

[3]. На части кантилеверов иммобилизовали антитела, не реагирующие с ВШС, для проверки специфичности изучаемого взаимодействия.

На поверхность свежесколотой слюды («SPI Supplies, Structure Probe», США) нанесли ВШС (100 мкг/мл, в ФБС) и сорбировали в течение 15 мин. Прежде чем перейти к измерениям сил взаимодействия в буфере, проверяли способность адсорбированного вируса взаимодействовать с антителами. Для этого на поверхность слюды с вирусом нанесли препарат антител, конъюгированных с наночастицами коллоидного золота со средним диаметром ($23,4 \pm 4,5$) нм. Конъюгат с частицами коллоидного золота использовали для лучшей визуализации. На рис. 1 представлено изображение комплексов, образованных ВШС и частицами конъюгата, полученное на воздухе с использованием кантилевера с радиусом кривизны 1 нм fpN01HR («Нанотюнинг», Россия). Для анализа результатов применяли программы «Aist» («АИСТ-НТ», Россия) и «Gwiddion» (Czech Metrology Institute, Чехия).

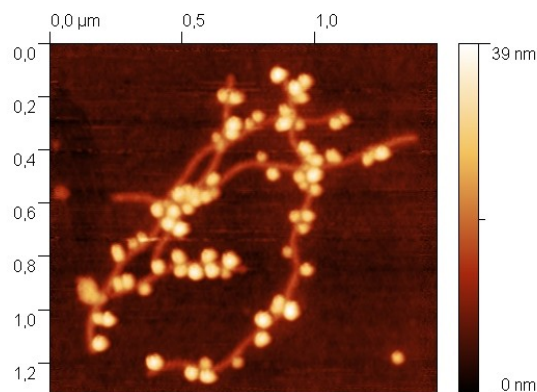


Рис. 1. Изображение комплексов, образованных ВШС и конъюгатами моноклональных антител с коллоидным золотом.

Измерение констант проводили следующим образом: в жидкостной ячейке сканировали образец с иммобилизованным ВШС в полуконтактном режиме нитрид кремниевым кантилевером с немодифицированной антителами поверхностью, получали изображение поверхности, меняли кантилевер на модифицированный, переходили в контактный ре-

жим, выбирали точку, в которой снимали зависимость силы по координате Z от расстояния зонд-поверхность. Точность позиционирования прибора позволяла использовать данные о местоположении вируса на поверхности, полученные в полуконтактном режиме.

В каждой точке снимали силовую кривую как минимум в пяти повторах. Типичный вид кривой, полученной при подводе к поверхности вируса кантилеверов со специфичными и неспецифичными антителами, представлен на рис. 2. Красными стрелками на рисунке обозначены значения сил на кривых отвода, которые необходимо приложить для разрыва комплекса вирус – антитело.

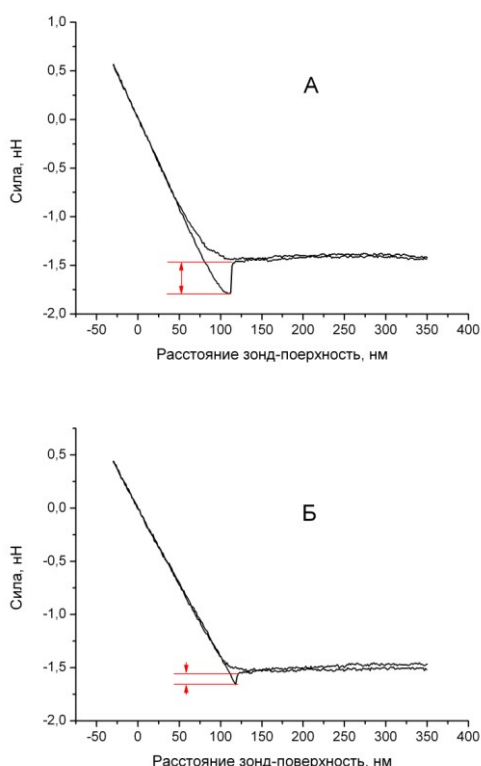


Рис. 2. Зависимость силы по координате Z от расстояния зонд-поверхность для кантилевера, модифицированного специфичными (А) и неспецифичными (Б) антителами.

Для специфичного и неспецифичного антитела было получено не менее 100 силовых кривых. Установлено, что сила отрыва для моноклональных антител, специфичных к ВШС, составляет (229 ± 90) пН. Этот результат соответствует значениям, указанным в работе [4], где отмечается, что для комплексов антиген-антитело с аффинностью от 10^2 до 10^{10} M^{-1} характерны силы отрыва в диапазоне 35-135 пН. Для данной пары реагентов нами была получена равновесная константа

диссоциации на приборе Biacore X («Biacore AB», Швеция) – $1,46 \cdot 10^8 \text{ M}$ [5]. Большое значение силы отрыва, полученное в эксперименте, может интерпретироваться как следствие участия во взаимодействии двух сайтов связывания антитела.

Предложенная методика для характеристики поливалентных взаимодействий с использованием метода АСМ может найти применение для оценки свойств конъюгатов антител, в частности – для сравнения конъюгатов разного состава.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ 09-03-90412-Укр_ф_а и ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009-2013 гг. (государственный контракт № П975).

Список литературы:

1. Hoh J.H., Cleveland J.P., J. Am. Chem. Soc., 114, 4917-4919 (1993).
2. Salvador B., Garcia J.A., Simon-Mateo C., Bull. OEPP/EPPO Bull., 36, 229-238 (2006).
3. Hermanson G.T., Bioconjugate Techniques, London, Academic Press, 2008.
4. Allen S., Chen X., Biochemistry, 36, 7457-7463 (1997).
5. Safenkova I.V., Zherdev A.V., Dzantiev B.B., J. Immunol. Meth. 357, 17–25 (2010).

СЛОЖНЫЕ ПОВЕРХНОСТИ МЕМБРАН ЭРИТРОЦИТОВ В ПОЛЕ АТОМНО-СИЛОВОГО МИКРОСКОПА «FEMTOSCAN» И ПОСЛЕДУЮЩИЙ ПРОСТРАНСТВЕННЫЙ ФУРЬЕ-АНАЛИЗ ЭТИХ ПОВЕРХНОСТЕЙ

А.М. Черныш, Е.К. Козлова, О.Е. Гудкова, М.С. Федорова, В.А. Сергунова
НИИ общей реаниматологии им. В.А. Неговского РАМН
olkagood@yandex.ru

В работе с помощью атомно-силовой микроскопии получали изображение поверхностей мембран эритроцитов при воздействии на клетки физико-химических факторов, в частности, при воздействии ионизирующими излучениями, фармхимпрепаратами, импульсным электрическим полем.

С помощью центрифуги DiffSpin 2 (USA) получали монослои эритроцитов крови человека. Мазки высушивали при комнатной температуре. Для получения изображений поверхности мембраны применяли атомно-силовой микроскоп FemtoScan и использовали его программное обеспечение. Сканирование проводили в контактном режиме стандартными кантилеверами. Сканировали поверхности в поле 10×10 мкм², 1×1 мкм², 200×200 нм².

Профиль поверхности мембраны представляет собой сложную кривую, представленную на рис. 1. При различных действиях на клетку, например, при разных дозах ионизирующих излучений, характер профиля поверхности меняется.

Однако выработка объективных критериев для сравнения профилей поверхностей представляет собой сложную задачу. Оценка шероховатостей стандартными методами существенно зависит от выбора поверхности отсчета, что вносит в исследование существенную зависимость от индивидуального подхода.

Мы предложили использовать для анализа поверхности преобразование Фурье, разложение на 3 порядка в зависимости от пространственного периода [1, 2].

Первый порядок в диапазоне T1 600-1000 нм, второй порядок в диапазоне T2 200-400 нм, третий порядок в диапазоне T3 80-120 нм.

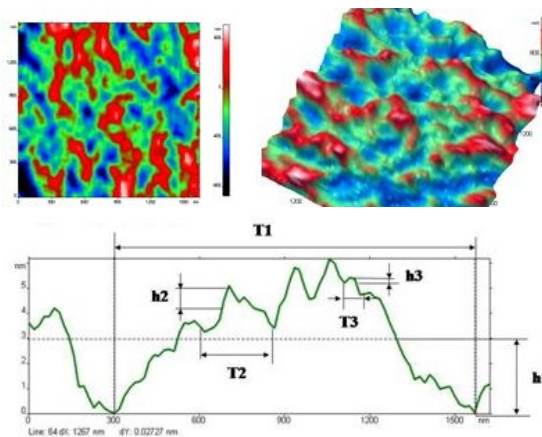
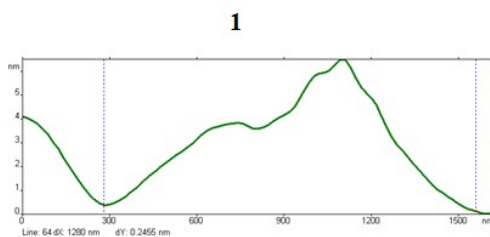
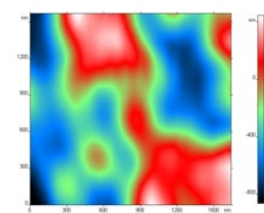


Рис. 1. Поверхность мембраны эритроцитов и ее профиль: а) плоское изображение; б) профиль мембраны; в) объемное изображение мембраны.

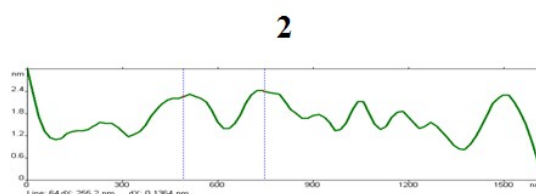
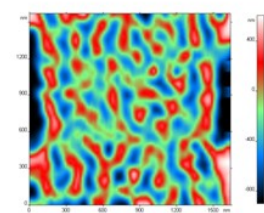
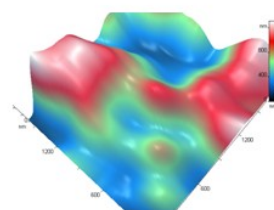
Характерные периоды и высоты каждого из порядков являлись объективными критериями оценки воздействия на мембраны эритроцитов.

Первый порядок соответствует макроструктуре объекта и определяет возможности ионного обмена. Второй порядок соответствует размерам спектринового матрикса клетки. Третий порядок соответствует характерным размерам между каналобразующими белками типа band 3 и band 4. Поверхности соответствующих порядков и их профили представлены на рис. 2. Такой подход позволил достоверно оценить величину воздействия на мембрану гамма-излучения, пучков электронов в широком диапазоне доз, действия фиксатора глутарового альдегида на мембрану, действия миореалаксантов при различных их концентрациях и ряда других факторов.

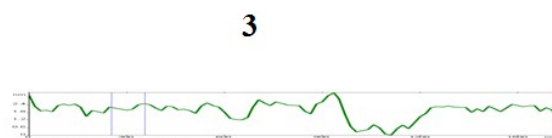
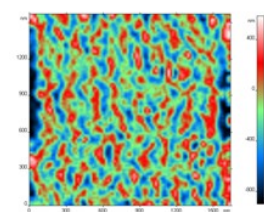
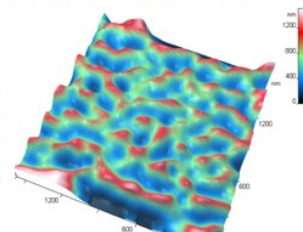
Поверхности 1, 2, 3 порядков



T1~1000 nm h1~ 2.5nm



T2~300 nm h2~ 1nm



T3~300 nm h3~ 0.5nm

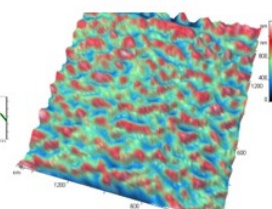


Рис. 2. Поверхности 1, 2, 3 порядков и их профили.

Список литературы:

1. Chernysh A.M., Kozlova E.K., Moroz V.V., Borshegovskaya P. Yu, Blizniuk U.A., Rysaeva R.M. The surface of erythrocyte membrane under calibrated electroporation: the study by atomic force microscopy, *Bullet.*

Experim. Biol. And Medic, 148, 9, 47-352 (2010).

2. Moroz V.V., Chernysh A. M., Kozlova E. K., Borshegovskaya P. Yu., Blizniuk U.A., Rysaeva R. M., Gudkova O. Ye. Comparison of red blood cell membrane microstructure after different physicochemical influences: Atomic force microscope research, *Journal of Critical Care* (2010).

ЗОНДОВАЯ МИКРОСКОПИЯ И НАНОЛИТОГРАФИЯ УГЛЕРОДНЫХ МАТЕРИАЛОВ

О.В. Синицына, Г.Б. Мешков, И.В. Яминский

Институт элементоорганических соединений им. А.Н. Несмеянова РАН

МГУ им. М.В. Ломоносова

НПП «Центр перспективных технологий»

sinitsyna@gmail.com

Углеродные материалы, графит, графен, углеродные нанотрубки, привлекают значительное внимание исследователей, так как обладают уникальными физическими и химическими свойствами. Потенциал углеродных материалов раскрывается в различных направлениях, среди которых наиболее важным является наноэлектроника. Для развития углеродной наноэлектроники требуется решить ряд важных задач: подбор диэлектрических материалов и разработка методов нанолитографии для реализации электронных схем, контроль структуры и локальных свойств используемых в производстве материалов.

Указанные задачи могут быть успешно решены с использованием методов зондовой микроскопии и литографии. Данные методы позволяют исследовать топографию поверхности и локальные свойства материалов с высоким пространственным разрешением. Нами предложен метод локального анодного окисления (ЛАО) углеродных материалов, позволяющий с помощью зондового микроскопа создавать диэлектрические наноструктуры на поверхности углеродных материалов. Для осуществления ЛАО предложена новая конструкция зонда [1, 2].

В докладе представлены результаты исследования процесса ЛАО поверхности высокоориентированного пиролитического графита производства ООО «Атомграф-Кристалл». Литография выполнялась на мультифункциональном сканирующем зондовом микроскопе «ФемтоСкан» производства «Центр перспективных технологий».

Установлено, что процесс ЛАО поверхности графита протекает в два этапа. На первом этапе высота поверхности практически не изменяется, но значительно возрастает коэффициент трения между модифицированной поверхностью графита и зондом. На втором этапе наблюдается увеличение высоты поверхности. Высота формируемых структур зависит линейно от величины приложенного напряжения (рис. 1) и от времени воздействия зонда на поверхность. По нашему пред-

положению, на первой стадии происходит частичное окисление поверхностного слоя графита, что объясняет резкий рост коэффициента трения, затем начинается процесс интеркаляции адсорбированной на поверхности воды в межслоевое пространство, что приводит к росту высоты поверхности.

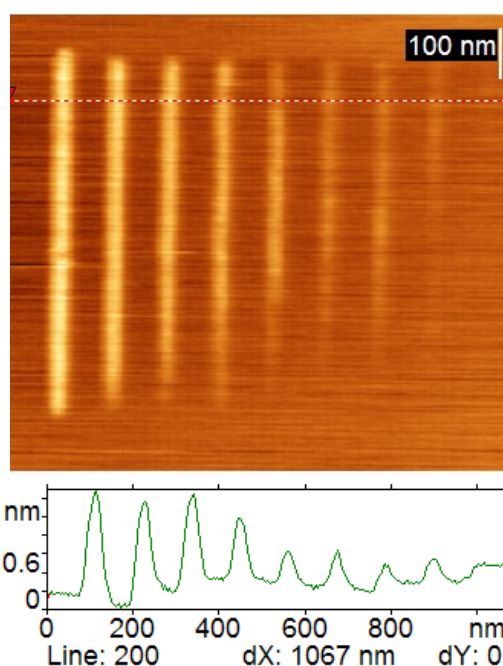


Рис. 1. Серия линий, полученных методом локального анодного окисления поверхности графита при различных напряжениях.

Авторы выражают благодарность за поддержку Роснауке и Рособразованию (госконтракты: 02.512.11.2279, 02.513.11.3448, П255, П717, П973), НАТО (программа «Наука для мира» грант CBN.NR.NRSFP 983204) и Корейскому институту науки и технологий (проект KIST-MSU).

Список литературы:

1. Мешков Г.Б., Синицына О.В., Яминский И.В., Патент на изобретение «Зонд для локального анодного окисления материалов» №2383078, 27.02.2010, бюл. № 6.
2. Мешков Г.Б., Синицына О.В., Яминский И.В., Патент на полезную модель «Зонд для локального анодного окисления материалов (Варианты)» №86342, 27.08.2009, бюл. № 24.

РАЗРАБОТКА СПОСОБА ФИКСАЦИИ ДНК НА ПОДЛОЖКУ ИЗ МОНОКРИСТАЛЛА КРЕМНИЯ n-ТИПА И ИССЛЕДОВАНИЕ ЭЛЕКТРОФИЗИЧЕСКИХ СВОЙСТВ СФОРМИРОВАННОЙ ПОВЕРХНОСТИ

Н.В. Базлов, П.А. Соколов, А.О. Пучкова, И.Л. Волков, Н.А. Касьяненко
Физический факультет Санкт-Петербургского государственного университета
farshmac@inbox.ru

В связи с развитием новых технологий конструирования и исследование наноструктур на основе биополимеров представляет большой интерес. Одним из наиболее перспективных объектов для подобного манипулирования является молекула ДНК. Комплементарность цепочек, допускающая управляемую самосборку, и изученное в достаточной мере взаимодействие с лигандами, повышающими проводимость ДНК, позволяют использовать ее для решения ряда задач нанобиотехнологий, актуальных для создания электронных устройств нового поколения. В связи с этим существует проблема сопряжения макромолекул с элементами твердотельной электроники.

Предложен способ фиксации ДНК и других полиионов на поверхность монокристалла кремния. Рассмотрены условия подготовки поверхности и проведен анализ влияния состава растворителя на процесс иммобилизации полимеров. Изучены вольт-амперные (ВАХ), вольт-фарадные (ВФХ) характеристики шоттки-диодов, полученных термическим напылением на поверхности приготовленных образцов Au-контактов. Обсуждается роль полупроводника в процессе металлизации серебром зафиксированной на его поверхности молекулы ДНК.

Использовали высокомолекулярную тимусную ДНК (Sigma), монокристаллы кремния n-типа. Фиксацию полимеров на поверхности кремния проверяли методом атомно-силовой (NanoScope 4a, Veeco), сканирующей электронной (Zeiss Supra 40VP) и ионной гелевой (Zeiss ORION) микроскопии. В зависимости от способа фиксации были получены образцы с одиночными макромолекулами на поверхности и с собранными в «жгуты» спиральями, образующими вытянутые протяженные структуры длиной порядка нескольких микрометров и толщиной до 20 нм, которые могут быть использованы, например, для создания нанопроволок (см. рис. 1).

