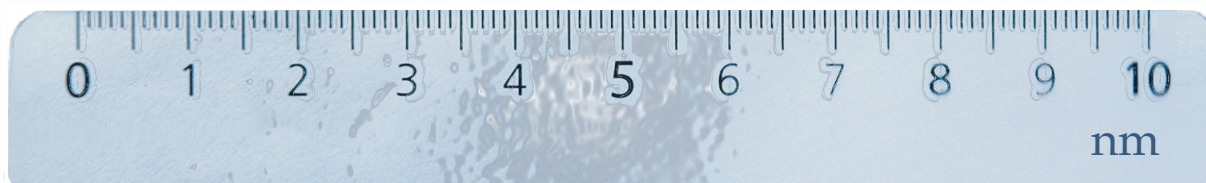


современные достижения БИОНАНОСКОПИИ



сборник тезисов

Вторая международная конференция
17-19 июня 2008 г., Москва
физический факультет МГУ

современные достижения БИОНАНОСКОПИИ



ВТОРАЯ МЕЖДУНАРОДНАЯ КОНФЕРЕНЦИЯ «СОВРЕМЕННЫЕ ДОСТИЖЕНИЯ БИОНАНОСКОПИИ»

17 – 19 июня, Москва,

Физический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова

Школа посвящена современным методам микроскопии высокого разрешения, достижениям сканирующей зондовой микроскопии и сопутствующим физико–химическим методам исследования биологических объектов.

В программу школы входят лекции по бионаноскопии, практические занятия по атомно–силовой микроскопии и сессия стендовых докладов.

Цель школы — повышение уровня подготовки научно–педагогических кадров, привлечение молодых исследователей к участию в научной работе по перспективным направлениям современной микроскопии и биотехнологии, повышение уровня кооперации молодых ученых.

Организационный комитет:

1. Сысоев Николай Николаевич, д.ф.–м.н., проф., физический факультет МГУ, — председатель;
2. Яминский Игорь Владимирович, д.ф.–м.н., проф., физический факультет МГУ, — сопредседатель;
3. Твердислов Всеволод Александрович, д.ф.–м.н., проф., физический факультет МГУ, — сопредседатель;
4. Багров Д.В., асп., физический факультет МГУ;
5. Галлямов М.О., к.ф.–м.н., физический факультет МГУ;
6. Горелкин П.В., асп., химический факультет МГУ;
7. Дубровин Е.В., к.ф.–м.н., физический факультет МГУ;
8. Колесов Д.В., асп., физический факультет МГУ;
9. Киселев Г.А., к.ф.–м.н., физический факультет МГУ;
10. Меньшиков Е.А., асп., физический факультет МГУ;
11. Мешков Г.Б., к.ф.–м.н., физический факультет МГУ;
12. Образцова Е.А., асп., физический факультет МГУ;
13. Сеницына О.В., асп., ИНЭОС РАН;
14. Сушко А.Д., ООО НПП «Центр перспективных технологий».

Программный комитет школы:

1. Панов В.И., д.ф.–м.н., профессор, физический факультет МГУ — председатель;
2. Трухин В.И., м.н., профессор, физический факультет МГУ;
3. Большакова А.В., к.ф.–м.н., химический факультет МГУ;
4. Дубровин Е.В., к.ф.–м.н., физический факультет МГУ;
5. Дрыгин Ю.Ф., д.х.н., профессор, НИИФХБ им. А.Н. Белозерского МГУ;
6. Клинов Д.В., к.ф.–м.н., ИБХ им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН;
7. Яминский И.В., д.ф.–м.н., профессор, физический факультет МГУ.

Ученый секретарь школы:

Е.В. Дубровин, к.ф.–м.н., физический факультет МГУ.

современные достижения БИОНАНОСКОПИИ



ПРОГРАММА ВТОРОЙ МЕЖДУНАРОДНОЙ КОНФЕРЕНЦИИ «СОВРЕМЕННЫЕ ДОСТИЖЕНИЯ БИОНАНОСКОПИИ»

1-й день (вторник, 17 июня 2008 года)

- 9.00 – 10.00 Регистрация участников.
10.00 – 10.20 Вступительное слово
10.20 – 10.55 Г.Б. Мешков: «Методические аспекты практического обучения зондовой микроскопии»
10.55 – 11.30 И.В. Яминский: «Современные достижения бионаноскопии»

Кофе-брейк

- 11.45 – 12.20 А.С. Филонов, «Организация лабораторного интернет-практикума на базе микроскопа Фемтоскан»
12.20 – 12.35 Д.В. Лебедев: «АСМ–зонды для исследований упругих свойств биологических объектов»
12.35 – 12.50 Д.А. Давыдов: «Изучение формирования трехкомпонентных липидных бислоев на слюде методом атомно–силовой микроскопии»

Кофе-брейк

- 13.00 – 14.30 Постерная сессия.
14.30 Экскурсия по центру коллективного пользования физического факультета МГУ.

2-й день (среда, 18 июня 2008 года)

- 10.00 – 10.35 Е.В. Дубровин, «АСМ–исследование биоспецифичных взаимодействий на поверхностях»
10.35 – 11.10 Г.А. Киселев: «Микромеханические биосенсоры на основе атомно–силовой микроскопии»

Кофе-брейк

- 11.25 – 12.00 О.В. Синицына: «Представляют ли углеродные нанотрубки реальную угрозу для здоровья?»
12.00 – 12.15 М.В. Трушин: «Исследование ДНК вегетативных форм и наноформ *M. Gallisepticum* S6 методом атомно–силовой микроскопии»
12.15 – 12.50 К.Е. Зиновьев: «Наномеханические кантилеверные сенсоры со встроенным оптическим считыванием данных»
12.50 – 13.25 Круглый стол «Перспективы развития бионаноскопии», председатель профессор И.В. Яминский

Кофе-брейк

- 14.00 – 16.00 специальная сессия «Участник молодежного научно-инновационного конкурса»

3-й день (воскресенье, 17 июня 2007 года)

- 10.00 – 14.00 «Исследование биологических объектов с помощью АСМ», практическое занятие.

СОДЕРЖАНИЕ

ОСОБЕННОСТИ МОРФОЛОГИЧЕСКОГО СТРОЕНИЯ СЛЮННЫХ ЖЕЛЕЗ, ВЫЯВЛЯЕМЫЕ С ПОМОЩЬЮ РАЗЛИЧНЫХ МЕТОДОВ МИКРОСКОПИИ

Е.С. Ариффулина, А.И. Варшавский, С.П. Зимин..... 8

ОСОБЕННОСТИ ПРИМЕНЕНИЯ АТОМНО–СИЛОВОЙ МИКРОСКОПИИ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ ВОЛОС

Д.В. Багров, И.В. Яминский, К.В. Шайтан, М.П. Кирпичников..... 9

ПРИМЕНЕНИЕ АТОМНО–СИЛОВОЙ МИКРОСКОПИИ ДЛЯ ВИЗУАЛИЗАЦИИ ПОВЕРХНОСТИ БАКТЕРИЙ

Е.А. Плетенёва, Д.В. Багров, О.В. Шабурова, И.В. Яминский, К.В. Шайтан..... 10

СНИЖЕНИЕ ПОПЕРЕЧНЫХ БЛУЖДАНИЙ ОПТИЧЕСКОГО ПУЧКА ДИАФРАГМИРОВАНИЕМ ДЛЯ ПОВЫШЕНИЯ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ АСМ

В.В. Бауков, В.В. Жижимонтов, А.В. Беляев, И.В. Быков 11

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ АТОМНО–СИЛОВОЙ МИКРОСКОПИИ ДЛЯ АНАЛИЗА СИЛ АДГЕЗИИ ПОВЕРХНОСТИ АЛМАЗА, МОДИФИЦИРОВАННОЙ АТОМАРНЫМ ВОДОРОДОМ ИЛИ КИСЛОРОДОМ

О.П. Будник, А.П. Будник 13

ПРЕИМУЩЕСТВА АВТОМАТИЗИРОВАННЫХ МЕТОДИК В ИЗУЧЕНИИ БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБЪЕКТОВ

И.В. Быков..... 14

МОРФОЛОГИЯ БИОСОВМЕСТИМЫХ ПОЛИМЕРНЫХ АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫХ ПОКРЫТИЙ

Д.Л. Горбачев, Д.В. Тапальский, А.И. Козлова, М.А. Ярмоленко 16

ЭЛЕКТРИЧЕСКИЕ И ЭЛЕКТРОННЫЕ ЭФФЕКТЫ В БИОЛОГИЧЕСКИХ СИСТЕМАХ ПО ДАННЫМ ЗОНДОВОЙ МИКРОСКОПИИ

А.П. Громова 17

МОДИФИКАЦИЯ ПОВЕРХНОСТИ ПОЛИМЕТИЛМЕТАКРИЛАТА КИСЛОРОДНОЙ ПЛАЗМОЙ И ВАКУУМНЫМ УЛЬТРАФИОЛЕТОМ

А.П. Алехин, С.А. Гудкова, А.Г. Кириленко, В.А. Кротков 19

ИЗУЧЕНИЕ ФОРМИРОВАНИЯ ТРЕХКОМПОНЕНТНЫХ ЛИПИДНЫХ БИСЛОЕВ НА СЛЮДЕ МЕТОДОМ АТОМНО–СИЛОВОЙ МИКРОСКОПИИ

П.В. Горелкин, Д.А. Давыдов, И.В. Яминский, А.А. Ярославов 20

АСМ–ИССЛЕДОВАНИЕ БИОСПЕЦИФИЧНЫХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ НА ПОВЕРХНОСТЯХ

Е.В. Дубровин, С.Г. Игнатов, Т.Е. Игнатьев, С.В. Краевский, Г.Н. Федюкина, И.В. Яминский..... 21

ИССЛЕДОВАНИЕ ПЛЕНОК БИОКОМПОЗИТА СУБТИЛИЗИН КАРЛСБЕРГ/ХИТОЗАН ПРИ ПОМОЩИ АТОМНО–СИЛОВОЙ МИКРОСКОПИИ

А.В. Бачева, А.А. Ежов 22

МЕТОД АТОМНО-СИЛОВОЙ МИКРОСКОПИИ В АНАЛИЗЕ ПРОЦЕССА СТАБИЛИЗАЦИИ НАНОСЕРЕБРА СОПОЛИМЕРАМИ МАЛЕИНОВОЙ КИСЛОТЫ

А.С. Ерофеев, И.В. Яминский, Н.А. Самойлова, М.А. Краюхина 23

ПРИМЕНЕНИЕ МЕТОДА ОПТИЧЕСКОГО ПИНЦЕТА ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ МЕЖДУ МИКРООБЪЕКТАМИ

А.Г. Жданов, Е.В. Любин, М.Д. Хохлова 24

ПОВЕРХНОСТНАЯ СТРУКТУРА КЛЕТОК ДРОЖЖЕЙ, ПОКРЫТЫХ ПОЛИМЕРНЫМИ ТОНКИМИ ПЛЕНКАМИ И ЗОЛОТЫМИ НАНОЧАСТИЦАМИ

А.И. Замалеева, Д.И. Тазетдинова, М.В. Морозов, Ф.К. Алимова,
А.Х. Гильмутдинов, Р.Ф. Фахруллин 25

ОСОБЕННОСТИ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ЛИНЕЙНО–ЦЕПОЧЕЧНОГО УГЛЕРОДА С СЕРЕБРОМ

В.Д. Кочаков, Н.Д. Новиков, П.А. Ишмуратов, В.А. Казаков..... 26

МИКРОМЕХАНИЧЕСКИЕ БИОСЕНСОРЫ НА ОСНОВЕ АТОМНО–СИЛОВОЙ МИКРОСКОПИИ

Г.А. Киселев, П.В. Горелкин, И.В. Яминский 28

КАНТИЛЕВЕРЫ ДЛЯ ХИМИЧЕСКИХ И БИОЛОГИЧЕСКИХ СЕНСОРОВ

Д.В. Колесов, И.В. Яминский 29

МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ АОРТЫ ЖИВОТНЫХ В УСЛОВИЯХ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО МОДЕЛИРОВАНИЯ

Р.В. Степанов, В.Д. Кочаков, А.А. Юсов..... 30

СПОСОБЫ АНАЛИЗА ЭРИТРОЦИТОВ ПРИ ПОМОЩИ АТОМНО–СИЛОВОЙ МИКРОСКОПИИ

Т.Г. Кузнецова, М.Н. Стародубцева, Е.И. Коваленко, Н.И. Егоренков..... 31

ЗОНДЫ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЙ УПРУГИХ СВОЙСТВ БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБЪЕКТОВ ПРИ ПОМОЩИ АТОМНО–СИЛОВОГО МИКРОСКОПА

Д.В. Лебедев, А.П. Чукланов, А.А. Бухараев, О.С. Дружинина..... 33

ИССЛЕДОВАНИЕ ВОЛОКОН ИЗ РЕКОМБИНАНТНЫХ БЕЛКОВ ПАУТИНЫ

Д.В. Клинов, В.Г. Богуш, О.С. Соколова, Л.И. Давыдова, К.В. Сидорюк, Н.Г. Есипова, Т.В. Неретина, И.А. Оршанский, В.Г. Макеев, В.Г. Туманян, П.Б. Логинов, А.Г. Михайлов, К.В. Шайтан, В.Г. Дебабов, М.П. Кирпичников..... 34

АТОМНО-СИЛОВАЯ МИКРОСКОПИЯ ДОМЕНОВ НЕСТРУКТУРНОГО БЕЛКА ГОРДЕИВИРУСА

В.В. Макаров, Е.А. Образцова, И.В. Яминский, Н.О. Калинина 35

АТОМНО–СИЛОВАЯ ИНТЕРФЕРЕНЦИОННАЯ МИКРОСКОПИЯ

Е.А. Меньшиков 36

МЕТОДИКА ИЗУЧЕНИЯ СИНТЕТИЧЕСКИХ И БИОЛОГИЧЕСКИХ ПОЛИМЕРОВ

Е.А. Меньшиков, А.В. Большакова, И.В. Яминский 37

МЕТОДИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ПРАКТИЧЕСКОГО ОБУЧЕНИЯ ЗОНДОВОЙ МИКРОСКОПИИ

Г.Б. Мешков, И.В. Яминский..... 38

МЕТОД СВЕРХТОЧНОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ПОЛОЖЕНИЯ ИСТОЧНИКА СВЕТА В ОПТИЧЕСКОЙ МИКРОСКОПИИ

Д.С. Мухин, А.С. Филонов, И.В. Яминский 39

АНАЛИЗ СТРУКТУРЫ ПОВЕРХНОСТИ ТИМОЦИТОВ КРЫСЫ ПРИ ОКИСЛИТЕЛЬНОМ СТРЕССЕ ПРИ ПОМОЩИ АТОМНО–СИЛОВОЙ МИКРОСКОПИИ

И. А. Никитина, М. Н. Стародубцева, А. Н. Никитин, А. И. Грицук 40

ИМПЛАНТАНТЫ С ПОКРЫТИЕМ ИЗ ЛИНЕЙНО–ЦЕПОЧЕЧНОГО УГЛЕРОДА В ЧЕЛЮСТНО–ЛИЦЕВОЙ ХИРУРГИИ

В.В. Трубин, В.Д. Кочаков, Н.Д. Новиков 41

АНАЛИЗ ДЕЙСТВИЯ ОДНОСТЕННЫХ УГЛЕРОДНЫХ НАНОТРУБОК НА БАКТЕРИАЛЬНЫЕ КЛЕТКИ С ПОМОЩЬЮ АТОМНО–СИЛОВОЙ МИКРОСКОПИИ

Е.А. Образцова, Е.П. Лукашев, А.П. Зарубина, Д.В. Багров, И.В. Яминский 43

ЛОКАЛИЗАЦИЯ ЦИТОПЛАЗМАТИЧЕСКИХ ДОМЕНОВ ЧЕЛОВЕЧЕСКОГО КАНАЛА KV2.1

А.В. Пищальникова, О.С. Соколова 44

АНТИСЕПТИКА БЕЛКОВЫХ ПЛЕНOK НА НАНОМАСШТАБАХ

И.А. Рогов, Т.Н. Данильчук, Г.Б. Мешков, И.В. Яминский, Н.В. Михеева, Л.С. Кузнецова 45

ПРЕДСТАВЛЯЮТ ЛИ УГЛЕРОДНЫЕ НАНОТРУБКИ РЕАЛЬНУЮ УГРОЗУ ДЛЯ ЗДОРОВЬЯ?

О.В. Сеницына 46

МОДЕЛИРОВАНИЕ И ТЕСТИРОВАНИЕ ПРИ ПОМОЩИ АТОМНО–СИЛОВОЙ МИКРОСКОПИИ АССАМБЛИРОВАНИЯ C₆₀ И МОЛЕКУЛ ДНК

И.М. Спорыш, Е.В. Симонова, Е.А. Кисиль, Е.В. Дубровин, Е.А. Образцова 47

АТОМНО–СИЛОВАЯ МИКРОСКОПИЯ ВИРУСА МЕНГО

А.Д. Сушко, Ю.Ф. Дрыгин, И.В. Яминский 48

ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ МИКРОЧАСТИЦЫ НА ОСНОВЕ ДИОКСИДА КРЕМНИЯ

З.М. Томова, И.В. Соболева, А.А. Федянин 50

ИССЛЕДОВАНИЕ ДНК ВЕГЕТАТИВНЫХ ФОРМ И НАНОФОРМ *M. GALLISEPTICUM* S6 МЕТОДОМ АТОМНО–СИЛОВОЙ МИКРОСКОПИИ

М.В. Трушин, В.М. Чернов, О.А. Коновалова, Д.С. Налимов, О.А. Чернова..... 51

АТОМНО–СИЛОВАЯ МИКРОСКОПИЯ В БИОЛОГИИ: КТО, ГДЕ И ЧТО ИССЛЕДУЕТ

О.В. Трушина..... 52

ОРГАНИЗАЦИЯ ЛАБОРАТОРНОГО ИНТЕРНЕТ–ПРАКТИКУМА НА БАЗЕ МИКРОСКОПА ФЕМТОСКАН

А.С. Филонов 53

ОСОБЕННОСТИ ПРИГОТОВЛЕНИЯ ОБРАЗЦОВ ПРИ ИЗУЧЕНИИ ИММОБИЛИЗАЦИИ МОЛЕКУЛ ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ НА СЛЮДЕ С ПОМОЩЬЮ АТОМНО–СИЛОВОЙ МИКРОСКОПИИ

Т.И. Шарипов, Р.Р. Гарафутдинов, Р.З. Бахтизин..... 54

ИССЛЕДОВАНИЕ ПОЛЯРИЗАЦИОННЫХ СВОЙСТВ ПЛАЗМОННЫХ МЕТАМАТЕРИАЛОВ МЕТОДАМИ ОПТИЧЕСКОЙ СПЕКТРОСКОПИИ И МИКРОСКОПИИ

М.Р.Щербаков, П.П. Вабищевич, А.А. Федянин 55

ПРИМЕНЕНИЕ НАНОЭТАЛОНА ДЛЯ КАЛИБРОВКИ ОПТИЧЕСКИХ И ЗОНДОВЫХ МИКРОСКОПОВ

Д.И. Яминский..... 56

СОВРЕМЕННЫЕ ДОСТИЖЕНИЯ БИОНАНОСКОПИИ

И.В. Яминский..... 57

PROTEIN MISFOLDING: HOW STABLE ARE MISFOLDED DIMERS?

Yuri L. Lyubchenko, Junping Yu, Sarka Malkova, and Luda S. Shlyakhtenko..... 58

THE NANOMECHANICAL CANTILEVER SENSORS WITH INTEGRATED OPTICAL READ-OUT

K.E. Zinoviev, L.M. Lechuga, J.A. Plaza, V. Cadarso, C. Dominguez..... 59

ОСОБЕННОСТИ МОРФОЛОГИЧЕСКОГО СТРОЕНИЯ СЛЮННЫХ ЖЕЛЕЗ, ВЫЯВЛЯЕМЫЕ С ПОМОЩЬЮ РАЗЛИЧНЫХ МЕТОДОВ МИКРОСКОПИИ

Е.С. Ариффулина¹, А.И. Варшавский¹, С.П. Зимин²

¹Ярославская государственная медицинская академия,

²Ярославский государственный университет им. П.Г. Демидова

arifuliny@mail.ru

Успехи современной медицины неразрывно связаны с созданием новых приборов и методов анализа биологических объектов. Изучение основ патоморфологии слюнных желез (СЖ) позволяет находить новые методы диагностики и лечения их заболеваний.

Целью работы является обзор литературных данных о морфологических особенностях СЖ, выявляемых с помощью различных методов микроскопии.

Оптическая микроскопия, имеющая разрешение до 1 мкм, позволяет определить клеточный состав ткани СЖ, выделить основные типы клеток ацинусов, протоковой системы и межклеточного вещества, дать количественную и качественную оценку клеточного материала, а также основных органелл клетки [1,2]. Несмотря на то, что этим методом невозможно получить более тонкую визуализацию клетки и ее свойств, он, как наиболее доступный, широко используется для диагностики заболеваний в биопсийных препаратах.

Конфокальная лазерная сканирующая микроскопия позволяет оценить процессы экспрессии белков и генов в живых клетках, изучить динамику экспрессии трансгенов и провести многие биохимические тесты с флуоресцентными зондами.

С помощью конфокальной микроскопии и иммуногистохимических исследований возможно исследование трансмембранного транспорта ионов, в том числе ионов кальция, которые в ответ на стимуляцию секреторных клеток мускариновыми рецепторами активизируют анионные каналы, что стимулирует выход ионов хлора из ацинозных клеток в проток СЖ [3,4].

Сканирующая электронная микроскопия (СЭМ) выявляет более тонкую структуру клеток ацинусов и главного выводного протока СЖ [5]. Метод позволяет без процедуры окрашивания видеть рельефное объемное контрастное изображение, увеличенное в несколько тысяч раз. Это дает возможность дифференцировать эндоплазматический ретикулум, видеть мембрану секреторных гранул. Вблизи апикальной поверхности неко-

торых апикальных частях клеток после усиленной секреции можно видеть многочисленные мелкие вакуоли — результат эндотоза апикальной плазматической мембраны, а также десмосомы, плотные контакты между апикальными участками ацинарных клеток, микроворсинки, обращенные в просвет ацинуса и в просветы межклеточных секреторных капилляров. Длинные микроворсинки наблюдаются также и по бокам клеток ацинусов вблизи их оснований, где расстояние между клетками бывает несколько увеличенным.

Метод СЭМ позволяет исследовать образование и транспорт секреторных гранул внутри клетки ацинуса, но ограниченно применим в исследовании транспорта секрета через апикальную мембрану в проток.

Эта задача может быть решена применением атомно-силовой микроскопии (АСМ). АСМ отображает трехмерную структуру биологических объектов в физиологической окружающей среде. Это позволяет изучать биохимические и физиологические процессы в реальном времени с высоким разрешением. Метод широко применяется для исследования цитоскелета, хроматина и плазмидов, ионных каналов и разнообразных мембран, механизмов клеточной секреции. Динамические процессы типа экзоцитоза железистых клеток различных органов были изучены на препаратах лабораторных животных [6,7].

Список литературы:

1. Бабаева Ф.Г., Структура, функция и адаптивный рост слюнных желез, М., 1979.
2. Estecondo I., Int. J. Morphol., 23, 19–24 (2005).
3. Segawa A., J. Cell Science, 115, 1869–1876 (2002).
4. Park K., J. Biol. Chem., 276, 27042–27059 (2001).
5. Riva A., It. J. Anat. Embriol., 100, 367–374 (1995).
6. Jena B.P. Domestic Animal Endocrinology, 29, 145–165 (2005).
7. Lal R., Am. J. Physiol. Soc., C1–C21 (1994).

ОСОБЕННОСТИ ПРИМЕНЕНИЯ АТОМНО–СИЛОВОЙ МИКРОСКОПИИ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ ВОЛОС

Д.В. Багров, И.В. Яминский, К.В. Шайтан, М.П. Кирпичников

МГУ им. М.В. Ломоносова

dbagrov@gmail.com

Исследование микроструктуры волос является важнейшим предметом интереса производителей шампуней и косметических средств. Создание полезных и безопасных средств для ухода за волосами требует выяснения влияния различных факторов (например, нагрева, воздействия химикатов) на микроструктуру волос. Для этого было предложено использовать атомно-силовую микроскопию (АСМ), поскольку она позволяет не только визуализировать поверхность волоса [1], но и оценить его жесткость и адгезионные свойства [2,3].

Человеческий волос состоит из трех слоев. Верхний слой, который мы видим при исследовании методом АСМ, состоит из чешуек — кутикул, которые наслаиваются одна на другую. Данная работа направлена на то, чтобы выявить некоторые особенности процесса сканирования волоса и обработки получаемых изображений. Исследования были проведены на микроскопе SolverBio Olympus, обработка изображений выполнена в программе FemtoScan Online.

Количественный анализ изображений волоса, полученных с помощью АСМ (Рис. 1), был предложен в работе [1]. Он предусматривает вычисление таких параметров, как характерная высота чешуек (350–500 нм), расстояние между их краями (1,5 до 6,5 мкм), средней шероховатости кутикул (10–20 нм) и ряда других.

Развитие алгоритмов обработки изображений позволило нам ввести в рассмотрение более сложные параметры, например, описывающие изрезанность кутикул. Для этого края кутикул должны рассматриваться как плоские кривые. По ним можно вычислить среднюю R_a и среднеквадратичную R_q шероховатости (их характерные значения оказываются 0,5–3 мкм), безразмерный параметр асимметрии R_{sk} (обычно он имеет значения, меньшие единицы по модулю, что характерно для гладких кривых) и ряд других параметров. Отметим, что эти характеристики могут быть измерены не только атомно-силовым, но и сканирующим электронным микроскопом, поэтому для некоторых исследователей они оказываются более удобными, чем, например, средняя высота кутикул. От-

метим также, что для корректного описания краев кутикул с помощью АСМ предпочтительно выбирать направление сканирования вдоль направления роста волоса. При этом уменьшается вероятность появления артефактов, связанных с тем, что края кутикул деформируются, а также, задевая их, кантилевер резко изгибается и меняет их видимые контуры.

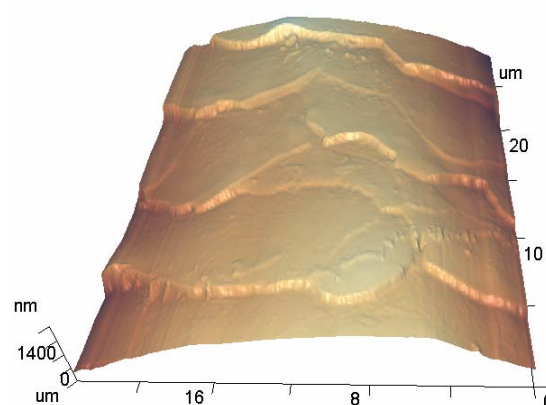


Рис. 1. АСМ изображение волоса человека.

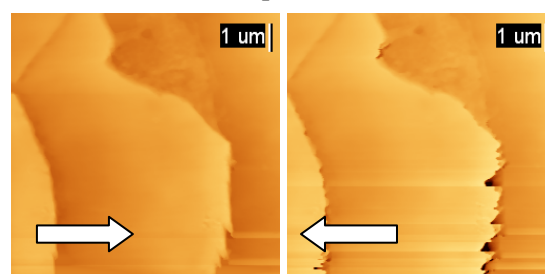


Рис. 2. АСМ изображения волоса человека, полученные при разных направлениях сканирования (указано стрелкой). Направление роста волоса — слева направо.

Список литературы:

1. Gurden S.P., Monteiro V.F., Longo E., Ferreira M.M.C., Quantitative analysis and classification of AFM images of human hair, *Journal of Microscopy*, 215, 13–23 (2004).
2. Luengo G., Serry F.M., Applications of AFM in Cosmetics Research and Product Development, Veeco Instruments Inc., AN88, Rev A0 (2005).
3. Monteiro V.F., Natal A.M.D., Soledade L.E.B., Longo E., Morphological Analysis of Polymers on Hair Fibers by SEM and AFM, *Materials Research*, 6, №4, 501–506 (2003).

ПРИМЕНЕНИЕ АТОМНО–СИЛОВОЙ МИКРОСКОПИИ ДЛЯ ВИЗУАЛИЗАЦИИ ПОВЕРХНОСТИ БАКТЕРИЙ

Е.А. Плетенёва¹, Д.В. Багров², О.В. Шабурова¹,

И.В. Яминский², К.В. Шайтан²

¹ГосНИИГенетика ²МГУ им. М.В. Ломоносова
dbagrov@gmail.com

В последние годы роль атомно–силовой микроскопии (АСМ) в биологических исследованиях существенно возросла. Поскольку АСМ позволяет не только получать трехмерные изображения исследуемых объектов с высоким пространственным разрешением, но и оказывать на них локальное механическое воздействие, спектр приложений этого метода непрерывно расширяется.

В данной работе описаны исследования двух штаммов бактерий (*Pseudomonas aeruginosa* PAO1 и *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 phi77R2) с целью выявления особенностей их поверхности. Бактерии рода *Pseudomonas* – подвижные грамотрицательные бактерии; *Pseudomonas aeruginosa* имеют полярные пилы и один жгутик. Они часто являются причиной раневых госпитальных инфекций, поэтому их изучение имеет практическую важность.

Лабораторный штамм *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 был впервые описан в 1955 г. *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 phi77R2 — спонтанный адсорбционный мутант штамма PAO1, который был выделен как устойчивый к вирулентному бактериофагу phi77 [1].

Образцы для исследования методом АСМ были приготовлены следующим образом. Бактерии переносили с поверхности агаризованной среды в дистиллированную воду, каплю полученной суспензии на короткое время помещали на свежесколотую слюду. Через несколько секунд каплю убирали с поверхности, образец высушивали потоком сжатого воздуха.

Сканирование проводилось на микроскопе Solver BIO Olympus фирмы «Нанотехнология МДТ». Обработка изображений выполнена в программе FemtoScan Online.

Изображения исследованных штаммов бактерий показаны на Рис. 1 и 2 соответственно. Видно, что бактерии *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 при описанном способе нанесения имеют гладкую поверхность и располагаются на слюде в виде колоний. Мутантные бактерии располагаются поодиночке, их поверхность шероховата, она покрыта выступами диаметром 60–90 нм.

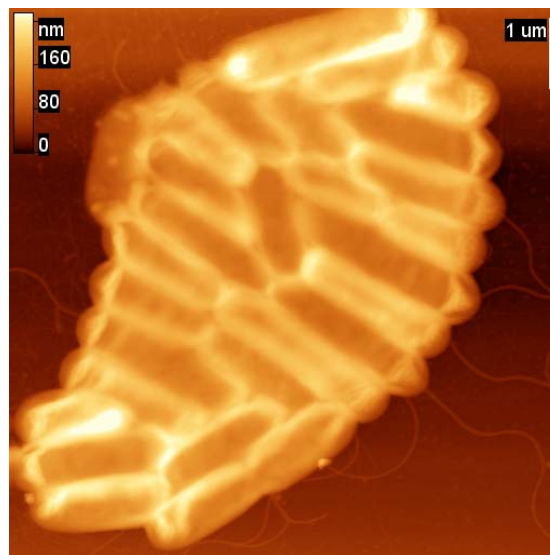


Рис. 1. *Pseudomonas aeruginosa* PAO1.

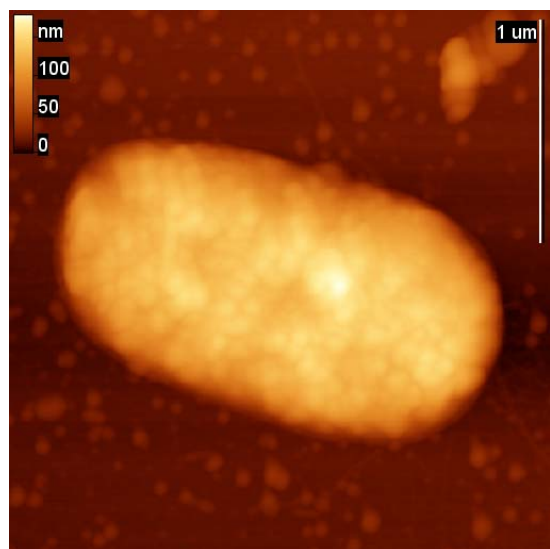


Рис. 2. *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 phi77R2 — фагоустойчивый мутант.

Предположительно, АСМ позволит установить связь между структурой поверхности бактерий и устойчивостью к бактериофагам определенных видов.

Список литературы:

1. Плетенева Е.А., Шабурова О.В., Сыкилинда Н.Н., Мирошников К.А., Кадыков В.А., Крылов С.В., Месянжинов В.В., Крылов В.Н., Генетика, Том 44, 2, 185–194 (2008).

СНИЖЕНИЕ ПОПЕРЕЧНЫХ БЛУЖДАНИЙ ОПТИЧЕСКОГО ПУЧКА ДИАФРАГМИРОВАНИЕМ ДЛЯ ПОВЫШЕНИЯ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ АСМ

В.В. Бауков, В.В. Жижимонтов, А.В. Беляев, И.В. Быков

Московский физико-технический институт
victor.baukov@gmail.com

От величины шумов в атомно-силовом микроскопе (АСМ) напрямую зависит качество получаемых изображений, в первую очередь предельное разрешение, характеризующее абсолютным шумом регистрирующей системы по вертикали.

Основными шумами в системе регистрации отклонения кантилевера по отклонению лазерного луча, обычно описываемыми в литературе, являются шум интенсивности полупроводникового лазерного диода, излучение которого сфокусировано объективом на обратной, отражающей стороне кантилевера; дробовой шум четырехсекционного позиционно-чувствительного фотодиода (ФД), регистрирующего отклонение отраженного пучка; тепловой шум нагрузочного резистора в предусилителе и тепловые колебания самого кантилевера [1],[2]. Величины трех последних шумов определяют теоретический предел точности, которую можно достичь в АСМ. В то же время, без должного внимания остаются другие типы шумов, в частности механические шумы, связанные с внешним окружением и шум, связанный с паразитными блужданиями лазерного пятна на ФД. В данной работе показано, что часто именно эти шумы являются наиболее значимыми.

