

ВЗГЛЯД В МИКРОМИР: ОТ АТОМОВ И МОЛЕКУЛ – ДО ЖИВЫХ КЛЕТОК

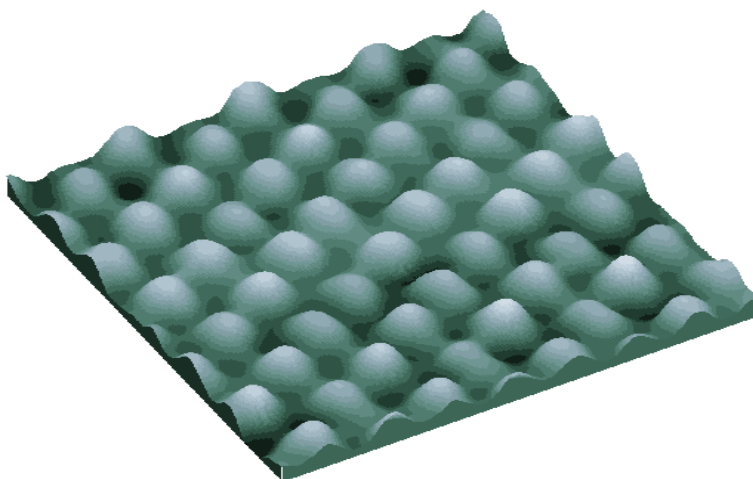
Сканирующая зондовая микроскопия — это совокупность методов определения с помощью различных микрозондов локальных механических, электрических, магнитных и других свойств поверхности. Результатами измерений этих методов являются, как правило, трехмерные изображения поверхности исследуемых объектов с пространственным разрешением в доли нанометров.

Изобретение сканирующего туннельного микроскопа — первого из семейства зондовых микроскопов — оказалось неожиданным даже для подготовленных специалистов.

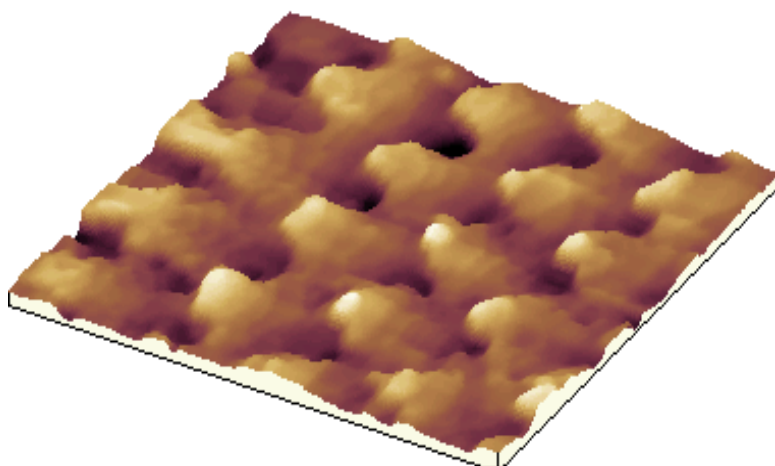
Первый зондовый микроскоп — сканирующий туннельный микроскоп — был изобретен в 1981 г. сотрудниками швейцарского отделения Исследовательского центра фирмы IBM Гердом Биннигом и Хайнрихом Рорером. Они предприняли попытку конструирования прибора для проведения спектроскопических исследований участков поверхности, размер которых менее 10 нм. В результате эта работа увенчалась созданием уникального микроскопа с возможностью визуализации отдельных атомов. В 1986 г. Г.Биннигу и Х. Рореру за изобретение туннельного микроскопа была вручена Нобелевская премия по физике.

С помощью туннельного микроскопа можно произвести интересные наблюдения. Например, обнаружить, что атомы кристалла на поверхности имеют другую упаковку, чем в объеме. На поверхности кристалла может происходить перестройка атомов, обусловленная тем, что происходит замыкание свободных связей атомов внешнего слоя кристалла. Такая картина — реконструкция поверхности — характерна для кристаллического кремния и многих других материалов. В экспериментах можно заметить периодические изменения в плотности электронных состояний вблизи моноатомных ступенек или группы атомов.

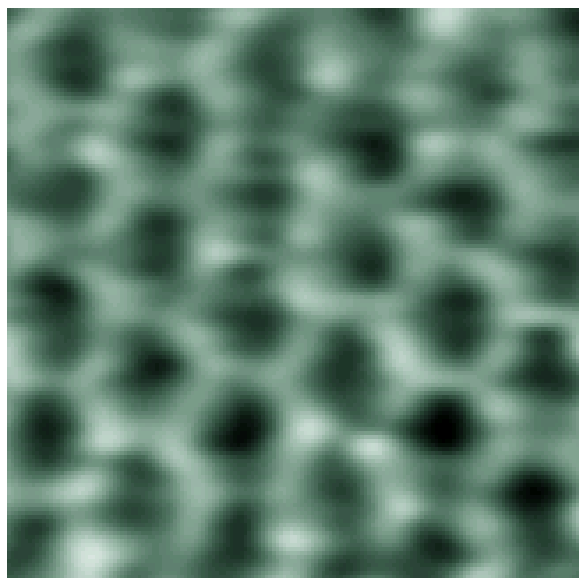
Туннельный микроскоп применяют в научных и практических исследованиях не только для изучения свойств поверхности объектов, но и для целенаправленной модификации поверхности различных материалов. С помощью иглы микроскопа можно осуществлять литографию — нанесение заданного рисунка на поверхность. Яркой демонстрацией метода является осаждение и удаление отдельных атомов на поверхности, а также их перемещение на поверхности подложки. Так, в 1991 г. Эйглер с сотрудниками, перемещая зондом атомы ксенона по поверхности никеля, составил слово IBM. Для написания буквы I было использовано всего 8 атомов ксенона, а букв В и М — по тринадцать атомов!



Атомная структура
поверхности высоко-
ориентированного
пиролитического графита.
Размер изображения:
 $17 \times 17 \times 2 \text{ \AA}^3$



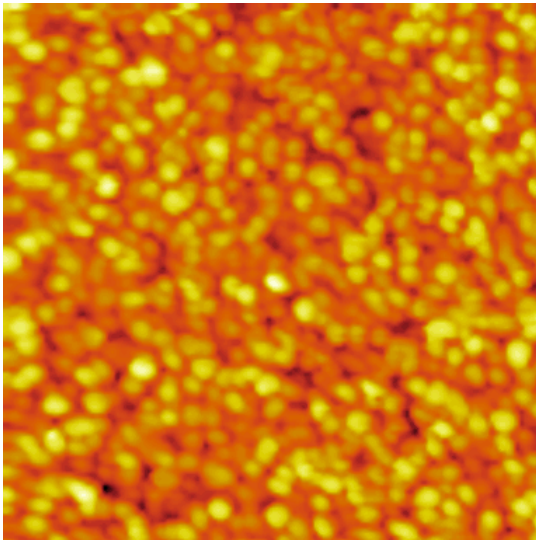
Плотнупакованная
молекулярная структура
монослойной пленки
стеариновой кислоты,
адсорбированной на
поверхность графита.
Размер изображения:
 $20 \times 20 \times 5 \text{ \AA}^3$



Атомная структура
поверхности природного
дисульфида молибдена.
Размер изображения: $24 \times 24 \text{ \AA}^2$
Перепад по высоте — $0,5 \text{ н\AA}$

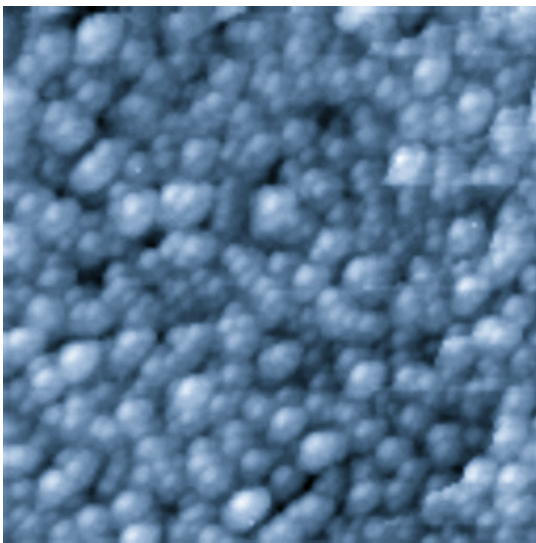
Рис.1 Визуализация атомной и молекулярной структуры поверхностей твердых тел методом туннельной микроскопии.