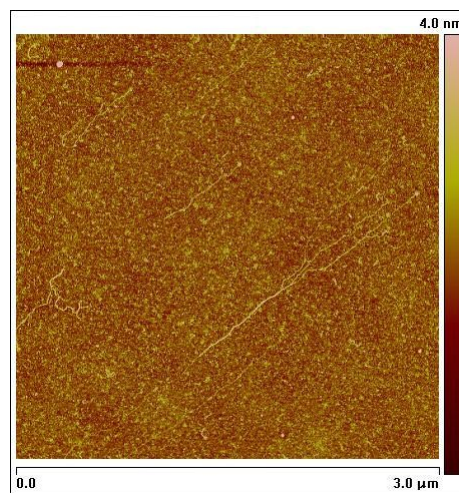


Рис. 1. АСМ-изображение ДНК на поверхности кремния.

Измерения ВАХ показали, что фиксация молекул ДНК на свету приводит к уменьшению тока насыщения диода и уменьшению коэффициента неидеальности до величин, характерных для идеального диода $n \cong 1,05$. Напротив, образцы, приготовленные в темноте, характеризовались возросшей величиной тока насыщения и увеличением коэффициента неидеальности до $n \cong 1,5$. ВФХ образцов, приготовленных при освещении, слабо отличались от ВФХ референсных диодов. При фиксации молекул в темноте наблюдалось уменьшение высокочастотной емкости диода, свидетельствующее о присутствии на поверхности дополнительного отрицательного заряда. Величина поверхностной плотности интерфейсных состояний при фиксации молекул в темноте, определенная из ВАХ и величин низкочастотной емкости, составляла порядка $N_s = 2 \cdot 10^{-12} \text{ см}^{-1}$, что соответствовало оценке, полученной из поверхностной плотности молекул на АСМ-изображениях.

МЕТРОЛОГИЧЕСКОЕ ОБЕСПЕЧЕНИЕ ИЗМЕРЕНИЙ ГЕОМЕТРИЧЕСКИХ И МЕХАНИЧЕСКИХ ВЕЛИЧИН В НАНОМЕТРОВОМ ДИАПАЗОНЕ МЕТОДАМИ СЗМ

В.В. Соловьев¹, К.В. Гоголинский¹, В.Г. Лысенко²,

С.А. Кононогов², К.Л. Губский³

¹ ФГУ ТИСНУМ, г. Троицк, ²ФГУП ВНИИМС, г. Москва, ³НИЯУ МИФИ, г. Москва

vladimir.sol@bk.ru

Одним из приоритетных направлений развития науки и техники в настоящее время является разработка и внедрение достижений в области нанотехнологий. Использование подобных разработок в областях биологии, медицины, микроэлектроники, материаловедения, создания конструкционных и других функциональных наноструктурированных материалов требует создания средств измерений, позволяющих контролировать рабочие параметры объектов на всех стадиях их жизненного цикла.

Повышение точности и достоверности результатов, получаемых с помощью вновь создаваемого оборудования, требует создания метрологических комплексов и нормативно-методической базы для обеспечения единства измерений в сфере nanoиндустрии.

Развитие приборной составляющей nanoиндустрии невозможно без:

- разработки, аттестации и производства приборов, работающих на принципах сканирующей зондовой микроскопии и наноиндентирования;
- разработки, изготовления и аттестации стандартных образцов для калибровки разрабатываемого оборудования и контроля погрешности выполняемых на нем измерений;
- разработки и аттестации методик выполнения измерений свойств наноструктурированных материалов, а так же методик калибровки средств измерений геометрических и механических параметров наноматериалов;
- разработки нормативных документов, регламентирующих проведение измерений параметров и испытаний наноматериалов;
- подготовки документации, в том числе проектов национальных стандартов, на методики выполнения измерений и методики калибровки средств измерений свойств наноструктурированных материалов и параметров продукции nanoиндустрии.

Переход к наноразмерным структурам открывает новые возможности для биологии, медицины, электроники, материаловедения и других сфер научной деятельности, это свя-

зано с тем, что в основе создания и исследования наноструктур лежит так называемый «размерный эффект».

Целью работы являлось проведение исследований для создания основ метрологического обеспечения приборов, представляющих из себя СЗМ с возможностью измерения геометрических и механических свойств в нанометровом диапазоне линейных размеров на примере метрологического СЗМ «НаноСкан-3Д», а также, аттестация и реализация новых методик измерений для определения свойств поверхности с использованием подобного оборудования. Рассмотрены особенности обеспечения единства измерений геометрических и механических свойств поверхности в нанометровом диапазоне при применении метрологического СЗМ «НаноСкан-3Д». Предложен ряд стандартных образцов предприятия (рабочих эталонов) для осуществления юстировки режима измерительного динамического индентирования при измерениях механических свойств в нанометровом диапазоне. Приведены результаты межлабораторного эксперимента с применением средств измерений нанометрового диапазона различных типов.

С целью повышения точности измерения геометрических параметров исследуемых объектов на базе СЗМ «НаноСкан-3Д» был создан прибор с интерферометрической приставкой (метрологический СЗМ). Такая модификация прибора позволяет определять геометрические параметры исследуемых объектов с точностью до 1 Å, а так же обеспечить прослеживаемость результатов к эталону единицы длины. Полученные характеристики делают возможным создание на базе разработанной модификации СЗМ «НаноСкан-3Д» эталона в области измерений геометрических параметров, кроме того особенности конструкции используемого оборудования способствуют дальнейшему улучшению его метрологических характеристик.

ОПЫТ ПРИМЕНЕНИЯ АТОМНО-СИЛОВОЙ МИКРОСКОПИИ В ОНКОЛОГИИ

С.С. Сухарев, И.В. Решетов, Е.Н. Славнова
Кафедра Онкологии ФГОУ ИПК ФМБА России
voimega@mail.ru

Известно, что процессы малигнизации проходят на субклеточном субмикронном уровне, поэтому с применением атомно-силовой микроскопии (АСМ) связаны надежды получения новой, полезной для понимания этих процессов информации. В наших исследованиях АСМ нашла применение в трех аспектах.

Мы подвергали сканированию рутинные препараты, которые в массовом порядке изучаются во всех цитологических лабораториях. Оказалось, что АСМ позволяет получить из указанных образцов важную дополнительную информацию. В частности, диагностическую ценность имеют следующие наблюдения:

1. Измерение интрануклеарных включений цитоплазмы при раке щитовидной железы (рис. 1);
2. Обнаружение и измерение перинуклеарной борозды койлоцитов при вирусном поражении шейки матки;
3. Объективизация результатов иммуноцитохимической реакции при определении продукции маркерных протеинов.

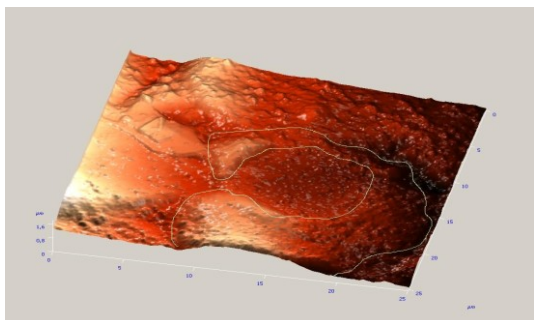


Рис. 1. Интрануклеарное включение цитоплазмы при раке щитовидной железы.

АСМ является адекватным инструментом при изучении лекарственных форм, включающих в свой состав наночастицы или наноконструкции (рис. 2). В частности, этот метод исследований позволяет определить размеры наночастиц, их концентрацию и среднее расстояние между частицами, ответить на вопрос образуют ли они конгломераты в данном конкретном геле.

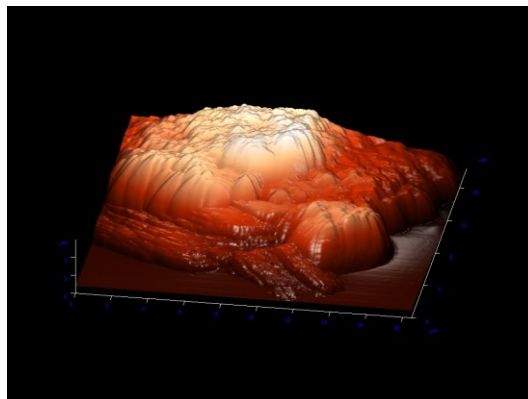


Рис. 2. Терапевтические наночастицы, диспергированные в геле.

Мы изучали динамику изменения параметров поверхностей электродов для индукции гипертермии переменным электромагнитным полем. Контроль на субмикронном уровне за изменением характеристик поверхности электрода в ходе многократных циклов «применение – стерилизация» позволяет дать рекомендации по многократному применению дорогостоящих расходных материалов и существенно снизить стоимость лечения. В Таблице 1 приведены типовые значения параметров шероховатости поверхности электрода на трех этапах: после вскрытия упаковки (столбец 1), после первого применения (столбец 2) и после стерилизации (столбец 3).

	1	2	3
Rq	66,99	123,91	67,29
Ra	51,3	91,81	46,80
Rz	948,25	2057,79	599,05

Таблица 1. Изменение свойств поверхности электрода.

Параметры шероховатости возросли после первого применения электрода, но практически вернулись к исходным значениям после стерилизации.

АСМ дает дополнительную важную для диагностики информацию, его результаты могут быть использованы для изучения поверхностей применяемых в медицине инструментов и лекарственных форм, включающих в свой состав наночастицы.

КОМПЬЮТЕРНОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ КАК СПОСОБ ПОВЫШЕНИЯ ИНФОРМАТИВНОСТИ АТОМНО-СИЛОВОЙ МИКРОСКОПИИ БИОПОЛИМЕРОВ

А.П. Толстова
МГУ им. М.В. Ломоносова
Solly8@mail.ru

С развитием современных методов молекулярной биологии стало возможным разрешать трехмерную структуру биополимеров (в частности белков) с высоким качеством. Основные методы – рентгеноструктурный анализ (РСА) и метод ядерно-магнитного резонанса позволили создать внушительную базу данных структур биополимеров в растворах и кристаллах. Однако эти методы не позволяют получать структуры адсорбированных биополимеров в нативных условиях, тем самым существенно ограничивая развитие этой области молекулярной биологии.

Атомно-силовая микроскопия (АСМ) обладает рядом важнейших качеств, подходящих для решения указанной проблемы, однако все преимущества нивелируются недостаточным для данной задачи разрешением метода и большим количеством возникающих в процессе сканирования артефактов [1, 2, 3].

Описанная проблема может быть решена единственно привлечением других экспериментальных или теоретических методов для совместной трактовки данных. Наиболее перспективным с этой точки зрения представляется компьютерное моделирование, на основе которого становится возможным создать новый метод анализа и обработки данных атомно-силовой микроскопии.

Его суть заключается в построении модельного АСМ-изображения и включает в себя 2 стадии:

1. Проведение компьютерного моделирования процесса адсорбции исследуемого биополимера при тех же параметрах окружающей среды, что и в АСМ-эксперименте;
2. Построение компьютерной модели процесса зондового сканирования.

Для апробации метода был выбран коммерчески доступный белок лизоцим компании Seikagaku Corporation. Сканируемый образец представлял собой мономеры лизоцима иммобилизованные на поверхности свежесколотой слюды из водного раствора (рис. 1).

Методами силового поля в среде NAMD была проведена симуляция адсорбции молекулы лизоцима. Слюда моделировалась оксидом кремния. Адсорбция происходила в

водной среде, моделировавшейся дискретными молекулами. Исходная структура лизоцима, полученная методом РСА, была взята из Брукхевенского банка данных. Конечная конформация (рис. 2) участвовала в модели зондового сканирования. Моделировался процесс регистрации поверхности зондом: выбиралась горизонтальная сетка, в каждом узле которой фиксировалась точка с максимальной координатой по оси z, в которой происходило перекрывание радиуса Ван-дер-Ваальса атомов образца и атомов пробного зонда. Пробный зонд представлял собой 8 атомов кремния, упакованных в куб.

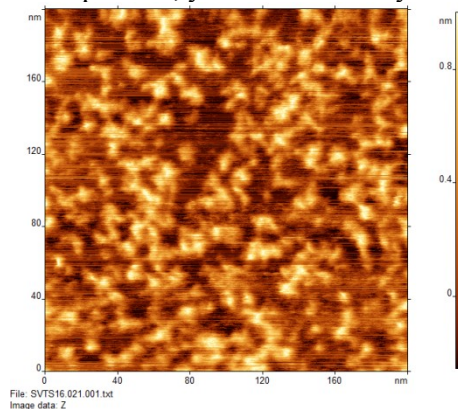


Рис. 1. Лизоцим на слюде, концентрация 0,05 мкг/мл и время сорбции 20 мин.

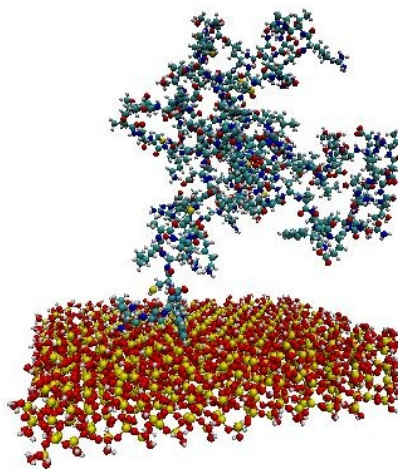


Рис. 2. Модель адсорбции лизоцима.

В результате получалась двумерная сеточная функция $Z(x,y)$, представляющая со-

бой рельеф поверхности (рис. 3). Это идеальное АСМ-изображение.

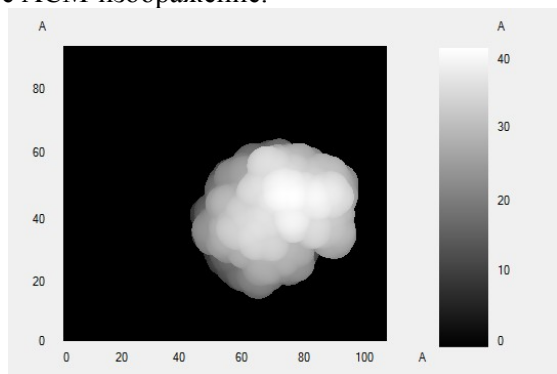


Рис. 3. модель АСМ-изображения.

АСМ-изображение также представляет собой двумерную сеточную функцию $Z(x,y)$, поэтому появляется возможность провести корреляционный анализ.

В результате оказалось, что данные реального и компьютерного эксперимента отличаются в несколько раз. Это различие вызвано в первую очередь высыханием белка в экспериментах с АСМ, а также зашумленностью АСМ изображения и сильной деформацией белка в процессе сканирования: в работе [4] показано, что белки массой меньше 30 кДа не могут быть адекватно визуализированы в зондовой микроскопии. Вдобавок, по данным атомно-силовой микроскопии [5], лизоцим при агрегации на отрицательно заряженную поверхность медленно расползается по поверхности, чтобы увеличить площадь контакта. Этот процесс не описывается в рамках молекулярной динамики. Также, по сильному различию реальных и ожидаемых экспериментальных данных, следует предположить, что на поверхности образца содержалась тонкая пленка конденсированной воды, скапливающейся между молекулами белка и уменьшающая тем самым максимальную высоту объектов.

Для решения возникшей проблемы планируется улучшить модель зондового сканирования, в которой предполагается учесть инерционность кантилевера в процессе колебаний [6], а также учесть процесс испарения и конденсации воды. Ожидается, что в такой модели белок будет взаимодействовать с подложкой большей площадью, что снизит его вертикальные размеры. В такой модели в каждом узле решетки пробный зонд будет совершать колебания с частотой резонанса и амплитудой, полученными из эксперимента, регистрация сигнала будет проводиться при изменении амплитуды колебаний на порядок, указанный в эксперименте. Поскольку наи-

более вероятно, что вклад высыхания и конденсации в разницу форм и размеров экспериментального и модельного белков максимальный, требуется отдельное детальное рассмотрение вопросов, связанных с моделированием этих процессов.

В перспективе предложенный метод может открыть следующие возможности:

1. получение дополнительных данных о структуре исследуемого биополимера: соотношение и природа сил, действующих на зонд; определение аминокислот, связанных с подложкой и силы связи биополимера с подложкой;
2. определение свойств биополимера в растворе: размеры, заряд, функциональная активность;
3. проведение исследований конформационных преобразований биополимеров *in vitro*;
4. существенное улучшение точности зондовой микроскопии.

К недостаткам метода следует отнести ограниченность области исследуемых объектов качеством и количеством структур в банках данных.

Проблема зондовой микроскопии состоит в необъективности получаемых данных. Проблема компьютерных моделей – в оторванности от реальности, в их ограниченности и неточности. Соединение этих двух методов даст уверенное, не иллюзорное понимание молекулярных процессов, происходящих в биополимерах.

Список литературы:

1. Миронов В.Л. Основы сканирующей зондовой микроскопии, М., Техносфера, 2004.
2. Bustamante C., Keller D., Scanning Force Microscopy in Biology., *Physics Today*, 32-38 (1995).
3. Louder D.R., Parkinson B.A., An Update on Scanning Force Microscopies, *Analytical Chemistry*, 67 (9), 297-303 (1995).
4. Schneider S.W., La Mermer J., Henderson R.M., Oberleithner H., Molecular weights of individual proteins correlate with molecular volumes measured by atomic force microscopy, *Pflugers Archiv European Journal of Physiology*, 435 (3), 362-367 (1998).
5. Ермакова Е.А., Применение броуновской динамики для изучения механизма взаимодействия белков, *Структура и динамика молекулярных систем*, X(2), 191-193 (2003).
6. Choi J.L., Gethin D.T., Simulation of atomic force microscopy operation via three-dimensional finite element modeling, *Nanotechnology*, 20, 065702, 1-14 (2009).

АДАПТАЦИЯ *A. LAIDLAWII* PG8 К НЕБЛАГОПРИЯТНЫМ УСЛОВИЯМ СРЕДЫ: ИССЛЕДОВАНИЕ КЛЕТОК МИКОПЛАЗМЫ МЕТОДОМ АТОМНО-СИЛОВОЙ МИКРОСКОПИИ

М.В. Трушин^{1,2}, В.М. Чернов¹, О.А. Коновалова²,
Е.С. Медведева, М.Н. Давыдова, О.А. Чернова¹

¹Казанский институт биохимии и биофизики РАН

²Казанский государственный университет

mtrushin@mail.ru

Acholeplasma laidlawii – «вездесущая» микоплазма (класс *Mollicutes*), встречается в почве и компосте, способна инфицировать растения, беспозвоночных и позвоночных животных, и в том числе человека; основной контаминант клеточных культур, в том числе используемых для производства вирусных вакцин. Разработку методов эффективного контроля инфекций, вызываемых *A. laidlawii*, связывают с изучением адаптации микоплазмы к разным условиям среды.