На примере серийной измерительной головки АСМ НТ-МДТ SFC050 экспериментально показано [3], что в области низких частот — менее 4 кГц, одним из доминирующих источников шума в регистрирующей системе являются именно такие преимущественно низкочастотные — менее 100 Гц — блуждания, связанные с поперечными угловыми блужданиями падающего на кантилевер исходного лазерного пучка. При этом в полосе 1 кГц на 100 мкм кантилевере шум по Z составляет 0,4 Å, в то время как вклад дробового шума ФД эквивалентен всего 2 пм, а вклад джонсоновского шума нагрузочного резистора — порядка 0,4 пм.

Для подавления поперечных блужданий оптического пучка предложено использовать диафрагмирование. Общая идея, которая может быть использована для любой оптической системы, критической к положению пучка в плоскости, перпендикулярной на-

правлению распространения, заключается в следующем [3]. Пусть в оптической системе есть диафрагма, находящаяся непосредственно после источника излучения с колоколообразным распределением интенсивности (в случае АСМ — между полупроводниковым лазерным диодом с гауссовым распределением и кантилевером), выделяющая центральную, наиболее пологую часть пучка. При уменьшении размера диафрагмы распределение интенсивности прошедшего пучка становится все ближе к константе, а небольшие паразитные поперечные блуждания падающего на диафрагму пучка все меньше влияют на распределение интенсивности прошедшего пучка (в случае АСМ — на распределение интенсивности на ФД, изменения которой и определяются блужданиями лазерного пятна на ФД).

Теоретическая эффективность применения диафрагмы для снижения шума в приближении малых поперечных смещений гауссова пучка имеет следующий вид:

$$\frac{\delta z_D}{\delta z_F} = \frac{1 - e^{-2\alpha^2}}{\operatorname{erf}(\sqrt{2}\alpha)} \rightarrow \frac{\sqrt{\pi}}{\sqrt{2}} \alpha, \alpha \rightarrow 0, \quad (1)$$

где индекс D (Diaphragm) относится к варианту с диафрагмой, F (Full) — без нее, $\alpha = a/\sigma$ — отношение полуширины диафрагмы a к полуширине σ исходного пучка (для наглядности рассмотрен случай одномерной диафрагмы). При этом диафрагма пропускает следующую часть исходной мощности пучка:

$$\frac{P_D}{P_F} = \operatorname{erf}(\sqrt{2}\alpha) \rightarrow \frac{\sqrt{8}}{\sqrt{\pi}} \alpha, \alpha \rightarrow 0. \quad (2)$$

Полученные функции возрастают от нуля до единицы при изменении α от нуля до бесконечности. Для значительного снижения шума надо уменьшать размер диафрагмы так, чтобы он был существенно меньше размера исходного пучка. Однако в этом случае происходит значительное снижение мощности прошедшего пучка, особенно когда диафрагму уменьшают одновременно по двум направлениям — в формуле (2) появляется квадратичная зависимость. Это является су-

ществленным недостатком предложенного метода, ограничивающим его максимальную эффективность, то есть минимально возможный размер диафрагмы. Тем не менее, во многих системах, где пространственное положение исходного пучка является наиболее критичным, такое снижение мощности может быть оправдано. Пучок с распределением типа $\text{Sin}(x)/x$, также имеющий большое значение в оптике, ведет себя аналогичным образом.

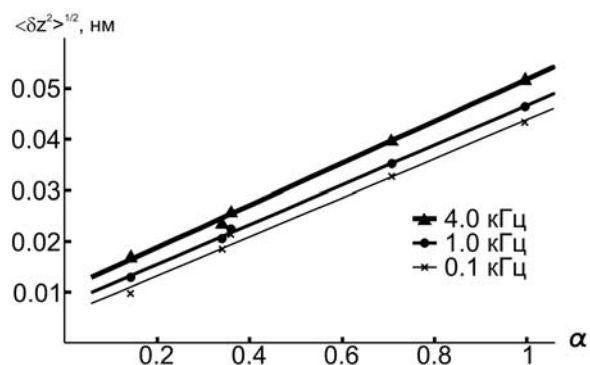


Рис. 1. Зависимость шума от $\alpha = a/\sigma$. Толстая линия — полоса 4,0 кГц, средняя линия — полоса 1,0 кГц, тонкая линия — полоса 0,1 кГц.

Эффективность предложенного метода продемонстрирована экспериментально на примере полупроводникового лазера Hitachi HL6724MG. Результаты измерений шума приведены на Рис. 1. Измерения проводились на стенде, исключающем влияние других источников шума, однако для простоты на рисунке шум пересчитан в измеряемый в нанометрах шум измерительной головки SFC050, использующей данный лазер. При этом величина блужданий прошедшего через диафрагму пучка при размерах диафрагмы, малых по сравнению с размерами пучка ($\alpha < 1$), зависит от размера диафрагмы практически линейно. Уменьшение исходной апертуры пучка диафрагмированием в семь раз (уменьшение α с 1 до 0,15) позволяет снизить уровень шумов приблизительно в три раза (до 0,15 Å — конечная величина определяется исходным шумом лазерного диода).

Описанный метод был применен для снижения шума в регистрирующей системе измерительной АСМ головки НТ-МДТ SFT01NTF с использованием лазера Hitachi HL6312G. Это позволило снизить уровень шума в полосе 1 кГц с 0,15 Å до 0,06 Å. Такой уровень шума позволяет легко получать качественные АСМ изображения с атомарным разрешением с полным рельефом порядка 1 Å. Возможности разработанного АСМ продемонстрированы при получении

изображений слюды и графита с атомарным разрешением, представленных на Рис. 2 и 3. При получении изображений использовались треугольные 85 мкм кантилеверы Park Scientific Instruments Microlever (F) из нитрида кремния с жесткостью 0,5 Н/м. Общие параметры изображений: XY Open Loop, количество точек 256×256, частота сканирования 2 Гц, режим постоянной силы, проведено построчное вычитание наклона для элиминации термодрейфов.

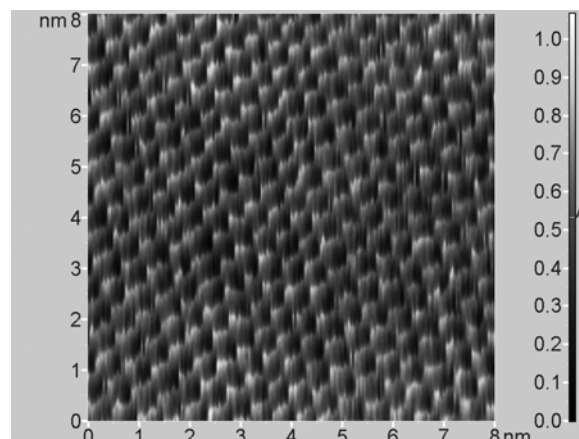


Рис. 2. Изображение 8×8 нм слюды — полный рельеф 1,0 Å.

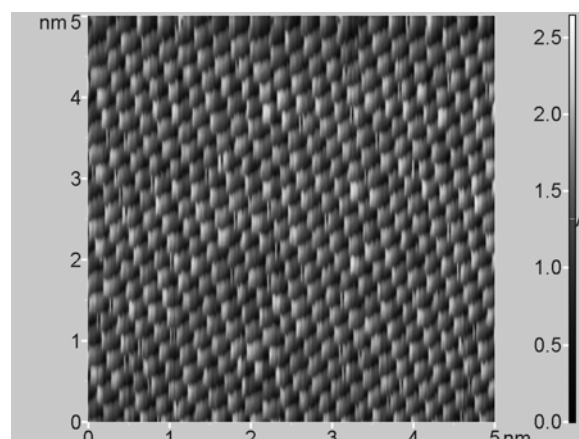


Рис. 3. Изображение 5×5 нм графита — полный рельеф 2,5 Å.

Список литературы:

1. Bhushan B, Springer Handbook of Nanotechnology, Berlin Heidelberg, Springer-Verlag, 2004.
2. Sarid D, Scanning Force Microscopy. With Applications to Electric, Magnetic and Atomic Forces, Oxford, Oxford Univ. Press, 1994, rev. edn.
3. Бауков В.В., Жижимонтов В.В., Беляев А.В., ПЖТФ, т. 33, вып. 13, 40 (2007).

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ АТОМНО–СИЛОВОЙ МИКРОСКОПИИ ДЛЯ АНАЛИЗА СИЛ АДГЕЗИИ ПОВЕРХНОСТИ АЛМАЗА, МОДИФИЦИРОВАННОЙ АТОМАРНЫМ ВОДОРОДОМ ИЛИ КИСЛОРОДОМ

О.П. Будник¹, А.П. Будник²

¹ *Институт прикладной оптики НАН Украины*

² *Институт физики НАН Украины*
oksinfo@i.com.ua

На сегодняшний день атомно–силовая микроскопия (АСМ) — это востребованная методика, которая позволяет проводить исследования на наноуровне, предоставляет возможность оценки ультратонких наноструктур и свойств различных материалов, в том числе различных биологических объектов, сложность которых может варьироваться от биополимерных молекул и до клеток [1].

Алмаз, как монокристаллический (МКА), так и нанокристаллический (НКА), является перспективным материалом для разработки биосенсоров для детектирования оптических и электрических сигналов от живых клеток, вследствие его хорошей биосовместимости, химической инертности и привлекательных электрохимических свойств [2].

С помощью АСМ можно не только проводить съемку топографии поверхности с наноразмерным рельефом, но и анализировать такие поверхностные характеристики как распределение электрического потенциала и величину силы адгезии. Последняя очень важна для биоприменений алмаза.

АСМ также широко применяется для наноразмерной литографии на поверхности образца с помощью техники локального оксидирования в электрическом поле [3]. Так, используя в качестве исходного образца нелегированный алмаз, поверхность которого покрыта атомарным водородом и имеет р-тип проводимости, с помощью указанной техники можно получить оксидированные площадки, действующие как изолятор. Такие поверхности стабильны на воздухе и сохраняют свойства длительное время [4].

При исследовании сил, действующих у приповерхностных зон алмаза, покрытых атомарным водородом или кислородом, большое значение имеет влажность. Капельки воды на игле кантеливера или поверхности образца способны исказить значение сил взаимодействия, и должны быть учтены.

Известно, что золотая игла кантеливера является относительно гидрофобной, в то время как кремниевая — гидрофильной. Со-

ответственно, разным будет их взаимодействие с участком поверхности, покрытым атомарным водородом, являющимся гидрофобным, и оксидированным участком, проявляющим гидрофильные свойства [5].

В работе представлены экспериментально полученные зависимости силы адгезии от расстояния до поверхности, а также топографические карты, снятые на НКА образцах, имеющих участки, покрытые атомарным водородом и кислородом. Полученные данные сравниваются с результатами измерений на гомоэпитаксиальном алмазе [6] и поликристаллическом алмазе [7].

Решение вопроса контролируемой влажности поверхности ускоряет разработку биосенсорных устройств на основе алмаза, делая возможным создание устройств с полной иммобилизацией биомолекул на них. Использование различий в электрических и химических свойствах участков поверхности, покрытых атомарным водородом или кислородом, открывает широкие возможности для комбинирования техник нанотехнологии и биотехнологии для создания нового поколения биосенсоров.

Список литературы:

1. Боровик А.С., Тарасова О.Е., Большакова А.В., Яминский И.В., Успехи современной биологии, том 120, №2, 217–224 (2000).
2. Collings A.F., Caruso F., Rep. Prog. Phys., 60, 1397–1445 (1997).
3. Snow E.S., Campbell P.M., Appl. Phys. Lett. 64 (1994).
4. Tachiki M., Fukuda T., Sugata K., Seo H., Umezawa H., Kawarada H., Appl. Surf. Sci. 159–160 (2000).
5. E.W. van der Vegte, Hadziioannou G., Langmuir 13, 4357–4368 (1997).
6. Kaibara Y. et al., Diamond Rel. Mater., 12, 560–564 (2003).
7. Ostrovskaya L. et al., Diamond Rel. Mater., 11, 845 (2002).

ПРЕИМУЩЕСТВА АВТОМАТИЗИРОВАННЫХ МЕТОДИК В ИЗУЧЕНИИ БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБЪЕКТОВ

И.В. БЫКОВ

Московский Физико-Технический Институт
ivan_bykov@mail.ru

В атомно—силовой микроскопии одним из наиболее используемых и перспективных является полуконтактный метод, который заключается в том, что сканирование происходит зондом, колеблющимся вблизи поверхности образца. Этот метод широко используется для большинства приложений Сканирующего Зондового Микроскопа (СЗМ). Одним из основных применений на сегодняшний день является биология (ткани, клетки, вирусы, ДНК, протеины, бактерии). Однако выбор режима взаимодействия зонда с образцом и настройка параметров сканирования могут существенно влиять на разрешение и «истинность» (отсутствие артефактов) полученных результатов. Анализ режимов также играет большую роль для снижения риска повреждения образца и зонда, что становится важным аспектом с появлением дорогостоящих, так называемых суперзондов, дающих высокое разрешение.

Реализация того или иного режима полуконтактного метода зависит от конкретных параметров: амплитуды свободных колебаний, параметра взаимодействия зонда с образцом и других, трудно контролируемых параметров таких как, свойства образца и условия проведения измерения. Следовательно, точно не известно, в каком режиме происходит сканирование. Так, под действием сильного воздействия зонда в режиме отталкивания поверхность относительно мягкого образца может быть даже модифицирована. Были рассмотрены два режима полуконтактного метода: притяжения и отталкивания, характерные зависимости и особенности работы с использованием каждого их них.

В работе теоретически обосновано и экспериментально показано, что измерение фазы (фазовый критерий) в зависимости от параметра взаимодействия (амплитуды колебаний в подведенном состоянии) позволяет нам однозначно определить режим [1, 2]. Здесь и далее будем под фазой подразумевать фазовый сдвиг между сигналом отклика кантилевера и возбуждающим сигналом. Условия, при которых фазовые изменения происходят в области выше начального уровня фазы, указывают на режим притяжения (Рис. 1а, область А), ниже — на режим отталкивания

(Рис. 1а, область R). Начальный уровень фазы соответствует состоянию, когда зонд не взаимодействует с образцом (Рис. 1а, область N).

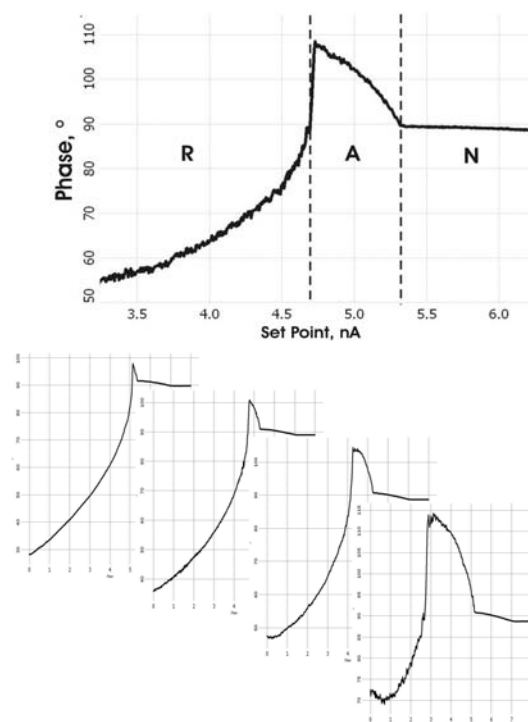


Рис. 1. а) Зависимость фазового сдвига от параметра взаимодействия зонда с образцом при подводе б) серия фазовых кривых, полученная при различных значениях амплитуды свободных колебаний.

Для получения «истинного» рельефа существенен выбор рабочей точки. Необходимо избегать условий измерения, близких к переходу между режимами (рабочая область должна быть выше или ниже области перехода), так как это приведет к неустойчивости и появлению артефактов.

Предлагается использовать двумерные «карты» распределения фазы как функции амплитуды свободных колебаний и параметра взаимодействия в качестве основного инструмента для анализа сил взаимодействия в полуконтактной микроскопии. Суть заключается в следующем: снимается серия фазовых кривых при различных значениях амплитуды свободных колебаний (Рис. 1б), далее строится «карта», на которой цветом отображается фаза, а по осям амплитуда свободных ко-

лебаний и параметр взаимодействия (Рис. 2а).

Таким образом, становится ясно, при каких параметрах реализуется тот или иной режим (размеры области притяжения и отталкивания) с учетом данного зонда, образца и условий окружающей среды. Область «R» на Рис. 2а соответствует режиму отталкивания, область «A» — режиму притяжения, область «N» — состоянию, когда зонд не взаимодействует с образцом. Также дополнительно строится «карта» распределения фазовых шумов (Рис. 2б), которые имеют значение, когда речь идет о разрешении метода фазового контраста.

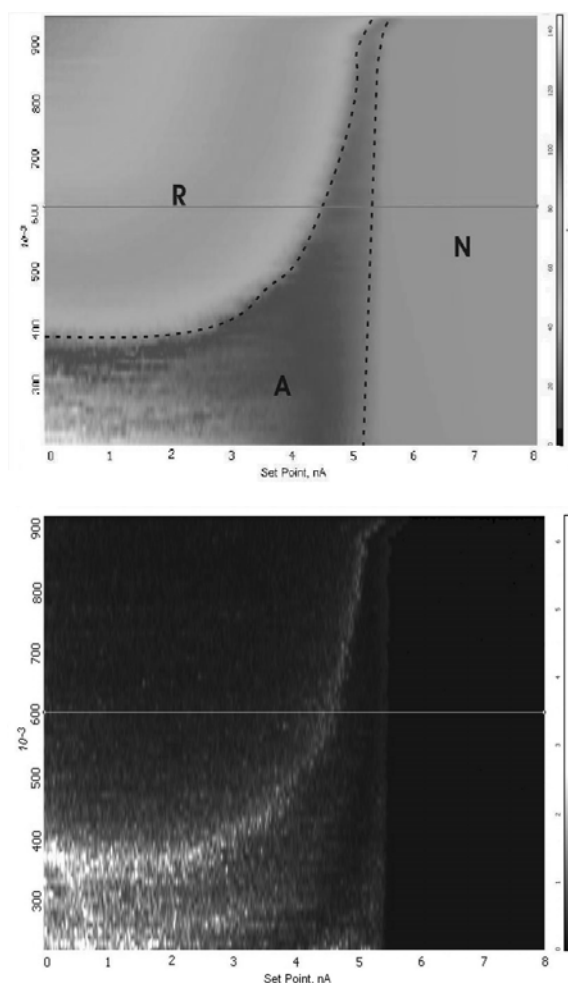


Рис. 2. Двумерная «карта» распределения фазы (а) и фазовых шумов (б).

Характер взаимодействия зависит от свойств образца, жесткости зонда и условий окружающей среды. В случае мягких образцов (полимеры, биологические образцы), мягких зондов и повышенной влажности размер области притяжения значительно увеличивается. Выбор окончательных рабочих условий проводится с учетом фазовых шумов

при определенной амплитуде свободных колебаний.

На основе сказанного выше были предложены алгоритмы автоматизации для настройки параметров сканирования и работы в режиме притяжения, реализованные на базе макроязыка Nova PowerScript (VBScripts) и являющиеся дополнительной опцией программы управления СЗМ Nova. Преимущество работы в режиме притяжения заключается в более «мягком» воздействии на объект.

Алгоритм автоматического выбора режима притяжения по фазовой кривой позволяет легко настроить оптимальные параметры для методики измерения в режиме притяжения. Дополнительно возможно выбирать, какие именно параметры считать оптимальными (размер области притяжения, амплитуды свободных колебаний, шум фазы) в зависимости от типа образца и зонда.

Другой алгоритм, основанный на автоматическом переборе параметров, близких к теоретически наилучшим, исключает необходимость выбора параметров вручную и сканирования при каждом из них. Задача сводится к сравнению изображений одного и того же участка при нескольких наборах параметров, которые выбираются пользователем на «картах» (Рис. 2).

Рассмотренные алгоритмы представляют значительный интерес с точки зрения экономии времени, воспроизводимости результатов и возможности для оператора осуществлять правильную настройку, не имея глубоких знаний. Основная перспектива использования таких алгоритмов — их интегрирование с экспертными системами и создание на их основе «умных» СЗМ. В результате СЗМ будет не только автоматизирован под конкретную задачу, но и сможет осуществлять частичную интерпретацию полученных данных.

Список литературы:

1. Garcia R., San Paulo A, Attractive and repulsive tip-sample interaction regimes in tapping-mode atomic force microscopy, *Phys. Rev.*, 60, 4961 (1999).
2. Garcia R., San Paulo A., Amplitude curves and operating regimes in dynamic atomic-force microscopy, *Ultramicroscopy*, 82, 79-83 (2000).

МОРФОЛОГИЯ БИОСОВМЕСТИМЫХ ПОЛИМЕРНЫХ АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫХ ПОКРЫТИЙ

Д.Л. Горбачев¹, Д.В. Тапальский², А.И. Козлова², М.А. Ярмоленко¹

¹Гомельский государственный университет им. Ф. Скорины

²Гомельский государственный медицинский университет

yarmolenko@belsut.gomel.by

Формирование бактериальных биопленок на поверхности внедряемых во внутреннюю среду организма металлических и полимерных конструкций является одной из причин развития послеоперационных инфекционных осложнений, лечение которых затруднительно и часто требует удаления имплантата. Предотвращение образования биопленок является основной задачей в профилактике имплантат-ассоциированных инфекций.

Для нанесения антибактериальных покрытий использовали субстанцию ципрофлоксацина (*Ciprofloxacin hydrochloride 1-hydrate*, KRKA, Словения) и мелкодисперсные порошки термопластов: полиэтилена высокого давления (ПЭВД, ГОСТ 16337 – 77) и полиуретана (ПУ, Десмопан 385).

Композиционные покрытия формировали в вакууме из активной газовой фазы, образованной продуктами электронно-лучевого диспергирования смеси порошков ципрофлоксацина и полимера в массовом соотношении 1:1 на пластинах монокристалла кремния [1]. В качестве источника электронов использовался электронно-лучевой прожектор с катодом прямого накала, позволяющий формировать пучки с плотностью тока $I = 50 \div 500 \text{ А/м}^2$ и энергией частиц $E = 0,1 \div 2,5 \text{ кэВ}$.

Для исследования морфологии покрытия использовался сканирующий зондовый микроскоп Solver P47 PRO (NT-MDT, Россия). По данным атомно-силовой микроскопии композиционное покрытие толщиной 0,3 мкм полиэтилен-ципрофлоксацин представляет собой систему, состоящую из полимерной матрицы и мелких (размером $\sim 100 \text{ нм}$), достаточно равномерно распределенных в объеме частиц ципрофлоксацина (Рис. 1).

При этом отметим, что морфология покрытия полиуретан-ципрофлоксацин (Рис. 2) имеет некоторые отличия от морфологии композиционных покрытия на основе полиэтилена, заключающиеся в изменении дисперсности частиц. Такая структура может быть обусловлена высокой полярностью макромолекул полиуретана и, как следствие этого, более высоким межфазным взаимодействием.

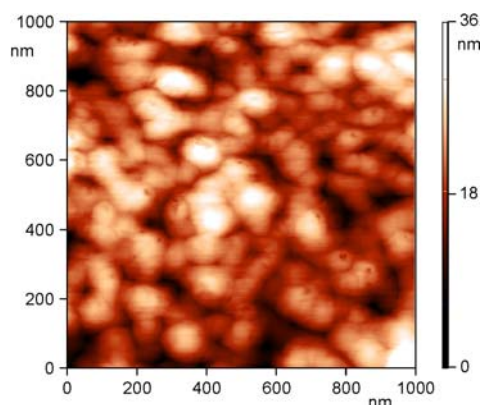


Рис. 1. Морфология покрытия полиэтилен-ципрофлоксацин.

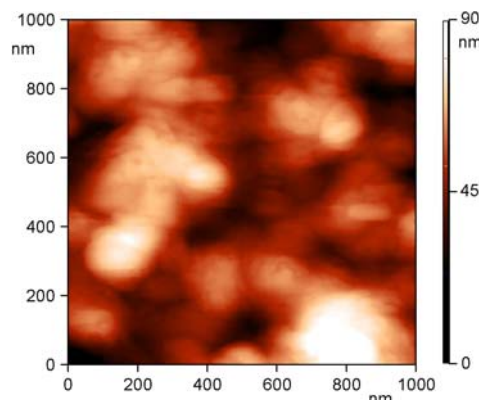


Рис. 2. Морфология покрытия полиуретан-ципрофлоксацин.

Покрытие полиуретан-ципрофлоксацин сохраняет бактерицидный эффект после 20 циклов отмывки. Устойчивость бактерицидного эффекта полиэтилен-ципрофлоксацинового покрытия несколько ниже и проявляется после 10 циклов. Антимикробный эффект чистого покрытия ципрофлоксацина не регистрировался уже после пяти циклов отмывки. Влияние природы полимерной матрицы на устойчивость антибактериального эффекта может быть объяснено установленными морфологическими особенностями композиционных покрытий, проявлением более высокого адсорбционного взаимодействия ципрофлоксацина с полиуретаном.

Список литературы:

1. Gritsenko K.P., Krasovsky A.M., Chem. Rev., 103, 3607–3649 (2003).

ЭЛЕКТРИЧЕСКИЕ И ЭЛЕКТРОННЫЕ ЭФФЕКТЫ В БИОЛОГИЧЕСКИХ СИСТЕМАХ ПО ДАННЫМ ЗОНДОВОЙ МИКРОСКОПИИ

А.П. Громова

Физический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова
solly8@mail.ru

Зеленые растения и фотосинтетические бактерии захватывают и утилизируют лучи света с помощью молекулярных электронных комплексов — реакционных центров (РЦ) — которые находятся в их мембранах. В растениях преобразование световой энергии в химическую происходит в РЦ фотосистемы 1 (PSI) и фотосистемы 2 (PSII), которые должны работать последовательно, используя воду как источник электронов и CO_2 как конечный электронный акцептор. В качестве первичного донора электронов они используют специальную пару молекул хлорофилла, а в качестве первичного акцептора электронов хлорофилл или феофитин. Дальнейшее возбуждение (передача электрона от возбужденного первичного донора к первичному акцептору) происходит за время порядка пикосекунд. Это процесс, характеризующийся высокой квантовой эффективностью. Высокая эффективность первичного разделения заряда фотосинтетических РЦ происходит из-за прямого векторного переноса электронов внутри белка, что приводит к формированию диполя с плотностью поля около 10^6 В/см . Время жизни этого диполя на несколько порядков больше, чем время его формирования. Можно сказать, что РЦ PSI — это фотодиод и нанометровая солнечная батарейка. Эти свойства делают РЦ технологически удобными устройствами для применения в молекулярной электронике и биотехнологии.

На сегодняшний день известны механизмы, позволяющие осаждать платину и другие металлы на поверхность фотосинтетических мембран, создавая таким образом прямой электрический контакт с акцепторной стороной PSI, где металл может или проводить фототок через внешнюю цепь, или ускорять движение водорода от одного переносчика к другому. Электронные свойства такого массива могут быть определены с помощью сканирующей туннельной спектроскопии. Первичные исследования показали, что полярные концы PSI положительно заряжены. Эти области служат для прикрепления ферредоксина и пластоцианина — естественных акцептора и донора электронов соответственно для PSI. Если PSI ориентирована направле-

нием электронного переноса параллельно к поверхности электрода, получалось вольтамперная характеристика как у полупроводника, а если направление электронного транспорта в PSI перпендикулярно поверхности электрода, получалась вольтамперная характеристика как у диода. Эти свойства открывают большое будущее реакционным центрам в нанoeлектронике.

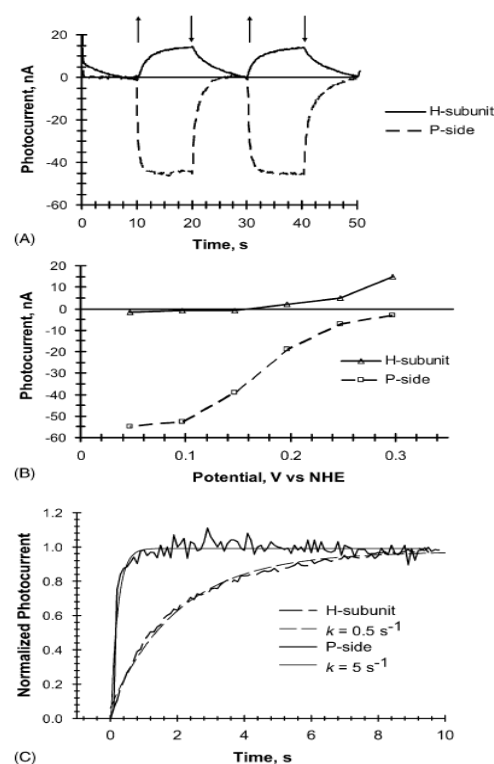


Рис. 1.

Чтобы использовать преимущества РЦ и создать электрический ток из РЦ-диполя, белок должен быть правильным образом закреплен и ориентирован на электроде. В принципе, белок может прикрепляться к электроду как донорной, так и акцепторной стороной. Сравнение фототока при двух противоположных ориентациях белка привело к открытию двух фундаментальных эффектов: 1) фототок всегда течет в одном и том же направлении — от первичного донора к первичному акцептору, то есть когда РЦ прикреплен к электроду его Н-субъединицей, фототок анодный, а когда он прикреплен Р-субъединицей, фототок катодный. 2) РЦ,

ориентированный к электроду Р-стороной, имеет более высокий фототок и достигает состояния, в котором способен принимать свет, примерно на порядок быстрее, чем когда ориентированы Н-субъединицы.

Для получения этих данных используется метод сканирующей туннельной микроскопии, позволяющий очень точно измерять ток, протекающий между острым зондом и молекулами изучаемой поверхности. Оценим возможные погрешности измерения. Для этого рассмотрим возможную схему усилителя микроскопа и оценим шумы, возникающие в ней:

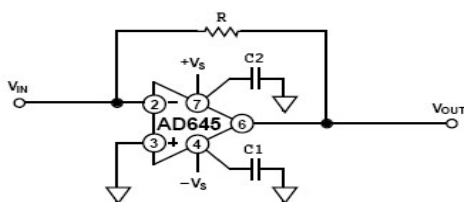


Рис. 2.

Пусть элементы схемы имеют следующие номиналы: $R=1\text{ ГОм}$, $C1=C2=0,22\text{ мкФ}$, $V_S=12\text{ В}$. Задача экспериментатора состоит в том, чтобы измерить ток порядка пикоампер. Рабочий интервал напряжений — милливольты, что гораздо меньше напряжения питания, 12 В , поэтому шумы питания можно сразу не учитывать.

I_f — шум резистора, который можно посчитать по формуле Найквиста. Для $T=300\text{ К}$ и полосы пропускания системы 10 кГц $I_f=0,4\text{ пА}$.

Оценим теперь шум усилителя: в работе использовался усилитель AD645 с распределением спектральной плотности шума, показанным на Рис. 3. Нас интересует шум с частотами до 10 кГц , так как на более высокие частоты ставится фильтр.

По этому графику можно оценить шум усилителя, подсчитав площадь под кривой: $I_n=30\text{ фА}$. Исходя из эквивалентной схемы головки микроскопа, находим общий шум: $0,43\text{ пА}$. На фоне тепловых шумов резистора обратной связи шум усилителя совсем незначителен, и им можно пренебречь.

Шумы других частей микроскопа тоже незначительны по сравнению с усиленным сигналом.

Из графиков фототока (Рис. 1), протекающего через реакционные центры фотосистемы I, видно, что его значение лежит в пределах от 10 до 50 пА , поэтому точность

измерений должна быть порядка наноампер, что на 3 порядка больше номинальных возможностей схемы. Предложенная конструкция открывает большие возможности перед экспериментатором, позволяя проводить точные исследования в области молекулярной биологии.

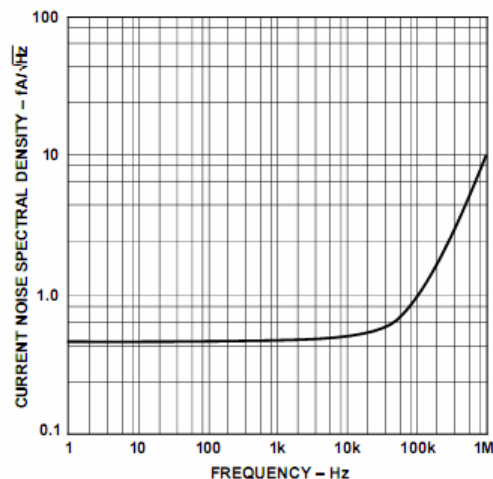


Рис. 3.

Список литературы:

1. Васильев С.Ю., Денисов А.В., Особенности туннельно-спектроскопических измерений в конфигурации воздушного сканирующего туннельного микроскопа, ЖТФ, т. 70, 1, 100–107 (2000).
2. Робинсон Ф.Н.Х., Шумы и флуктуации в электронных схемах и цепях, М.: Атомиздат, 1980.
3. Букингом М., Шумы в электронных приборах и системах, М.: Мир, 1986.
4. Trammell S.A., Spano A., Price R., Lebedev N., Effect of protein orientation on electron transfer between photosynthetic reaction centers and carbon electrodes, Biosensors and Bioelectronics, 21, 7, 1023–1028 (2006)
5. Trammell S.A., Wang L., Zullo J.M., Shashidhar R., Lebedev N., Orientated binding of photosynthetic reaction centers on gold using Ni-NTA self-assembled monolayers, Biosensors and Bioelectronics, 19, 12, 1649–1655 (2004)
6. Lee I., Lee J.W., Greenbaum E., Biomolecular Electronics: Vectorial Arrays of Photosynthetic Reaction Centers, Phys. Rev. Lett. 79, 3294–3297 (1997)
7. Тихонов А.Н., Трансформация энергии в хлоропластах — энергопреобразующих оргanelлах растительной клетки, Соросовский Образовательный Журнал, 4, 24–32 (1996).
8. Кукушкин А.К., Тихонов А.Н., Лекции по биофизике фотосинтеза растений, М.: МГУ, 1988.