Наблюдения проведены с помощью сканирующего туннельного микроскопа “Скан-8” (Москва, Центр перспективных технологий)



СТМ-изображение поверхности золотой пленки, напыленной на стекло.

Размер изображения: $5000 \times 5000 \times 100 \text{ \AA}^3$

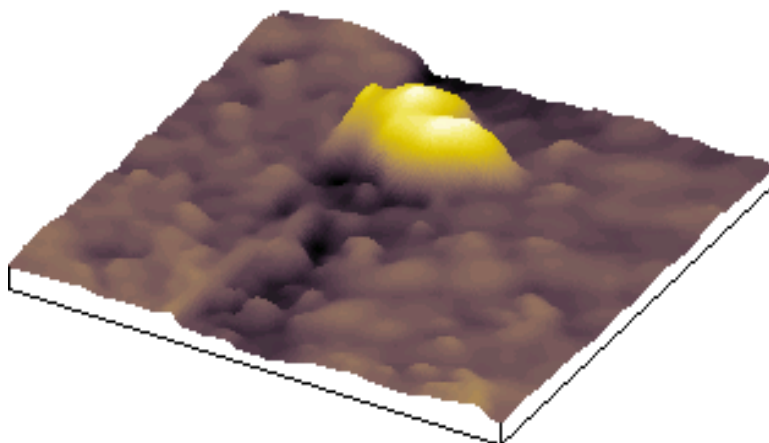


СТМ изображение поверхности никелевой пленки, напыленной на стекло.

Размер изображения: $3600 \times 3600 \times 34 \text{ \AA}^3$

Рис.2 СТМ-изображения поверхности металлических пленок

Наблюдения проведены с помощью сканирующего туннельного микроскопа “Скан-8” (Москва, Центр перспективных технологий)



Размер изображения: $3000 \times 3000 \times 300 \text{ \AA}^3$

Рис.3 СТМ-изображение липосом фосфатидилхолина на поверхности золотой подложки

***Наблюдения проведены с помощью сканирующего туннельного микроскопа “Скан-8”
(Москва, Центр перспективных технологий)***

Сканирующий туннельный микроскоп — это уникальный прибор для исследования поверхности с рекордными возможностями. На зеркальных поверхностях пленок золота или никеля, нанесенных на ровную подложку термическим испарением в вакууме, с помощью туннельного микроскопа можно легко увидеть зернистую структуру с размером кластера в 10–30 нм. Сканирующий туннельный микроскоп пригоден для визуализации биологических структур, например, — липосом (бислойных мембран, образующих сферическую поверхность). Туннельный микроскоп позволяет наблюдать образцы в различных условиях: на воздухе, в вакууме, в растворах и электролитах.

Изобретатели сканирующего туннельного микроскопа Г. Бинниг и Х. Рорер писали в 1986 г.: “Мы искренне верим, что красота атомных структур послужит стимулом к применению данного метода к решению тех задач, где он сможет принести наибольшую пользу человечеству”.

Прошедшее десятилетие показало, что зондовые микроскопы нашли широкое применение в научных исследованиях в различных областях физики, химии, биологии, медицины и материаловедения. Зондовые микроскопы применяют в качестве контрольно-измерительной аппаратуры при производстве сложных интегральных схем и перспективных носителей информации (магнитные, магнитооптические и лазерные диски).

ЗОНДОВАЯ МИКРОСКОПИЯ: МЕТОДЫ И АППАРАТУРА

Можно перечислить, по крайней мере, три основные и существенные особенности сканирующих зондовых микроскопов, благодаря которым зондовые микроскопы привлекли внимание специалистов различных профилей.

1. Возможность увидеть атомную и молекулярную структуру поверхности, воздействовать на нее на уровне отдельных атомов и молекул. Пространственное разрешение сканирующего туннельного и атомно-силового микроскопа может достигать тысячных долей нанометра в направлении по нормали к образцу и сотые доли нанометра в плоскости образца.

2. Структуру и свойства (механические, электрические и электрон-ные) поверхности можно изучать в различных средах — на воздухе, в чистых жидкостях и растворах, в вакууме.

3. Наглядность представляемой информации.

Общепринятая аббревиатура сканирующей зондовой микроскопии — СЗМ. Основное отличие разных методов зондовой микроскопии состоит в типе применяемого зонда. Приведу примеры.

Сканирующий туннельный микроскоп (СТМ). Металлическое острие и проводящая поверхность исследуемого образца образуют туннельный переход. В микроскопе измеряют величину электрического тока туннельного перехода.

Сканирующий силовой микроскоп (ССМ). В качестве зонда используется микроострие, закрепленное на упругой микроконсоли. В ССМ регистрируется сила взаимодействия между микроострием и поверхностью образца. Для ССМ часто используется и другое название — атомно-силовой микроскоп (АСМ), которое указывает на локальный характер силового взаимодействия.

Сканирующий электрохимический микроскоп (СЭМ). Дает возможность визуализировать отдельные атомы в растворах электролитов.

Хронология появления различных приборов семейства зондовых микроскопов приведена в обзоре, составленном Квейтом. В приведенном ниже списке фамилии авторов указаны в оригинальной транскрипции, в круглых скобках дан год изобретения каждого зондового микроскопа.

1. Сканирующий туннельный микроскоп — *G. Binnig, H. Rohrer (1981)* — визуализация атомной структуры проводящих поверхностей.

2. Сканирующий ближнепольный оптический микроскоп — *D.W. Pohl (1982)* — оптические изображения с продольным разрешением в 50 нм.

3. Сканирующий емкостной микроскоп — *J.R. Matey, J. Blanc (1984)* — регистрация вариаций электрической емкости с разрешением 500 нм.

4. Сканирующий тепловой микроскоп — *C.C. Williams, H.K. Wickramasinghe (1985)* — регистрация перепадов температуры с продольным пространственным разрешением в 50 нм.
5. Атомно-силовой микроскоп (сканирующий силовой микроскоп) — *G. Binnig, C.F. Quate, Ch. Gerber (1986)* — атомное разрешение на проводящих и непроводящих поверхностях.
6. Сканирующий бесконтактный микроскоп — *Y. Martin, C.C. Williams, H.K. Wickramasinghe (1987)* — визуализация поверхностей в режиме сил притяжения, пространственное разрешение в плоскости образца — 5 нм.
7. Магнитно-силовой микроскоп — *Y. Martin, H.K. Wickramasinghe (1987)* — изображения магнитных доменов с разрешением менее 100 нм.
8. Сканирующий фрикционный микроскоп — *C.M. Mate, G.M. McClelland, S. Chiang (1987)* — атомные изображения в режиме сил трения.
9. Электростатический силовой микроскоп — *Y. Martin, D.W. Abraham, H.K. Wickramasinghe (1987)* — обнаружение элементарных зарядов.
10. Сканирующий микроскоп неупругого туннелирования — *D.P.E. Smith, D. Kirk, C.F. Quate (1987)* — регистрация фоновых спектров молекул с помощью СТМ.
11. Сканирующий туннельный микроскоп, управляемый лазерным лучом — *L. Arnold, W. Krieger, H. Walther* — визуализация с помощью нелинейного преобразования света в области туннельного перехода.
12. Микроскоп с эмиссией баллистических электронов — *W.J. Kaizer (1988)* — изучение барьеров Шоттки с нанометровым пространственным разрешением.
13. Силовой микроскоп с инверсной фотоэмиссией — *J.H. Coombs, J.K. Gimzewski, B. Reihl, J.K. Sass, R.R. Schlitter (1988)* — люминесцентные спектры с пространственным разрешением в единицы нанометров.
14. Ближнепольный акустический микроскоп — *K. Takata, T. Hasegawa, S. Hosaka, S. Hosoki, T. Komoda* — низкочастотные звуковые измерения с разрешением в 10 нм.