Ранее в наших исследованиях было установлено, что в неблагоприятных условиях среды (НУС) изменяется морфология, ультраструктура, пролиферация, экспрессия генов и вирулентность клеток микоплазм [1, 2]. Результаты анализа трансмиссионных микрографий клеток *A. laidlawii* позволяют предположить, что в НУС в популяции микоплазмы образуются клетки с размером, близким к теоретическому минимуму для клеток, способных к самостоятельному самовоспроизведению. Для проверки этого предположения необходимы дополнительные исследования, связанные с морфологическим анализом.

Задачу настоящей работы составило проведение сравнительного анализа морфологии и размеров клеток *A. laidlawii*, образующихся в разных условиях среды, с помощью атомно-силовой микроскопии (АСМ). Исследование образцов проводили на атомно-силовом микроскопе Solver P47H (ЗАО «НТ-МДТ», Россия). В работе использовали кантилеверы μpN 11S (НИИФП, Россия) радиусом 10 нм. Визуализацию проводили в полуконтактном режиме, для обработки данных использовали программу Nova 1.0.26 RC1 (НТ-МДТ, Россия). В качестве подложки использовали слюду, клетки высушивались на воздухе. Были проанализированы форма, высота, диаметр и объем клеток.

В результате анализа полученных данных было установлено, что в популяциях клеток контрольной и опытной культур присутствуют как «типичные», так и мелкие клетки микоплазмы – ультрамикрoформы (УМФ).

Количественное соотношение этих клеток в разных культурах микоплазмы различается. В случае контрольной культуры большая часть популяции представлена «типичными» клетками микоплазмы, а в случае опытной – наоборот. При длительном культивировании микоплазмы в НУС наблюдается более чем двукратное увеличение количества клеток, объем которых меньше объема минимальной клетки с диаметром 150 нм.

Таким образом, впервые в результате анализа клеток *A. laidlawii* с помощью метода АСМ было показано, что адаптация микоплазм к НУС связана с активной трансформацией клеток в УМФ, объем которых меньше теоретически рассчитанного для минимальной клетки.

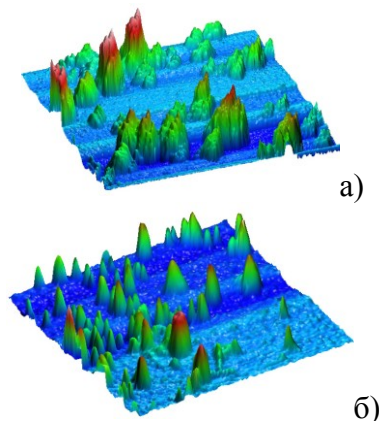


Рис. 1. Топографическое изображение клеток *A. laidlawii* PG8, культивированных на полноценной (а) и дефицитной среде (б). Размер кадра 3×3 мкм².

Список литературы:

1. Чернов В.М., Мухаметшина Н.Е., Гоголев Ю.В., Абдрахимов Ф.А., Чернова О.А., Микробиология, 74 (4), 498-504 (2005).
2. Chernov V.M., Moukhametshina N.E., Gogolev Y.V., Nesterova T.N., Trushin M.V., Chernova O.A., The Scientific World Journal, 7, 1-6 (2007).

ОСОБЕННОСТИ КРИСТАЛЛИЗАЦИИ РАСПЛАВА УГЛЕРОДА НА РАЗЛИЧНЫХ ГРЯНЯХ ВЫСОКООРИЕНТИРОВАННОГО ГРАФИТА

А.Ю. Башарин, М.А. Турчанинов

*Объединенный институт высоких температур, РАН
turchaninoff@mail.ru*

Прогресс науки в большой степени связан с новыми веществами и материалами, а также с разработкой новых методов получения уже известных веществ. Применительно к углеродным материалам наибольший фундаментальный и практический интерес представляют полученные в последние десятилетия метастабильные при нормальных условиях твердые структуры, такие как фуллерены, в том числе полимеризованные, нанотрубки, карбин, алмаз, в том числе наноалмазы, онионы и некоторые другие. Жидкий углерод – один из самых малоизученных расплавов элементов периодической системы, имеющий не только экстремально высокую температуру, но и повышенное давление в тройной точке графит–жидкость–пар, соответственно на уровне 5000 К и 10 МПа [1]. Поэтому неудивительно, что среди методов получения новых форм углерода практически отсутствуют методы кристаллизации расплава углерода и углеродного пара при участии жидкой фазы. По сути, отсутствует целый пласт технологий, широко применяющихся для получения металлов и сплавов, полупроводников и полимеров. Следует, правда, упомянуть о методах получения нанотрубок по механизму пар–жидкость–кристалл, но в этом случае рост идет из жидкого карбида, а не из однокомпонентного жидкого углерода.

В то же время углерод, имея столь высокое давление в тройной точке, предоставляет уникальную возможность для синтеза метастабильных фаз. Действительно, выдерживая строго изобарные условия плавления графита, в непосредственной близости к тройной точке, можно получать сколь угодно малые количества жидкости. Импульсные методы плавления графита, применяемые для получения жидкого состояния, обеспечивают в этом случае и сверхвысокие скорости закалки. Как известно, скорости закалки жидкости более 10^6 К/с приводят к образованию метастабильных твердых фаз, в том числе метастабильных фаз высокого давления в области стабильности фазы низкого давления.

В настоящий момент известна всего одна стабильная фаза высокого давления, линия плавления которой имеет безусловное место

на фазовой диаграмме углерода – это алмаз. Достаточно точно экспериментально определено давление в тройной точке алмаз–графит–жидкость величиной около 12 ГПа. Метастабильные состояния веществ, имеющих области стабильности на фазовой диаграмме являются неотъемлемой частью фазовых диаграмм. Им соответствуют области сосуществования метастабильной фазы с переохлажденной (метастабильной) жидкостью, в которых они находятся в состоянии квазиравновесия, отделенном от состояния глобального равновесия энергетическим барьером. Такая область для алмаза грубо очерчена на фазовой диаграмме углерода Банди [1] до давления 5 ГПа.

Дискутируется вопрос о месте на фазовой диаграмме еще двух форм углерода – полимерной формы карбина и металлического углерода. Предполагается, что при температуре выше 2600 К и давлении в районе 0,1 МПа происходит твердофазный переход графит–карбин. Однако на сегодняшний момент собранных данных явно недостаточно для однозначных выводов, поэтому область существования карбина представлена на фазовой диаграмме углерода в версии Банди лишь условно. Аналогичная ситуация складывается и с металлическим углеродом, область существования которого располагается в области давлений выше 200 ГПа.

Именно алмаз и карбин, и возможно металлический углерод (фаза ВС8), наряду с графитом, скорее всего, должны образовываться в процессах неравновесной кристаллизации жидкого углерода. Можно предположить, что другие метастабильные фазы, имеют слишком высокие значения энергии Гиббса и для них условия квазиравновесия с переохлажденным, а тем более стабильным жидким углеродом выполнены быть не могут. Вопросы формо- и структуро- образования фактически не исследованы ни для равновесных, ни для неравновесных условий кристаллизации жидкого углерода. Парадоксально, но указанная область тройной точки менее изучена, чем область давлений в районе единиц и десятков гигапаскалей и уме-

ренных температур не превышающих 2000 К, традиционных для синтеза алмаза.

В настоящей работе показано, что при плавлении базисной грани НОРГ лазерным импульсом длительностью 1 мс в твердой подложке возникают значительные механические напряжения. Сжимающие напряжения приводят к появлению после эксперимента выпуклой сетки прямолинейных элементов, показанных на рис. 1.

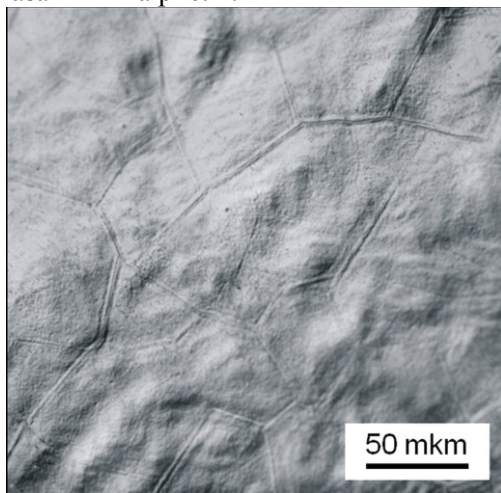


Рис. 1. Линейные элементы, возникающие в результате механических напряжений на (001) НОРГ.

Другим последствием возникновения напряжений является появление винтовых дислокаций из-за смещения графеновых слоев в направлении, перпендикулярном базисному. Это в свою очередь приводит к слоисто-спиральному росту эшелонных элементарных ступеней графита с шагом около 20 нм при кристаллизации слоя жидкого углерода толщиной около 3 мкм. Один из таких эшелонов показан на рис. 2.

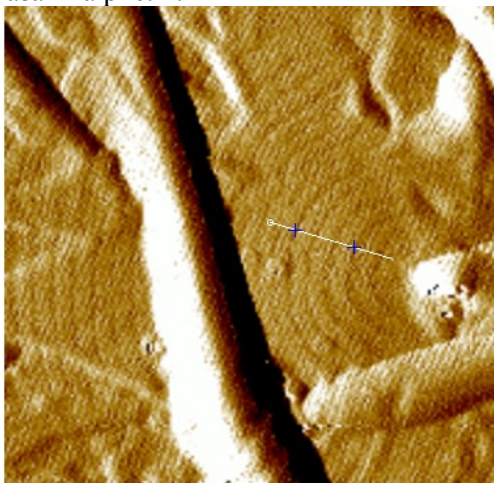


Рис. 2. Эшелон элементарных ступеней роста на поверхности расплава, закристаллизованного на грани (001) НОРГ. Скан 500 x 500 нм².

Таким образом, при плавлении базисной грани НОРГ, всегда имеются готовые ступени роста, которые приводят к тому, что кристаллизация жидкого углерода идет практически без переохлаждения.

Совершенно другая картина наблюдается при кристаллизации жидкого углерода на призматической грани НОРГ. В этом случае связи чрезвычайно слабы, а расстояния между графеновыми слоями велики, что демпфирует расширение графита при нагреве и готовых ступеней роста не образуется. Жидкость на такой грани в состоянии переохлаждаться ниже температуры плавления метастабильной фазы [2], что наблюдалось нами по образованию ряда метастабильных фаз при ее кристаллизации. Формировались алмаз, карбин и сверхплотная фаза С8, что зафиксировано методами просвечивающей электронной микроскопии [3]. Высокая вязкость переохлажденной жидкости приводила к тому, что волны, специфичные для лазерных жидкостей, не рассасывались и затвердевали в виде поверхностных периодических структур с периодом 700 нм и глубиной около 100 нм, показанных на рис. 3.

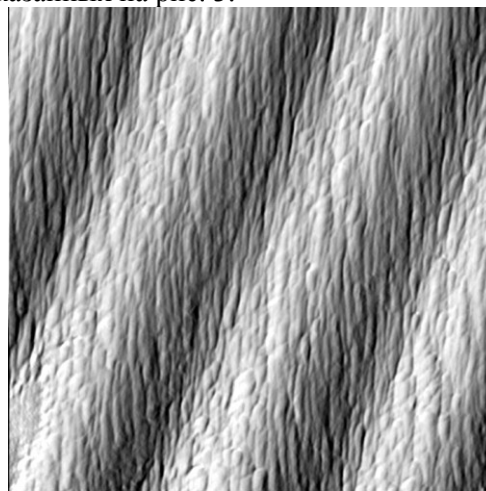


Рис. 3. Вид ППС в атомно-силовом микроскопе. Скан 2 x 2 мкм².

Список литературы:

1. Bundy F.P., Bassett W.A., Weathers M.S., Hemley R.J., Mao H.K. and Goncharov A.F., Carbon, 34, 2, 141–153 (1996).
2. Башарин А.Ю., Дождиков В.С., Кириллин А.В., Турчанинов М.А., Фокин Л.Р., Письма в Журнал технической физики, Принята к печати 12.02.2010.
3. Башарин А.Ю., Дождиков В.С., Дубинчук В.Т., Кириллин А.В., Лысенко И.Ю., Турчанинов М.А., Письма в Журнал технической физики, 35, 9, 84-92 (2009).

FLUORESCENT PROBE AND AFM STUDY OF THE CHANGES IN FINE STRUCTURE AND FUNCTIONAL STATE OF LYMPHOCYTE MEMBRANES EXPOSED TO VARIOUS CONCENTRATIONS OF ZINC

D.S. Filimonenko¹, A.Ya. Khairullina¹, E.I. Slobozhanina,²
N.M. Kozlova², V.M. Yasinskii¹

¹ *Stepanov Institute of Physics, National Academy of Sciences of Belarus, Minsk*

² *Institute of Biophysics and Cell Engineering, National Academy of Sciences of Belarus, Minsk
demonr@tut.by*

The study on changes in the structure of blood cell membranes under the action of stress, tension, various substances and environmental conditions by atomic force microscopy (AFM), is the subject of growing interest [1]. It is due to the fact that blood cells respond to the adverse operating conditions in the first instance.

The plasma membrane of the cell is one of the main targets for heavy metals, in that way alteration of membrane surface structure represents an important sign of the interaction between blood cell and heavy metal ions. However, membrane mechanisms of toxic action of heavy metals are not entirely clear.

In our previous study, it was revealed that zinc and lead ions at subhemolytic concentrations increase heat vesiculation of erythrocytes, which is caused by oxidation of SH-groups of membrane proteins, and also reduce the activity of acetylcholinesterase and methemoglobinreductase as well as produce changes in the microviscosity of membrane lipids [2, 3]. By means of AFM it was found that surface roughness of erythrocytes membrane increased with concentration of metal as a result of clustering of the protein band 3, separation of vesicles from membrane surface and increase in microviscosity of the membrane lipid bilayer.

The aim of this research was to find dependence between fine structure of lymphocyte membranes subjected to action of zinc ions (using AFM) and functional state of some components of membrane composition (polarization measurements using fluorescent marker).

The experiments were performed on venous blood lymphocytes obtained from healthy donors in the Republican Theoretical and Practical Center of Hematology and Blood Transfusion, (Minsk, Belarus). Lymphocytes were isolated from glucicirum-anti-coagulated human venous blood according to the Histopaque -1077 (Sigma-Aldrich) density gradient centrifugation methods (400 g for 30 min at room temperature) [4]. They were suspended in 25 mM Tris HCl buffer containing 140 mM NaCl; 5 mM KCl;

pH 7.4 (buffer A) and then cells were washed twice in buffer A.

For AFM analysis, samples of a suspensions of lymphocytes under the action of ZnSO₄ (0.25 mM, 0.5 mM, 1 mM) along with a sample of the initial suspension were placed on a coverslip, incubated for 40 min at room temperature for spontaneous cell adhesion, fixed with two-percent solution of glutaraldehyde, washed once in buffer A and twice in distilled water and finally air dried.

Measuring was conducted in contact mode by AFM NT206 (ODO Mikrotestmashiny, Belarus) in a small imaging region, using standard silicon tips (from MikroMash) in the static (CSC21 tips) and dynamic (NSC21 tips) regimes. The lateral resolution of the microscope is 20-30 nm, and the vertical resolution is 0.5 nm.

The study of changes in the physical state of lipids in the membranes of human lymphocytes exposed to zinc ions, using fluorescent probes TMA-DPH and laurdan displayed that after lymphocytes exposure to Zn²⁺ ions at concentrations of 0.1 mM - 1.0 mM the degree of polarization of the lipophilic fluorescence probe TMA- DPH decreases (Fig. 1), while there is more substantial increase in fluorescence intensity of bound probe (Fig. 2).

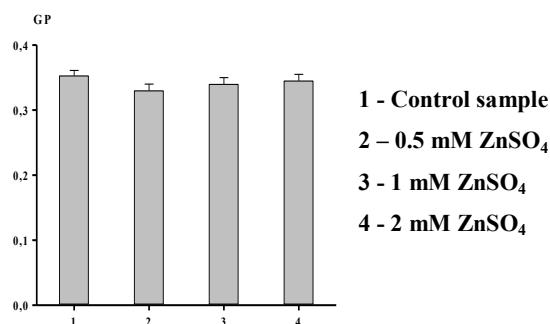


Fig. 1. ZnSO₄ effect on fluorescence polarization of TMA-DPH incorporated into the lymphocyte membranes. Excitation wavelength $\lambda_{ex} = 365$ nm, emission wavelength $\lambda_{reg} = 428$ nm.

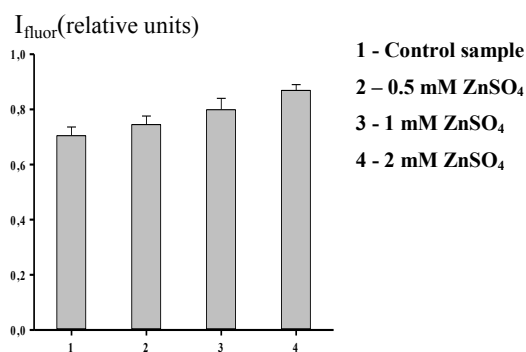


Fig. 2. The intensity of the lipophilic fluorescence probe TMA-DPH, incorporated into the lymphocyte membranes treated with various concentrations of ZnSO₄ (excitation wavelength $\lambda_{\text{ex}} = 365$ nm; emission wavelength $\lambda_{\text{reg}} = 428$ nm).

It is known that TMA-DPH is localized near the surface of the lipid bilayer [5], therefore we can assume that the action of Zn ions decreases microviscosity of lipids in the polar heads of outer lipid monolayer of lymphocytes membrane.

While studying on the physical state of more hydrophobic parts of lipid bilayer with the lipophilic probe laurdan we didn't find significant changes of generalized polarization (GP) of laurdan at the same concentrations of Zn ions which may indicate that there weren't any alteration in lipid microviscosity of the hydrophobic part of lipid bilayer. This confirms the previously found fact that zinc ions are usually weakly penetrate deep into the lipid bilayer [6]. Thus, the results of the study of lipids physical state using the fluorescent lipophilic probes TMA-DFG and laurdan showed us that zinc ions influence the microviscosity of the outer monolayer of lymphocyte membranes lipid bilayer.