МОДИФИКАЦИЯ ПОВЕРХНОСТИ ПОЛИМЕТИЛМЕТАКРИЛАТА КИСЛОРОДНОЙ ПЛАЗМОЙ И ВАКУУМНЫМ УЛЬТРАФИОЛЕТОМ

А.П. Алехин^{1,2}, С.А. Гудкова^{1,2}, А.Г. Кириленко², В.А. Кротков²

¹Московский физико-технический институт, г. Долгопрудный,

²НИИ Физических проблем им. Ф.В. Лукина, г. Зеленоград

sagudkova@mail.mipt.ru

Полиметилметакрилат (ПММА) широко применяется в биомедицине, например, в качестве материала для создания искусственных органов. Одним из способов модификации ПММА является облучение его поверхности ультрафиолетом (УФ). Оно позволяет изменять морфологические, структурные и химические свойства приповерхностных слоев ПММА в нанометровом масштабе (~100 нм) посредством селективного разрыва химических связей, в результате чего на поверхности образуются активные центры. Поглощение вакуумного УФ газовой средой приводит к диссоциации молекул газа и образованию химически активных атомов, молекул, ионов и свободных радикалов, которые взаимодействуют с активными центрами поверхности полимера [1,2]. Таким образом, можно до определенной степени управлять физико-химическими свойствами приповерхностного слоя ПММА, что и требуется для изменения гидрофобно-гидрофильного баланса биомедицинских материалов.

Для исследования данного эффекта был выбран тест-объект, представляющий собой наноструктурированную в кислородной плазме пленку ПММА. В качестве подложки для тест-объекта использовалась полированная поверхность кремниевой пластины.

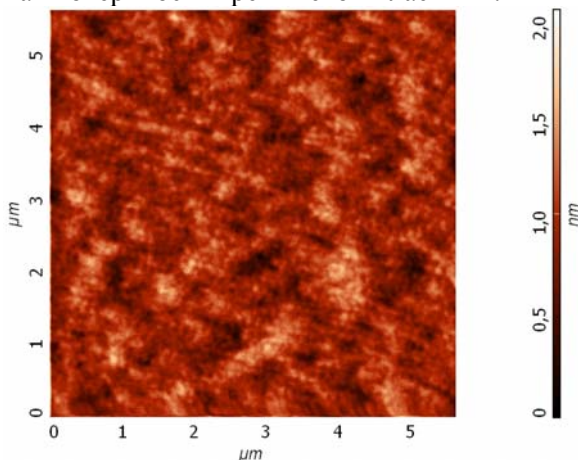


Рис. 1. Исходная поверхность пленки ПММА после нанесения на кремниевую подложку.

Морфология поверхности пленки ПММА и динамика изменения шероховатости в за-

висимости от времени и давления вакуумной УФ обработки исследовалась методом сканирующей атомно-силовой микроскопии (АСМ).

Анализ полученных результатов показывает, что уже при небольшой продолжительности вакуумного УФ облучения (30 сек., давление 2 Па) хорошо заметно сглаживание (~1,2 раза) особенностей наноструктурированной поверхности пленки ПММА.

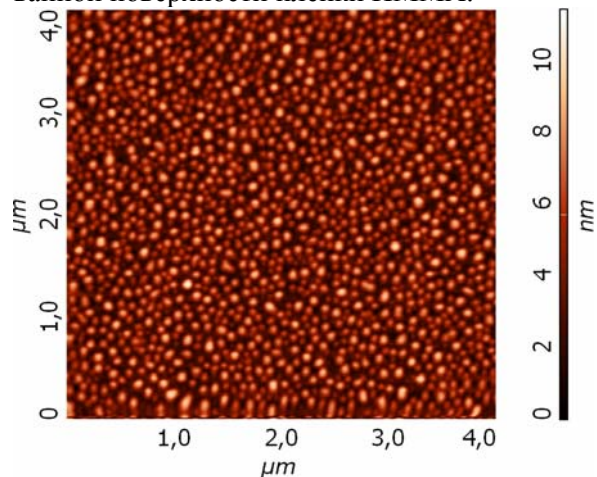


Рис. 2. Наноструктурированная пленка ПММА, облученная ультрафиолетом.

Облучение пленки ПММА при более высоком давлении воздуха (100 Па) приводит к образованию межмолекулярных связей С-О-С [2]. Таким образом, дополнительное поглощение вакуумного УФ излучения воздухом снижает скорость сглаживания наноструктурированной поверхности пленки ПММА. Однако, после 15 и более минут обработки скорость сглаживания и величина шероховатости выходят на тот же уровень, что и для процесса, протекающего при давлении 2 Па.

Список литературы:

1. Vasilets V.N., Hirata I., Iwata H., Ikada Y., J. Appl. Polym. Sci., 36 (1998).
2. Vasilets V.N., Nakamura K., Uyama Y. Polymer, 39 (1998).

ИЗУЧЕНИЕ ФОРМИРОВАНИЯ ТРЕХКОМПОНЕНТНЫХ ЛИПИДНЫХ БИСЛОЕВ НА СЛЮДЕ МЕТОДОМ АТОМНО–СИЛОВОЙ МИКРОСКОПИИ

П.В. Горелкин, Д.А. Давыдов, И.В. Яминский, А.А. Ярославов

*Кафедра высокомолекулярных соединений,
Химический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова
dimitri.davydov@gmail.com*

Большое количество научных работ и монографий [1–3] посвящены поиску и разработке способов получения липидных бислойных покрытий на поверхностях различного характера. В них приведены методики получения хорошо воспроизводимых результатов, подтвержденных экспериментально и теоретически для систем, содержащих два типа липидов. В то же время, общих принципов получения многокомпонентных липидных мембран на плоскости пока не существует [4], хотя эта задача имеет большое значение, как для фундаментальных, так и для прикладных исследований в качестве моделей взаимодействия биологических систем и полимеров.

В данной работе был получен липидный бислой на поверхности слюды методом «спин-коатинга» (spin-coating) [1].

На примере двухкомпонентных липосом, состоящих из цвитер-ионного фосфатидил холина (ФХ) и отрицательно заряженного кардиолипина (КЛ), в соотношении 4:1, соответственно, был продемонстрирован метод получения отрицательно заряженного липидного бислоя на слюде. Образование слоя подтверждали, измеряя зависимость изгиба кантилевера в приповерхностном слое от расстояния до слюды.

Определение основных условий образования бислоя на подложке позволило получить мембрану с малым количеством дефектов. Новизна подхода заключалась в том, что в качестве исходных липосом использовали трехкомпонентные везикулы, содержащие молекулы ФХ, КЛ и Бридж 58 (в мольном соотношении 5/2/3, соответственно). Третий компонент представляет собой «однохвостое» неионогенное ПАВ. Молекула устроена таким образом, что с додецильным фрагментом ковалентно связана молекула полиэтиленгликоля со степенью полимеризации 22. Подобная модификация позволяет получать стерически стабилизированные липосомы. Это означает, что частицы не коалесцируют в течение продолжительного периода времени (вплоть до месяца).

В нашей работе методом атомно–силовой микроскопии показано, что в трехкомпонентном липидном бислое протекает процесс латеральной сегрегации (образование доменов) (Рис. 1); также произведена оценка прочностной характеристики бислоя.

Описанные в данной работе подходы могут быть использованы для исследования модификаций различных наноконтейнеров для моделирования векторов доставки лекарственных препаратов в поврежденные клетки.

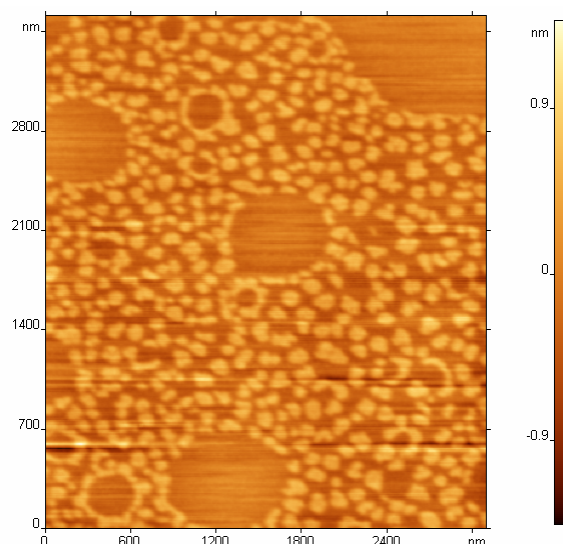


Рис. 1. Липидный бислой, сформированный из ФХ/КЛ/Бридж липосом.

Список литературы:

1. Richter R.P., Brisson A.R., Biophys J., 88(5), 3422–3433 (2005).
2. Richter R.P., Re'mi Be'rat, Brisson A.R., Langmuir, 22, 3497–3505 (2006).
3. Reviakine, Brisson A., Langmuir, 16, 1806–1815 (2000).
4. Ganchev D.N., Hasper H.E., Breukink E., B. de Kruijff, Biochemistry, 45, 6195–6202 (2006).

АСМ–ИССЛЕДОВАНИЕ БИОСПЕЦИФИЧНЫХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ НА ПОВЕРХНОСТЯХ

Е.В. Дубровин¹, С.Г. Игнатов², Т.Е. Игнатьюк³, С.В. Краевский³,
Г.Н. Федюкина², И.В. Яминский¹

¹Физический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова,

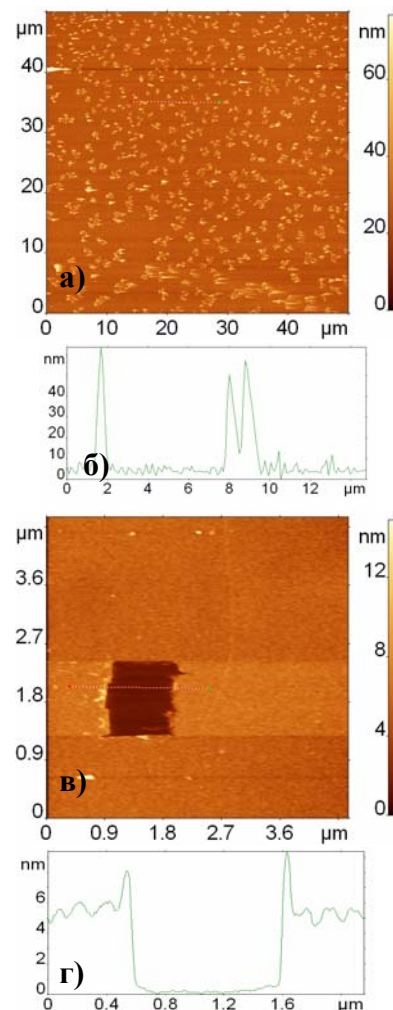
²ГНЦ Прикладной Микробиологии и Биотехнологии,

³Институт теоретической и экспериментальной физики им. А.И. Алиханова
dubrovin@poly.phys.msu.ru

Одной из наибольших трудностей при исследованиях с помощью атомно–силовой микроскопии (АСМ) является идентификация изучаемого объекта на полученном АСМ–изображении. Для биологических объектов, осаждаемых из растворов, это связано, прежде всего, с наличием в них примесей и загрязнений. Иногда удается избежать такой проблемы за счет постановки необходимого количества контрольных экспериментов, однако зачастую «паразитные» объекты неотделимы от изучаемых и в контрольных экспериментах не проявляются. Для гарантированной идентификации объекта можно использовать его способность к специфическому взаимодействию со специально приготовленной поверхностью. Кроме того, задача детектирования нанобъектов за счет специфического связывания представляет отдельный интерес для многочисленных прикладных областей исследования.

В данном докладе представлены результаты работы по исследованию поверхностей, специфичных к бактериальным клеткам и их фрагментам. Для этой цели нами была предложена следующая структура специфичной к антигену поверхности: активированная в тлеющем разряде слюда — белок G — антитело. Активированная слюда улучшает адсорбцию на нее белка G, который, в свою очередь, увеличивает степень адгезии на него антител (в силу их специфического взаимодействия). На Рис. 1а показано АСМ–изображение обработанной в тлеющем разряде поверхности слюды, экспонированной последовательно в раствор белка G, а затем (после промывки) в раствор моноклональных антител к *Escherichia coli* и результаты «царапающих экспериментов», а на Рис. 1в — АСМ–изображение такой же поверхности после ее экспонирования в растворе, содержащем разрушенные фрагменты клеток *E.coli* с концентрацией 10^9 клеток/мл. На контрольных экспериментах, где вместо *E.coli* использовались клетки *Salmonella*

enteritidis, подобного связывания не наблюдалось.



Работа выполнена при поддержке проекта МНТЦ № 3245.

Рис. 1. АСМ–изображения: а) обработанной в тлеющем разряде поверхности слюды, экспонированной последовательно в раствор белка G, а затем в раствор моноклональных антител к *E.coli*, в) такой же поверхности после ее экспонирования в растворе, содержащий разрушенные фрагменты клеток *E.coli*, б, г) АСМ–профили вдоль пунктирных линий на АСМ–изображениях. Размеры кадров составляют а) $4,6 \times 4,6$ мкм², в) 50×50 мкм².

ИССЛЕДОВАНИЕ ПЛЕНОК БИОКОМПОЗИТА СУБТИЛИЗИН КАРЛСБЕРГ/ХИТОЗАН ПРИ ПОМОЩИ АТОМНО–СИЛОВОЙ МИКРОСКОПИИ

А.В. Бачева, А.А. Ежов
МГУ им. М.В. Ломоносова
alexander-ezhov@yandex.ru

В работе представлены результаты исследования пленок, полученных из хитозана — носителя иммобилизованного фермента субтилизин Карлсберг и биокompозита субтилизин/хитозан методом атомно–силовой микроскопии (АСМ). Все исследованные пленки биокompозита обладали высокой ферментативной активностью, сохраняющейся в течение длительного времени. Методом АСМ были охарактеризованы толщины и характерные морфологические особенности пленок, полученных на поверхности стекла и полипропилена различными способами.

Пленки были получены из раствора носителя или из смеси растворов фермента и носителя. В качестве исходных растворов использовались 1% раствор ацетата хитозана в 0,1М ацетатном буфере и водный раствор субтилизина Карлсберг. Затем было проведено сравнение пленок, образующихся при высыхании лежащей капли, при высыхании капли, скользящей по наклонной поверхности и пленок, полученных методом спиннингования. Кроме того, было исследовано влияние обработки пленок сшивающим агентом (глутаровым альдегидом) на их морфологию. АСМ–исследования в режимах прерывистого контакта и фазового контраста проводились при нормальных условиях на воздухе и в жидкой среде буфера Трис–HCl (pH 8,2). При проведении АСМ–исследований использовались стандартные кремниевые кантилеверы.

Установлено, что толщины пленок, полученных при высыхании скользящей по наклонной поверхности капли, составляют 500–800 нм (см. Рис. 1), а в случае спиннингования — около 200 нм. Показано, что для исследованных пленок наиболее типичным является присутствие на поверхности неупорядоченных неоднородностей с латеральными размерами от десятков до сотни нанометров, из которых, в свою очередь, формируются более крупные неоднородности с характерными латеральными размерами порядка микрона (см. Рис. 2). Результаты АСМ–исследований позволяют сделать вывод, что подавляющее большинство получаемых пленок являются сплошными и не имеют сквозных пор, поперечные размеры которых, по

порядку величины, сопоставимы с толщинами пленок.

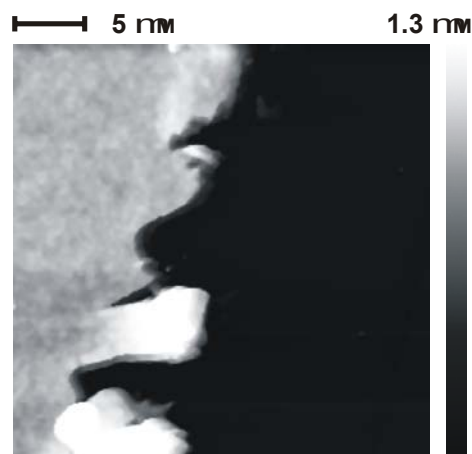


Рис. 1. АСМ изображение края пленки ацетата хитозана, использовавшееся для определения толщины.

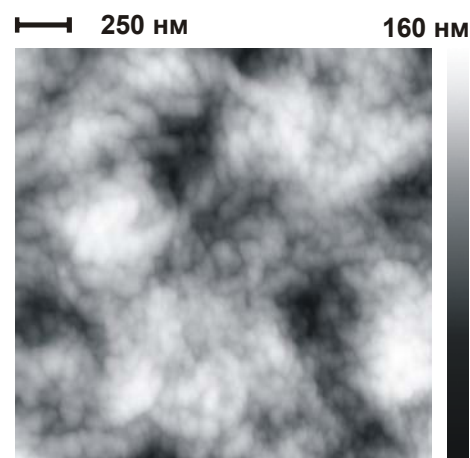


Рис. 2. Типичное АСМ изображение края пленки ацетата хитозана, использовавшееся для определения толщины.

Установлено, что морфология поверхности пленок после сушки на воздухе в течение нескольких суток не изменяется при их последующем помещении в буферный раствор. Продемонстрировано, что обработка глутаровым альдегидом, существенно повышающим стабильность биокompозита субтилизин/хитозан, не приводит к качественным изменениям морфологии пленок носителя или биокompозита.

МЕТОД АТОМНО-СИЛОВОЙ МИКРОСКОПИИ В АНАЛИЗЕ ПРОЦЕССА СТАБИЛИЗАЦИИ НАНОСЕРЕБРА СОПОЛИМЕРАМИ МАЛЕИНОВОЙ КИСЛОТЫ

А.С. Ерофеев, И.В. Яминский, Н.А. Самойлова, М.А. Краюхина

Физический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова

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 серебра, способствует более эффективному заживлению воспаленных ран, чем при использовании обычных антисептиков. Наночастицы могут быть использованы, как для модификации традиционных, так и для создания новых материалов, покрытий, косметических, дезинфицирующих и моющих средств (в том числе зубных и чистящих паст, стиральных порошков, мыла).

Наночастицы металлов размером менее 10 нм — это системы, обладающими избыточной энергией и высокой химической активностью. Предотвращение агрегации таких частиц возможно с помощью различных стабилизаторов, поэтому вопросы получения наночастиц и процессы их стабилизации рассматриваются в комплексе. В качестве стабилизаторов наночастиц металлов может быть использован класс линейных сополимеров с регулярно чередующимися звеньями электролитной и неэлектролитной природы, например, водорастворимые сополимеры на основе двухосновной малеиновой кислоты и этилена [1]. Преимуществом этого класса полимеров является их дифильный характер, возможность регулирования гидрофобно-гидрофильного баланса макромолекул.

Главная цель данной работы — изучение возможности использования сополимера этилена и малеиновой кислоты, а также полученного на его основе амфифильного полимера, содержащего остатки октадециламина (стеарильные группы), в качестве стабилизатора наночастиц серебра, используемого в медицине в качестве бактерицидного агента. Второстепенной целью является наблюдение за процессом изменения конформации и микроагрегации макромолекул в процессе образования полимерной соли и нуклеации серебра. Иными словами, выявление особенностей строения комплексов сополимер малеиновой кислоты (или амфифильный сополимер) — ионное серебро или наносеребро в сравнении с исходными сополимерами мето-

дом атомно-силовой микроскопии. В атомно-силовом микроскопе игла, закрепленная на упругой микропластине, скользит по поверхности исследуемого образца. По изгибу микропластины, который регистрируют с помощью оптической системы, определяется топографическая картина сканируемого образца.

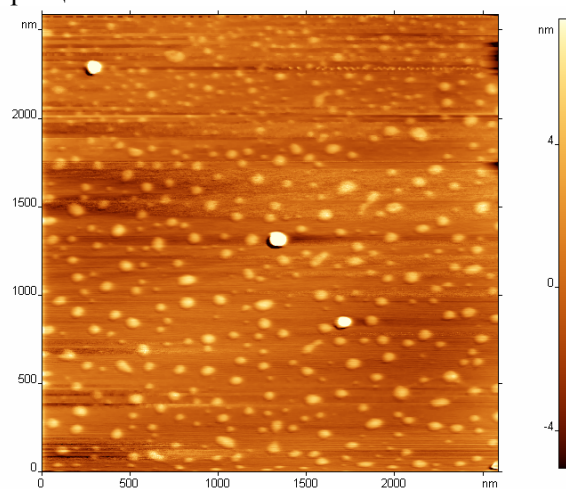


Рис. 1. Изображение сополимера малеиновой кислоты с этиленом с восстановленным серебром. Размер кадра 2,6×2,6 мкм.

С помощью метода сканирующей атомно-силовой микроскопии было установлено, что на всех стадиях нуклеации серебра макромолекулы сополимеров малеиновой кислоты с этиленом образуют агрегаты различного размера. На изображениях, полученных с помощью указанного метода, видно, что при введении гидрофобных лигандов в состав сополимера (стеарильных остатков) происходит компактизация агрегатов.

На изображениях, полученных с помощью просвечивающей электронной микроскопии, видно, что сополимеры малеиновой кислоты с этиленом можно использовать в роли стабилизатора наночастиц серебра. Стабилизированные наночастицы серебра имеют размер около 3 нм.

Список литературы:

1. Кабанов В.А., Зубов В.Г., Семчинов Ю.Д., Комплексная радикальная полимеризация, М.: Химия, 1987.

ПРИМЕНЕНИЕ МЕТОДА ОПТИЧЕСКОГО ПИНЦЕТА ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ МЕЖДУ МИКРООБЪЕКТАМИ

А.Г. Жданов, Е.В. Любин, М.Д. Хохлова
физический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова
zhdanov@nanolab.phys.msu.ru

Метод захвата под действием сил светового давления сильно сфокусированного лазерного пучка, называется *методом оптического пинцета*. Наибольшее распространение этот метод нашел в биологических приложениях, поскольку является невозмущающим способом манипуляции микрообъектами. Метод оптического пинцета позволяет, в том числе, проводить операции с живыми клетками.

С помощью собранной в ходе работы установки были изучены особенности захвата различных микрообъектов. Рассматривались эритроциты, прозрачные частицы диоксида кремния размером от 400 нм до 3 мкм, асимметричные конгломераты частиц и частицы диоксида кремния, покрытые золотом. На примере этих микрообъектов изучены особенности оптического захвата различных частиц и биологических объектов.

В ходе работы была выполнена калибровка установки оптического пинцета по статистическим параметрам движения захваченных частиц и определена зависимость параметров захвата от мощности лазерного излучения.

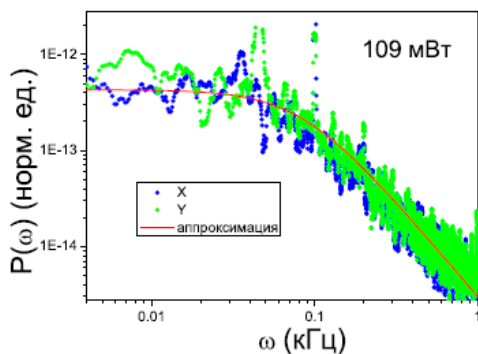


Рис. 1. Спектр мощности колебаний частицы в ловушке.

На Рис. 1 представлен спектр мощности колебаний частицы SiO_2 ($D = 3 \mu\text{м}$) в оптической ловушке при мощности лазерного излучения 109 мВт. Точки на графике соответствуют экспериментальным результатам, красная кривая – результат теоретической численной аппроксимации. Эффективные коэффициенты жесткости оптической ловушки составили от 0,75 до 2,8 пН/мкм при

мощности лазерного излучения от 50 мВт до 120 мВт. Таким образом, данный метод может быть применен для измерения сил в диапазоне нескольких пиконьютонов на микронном и субмикронном масштабе.

В ходе работы также был продемонстрирован оптический захват и манипулирование красными кровяными тельцами.



Рис. 2. Микрофотография оптического захвата и деформации одиночного эритроцита.

На Рис. 2 показан захват эритроцита, имобилизованного на подложке. Излучение лазера не приводит ни к каким видимым необратимым изменениям. Передвижение эритроцита относительно оптической ловушки приводит к обратимым деформациям.

В данной работе показано, что методом оптического пинцета возможно эффективное изучение механических свойств биологических объектов, например, определение эластичных свойств эритроцитов. Поскольку оптический захват не вызывает необратимых изменений данный метод может применяться и для манипуляции биологическими микрообъектами.

Список литературы:

1. Ashkin A., Phys. Rev. Lett. 24, 156–159 (1970).
2. Lee W.G., Bang H., Yun H., Lee J., Park J., Kim J.K., Chung S., Cho K., Chung C., Han D.C., Chang J.K., Lab Chip, 7, 516–519 (2007).
3. Meiners J.C., Quake S.R., Phys. Rev. Lett., 84, 5014–5017 (2000).

ПОВЕРХНОСТНАЯ СТРУКТУРА КЛЕТОК ДРОЖЖЕЙ, ПОКРЫТЫХ ПОЛИМЕРНЫМИ ТОНКИМИ ПЛЕНКАМИ И ЗОЛОТЫМИ НАНОЧАСТИЦАМИ

А.И. Замалеева, Д.И. Тазетдинова, М.В. Морозов, Ф.К. Алимова,
А.Х. Гильмутдинов, Р.Ф. Фахруллин
Казанский государственный университет
alsu130ksu@mail.ru

Метод послойного нанесения полимерных нанопленок на коллоидные частицы получил широкое распространение для модификации различных объектов [1]. Получены и охарактеризованы сферические и анизотропные микро- и нанокапсулы, сформированные путем последовательного нанесения противоположно заряженных полиэлектролитов на поверхности различных частиц, как органической, так и неорганической природы [2]. Одним из интересных направлений является поверхностная модификация живых клеток нанопленками, например, описана инкапсуляция эритроцитов [3] и дрожжей [4]. В данной работе описано нанесение нанопленок и наночастиц на клеточные стенки дрожжей и визуализация поверхностей клеток методом атомно-силовой микроскопии (АСМ).

Клетки дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* использовали в качестве модельного объекта. Суспензии клеток обрабатывали путем последовательного нанесения полиэлектролитов: полиаллиламин гидрохлорида (Sigma), полистирен сульфоната (Sigma) и золотыми наночастицами, полученными методом восстановления металла при помощи цитрата натрия. Наночастицы включали в качестве одного из слоев между положительно заряженными полимерами. Индикатором успешного включения наночастиц в пленочные слои служило изменение окраски суспензии клеток, фиксируемое при помощи оптического микроскопа Leica DM 1000. Визуализацию поверхности клеток осуществляли при помощи АСМ Integra Prima (NT-MDT) с кантилеверами NSG 3 в полуконтактном режиме.

Было установлено, что обработка полиэлектролитами и наночастицами приводит к формированию на поверхности клеток дрожжей нанопленок, значительно увеличивающих поверхностную площадь обработанных клеток.

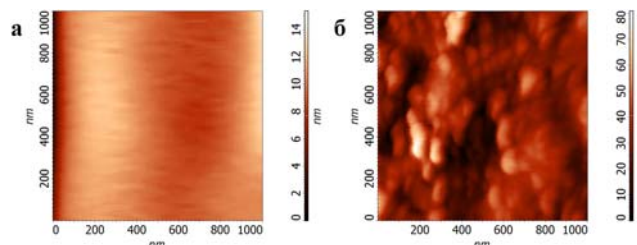


Рис. 1. а) поверхность необработанных клеток, б) поверхность клеток, обработанных нанопленками и золотыми наночастицами.

Анализ АСМ-изображений (Рис. 1) позволил установить, что нанесение наночастиц приводит к формированию на поверхности клеток дрожжей развитой поверхностной структуры, в сравнении с необработанной поверхностью интактных клеток. Было установлено, что клетки сохраняют свою жизнеспособность после обработки пленками и золотыми наночастицами. Можно предположить, что полимерные нанопленки служат буфером между клеточной стенкой дрожжей и наночастицами, препятствуя их проникновению внутрь клеток.

Данная методика может быть использована для увеличения площади поверхности клеток при иммобилизации биопестицидов и антибиотиков в целях создания биопрепаратов, а также для регулирования адгезионных свойств микроорганизмов.

Список литературы:

1. Dahne L., Peyratout C.S., *Angew. Chem. Int. Ed.*, 43, 3762 – 3783 (2004).
2. Möhwald H., *Colloid Surface A*, 171, 25-31 (2000).
3. Donath E., Moya S., Neu B., Sukhorukov G.B., Georgieva R., Voigt A., Baumler H., Kiese-wetter H., Mohwald H., *Chem. Eur. J.*, 8, 5481–5485 (2002).
4. Diaspro A., Silvano D., Krol S., Cavalleri O., Gliozzi A., *Langmuir* 18, 5047–5050 (2002).

ОСОБЕННОСТИ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ЛИНЕЙНО–ЦЕПОЧЕЧНОГО УГЛЕРОДА С СЕРЕБРОМ

В.Д. Кочаков, Н.Д. Новиков, П.А. Ишмуратов, В.А. Казаков

Чувашский государственный университет им.И.Н. Ульянова
kocherishca@mail.ru

Ранее [1] были представлены результаты по исследованию интеркаляции пленок линейно–цепочечного углерода (ЛЦУ) в пленку серебра. В данной работе показано, что при нагреве пленки серебра, покрытой пленкой ЛЦУ, топография поверхности претерпевает структурные изменения, характер которых зависит от соотношения толщины пленки серебра и толщины пленки ЛЦУ.

С помощью атомно–силового микроскопа FemtoScan была исследована поверхность пленки серебра, частично покрытая пленкой ЛЦУ, после термообработки. Результат представлен на Рис. 1.

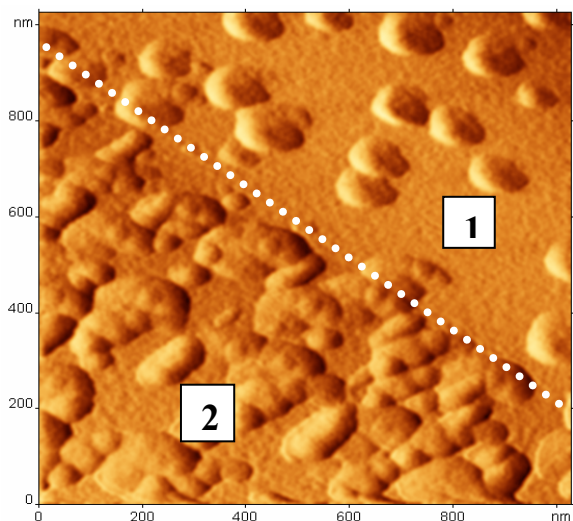


Рис. 1. Фрагмент поверхности пленки серебра с частично покрытой пленкой ЛЦУ (отмеченная цифрой 1) после термообработки на воздухе при температуре 400°C.

Из рисунка видно, что не покрытая ЛЦУ область пленки серебра окислилась с нарушением сплошности (эта область отмечена цифрой 2), а область 1 представляет собой поверхность, покрытую кластерами системы Ag — ЛЦУ в виде капель. Пленки серебра и ЛЦУ имеют одинаковую толщину 500 Å и первоначально сплошные.

Окисление тонких пленок серебра происходит с нарушением сплошности. Это доказано отдельным экспериментом, в котором исследовалась динамика окисления тонкой пленки серебра на воздухе при температуре 400°C. Фрагменты процесса окисления показаны на Рис. 2.

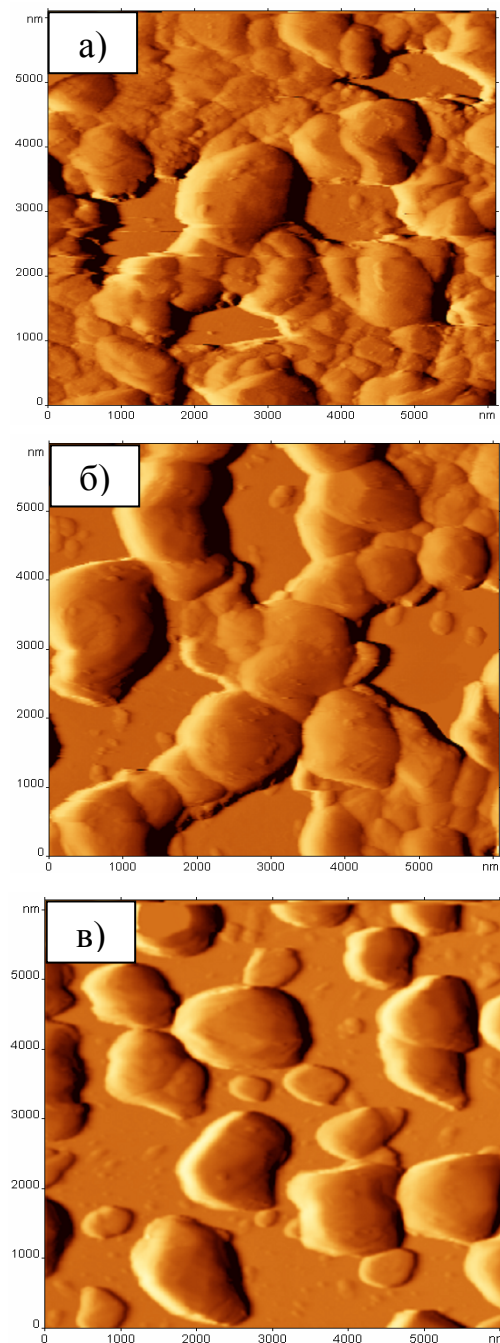


Рис. 2. Фрагменты процесса окисления тонкой (600 Å) пленки серебра при 400°C: а) через 5 минут, б) через 10 минут, в) через 15 минут.