Здесь можно продолжить и далее перечисление различных типов микроскопов, родоначальником которых стал сканирующий туннельный микроскоп. Этот список также, по всей видимости, будет расширен в ближайшее время в результате изобретения новых модификаций зондовых микроскопов.

Принцип работы туннельного микроскопа основан на прохождении электроном потенциального барьера, который образован разрывом электрической цепи — небольшим промежутком между зондирующим микроострием и поверхностью образца. В основе работы прибора лежит хорошо известный феномен электронного туннелирования (туннельный эффект). Между металлическим острием и поверхностью исследуемого проводника прикладывают электрическое напряжение (типичные значения напряжений: от единиц мВ до В) и острие приближают к поверхности образца до появления туннельного тока. Устойчивые изображения многих поверхностей можно получать при

величине туннельного тока в 10^{-9} А, т.е. в 1 нА. При этом острие оказывается вблизи поверхности на расстоянии в доли нанометра.

Для получения изображения поверхности металлическое острие перемещают над поверхностью образца, поддерживая постоянной величину туннельного тока. При этом траектория движения острия по сути дела совпадает с профилем поверхности, острие огибает возвышенности и отслеживает углубления. Такое пространственное перемещение зонда часто сравнивают с полетом крылатой ракеты или современного воздушного шара. При некоторой схематичности такого сравнения есть и существенные основания для этого. В обоих случаях используются одинаковые алгоритмы управления и вычислительные программы и даже сходные электронные системы автоматического регулирования.

В сканирующем туннельном микроскопе в качестве зонда используется заточенное острие, приготовленное из металлической проволоки, например, вольфрамовой или из сплава благородных металлов (80% Pt, 20% Ir). Изготовление зонда осуществляют методом электрохимического травления или просто механическим срезом. В первом случае кончик проволоки, как правило, опускают в раствор щелочи и при пропускании постоянного или переменного тока формируют микроострие. Во втором случае можно даже с помощью простых ножниц сделать срез проволоки под углом $30\text{--}60^\circ$. Удивительно, но даже с помощью такого зонда можно увидеть отдельные атомы на поверхности проводника. Существует целое многообразие методов приготовления зондов. Для надежного измерения профиля шероховатой поверхности часто формируют зонды со строго определенной геометрией острия, например, выбирают угол схождения конуса острия в 20° . Для исследования биологических объектов применяют зонды небольшого диаметра (1–2 микрона) при значительной длине (10–15 мкм). При изучении поверхности в жидких средах, на поверхность иглы, за исключением самого кончика, наносят диэлектрическое покрытие – пленку полимера или иного материала. В таком случае можно наблюдать электрохимическое осаждение единичных атомов при электролизе.

Важной деталью сканирующего туннельного микроскопа является механический манипулятор, который обеспечивает перемещение зонда над поверхностью с точностью до тысячных долей нанометра. Традиционно механический манипулятор изготавливают из пьезокерамического материала. Если из пьезоматериала вырезать балку прямоугольного сечения, нанести на противоположные стороны металлические электроды и приложить к ним разность потенциалов, то при этом произойдет изменение геометрических размеров балки. Это и есть так называемый обратный пьезоэффект. С помощью такой балки можно перемещать зонд по одной координате, с помощью комбинации из трех балок — по трем координатам. В практических конструкциях обычно используют пьезокерамические манипуляторы, выполненные в виде тонкостенной трубки с несколькими отдельными электродами. Управляющее напряжение вызывает удлинение или изгиб таких трубчатых манипуляторов и, соответственно, перемещение зонда по всем трем пространственным координатам X , Y и Z . Конструкции современных манипуляторов обеспечивают диапазон механического перемещения зонда до 100–200 мкм в плоскости образца и до 5–12 мкм — по нормали к образцу.

Сканирующий туннельный микроскоп применяют для исследования проводящих поверхностей. Изображения, которые получают с помощью этого микроскопа дают информацию о пространственном распределении плотности электронных состояний вблизи поверхности. Образно говоря, туннельный микроскоп видит распределение электронных облаков вблизи поверхности.

Туннельный микроскоп стал прототипом зондовых микроскопов новых конструкций, среди которых самое широкое применение нашел атомно-силовой микроскоп.

Основное отличие зондовых микроскопов друг от друга лежит в применении различных микрозондов, с помощью которых проводится измерение локальных свойств и характеристик поверхности. В туннельном микроскопе основным измеряемым параметром является туннельный ток между иглой и образцом, в атомно-силовом микроскопе контролируется сила взаимодействия между микроострием и поверхностью образца.

Традиционный атомно-силовой микроскоп представляет собой оригинальную конструкцию сверхчувствительного измерителя профиля поверхности. В качестве зонда атомно-силового микроскопа используют микроминиатюрную упругую пластинку (кантилевер), на свободном конце которой методами литографии формируют острие из твердого материала (нитрида кремния, кремния). При перемещении зонда вдоль поверхности регистрируют отклонения кантилевера, либо осуществляют перемещения зонда таким образом, чтобы прогиб кантилевера (следовательно, и сила взаимодействия между зондом и образцом) оставался постоянным. В последнем случае, получаемые изображения соответствуют контурам постоянной силы.

Такой микроскоп позволяет измерять не только профиль поверхности, но и локальные силы трения, величину адгезии, упругие и вязкие свойства поверхности с субнанометровым пространственным разрешением. Широкое применение при исследовании материалов с пониженной поверхностной жесткостью — полимерных материалов и биополимеров — нашли различные модуляционные методы. В этих методах кантилевер приводят в резонансные колебания, а взаимодействие с поверхностью вызывает изменения амплитуды, частоты или фазы резонансных колебаний. При этом уменьшается воздействие на поверхность образца и удастся изучать динамику явлений на поверхности с участием макромолекул.

В другой модификации зондового микроскопа — сканирующем оптическом микроскопе ближнего поля — в качестве зонда фигурирует оптическое волокно с миниатюрной диафрагмой. При сканировании образца манипулятор перемещает диафрагму вблизи поверхности. Излучение лазерного источника, проходя через диафрагму, освещает исследуемую поверхность. В микроскопе такой конструкции регистрируют рассеянный или переизлученный свет. В результате того, что рассеяние света происходит в ближней зоне (на расстоянии от излучающей диафрагмы меньшем, чем длина волны света), удастся преодолеть принципиальное ограничение обычной оптической микроскопии по разрешающей способности: становятся заметными детали поверхности размером в десятки нанометров.

ЗОНДОВАЯ МИКРОСКОПИЯ: ПОСТРОЕНИЕ И ОБРАБОТКА ИЗОБРАЖЕНИЙ

При изучении свойств объектов методами сканирующей зондовой микроскопии основным результатом научного поиска являются, как правило, трехмерные изображения поверхности этих объектов. Адекватность интерпретации изображений зависит от квалификации специалиста. Вместе с тем, при обработке и построении изображений используется ряд традиционных приемов, о которых следует знать при анализе изображений.

Сканирующий зондовый микроскоп появился в момент интенсивного развития компьютерной техники. Поэтому при записи трехмерных изображений в нем были использованы цифровые методы хранения информации, разработанные для компьютеров. Это привело к значительному удобству при анализе и обработке изображений, однако пришлось пожертвовать фотографическим качеством, присущим методам электронной микроскопии.

Информация, полученная с помощью зондового микроскопа, в компьютере представляется в виде двумерной матрицы целых чисел. Каждое число в этой матрице, в зависимости от режима сканирования, может являться значением туннельного тока, или значением отклонения кантилевера, или значением какой-то более сложной функции. Если показать человеку эту матрицу, то никакого связного представления об исследуемой поверхности он получить не сможет. Итак, первая проблема — это преобразовать числа в вид, удобный для восприятия. Делается это следующим образом.

Числа в исходной матрице лежат в некотором диапазоне, есть минимальное и максимальное значения. Этому диапазону целых чисел ставится в соответствие цветовая палитра. Таким образом, каждое значение матрицы отображается в точку определенного цвета на прямоугольном изображении. Строка и столбец, в которых находится это значение, становятся координатами точки. В результате мы получаем картину, на которой, например, высота поверхности передается цветом – как на географической карте. Но на карте обычно используются лишь десятки цветов, а на нашей картине их сотни и тысячи. Для удобства восприятия точки, близкие по высоте, должны передаваться сходными цветами.