The indicated above change in physical-chemical properties of lymphocytes membrane components allow us to suggest that toxic action of zinc ions affects the topography of the surface of cells. Therefore we investigated the metal induced changes of lymphocytes membrane exposed to subhemolytic concentrations of zinc using an AFM. Two-dimensional image allow us to reveal more clearly that the typical structure of lymphocyte surface consists of large number of nanosized particles (from several to tens nanometers).

Since the profile of an lymphocyte membrane represents a typical random process, we chose correlation lengths of the normalized autocorre-

lation functions $K_0(r)$ of irregularity profiles as the most informative and deterministic parameter in order to estimate the merely topographic effect of metal doping on lymphocytes surface [7]. It turned out that zinc treatment produce correlation length reduction with increasing of metal concentration (Fig. 3).

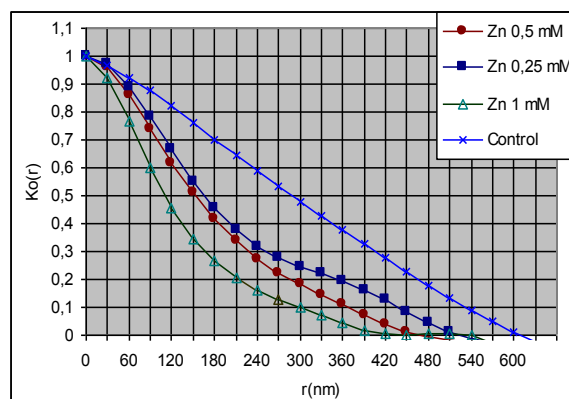


Fig. 3. Normalized autocorrelation functions of unmodified lymphocyte surface profiles along with surface profiles of lymphocyte modified with zinc and lead ions of different concentrations.

Taken as a whole, the presented results demonstrate that correlation length of the normalized autocorrelation functions as an informative parameter could be helpful in diagnostics of diseases linked to disbalance of microelements in human organism.

Observable metal induced changes on AFM images of lymphocytes membranes modified by zinc allows us to propose an approach of early disease detection using preclinical manifestation of toxic metal action on lymphocytes and also to pursue research into the action of different factors on hemocytes and other biological cells.

Reference List:

1. Xiao-Long Ji et al, World J Gastroenterol., 11, 1709-1711 (2005).
2. Slobozhanina E.I. et al, J.Appl.Toxicol., 25, 109 (2005).
3. Khairullina A.Ya. et al, Opt. and Spectr., 105, 154 (2008).
4. Boyun A., Scand. J. Immunol. Suppl., 5, 9-15 (1976).
5. Haugland R. P., Handbook of Fluorescent Probes and Research Products, 9 ed., London, Phoenix, 2002.
6. Bettger W. J. and O'Dell B. L., Life Sci., 28, 1425-1438 (1981).
7. Filimonenko D.S. et. al, Proc. of 17th Int. Symp. "Nanostructures: Physics and Technology" (Minsk, 2009), Ioffe Institute, 228-230, 2009.

РЕАЛИЗАЦИЯ ИНТЕРНЕТ-ПРАКТИКУМА ПО ЗОНДОВОЙ МИКРОСКОПИИ

А.С. Филонов

ООО НПП «Центр перспективных технологий»
filonov@femtoscanonline.com

На физическом факультете МГУ им. М.В. Ломоносова запущен современный интернет-практикум по сканирующей зондовой микроскопии. В практикуме реализовано несколько задач, от простейших до более сложных, выполнение которых позволяет студентам овладеть современными методами изучения нанообъектов.

Компоненты Интернет-лаборатории: прибор – СЗМ ФемтоСкан [1]; система удаленного доступа к прибору – программное обеспечение ФемтоСкан Сервер, ФемтоСкан Онлайн [2]; система администрирования пользователей, задач, учебных материалов – Moodle [3]; инфраструктура – сеть TCP/IP, Веб-серверы, базы данных.

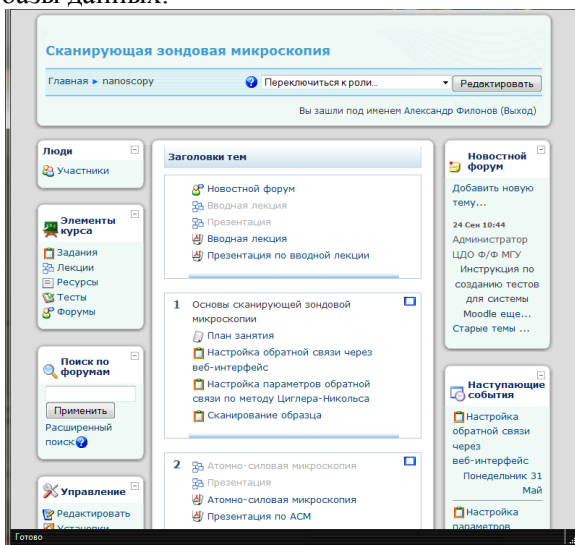


Рис. 1. Система организации процесса дистанционного образования Moodle.

Комплекс оборудования и программного обеспечения базируется на СЗМ ФемтоСкан, отличительной особенностью которого является функция удаленного управления по сети Интернет. Для выполнения административных функций практикума используется система Moodle. Часть заданий выполняется с использованием стандартного браузера [4], часть – с использованием специализирован-

ного программного обеспечения «ФемтоСкан Онлайн».

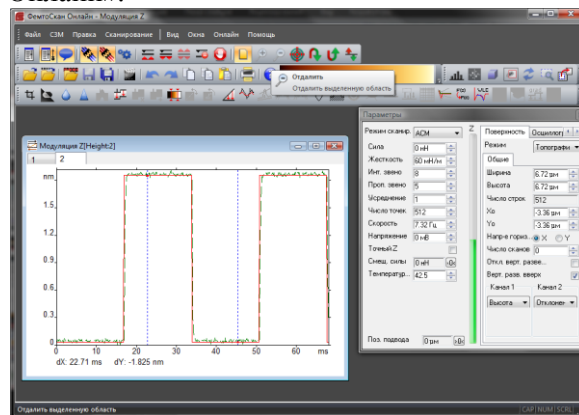


Рис. 2. Настройка обратной связи через программу-клиент.

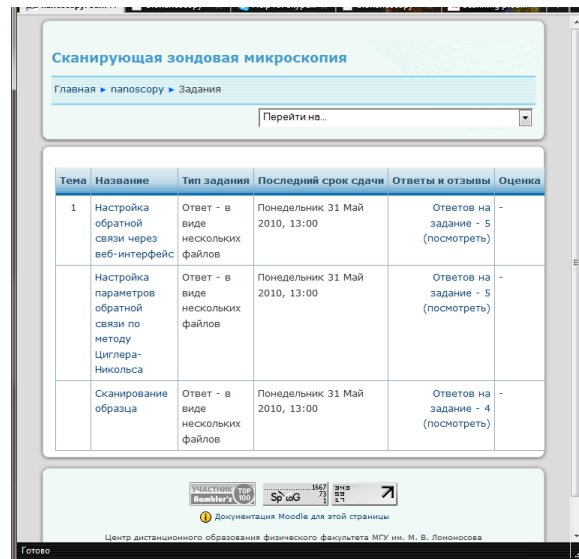


Рис. 3. Сдача результатов практикума.

На настоящее время задания практикума выполнили или выполняют 15 человек, общее время работы прибора в режиме удаленного сканирования составило 40 часов.

Ссылки:

1. www.nanoscopy.net
2. www.femtoscanonline.com/wiki/ru/doku.php
3. distant.phys.msu.ru/course/view.php?id=36
4. www.nanoscopy.org/Applications.shtml

АТОМНО-СИЛОВАЯ МИКРОСКОПИЯ ТРОМБОЦИТОВ В ПРЕПАРАТАХ ЦИТАФЕРЕЗНОГО ТРОМБОКОНЦЕНТРАТА

С.В. Ходырев, С.А. Орлов

Югорский центр нанотехнологий Югорского НИИ информационных технологий.

г. Ханты-Мансийск

icnt@uriit.ru

Концентрат тромбоцитов входит в стандартные протоколы лечения тромбоцитопений различного генеза, в первую очередь, в онкологической и гематологической клинике. Под протекцией донорских тромбоцитов проводится трансплантация аллогенного или родственного костного мозга, высокодозная химиотерапия, лучевая терапия. На станциях переливания крови для хранения тромбоконцентрата применяются специальные термостаты с интегрированными линейными тромбомиксерами. Срок хранения препарата ограничен 5 сутками из-за естественной гибели тромбоцитов. На основании Закона РФ «О донорстве крови и ее компонентов», кровь, ее компоненты, препараты из донорской крови, выпускаемые учреждениями службы крови, подлежат обязательному контролю.

В современных условиях качество заготовленного донорского тромбоконцентрата оценивается в основном по концентрации тромбоцитов в единице объема. Однако, прогноз течения заболевания и его исход зачастую зависит от функциональной полноценности кровяных пластинок и их потенциальной возможности запускать каскад реакций свертывания крови.

Высокая степень различия донорских цитаферезных тромбоцитов по морфологическим признакам, а также возможность потери их естественных функциональных свойств в период хранения, затрудняет проведение диагностики и прогнозирование лечебного эффекта при применении тромбоконцентрата. Количественное определение степени различия в морфологии клеток в первую очередь основываются на морфологических исследованиях *in vitro* с применением микроскопии. В настоящее время количественная и качественная оценка степени различия цитаферезных тромбоцитов по морфологическим признакам основывается на применении световой микроскопии. Возможности световой микроскопии позволяют различать клетки по морфологическим признакам, но уровень дифференцировки при этом не высок и в конечном итоге результаты исследования, по

мнению специалистов, носят субъективный характер [1].

В работе клинических лабораторий давно назрела необходимость перехода от обычного визуального анализа микроскопических изображений к применению методов количественной морфометрии с применением анализаторов изображений клеток полученных методами атомно-силовой микроскопии (АСМ). В данной работе экспериментально показана возможность применения атомно-силовой микроскопии для исследования морфологии тромбоцитов в препаратах цитаферезного тромбоконцентрата.

Пробы для анализа с помощью атомно-силового микроскопа Solver P47 получали по стандартной методике из тромбоконцентрата, полученного методом цитафереза от здорового донора. Концентрация тромбоцитов в препарате составляла $132 \times 10^9 \text{ л}^{-1}$. Способ приготовления проб для атомно-силовой микроскопии описан в работах [2, 3]. Фиксация клеток на стекле осуществлялась метанолом. Сканирование поверхности образцов проводили в бесконтактном режиме на воздухе, что позволяло минимизировать влияние острия зонда на клетки. Использовались специальные кремниевые зонды серии NSG-11 (NT-MTD) жесткостью 11.5 Н/м и частотой 255 кГц.

На рис. 1 представлено АСМ-изображение тромбоцитов, фиксированных на стекле метанолом. Образец получен из тромбоконцентрата в первые сутки его хранения. Всего было отсканировано десять полей с 50 – 60 клетками в каждом поле. Для отображения тонкой структуры морфологии клеток использовались АСМ-методы фазового контраста и рассогласования сигнала. Как оказалось, большая часть клеток наблюдается в обратимо активированном состоянии, на что указывает наличие коротких псевдоподий. Длина псевдоподий различна – от 0,5 до 3,0 мкм, а толщина – 0,05 мкм. Такая детализация полезна для точного определения относительного числа тромбоцитов с различными морфологическими признаками.

На функциональную активность тромбоцитов указывает большое число активированных клеток, способных к адгезии и агрегации.

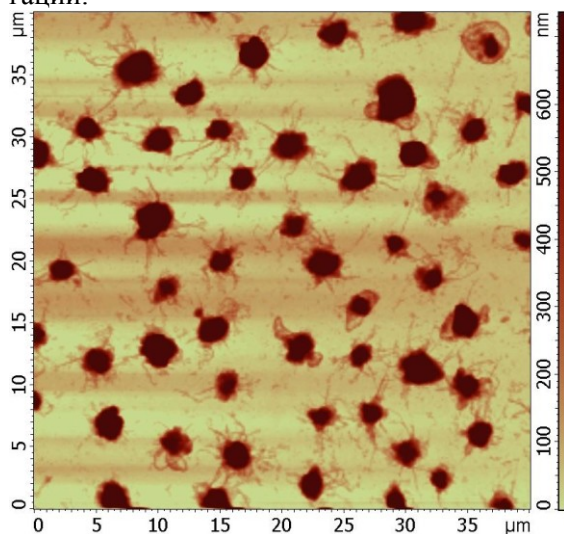


Рис. 1. АСМ-изображение тромбоцитов, фиксированных на стекле метанолом. Для приготовления образца использовался тромбоконцентрат первых суток хранения.

Наблюдаемые на АСМ-изображениях клетки были классифицированы по пяти морфологическим типам. I тип – неактивированные тромбоциты, II – обратимо активированные, III – необратимо активированные, IV – в стадии адгезии к подложке и V – в стадии дегрануляции или «тени» (распавшиеся тромбоциты). Агрегаты из двух, трех и более тромбоцитов при счете клеток не учитывались. Для изучения агрегативной способности тромбоцитов используется другая, специальная методика [1].

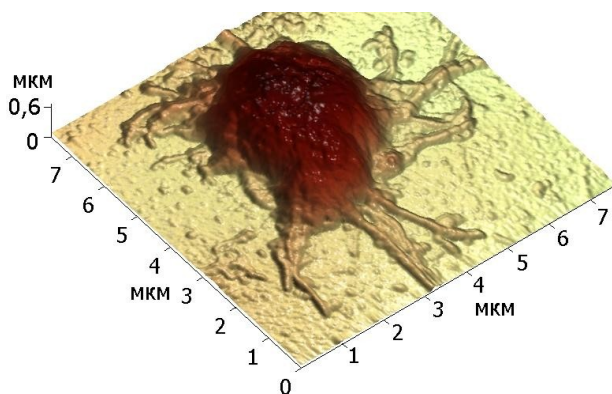


Рис. 2. АСМ-изображение обратимо активированного тромбоцита.

Распределение тромбоцитов в препарате по морфологическим типам соответствовало логарифмически нормальному распределению. В распределении доминирует тип II. По мере увеличения срока хранения относитель-

ное число клеток этого типа не остается постоянным, а монотонно уменьшается. При этом число клеток типа III, IV и V увеличивается. При обследовании двух образцов тромбоконцентрата установлено, что в течение 5 суток (стандартный период хранения препарата) происходит монотонное уменьшение качественных клеток II морфологического типа. Это изменение состояния клеток происходит в силу естественных причин и является закономерностью. В виде аналитической формулы эта закономерность может быть выражена так: $P_{II} = P_{II(t=0)} - k \cdot t$, где P_{II} – процент обратимо активированных тромбоцитов (II морфологического типа) в препарате цитаферезного тромбоконцентрата, $P_{II(t=0)}$ – процент обратимо активированных тромбоцитов в начале срока хранения, k – коэффициент, характеризующий естественную убыль обратимо активированных тромбоцитов за сутки хранения в препарате, t – время хранения тромбоконцентрата, измеряемое в сутках. Сравнение значения коэффициента k для двух образцов тромбоконцентрата полученных от здоровых доноров и хранящихся в одинаковых условиях, не выявило отличий.

Данная формула применима только при подсчете цитаферезных тромбоцитов *in vitro* с использованием АСМ-изображений.

Предложенная в работе классификация клеток по пяти морфологическим типам отличается от традиционной методики подсчета клеток в камере Горяева и окрашенных мазках. Однако, на ее основе можно получить статистически достоверные и объективные данные об изменении морфологии клеток в тромбоконцентрате в период хранения.

Список литературы:

1. Луговская С.А., Морозова В.Т., Почтарь М.Е., Долгов В.В. Лабораторная гематология. Тверь, Триада, 2006.
2. Ходырев С.В., Орлов С.А., Исследование морфофункциональной активности тромбоцитов методом атомно-силовой микроскопии, Сборник тезисов докладов международного конкурса научных работ молодых ученых в области нанотехнологий, 612-613 (2008).
3. Орлов С.А., Донников М.Ю., Зиновьева А.В., Кутефа У.И., Качественная оценка морфофункциональной активности тромбоцитов по данным атомно-силовой микроскопии, Клиническая лабораторная диагностика, 8, 30-32 (2009).

НОВЫЙ МЕТОД МИКРОХИРУРГИИ ЭМБРИОНОВ МЛЕКОПИТАЮЩИХ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ СИСТЕМЫ «ОПТИЧЕСКИЙ СКАЛЬПЕЛЬ – ОПТИЧЕСКИЙ ПИНЦЕТ»

Ю.В. Храмова¹, М.Л. Семенова¹, С.А. Сергеев¹,
М.Б. Агранат², М.М. Ракитянский²

¹МГУ им. М.В.Ломоносова

²Объединенный институт высоких температур РАН
yul.khramova@gmail.com

Эмбрионы млекопитающих первых дней развития – от оплодотворения и до начала имплантации могут быть подвергнуты микрохирургическим процедурам, что находит широкое применение, как в экспериментальных исследованиях, так и в клинической практике. Во время преимплантационного развития эмбрион проходит следующие стадии: дробление, морула, компактизированная морула, бластоциста. К моменту имплантации в эмбрионе насчитывают порядка 100-150 клеток. В настоящее время микрохирургические операции на эмбрионах в целях преимплантационной генетической диагностики (биопсия редуционного тельца (РТ) или бластомера) и вспомогательного хэтчинга (иссечение *zona pellucid* (ZP)) проводят во многих клиниках вспомогательных репродуктивных технологий. В экспериментальной эмбриологии при помощи микрохирургических методов получают трансгенных животных путем введения генетических конструкций (инъекция ДНК в пронуклеус зиготы или трансплантация генномодифицированных клеток в полость бластоцисты). В клиниках и лабораториях для осуществления этих процедур используют микроманипуляторы (по одному для правой и левой рук оператора) и микроинъекторы. Эмбрион удерживается стеклянной присоской, укрепленной на одном манипуляторе, а в другом устанавливаются стеклянные иглы или пипетки, которыми и проводят микрооперацию. В последнее время активно развивающиеся лазерные технологии находят все большее применение в эмбриологии. Так, например, в клинической практике уже широко используются лазерные установки для иссечения ZP, однако все остальные процедуры до сих пор проводятся при помощи стеклянного микроинструмента.