Как видно из рисунка 2, процесс окисления сопровождается трансформацией пленочного покрытия и идет с нарушением сплошности. Однако образовавшиеся кластеры не имеют капельной формы. Структурные

изменения происходят в твердой фазе путем внедрения кислорода диффузией.

По-видимому, проникновение пленок Ag и ЛЦУ друг в друга происходит с выделением тепла и система Ag — ЛЦУ формируется в расплавленном виде. Это подтверждает Рис. 3. Из него видно, что поверхность трехфазной пленки атомно-гладкая.

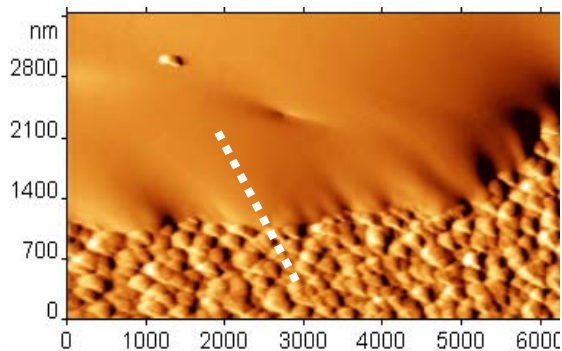


Рис. 3. Сползание пленочной системы Ag — ЛЦУ при отжиге на воздухе с толстой пленки серебра.

По указанной на Рис. 3 пунктирной линии был прописан профиль поверхности, который показан на Рис. 4.

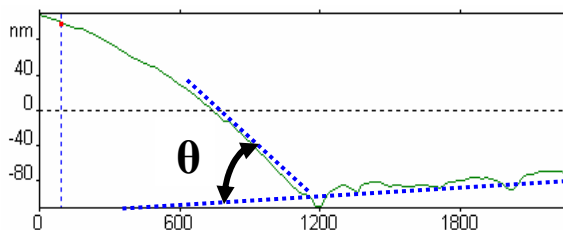


Рис. 4. Определение краевого угла смачивания.

По указанному профилю был определен краевой угол смачивания, который составил 18° . Краевой угол смачивания определяет соотношение между работой адгезии W_a и когезии W_k по уравнению Дюпре:

$$\cos \theta = 2\left(\frac{W_a}{W_k} - 1\right).$$

Расчет по приведенной формуле показал, что работа сил адгезии W_a больше работы сил когезии W_k в 1,48 раза, что указывает на хорошую смачиваемость между пленочной системой Ag — ЛЦУ и поверхностью окисленного серебра.

С помощью метода РФЭС был проведен анализ состава интеркалированной серебром пленки ЛЦУ. Таким образом удалось определить атомную концентрацию элементов C1s — 39.1%, O1s — 25% и Ag3d_{5/2} — 35.9 %. Наблюдаемый сдвиг между спектрами Ag и Ag интеркалированного в ЛЦУ (Рис. 5) свидетельствует о наличии слабой связи между атомами серебра и линейно-цепочечным углеродом с энергией 0,2 эВ.

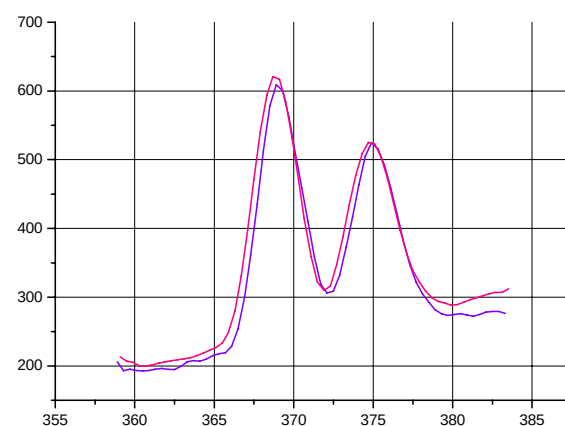


Рис. 5. Фотоэлектронный спектр от атомов свободного Ag и от атомов Ag, интеркалированного в ЛЦУ.

Список литературы:

1. Кочаков В.Д., Новиков Н.Д., Ярусов Е.А., Егоров Д.В., Современные достижения бионаноскопии, М.: МГУ, 2007, 66 – 67.

МИКРОМЕХАНИЧЕСКИЕ БИОСЕНСОРЫ НА ОСНОВЕ АТОМНО-СИЛОВОЙ МИКРОСКОПИИ

Г.А. Киселев^{1,3}, П.В. Горелкин^{2,3}, И.В. Яминский^{2,3}

¹Институт физической химии и электрохимии РАН им. А.Н. Фрумкина

²МГУ им. М.В. Ломоносова

³ООО «Академия биосенсоров»

kiselev@biosensoracademy.com

В последние годы исследование наносистем стало одним из приоритетных и финансируемых направлений в науке, в результате чего возникла необходимость в создании высокоточного оборудования для исследования процессов, происходящих в тонкопленочных супрамолекулярных структурах.

Современные микрометрические системы, функционирующие на базе атомно-силового микроскопа, позволяют определять изменение поверхностного натяжения сверхтонких пленок, нанесенных на твердую поверхность механического датчика (кантилевера), с разрешением до 10^{-5} Н/м.

При внешнем воздействии на слой молекулярных рецепторов, помещенных на одну из поверхностей микроконсоли, происходит изгиб кантилевера. Величина изгиба зависит от типа молекул, которыми модифицирован датчик.

Массив кантилеверов, модифицированных разными веществами, будет представлять собой подобие рецептора человеческого носа (Рис. 1), который способен определять тип внешнего химического воздействия по гистограмме откликов отдельных датчиков.

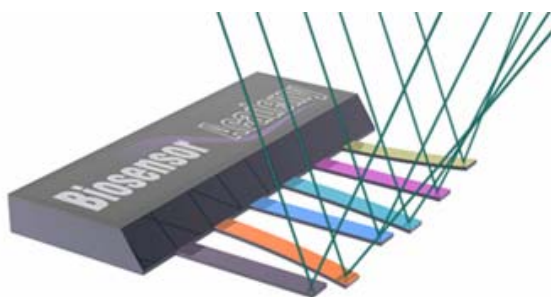


Рис. 1. Массив кантилеверов с разными рецепторными слоями.

Кантилеверы можно использовать в качестве микровесов. Измерение массы присоединенных микроскопических объектов или тонких пленок легко осуществляется с помощью прецизионного контроля частоты собственных колебаний кантилевера (Рис. 2).

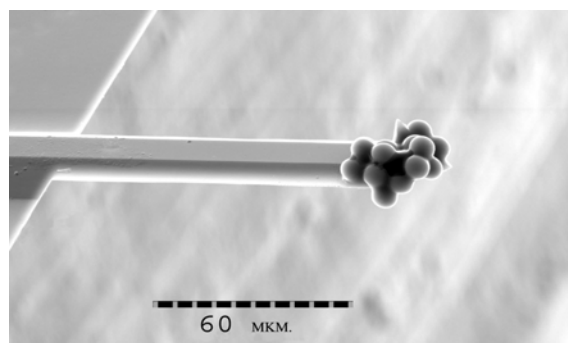


Рис. 2. Процесс взвешивания микрочастиц с помощью кантилевера.

В настоящем докладе описывается прибор, позволяющий на своей основе создавать высокочувствительные химические *label-free* сенсоры с возможностью многофакторного анализа (Рис. 3).

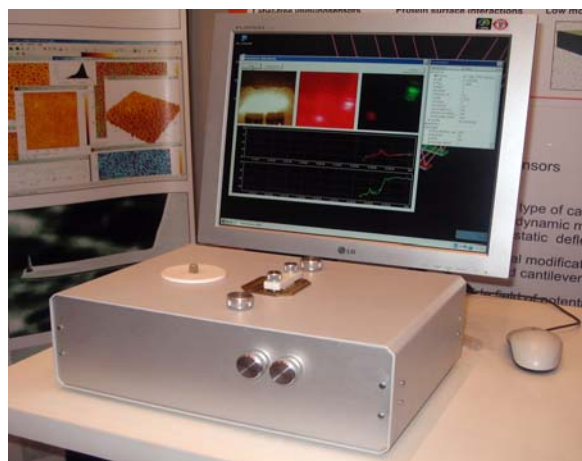


Рис. 2. Мультикантилеверная система "Атомные весы Биоскан".

В докладе приводятся конкретные практические примеры применения.

КАНТИЛЕВЕРЫ ДЛЯ ХИМИЧЕСКИХ И БИОЛОГИЧЕСКИХ СЕНСОРОВ

Д.В. Колесов, И.В. Яминский

МГУ им. М.В. Ломоносова, физический факультет
kolesov@polly.phys.msu.ru

Создание миниатюрных сенсоров открывает громадные перспективы для биохимического анализа, детектирования газов, медицины и некоторых других областей науки и техники. В связи с широким распространением сканирующей зондовой микроскопии развитие получили сенсоры, основанные на кантилеверах для атомно-силового микроскопа. Для использования в сенсорах, кантилеверу нет необходимости иметь острую иглу. Однако, изначально, использовались коммерческие кантилеверы с зондом на конце. В настоящее время, большинство фирм, производящих кантилеверы, предлагают специальные беззондовые кантилеверы. Характеристики таких кантилеверов могут быть близкими как к контактному, так и к безконтактному, в зависимости от режима работы сенсора. Для работы статического сенсора нужны длинные, мягкие кантилеверы, в то время как для работы динамического — жесткие кантилеверы с большой резонансной частотой.

Мы предлагаем использовать вместо коммерческих кремниевых кантилеверов новые кантилеверы из перспективных материалов. В качестве таких материалов могут выступать полимерные пленки. Большой выбор полимеров и их уникальные механические и химические свойства открывают широкие перспективы по созданию высокочувствительных сенсоров на широкий спектр веществ. Другим интересным материалом является слюда. Она также обладает замечательными свойствами и ее легко скалывать для получения достаточно тонких образцов с атомарно гладкой поверхностью.

В нашей работе мы использовали тонкие и длинные пластинки слюды. Размеры таких пластинок составляли миллиметры, однако, они являются прототипами слюдяных микро- и нанокантилеверов. Для проверки работоспособности были проведены эксперименты по детектированию 2-тиоэтанола в жидкости и газе. В состав данного соединения входит SH-группа, поэтому в качестве аналитического слоя на поверхность слюды была напылена пленка золота толщиной 30 нм. Эксперименты в жидкости проводились в герметичной ячейке с использованием головки атомно-силового микроскопа FemtoScan.

Раствор 2-тиоэтанола в метаноле поступал в ячейку, в которой была установлена слюдяная пластинка с размерами рабочей части 3750x1500x18 мкм. В эксперименте фиксировался значительный изгиб пластины, выходящий на постоянное значение в течение приблизительно 5 часов. Концентрация детектируемого вещества составила $1,5 \times 10^{-2}$ М.

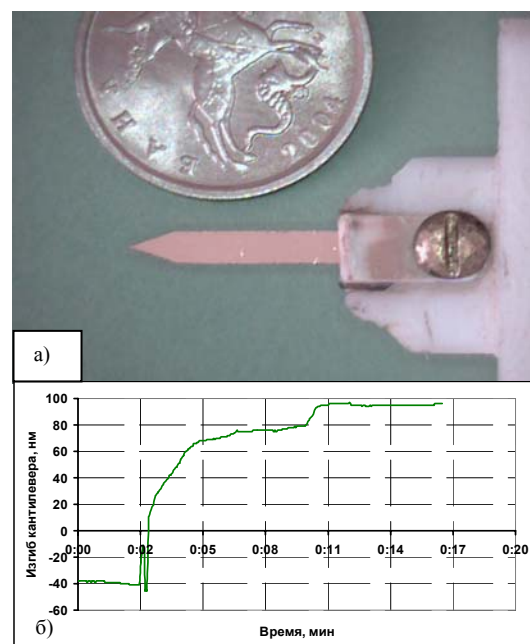


Рис. 1. а) Слюдяная пластинка в держателе прибора Биосенсор; б) график зависимости отклонения края пластины от времени.

Для проведения эксперимента в газообразной фазе, слюдяная пластина устанавливалась в держатель прибора Биосенсор (Рис. 1а) и помещалась в специальную камеру. На дно камеры впрыскивался раствор 2-тиоэтанола в воде. Таким образом, слюдяная пластина находилась в парах детектируемого вещества. Концентрация паров составила менее 50 частиц на миллион. Эксперимент протекал быстрее, чем в жидкости. График зависимости отклонения края пластины от времени представлен на Рис. 1б. За время менее 10 минут наблюдалось значительное отклонение и выход кривой изгиба кантилевера в состояние насыщения.

Была показана возможность использования слюдяных пластин в качестве преобразователей в сенсорных устройствах. Зафиксированы малые концентрации 2-тиоэтанола.

МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ АОРТЫ ЖИВОТНЫХ В УСЛОВИЯХ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО МОДЕЛИРОВАНИЯ

Р.В. Степанов, В.Д. Кочаков, А.А. Юсов
ФГОУ ВПО «ЧувГУ» им. И.Н. Ульянова, г. Чебоксары
kocherishca@mail.ru

Инфаркт миокарда (ИМ) и ишемическая болезнь сердца на территории Чувашской Республики имеет выраженную биогеохимическую зональность. Сверхвысокие показатели заболеваемости и смертности от ИМ, превышающие среднереспубликанские более чем в три раза, регистрируются в юго-западной части республики, в Присурском биогеохимическом субрегионе (кремниевая провинция). Сверхнизкие уровни заболеваемости и смертности от ИМ в два раза ниже среднереспубликанских отмечаются в восточной части республики, в Прикубнинском субрегионе (цинкдефицитная провинция).

Цель настоящего исследования состояла в том, чтобы провести сравнительный анализ морфологических особенностей аорты в условиях естественного хронического моделирования двух вышеуказанных субрегионов.

Для достижения поставленной цели на беспорядных белых половозрелых крысах (самцах весом 145 ± 13 г) было проведено натурное хроническое экспериментальное исследование. Крысы были разделены на две группы, в которых был организован кормовой рацион и питьевой режим, соответствующим одному из субрегионов Чувашской Республики. Рацион отличался по содержанию и соотношению некоторых макро- и микроэлементов (Ca, Mg, Na, K, Si, F, Co, Se). Крысы первой группы (подопытные) получали питьевую воду и корм, привезенные из кремниевой провинции, вторые (контрольная группа) — из цинкдефицитной провинции.

Срезы аорты животных толщиной 15 мкм исследовались на атомно-силовом микроскопе «FemtoScan». Результаты сравнительных топографий поверхности аорты животных представлены на Рис. 1.

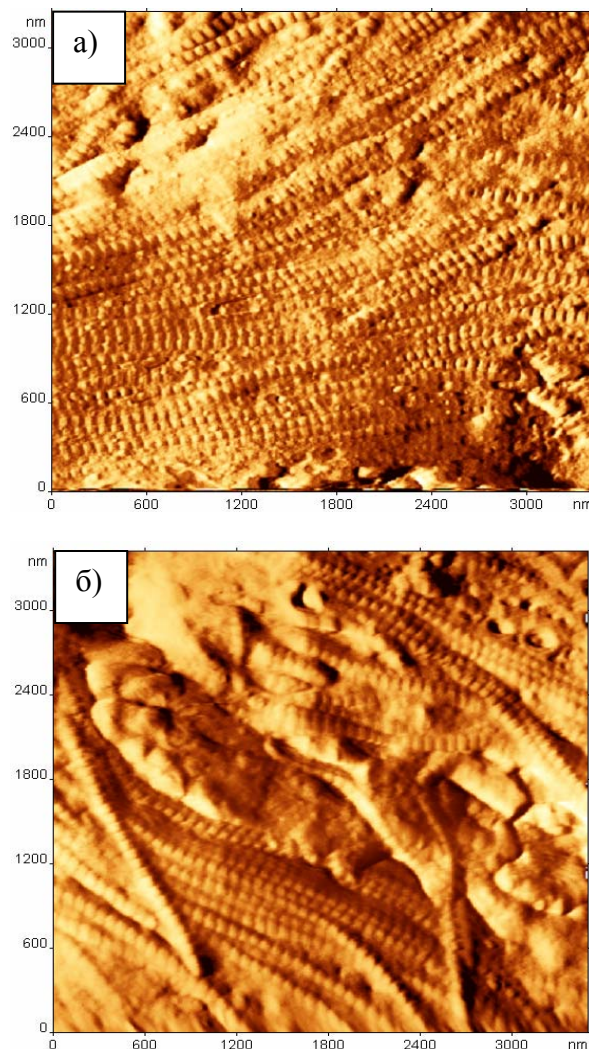


Рис. 1. Топографии поверхностей аорт животных экспериментальных групп: а) подопытной, б) контрольной.

Как видно из Рис. 1а, у животных подопытной группы эластические волокна характерны для атерогенеза в отличие от аорты животных контрольной группы (Рис. 1б).

Таким образом, методы атомно-силовой микроскопии позволяют оценить состояние эластического каркаса аорты.

СПОСОБЫ АНАЛИЗА ЭРИТРОЦИТОВ ПРИ ПОМОЩИ АТОМНО–СИЛОВОЙ МИКРОСКОПИИ

Т.Г. Кузнецова¹, М.Н. Стародубцева¹, Е.И. Коваленко², Н.И. Егоренков³

¹ Гомельский государственный медицинский университет

² Белорусский государственный университет

³ Гомельский государственный технический университет им. П.О. Сухого
tmatuh@server.by

Цель нашей работы — выбор адекватного способа исследования эритроцитарной поверхности методами АСМ для оценки структурно-функционального состояния эритроцитов человека.

Было проведено сравнительное АСМ–исследование эритроцитов мазка крови, эритроцитов, фиксированных 1% раствором глутарового альдегида и фиксированных эритроцитарных теней. Работа выполнена на атомно-силовом микроскопе НТ-206 (МикроТестМашины, Беларусь) в контактном режиме сканирования на воздухе с использованием игл типа CSC38 (MicroMash). Регистрировали топографию, карты вертикальных отклонений острия АСМ-зонда и карты латеральных сил поверхности клеток. Для количественной оценки структуры клеточной поверхности был проведен фрактальный анализ карт латеральных сил площадью от $0,5 \times 0,5 \text{ мкм}^2$ до $6 \times 6 \text{ мкм}^2$ с разрешением 256×256 пикселей. Фрактальная размерность рассчитана с использованием программы SurfaceXplore 1.3.11

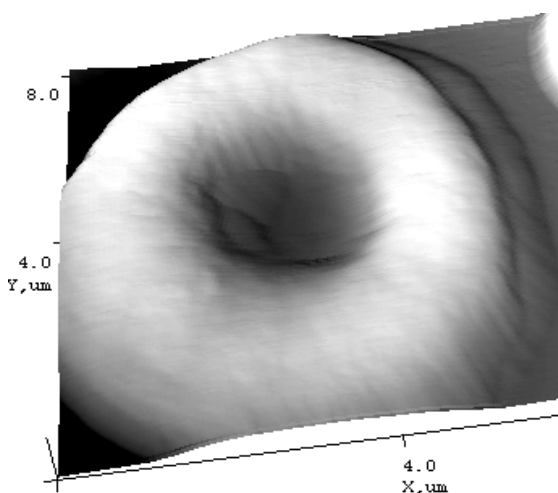


Рис. 1. Эритроцит, фиксированный глутаровым альдегидом.

Фиксированные клетки имеют классическую форму двояковогнутого диска и средний диаметр от 6 до 7 мкм (Рис. 1) Эритроциты мазка, напротив, приобретают форму почти плоского диска с диаметром от 8 до

10 мкм (Рис. 2). Таким образом, их анализ позволяет получить информацию о процессах существенной перестройки, происходящей в клетках при взаимодействии с субстратом (подложкой) и одновременном высыхании. Эритроциты мазка крови также позволяют исследовать температурные перестройки мембран и подмембранных комплексов. Наши эксперименты с использованием термоплатформы показали, что при варьировании температур средние значения угла кручения острия для карт латеральных сил резко изменяются в диапазоне $45\text{--}55^\circ\text{C}$ для эритроцитов мазка, но остаются постоянными для фиксированных клеток. Именно в этом диапазоне происходит и фазовый переход вещества мембраны эритроцитов, соответствующий структурной перестройке спектрина.

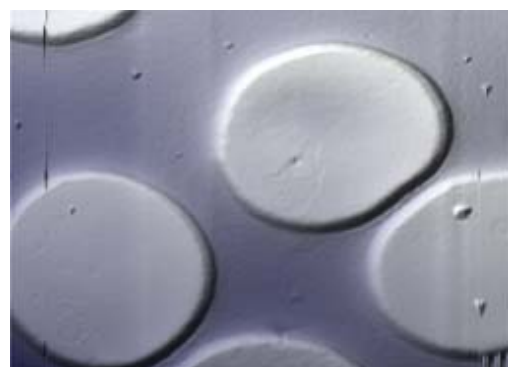


Рис. 2. Эритроциты мазка крови ($21 \times 16 \text{ мкм}^2$).

Фиксация глутаровым альдегидом обеспечивает хорошую сохранность клеток, о чем свидетельствует то, что, с одной стороны, процент трансформированных форм не выходит за рамки гематологических норм, а с другой стороны, хорошо выявляются индивидуальные различия клеток. АСМ–анализ, включающий нанопрофилометрию отдельных эритроцитов, позволяет делать количественную оценку различных геометрических параметров дискоцитов, в частности, рассчитывать такие важные показатели, как объем клеток и радиус кривизны центрального углубления.

Поверхность эритроцитов мазка крови сглаженная. АСМ–изображения, полученные для малых площадей сканирования ($1 \times 1 \text{ мкм}^2$), выявляют мелкозернистую шероховатость (Рис. 3а). Поверхность фиксированных эритроцитов демонстрирует более рельефную и сложную организацию, особенно четко выявляемую на картах латеральных сил (Рис. 3б).

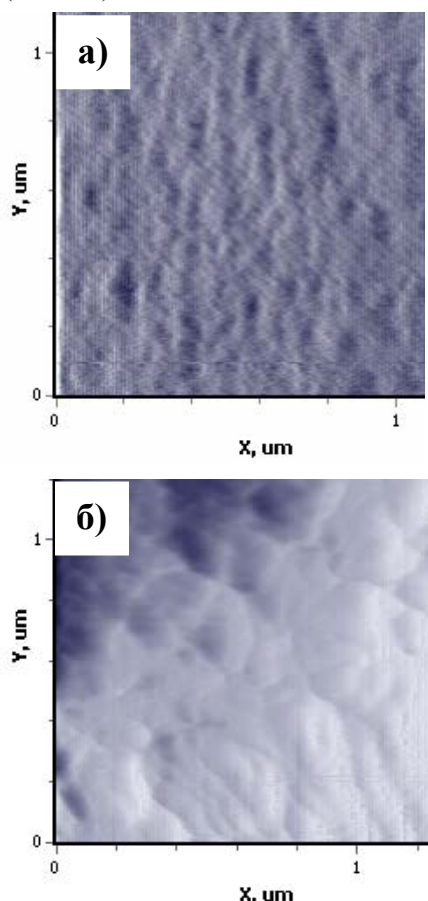


Рис. 3. Карты латеральных сил для эритроцитарной поверхности а) мазок крови, б) фиксация глутаровым альдегидом.

Это позволило нам предложить методику структурного анализа подмембранного цитоскелета нативных клеток. Идея заключается в том, что при химической стабилизации цитоскелет является сетчатым каркасом, который сохраняет прижизненную форму клеток, и на который в процессе частичной дегидратации «опирается» липидная мембрана. Сила взаимодействия зонда с поверхностью эритроцита над каким-либо элементом цитоскелета отличается от силы взаимодействия в тех точках, где эти элементы отсутствуют, что находит отражение на картах латеральных сил. Эта методика позволила нам выявить гексогональную сеть, хорошо соответствующую теоретическим моделям актин-спектринового цитоскелета. Определение

фрактальной размерности карт латеральных сил позволило оценить особенности и динамику структуры цитоскелета при воздействии активных форм азота и кислорода, а также при заболевании сахарным диабетом второго типа.

Был также проведен АСМ–анализ теней эритроцитов, распластанных на подложке и фиксированных глутаровым альдегидом.

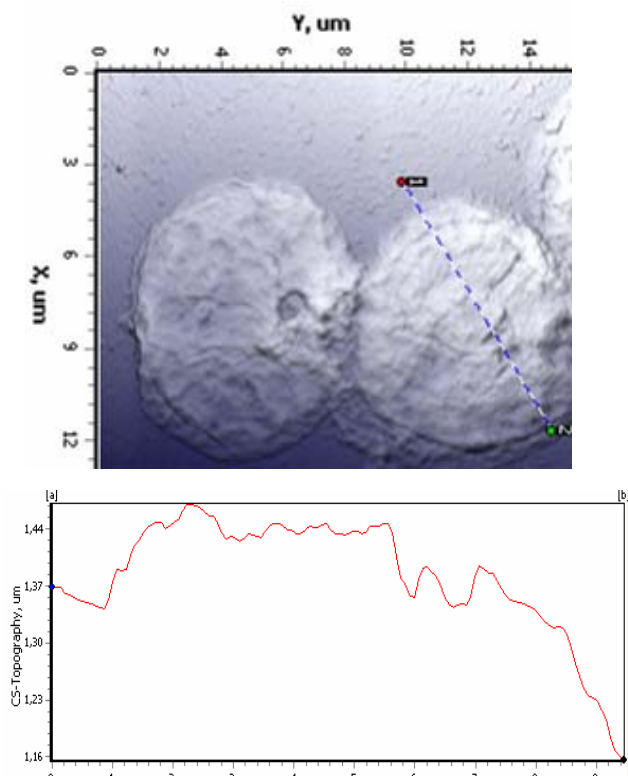


Рис. 4. Тени эритроцитов (топография и профилометрия).

Диаметр эритроцитарных теней варьировал от 7 до 8 мкм (Рис. 4). Профилометрия верхней мембраны показала большие перепады высот. Отчетливо просматриваются участки мембранных разрывов. Однако организация рельефа, выявленная при малых полях сканирования, оказалась очень сходна с мембранной поверхностью фиксированных дискоцитов. Это свидетельствует о хорошей сохранности цитоскелетных элементов эритроцитарных теней при условии их стабилизации глутаровым альдегидом.

Таким образом, химическая фиксация оказывается важным и даже необходимым элементом подготовки эритроцитов при исследовании структуры мембранного цитоскелета.

Работа выполнена при поддержке БРФФИ (грант Б07-043).

ЗОНДЫ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЙ УПРУГИХ СВОЙСТВ БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБЪЕКТОВ ПРИ ПОМОЩИ АТОМНО–СИЛОВОГО МИКРОСКОПА

Д.В. Лебедев^{1,2}, А.П. Чукланов¹, А.А. Бухараев^{1,2}, О.С. Дружинина³

¹Казанский физико-технический институт им. Е.К. Завойского

²Казанский государственный университет

³Казанский институт биохимии и биофизики

denis.lebedev@bk.ru

Интенсивное развитие сканирующей зондовой микроскопии в последнее десятилетие привело к появлению новых методик исследования свойств поверхности с высоким пространственным разрешением. К таким методикам относится среди прочих и измерение упругости мембран отдельных клеток с помощью атомно–силового микроскопа (АСМ). В основе этого метода лежит регистрация силовых кривых, которые отражают отклонение гибкой балки (кантилевера) при взаимодействии вершины зонда с поверхностью в зависимости от расстояния между ними [1]. Анализируя угол наклона кривой подвода можно получить информацию о локальных упругих свойствах образца.

Однако использование стандартных зондов имеет ряд существенных недостатков. Так как точная форма каждого конкретного зонда неизвестна, довольно сложно получить количественные значения модуля Юнга и силы адгезии. Еще один недостаток стандартных зондов проявляется при исследовании мягких биологических объектов (клеток и бактерий) в условиях, близких к естественным (например, в физиологическом растворе). Радиус закругления обычного зонда составляет 30–100 нм, так что даже при небольшом надавливании зондом на живую клетку во время эксперимента она может легко разрушиться.

В данной работе были созданы и испытаны зонды для измерения упругих свойств биообъектов (Рис. 1). Главное отличие таких зондов от стандартных состоит в том, что вместо обычного острого конического зонда на балку крепится кварцевый шарик известного размера (диаметром от нескольких сотен нанометров до десятков микрометров). Для этого используются специальные кремниевые балки без выращенных зондов.

Преимущества таких зондов очевидны: во–первых, благодаря большей контактной площади уменьшается давление на поверхность, что дает возможность проводить эксперименты на мягких биологических объектах не повреждая их. Во–вторых, поскольку

форма и размер таких зондов точно известна (например, кварцевая полусфера диаметром 5 мкм), то существенно повышается точность в определении величины модуля Юнга — основного количественного параметра, отражающего упругие свойства мембраны клетки.

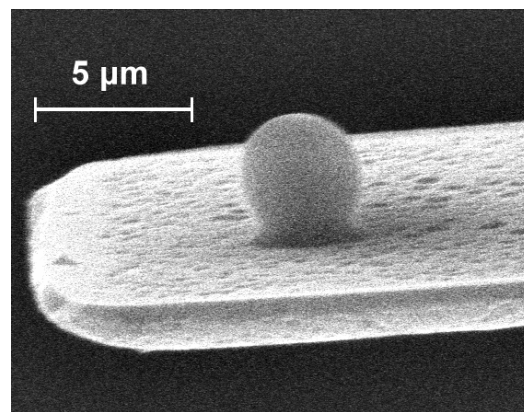


Рис. 1. СЭМ изображение АСМ зонда для исследования упругих свойств.

С помощью созданных зондов нами были проведены исследования упругих свойств внутренней поверхности кровеносного сосуда лабораторной крысы в физиологическом растворе. Так же нами были получены абсолютные численные значения модуля Юнга для данного образца. На Рис. 1 приведено изображение созданного нами зонда, полученное на сканирующем электронном микроскопе (СЭМ).

Применение нового подхода для определения модуля Юнга в условиях максимально близких к естественным (*in vitro*) открывает новые возможности в диагностике и подборе лекарственных препаратов для широкого круга заболеваний [2].

Список литературы:

1. Kurihara K., Adv. in Colloid and Interface Sci., 71–72, 243–258 (1997).
2. Dulińska I., Targosz M. et. al., J. Biochemical and Biophysical Methods, 66, 1–11 (2006).

ИССЛЕДОВАНИЕ ВОЛОКОН ИЗ РЕКОМБИНАНТНЫХ БЕЛКОВ ПАУТИНЫ

Д.В. Клинов¹, В.Г. Богуш², О.С. Соколова³, Л.И. Давыдова², К.В. Сидорюк²,
Н.Г. Есипова⁵, Т.В. Неретина¹, И.А. Оршанский⁴, В.Г. Макеев⁴,
В.Г. Туманян⁴, П.Б. Логинов¹, А.Г. Михайлов¹,
К.В. Шайтан³, В.Г. Дебабов², М.П. Кирпичников³

¹Институт Биоорганической Химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,

²Государственный научный центр «ГосНИИГенетика»,

³Биофак МГУ,

⁴Институт биохимии РАН,

⁵Институт молекулярной биологии РАН

Паутина является уникальным, интересным для исследования биологическим материалом. Волокно паутины прочнее стальной проволоки той же толщины и способно растягиваться в 5 раз, прежде чем разорваться. Нами активно ведутся исследования процесса самосборки белков паутины в фибриллы при помощи сканирующей зондовой микроскопии.

В нашей лаборатории были проведены эксперименты, показавшие возможность самосборки нановолокон паутины из растворов белков 1F9 и 2E12 в лабораторных условиях. Белки растворялись в различных буферах и просто в воде, затем наносились на стекло. При помощи атомно-силового микроскопа было показано, что в определённых случаях в результате самосборки белков на поверхности образуются волокна длиной от 0,5 до 3 микрон и толщиной около 2 нм (Рис. 1).

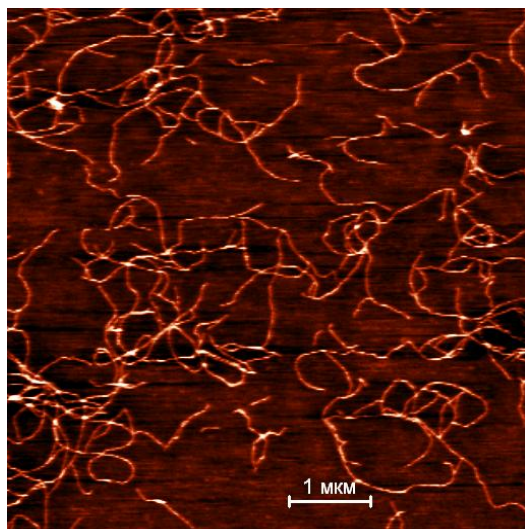


Рис. 1. Нановолокна рекомбинантных белков паутины, нанесенные на стекло из водного раствора.

Универсальным методом формирования нановолокон является микрокапиллярное электрораспыление. Нами были проведены

эксперименты по электронапылению паутины на поверхность графита. Между иглой и поверхностью прикладывалось напряжение около 5000 Вольт, растворённый белок распылялся из капилляра. В результате было показано, что на поверхности образуются волокна диаметром от 10 до 400 нанометров (Рис. 2). Нановолокно образует плотноупакованную пленку на поверхности подложки. Пленка состоит из одного волокна гигантской длины (по нашим оценкам около 5-10 см).

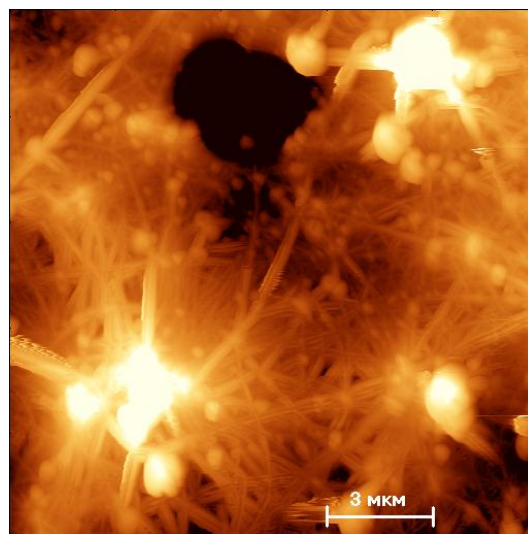


Рис. 2. Нановолокна паутины, нанесённой на графит с помощью электронапыления.