Может оказаться, и, как правило, так всегда и бывает, что диапазон исходных значений больше, чем число возможных цветов. В этом случае происходит потеря информации, и увеличение количества цветов не является выходом из положения, так как возможности человеческого глаза ограничены. Требуется дополнительная обработка информации, причем в зависимости от задач обработка должна быть разной. Кому-то необходимо увидеть всю картину целиком, а кто-то хочет рассмотреть детали. Для этого используются разнообразные методы, описанию которых посвящена следующая часть статьи. В качестве примера будут рассматриваться изображения, на которых цветом передается высота точки.

Вычитание среднего наклона

Полученные изображения часто имеют общий наклон, который может появляться по разным причинам. Это может быть реальный наклон поверхности; может быть температурный дрейф, который приводит к смещению образца во время сканирования; может быть нелинейность пьезокерамического манипулятора. Как бы то ни было, это приводит к появлению общего наклона, и на изображении обычно это мешает выявлению структуры объекта. Для того, чтобы этого избежать, из исходной матрицы значений вычитается плоскость среднего наклона. Поясним это одномерным случаем (рис. 1).

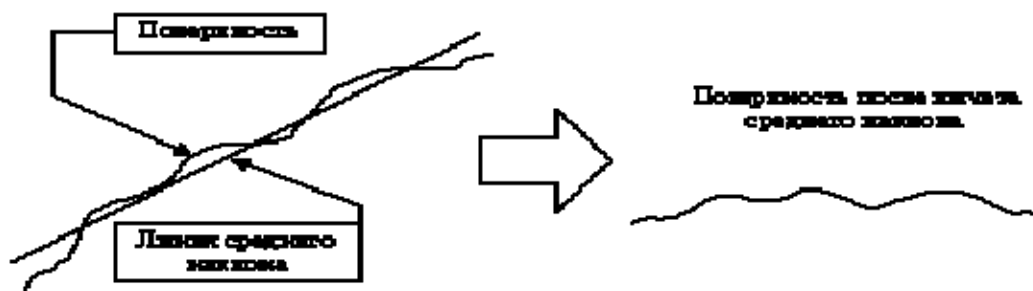


Рис. 1. Вычитание среднего наклона

В результате получается матрица с меньшим диапазоном значений и мелкие детали отображаются большим количеством цветов, становятся более заметными. Нелинейности пьезоманипулятора могут привести также к тому, что изображение получается вогнутым. В этом случае нужно вычитать не плоскость, а более сложную поверхность — параболическую или гиперболическую.

Усреднение

Помимо полезного сигнала на изображении всегда присутствует шумовая составляющая. Чтобы убрать ее, часто достаточно заменить значение в каждой точке средним арифметическим значений всех точек в некоторой ближайшей ее окрестности (рис. 2).

Если это не помогает — например, если уровень шумов довольно высок — требуется применение более сложных методов. Например, можно попробовать выделить полезный сигнал, убрав высокочастотную составляющую исходного сигнала. В сущности, усреднение по окрестности и есть такая фильтрация. Часто помогает увеличение размеров окрестности, по которой ведется усреднение. Рассмотрим для примера одномерный случай, т.е. не двумерную матрицу, а строку значений.

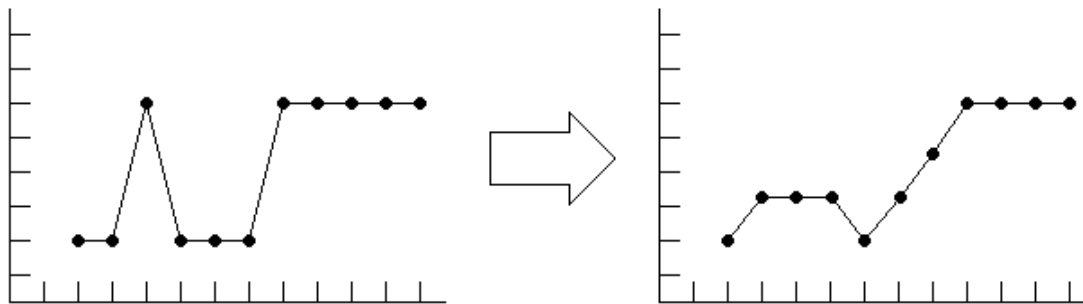


Рис. 2. Усреднение

Построим график, на котором по горизонтали отложим координату точки, а по вертикали значения точек. В результате получится профиль строки. На рис. 2 изображен этот профиль до и после фильтрации.

Медианная фильтрация

Хорошие результаты дает медианная фильтрация. Это нелинейный метод обработки изображений, позволяющий убрать резкие выбросы, но, в отличие от усреднения, оставляющий ступеньки. Поясним этот метод на одномерном случае. По горизонтали отложена координата точки, по вертикали — значение. Получается двумерный профиль. Для фильтруемой точки берутся значения ее соседей и заносятся в таблицу. Эта таблица сортируется по возрастанию, и за новое значение точки принимается значение из средней ячейки таблицы.

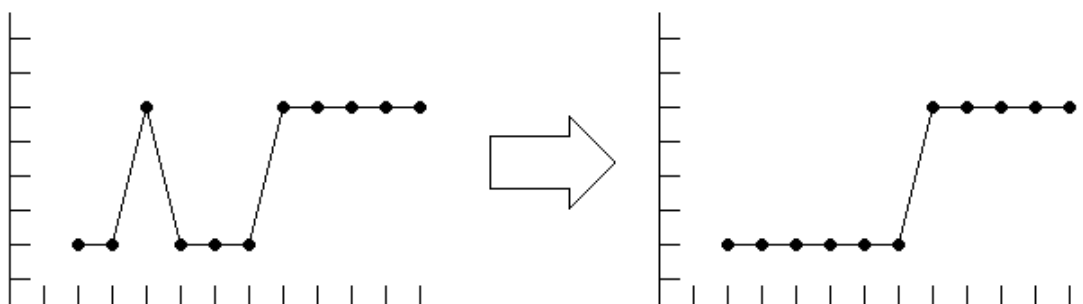


Рис. 3. Медианная фильтрация

Таким образом, если в точке был выброс, то она оказывается на краю отсортированной таблицы и не попадает в отфильтрованное изображение. Ступеньки же остаются без изменения (рис. 3). Если сравнить результаты усреднения и медианной фильтрации, то легко заметить различия в конечных результатах (рис. 2,3).

Усреднение по строкам

Изображения в сканирующей зондовой микроскопии характерны тем, что формируются они построчно. Таким образом, появляется выделенное направление (формирования строки), вдоль которого изображение имеет характерные особенности. Дело в том, что снятие строки происходит быстро, а между снятием соседних строк проходит некоторое время. При этом может произойти какой-то сбой, и следующие строки окажутся резко сдвинутыми вверх или вниз. На изображении появляется горизонтальная ступенька, которой нет на реальной поверхности. Чтобы убрать этот дефект, применяется усреднение по строкам. Все строки изображения сдвигаются вверх или вниз так, чтобы их средние значения были одинаковыми. При этом профиль строки остается прежним, а профиль столбца меняется, — убираются ступеньки (рис. 4).