Нами была разработана новая методика проведения микрохирургических манипуляций с преимплантационными эмбрионами млекопитающих при помощи системы «оптический скальпель – оптический пинцет». В

работе была использована установка на основе фемтосекундного хром-форстеритового лазера (оптический скальпель), непрерывного итербиевого волоконного лазера (оптический пинцет) и инвертированного микроскопа, разработанная в отделе лазерной плазмы Объединенного института высоких температур РАН. Работы проводили на эмбрионах мышей линий DBA и C57Bl/СВА; эмбрионы после полутора суток развития вымывали из яйцеводов по стандартному протоколу [1]. Все манипуляции производили в каплях среды для манипуляций M2 (Millipore, MR-015P-5D), покрытых минеральным маслом. После лазерного воздействия эмбрионы культивировали *in vitro* в среде M16 (Millipore, MR-010P-5D) в инкубаторе (37 °С, 5 % CO₂) до стадии бластоцисты.

Мы успешно провели два типа микрохирургических лазерных операций: слияние бластомеров эмбрионов на стадии двух клеток с помощью оптического скальпеля (1) и биопсия редуционного тельца (РТ) с помощью системы «оптический скальпель – оптический пинцет» (2). В результате проведенных экспериментов были подобраны параметры установки для проведения слияния бластомеров; наилучший результат был получен при низких энергиях импульсов и при смещении оптического фокуса по оси Z. Процесс слияния бластомеров представлен на рис. 1.

На рис. 2 представлен процесс биопсии РТ. При проведении этой процедуры сначала оптическим скальпелем делали отверстие в ZP, а затем с помощью оптического пинцета через это отверстие извлекали РТ, контролируя процесс его перемещения на мониторе компьютера.

Также было проведено исследование влияния лазерного воздействия на жизнеспособность эмбрионов. Оптическим скальпелем делали небольшой надрез в ZP 25-ти эмбрионов на стадии 2-х бластомеров, которые затем культивировали *in vitro*.

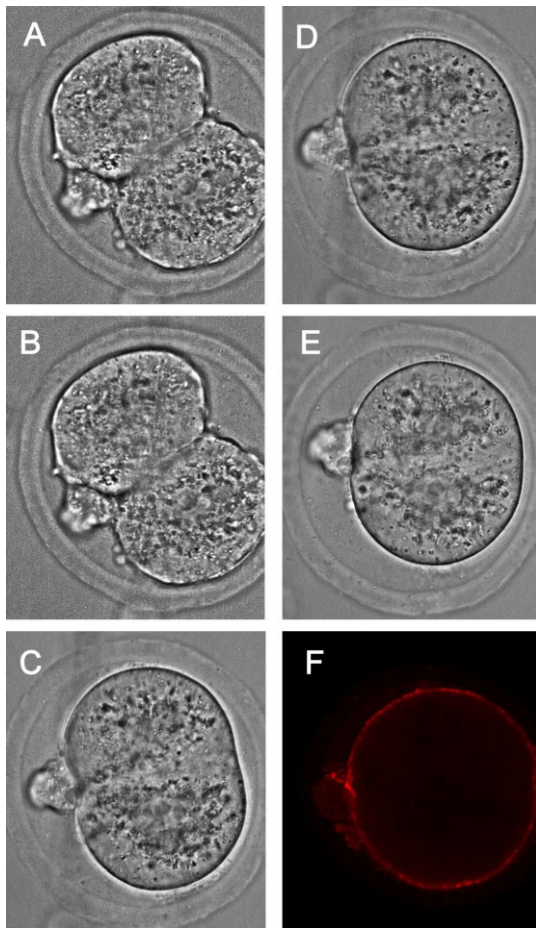


Рис. 1. Слияние бластомеров двухклеточного эмбриона: до выстрела (А); сразу после выстрела (В); через 30 мин. после выстрела (С); после второго выстрела (D); после завершения слияния бластомеров (Е); окрашивание поверхностной мембраны флуоресцентным маркером FM4-64 (F34653, Invitrogen) подтверждает слияние бластомеров (F).

В результате получили 23 бластоцисты с хэтчингом (бластоциста, которая выходит из оболочки), 1 бластоцисту без хэтчинга и 1 морулу. Для выявления живых и мертвых клеток эмбрионы окрашивали Hoechst (В-2261, Sigma) и propidium iodide (P1304MP, Invitrogen). Во всех бластоцистах после лазерного воздействия не было обнаружено погибших (PI-положительных) клеток (рис. 3). Таким образом, можно сделать вывод о том, что лазерное воздействие не влияет на жизненные показатели преимплантационного эмбриона и не нарушает процесс нормального развития.

Таким образом, мы разработали новый бесконтактный метод микрохирургии эмбрионов с помощью системы «оптический скальпель – оптически пинцет», который позволит повысить эффективность эмбрионических процедур.

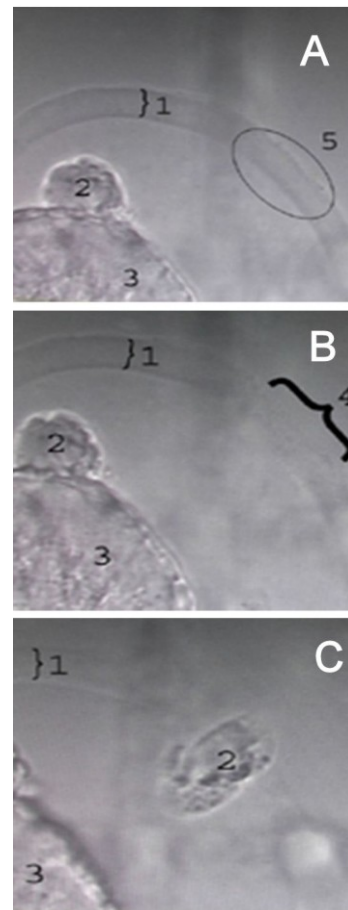


Рис. 2. Биопсия ЗР: ориентация эмбриона и выбор места иссечения ЗР (А), отверстие в оболочке, полученное с помощью лазера (В), извлечение ЗР с помощью оптического пинцета через полученное отверстие (С).

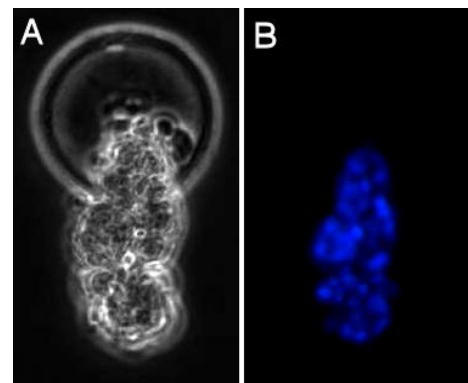


Рис. 3. Бластоциста выходит из ЗР через надрез, сделанный оптическим скальпелем (А); Все клетки бластоцисты не имеют повреждений (“+” Хехст-окрашивание, “-” йодид пропидия) (В).

Список литературы:

1. Манк, (1990).

ИССЛЕДОВАНИЕ ПРОВОДИМОСТИ МОЛЕКУЛ ДНК

Т.И. Шарипов, С.С. Гоц, Р.З. Бахтизин

¹Башкирский государственный университет

Sha-T@yandex.ru

В последние годы значительно возрос интерес к процессам переноса заряда в молекулах ДНК, есть перспективы их использования в нанoeлектронных устройствах. Попытки измерить электрическое сопротивление ДНК дают противоречивые результаты: молекула может быть диэлектриком [1], полупроводником [2], металлом [3] и даже сверхпроводником [4]. Результаты неоднозначны из-за сложности структуры ДНК и экспериментальной неопределенности.

Для исследования проводимости молекулы ДНК наиболее часто используется два подхода. В первом случае изолированная молекула ДНК располагается между двумя электрическими контактами. Расстояние между электродами должно быть небольшим, порядка 1-10 нм, но достаточным, чтобы препятствовать туннелированию зарядов. Такой эксперимент достаточно сложно реализовать и особенно трудно контролировать.

Второй подход к измерению проводимости индивидуальных молекул основан на использовании сканирующего туннельного микроскопа (СТМ) [5]. Уже первые эксперименты с использованием СТМ показали, что это подходящий инструмент для исследований как одиночных молекул ДНК, так и молекул в монослойных пленках, однако, выполнение качественных и достоверных экспериментов по измерению переноса заряда через отдельную молекулу с помощью СТМ чрезвычайно затруднительно, а интерпретация полученных результатов оказывается еще более сложной.

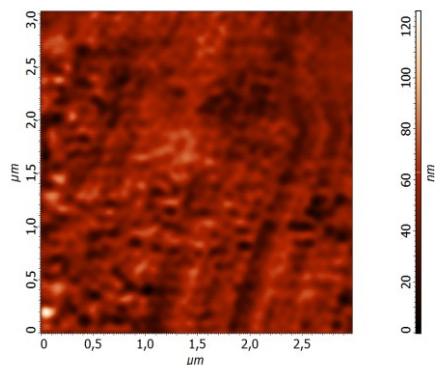


Рис. 1. СТМ-изображение молекул ДНК на поверхности золота.

СТМ-исследование поверхности золота с иммобилизованными молекулами ДНК проводилось в режиме постоянного туннельного тока. На СТМ-изображении (Рис. 1) наблюдаются темные области малого диаметра - молекулы ДНК. Их латеральные размеры сходятся с размерами ДНК на АСМ-изображениях.

После получения ряда СТМ-изображений и идентификации молекул ДНК на них мы приступили к снятию вольт-амперных характеристик (ВАХ) (Рис. 2) в темных точках, где предположительно и располагаются молекулы ДНК.

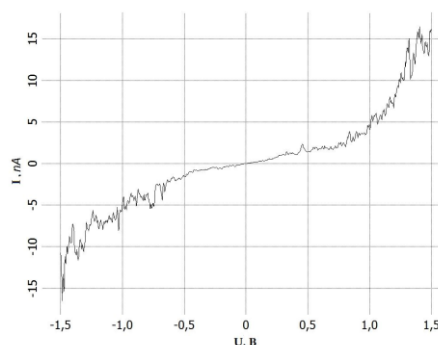


Рис. 2. Вольт-амперная характеристика молекул ДНК.

Кривая ВАХ имеет симметричный вид относительно нулевых значений как тока, так и напряжения. Вид кривой зависимости тока от напряжения нелинейный. Интересно отметить, что на участках ВАХ с выраженным проявлением нелинейности (U больше I) заметен рост дисперсии флуктуаций мгновенных значений туннельного тока.

Список литературы:

1. Brauns E B, Madaras M L, Coleman R S, Murphy C J, and Berg M A, J. Am. Chem. Soc. 121, 11644 (1999).
2. Porath D, Bezryadin A, Vries S De and Dekker C, Nature London, 403, 635 (2000).
3. H.W. Fink and C. Schonberger, Nature 398, 407 (1999).
4. Kasumov A Y, Kociak M, Gueron S, Reulet B, Volkov V T, Klinov D V, and Bouchiat H, Science 291, 280 (2001).
5. H. Cohen, C. Nogues, R. Naaman, D. Porath, PNAS, v. 102, № 33, pp. 11589-11593 (2005).

РЕКОНСТРУКЦИЯ 3D-СТРУКТУРЫ АКТИН-СВЯЗЫВАЮЩЕГО С-ДОМЕНА РЕКОМБИНАНТНОГО САР-БЕЛКА ПО ДАННЫМ ЭЛЕКТРОННОЙ МИКРОСКОПИИ

Г.Г. Шаров, F.A. Chaudhry, B.L. Goode, O.C. Соколова
Биологический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова
sharov.grigory@gmail.com

Многие жизненно важные процессы в клетке обеспечиваются регулируемой динамикой актиновых филаментов. Детальное изучение данной проблемы невозможно без привлечения структурных данных, позволяющих выявить взаимодействия филаментов с разными биомолекулами посредством актин-связывающих белков. Привлечение таких данных необходимо для того, чтобы приблизиться к пониманию механизма тонкой регулируемой работы этой системы живой клетки. Процессы сборки и разборки актиновых филаментов, а также направление и скорость роста регулируются не только концентрацией мономерного актина в определенных частях клетки, но и большим комплексом актин-связывающих белков (АСБ). В настоящее время известно более 160 АСБ [1]. Большинство из них взаимодействует с фибриллярным F-актином и только некоторые с мономерным G-актином (в том числе САР).

Белок САР обнаружен в большинстве эукариотических клеток [2]. Он представляет собой молекулярную машину – высокомолекулярный комплекс с актином, имеющий множество сайтов связывания с другими АСБ. Участвуя в процессе обновления актиновых филаментов, N- и С-фрагменты комплекса работают последовательно, освобождая молекулы актина и кофилина [3]. Получение пространственной структуры этого комплекса и объяснение механизма его работы является необходимой задачей для понимания функционирования актинового цитоскелета.

Для мономера САР известны [4, 5] кристаллические структуры отдельных доменов: N- (1S0P) и С-концов (1K4Z), но нет данных о пространственной структуре в целом. Результаты аналитического ультрацентрифугирования позволяют предположить, что комплекс является додекамером с молекулярной массой около 600 кДа и состоит из 12 молекул САР и актина в соотношении 1:1.

Целью данной работы является получение 3D-реконструкции С-концевого фрагмента САР. Известно, что именно он ответственен за связывание мономерного актина.

С-САР домен представлен бета-спиральными участками. Известная кристаллическая структура фрагмента представляет собой димер (рис. 1), каждый мономер которого включает 6 правозакрученных бета-структур, фланкированных антипараллельными бета-листами.

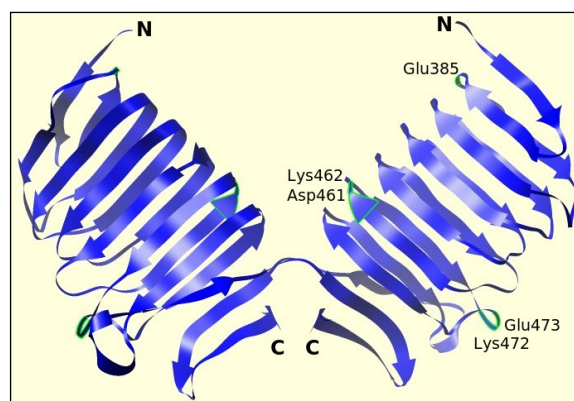


Рис. 1. Димер С-САР с тремя сайтами связывания актина (обведены зеленым).

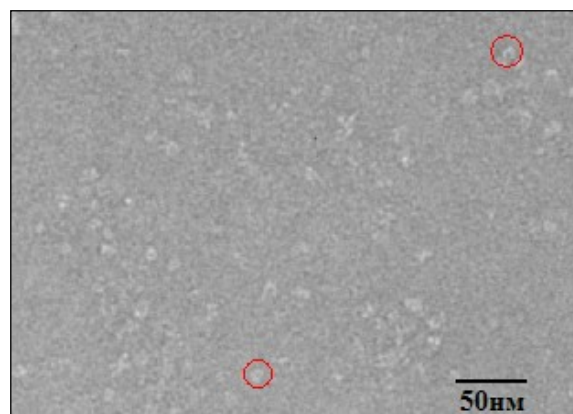


Рис. 2. Микрофотография с частицами С-САР в комплексе с актином. Красными кружками выделены одиночные частицы С-концевых доменов с актином, собираемые в процессе скрининга. Масштабный отрезок 50 нм.

Для изучения методом электронной микроскопии структуры С-САР (в комплексе с актином), полноразмерный комплекс САР с мономерным актином выделяли из дрожжей и наносили на сетки с углеродной подложкой. Негативно окрашенные сетки исследовали на микроскопе FEI Tecnai G2 Spirit в

условиях низкой дозы (120 кВ, увеличение $\times 52000$). Отбор удачных изображений отдельных молекул С-САР (рис. 2) для последующего построения 3D-структуры проводился вручную с помощью программы Signature. На основе этих изображений после коррекции частотно-контрастной характеристики с помощью программы IMAGIC (рис.3) была получена объёмная структура С-концевого домена САР с разрешением 24 Å.

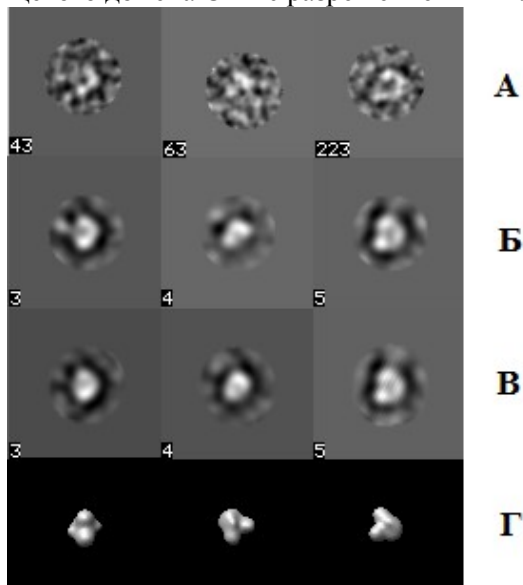


Рис. 3. Процесс реконструкции в IMAGIC: А – выбранные изображения, отфильтрованные от шума, Б – некоторые классы, использованные при реконструкции, В – репроекции трехмерной структуры, Г – трехмерная структура.

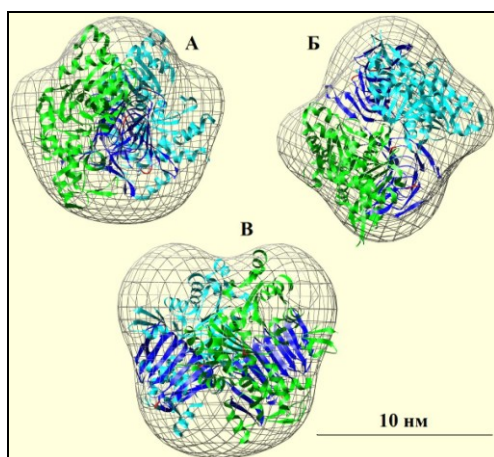


Рис. 4. Докинг кристаллических структур актина и С-САР в электронную плотность трехмерной модели. А – вид сбоку, Б – вид сверху, В – вид сбоку (повернуто на 90 градусов относительно А). Синим цветом обозначен димер С-САР, два мономера актина – зеленым и голубым.

3D-структура С-САР имеет форму подковы с линейными размерами 12 \times 9 нм (рис. 4). Для интерпретации результатов проводили докинг кристаллических структур С-концевого домена САР и мономерного актина в полученную электронную плотность.

Было показано, что 3D-структура может вместить два мономера С-концевого домена, каждый из которых связан с одной молекулой актина. Молекулярная масса димерного комплекса С-САР с учетом двух молекул актина составляет около 150 кДа, и соответствует рассчитанной массе 3D-реконструкции. Полученные результаты свидетельствуют о том, что в полномасштабном комплексе САР с актином С-концевые домены организованы в димеры, стабилизированные N-концевыми двойными спиралями.

В дальнейшем планируется получение трехмерной модели С-САР без актина для более точного определения связывания мономеров актина, а также модели N-концевого домена и в перспективе реконструкция полного САР-комплекса.