Исследования в этом направлении важны для медицинских целей, для создания искусственных органов, и для создания высокоэффективных наночистот.

Список литературы:

1. Knight D.P., Vollrath F., Biological liquid crystal elastomers, Phil. Trans. R. Soc. Lond., 357, 155–163 (2002).
2. Vollrath F., Porter D., Spider silk as archetypal protein elastomer, Soft Matter, 2, 377–385 (2006).

АТОМНО-СИЛОВАЯ МИКРОСКОПИЯ ДОМЕНОВ НЕСТРУКТУРНОГО БЕЛКА ГОРДЕИВИРУСА

В.В. Макаров¹, Е.А. Образцова², И.В. Яминский², Н.О. Калинина¹

¹НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского МГУ им. М.В. Ломоносова,

²Физический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова

makarov_vv85@mail.ru

Неструктурный белок 63К гордеивируса полуватентного вируса мятлика (ПЛВМ) формирует невирионные рибонуклеопротеидные (вРНП) комплексы для транспорта вирусного генома в растениях. Согласно предложенной нами модели белок 63К состоит из трех доменов: N-концевого неструктурированного домена (NTD), центрального домена с преимущественно β -структурой (CD), и C-концевого ферментативного (хеликазного) домена. Предполагается, что N-концевая половина белка 63К (мутантный белок N63K), включающая в NTD и CD, выполняет структурную роль при формировании вРНП комплекса.

В настоящей работе свойства доменов, входящих в состав белка N63K, изучены с помощью атомно-силовой микроскопии. Мутантные рекомбинантные белки, соответствующие NTD и CD доменам и белку N63K, экспрессировали в клетках *E. coli*, очищали аффинной хроматографией и диализовали против воды. На Рис. 1 представлены типичные топографические изображения мутантных белков, нанесенных на поверхность слюды из раствора. Изображения получены с помощью атомно-силового микроскопа Nanoscope III в режиме прерывистого контакта зонда с поверхностью образца. Видно, что NTD (Рис. 1а) формирует глобулы высотой $1,5 \pm 0,2$ нм, однако в отдельных случаях наблюдаются частицы как меньшего (от 0,4 нм), так и большего (до 3,8 нм) размера, что свидетельствует о формировании гомо-олигомеров, состоящих из нескольких глобул. CD (Рис. 1б) формирует глобулы (высотой от 1,0 нм до 2,5 нм) и нитевидные структуры со средней высотой $1,7 \pm 0,4$ нм и длиной до 300 нм, часто образующие клубки. Мутантный белок N63K (N-концевая половина белка 63К, включающая NTD и CD) (Рис. 1в) также формирует два типа частиц: глобулы высотой $1,0 \pm 0,2$ нм (в отдельных случаях до 3 нм) и нитевидные структуры высотой $1,2 \pm 0,6$ нм. Причем в большинстве случаев происходит формирование более сложных структур "бусины на нити", состоящих из частиц обоих типов. Данные АСМ соответствуют результатам, полученным нами при

ультрацентрифугировании мутантных белков в градиентах концентрации сахарозы и методом динамического лазерного светорассеяния. Таким образом, очевидно, что CD отвечает за способность N-концевой половины белка 63К к олигомеризации с образованием протяженных нитевидных структур.

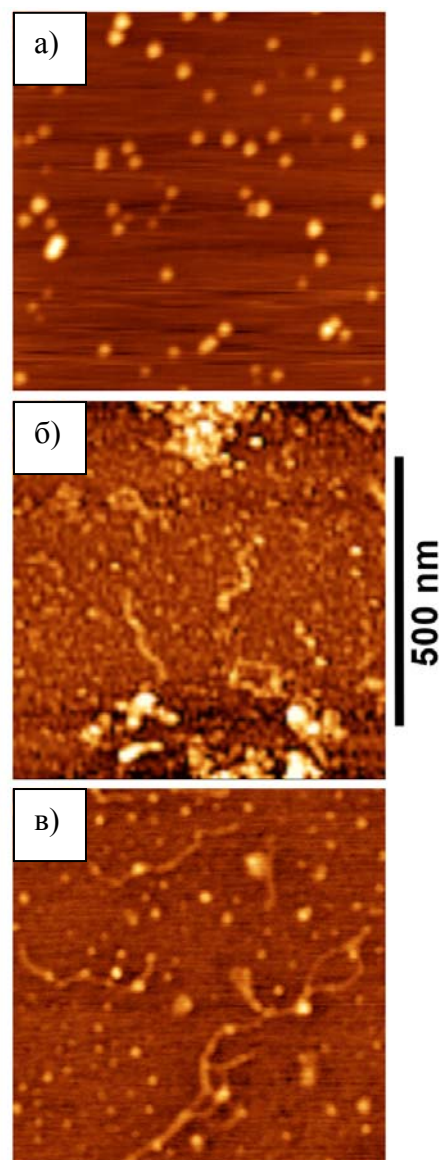


Рис. 1. АСМ изображения белков: а) NTD; б) CD; в) N63K.

АТОМНО–СИЛОВАЯ ИНТЕРФЕРЕНЦИОННАЯ МИКРОСКОПИЯ

Е.А. Меньшиков

МГУ им. М.В. Ломоносова

emenshikov@gmail.com

В последнее время при исследовании материалов все большую популярность приобретает атомно–силовая микроскопия (АСМ). Эта методика позволяет анализировать на атомном уровне поверхности широкого круга материалов: полимерные пленки, кристаллы, биологические микрообъекты и так далее. Измерения можно проводить на воздухе, в атмосфере любого газа и в жидкости.

Наряду с АСМ при исследовании отражающих поверхностей используется интерференционная микроскопия (ИМ), позволяющая изучать микрообъекты прозрачные для излучения видимого оптического диапазона. Одной из тенденций современной интерференционной микроскопии является создание самостоятельных оптических узлов с микрообъективами, реализующими тот или иной вид интерференционной схемы (микрообъектив — интерферометр). Наиболее распространенными являются схемы двулучевых интерферометров Майкельсона, Маха-Цендера, Миро и Линника.

Каждый из вышеупомянутых методов исследования имеет ряд достоинств и недостатков. Так, АСМ позволяет получать изображения с атомным разрешением по горизонтали и вертикали, однако размер кадра обычно составляет около десяти микрон, а время получения изображения составляет несколько минут. Интерференционная микроскопия позволяет получать изображения размером в сотни микрон за короткое время (доли секунды) с нанометровым разрешением по вертикали, однако разрешение по горизонтали в соответствии с критерием Релея не превышает сотни нанометров.

Совмещение принципов интерференционной и атомно–силовой микроскопии в одном приборе дает широкие возможности для исследования материалов. Одним из преимуществ такого “технического синтеза”, является упрощение процесса наведения атомно–силового микроскопа на интересующую исследователя область образца. Так, при изучении динамики роста кристаллов с помощью АСМ, существенную трудность составляет позиционирование зонда в область роста кристалла. Дополнительное использование интерференционного микроскопа позволяет легко наводиться на вершину.



Рис. 1. Интерференционный микроскоп.

Второй областью применения прибора является исследование процессов, происходящих на поверхности образца при деформации изгиба. Исследования такого рода могут быть полезны при разработке и создании кантилеврных биосенсоров, а также при исследовании механики полимеров и процессов (изменение шероховатости, крейзование), происходящих в полимерных пленках при изгибе. При таких совмещенных исследованиях интерференционная микроскопия позволяет измерить величину деформации образца, а атомно–силовая микроскопия — исследовать процессы, происходящие на его поверхности.

Кроме того, совмещение АСМ и ИМ в едином приборе позволяет упростить процесс калибровки сканера АСМ, а также контролировать отклонения кантилевера по интерференционной картине.

Нами было начато создание совмещенного прибора — атомно–силового интерференционного микроскопа. Поданы заявки на получение патента на изобретение. На базе оптического микроскопа МСП-1 создан интерференционный микроскоп (Рис. 1).

МЕТОДИКА ИЗУЧЕНИЯ СИНТЕТИЧЕСКИХ И БИОЛОГИЧЕСКИХ ПОЛИМЕРОВ

Е.А. Меньшиков, А.В. Большакова, И.В. Яминский

МГУ им. М.В. Ломоносова

emenshikov@gmail.com

Изучение биополимеров на данный момент является одной из актуальных задач науки. Наиболее важные биополимеры — ДНК и белки — являются сополимерами, молекулы которых содержат звенья мономеров различного химического состава. Для того, чтобы понять механизмы процессов, происходящих в биополимерах необходимо детально изучить свойства синтетических сополимеров.

Целью данной работы было создание методики, позволяющей наиболее полно изучить процессы микрофазового расслоения в пленках блок-сополимеров: полистирол-полибутадиен-полистирол (СБС) и полистирол-полиметилакрилат-полистирол (СМАС), на основе анализа данных, полученных методами атомно-силовой (АСМ) и просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ).

Исследованы пленки СБС блок-сополимера с массовым содержанием полистирола: 85%, 50%, 30%, а так же СМАС блок-сополимера с массовым содержанием полистирола: 50%, 33%, приготовленные методом прямой адсорбции на слюде, кремнии и графите.

Сканирование пленок СБС блок-сополимеров проводили в контактном режиме. В виду того, что использование контактного режима приводит к изменению морфологии поверхности пленок СМАС блок-сополимера, сканирование проводили в резонансном режиме АСМ. Для обоих режимов АСМ получены оптимальные параметры сканирования, обеспечивающие максимальное контрастирование фаз, обусловленное различием их механических характеристик.

Для количественного описания влияния природы подложек на эффект микрофазового расслоения разработаны и реализованы алгоритмы расчета среднего размера доменов и периода ламеллярной структуры. Использование Фурье-анализа позволило устранить макрорельеф поверхности пленок блок-сополимеров на полученных АСМ изображениях и достичь универсальности применения разработанных алгоритмов.

Таким образом, разработана комплексная методика, позволяющая качественно и коли-

чественно изучить механизмы микрофазового расслоения.

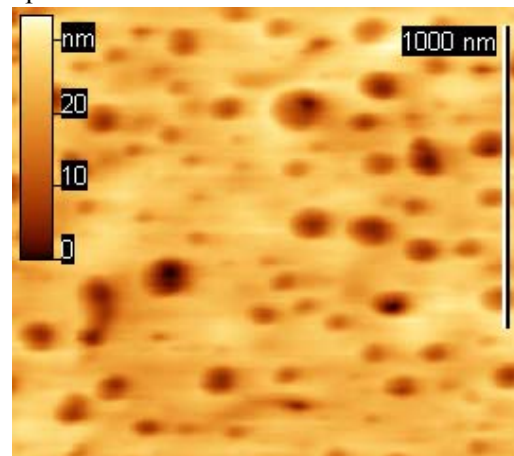


Рис. 1. Изображение доменной структуры пленки СБС (ПС 85%).

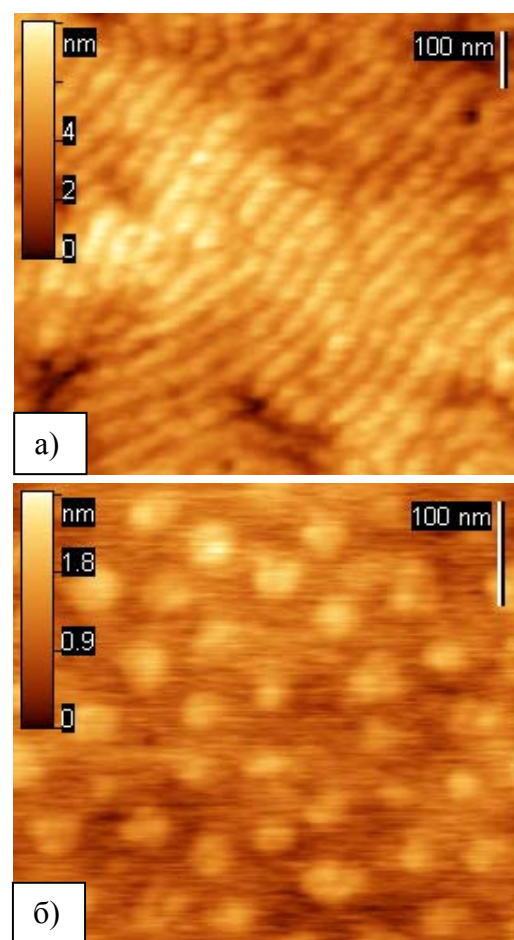


Рис. 2. Изображения а) ламеллярной ([ПС]:[ПМА]=1:1) и б) доменной ([ПС]:[ПМА]=1:2) структуры пленки СМАС.

МЕТОДИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ПРАКТИЧЕСКОГО ОБУЧЕНИЯ ЗОНДОВОЙ МИКРОСКОПИИ

Г.Б. Мешков, И.В. Яминский

МГУ им. М.В. Ломоносова, физический факультет
meshkov@polly.phys.msu.ru

Сканирующая зондовая микроскопия на сегодняшний день является одним из основных методов исследования нанообъектов, и соответственно основным инструментом нанотехнологии. Атомно-силовая микроскопия является наиболее простым для освоения экспериментальным методом. Однако даже в нем существует масса тонкостей, незнание которых может привести к неправильным результатам и к появлению так называемых «артефактов» — то есть результатов, не соответствующих действительности и появившихся вследствие неправильного использования прибора и измерений в некорректных режимах.

Для полного освоения микроскопа необходимо доскональное знание принципов работы микроскопа и представление процессов, происходящих в микроскопе во время сканирования. Однако за годы развития методик измерения в зондовой микроскопии произошел такой прогресс, что сейчас для освоения микроскопа необходимо несколько часов работы, после чего пользователь уже способен получать изображения поверхности. В некоторых микроскопах количество управляющих параметров сведено к минимуму и большинство настроек предустановлены производителем, поэтому пользователь может легко запомнить как изменять параметры для получения изображения. Популярной также является идея «одной кнопки», когда общение пользователя с микроскопом сводится к загрузке образца и нажатию на единственную кнопку «старт». Однако данный подход существенно ограничивает в возможностях опытного экспериментатора на том же приборе. Отсюда возникает задача поэтапного обучения пользователей с повышением уровня сложности без уменьшения возможностей прибора.

При массовом обучении самой простой методике атомно-силовой микроскопии возникает вопрос стоимости расходных материалов, кантилеверов, которые достаточно дороги. При переходе на другие формы зондов полностью меняется механическая конструкция микроскопа, и человек обладающий практическими навыкам сканирования на таком приборе должен учиться заново пере-

ходя на работу обычными зондами. Микроскопы использующие стандартные кантилеверы в большинстве своем очень похожи друг на друга в механической части, и пользователю одного микроскопа достаточно легко освоить модель от другого производителя.

Наиболее сложными объектами для исследования методами зондовой микроскопии, особенно для начинающих пользователей, являются биополимерные объекты. Проблему также представляет раздельность эксперимента. Как правило, образцы создаются специалистами в области молекулярной биологии, а измерениями занимаются специалисты в области зондовой микроскопии. Это связано с тем, что процесс приготовления образцов из различных биополимеров является достаточно сложным.

Методика приготовления образцов представляет трудности еще и по той причине, что необходима уверенность в том, что объект, который мы видим на поверхности и есть искомым исследуемым образцом. Поэтому зондовая микроскопия оперирует в основном поверхностями, на которых исследуемый материал нанесен равномерно по всему образцу.

Разнообразие аспектов методики измерений, которые в отдельности друг от друга бывают не очень важны, но в совокупности являются необходимым условием получения хорошего результата, приводит к тому, что объем знаний экспериментатора, занимающегося исследованиями в области зондовой микроскопии должен быть достаточно велик.

Мы представляем курсы обучения практической зондовой микроскопии, которые своей основной целью предполагают обучение экспериментаторов, в том числе биологов и медиков, практическим навыкам работы на микроскопе и особенностям получения изображений в их специфических областях, а также умению учитывать и устранять влияние измерительного прибора на получаемые данные. Среди возможных курсов обучения выделяются варианты различной длительности и интенсивности.

МЕТОД СВЕРХТОЧНОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ПОЛОЖЕНИЯ ИСТОЧНИКА СВЕТА В ОПТИЧЕСКОЙ МИКРОСКОПИИ

Д.С. Мухин, А.С. Филонов, И.В. Яминский

МГУ им. М.В. Ломоносова, физический факультет

mukhin@polly.phys.msu.ru

Одним из важнейших направлений развития нанотехнологий является разработка новых методов для проведения исследований в социально значимых сферах, таких как биология, медицина и микроэлектроника. В этих областях науки наиболее востребованной является сверхточная оптическая микроскопия. Эта тенденция открывает новую нишу приборостроения, а именно, разработку сверхточных оптических микроскопов.

Существуют различные методы сверхточного определения положения образца в оптике [1–3]. Но они имеют ряд недостатков:

- занимают много времени;
- используют избыточный массив данных;
- достигнутая точность (~20 нм) недостаточна для современных исследований.

В связи с этим необходимо оптимизировать процесс набора данных и увеличивать точность измерений.

В данной работе предлагается новый метод определения положения источника света с высокой точностью. Нами была разработана программа FemtoScan VideoSense и проведены предварительные измерения.

Источник света смещается с помощью пьезокерамики на заданное расстояние. С помощью вебкамеры и программы FemtoScan VideoSense фиксируется изменение положения светового пучка. Затем находится центр

интенсивности по формуле
$$Y_{ц.и.} = \frac{Y_i * I_i}{I_{tot}},$$

где I_i, I_{tot} — суммарная интенсивность ряда и всех пикселей на матрице соответственно, Y_i — ордината i -го ряда, определяется разницей суммарных интенсивностей верхней и нижней полуплоскости относительно первоначального центра интенсивностей $Y_{ц.и.}^*$. Все данные сохраняются в файле для последующей обработки и выводятся в специальном окне в виде графиков.

При смещении источника света графики дают относительное (метод разности интенсивности) и абсолютное (метод центр интенсивности) смещения. С помощью образца с известными размерами можно установить соответствие между пространственными размерами и размерами элемента матрицы камеры для данной оптической системы и

определить расстояние, на которое смещается образец.

В ходе предварительного эксперимента с обычной вебкамерой было зафиксировано смещение источника света на 200 нм (Рис. 1).

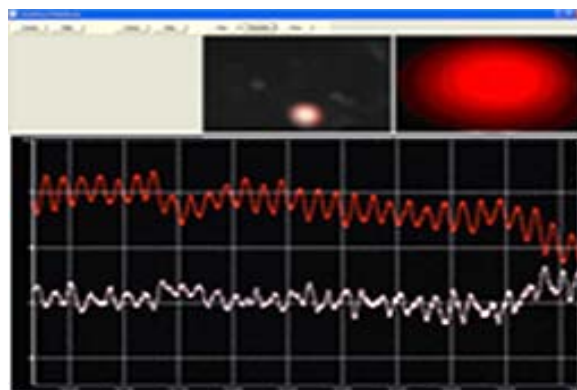


Рис. 1. Интерфейс программы FemtoScan VideoSense. Верхнее левое окно — захваченный камерой источник, верхнее правое окно — обработанное изображение, нижнее окно — график зависимости смещения от времени (красная линия — разность интенсивностей верхней и нижней полуплоскости относительно первоначального центра интенсивности, серая линия — смещение центра интенсивности).

По нашим оценкам, применение разработанного алгоритма и программного обеспечения совместно с совершенным оптическим микроскопом с большей увеличительной силой и качественной камерой позволит определить положения источника света с точностью до 1 нм.

Список литературы:

1. Bates W.M., Huang B., Dempsey G.T., Zhuang X., Science, 317, 1749–1753 (2007).
2. Betzig E., Patterson GH., Lindwasser R.S.O.W., Olenych S., Bonifacino J.S., Science, 313, 1642–1645, (2006).
3. Климов А.А., Климов Д.А., Сборник тезисов Первой Всероссийской Школы-семинара «Современные достижения бионаноскопии». М.: МГУ, 2007.

АНАЛИЗ СТРУКТУРЫ ПОВЕРХНОСТИ ТИМОЦИТОВ КРЫСЫ ПРИ ОКИСЛИТЕЛЬНОМ СТРЕССЕ ПРИ ПОМОЩИ АТОМНО-СИЛОВОЙ МИКРОСКОПИИ

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

Гомельский государственный медицинский университет
nikitsin@tut.by

Тимоциты являются незрелыми предшественниками Т-лимфоцитов, проходящими развитие в тимусе. Цель работы: выявление изменений структуры поверхности тимоцита при окислительном стрессе, вызванном действием пероксинитрита.

Тимоциты выделялись из тимуса половозрелых белых крыс с использованием стандартных методов. Исследования поверхности тимоцитов осуществляли на атомно-силовом микроскопе «НТ-206», для обработки изображений использовали программу SurfaceXplorer (MicroTestMachines, Беларусь).

Для количественной характеристики поверхности использовали параметры шероховатости, широко применяемые при исследовании различных материалов в технике.

В качестве фактора, вызывающего окислительный стресс, использовали пероксинитрит (100 мкмоль/мл). Пероксинитрит (ONOO-) — продукт реакции оксида азота с супероксидным анион-радикалом, вызывающий окислительный стресс клеток. Известно, что ONOO- в малых концентрациях вызывает апоптоз, а при более высоких концентрациях — некроз клеток.

Форма адгезированных тимоцитов куполообразная, для них характерно наличие филоподий (Рис. 1), как правило, собранных в группы. Диаметр тимоцитов составил $5,9 \pm 0,5$ мкм ($n=13$).

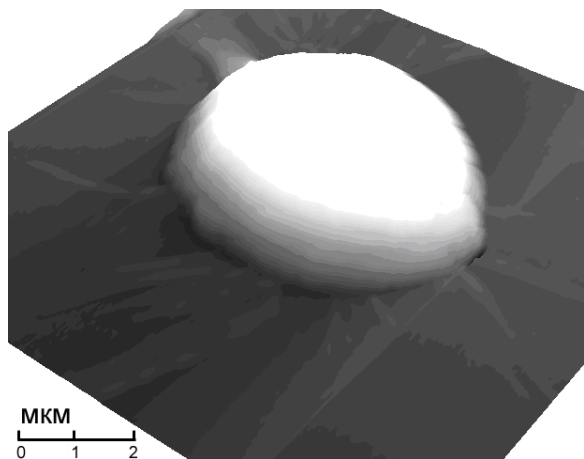


Рис. 1. Топография тимоцита крысы (12×12 мкм²).

Поверхность тимоцитов характеризуется относительно сглаженным рельефом; фрактальная размерность участков поверхности размером 1 мкм² равна $2,63 \pm 0,04$ ($n=58$).

Воздействие пероксинитрита вызвало изменения формы тимоцитов: клетки стали более плоскими (Рис. 2), ламеллоподии исчезли. На поверхности тимоцитов появились кратероподобные образования и инвагинации, наблюдается выброс части содержимого клеток в виде гранул, размер которых составляет 400–700 нм. Число пиков на 1 мкм профиля отражает насыщенность поверхности структурными элементами. При воздействии пероксинитрита число пиков увеличилось более чем в два раза (с $3,1 \pm 0,9$ до $6,8 \pm 1,5$). В режиме вертикальных отклонений консоли при окислительном стрессе выявляется увеличение среднеарифметической шероховатости (с $1,28 \pm 0,36$ до $2,07 \pm 0,48$) и среднеквадратичного отклонения высот (с $1,92 \pm 0,62$ до $2,86 \pm 0,59$).

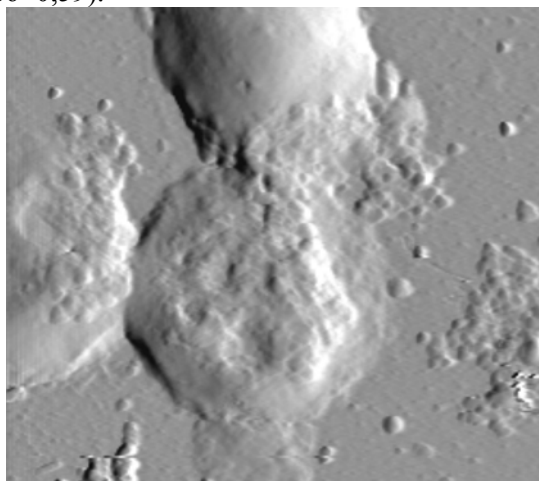


Рис. 2. Тимоциты после воздействия пероксинитрита (карта вертикальных отклонений АСМ консоли, 18×18 мкм²).

Сравнительный АСМ анализ контрольных и обработанных пероксинитритом тимоцитов показал, что окислительный стресс изменяет структуру поверхности данных клеток: подавляет образование филоподий и вызывает гранулирование их поверхности.

Работа частично выполнена за счет гранта БРФФИ (Б07-043).

ИМПЛАНТАНТЫ С ПОКРЫТИЕМ ИЗ ЛИНЕЙНО–ЦЕПОЧЕЧНОГО УГЛЕРОДА В ЧЕЛЮСТНО–ЛИЦЕВОЙ ХИРУРГИИ

В.В. Трубин, В.Д. Кочаков, Н.Д. Новиков

Чувашский государственный университет им. И.Н. Ульянова
kocherishca@mail.ru

Линейно–цепочечный углерод (ЛЦУ) наносился на различные поверхности с целью изучения кроющей способности. Пленки наносились на разные материалы. В качестве примера на Рис. 1 и 2 показаны топологии поверхностей олова и титана, покрытых пленкой ЛЦУ.

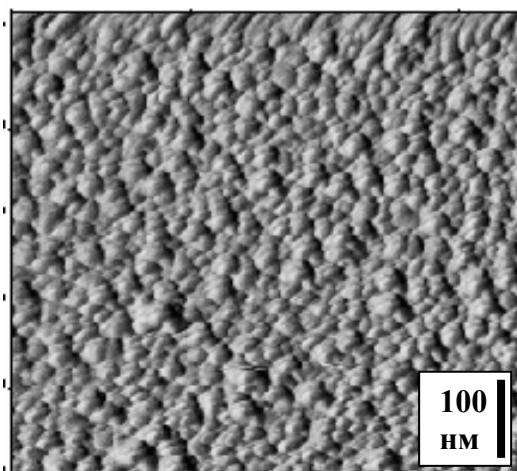


Рис. 1. Поверхность олова, покрытая ЛЦУ.

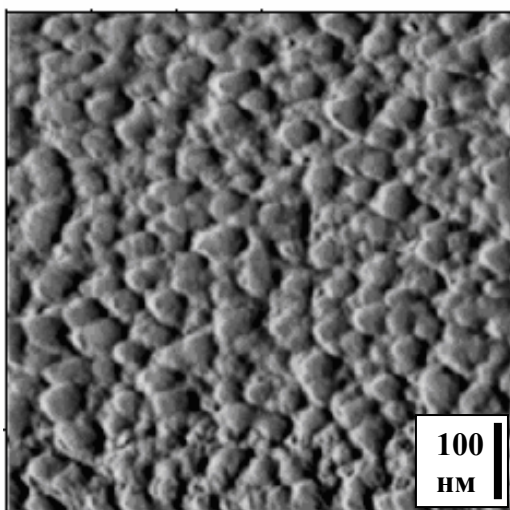


Рис. 2. Поверхность титана, покрытая ЛЦУ.

Топографию поверхности исследовали на сканирующем микроскопе Femtoscan в атомно-силовом режиме. Исследования показали, что линейно-цепочечный углерод при толщинах от 10 Å до 1500 Å покрывает поверхность без нарушения сплошности.

Биомедицинские эксперименты с использованием ЛЦУ показали прекрасную совместимость с кровью. На Рис. 3 показан

сравнительный анализ свертываемости крови на поверхности различных материалов. Из рисунка видно, что покрытие ЛЦУ придает исключительную тромборезистентность (превосходит полистерин, являющийся до настоящего времени лучшим по этим показателям) и позволяет улучшить биосовместимость медицинских имплантатов и устройств, уменьшает риск образования тромбов и отторжения имплантата.

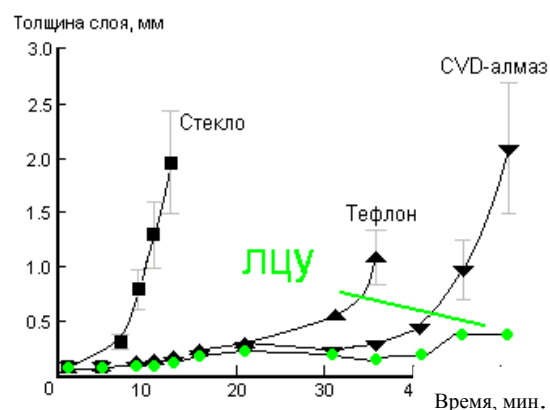


Рис. 3. Скорость свертывание крови на различных материалах.

Имплантаты, покрытые ЛЦУ, были опробованы на биосовместимость на крысах и дали положительные результаты, что показано на Рис. 4.



Рис. 4. Металлический винт, покрытый пленкой ЛЦУ, в челюсти крысы.

Результаты внедрения различных материалов с пленкой ЛЦУ в качестве имплантантов представлены на Рис. 5,6.



Рис. 5. Образец из нержавеющей стали.



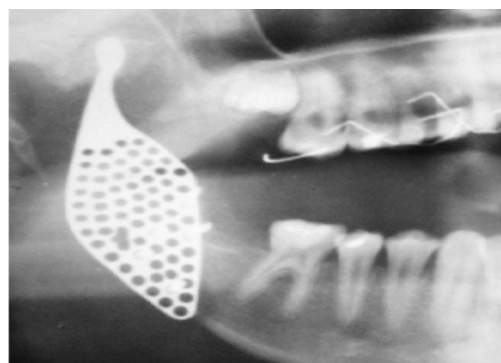
Рис. 6. Образец из полимера.

Многолетние исследования дали положительные результаты и стали основанием для практического применения пленок ЛЦУ для эндопротезирования.

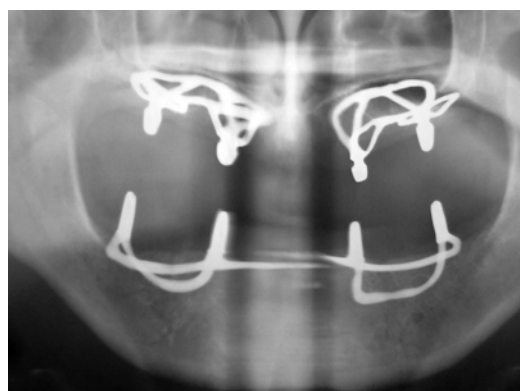
На Рис. 7 представлены образцы имплантантов покрытых пленкой ЛЦУ, которые были использованы в медицинской практике.



Рис. 7. Имплантанты, покрытые пленкой ЛЦУ.



а)



б)

Рис. 8. Результаты операций с применением имплантантов, покрытых ЛЦУ.

На Рис. 8а показано височно-нижнечелюстное эндопротезирование. На Рис. 8б показано восстановление окклюзии (прикуса), которое производится компенсирующим методом зубной имплантации.

АНАЛИЗ ДЕЙСТВИЯ ОДНОСТЕННЫХ УГЛЕРОДНЫХ НАНОТРУБОК НА БАКТЕРИАЛЬНЫЕ КЛЕТКИ С ПОМОЩЬЮ АТОМНО–СИЛОВОЙ МИКРОСКОПИИ

Е.А. Образцова¹, Е.П. Лукашев², А.П. Зарубина²,
Д.В. Багров¹, И.В. Яминский¹

МГУ им. М.В. Ломоносова, ¹физический факультет, ²биологический факультет

E-mail: kobr@polly.phys.msu.ru

Повышенное внимание к взаимодействию наночастиц с биологическими объектами в последние годы вызвано перспективой широкого применения нанобъектов в продуктах массового и промышленного потребления. Однако действие наноматериалов на биологические системы, организмы, в том числе и человека, недостаточно изучено. Результаты исследований, проводимых во многих лабораториях, во многом противоречат друг другу.

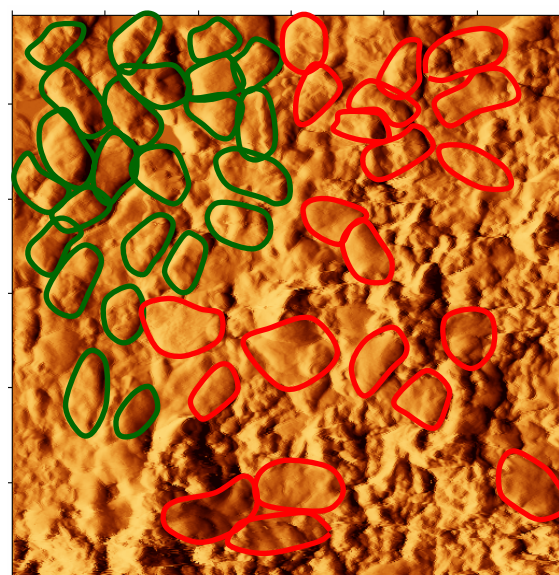
Данная работа посвящена изучению действия одного из наиболее перспективных углеродных наноматериалов — одностенных углеродных нанотрубок (ОУНТ) на клетки генно-инженерного штамма *Escherichia coli* K12 TGI, имеющего светящийся фенотип, обеспеченный клонированием в него *lux*-оперона из природных люминесцентных морских бактерий *Photobacterium leiognathi*. Этот штамм в настоящее время широко используется в России в качестве биосенсора тест-системы «Эколюм» для экспресс-оценки токсичности различных химических веществ, их смесей и физических факторов.

Нами изучены выживаемость и изменение морфологии бактериальных клеток в динамике действия ОУНТ (в течение 8–ми суток) с помощью атомно–силовой микроскопии (АСМ). Популяция исходной суспензии бактерий была достаточно гетерогенна по размерам и морфологии и содержала около 90% морфологически полноценных клеток.