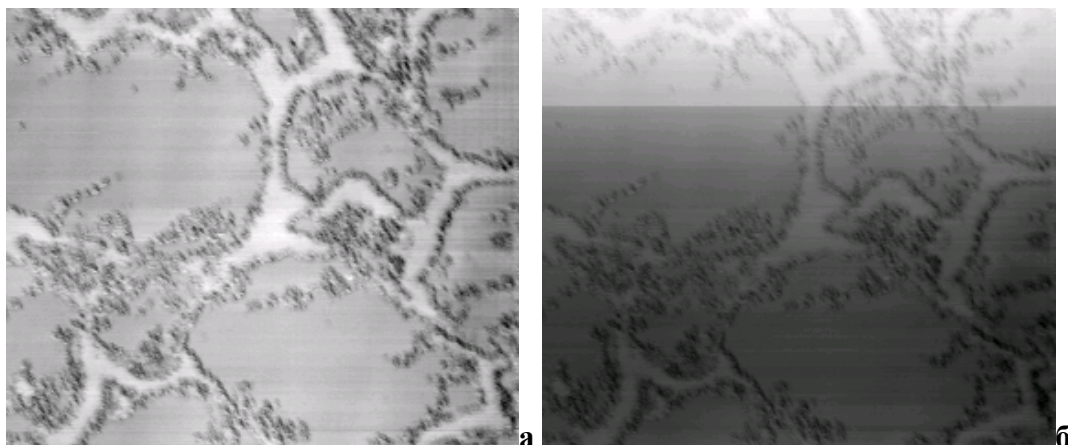


Рис. 4. Изображения многокомпонентной органической пленки
а — до усреднения по строкам;
б — после усреднения

Подсветка

Человеческий глаз лучше различает контрастные предметы. Потому на изображении, где цветом передается высота, мелкие детали не заметны на фоне крупных объектов. Как же поступить в этом случае?

Есть способ совместить информацию о высоте объекта с информацией о высоте мелкой детали над его поверхностью. Представьте, что вы летите на самолете над горами Кавказа. Вы ясно различаете все ущелья и утесы, хотя по сравнению с самими горами перепад высот там совсем невелик. Это происходит благодаря игре света и тени. Если солнце в зените, то горизонтальные участки поверхности будут освещены сильнее, чем склоны. По величине тени ваш мозг сам рассчитывает высоту объекта.

Таким образом, если смоделировать на изображении эффект освещения, то проявляются мелкие детали, причем без потери информации о крупных объектах (рис. 5).

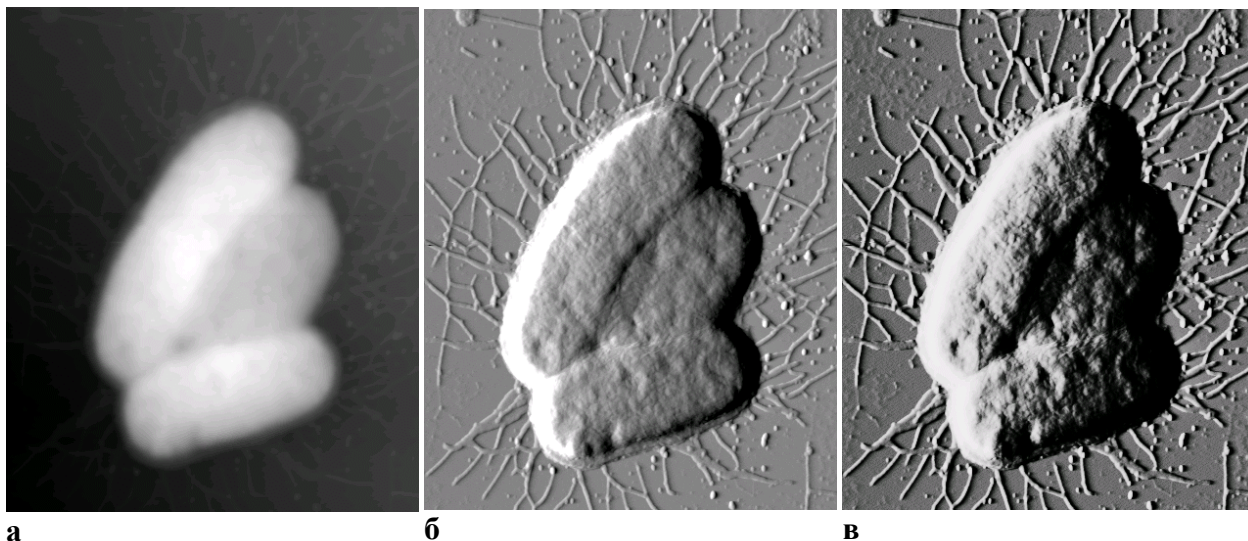


Рис. 5. Компьютерная обработка позволяет повысить контраст изображений
а — исходное изображение;
б, в — изображения с применением боковой подсветки разной интенсивности.
Исследуемый объект – бактерии *Escherichia coli* (кишечная палочка).
Размер кадра $4,6 \times 4,6$ мкм²

Современные компьютерные программы предлагают различные дополнительные возможности по обработке и построению изображений, полученных с помощью зондового микроскопа. Перспективными являются те программы, которые допускают многооконный интерфейс. В этом случае на экране монитора можно видеть одновременно разные изображения или одно и то же изображение на разных стадиях его математической обработки.

Пример рабочего поля программы “ФемтоСкан-001” (Москва, Центр перспективных технологий) представлен на рис. 6. Программа “ФемтоСкан-001” разработана для операционных систем Windows 95 и Windows NT.

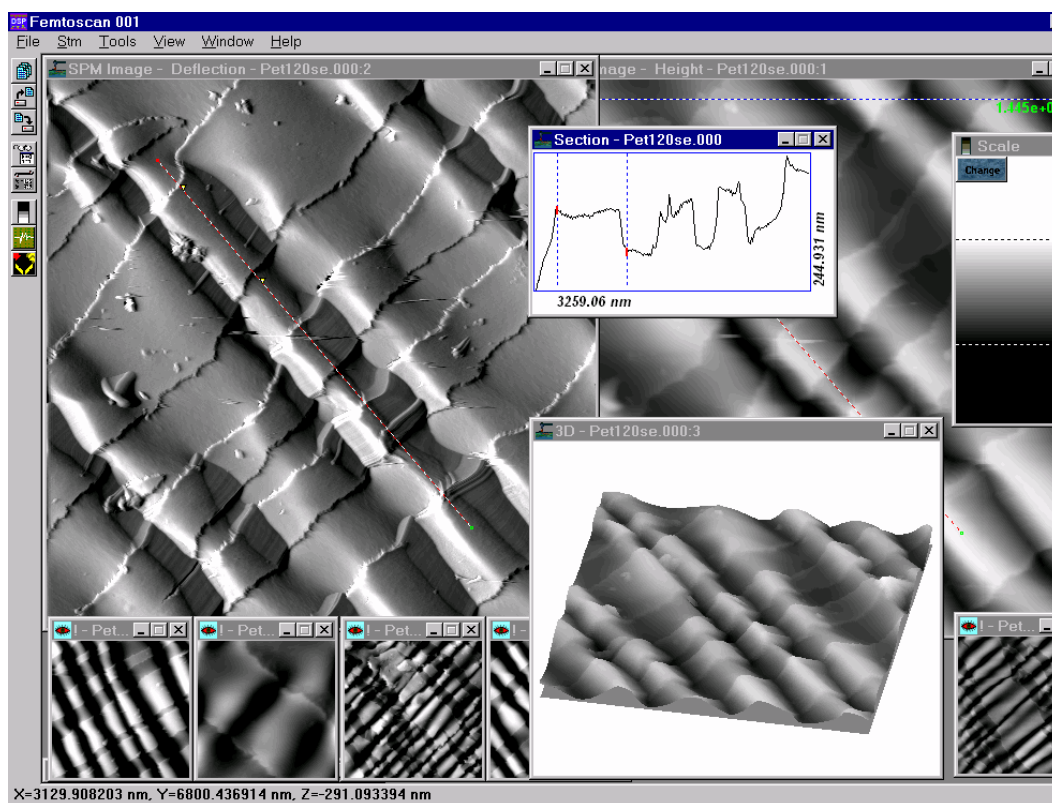


Рис. 6.
Пример
рабочего
поля
программы
“ФемтоСкан
-001”

Многооконный интерфейс и широкий набор специализированных функций позволяют представлять полученные изображения в удобном для восприятия виде.