Работа поддержана грантами CRDF (№ 2918) и РФФИ (№ 08-04-91125).

Список литературы:

1. Dos Remedios C.G., Chhabra D., Kekic M., Dedova I.V., Tsubakihara M., Berry D.A., Nosworthy N.J., Actin Binding Proteins: Regulation of Cytoskeletal Microfilaments, *Physiol Rev*, 83, 433-473 (2003).
2. Hubberstey A.V., Mottillo E.P., Cyclase-associated proteins: CAPacity for linking signal transduction and actin polymerization, *FASEB J.*, 16, 487-499 (2002).
3. Quintero-Monzon O., Jonasson E.M., Bertling E., Talarico L., Chaudhry F., Sihvo M., Lappalainen P., Goode B.L., Reconstitution and Dissection of the 600-kDa Srv2/CAP Complex, *The Journal of Biological Chemistry*, 284, 10923-10934 (2009).
4. Ksiazek D., Brandstetter H., Israel L., Bourenkov G.P., Katchalova G., Janssen K.-P., Bartunik H.D., Noegel A.A., Schleicher M., Holak T.A., Structure of the N-Terminal Domain of the Adenylyl Cyclase-Associated Protein from *Dictyostelium discoideum*, *Structure*, 11, 1171-1178 (2003).
5. Dodatko T., Fedorov A. A., Grynberg M., Patskovsky Y., Rozwarski D.A., Jaroszewski L., Aronoff-Spencer E., Kondraskina E., Irving T., Godzik A., Almo S.C., Crystal structure of the actin binding domain of the cyclase-associated protein, *Biochemistry*, 43 (33), 10628-1041 (2004).

СЕНСОРЫ НА ОСНОВЕ КАНТИЛЕВЕРОВ

И.В. Яминский

*МГУ им. М.В. Ломоносова, физический и химический факультеты
yaminsky@nanoscopus.net*

В весах для измерения массы хорошо работает геометрический принцип. Чем миниатюрнее весы, тем меньшие массы можно взвешивать. Технологии последних лет показали, что если идти этим путем, то можно определить массу одной бактерии [1], белка [2] и даже отдельного атома [3].

Ключевой деталью большинства весов является упругий элемент. В весах для определения массы наночастиц размеры самого упругого элемента должны лежать в области нано.

Атомные весы с чувствительностью на уровне 10^{-12} – 10^{-16} г традиционно используют кремниевую микроконсоль (кантилевер) и оптическую систему регистрации положения кантилевера. В этом приборе, по сути дела, и кантилевер, и система регистрации заимствованы у атомно-силового микроскопа. У атомных весов этой конструкции есть ограничение на минимальную величину измеряемой массы. Происходит это по следующей причине. Оптическая система регистрации требует, чтобы размеры кантилевера были больше длины источника света – диодного лазера. В реальных экспериментах используют кантилеверы, длина и ширина которых более 5 мкм. Масса такого кантилевера при толщине в 1 мкм около 10^{-10} г. Минимально достижимая погрешность измерений находится на уровне 10^{-16} г.

Для повышения чувствительности весов необходимо использовать кантилеверы субмикронного размера. Такие размеры кантилевера требуют отказа от использования оптической системы регистрации со свойственным ей дифракционным ограничением.

Измерение массы величиной в 10^{-18} г было достигнуто с помощью кремниевого кантилевера, на поверхности которого имелась проводящая золотая дорожка [4]. В тонкой пленке золота наблюдался пьезорезистивный эффект: при изгибе кантилевера происходило изменение электрического сопротивления пленки золота. Природа пьезорезистивного эффекта в полной мере не понята, однако, сами весы продемонстрировали рекордную на то время чувствительность: была измерена масса в 10^{-18} г.

Этот рекорд продержался недолго. Спустя один год он был улучшен в 10^6 раз [3]. Для

достижения этого рекорда была взята углеродная нанотрубка длиной в 254 нм и диаметром в 2,09 нм. Масса такой трубки – $2,33 \cdot 10^{-18}$ г. В результате удалось зарегистрировать массу одного атома золота. Для регистрации положения упругого элемента – углеродной нанотрубки – авторы статьи придумали остроумную схему измерений. Была собрана электрическая цепь, в которую входили источник тока, нанотрубка и металлический электрод. Электрод подносили к нанотрубке до возникновения тока эмиссии через зазор. При колебаниях нанотрубки менялся зазор нанотрубка-электрод и, соответственно, происходила модуляция тока эмиссии. Зазор начинал излучать радиоволны. Частота радиоволн, которую регистрировал радиоприемник, совпадала с частотой колебаний нанотрубки. При попадании атомов золота на поверхности нанотрубки частота её колебаний менялась дискретно. Минимальный размер дискрета соответствовал присоединению одного атома.

Приведенные выше примеры продемонстрировали, что атомные весы являются уникальным прибором для измерения массы наночастиц. Они могут служить основой для создания сверхчувствительных сенсоров на химические и биологические вещества. Однако на пути их прямого использования в качестве сенсоров есть определенные нерешенные задачи. Сенсор на определенное вещество должен уметь отличать именно это вещество от всех остальных. Здесь возникает задача оптимального формирования на поверхности чувствительного элемента сенсора рецепторного слоя, который должен избирательным образом реагировать только на искомое вещество. В биологии наибольший интерес представляют сенсоры, которые могут работать в жидкости. В работе [1] описана конструкция, в которой кантилевер колеблется в вакууме, но в теле кантилевера имеется микроканал, через который проходит исследуемая жидкость. Если использовать эти атомные весы в качестве сенсора, то возникают определенные технологические трудности в модификации поверхности внутреннего миниатюрного канала.

Реальные сенсоры в настоящее время работают с кантилеверами микронного разме-

ра, что позволяет не только наносить надежным образом рецепторные слои, но и уверенно регистрировать изгиб кантилевера. Пример массива кантилеверов с пьезоэлектрической системой регистрацией приведен в [5].

Представленные выше случаи описывают применения атомных весов для измерений на воздухе и в вакууме. В этих случаях атомные весы регистрируют изменение резонансной частоты колебаний кантилевера. Проводить таким образом измерения в жидкостях становится неэффективно. Жидкие среды демпфируют колебания кантилевера, и чувствительность прибора существенно падает. В жидкостях, как правило, измеряют статический изгиб кантилевера. Статический изгиб кантилевера в жидких средах играет ключевую роль в сенсорном приборе, и это явление требует детального и внимательного разъяснения. Может показаться, что основной вклад в изгиб кантилевера вносит вес измеряемого вещества. Однако простой анализ показывает, что хотя этот вклад и есть, но он на много порядков меньше наблюдаемого эффекта. Основная причина в другом. В жидкости одну (только одну) из поверхностей покрывают рецепторным слоем (рис. 1). Присоединение к поверхности рецепторного слоя регистрируемого вещества – аналита – приводит к изменению поверхностного натяжения на одной из сторон кантилевера, и как следствие к изгибу всего кантилевера в целом. В зависимости от баланса сил в слое рецептор-аналит кантилевер может изгибаться как в сторону слоя, так и в обратную [6]. Это дает дополнительную информацию о характере межмолекулярных сил в слое.

Кантилеверные сенсоры делают первые, но достаточно уверенные шаги. Следует упомянуть новые достижения в химии поверхностных реакций: создание сенсора на ионы металлов в растворе [7], сенсора на тиоловые соединения [8]. С помощью атомных весов удалось получить новые данные о формировании фибрилл в монослоях лизоцима [9]. Последняя работа имеет важное значение для понимания молекулярной природы ряда нейродегенеративных заболеваний человека.

У атомных весов есть и другие области эффективного применения, в частности, для термогравиметрического анализа наночастиц, для измерения вязкости и плотности жидкостей и относительной влажности паров. Их можно использовать в качестве микроминиатюрного датчика температуры и ИК-излучения, определителя динамики усадки

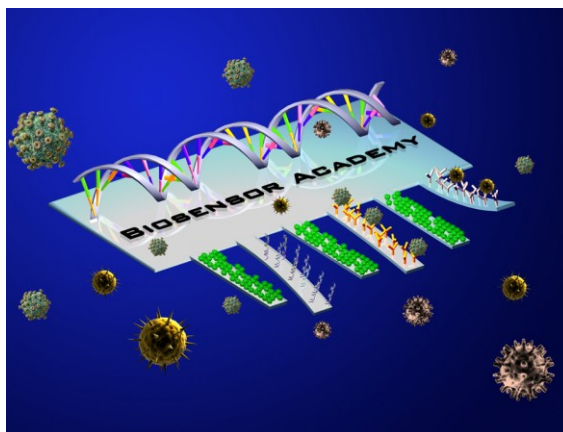


Рис. 1. Массив кантилеверов, имеющих индивидуальные рецепторные слои. Отклонения фиксируют с помощью оптической системы аналогично тому, как это осуществляется в атомно-силовом микроскопе.

тонких пленок с течением времени: защитных, лакокрасочных и других покрытий.

Автор выражает благодарность за поддержку Министерству образования и науки (02.512.11.2279, П255), РФФИ (10-02-06030-г, 10-04-01574-а), НАТО (Наука для мира, CBN.NR.NRSFP 983204), проектам МГУ-KIST и EU-RU.NET.

Список литературы:

1. Burg T.P., Godin M., Knudsen S.M., Shen W., Carlson G., Foster J.S., Babcock K., Manalis S.R., *Nature*, 446, 1066-1069 (2007).
2. Naik A. K., Hanay M. S., Hiebert W. K., Feng X. L., Roukes M. L., *Nature Nanotechnology*, 4, 445-450 (2009).
3. Jensen K., Kwanpyo Kim, Zettl A., *Nature Nanotechnology*, 3, 533-537 (2008).
4. Mo Li, H.X. Tang, M.L. Roukes., *Nature Nanotechnology*, 2, 114-120 (2007).
5. Hwang K.S., Lee S.-M., Kim S.K., Lee J.H., *Annual Reviews of Analytical Chemistry*, 77-98 (2009).
6. Yaminsky I., Gorelkin P., Kiselev G., *Japanese Journal of Applied Physics*, 45, 3B, 2316-2318 (2006).
7. Beloglazkina E.K., Majouga A.G., Zyk N.V., Rakhimov R.D., Yaminsky I.V., Gorelkin P.V., Kiselev G.A., Kutateladze A.G., *Thin Solid Films*, 515, 4649-4661 (2007).
8. Киселев Г.А., Кудринский П.В., Яминский И.В., Виноградова О.И., *Физикохимия поверхности и защита материалов*, 44, 6, 573-580 (2008).
9. Украинцев Е.В., Киселев Г.А., Кудринский А.А., Лисичкин Г.В., Яминский И.В., *Высокомолекулярные соединения, Серия Б*, 49,1, 125-129 (2007).

АСМ-ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ ДНКАЗЫ НА ДНК, АДсорБИРОВАННУЮ НА ТВЕРДУЮ ПОДЛОЖКУ

Н.А. Янькова¹, Д.И. Ахмерова¹, А.Д. Сушко²,
Е.В. Дубровин^{2,3}, И.В. Яминский^{1,2,3}

¹Химический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова

²ООО НПП «Центр перспективных технологий»

³Физический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова
tatoshechka-yna@rambler.ru

При исследовании с помощью атомно-силовой микроскопии (АСМ) биомолекул и их комплексов часто встает вопрос о влиянии поверхности подложки на образец. Поскольку АСМ зачастую изучает процессы молекулярного взаимодействия в режиме реального времени прямо на подложке, то влияние подложки может приводить к искажению кинетики такого взаимодействия по сравнению с такой же реакцией в растворе. Это может происходить, например, из-за полной или частичной потери активности связывающих центров адсорбированной к твердому субстрату молекулы, которая участвует во взаимодействии.

Целью данной работы было изучить влияние фермента на адсорбированный на твердую подложку биополимер на примере модельной системы, где в качестве биополимера используется ДНК, а в качестве фермента – ДНКаза. Особенность задачи состоит в том, что молекулы ДНК прикреплены к поверхности за счет физической адсорбции и не могут свободно находиться в объеме.

В работе использовалась коммерческая ДНК Fermentas pBR322. Нанесение ДНК на слюду производили стандартным способом из раствора ДНК, содержащем одно- и двухвалентные катионы, после чего образец промывали в дистиллированной воде [1].

АСМ-изображение молекул ДНК pBR322 приведено на рисунке 1. Средняя длина молекулы по данным АСМ составляет 1270 нм.

Обработку поверхности слюды с адсорбированной ДНК проводили нанесением раствора ДНКазы на подложку и его экспонированием в течение нескольких минут, после чего поверхность промывалась дистиллированной водой и высушивалась.

После ДНКазной обработки поверхности на АСМ-изображениях молекулы ДНК не наблюдаются (см. рис. 2), вместо чего поверхность равномерно покрыта большим количеством относительно низких (2-3 нм) частиц, которые, вероятно, являются результатом взаимодействия ДНК с ДНКазой. Таким

образом, молекулы ДНК, адсорбированные на поверхность слюды, являются легко доступными для ДНКазы.

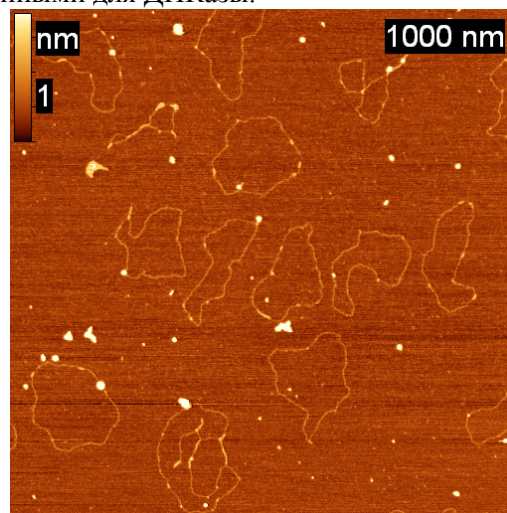


Рис. 1. АСМ-изображение ДНК pBR322, нанесенной на слюду.

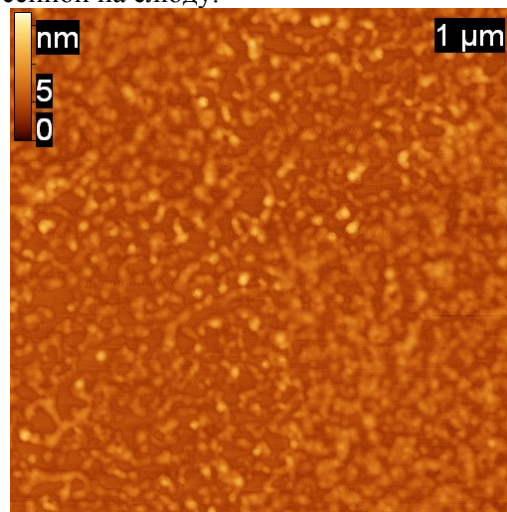


Рис. 2. АСМ-изображение адсорбированной ДНК после экспонирования в раствор ДНКазы.

Работа поддержана программой грантов Президента Российской Федерации МК-2010 (проект МК-5121.2010.2)

Список литературы:

1. Hansma H.G., Laney D.E., Biophysical Journal, 70, 1933-1939 (1996).

НАНОМЕХАНИЧЕСКАЯ КАНТИЛЕВЕРНАЯ СИСТЕМА – НОВЫЙ ИНСТРУМЕНТ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ ПОВЕРХНОСТНЫХ ЯВЛЕНИЙ

П.В. Горелкин, Г.А. Киселев, Д.С. Мухин, Д.В. Колесов, А.С. Ерофеев,
И.В. Яминский

МГУ им. М.В. Ломоносова
ООО «Академия биосенсоров»
gorelkin@biosensoracademy.com

Одно из приоритетных направлений нано- и биотехнологий – разработка новых прецизионных наномеханических кантилеверных систем. Такие устройства используются для изучения процессов формирования монослойных пленок на твердых поверхностях, исследования комплиментарного связывания биомолекул (белки и нуклеиновые кислоты), создания наноструктур на различных поверхностях.



Рис. 1. Фотография наномеханической кантилеверной системы – БиоСкан.

Учеными МГУ им. М.В. Ломоносова был разработан для дальнейшей коммерциализации прототип прибора БиоСкан (рис. 1) для прецизионного измерения сил в тонких пленках. Устройство сопровождается специальным программным обеспечением, позволяющим проводить удаленный сбор и обработку информации через современные протоколы соединений с несколькими приборами.

Устройство БиоСкан можно использовать в исследовательских целях для изучения поверхностных явлений в физике, химии и биологии для прецизионного измерения массы и поверхностного натяжения в тонких пленках. На основе данного прибора может быть соз-

дан практикум для дистанционного обучения студентов работе с микроэлектронными механическими системами.

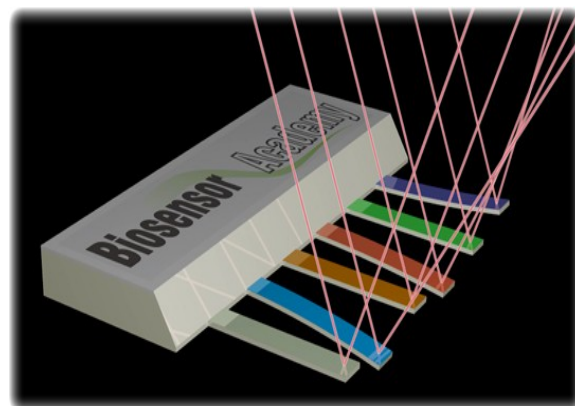


Рис. 2. Массив нанокантилеверных сенсоров.

Прибор пригоден для проведения многофакторного анализа жидкостей и газов и имеет перспективу быть использованным в качестве основы для создания высокочувствительных и селективных многофакторных биосенсоров.

Работа выполнена при финансовой поддержке Федерального агентства по науке и инновациям (02.512.11.2279), Федерального агентства по образованию (П255), Программы НАТО "Наука для мира" (CBN.NR.NRSFP 983204), РФФИ (10-02-06030, 10-04-01574) и Корейского института науки и технологии (KIST-MSU).

Список литературы:

1. Beloglazkina E., Majouga A., Zyk N., Rakhimov R., Yaminsky I., Gorelkin P., Kiselev G., Kutateladze A., Thin solid films, 515, 11, 4649-4661 (2007).
2. Украинцев Е.В., Киселев Г.А., Кудринский А.А., Лисичкин Г.В., Яминский И.В., Высокомолекулярные соединения, Серия Б, 49, 1, 125–129 (2007).
3. Yaminsky I., Gorelkin P., Kiselev G., Japanese Journal of Applied Physics, 45, 3B, 2316-2318 (2006).