Смеси водных суспензий ОУНТ и бактерий, используемых в различных концентрациях, были проанализированы методом АСМ. Образцы для АСМ были приготовлены путем нанесения их в объеме 3–5 мкл на поверхность пластинки слюды.

Исследование методом АСМ показало, что действие ОУНТ приводит к практически полному разрушению бактериальных клеток в области непосредственного их контакта, что хорошо видно на Рис. 1. В области, свободной от нанотрубок, клетки имеют характерную для бактерий форму, их высота составляет 250 ± 50 нм. Клетки бактерий, находящиеся в области, покрытой ОУНТ, значи-

тельно уплощены, отличаются размерами латеральных поверхностей, их высота не превышает 70 нм, что, возможно, связано с их гибелью при разрушении бактериальной клеточной стенки и нарушении мембраны под действием ОУНТ.



4 мкм

Рис. 1. АСМ изображение образца ОУНТ с бактериальными клетками *Escherichia coli* K12 TGI.

В представленной на Рис. 1 области наблюдается неравномерное покрытие поверхности углеродными нанотрубками, вследствие чего часть бактерий не имеет непосредственного контакта с ними. Зеленым цветом обозначены бактериальные клетки, не имеющие непосредственного контакта с ОУНТ; красным цветом обозначены бактерии, имеющие непосредственный контакт с ОУНТ и, вследствие этого, разрушенные.

Таким образом, в работе выявлено, что непосредственный контакт одностенных углеродных нанотрубок с бактериальными клетками *Escherichia coli* K12 TGI приводит к их гибели, вызванной, очевидно, механическим нарушением клеточной стенки и мембраны.

ЛОКАЛИЗАЦИЯ ЦИТОПЛАЗМАТИЧЕСКИХ ДОМЕНОВ ЧЕЛОВЕЧЕСКОГО КАНАЛА Kv2.1

А.В. Пищальникова, О.С. Соколова

МГУ им. М.В. Ломоносова

bionastya@gmail.com

Калиевые потенциал-зависимые каналы (K_v) играют важную роль в генерации электрических импульсов и регуляции мембранного потенциала.

Все K_v каналы имеют сходную структуру, но размер цитоплазматического участка может сильно варьироваться. Строение этого участка представляет интерес в связи с участием их N- и C-концов в регулировании активности каналов [1].

Человеческий потенциал-зависимый калиевый канал $K_v2.1$ имеет очень большой C-конец. Недавно было предположено наличие в его составе нескольких доменов (СТА и K_v2) [3].

Цель работы состояла в локализации C-концевых цитоплазматических доменов канала $K_v2.1$. Изучение каналов производилось методом электронной микроскопии отдельных белковых молекул, окрашенных ацетатом урана. Отбор изображений отдельных одиночных каналов для построения 3D структуры проводился с помощью программы Signature [4] (Рис. 1).

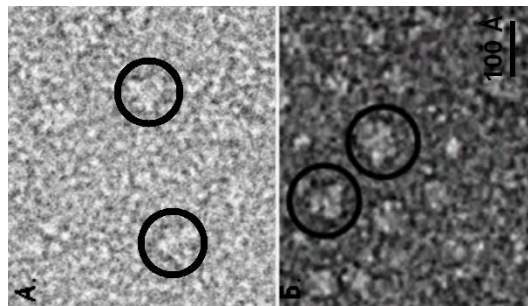


Рис. 1. Электронные микрофотографии негативно окрашенных белков каналов $K_v2.1\Delta C$ (слева) и $K_v2.1\Delta CTA$ (справа). Некоторые каналы выделены.

С помощью компьютерной программы IMAGIC были получены трехмерные реконструкции каналов [3] (Рис. 2). Показано, что каналы имеют доменную организацию (Рис. 3).

Для определения локализации удаленных цитоплазматических доменов трехмерные структуры каналов $K_v2.1\Delta C$ и $K_v2.1\Delta CTA$ и известная структура $K_v2.1$

[4] были сравнены между собой. Структуры были выровнены относительно общего центра масс, и было рассчитано разностное изображение между $K_v2.1\Delta C$ и $K_v2.1\Delta CTA$, которое выявило локализацию доменов K_v2 . Путем сравнения структуры каналов $K_v2.1$ и $K_v2.1\Delta C$ была подтверждена локализация домена СТА (Рис. 3).

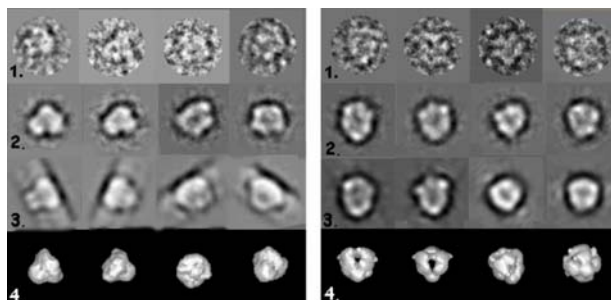


Рис. 2. Процесс обработки изображений каналов $K_v2.1\Delta C$ (слева) и $K_v2.1\Delta CTA$ (справа): 1. выровненные изображения каналов; 2. классы; 3. репроекции; 4. 3D-структура каналов.

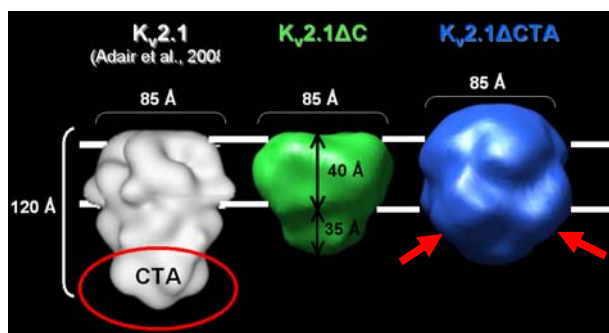


Рис. 3. Сравнение структур каналов $K_v2.1$, $K_v2.1\Delta C$ и $K_v2.1\Delta CTA$. Красным овалом показано гипотетическое расположение домена СТА; стрелки указывают на расположение доменов K_v2 .

Список литературы:

1. Kobrinsky E, J Biol Chem 281(28):19233-40 (2006).
2. Ju M et al, J Biol Chem 278(15):12769-78. (2003)
3. VanHeel, M et al., J Struct Biol 116: 17-24 (1996).
4. Adair B, et al. Biophys J 94(6):2106-14 (2008)

АНТИСЕПТИКА БЕЛКОВЫХ ПЛЕНОК НА НАНОМАСШТАБАХ

И.А. Рогов¹, Т.Н. Данильчук¹, Г.Б. Мешков², И.В. Яминский²,
Н.В. Михеева¹, Л.С. Кузнецова¹

¹ *Московский государственный университет прикладной биотехнологии*

² *МГУ им. М.В.Ломоносова, физический факультет*

iar@msaab.ru

Исследование свойств биополимеров, таких как белковые молекулы, РНК и ДНК, является одной из основных задач молекулярной биологии и представляет интерес для решения различных прикладных задач. Иногда зондовая микроскопия является единственным неразрушающим методом исследования структуры объектов, не требующим модификации исследуемого материала. Этот метод позволяет на нанометровых масштабах проводить измерения частиц, не регистрируемых другими методами, к примеру, светорассеянием.

С использованием метода зондовой микроскопии можно изучать структуру различных природных объектов (срезы тканей, части организмов) и структуру органических полимерных материалов, используемых в пищевой промышленности (белковые оболочки для колбасных изделий, в том числе модифицированные различными антисептиками). Влияние различных антимикробных реагентов на структуру белковых пленок и покрытий до сих пор недостаточно изучено, что связано в основном со сложностью исследования указанных объектов. Основными методами исследования являются оптическая и электронная микроскопии. Однако эти методы не дают точной информации о профиле поверхности и не позволяют изучать объекты с высоким разрешением (вплоть до 1 нм).

Интересной темой является вопрос о влиянии шероховатости поверхности на рост бактерий и на средство поверхности к живым тканям. На настоящий момент этот вопрос остается окончательно не разрешенным, однако есть данные, показывающие, что на поверхностях, обладающих большей макроскопической шероховатостью, бактерии лучше размножаются. Кроме того, инородные тела с шероховатой поверхностью лучше приживаются в тканях живых организмов.

В докладе представлены сравнительные результаты микроскопических исследований образцов белковой колбасной оболочки, обработанных различными антимикробными реагентами. Рассмотрен вопрос об эффективности подобной обработки с точки зрения размножения вредных бактерий при дли-

тельном хранении пищевых изделий, производимых в таких оболочках; обсуждается вопрос о связи шероховатости поверхности оболочки на наномасштабах с эффективностью антисептической обработки. Приводится обзор последних экспериментальных исследований в этой области.

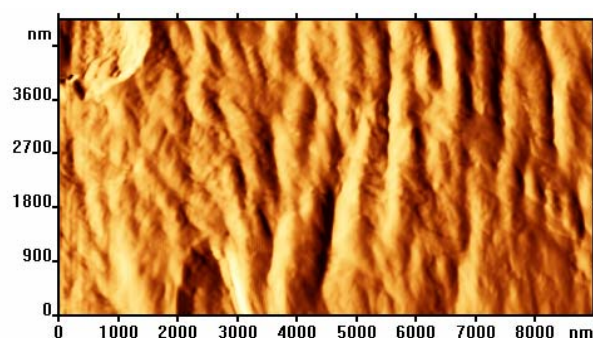


Рис. 1. Изображение поверхности белковой оболочки до обработки антисептиком. Среднеквадратичная шероховатость поверхности по площади $5 \times 10 \text{ мкм}^2$ составила 70 - 80 нм.

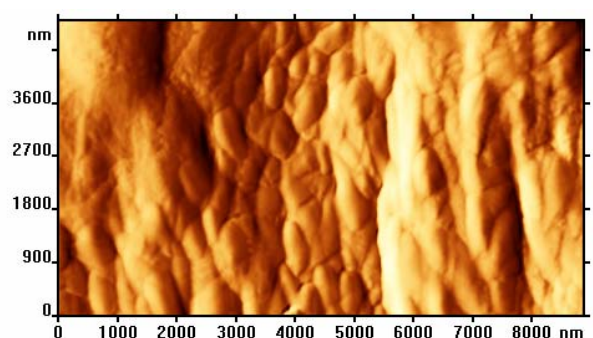


Рис. 2. Изображение поверхности белковой оболочки после обработки антисептиком. Среднеквадратичная шероховатость поверхности по площади $5 \times 10 \text{ мкм}^2$ составила 100 - 120 нм.

Измерения проводились на сканирующем зондовом микроскопе FemtoScan (Центр перспективных технологий, Россия) в режиме контактной атомно-силовой микроскопии, использовался кантилевер frC11S (НИИФП, Россия).

ПРЕДСТАВЛЯЮТ ЛИ УГЛЕРОДНЫЕ НАНОТРУБКИ РЕАЛЬНУЮ УГРОЗУ ДЛЯ ЗДОРОВЬЯ?

О.В. Синицына

*Институт элементоорганических соединений им. А.Н. Несмеянова
sinitsyna@gmail.com*

Потенциальная сфера применения углеродных нанотрубок (УНТ) чрезвычайно широка. Предполагается использовать УНТ для создания дисплеев, микросхем, прозрачных проводящих пленок, сверхпрочных композитов. В ряде исследований указывается на возможность применения УНТ в медицине [1, 2]. К химически модифицированным УНТ могут быть присоединены различные биологически активные молекулы, такие как пептиды, белки, аминокислоты. Благодаря уникальной способности УНТ проникать сквозь мембраны внутрь клеток, не повреждая их, нанотрубки могут быть использованы для доставки лекарственных средств к месту действия. УНТ, функционализированные аминогруппами, способны образовывать комплексы с ДНК. Доставка ДНК в ядра клеток при помощи УНТ может быть перспективна в генной терапии. УНТ способны повышать скорость регенерации костной ткани [3].

До начала крупномасштабного использования УНТ требуется ответить на вопрос: представляют ли они реальную угрозу для здоровья потенциальных потребителей?

Предполагается, что УНТ могут проникать внутрь клеток как посредством эндоцитоза, так и напрямую через клеточные мембраны [1, 4]. В работе [4] одностенные УНТ были обнаружены внутри клеточных ядер. Токсичность УНТ показана для ряда клеточных культур. Накопление УНТ в клетках замедляет их рост, а затем приводит к их гибели. В экспериментах со стволовыми клетками эмбрионов мышей воздействие многостенных УНТ привело к повышению частоты мутаций [5]. В клетках наблюдалось увеличение количества свободных радикалов, что, по мнению авторов, явилось причиной повреждения ДНК.

УНТ могут попадать в организм человека в результате контакта с кожей или в виде пыли через органы дыхания. В опыте с мышами показано, что, попадая в легкие, УНТ становятся причиной образования гранул [6]. УНТ являются также токсичными для кожи [7]. Нужно учитывать, что токсичность образцов УНТ зависит от наличия в их составе частиц катализатора или сажи, микроструктуры нанотрубок, степени дисперсности об-

разцов (при синтезе образуются прочные агрегаты УНТ, например, см. Рис. 1).

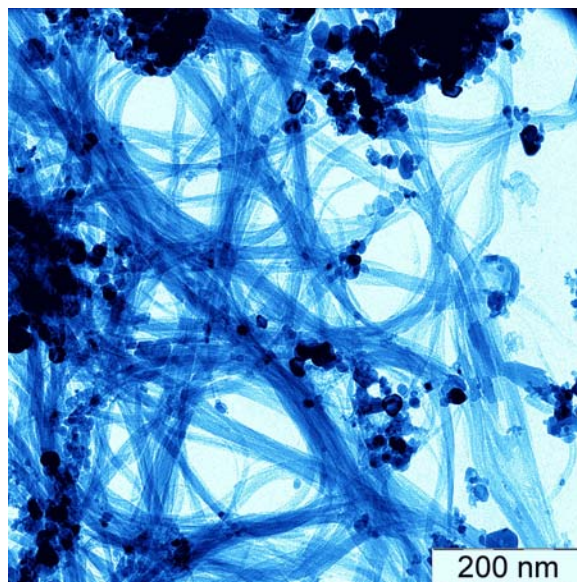


Рис. 1. Жгуты одностенных углеродных нанотрубок (ООО «Карбонлайт»). Изображение получено методом просвечивающей электронной микроскопии.

В настоящее время многие вопросы о влиянии УНТ на живые организмы остаются открытыми. Результаты немногочисленных исследований в данной области свидетельствуют о возможном значительном риске для здоровья людей, работающих с УНТ.

Список литературы:

1. Bianco A., Kostarelos K., Prato M., Current Opinion in Chemical Biology, 9, 674–679 (2005).
2. Bianco A., Kostarelos K., Partidos Ch.D., Prato M., Chemical Communications, 4, 571–577 (2005).
3. Usui Y., Aoki K., Narita N., et al., Small, 4, 240–246 (2008).
4. Porter A.E., Gass M., Muller K., Skepper J.N., Midgley P.A., Welland M., Nature nanotechnology, 2, 713–717 (2007).
5. Zhu L., Chang D.W., Dai L., Hong Y., Nanoletters, 7(12), 3592–3597 (2007).
6. Lam Ch.-W., James J.T., McCluskey R., Hunter R.L., Toxicological Sciences, 77, 126–134 (2004).
7. Monteiro-Riviere N.A., Inman A.O., Carbon, 44, 1070–1078 (2006).

МОДЕЛИРОВАНИЕ И ТЕСТИРОВАНИЕ ПРИ ПОМОЩИ АТОМНО–СИЛОВОЙ МИКРОСКОПИИ АССАМБЛИРОВАНИЯ C₆₀ И МОЛЕКУЛ ДНК

И.М. Спорыш¹, Е.В. Симонова¹, Е.А. Кисиль¹,
Е.В. Дубровин², Е.А. Образцова²

¹Киевский национальный университет им. Тараса Шевченко,

²МГУ им. М.В. Ломоносова

iryna.sporysh@online.ua

Идея создания новых multifunctional молекул, с использованием новейших синтезированных нанокремниевых материалов, основана на использовании хорошо известных принципов интерфейсной организации биологических макромолекул в живых клетках. Основоположающими в данных системах являются нековалентные взаимодействия: водородные связи, гидрофобные и электростатические взаимодействия. Для конструирования молекул с контролируемой структурой и межмолекулярной организацией были выбраны углеродные фуллерены и отобранные биомолекулы (ДНК, олиго- и мононуклеотиды). Биотехнология проведена в суспензиях и в пленках Ленгмюра–Блоджетта на специальных подложках. Оптическими исследованиями подтверждены предложенные модели для конструирования молекул (использовали спектроскопию поглощения в видимом диапазоне) и их функционализация с контролируемой интенсивной флуоресценцией в видимом диапазоне, а также формирование донорно–акцепторных пар. На АСМ–изображении (полное изображение размером 900 x 900 нм и часть изображения 230 x 330 нм) представлен адсорбированный из водной суспензии и высушенный слой двуспиральной ДНК с фуллеренами C₆₀ и кислородными производными C₆₀ на поверхности слюды, модифицированной NH₃⁺ группами.

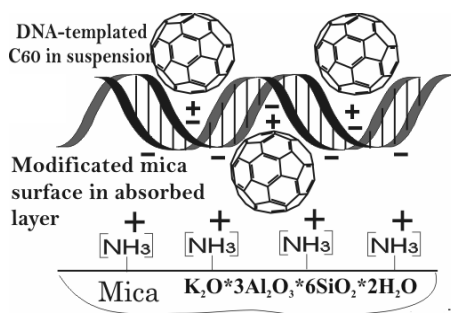


Рис. 1. Структурная модель для интерфейса C₆₀ – ДНК молекулы, основанная на кулоновском взаимодействии между фуллереновыми и нуклеотидными молекулами.

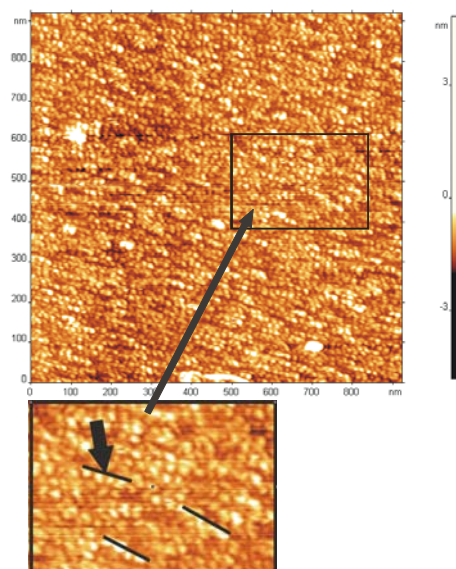


Рис. 2. Изображение пленок Ленгмюра–Блоджетта с C₆₀ и молекулами ДНК, подтверждающее формирование упорядоченных структур, которые соответствуют предложенной модели взаимодействия.

Водные суспензии содержали агрегаты C₆₀ (около 13 молекул C₆₀ с диаметром 9,1 нм) и гель двуспиральной ДНК (λ-формы, 49% G+C и 51% A+T, 48502 пар оснований), в 10 mM Tris–HCl (pH 7,4 при 20°C). На изображении адсорбированного слоя с водной суспензией C₆₀ и ДНК на подложке, модифицированной NH₃⁺ группами, можно четко выделить соединения в виде «мячей». Такие «мячи» содержат агрегаты, сформированные приблизительно 13 молекулами C₆₀ (диаметр агрегатов около 9,1 нм). На изображении 900 x 900 нм можем выделить линию агрегатов общей высотой до 3 нм. На изображениях 200 x 200 нм, можно увидеть линию длиной 100 нм, она выделена на Рис. 2 черной прямой. Высота таких агрегатов составляет 11 нм и объединяет 15 молекул C₆₀. Высота таких агрегатов составляет 4 – 5 нм.

Авторы выражают благодарность профессору И.В. Яминскому и профессору Е.В. Бузаневу за помощь в проведении эксперимента и плодотворную дискуссию.

АТОМНО–СИЛОВАЯ МИКРОСКОПИЯ ВИРУСА МЕНГО

А.Д. Сушко, Ю.Ф. Дрыгин, И.В. Яминский

МГУ им. М.В. Ломоносова

sushko@polly.phys.msu.ru

Вирус Менго относится к семейству Пикорнавирусов (*Picornaviridae*). Вирусы этой группы — одни из самых маленьких известных на сегодняшний день вирусных частиц. Их белковая оболочка представляет собой икосаэдр диаметром около 30 нм, а генетический материал представлен одноцепочечной РНК положительной полярности (т.е. мРНК). Вирус Менго широко используется в различных биологических опытах, в то же время, работы по его атомно–силовой микроскопии нам неизвестны.

Вирус выделяли из культуры лизированных клеток *HeLa*, зараженных вирусом Менго. Сначала их центрифугировали 10 минут со скоростью 6000 об/мин при температуре +4°C на центрифуге Beckman JC-21. При этом в осадок выпадали неразрушенные клетки, крупные органеллы, фрагменты клеточных мембран. Полученный супернатант аккуратно сливали и высаживали вирус ультрацентрифугированием через 30% раствор сахарозы. Для этого готовили 30% раствор сахарозы на TN–буфере (1 М NaCl, 20 mM трис-HCl) и равные объемы суспензии наслаивали в пробирки поверх этого раствора. Затем центрифугировали 4 часа со скоростью 25000 об/мин при температуре +4°C на препаративной ультрацентрифуге Beckman L8, в роторе SW-27. Полученный осадок тщательно суспендировали и разбавляли до нужной концентрации при помощи TNM–буфера с pH 7,8 (10 mM трис-HCl, 50 mM NaCl, 1 mM MgCl₂).

На свежесколотую слюду наносили 15 мкл готового вирусного препарата и оставляли на 15 минут. Затем образцы промывались в капле 60 мкл дистиллированной воды и высушивались в вакуум–эксикаторе.

Сканирование велось на микроскопе Nanoscope 3a в резонансном режиме. Для получения высокоразрешенных изображений мы использовали кантилеверы Нанотьюнинг с радиусом закругления острия 10 нм.

Полученные изображения вируса Менго приведены на Рис. 1а. Средняя высота частиц составила $27,0 \pm 1,5$ нм (соответствующая гистограмма приведена на Рис. 1б).

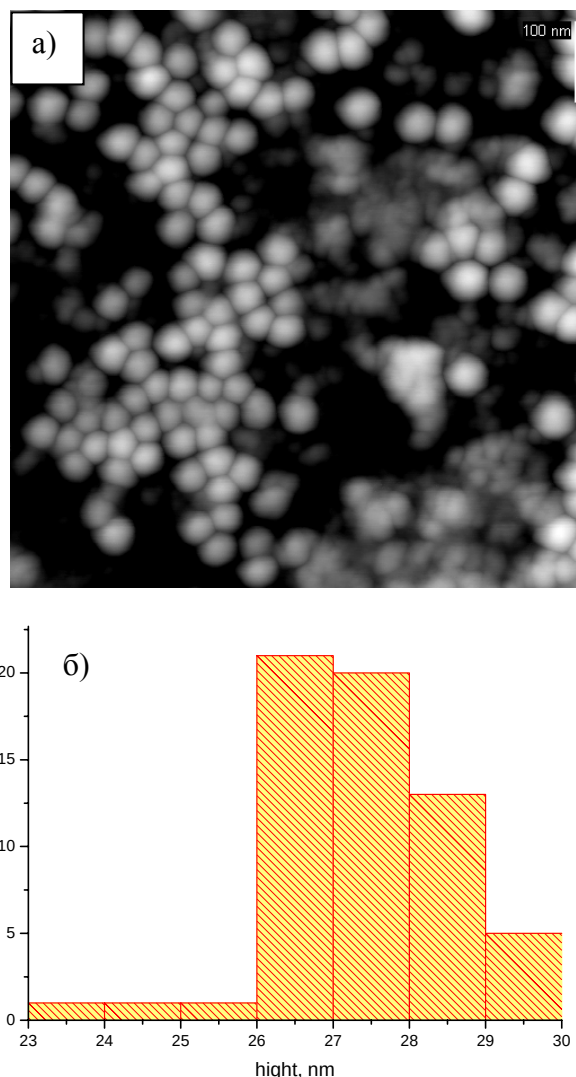


Рис. 1. а) АСМ–изображение вируса Менго; б) распределение частиц по высотам.

Вирус Менго представляет собой икосаэдр. Разумеется, АСМ не позволяет визуализировать форму изолированной частицы: такие частицы выглядят на изображении скорее как шарики. Но, когда частицы агрегируют, образуя монослой на поверхности слюды, сформированная ими пленка, как и сами частицы, имеет определенную симметрию. Как правило, при сорбции на слюду вирус ложится на ее поверхность одной из двадцати граней. При этом его проекция на плоскость представляет собой шестигранник, и вплотную с ним могут расположиться шесть частиц (см. Рис. 2а).

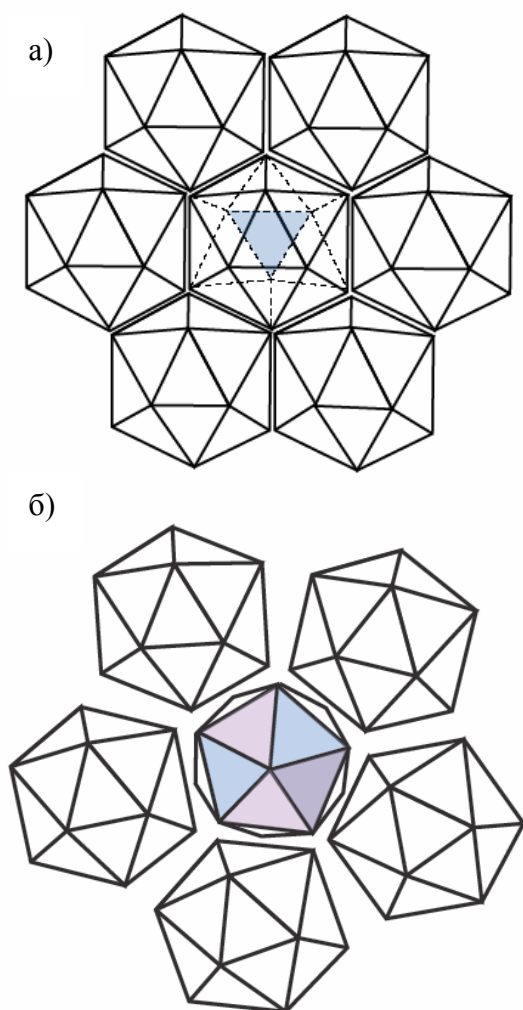


Рис. 2. Варианты расположения вирусных частиц на плоскости.

В соответствии с этим на изображениях мы видим много гексагональных частиц. Обычно весь слой целиком и состоит из них (такая картина наблюдается, например, в случае вируса HRV 2, родственного вирусу Менго). А на образцах вируса Менго мы обнаружили некоторое количество «пентагональных» частиц.

Ранее было высказано предположение, что пентагональные частицы в монослоях икосаэдрических вирусов представляют собой обломки вирусных оболочек. Действительно, связи, удерживающие вместе пентамеры, значительно слабее, чем связи, удерживающие белки внутри каждого из них. Поэтому процесс разрушения оболочки проходит в несколько стадий. Она сначала распадается на четыре пентамера, а затем каждый из них в свою очередь на пять частей. Если бы природа пентагональных частиц на наших образцах была именно такая, то такие частицы

должны бы были быть значительно ниже, чем гексагональные. Это не наблюдается.

Пентагональная частица возникнет, если вирус касается слюды не гранью, а вершиной. В каждой вершине икосаэдра сходятся пять граней и, следовательно, вокруг такой частицы смогут расположиться только пять, а не шесть соседей (Рис. 2б).

Очевидно, что высота вирусных частиц, лежащих различным образом на поверхности, не будет одинакова. Для гексагональной частицы измеряемая высота вируса — это диаметр вписанной в икосаэдр сферы. Пентагональная частица должна быть несколько выше: ее высота — это диаметр описанной сферы. Легко подсчитать, какую разницу в размерах частиц мы должны наблюдать.

Радиус сферы, вписанной в икосаэдр со стороной a :

$$r = \frac{1}{4\sqrt{3}}(3 + \sqrt{5})a$$

Радиус сферы, описанной вокруг икосаэдра со стороной a :

$$R = \frac{1}{4}\sqrt{2(5 + \sqrt{5})}a$$

Разница между ними оказывается сравнительно велика: $\Delta = \frac{R-r}{(R-r)/2} \approx 0,24$ и

должна быть хорошо заметна на АСМ-изображениях. В нашем распоряжении была лишь небольшая статистика, тем не менее, уже на ней эта разница оказалась заметна. В среднем она составила $\Delta = 0,18 \pm 0,07$. То есть в пределах погрешности полученный результат совпадает с теоретическим.

Список литературы:

1. Fields B.N., Knipe D.M., Howley P.M., Fields virology, **vol.1**, 610–630.
2. Tuthill T.J., Rowlands D.J., Killington R.A., Picornavirus entry, Future Virol., **2**, xxx-xxx (2007).
3. Kienberger F., Zhu R., Moser R., Rankl C., Blaas D., Hinterdorfer P., Dynamic force microscopy for imaging of viruses under physiological conditions, Biol. Proced. Online, **6**, 120–128 (2004).

ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ МИКРОЧАСТИЦЫ НА ОСНОВЕ ДИОКСИДА КРЕМНИЯ

З.М. Томова, И.В. Соболева, А.А. Федянин

Кафедра квантовой электроники, физический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова
tomova@nanolab.phys.msu.ru

В последние годы развитие методик изготовления частиц микронного и субмикронного размера, позволяющих получать частицы диоксида кремния различной формы и размера, привело к тому, что стало возможным использовать такого рода объекты для создания материалов с заранее заданными свойствами. Однако прозрачные микросферы диоксида кремния обладают некоторыми недостатками, а именно, они являются оптически пассивными. Известны методы функционализации частиц, при этом на их поверхность наносят слои различных материалов, например, магнетиков или металлов. Покрытие частиц магнитными материалами позволяет использовать такие частицы в качестве основы для микроскопии магнитных свойств различных структур, а при использовании их в оптическом пинцете они открывают возможность исследовать магнитные свойства биологических объектов *in vivo* на микроуровне. Целью данной работы является создание функциональных микрочастиц, обладающих магнитными свойствами, на основе микросфер диоксида кремния.

Для синтеза сфер диоксида кремния использовался метод Штобера [1] при соотношении объемов $\text{Si}(\text{C}_2\text{H}_5\text{O})_4 : \text{NH}_3 : \text{C}_2\text{H}_5\text{OH} : \text{H}_2\text{O}$ как 2,9 : 0,5 : 20 : 20. Через 3 – 5 минут после добавления $\text{Si}(\text{C}_2\text{H}_5\text{O})_4$ раствор начинает мутнеть, что свидетельствует о зарождении частиц диоксида кремния. Полное время синтеза составило 30 минут, после чего каждый образец пятикратно промывался дистиллированной водой. Характеризация полученных микрочастиц проводилась методом динамического светорассеяния, АСМ и СЭМ-микроскопии. На Рис. 1 приведены изображения микросфер, полученные при помощи сканирующего электронного микроскопа. Частицы представляют собой однородные по форме и размеру сферы, средний размер которых составляет 160 нм.

Функционализация частиц диоксида кремния проводилась методом послойного осаждения [2] PDADMAC и наночастиц магнетита. PDADMAC осаждался из водно-солевого раствора, содержащего 0,5M NaCl. Концентрации частиц диоксида кремния (2,5 мг/мл) и PDADMAC (1,1 мг/мл) подобраны

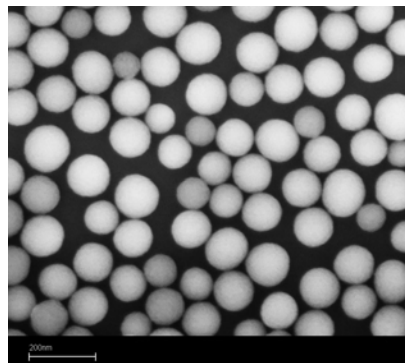


Рис. 1. СЭМ-изображение частиц диоксида кремния, покрытых наночастицами магнетита.

таким образом, что через 10 мин осаждения на частицах образуется монослой полиэлектролита. На частицы, покрытые полиэлектролитом, из водной суспензии осаждались наночастицы Fe_3O_4 размером 20 нм и концентрацией 7,2 мг/мл. Характеризация полученных функциональных частиц проводилась методом динамического светорассеяния. Также получены СЭМ и АСМ-изображения изготовленных композитных частиц $\text{SiO}_2\text{Fe}_3\text{O}_4$ (Рис. 2).

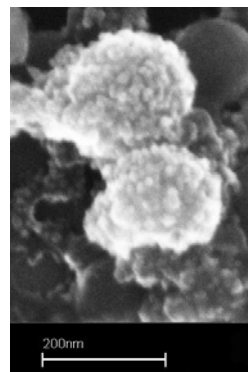


Рис. 2. СЭМ-изображение частиц диоксида кремния, покрытых наночастицами магнетита.

Список литературы:

1. Strober W., Fink A., Bohn E., J. Coll. Int. Sci., 26, 62 (1968).
2. Zhua Y., Daa H., Yang X., Hu Y., Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects, 231, 123 (2003).

ИССЛЕДОВАНИЕ ДНК ВЕГЕТАТИВНЫХ ФОРМ И НАНОФОРМ *M. GALLISEPTICUM* S6 МЕТОДОМ АТОМНО–СИЛОВОЙ МИКРОСКОПИИ

М.В. Трушин^{1,2}, В.М. Чернов¹, О.А. Коновалова²,
Д.С. Налимов², О.А. Чернова¹

¹Казанский институт биохимии и биофизики РАН, ²Казанский госуниверситет
mtrushin@mail.ru

Mycoplasma gallisepticum — патоген, инфицирование которым приводит к существенным экономическим потерям в птицеводстве. В связи с этим, задача разработки методов эффективного контроля данной инфекции представляется особенно актуальной, а знание молекулярных особенностей биологии патогена является необходимым условием для ее решения.