НУКЛЕИНОВЫЕ КИСЛОТЫ

Среди множества биологических объектов, к исследованию которых применялись методы зондовой микроскопии, первой была молекула дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК). Однако на начальном этапе этих исследований отмечались сложности в интерпретации получаемых изображений. Так, авторы работ [Travaglini *et al.*, 1987; Dunlap, Bustamante, 1989] представили данные сканирующей туннельной микроскопии (СТМ) по изучению молекул ДНК, адсорбированных на подложку из высокоориентированного пиролитического графита (пирографита). Выбор данного материала в качестве подложки был обусловлен его проводящими свойствами, а также простотой приготовления атомарно гладких участков поверхности значительной площади. На СТМ-изображениях наблюдались протяженные цепочки, обладающие продольной периодичностью (период около 2–3 нм), на основании чего авторы делали вывод о визуализации витков двойной спирали.

Однако позднее были опубликованы данные [Clemmer, Beebe, 1991], свидетельствующие о возможности наблюдения сходных “ДНК-подобных” структур при исследовании методом СТМ чистой, свежесколотой поверхности пирографита. Возникновение таких структур объясняется чувствительностью СТМ к электронным свойствам поверхности — происходит визуализация доменных стенок пирографита [Heckl, Binning, 1992]. Эти результаты, а также слабая воспроизводимость и отсутствие безусловно необходимых контрольных экспериментов в первых работах по СТМ-визуализации ДНК вызывали сомнения в применимости методов зондовой микроскопии для исследования макромолекул, адсорбированных на поверхности пирографита.

Существенное изменение ситуации произошло в 1992 г., когда были опубликованы первые надежные, стабильные и воспроизводимые результаты исследования ДНК методом атомно-силовой микроскопии (АСМ) [Bustamante *et al.*, 1992; Vesenska *et al.*, 1992]. Эти публикации убедительно продемонстрировали уникальные возможности применения методов зондовой микроскопии к исследованию биологических объектов при условии использования адекватной методики приготовления образцов для иммобилизации исследуемых структур на подложке.

Методики приготовления образцов для зондовой микроскопии нуклеиновых кислот

Универсальных методик приготовления образцов для решения широкого спектра задач зондовой микроскопии пока не существует, поэтому в каждом конкретном случае специфика задачи требует экспериментального определения адекватной процедуры иммобилизации исследуемых структур на подложке. При этом в большинстве случаев бывает необходимо, чтобы молекулы нуклеиновых кислот адсорбировались на подложку в развернутом состоянии. В настоящее время для анализа свойств данных макромолекул методом зондовой микроскопии апробирован целый ряд различных подходов к приготовлению образцов. Ниже остановимся подробнее на основных из них.

Первые надежные результаты исследования ДНК методом атомно-силовой микроскопии были получены в том случае, когда изучаемые структуры наносили из капли рабочего

раствора (раствора буфера, водно-спиртовой среды и т.п.) на поверхность слюды, модифицированной ионами металлов Mg^{2+} , Zn^{2+} , Co^{2+} , La^{3+} , Zr^{4+} и т.п. [Bustamante *et al.*, 1992; Vesenka *et al.*, 1992]. Эти ионы, по-видимому, служат связующими мостиками между отрицательно заряженной слюдой и отрицательно заряженными фосфатными группами молекулы ДНК (при нейтральном pH рабочих растворов). Модификация слюды может предшествовать процессу адсорбции макромолекул — в этом случае свежесколотую слюду помещают для предварительной обработки на некоторое время (минуты, часы) в раствор, содержащий катионы металлов, затем ее промывают дистиллированной водой и высушивают. После этого на модифицированную поверхность слюды наносят рабочий раствор с исследуемыми структурами. Другой подход — добавление солей металлов непосредственно к рабочему раствору — позволяет исключить этап предварительной обработки слюды (образцы наносят непосредственно на свежесколотую поверхность слюды). В этом случае процессы адсорбции макромолекул и формирования ионных мостиков протекают коррелированно. После высыхания капли рабочего раствора образцы, как правило, подвергают дополнительной промывке (в дистиллированной воде или в водно-спиртовой среде) для уменьшения поверхностной концентрации примесей.

В работе [Thundat *et al.*, 1992] методом АСМ проводили сравнительный анализ процесса адсорбции макромолекул ДНК на слюду, как с использованием стабилизирующих катионов металлов, так и без них. Было показано, что во втором случае адсорбированные молекулы нестабильны в процессе предварительной промывки образцов и при сканировании. Кроме того, макромолекулы характеризуются большим количеством запутанных и перекрученных участков, тогда как при использовании связующих ионов и применении предшествующей сканированию промывки образцов молекулы ДНК адсорбируются на поверхность подложки в расправленном состоянии.

Авторы работы [Thomson *et al.*, 1996] исследовали методом АСМ в жидкостной ячейке обратимое осаждение молекул ДНК при различных параметрах исходного раствора в реальном масштабе времени. Было показано, что адсорбция макромолекул ДНК на поверхность подложки (слюды) и величина силы адгезии существенно зависят от концентрации связующих ионов (оптимальное значение около 2 мМ для Zn^{2+}) и показателя pH среды (оптимальное значение около 7,5).

На сегодняшний день использование катионов металлов для связывания макромолекул с подложкой является, пожалуй, наиболее распространенной методикой приготовления образцов при проведении АСМ-исследований нуклеиновых кислот, что объясняется ее простотой и высокой воспроизводимостью результатов. На рис. 1 представлены АСМ-изображения молекул ДНК, контрастированных уранилацетатом и адсорбированных на поверхность слюды.

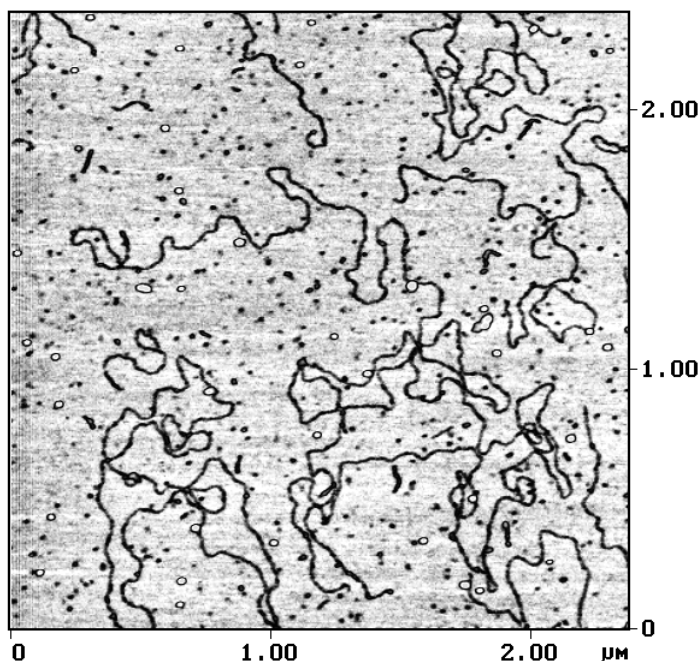


Рис. 1. Молекулы ДНК контрастированы уранилацетатом и адсорбированы на слюду

АСМ-исследование, контактный режим.

Размер кадра 2,3 × 2,3 мкм²

Из рисунка видно, что ионы уранила способствуют адсорбции макромолекул на подложку в расправленном состоянии. Приводимые изображения молекул характеризуются завышенными латеральными значениями — 15–20 нм — и заниженными вертикальными — около 1 нм, в то время как диаметр одиночной молекулы ДНК около 2 нм. Завышение латеральных размеров полученных изображений, по всей видимости, обусловлено конечным размером радиуса кривизны зонда. Причиной занижения вертикальных размеров может являться деформация молекулы под действием силы адгезии к подложке и давления острия зонда. Следует подчеркнуть, что такие артефакты являются типичными при АСМ-исследованиях молекул нуклеиновых кислот [Murray *et al.*, 1993].

Другая широко используемая методика химической модификации подложки для стабилизации молекул нуклеиновых кислот на поверхности — это силанизация слюды [Hu *et al.*, 1996]. Процесс силанизации не изменяет топографических особенностей поверхности слюды — она остается достаточно гладкой. В то же время улучшается связь макромолекулы с модифицированной подложкой, что повышает стабильность макромолекулы в процессе сканирования и обеспечивает возможность промывки поверхности, подлежащей исследованию. В работе [Lyubchenko, Gall *et al.*, 1992] при проведении АСМ-исследований нуклеиновых кислот (ДНК, двунитевой рибонуклеиновой кислоты (РНК)) в качестве подложки использовали поверхность слюды, химически модифицированную 3-аминопропилтриэтоксисиланом (APTES). Модификация включала ковалентную привязку аминогрупп молекул APTES к слюде, степень модификации контролировалась с помощью АСМ и выбиралась таким образом, чтобы шероховатость получаемой поверхности не затрудняла идентификацию исследуемых структур.