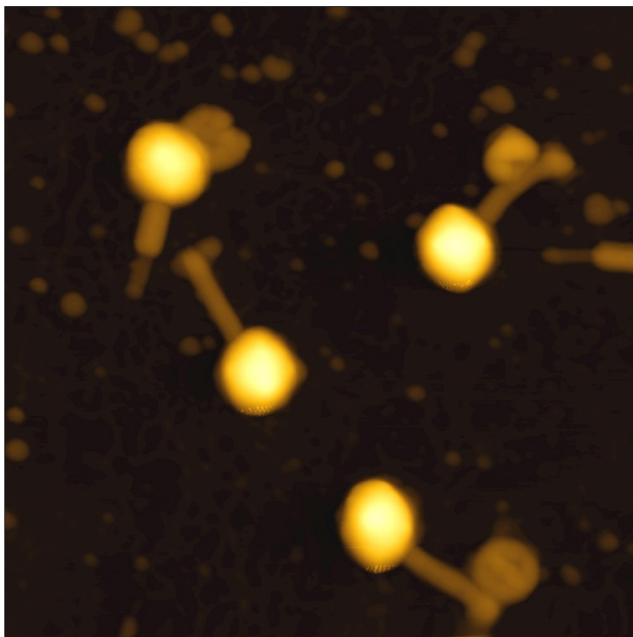
Конкурс изображений

BioImage

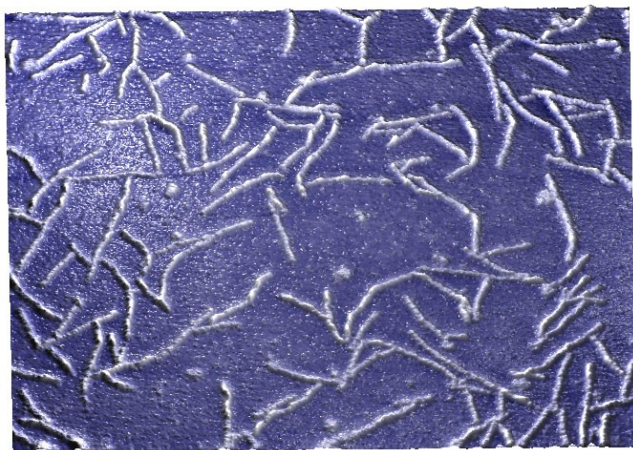
Багров Дмитрий Владимирович

Биологический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова

Микроскоп: атомно-силовой микроскоп Solver Pro-M (НТ-МДТ, Россия)



Булавы. Изображение бактериофагов EL *Pseudomonas Aeruginosa* на слюде. Изображение получено на приборе Solver PRO-M в полуконтактном режиме на воздухе, кантилевер NSG11S. Размер кадра 1,2x1,2 мкм. Образец предоставлен О.В. Шабуровой (ГНЦ РФ "ГосНИИГенетика").



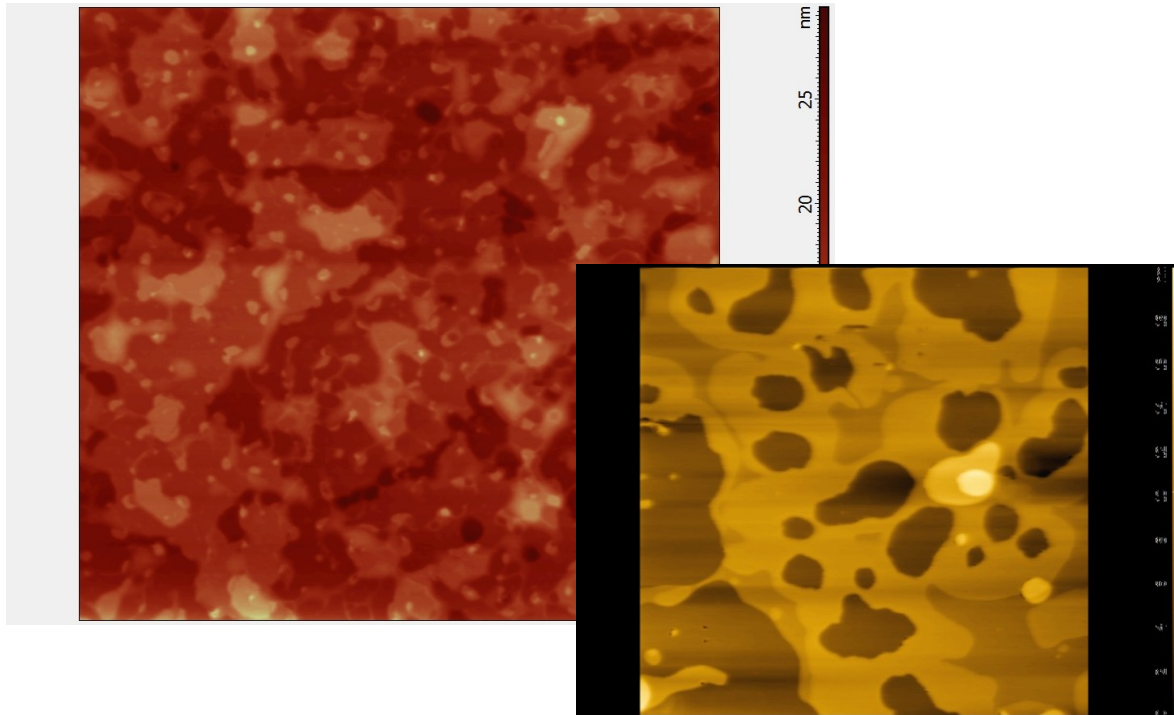
Лабиринт. Изображение надмолекулярных агрегатов рекомбинантного белка паутины на слюде. Изображение получено на приборе Solver PRO-M в полуконтактном режиме на воздухе, кантилевер NSG11S. Размер кадра 1x1 мкм. Образец предоставлен В.Г. Богушем (ГНЦ РФ "ГосНИИГенетика").

BioImage

Гриценкова Ольга

МГУ им. М.В. Ломоносова

Микроскоп: атомно-силовой микроскоп Solver Pro-M (НТ-МДТ, Россия)



Изображения DPPC липидного бислоя на воздухе.

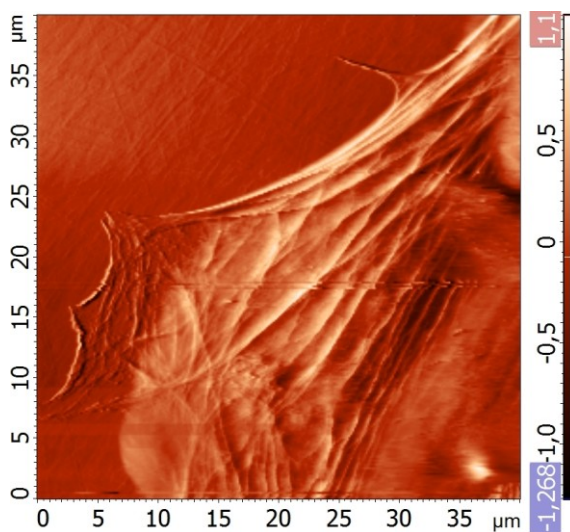
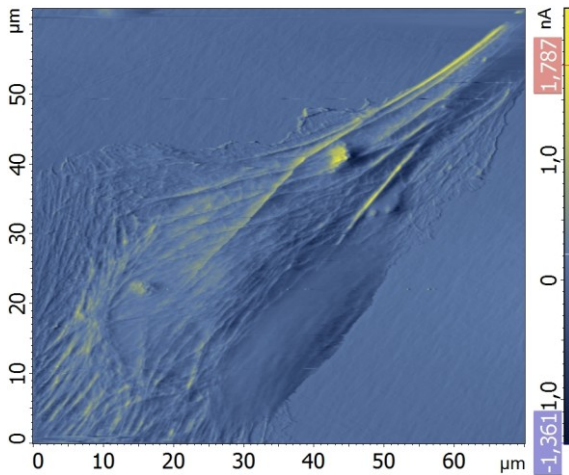
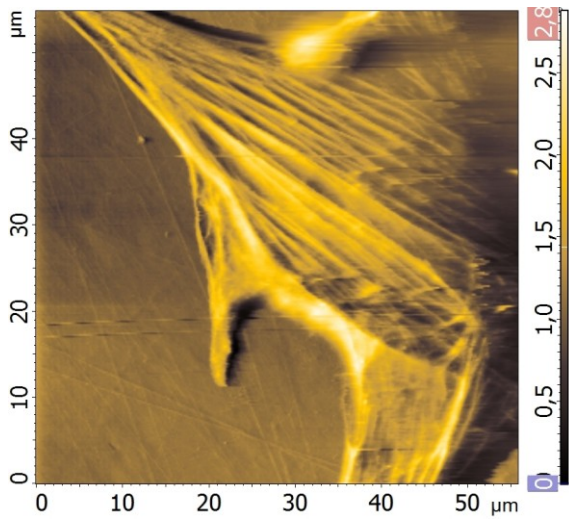
На подложке наблюдается дефектный липидный бислой, причем в некоторых местах в нем видны более тонкие домены. Возможно, они сформировались из-за попадания некоторой примеси. Иногда два или три бислоя накладываются друг на друга.

BioImage

Ефремов Юрий

*Кафедра биоинженерии биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова
Микроскоп: атомно-силовой микроскоп Solver Bio Olympus (НТ-МДТ, Россия)*

Изображения живых фибробластов в среде культивирования на подложке: верхнее – фибронектин, остальные – желатин. Контактный режим, сигнал рассогласования обратной связи.



**УЧАСТНИКИ КОНФЕРЕНЦИИ
«СОВРЕМЕННЫЕ ДОСТИЖЕНИЯ БИОНАНОСКОПИИ»**

Алекперов Султан Джабарович

*филиал МГУ им. М.В. Ломоносова
в г. Баку
sdalekperov@mail.ru*

Афанасьев Антон Евгеньевич

*Институт спектроскопии РАН,
г. Троицк
afanasiev@isan.troitsk.ru*

Ахмерова Дилара Иршатовна

*Химический факультет МГУ
им. М.В. Ломоносова, г. Москва
dilaro4ka05@rambler.ru*

Багров Дмитрий Владимирович

*Биологический факультет МГУ
им. М.В. Ломоносова, г. Москва
dbagrov@gmail.com*

Байрамуков Виктор Юрьевич

*Петербургский институт ядерной
физики РАН, г. Гатчина
vbayramukov@gmail.com*

Богданов Алексей

Александрович
*Физический факультет СПбГУ,
г. Санкт-Петербург
aleks_aa@mail.ru*

Будник Оксана Петровна

*Международный центр «Институт
прикладной оптики», Украина
oksanalight@gmail.com*

Бухарина Наталья Сергеевна

*НИИ Биомедицинской химии
им. В.Н. Ореховича РАН, г. Москва
natalie_buharina@list.ru*

Горелкин Петр Владимирович

*ООО «Академия биосенсоров»
gorelkin@biosensoracademy.com*

Грищенко Ольга Викторовна

*МГУ им. М.В. Ломоносова, г. Москва
o.grishchenkova@gmail.com*

Гудкова Светлана

Александровна
*МФТИ им. Баумана, г. Москва
svetlanagudkova@yandex.ru*

Гудкова Ольга Евгеньевна

*НИИ общей реаниматологии
им. В.А. Неговского РАН, г. Москва
olkagood@yandex.ru*

Дзюбенко Егор Вячеславович

*Биологический факультет МГУ
им. М.В. Ломоносова, г. Москва
ejeek@yandex.ru*

Дубровин Евгений

Владимирович
*Физический факультет МГУ
им. М.В. Ломоносова, г. Москва
dubrovin@polly.phys.msu.ru*

Ежов Александр Анатольевич

*Физический факультет МГУ
им. М.В. Ломоносова, г. Москва
alexander-ezhov@yandex.ru*

Ерофеев Александр Сергеевич

*Физический факультет МГУ
им. М.В. Ломоносова, г. Москва
erofeev@polly.phys.msu.ru*

Ефремов Юрий Михайлович

*Биологический факультет МГУ
им. М.В. Ломоносова, г. Москва
yuefa2111@mail.ru*

**Жавнерко Геннадий
Константинович**

*Институт химии новых материалов
НАН Беларуси, г. Минск
zhavn@ichnm.basnet.by*

Завьялова Елена Геннадиевна

*Химический факультет МГУ
им. М.В. Ломоносова, г. Москва
zlenka2006@rambler.ru*

Загидуллин Вадим Эдуардович

*Биологический факультет МГУ
им. М.В. Ломоносова, г. Москва
vad-zag@yandex.ru*

Замалеева Алсу Ильгизовна

*Казанский (Приволжский) федеральный
университет, г. Казань
alsu130ksu@mail.ru*

Zivkovic Jelena

*Radboud University Nijmegen, Netherlands
j.zivkovic@science.ru.nl*

Игнатюк Татьяна Евгеньевна

*ГНЦ РФ ИТЭФ, г. Москва
ignatiouk@itep.ru*

Илин Елена

*Technische Universität Kaiserslautern,
Германия
ilin@rhrk.uni-kl.de*

Карпова Ольга Вячеславовна

*Биологический факультет МГУ
им. М.В. Ломоносова, г. Москва
okar@genebee.msu.su*

Касьяненко Нина Анатольевна

*Физический факультет СПбГУ,
г. Санкт-Петербург
nkasyanenko@mail.ru*

Sang Kyung Kim

*Korea Institute of Science and Technology
tskim@microsystem.re.kr*

Коновалова Ольга Анатольевна

*Казанский государственный
университет, г. Казань
olga.konovalova@bk.ru*

Краевский Сергей

Владимирович
*ГНЦ РФ ИТЭФ, г. Москва
skraevsky@mail.ru*

Красикова Алла Валерьевна

*СПбГУ, г. Санкт-Петербург
alla.krasikova@gmail.com*

Крупенин Владимир

Александрович
*Физический факультет МГУ
им. М.В. Ломоносова, г. Москва
vladimir.krupenin@phys.msu.ru*

Курочкин Илья Николаевич

*Химический факультет МГУ им.
М.В. Ломоносова, г. Москва
ikur@genebee.msu.su*

Лускинович Петр Николаевич

*ЗАО «Техносистема Н», г. Москва
nanofactory@mail.ru*

Любченко Юрий Львович
*University of Nebraska Medical Center,
Omaha, USA*
ylyubchenko@unmc.edu

Макарова Дарья Владимировна
*ФГУ Российский Геронтологический
научно-клинический центр Росздрава,
г. Москва*
svia@rambler.ru

Максимов Георгий
*Биологический факультет МГУ
им. М.В. Ломоносова, г. Москва*
yavor@pisem.net

**Меньшиков Евгений
Александрович**
*University of Nebraska Medical Center,
Omaha, USA*
emenshikov@gmail.com

Меньшикова Ирина Петровна
*University of Nebraska Medical Center,
Omaha, USA*
ira.menshikova@gmail.com

**Никитин Николай
Александрович**
*Биологический факультет МГУ
им. М.В. Ломоносова, г. Москва*
nik.nikitin@gmail.com

Никитина Ирина Александровна
*Гомельский государственный
медицинский университет, Беларусь,
г. Гомель*
nikkitina@gmail.com

**Образцова Екатерина
Александровна**
*ИБХ им. М.М. Шемякина и
Ю.А. Овчинникова, г. Москва*
kobr@polly.phys.msu.ru

Паршина Евгения Юрьевна
*Биологический факультет МГУ
им. М.В. Ломоносова, г. Москва*
parshinae@gmail.com

Пестовский Юрий Сергеевич
*Химический факультет МГУ
им. М.В. Ломоносова, г. Москва*
organics@mail.ru

Печникова Евгения Викторовна
*Институт кристаллографии
им. А.В. Шубникова*
eugenia.pechnikova@gmail.com

**Пищальникова Анастасия
Владимировна**
*Биологический факультет МГУ
им. М.В. Ломоносова, г. Москва*
bionastya@gmail.com

**Пухлякова Екатерина
Александровна**
*Биологический факультет МГУ
им. М.В. Ломоносова, г. Москва*
ekaterina24_87@mail.ru

Пучкова Анастасия Олеговна
*Физический факультет СПбГУ,
г. Санкт-Петербург*
aoruchkova@mail.ru

Рахимова Алина Рифатовна
*Химический факультет МГУ
им. М.В. Ломоносова, г. Москва*
alinarar@gmail.com

Рашкович Леонид Николаевич
*Физический факультет МГУ
им. М.В. Ломоносова, г. Москва*
rashk@polly.phys.msu.ru

Роман Светлана Георгиевна

*Физический факультет МГУ
им. М.В. Ломоносова, г. Москва
svetabaj@gmail.com*

Роскошная Анна Сергеевна

*Биологический факультет МГУ
им. М.В. Ломоносова, г. Москва
annarosk@gmail.com*

Сафенкова Ирина

*Институт биохимии им. А.Н. Баха РАН,
г. Москва
irina.safenkova@gmail.com*

**Сергунова Виктория
Александровна**

*НИИ общей реаниматологии
им. В.А. Неговского РАМН, г. Москва
vika_23s82@mail.ru*

Синицына Ольга Валентиновна

*ИНЭОС РАН, г. Москва
sinitsyna@gmail.com*

Соколов Петр Александрович

*Физический факультет СПбГУ,
г. Санкт-Петербург
farshmac@inbox.ru*

Соловьев Владимир

*ФГУ ТИСНУМ, г. Троицк
vladimir.sol@bk.ru*

Сушко Анна Дмитриевна

*ООО НПП «Центр перспективных
технологий», г. Москва
sushko@polly.phys.msu.ru*

Сухарев Сергей Сергеевич

*ФГОУ ИПК ФМБА, кафедра онкологии
voimega@mail.ru*

Тихомиров Алексей

Александрович
*ЗАО «НТ-МДТ», г. Зеленоград
savin@ntmdt.ru*

Толстова Анна Павловна

*МГУ им. М.В. Ломоносова, г. Москва
solly8@mail.ru*

Трушин Максим Викторович

*Казанский государственный
университет, г. Казань
mtrushin@mail.ru*

Турчанинов Михаил

Александрович

*Объединенный институт высоких
температур, РАН, г. Москва
turchaninoff@mail.ru*

Тычинский Максим Викторович

*МИРЭА, г. Москва
vtych@yandex.ru*

Федянин Андрей Анатольевич

*МГУ им. М.В. Ломоносова, г. Москва
fedyanin@nanolab.phys.msu.ru*

Филимоненко Дмитрий

Сергеевич

*Институт физики им. Б.И. Степанова
НАН Беларуси, г. Минск
demonr@tut.by*

Филонов Александр Сергеевич

*Химический факультет МГУ
им. М.В. Ломоносова, г. Москва
filonov@femtoscanonline.com*