Ранее нами было показано, что при неблагоприятных условиях вегетативные клетки микоплазм могут превращаться в наноформы, характеризующиеся резким сокращением размеров клеток, а также изменением физиологических и биохимических особенностей клеток данных микробов [1]. Кроме того, нами было обнаружено, что патогенность наноформ микоплазм отличается от патогенности у вегетативных клеток [2]. Изменение активности некоторых генов в процессе нанотрансформации вегетативных клеток микоплазм в наноформы обнаружено нами ранее [3].

Цель настоящей работы заключалась в проведении при помощи атомно-силовой микроскопии (АСМ) сравнительного анализа ДНК, выделенной из вегетативных форм и наноформ *M. gallisepticum* S6. Для фиксации молекул ДНК на поверхности субстрата (слюды) был использован буфер, содержащий 5 мМ MgCl₂ и 10 мМ Трис-HCl; концентрация ДНК варьировала от 0,15 до 0,5 нг/мкл. 3 мкл ДНК наносили на поверхность слюды, спустя минуту после нанесения образец дважды промывали бидистиллированной водой и высушивали сжатым воздухом. Исследование образцов ДНК проводили на АСМ Solver Pro (НТ–МДТ, Россия). В работе использовали кантилеверы μpN11S (ЦПТ, Москва, Россия) радиусом ≈ 10 нм. Измерения проводили в полуконтактном режиме на воздухе, для обработки данных использовали программу Nova 1.0.26 RC1 (НТ–МДТ, Россия).

Нами было обнаружено, что ДНК, выделенная из вегетативных форм *M. gallisepticum* S6 и наноформ (Рис. 1) отличается как по топологии, так и по линейным размерам. Ширина и высота молекул ДНК наноформ как минимум в 1,5 раза меньше, чем у ДНК вегетативных форм. Обнаруженный феномен требует дальнейшего исследования, однако уже сейчас можно предполагать, что наблюдаемые изменения экспрессии генов наноформ могут быть связаны, с изменениями линейных размеров молекул ДНК.

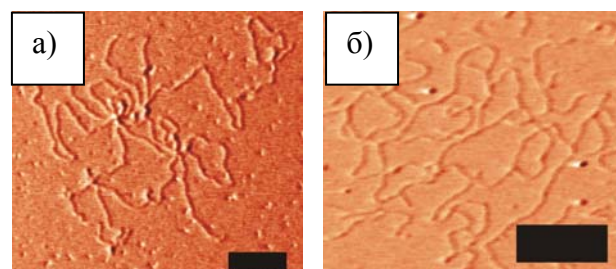


Рис. 1. АСМ-изображение молекул ДНК, экстрагированной из вегетативных форм (а) и наноформ (б) *M. gallisepticum* S6. Исследование проведено в режиме регистрации изменения амплитуды колебаний кантилевера. Отрезок на рисунках соответствует 200 нм.

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 VM, Moukhametshina NE,
3. Gogolev YV, Nesterova TN, Trushin MV, Chernova OA. The Scientific World Journal, 10; 7:1 – 6 (2007).
4. Chernov VM, Moukhametshina NE, Gogolev YuV, Nesterova TN, Trushin MV, Chernova OA. Journal of Rapid Methods and Automation in Microbiology, 14 (4), 369 – 376 (2006).

АТОМНО–СИЛОВАЯ МИКРОСКОПИЯ В БИОЛОГИИ: КТО, ГДЕ И ЧТО ИССЛЕДУЕТ

О.В. Трушина

*Казанский государственный университет
systal@mail.ru*

Появившись более 20 лет назад, атомно–силовой микроскоп в настоящее время стал одним из мощнейших инструментов в современных биологических и медицинских исследованиях [1]. С помощью атомно–силового микроскопа определяют морфологию и тонкие механизмы клеточных взаимодействий, структуру отдельных молекул и биополимеров, решают другие задачи [2–4]. Фактическое количество произведенных атомно–силовых микроскопов составляет уже тысячи, и, как следствие, возрастает количество публикаций, посвященных, в том числе, применению атомно–силового микроскопа в биологии, увеличивается количество патентов, в которых применяется метод атомно–силовой микроскопии [5]. Так, например, резкий рост публикаций по бионаноскопии начался в середине 1990-х годов; к 2005 году количество опубликованных статей увеличилось (по сравнению с 1995 годом) почти в 10 раз и приближалось к 5000, а на апрель 2008 года база данных PubMed на запрос «атомно–силовая микроскопия» выдавала уже более 9500 ссылок: подавляющее большинство работ было посвящено биомедицинской тематике [6]. В связи с этим встает проблема поиска необходимой информации. Накопление информации, к сожалению, препятствует формированию четкого представления о том, кто в современной биологии и с какой целью использует метод атомно–силовой микроскопии. Цель настоящей работы заключается в проведении анализа использования метода атомно–силовой микроскопии в современных биомедицинских исследованиях.

Была исследована выборка около 100 статей, посвященных применению метода атомно–силовой микроскопии в биологии. Определены страны, входящие в десятку наиболее активных «поставщиков» научных результатов с применением метода атомно–силовой микроскопии: из исследуемой выборки около 30% публикаций приходилось на исследователей из США, приблизительно одинаковое количество публикаций (около 10%) приходилось на исследователей из Германии, Франции, Великобритании, Японии и России. Оставшиеся 20% приходились на работы, выполненные в Испании — около 5%, Ки-

тае — около 5%, Канаде, Италии, Бразилии, Швеции, Бельгии и на Тайване (суммарно около 8%), а также в других странах (оставшиеся 3%). Далее был проведен анализ тематик, которыми заняты исследователи из тех или других стран: США — структура и динамика ДНК (штаты Индиана, Калифорния, Техас и Аризона), исследование цитоскелета клеток и эластичности мембран (штаты Теннесси, Нью–Йорк), морфология бактерий (штат Вайоминг), хромосомный анализ (штат Северная Каролина); Бельгия — механические свойства микробных клеток; Испания — исследование морфологии и адгезивных свойств микробов; Япония — динамика взаимодействия нуклеиновых кислот в клетках, наблюдение динамических биомолекулярных процессов; Германия — межклеточные взаимодействия у прокариот и эукариот; Франция — структура ДНК и других биополимеров; Великобритания — мембранные флуктуации клеток человека, Бразилия — атомно–силовая микроскопия в диагностике вирусных инфекций. Вот лишь далеко не полный список стран и тематик проводящихся с помощью метода атомно–силовой микроскопии исследований. Более подробная информация будет представлена на постерной сессии.

Список литературы:

1. Shao Z, Mou J, Czajkowsky DM, Yang J, Yuan JY. *Advances in Physics*, 45, 1 – 86 (1996).
2. Yang J. *Cellular Biochemistry and Biophysics*, 41, 435 – 450 (2004).
3. Jena BP, Horber JKH. *Force Microscopy applications in Biology and Medicine*. John Wiley & Sons, Inc.: Hoboken, New Jersey (2006).
4. Parot P, Dufrene YF, Hinterdorfer P, Le Grimmellec C, Navajas D, Pellequer JL, Scheuring S. *Journal of Molecular Recognition*, 20, 418 – 431 (2007).
5. <http://www.wipo.int/pctdb/en>
6. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez>

ОРГАНИЗАЦИЯ ЛАБОРАТОРНОГО ИНТЕРНЕТ–ПРАКТИКУМА НА БАЗЕ МИКРОСКОПА ФЕМТОСКАН

А.С. Филонов

*ООО НПП «Центр перспективных технологий»,
Химический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова
filonov@nanoscopy.net*

Отличительной особенностью зондового микроскопа ФемтоСкан является уникальное программное обеспечение, позволяющее работать с микроскопом удаленно. Архитектура программного обеспечения, использующая схему клиент-сервер, определяет такую возможность. Даже при работе непосредственно за компьютером, к которому подсоединен микроскоп, все равно происходит обмен данными между сервером и клиентом по протоколу TCP/IP. Все параметры сканирования, все данные передаются по этому протоколу. Поэтому, при переносе клиента — верхней части программного обеспечения, или программы ФемтоСкан Онлайн — на другой компьютер, фактически в схеме работы ничего не меняется.

Следующий шаг в развитии управления прибором через сеть — это одновременное подключение нескольких клиентов к одному серверу. Понятно, что если всем клиентам сразу предоставить возможность управления прибором, то возникнет конфликт в выборе параметров. Чтобы предотвратить это, только один клиент может выступать в роли управляющего микроскопом, а остальные остаются наблюдателями, при этом получая все данные сканирования. Такая схема работы соответствует взаимоотношениям учитель – ученик. Опытный учитель управляет прибором, обучая группу учеников (студентов).

Используя описанные возможности, очень просто организовывать лабораторный практикум для групп студентов, имея в распоряжении всего один прибор. Что замечательно, обучение можно проводить в дистанционном режиме — студенты не обязательно должны находиться в одной аудитории, они могут быть подключены через Интернет из другого здания, города, страны.

Для реализации подобной схемы в программном обеспечении реализован набор инструментов, ориентированных на упрощение и повышение удобства работы в многопользовательской среде, с использованием сети Интернет.

Для общения пользователей между собой имеется встроенный чат, в котором можно наблюдать состояние всех подключенных

пользователей и вести диалог. Как альтернативу можно использовать одну из широко распространенных программ мгновенного обмена сообщениями.

Помимо передачи данных сканирования сервер может осуществлять видеозахват изображения — это может быть оптическое изображение образца или обзорное изображение прибора.

Отсканированные изображения и данные видеозахвата публикуются на встроенном веб-сервере, который можно интегрировать в веб-сайт лаборатории для показа результатов через обычный веб-браузер.



Рис. 1. Галерея изображений на сайте www.nanoscopy.net [1].

Для публикации обработанных изображений реализована специальная функция. Прямо из программы ФемтоСкан Онлайн изображение экспортируется в базу данных MySQL и становится видимым через веб-браузер. Таким образом быстро формируется обширная галерея изображений с результатами сканирования, доступная для просмотра на веб-сайте лаборатории.

Сетевой протокол обмена является открытым и может быть реализован в других приложениях. В частности, сейчас реализован Java-апплет, позволяющий проводить настройку цепи обратной связи [2].

Ссылки:

1. Галерея изображений зондовой микроскопии, <http://www.nanoscopy.net/rus/gallery.php>.
2. Настройка цепи обратной связи, <http://www.nanoscopy.org/Applications.shtml>.

ОСОБЕННОСТИ ПРИГОТОВЛЕНИЯ ОБРАЗЦОВ ПРИ ИЗУЧЕНИИ ИММОБИЛИЗАЦИИ МОЛЕКУЛ ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ НА СЛЮДЕ С ПОМОЩЬЮ АТОМНО–СИЛОВОЙ МИКРОСКОПИИ

Т.И. Шарипов¹, Р.Р. Гарафутдинов², Р.З. Бахтизин¹

¹Башкирский государственный университет,

²Институт биохимии и генетики УНЦ РАН

Sha-T@yandex.ru

Атомно–силовая микроскопия (АСМ) привлекает внимание биофизиков тем, что позволяет реализовать комплексный подход к изучению структурно–функциональных связей биологических объектов, сочетая высокое разрешение нанометрового порядка по нормали с неразрушающим характером исследования.

Вместе с тем, следует указать и на некоторые ограничения применимости методики АСМ: при интерпретации результатов следует учитывать, что латеральное разрешение зависит от исследуемого образца, размера и формы иглы. Также необходимо учитывать недостаточное понимание взаимодействия зонда с образцом и разрабатывать специфичные методы приготовления образцов [1, 2].

Применение методов АСМ позволяет непосредственно визуализировать результаты нанесения и иммобилизации ДНК–зондов (пришитых к поверхности ДНК–чипа молекул олигонуклеотидов с известной последовательностью) на поверхности подложки. После этого возможно повысить плотность и однородность иммобилизованных олигонуклеотидов, а также наблюдать присутствие чужеродных объектов, образование агрегатов. Субмолекулярное разрешение исследуемых молекул может быть достигнуто в случае, если они стабильно прикреплены к поверхности подложки *отдельно* друг от друга.

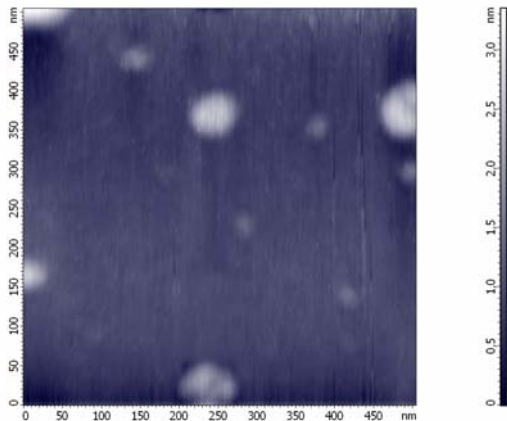


Рис. 1. АСМ-изображение олигонуклеотидов, иммобилизованных на слюде, модифицированной катионами Mn^{2+} .

В работе исследовались два образца, приготовленные различными способами.

В первом случае, на полученном АСМ-изображении (Рис. 1) наблюдаются как отдельные молекулы олигонуклеотидов размерами около 25 – 30 нм, так и объединения нескольких молекул — агрегаты различных размеров (50 – 70 нм).

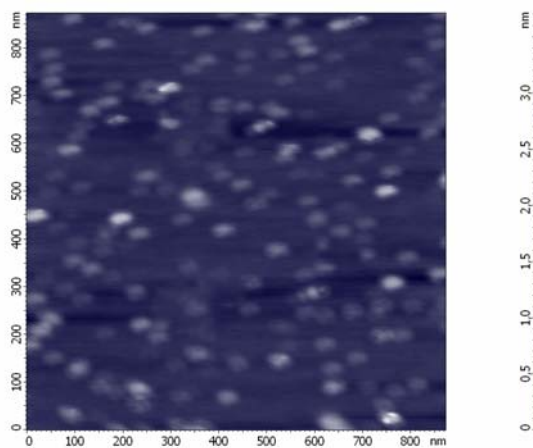


Рис. 2. АСМ-изображение олигонуклеотидов, иммобилизованных на слюде, модифицированной катионами Mn^{2+} и НЕРЕС-КОН буфером.

Во втором случае, на полученном АСМ-изображении (Рис. 2) наблюдаются плотно расположенные, преимущественно одиночные объекты эллипсоидной формы — олигонуклеотиды.

При сравнении АСМ-изображений, приведенных на Рис. 1 и 2 видно, что во втором случае агрегация происходит в гораздо меньшей степени, но сами изображения получаются менее отчетливыми и с большей шероховатостью поверхности.

Работа выполнена при поддержке РФФИ (проект № 08-03-970009-р_поволжье_a).

Список литературы:

1. Muller D.J., Engel A., Amrein M., Biosensors & Bioelectronics, 12. 8, 867 – 877 (1997).
2. Wagner P., FEBS Letters, 430, 112 – 115 (1998).

ИССЛЕДОВАНИЕ ПОЛЯРИЗАЦИОННЫХ СВОЙСТВ ПЛАЗМОННЫХ МЕТАМАТЕРИАЛОВ МЕТОДАМИ ОПТИЧЕСКОЙ СПЕКТРОСКОПИИ И МИКРОСКОПИИ

М.Р.Щербаков, П.П. Вабищевич, А.А. Федянин

Кафедра квантовой электроники, физический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова
shcherbakov@nanolab.phys.msu.ru

Управление распространением света на нанометровых масштабах является одной из важнейших задач современной оптики и лазерной физики. Одним из решений, связанных с обработкой оптического сигнала на субдлинноволновых масштабах, является использование поверхностных плазмонов. Наноструктурирование среды, в которой может возбуждаться такая поверхностная волна, позволяет создавать различные условия распространения и преобразования оптического сигнала. Материалы, имеющие особенности структурирования, сравнимые или меньшие длины волны оптического сигнала, способны оказывать значительное воздействие на состояние проходящего через них света, в том числе, и на состояние поляризации. Такие материалы относятся к классу так называемых метаматериалов [1].

Для изучения оптического отклика плазмонных метаматериалов было изготовлено несколько структур на основе серебряной пленки толщиной 150 нм, нанесенной на подложку из плавленого кварца путем термического напыления. Массив отверстий субдлинноволнового масштаба был нанесен на пленку методом фокусированного ионного пучка.

АСМ-изображение фрагмента одной из структур (Рис. 1) демонстрирует отсутствие у массива отверстий каких-либо симметрий, кроме вращательной симметрии второго порядка. Именно в таких структурах с ярко выраженной анизотропией в плоскости, а также с отсутствующей зеркальной симметрией в плоскости, удалось обнаружить эффекты, связанные с преобразованием поляризации излучения, проходящего через нее.

Микроспектроскопия структуры производилась на оптическом столе в схеме с фокусирующим и дефокусирующим объективами и лампой накаливания в качестве источника света. Сигнал, прошедший через структуру, собирался на апертуре оптического волокна спектрометра так, что пространственная область образца, спектр которой регистрировался, имела площадь $\sim 50 \times 50$ мкм. При этом, как падающее, так и прошедшее излучение анализировалось поляризационной оптикой, и была получена информация о преобразовании поляризации света структурой, а именно об угле поворота плоскости поляризации и деполяризации излучения.

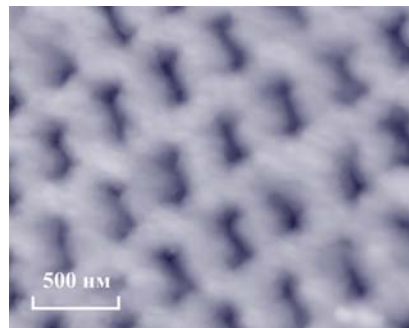


Рис. 1. Фрагмент поверхности образца, полученный методами атомно-силовой микроскопии.

Было обнаружено, что из-за линейного дихроизма, линейного двулучепреломления, а также кругового дихроичного преобразования [2] вращение плоскости поляризации данной структурой достигает 160° , а деполяризация составляет 0,9 (Рис.2).

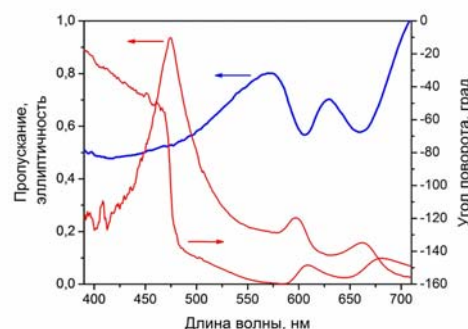


Рис. 2. Преобразование поляризации в планарных метаматериалах. Спектр пропускания обозначен синей кривой, спектры вращения и деполяризации — красными.

Методами оптической микроскопии ближнего поля было показано, что пространственное распределение ближнепольной компоненты оптического отклика структуры существенным образом зависит от направления циркулярной поляризации падающей по нормали волны.

Список литературы:

1. Gordon R., Brolo A.G., McKinnon A., Rajora A., Leathem B., Kavanagh K.L., Phys. Rev. Lett. 92, 037401 (2004).
2. Fedotov V.A., Mladyonov P.L., Prosvirnin S.L., Rogacheva A.V., Chen Y., Zheludev N.I., Phys. Rev. Lett. 97, 167401 (2006).

ПРИМЕНЕНИЕ НАНОЭТАЛОНА ДЛЯ КАЛИБРОВКИ ОПТИЧЕСКИХ И ЗОНДОВЫХ МИКРОСКОПОВ

Д.И. Яминский

МГУ им. М.В. Ломоносова

yaminsky@sinno.ru

Проблема метрологии сейчас является одной из самых важных тем нанотехнологий и наук о материалах. На данный момент не существует точных эталонов для калибровки приборов с разрешением в 1 нм и менее.

Известны следующие калибровочные модели: эталоны на основе атомных ступеней, дислокаций, дефектов. Но из-за сложности их изготовления и нестабильности в реальной метрологии они использоваться не могут.

Для изготовления манипуляторов сканирующих зондовых микроскопов используют поляризованный пьезоэлектрик [1]. Используя данный материал, возможно перемещать объекты с точностью 0,01 нм и выше.

Разрабатываемый калибровочный эталон состоит из пластины, к двум противоположным концам которой подсоединено по одному электроду. На пластину подается напряжение постоянной амплитуды и полярности [2]. Пластина изготовлена из поляризованного пьезоэлектрического материала. По сути дела эталон представляет собой пластинку с периодически изменяемой во времени толщиной. Применение источника напряжения постоянной амплитуды, полярности и частоты позволяют сделать такие типичные погрешности пьезокерамических манипуляторов как гистерезис, крипп (ползучесть) и нелинейность детерминированными и неизменными во времени.

Для проведения калибровки измерительного прибора используется следующий метод. Калибровочный эталон устанавливается в держатель образца. Прибор фиксируется на образце. Далее к пластине калибровочного эталона прикладывается электрическое напряжение постоянной амплитуды и полярности. Под действием электрического напряжения изменяется толщина эталона, которую регистрирует профилометр. Профилометр записывает положение зонда и перемещение образца. Получаемые измерения обусловлены перемещением поверхности эталона под действием приложенного напряжения на заданную величину.

Основные преимущества данного метода, по сравнению с существующими на настоящий момент, заключаются в следующем:

1. низкая погрешность измерений;
2. отсутствие зависимости измерений от величины прикладываемой силы со стороны зонда профилометра;
3. возможность многократного использования эталона. Эталон легко поддается очистке от посторонних примесей и загрязнений. При этом механическое стирание поверхности не приводит к увеличению погрешности калибровки;
4. возможность калибровки профилометра при проведении эксперимента.

Аналогичным образом калибровочный эталон можно использовать для проверки просвечивающих электронных микроскопов, перемещая исследуемый образец на заданное расстояние. Также его можно использовать для калибровки оптических микроскопов сверхвысокого разрешения, работающих за пределами дифракционного уширения.

Список литературы:

1. Allia D., Cecconi C., Nicolini C., A simple method for preparing calibration standards for the three working axes of scanning probe microscope piezo scanners, *Rev. Sci. Instrum.*, 67 (3), 748–751 (1996)
2. Ланин В.А., Старение пьезокерамики системы ЦТС под действием электрических и механических напряжений, автореферат диссертации на соискание ученой степени кандидата технических наук. Томск: СГУПС, 2006.

СОВРЕМЕННЫЕ ДОСТИЖЕНИЯ БИОНАНОСКОПИИ

И.В. Яминский

*МГУ им. М.В. Ломоносова,
физический и химический факультеты,
ООО НПП «Центр перспективных технологий»
yaminsky@nanoscopy.net*

Биологические и медицинские приложения сканирующей зондовой микроскопии являются одними из наиболее увлекательных и одновременно наиболее сложными направлениями исследования наномира. В настоящем докладе приведен обзор данных по исследованию нуклеиновых кислот и их комплексов с белками, росту белковых кристаллов, изучению вирусных частиц и бактериальных клеток. Приведено обсуждение задач атомно-силовой микроскопии в области медицины.

В докладе будет проведена демонстрация галереи изображений различных вирусов и бактериальных клеток.



Рис. 1. Изображение вируса табачной мозаики [1,2] на поверхности свежесколотого графита. Размер кадра 2x2 мкм. Изображение построено с помощью программного обеспечения «ФемтоСкан Онлайн» [3].

Традиционная сканирующая зондовая микроскопия является мощным инструментом трехмерной визуализации нанообъектов живой природы — ДНК, РНК, белков, липополисахаридов, бислойных мембран и их комплексов. Вместе с тем, в настоящее время активно развивается новое направление — бионаноскопия молекулярного узнавания.

Для описания молекулярного узнавания в живых системах активно используется понятие «биоспецифическое взаимодействие», которое, однако, не дает никакого представления о характере взаимодействия между молекулами. Для подробного изучения физики взаимодействия биомолекул необходимо дальнейшее развитие зондовой микроскопии и родственных экспериментальных мето-

дов, а также требуется постановка прецизионных экспериментов по изучению парного взаимодействия между отдельными молекулами заранее известного состава и определенной структуры. Необходимость таких исследований обусловлена потребностями создания искусственных сенсорных систем, по чувствительности и избирательности приближающихся к носу человека и животных. В настоящее время с помощью атомно-силовой микроскопии удается регистрировать силовое взаимодействие между отдельными макромолекулами. Однако остаются нерешенными вопросы невозмущающего закрепления исследуемых молекул на твердой подложке, установления взаимосвязи между регистрируемыми силовыми взаимодействиями и конформационными состояниями макромолекул. Не ясным являются многие вопросы конструирования реальных сенсорных систем, построенных на принципах молекулярного узнавания. Системы обоняния в живой природе существенно превосходят по всем параметрам искусственно создаваемые сенсоры и датчики. В настоящее время нет полного понимания механизма выработки аналитического сигнала молекулярного узнавания в биомолекулярных системах, ответственных за обоняние.

Список литературы:

1. Drygin Yu. F., Bordunova O. A., Gallyamov M. O., Yaminsky I. V., Atomic Force Microscopy Examination of TMV and Virion RNA, FEBS Letters, 425, 217 – 221 (1998).
2. Gallyamov M.O., Drygin Yu.F., Yaminsky I.V., Atomic force microscopy visualization of RNA and ribonucleotides of the tobacco mosaic virus, Surface investigation, 15, 1127 – 1134 (2000).
3. Filonov A.S., Yaminsky I.V., Femto-Scan Scanning Probe Microscopy Image Processing Software User's Manual, M.: Advanced Technologies Center, 2008 - 86.

PROTEIN MISFOLDING: HOW STABLE ARE MISFOLDED DIMERS?

Yuri L. Lyubchenko, Junping Yu, Sarka Malkova, and Luda S. Shlyakhtenko

*Department of Pharmaceutical Sciences,
College of Pharmacy, University of Nebraska Medical Center, Omaha, NE, USA.
ylyubchenko@unmc.edu*

Misfolding and aggregation of proteins is a common theme linking a number of neurodegenerative diseases such as Alzheimer's, Huntington's and Parkinson's. Protein misfolding is the very first link in this long chain of events eventually leading to neurodegeneration. Therefore, availability of methods capable of detecting the disease prone protein conformations facilitates the development of novel tools for diagnostic and treating the diseases at the very early stages of development.

The structure of individual protein molecules within well ordered aggregates can be partially elucidated by traditional structural techniques, including X-ray crystallography, NMR, circular dichroism, fluorescence and IR spectroscopies. However, none of these techniques is fully capable of sensing the misfolded conformation of the protein prior to aggregation. Apparently, the conformation of misfolded protein preceding aggregation differs from that in aggregates, but to what extent it is being different is not clear. High-resolution methods such as x-ray crystallography, NMR, electron microscopy, and atomic force microscopy (AFM) have provided useful data regarding the secondary structure of proteins in nano-assemblies and the morphologies of self-assembled aggregates. However, we still lack of a mechanistic understanding of the process leading to the misfolded conformations of a protein. To address this question, we need to utilize new techniques capable of probing transient conformations of single protein molecules.

Our central hypothesis is that the transitions of proteins in misfolded states are characterized by elevated interprotein interactions that can be detected by AFM force spectroscopy approach. We developed nanoprobng approach for detection and analyses of transient states based on the fact that misfolded protein conformations differ from folded and other protein conformations by their increased propensity to interact with each other.

This presentation summarizes our results on the development nanoimaging based approaches for detection and analysis of protein misfolding states tested on a number of proteins and illustrated by α -synuclein misfolding studies. We used AFM force spectroscopy operating in the single molecule mode to measure for the first time the stability of the α -synuclein dimer, the very first step of the protein aggregation process. The enormously high stability of the misfolded dimer is unexpected finding that provides sheds a new light into the mechanisms of the self-assembly of misfolded proteins into the disease related aggregates.

THE NANOMECHANICAL CANTILEVER SENSORS WITH INTEGRATED OPTICAL READ-OUT

K.E. Zinoviev, L.M. Lechuga, J.A. Plaza, V. Cadarso, C. Dominguez
Nacional Centre for Microelectronics (IMB-CSIC), campus UAB, Barcelona, Spain
kirill.zinoviev@cnm.es

Ultra-thin microcantilevers produced by standard silicon technologies possess low spring constants and are widely used as high sensitivity transducers for sensing applications. The cantilever deflection caused by any kind of biochemical reaction occurring on one cantilever surface can be detected with subangstrom resolution if an appropriate detection system is employed. Since a few years ago the sensing mechanism has become widely used also in biological research.

For the readout of the nanomechanical response of the micro beams to bio-specific interactions produced on one side of the cantilevers usually a technique similar to the AFM is employed. For an instrument working with this technique the chips with arrays of 340 nm thick and 200 μm long silicon cantilevers metallised with gold were fabricated using standard microelectronics technologies. The cantilevers are separated by 250 μm distance. Each cantilever is located in it's own cavity with vertical walls going through the chip. This was specified with the purpose of obtaining a multichannel microfluidic system which would permit addressing each cantilever with a different reagent. A photograph of a chip containing an array of 20 cantilevers is presented in the Fig. 1.

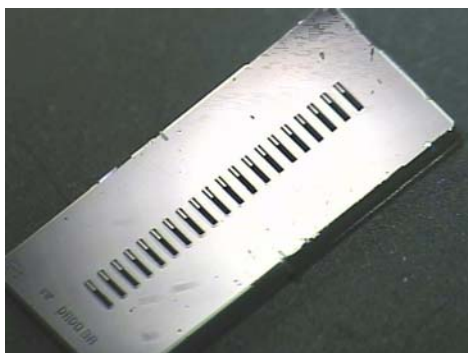


Fig. 1. The photograph of the chip with an array of 20 silicon cantilevers.

The optical read-out method has some disadvantages, such as low degree of integration and difficulties of adjustment in work with arrays of cantilevers.

In this work we will discuss a couple of alternative methods developed for the cantilever displacement detection. We will present

advantages of these methods and the problems associated with integration and encapsulation of the chips.

The first method consists in measuring the excitation efficiency of an optical waveguide cantilever on a diffraction grating. Registering the coupling efficiency one can accurately detect the changes in the incidence angle of the excitation light beam. This phenomenon was applied to detect ultra small deflections of silicon dioxide cantilevers with a diffraction grating with submicron period fabricated on top of it. Power of light coupled into the cantilevers was monitored with a conventional photodetector. Using a stimulated mechanical oscillation of 500 nm thick silicon dioxide cantilevers we have measured the coupled light intensity as a function of the cantilever deflection.

Another technique is based on a device where the cantilever itself is an optical waveguide butt coupled with another one. The device is fabricated as an array of waveguide cantilever channels which allows for higher integration level. The schematic of the design is shown in Fig. 2. The cantilevers are 500 nm thick and 200 μm long and possess the spring constant comparable to the one of silicon cantilevers with half of that thickness.

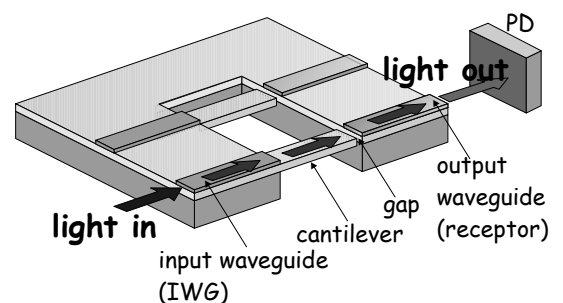


Fig. 2. Schematic drawing of the optical waveguide cantilever sensor.

The analysis of the capabilities of the device, the problems associated with the design and the fabrication of the device, the choice of the material and the technology for the fabrication of very flat cantilevers have been successfully addressed. The characterization of the device was done, showing that the resolution of the device is comparable with the one of the optical lever read-out technique.

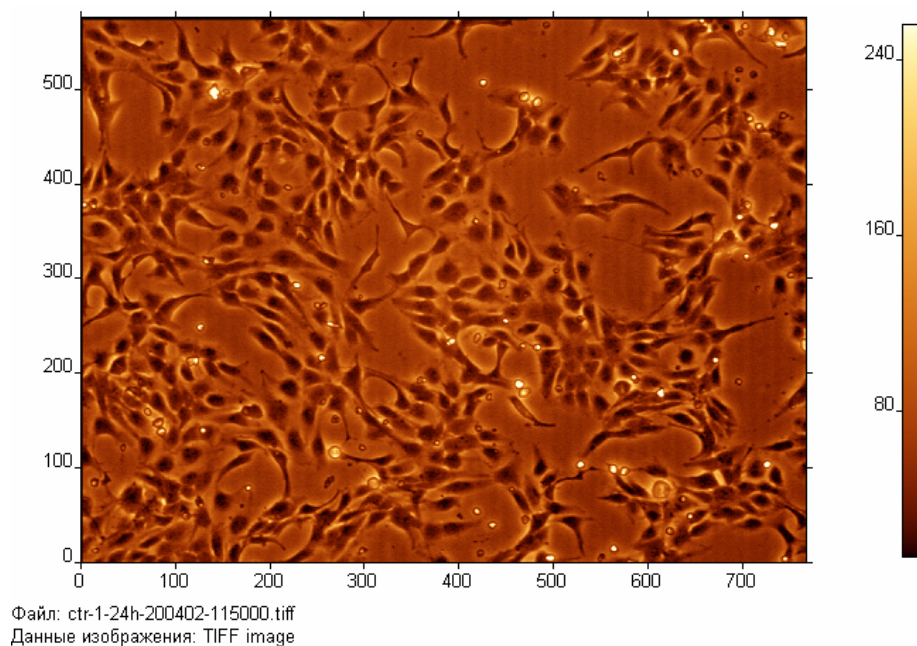
Конкурс изображений

BioImage

Будник Оксана Петровна

*Международный центр «Институт прикладной оптики» НАНУ
Инвертирующий микроскоп*

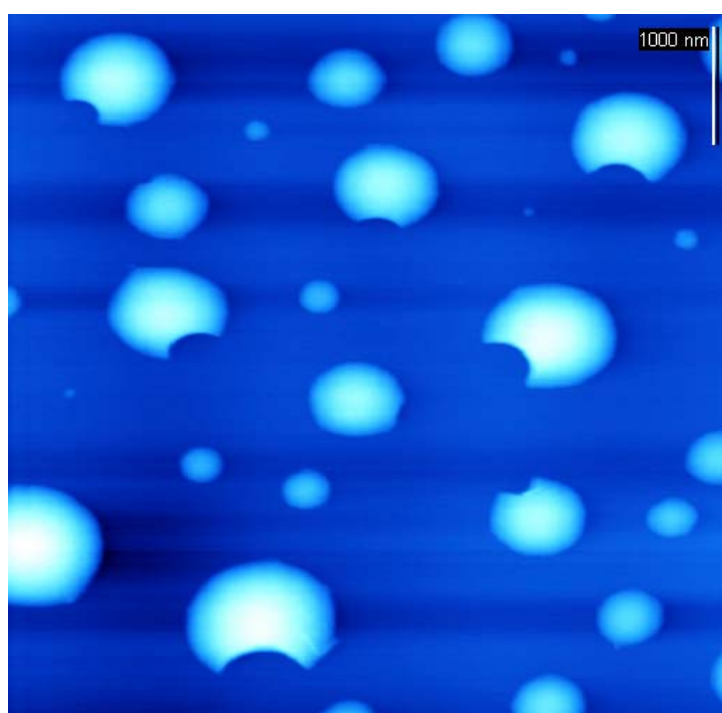
На изображении представлены нейроны животного происхождения GT1-7 на пластиковой подложке.