Было показано [Lyubchenko, Jacobs *et al.*, 1992], что применяемая методика достаточно удобна для проведения исследований распределения молекул нуклеиновых кислот по длинам. Представленные авторами результаты совпадали с данными электронной микроскопии (исследовались молекулы двунитевой РНК реовируса), при этом было показано, что при равенстве разрешающих способностей важным преимуществом АСМ является существенно менее сложная методика приготовления образцов.

Была продемонстрирована возможность использования модифицированной слюды при проведении исследований как на воздухе, так и в водной среде, — в обоих случаях

величина адгезии молекул нуклеиновых кислот к подложке позволяла осуществлять сканирование в контактном режиме. Авторы [Lyubchenko *et al.*, 1993] осуществляли сканирование одного и того же участка поверхности с адсорбированными макромолекулами на воздухе и в воде, при этом во втором случае наблюдалось увеличение разрешающей способности (примерно в три раза), что может быть связано с исключением негативного влияния капиллярных сил. Данные силы возникают из-за формирования водяного мениска между зондом и образцом за счет тонкой водной пленки, покрывающей поверхности при проведении исследований на воздухе. Капиллярные силы увеличивают силовое воздействие зонда на образец, что вызывает деформации макромолекулы или ее нестабильность в процессе сканирования и приводит к уменьшению разрешающей способности.

Другие исследователи также сообщают, что если АСМ-исследования проводятся либо в сухой газовой атмосфере (иногда для уменьшения относительной влажности температуру рабочей атмосферы повышают до 60–100° С [Прохоров и др., 1996]), либо в жидкостной ячейке [Hansma H.G. *et al.*, 1992; Yang, Shao, 1993], то влияние капиллярных сил уменьшается, что увеличивает достигаемое пространственное разрешение. Применение режима прерывистого контакта (tapping mode) [Zhong *et al.*, 1993; Hansma P.K. *et al.*, 1994] также позволяет исключить влияние капиллярных сил. Результат подобного АСМ-исследования молекул ДНК приведен на рис. 2.

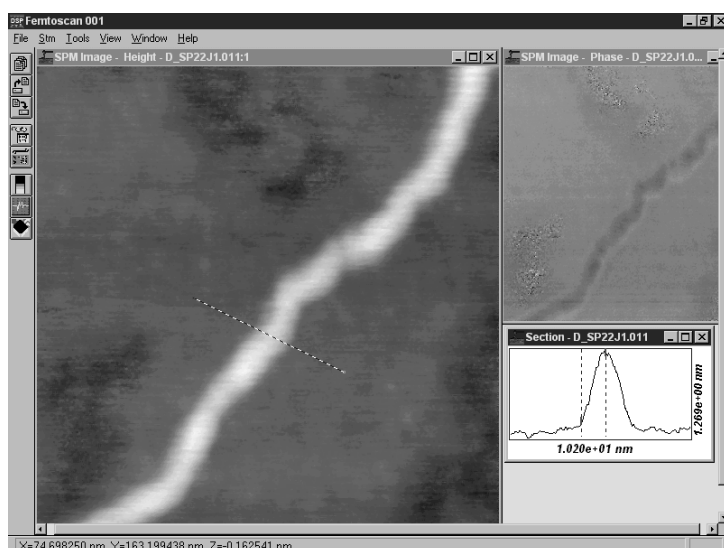


Рис.2. Фрагмент молекулы ДНК, адсорбированной на слюду.

АСМ-исследование, режим прерывистого контакта

Размер основного кадра 0,2 × 0,2 мкм²

Режим прерывистого контакта, применяемый для исследования в жидких средах, позволяет сегодня достичь разрешения, необходимого для визуализации витков двойной спирали ДНК [Hansma *et al.*, 1995].

На пути подбора адекватного подхода к приготовлению образцов может оказаться полезным накопленный за десятилетия исследований багаж соответствующих методик электронной микроскопии. В упрощенном варианте многие из этих методик могут применяться и для решения задач зондовой микроскопии. Так, модифицированный метод Кляйншмидта (метод белковой пленки) дает хорошие результаты при использовании гидрофобных подложек [Yang *et al.*, 1992].

Для разворачивания молекул ДНК на поверхности подложки применяют также хлорид бензилдиметиламмония (ВАС) [Schaper *et al.*, 1993; Jelen *et al.*, 1994] — широко используемый в электронной микроскопии реагент, представляющий собой катионное поверхностно-активное вещество (ПАВ). ВАС в малых концентрациях (около $5 \times 10^{-5}\%$) добавляют непосредственно в раствор, содержащий макромолекулы перед нанесением их

на поверхность слюды. Вследствие свойств ПАВ, на поверхности капельки, наносимой на подложку, формируется стабильная пленка молекул ВАС (со связанными с ней молекулами ДНК), которая потом распределяется по поверхности слюды и стабилизируется за счет сил электростатического взаимодействия. Добавление к рабочему раствору других ПАВ (в малых концентрациях) также способствует стабилизации молекул нуклеиновых кислот на поверхности слюды. Так, в работе [Scharer *et al.*, 1994] для разворачивания ДНК на поверхности успешно применили 2,4,6-трис(диметиламинометил)фенол (DMP-30) и хлорид цетилпиридиния (СР), представляющие собой, соответственно, неионное и катионное ПАВ. На рис. 3 приведен результат АСМ-исследования [Sergeyev *et al.*, 1998] ДНК бактериофага Т4, адсорбированной на поверхность слюды из раствора, содержащего малые концентрации бромид цетилтриметиламмония (ЦТАБ).

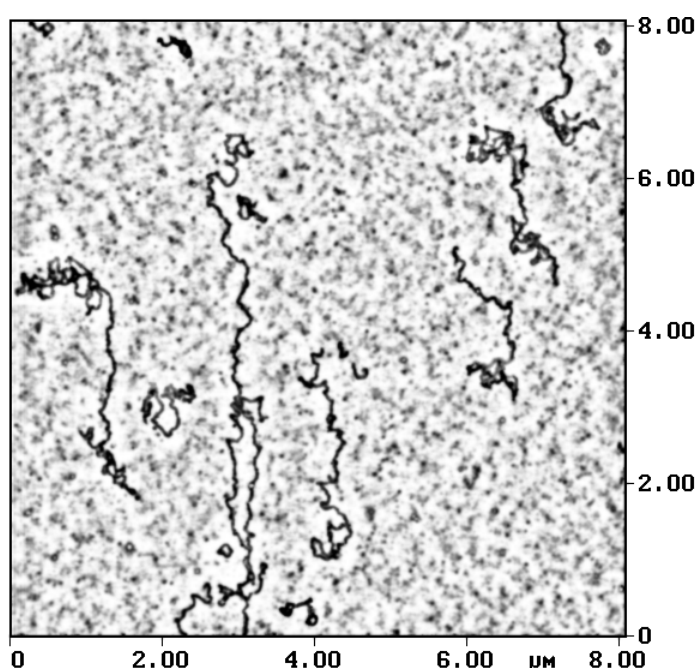


Рис.3. Молекулы ДНК бактериофага Т4 адсорбированы из буфера в присутствии бромида цетилтриметиламмония на слюду

АСМ-исследование, контактный режим.

Размер кадра 8×8 мкм²

В работе [Butt *et al.*, 1993] для иммобилизации молекул ДНК применили другую методику, сходную с традиционными для электронной микроскопии. Макромолекулы адсорбировали на поверхность слюды, сверху напыляли слой углерода. После этого на углерод приклеивалась стальная пластинка, слюда удалялась, и открытой для сканирования оказывалась внутренняя (обращенная прежде к слюде) сторона углеродной пленки с жестко закрепленными в ней макромолекулами. Шероховатость поверхности приготовленной таким образом углеродной пленки составляла, по оценкам авторов, единицы ангстрем и допускала однозначную идентификацию отдельных молекул ДНК. Авторы работы отмечают высокую стабильность приготовленных образцов, — макромолекулы не разрушались при больших силах взаимодействия между зондом и образцом, результаты не зависели от среды исследования (эксперименты проводились как на воздухе, так и в жидкости), длительное хранение не влияло на качество образцов.