Ходырев Сергей Владимирович

*Югорский научно-исследовательский
институт информационных технологий,
г. Ханты-Мансийск
ucnt@uriit.ru*

Храмова Юлия Владимировна

*Биологический факультет МГУ
им. М.В. Ломоносова, кафедра
эмбриологии, г. Москва
yul.khramova@gmail.com*

Шарипов Талгат

Ишмухамедович

*ГОУ ВПО Башкирский государственный
университет, г. Уфа
sha-t@yandex.ru*

Шаров Григорий Германович

*Биологический факультет МГУ
им. М.В. Ломоносова, кафедра
биоинженерии, г. Москва
sharov.grigory@gmail.com*

Яминский Игорь Владимирович

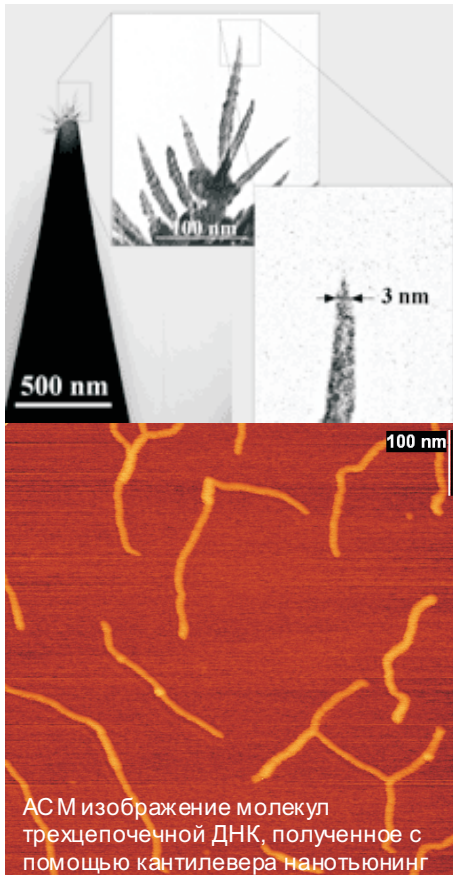
*Физический факультет МГУ
им. М.В. Ломоносова, г. Москва
yaminsky@nanoscopy.org*

Янькова Наталья Александровна

*Химический факультет МГУ
им. М.В. Ломоносова, г. Москва
tatoshechka-yna@rambler.ru*



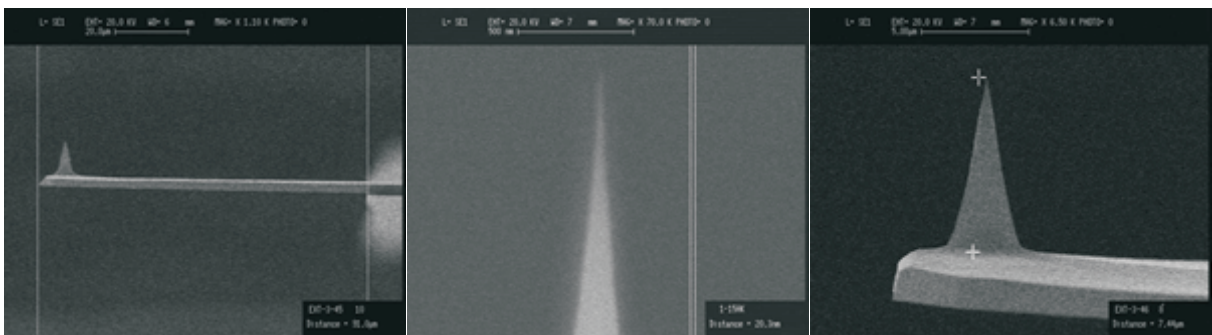
ООО НПП "Центр перспективных технологий"
Advanced Technologies Center
www.nanoscopy.net
e-mail: spm@nanoscopy.net



Нанотьюнинг – кантилевер высокого разрешения

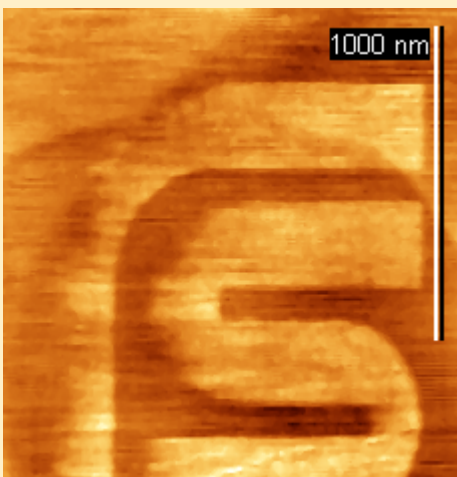
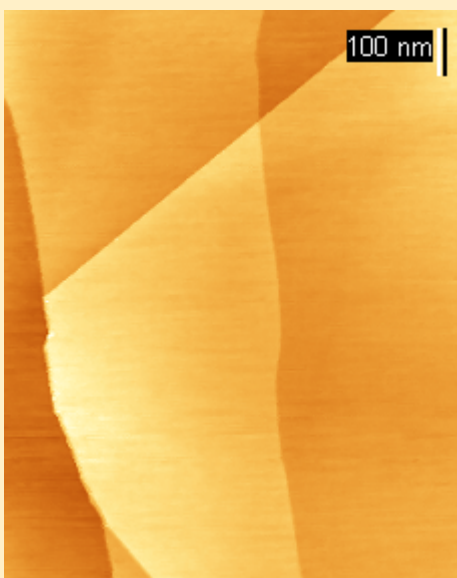
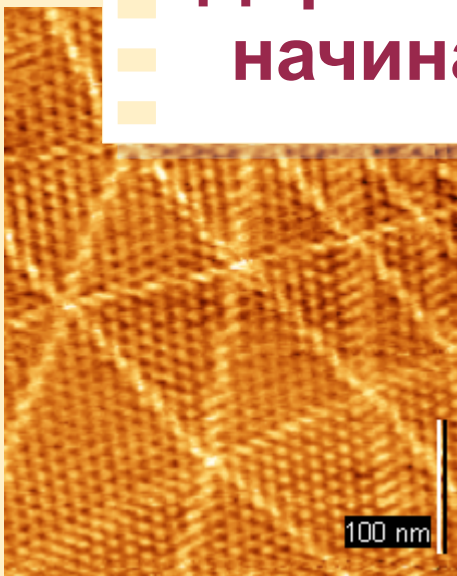
- Сверхострые зонды из алмазоподобного углерода
- Радиус зонда ~1 нм
- Наблюдаемый диаметр молекул ДНК 14-17 нм

Кремниевые кантилеверы



- Кантилеверы для всех видов зондовой микроскопии
- Большой выбор размеров и характеристик
- Категория "Super" — радиус скругления иглы менее 10 нм
Категория "Standard" — радиус скругления иглы менее 25 нм
- Проводящее и магнитное покрытие

Дорога в мир НАНО начинается с графита

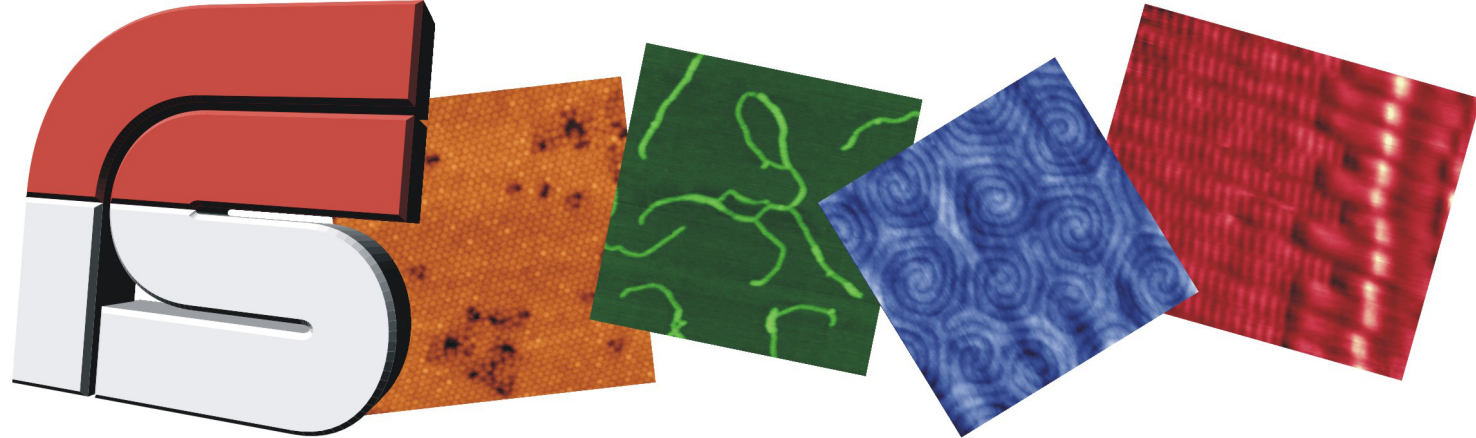


Высокоориентированный пиролитический графит:

- Гидрофобная подложка для исследования молекул, кластеров, монослоев
- Калибровочная решетка для зондовых микроскопов
- Модельная поверхность для проверки теорий зондовой микроскопии
- Удобный объект для студенческих практикумов по нанотехнологиям
- Материал для приготовления образцов графена

www.nanoscopy.net

Центр перспективных технологий



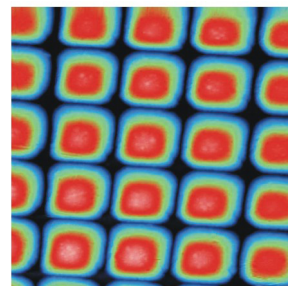
Центр перспективных технологий

www.nanoscopy.net, sptm@nanoscopy.net, (495) 926-37-59

Практикум по наноскопии – это увлекательное путешествие в мир атомов и молекул

Практикум комплектуется

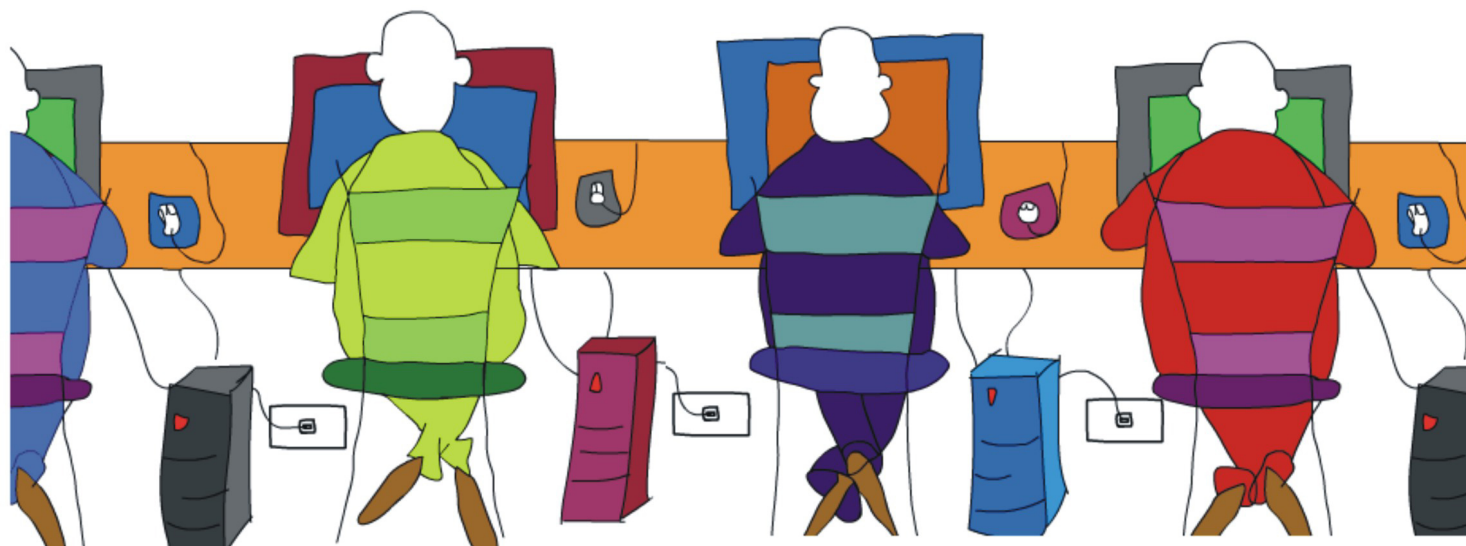
- ✎ сканирующим зондовым микроскопом “ФемтоСкан”
- ✎ компьютерами с большими экранами
- ✎ наборами образцов и наглядными описаниями
- ✎ программным обеспечением для управления микроскопом и построения трехмерных картинок



В практикуме Вы приобретаете полезные навыки работы на микроскопе. Доступны режимы туннельной, атомно-силовой, резистивной, электростатической, магнитно-силовой микроскопии и нанолитографии.

**Технологии открытого
интернет образования по
наноскопии**

5+



ФемтоСкан™. Сканирующие зондовые микроскопы, программное обеспечение, расходные материалы и аксессуары для нанотехнологии.

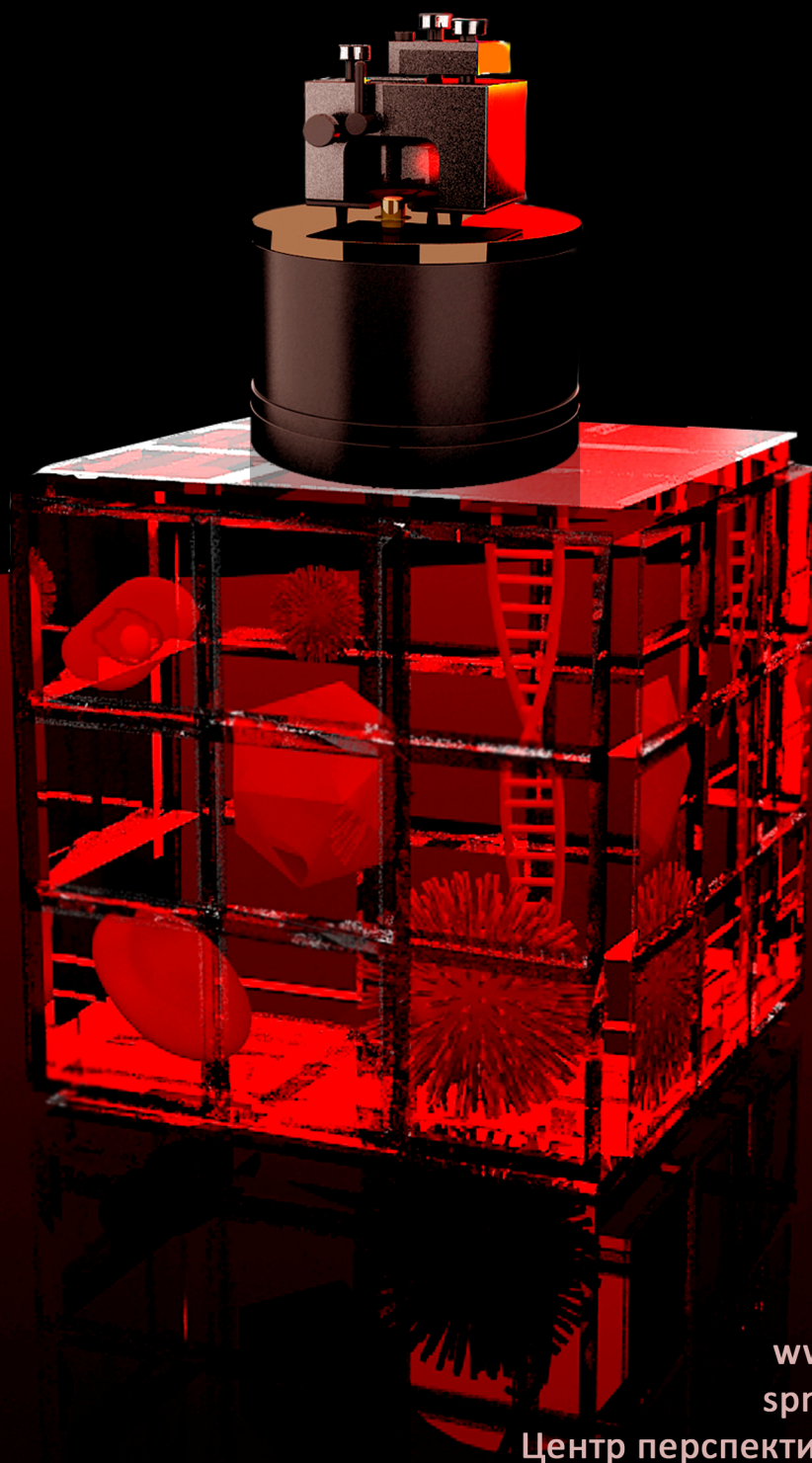
ATC
ADVANCED TECHNOLOGIES CENTER

ФЕМТОСКАН

многофункциональный сканирующий зондовый микроскоп

Полное управление микроскопом через Интернет
Регулируемый нагрев температуры образца
Измерения на воздухе и в жидкости
Оптическая микроскопия с передачей данных через Интернет
Более 50 режимов работы, в том числе:

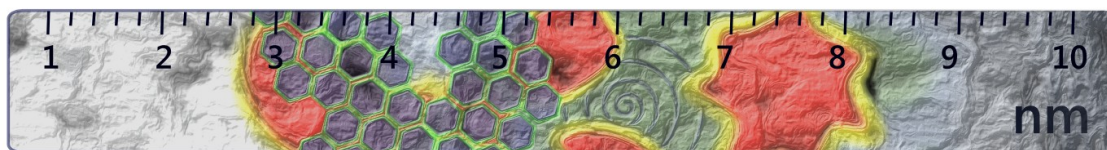
резонансная атомно-силовая микроскопия
контактная атомно-силовая микроскопия
сканирующая резистивная микроскопия
сканирующая туннельная микроскопия
электростатическая микроскопия
магнитно-силовая микроскопия
наноитография
и др.



фемтоскан.рф
www.nanoscopy.net
spm@nanoscopy.net

Центр перспективных технологий

Современные достижения бионаноскопии



Сборник тезисов четвертой международной конференции
"Современные достижения бионаноскопии". 15–18 июня 2010
года, Москва, физический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова
— 103 с.

Конференция проведена при поддержке:
Российского фонда фундаментальных исследований 10-02-06030-г,
ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на
2009-2013 годы ГК № 2180

Спонсоры:
ООО НПП "Центр перспективных технологий"

<http://www.nanoscopy.org/conf/>