Горелкин Петр Владимирович

ООО «Академия биосенсоров», г. Москва

Микроскоп: FemtoScan

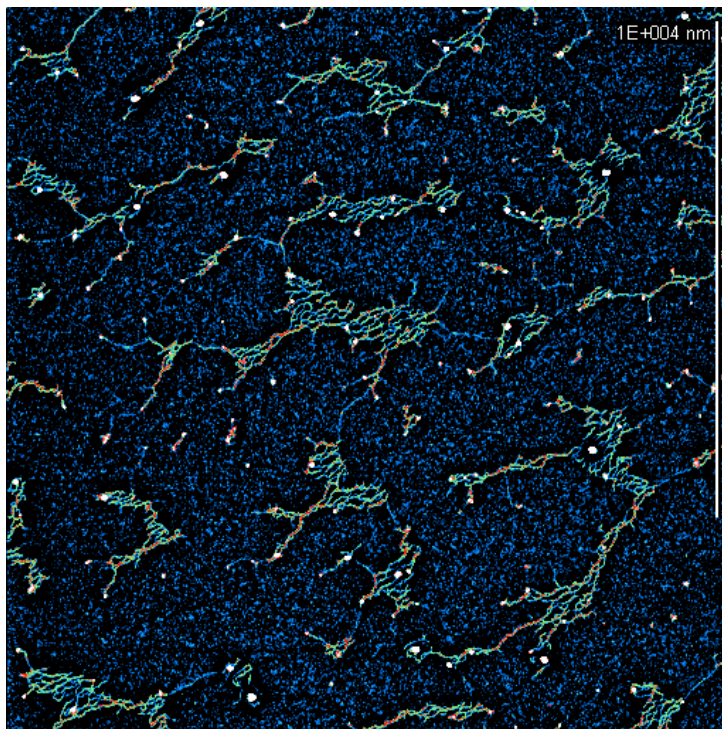


Раствор липосом капнули на слюду и открутили с помощью спинкоутинка. При получении изображения использован кантилевер Veeco NP-S1.

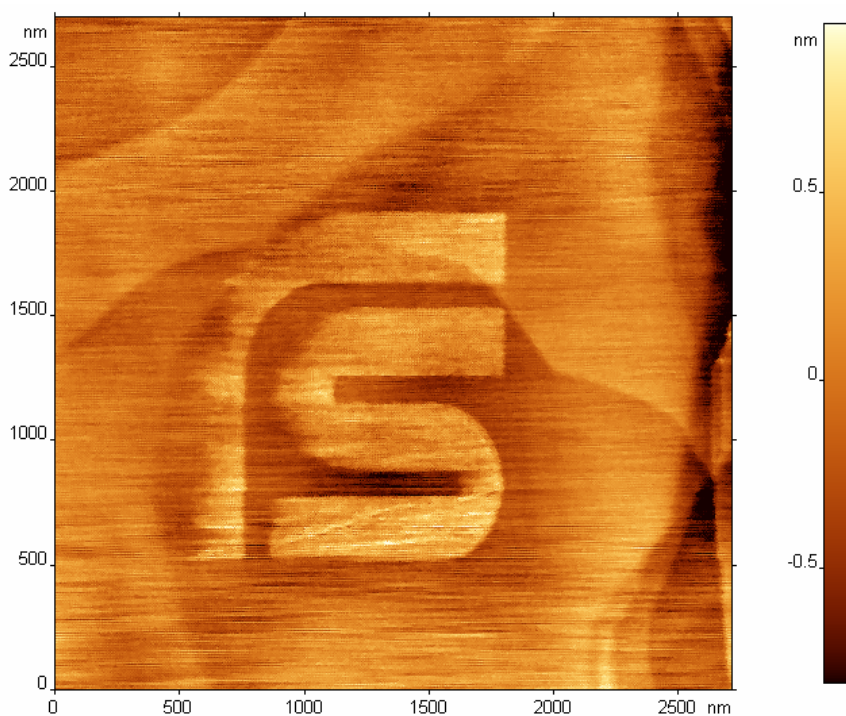
BioImage

Образцова Екатерина Александровна
Физический факультет МГУ имени М.В. Ломоносова, г. Москва
Микроскоп: Nanoscope 3

Изображение ДНК, которую планируется вводить в частицы вируса табачной мозаики. Изображение получено на микроскопе Nanoscope 3 с помощью кантилевера NSC35 фирмы Mikromasch в резонансном режиме сканирования. Обработано изображение в программе FemtoScan Online.



Синицына Ольга Валентиновна
Институт элементоор-ганических соединений им. А.Н. Несмеянова, г. Москва
Микроскоп: FemtoScan



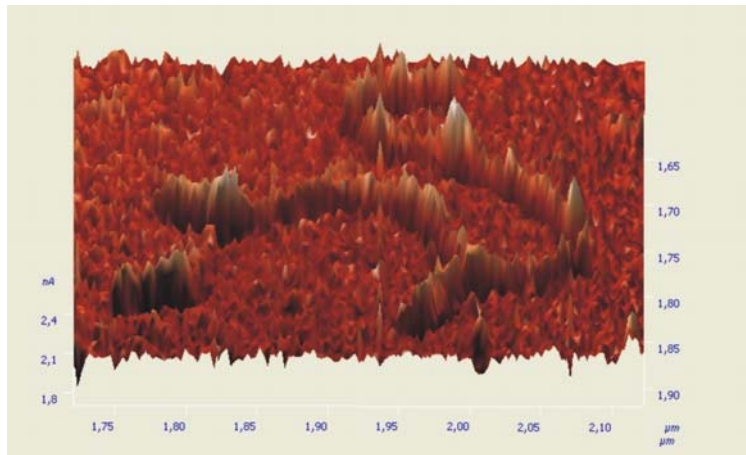
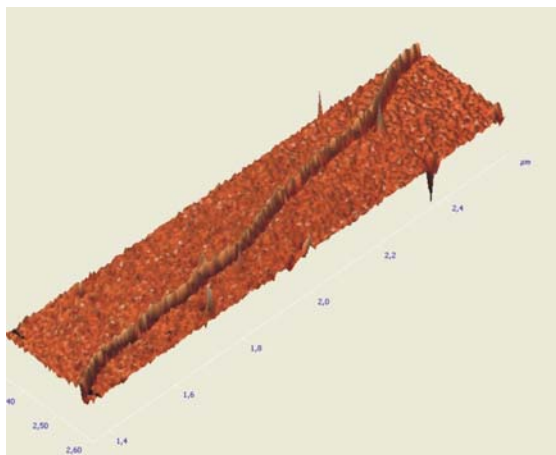
Изображение эмблемы FemtoScan, получено методом локального анодного окисления графита. Литография и изображение были выполнены на микроскопе FemtoScan с помощью кантилевера с золотым покрытием CSG11. Режим сканирования — контактный.

BioImage

Трушин Максим Викторович

*Казанский институт биохимии и биофизики; Казанский государственный университет
г. Казань*

Микроскоп: Solver P47H (НТ-МДТ, Россия)

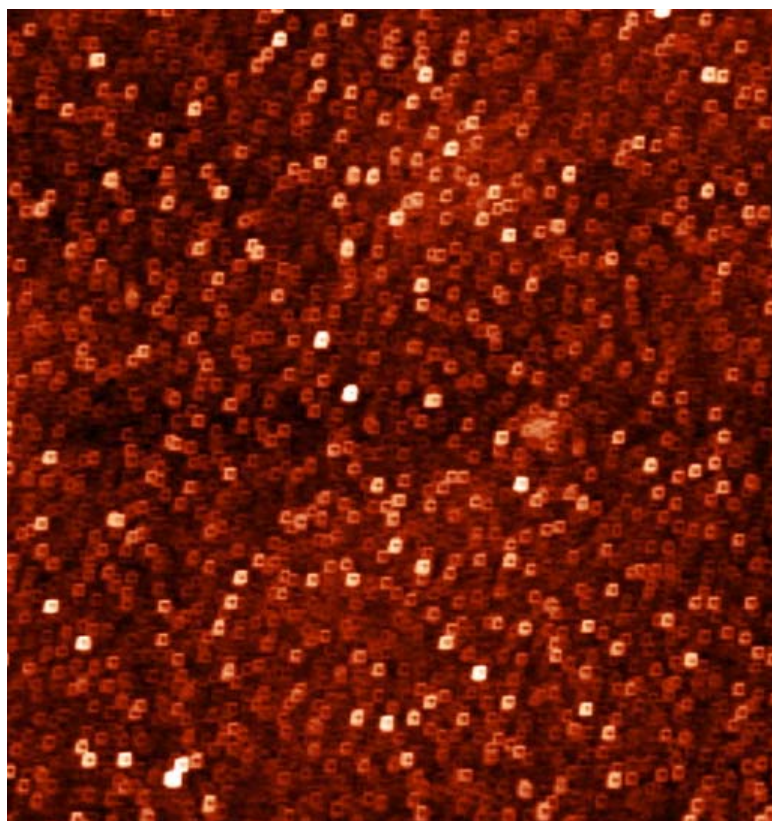


3D-изображения ДНК, выделенной из клеток *Mycoplasma gallisepticum* S6, выращенных на полноценной (слева) и голодной (справа) питательных средах.

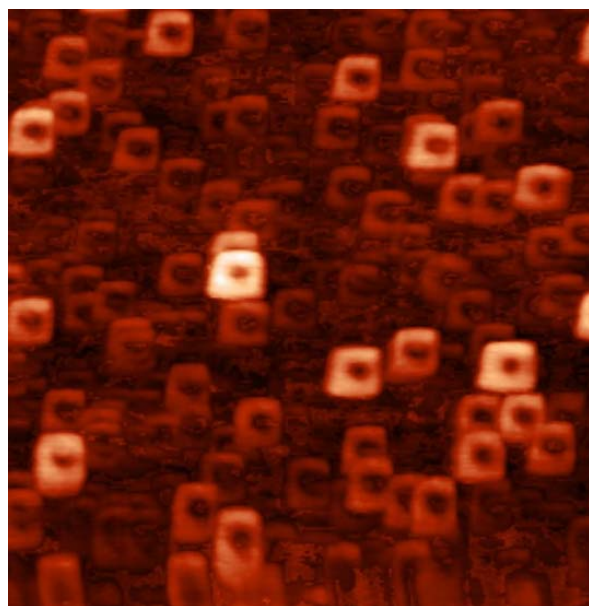
Федосенко Николай Николаевич

Физический факультет МГУ имени М.В. Ломоносова, г. Москва

Микроскоп: FemtoScan



Покрытие кобальта в SiO₂ матрице, сформированный Золь-Гель методом (отжиг при 750°C).

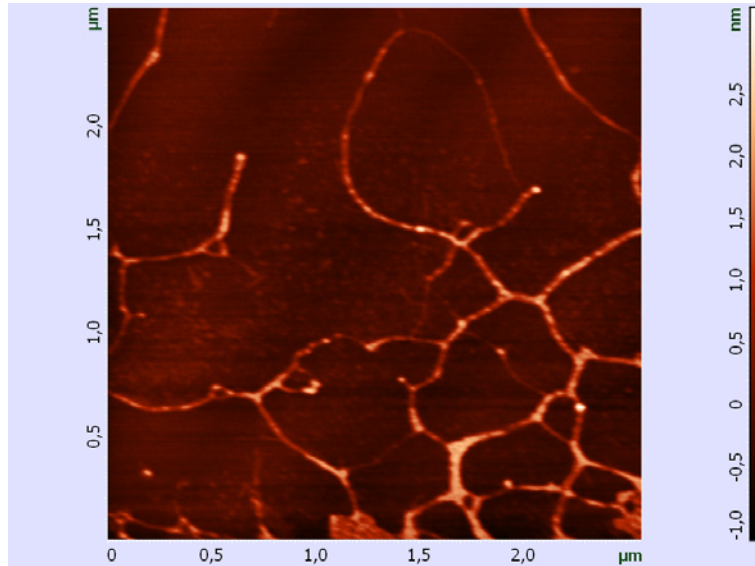


BioImage

Шарипов Талгат Ишмухамедович

Башкирский государственный университет, г. Уфа

Микроскоп: NTEGRA Prima



Самосборка молекул Лямбда-ДНК, иммобилизованных на поверхности слюды.

Изучение процесса иммобилизации молекул ДНК на твердотельной подложке может дать вклад в решение одной из фундаментальных проблем в технологии — изготовления биочипов (в частности ДНК-чипов). Также результаты подобных исследований могут быть применены в нанoeлектронике.

**УЧАСТНИКИ КОНФЕРЕНЦИИ
«СОВРЕМЕННЫЕ ДОСТИЖЕНИЯ БИОНАНОСКОПИИ»**

Арифулина Екатерина Сергеевна

*Ярославская государственная
медицинская академия, г. Ярославль
arifuliny@mail.ru*

Багров Дмитрий Владимирович

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

Бауков Виктор Владимирович

*Московский физико-технический
институт, г. Долгопрудный
victor.baukov@gmail.com*

Будник Оксана Петровна

*Международный центр «Институт
прикладной оптики», Украина
oksinfo@i.com.ua*

Быков Иван Вадимович

*Московский физико-технический
институт, г. Долгопрудный
ivan_bykov@mail.ru*

Горбачев Дмитрий Леонидович

*Гомельский государственный
университет, Белоруссия, г. Гомель
dgorbachev@list.ru*

Горелкин Петр Владимирович

*ООО «Академия биосенсоров», г. Москва
gorelkin@genebee.msu.ru*

Громова Анна Павловна

*Физический факультет МГУ
им. М.В. Ломоносова, г. Москва
solly8@mail.ru*

**Гудкова Светлана
Александровна**

*Московский физико-технический
институт, г. Долгопрудный
svetlanagudkova@yandex.ru*

**Давыдов Дмитрий
Александрович**

*Химический факультет МГУ
им. М.В. Ломоносова, г. Москва
dimitri.davydov@gmail.com*

**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*

Жданов Александр Григорьевич

*МГУ им. М.В. Ломоносова, г. Москва
zhdanov@nanolab.phys.msu.ru*

Замалеева Алсу Ильгизовна

*Казанский государственный
университет им. В.И. Ульянова-Ленина,
г. Казань
alsu130ksu@mail.ru*

Киселев Глеб Александрович

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

Колесов Дмитрий Валерьевич

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

Кочаков Валерий Данилович

Чувацкий государственный
университет им. И.Н. Ульянова,
г. Чебоксары
kocherishca@mail.ru

Краевский Сергей

Владимирович

ИТЭФ, г. Москва
skraevsky@mail.ru

Кузнецова Татьяна Григорьевна

Гомельский государственный
медицинский университет,
Белоруссия, г. Гомель
tmatuh@server.by

Лебедев Денис Владимирович

Казанский государственный
университет им. В.И.Ленина; Казанский
физико-технический институт
им. Е.К. Завойского, г. Казань
Denis.Lebedev@bk.ru

Логинов Павел Борисович

Институт Биоорганической Химии
им. М.М. Шемякина
и Ю.А. Овчинникова РАН, г. Москва
altodor@rambler.ru

Любченко Юрий Львович

Department of Pharmaceutical Sciences,
College of Pharmacy, University of
Nebraska Medical Center, Omaha, USA
ylyubchenko@unmc.edu

Макаров Валентин

Владимирович

НИИ физико-химической биологии
им. Белозерского, г. Москва
makarov_vv85@mail.ru

Меньшиков Евгений

Александрович

ООО «Старт инноваций», г. Москва
menshikov@polly.phys.msu.ru

Мешков Георгий Борисович

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

Милованов Святослав Сергеевич

Саратовский государственный
медицинский институт, г. Саратов
misser1977@gmail.com

Мухин Дмитрий Сергеевич

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

Никитина Ирина Александровна

Гомельский государственный
медицинский университет,
Белоруссия, г. Гомель
nikitsin@tut.by

Новиков Николай Дмитриевич

Чувацкий государственный
университет им. И.Н. Ульянова,
г. Чебоксары
novdennik@mail.ru

Образцова Екатерина

Александровна

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

**Пищальникова Анастасия
Владимировна**

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

Синицына Ольга Валентиновна
*ИНЭОС РАН, г. Москва
sinitsyna@gmail.com*

Спорыш Ирина Марковна
*Киевский национальный университет
им. Т. Шевченка, Украина, г. Киев
iryna.sporysh@online.ua*

Сушко Анна Дмитриевна
*Физический факультет МГУ
им. М.В. Ломоносова, г. Москва
sushko@polly.phys.msu.ru*

Томова Зулейхан Мухматовна
*Физический факультет МГУ
им. М.В. Ломоносова, г. Москва
tomova@nanolab.phys.msu.ru*

Трушин Максим Викторович
*Казанский институт биохимии
и биофизики; Казанский госуниверситет,
г. Казань
mtrushin@mail.ru*

Трушина Оксана Владимировна
*Казанский государственный
университет, г. Казань
sylstal@mail.ru*

Федянин Андрей Анатольевич
*Физический факультет МГУ
им. М.В. Ломоносова, г. Москва
fedyanin@nanolab.phys.msu.ru*

Филонов Александр Сергеевич
*Физический факультет МГУ
им. М.В. Ломоносова, г. Москва
filonov@nanoscopy.org*

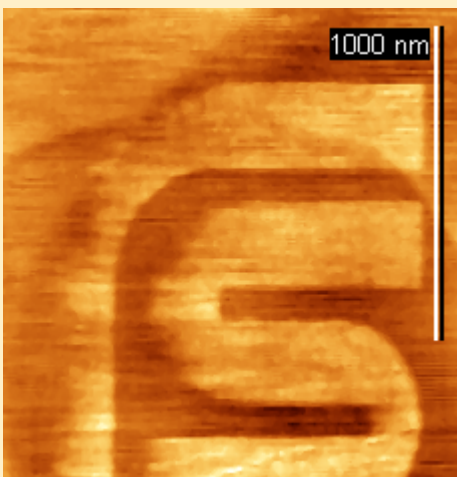
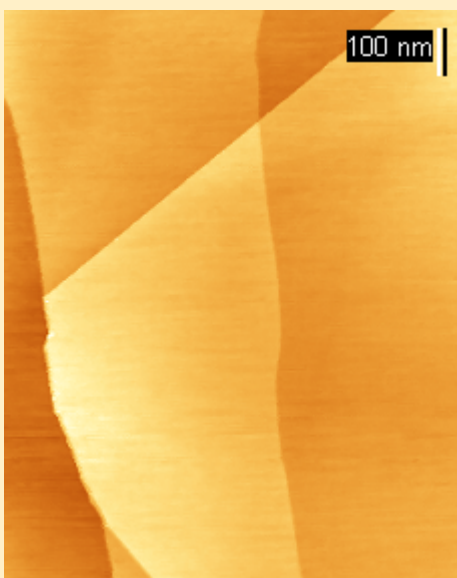
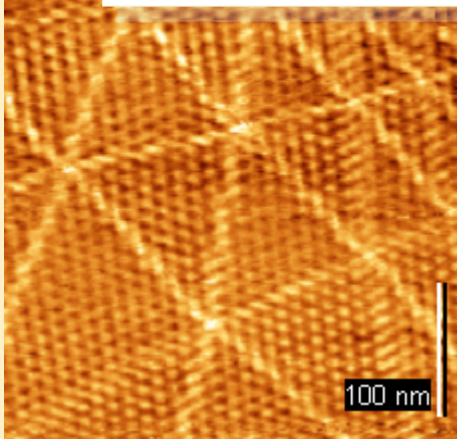
**Шарипов Талгат
Ишмухамедович**
*Башкирский государственный
университет, г. Уфа
sha-t@yandex.ru*

Щербаков Максим Радикович
*Физический факультет МГУ
им. М.В. Ломоносова, г. Москва
shcherbakov@nanolab.phys.msu.ru*

Яминский Дмитрий Игоревич
*Физический факультет МГУ
им. М.В. Ломоносова, г. Москва
yaminsky@sinno.ru*

Яминский Игорь Владимирович
*Физический факультет МГУ
им. М.В. Ломоносова, г. Москва
yaminsky@nanoscopy.org*

Дорога в мир НАНО начинается с графита



Высокоориентированный пиролитический графит:

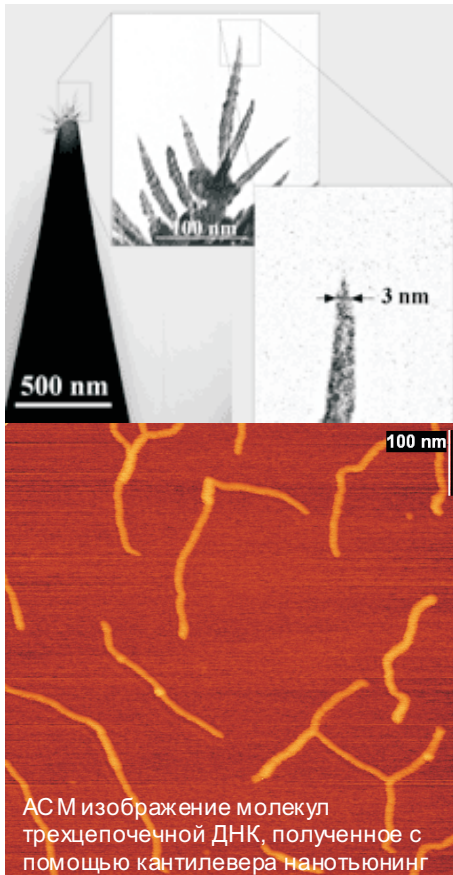
- Гидрофобная подложка для исследования молекул, кластеров, монослоев
- Калибровочная решетка для зондовых микроскопов
- Модельная поверхность для проверки теорий зондовой микроскопии
- Удобный объект для студенческих практикумов по нанотехнологиям
- Материал для приготовления образцов графена

www.nanoscopy.net

Центр перспективных технологий



ООО НПП "Центр перспективных технологий"
Advanced Technologies Center
www.nanoscopy.net
e-mail: spm@nanoscopy.net

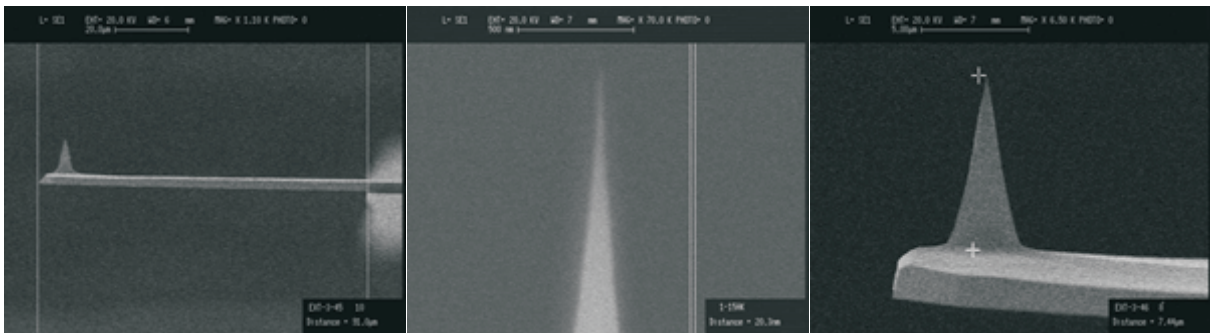


АСМ изображение молекул
трехцепочечной ДНК, полученное с
помощью кантилевера нанотьюнинг

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

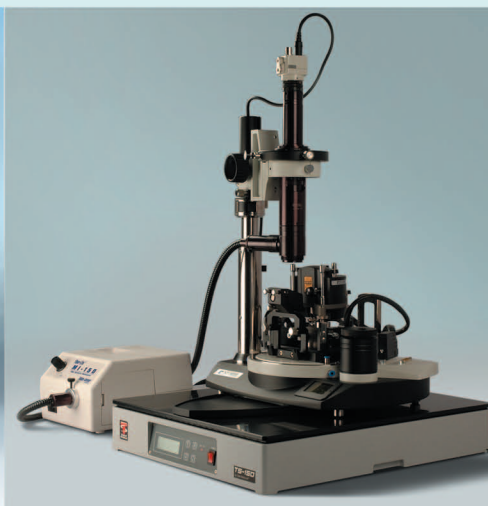
НТ-МДТ

Инструменты для нанотехнологии

Оборудование производства НТ-МДТ



Солвер Некст



Платформа ИНТЕГРА



Наноэдюкатор

Оборудование сторонних производителей



**Электронные
микроскопы**



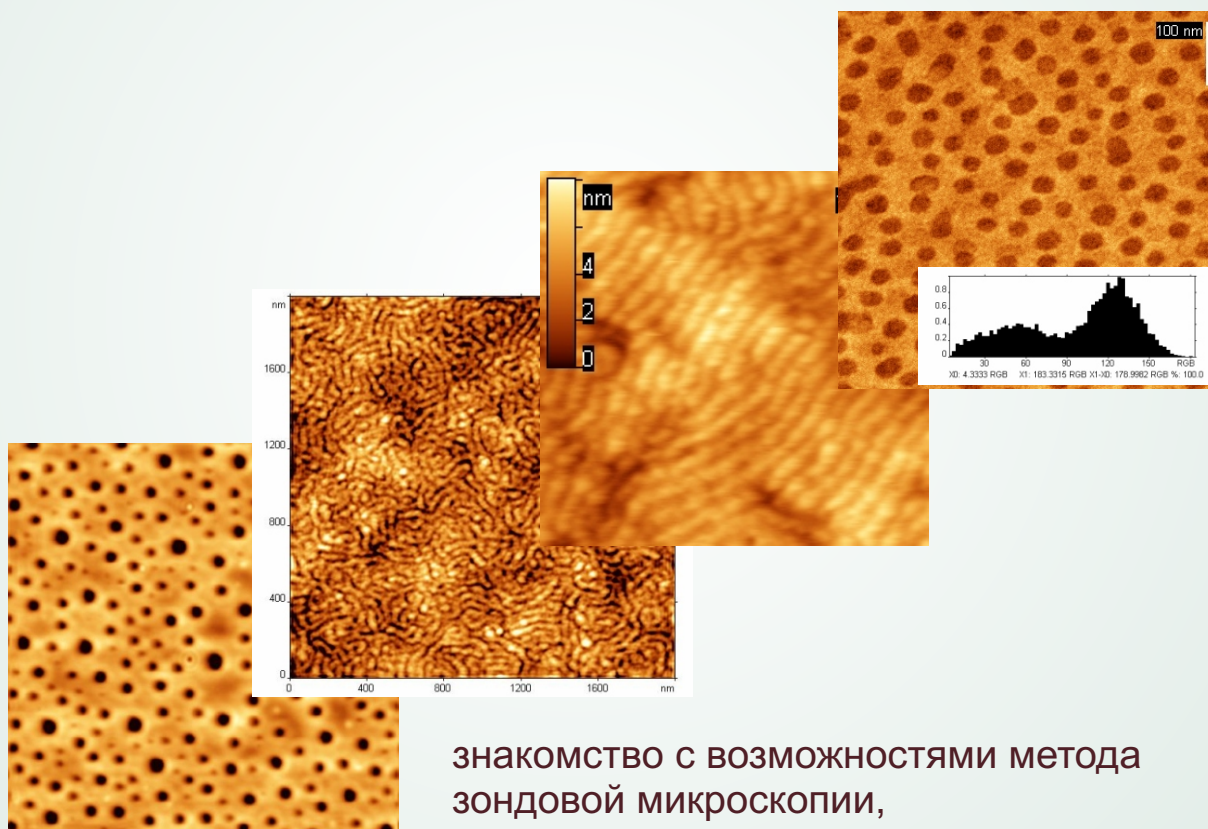
**КР
спектрометры**



**Рентгеновские
дифрактометры**

Кафедра ВМС химического факультета
МГУ имени М.В. Ломоносова
и
ООО НПП “Центр перспективных технологий”
представляют
лабораторную работу
“Сканирующая зондовая микроскопия
блок-сополимеров”

Большакова А.В., Киселёва О.И., Никонорова Н.И., Яминский И.В.



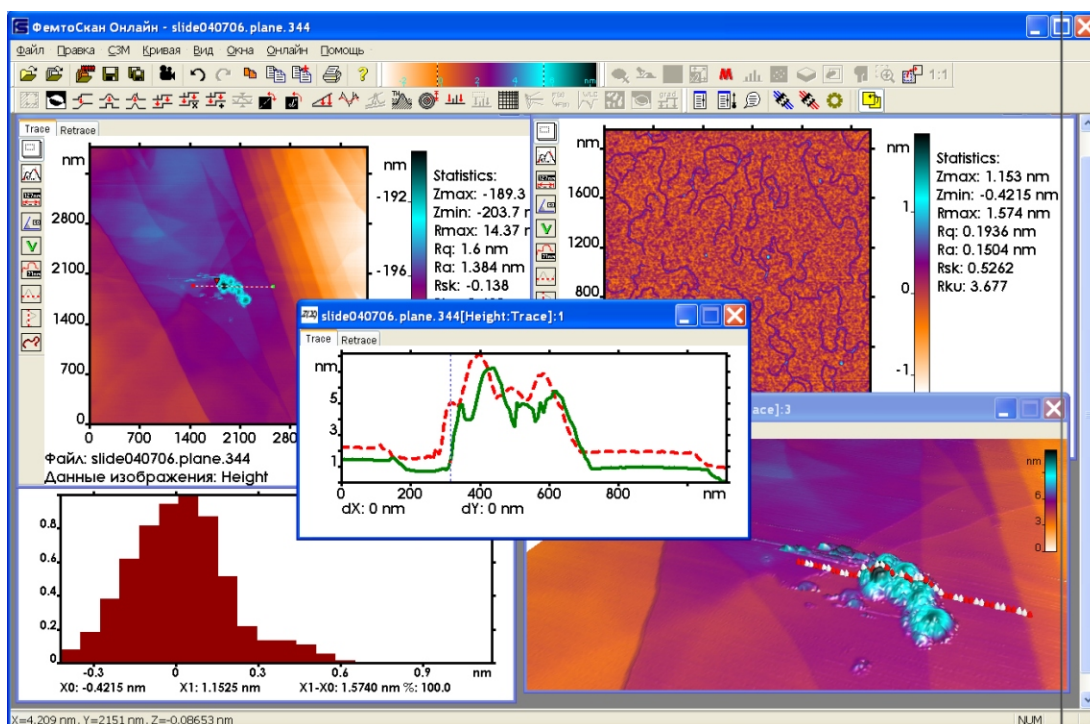
знакомство с возможностями метода
зондовой микроскопии,
применительно к полимерным объектам;
изучение структуры блок-сополимеров;
обработка данных и
представление научных результатов

*Выполнение работы требует знание основ теории полимеров
Лабораторная работа рассчитана на 16 академических часов

**Москва
2008**

Программное обеспечение ФемтоСкан Онлайн

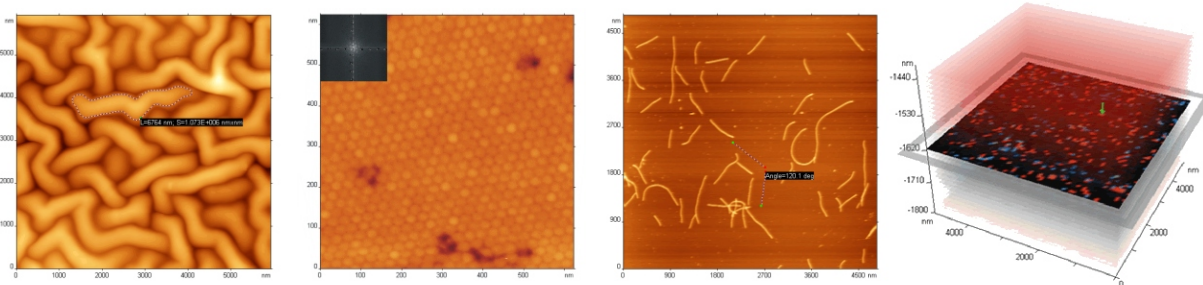
>> ТЕПЕРЬ – ПОЛНОСТЬЮ В РУССКОМ ИНТЕРФЕЙСЕ <<



ФемтоСкан Онлайн поможет Вам обработать и проанализировать данные зондовой микроскопии, а также представить их доступно и наглядно

Фемтоскан Онлайн - это:

- Простота использования, гибкая настройка программы, понятный интерфейс
- Большой набор математических функций
- Функции для работы с внешними данными
- Поддержка разнообразных форматов (Nanoscope, NT-MDT, Molecular Imaging и т.д.)
- Построение 3х и 4х мерных изображений
- Быстрая и удобная техническая поддержка
- Документация и примеры
- Работа в операционных системах семейства Windows



<http://www.nanoscopy.net>