Успехи применения атомно-силовой микроскопии к исследованию молекул нуклеиновых кислот позволили достичь прогресса и при проведении подобных экспериментов методами сканирующей туннельной микроскопии. Хорошие результаты были получены при СТМ-исследовании молекул ДНК, адсорбированных на химически модифицированных поверхностях металлов [Bottomley *et al.*, 1992]. Химическая модификация включала ковалентную связь химически поляризуемых групп тиолов с чистой поверхностью металла. Адсорбция ДНК осуществлялась за счет кулоновского взаимодействия молекулы с плотно упакованной мономолекулярной пленкой тиолов,

ориентированных положительными функциональными группами в направлении к поверхности молекулы ДНК. Характерной особенностью представленных в работе [Allison *et al.*, 1993] изображений молекул ДНК является отрицательный контраст (при движении над молекулой туннельная игла опускается ниже, чем при движении над поверхностью подложки), связанный, по-видимому, со слабой проводимостью макромолекулы.

Другой перспективный подход к исследованию макромолекул методами СТМ — применение низкотоковой туннельной микроскопии [Dunlap, 1996] с рабочим диапазоном туннельного тока менее 1 пА. В этом случае экспериментальные результаты [Guckenberger *et al.*, 1994] свидетельствуют о возможности визуализации молекул ДНК, адсорбированных на поверхности диэлектрической подложки (слюды). Транспорт заряда в системе зонд-образец-подложка осуществляется за счет проводимости ультратонкой пленки воды, покрывающей поверхности образца и подложки при проведении исследований в условиях контролируемой относительной влажности. Согласно экспериментальным результатам оптимальное значение последней составляет 60–65%.

Применение зондовой микроскопии для исследования структуры и свойств молекул нуклеиновых кислот и их комплексов

При использовании адекватной методики приготовления образцов сканирующий зондовый микроскоп представляет собой удобный и надежный прибор для исследования свойств биологических структур на молекулярном уровне. Убедительным доказательством этого утверждения могут служить результаты работ, посвященных исследованию конформационных свойств молекул нуклеиновых кислот и их комплексов с белками, поверхностно активными веществами и т.п.

Авторы работы [Hansma H.G. *et al.*, 1994] исследовали влияние определенных лигандов (дистамицина и микрогонотропена-6b) на конформационные свойства нескольких типов молекул ДНК с помощью АСМ в режиме прерывистого контакта. Результаты исследований не только обеспечили визуальное доказательство влияния данных лигандов на конформацию ДНК, но и позволили сделать определенные количественные оценки, основанные на анализе представленных авторами гистограмм распределения расстояния между концами ДНК. Возможность набора статистики, основанной на анализе большого количества изображений отдельных молекул ДНК (100–200 и более), повышает достоверность интерпретации полученных результатов и свидетельствует о высокой надежности метода зондовой микроскопии.

В работе [Rees *et al.*, 1993] исследовали комплексы РНК-полимеразы из *Escherichia coli* с ДНК, содержащей I P_L промотор. Образованные комплексы были визуализированы методом АСМ, на полученных изображениях наблюдались молекулы ДНК с РНК-полимеразой, локализованной на расстоянии ⁴⁰ нм от одного из концов. Проводился анализ структуры комплекса РНК-полимеразы и ДНК как в открытых комплексах, связанных с промотором (ОРС), так и в стабильных элонгационных комплексах (С15) с образованным 15-нуклеотидным транскриптом. Было показано, что в области прикрепления РНК-полимеразы происходит изгиб молекулы ДНК, причем средний угол изгиба для ОРС и С15 составлял $54 \pm 31^\circ$ и $92 \pm 37^\circ$, соответственно (распределение угла изгиба для того же участка шаблона в отсутствии РНК-полимеразы является гауссовым с центром в 0°).

На основании обнаруженного различия в значениях средних углов изгиба для OPCs и C15 авторы делают вывод, что процесс транскрипции сопровождается изменением структуры комплекса РНК-полимеразы с ДНК, обусловленной конформационными изменениями полимеразы.

Авторы работы [Sergeyev *et al.*, 1997] применили ряд методик (в том числе зондовую микроскопию) для исследования конформационных свойств комплексов ДНК-ПАВ. Было показано, что при взаимодействии ДНК с ПАВ происходит сворачивание макромолекулы в компактный тороидальный комплекс. Вывод о тороидальной структуре данных компактизованных комплексов сделан именно на основании результатов исследования зондовой микроскопии. Наряду с этим было обнаружено, что тороподобные комплексы ДНК-ПАВ, образованные в водной фазе, растворимы в хлороформе, в то время как ДНК в отсутствие поверхностно-активных веществ в хлороформе не растворяется [Пышкина и др., 1996]. В случае образования этих комплексов в двухфазной системе вода/хлороформ гидрофобные частицы комплекса ДНК-ПАВ оказываются нерастворимыми в водной среде и переходят в малополярный органический растворитель — хлороформ, пересекая границу раздела фаз. Методы АСМ позволили визуализировать тороподобные комплексы ДНК-ПАВ, перешедшие через границу раздела фаз в хлороформ [Андреева и др., 1997]; результаты представлены на рис. 4.

Подобные исследования с применением зондовой микроскопии для изучения конформационных превращений молекул ДНК в различных средах, моделирующих внутреннюю часть липидного бислоя биологических мембран, открывает уникальную возможность для понимания механизмов трансмембранного переноса [Пышкина, 1997].

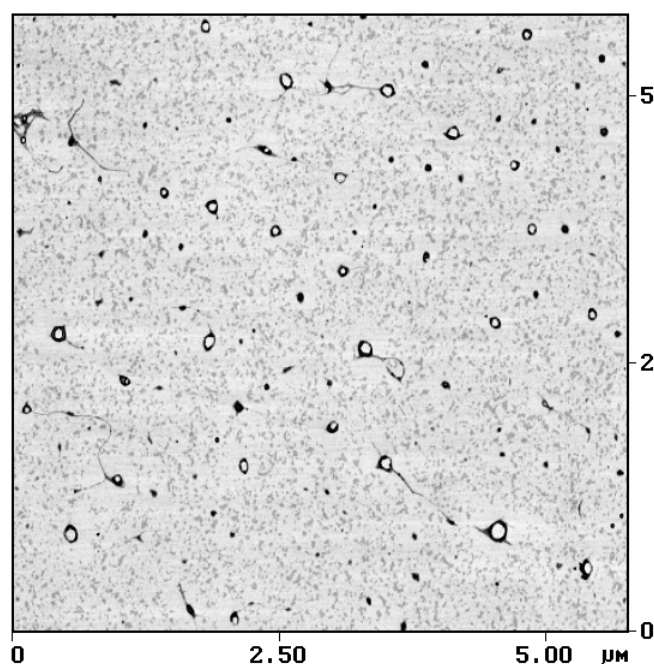


Рис. 4. Изображение тороподобных комплексов ДНК-ПАВ

В качестве ПАВ использовали хлорид дистеарилдиметиламмония; макромолекулы ДНК состояли из 300–500 пар оснований. Комплексы образованы в водной фазе, переведены через границу раздела фаз в хлороформ и из хлороформа адсорбированы на поверхность слюды. АСМ-исследование, контактный режим.

Размер кадра 6×6 мкм²

Ту же природу имеет компактная тороидальная морфология макромолекулы ДНК в водно-спиртовых средах. Известно, что в водно-спиртовых средах различные мультивалентные катионы, в том числе двухвалентные катионы металлов, вызывают конденсацию ДНК [Bloomfield, 1991]. Но и в отсутствии конденсирующих агентов методами АСМ были визуализированы компактные тороидальные структуры, образованные молекулами ДНК в 50%-ной смеси изопропанола и 0,05 М ТВЕ буфера [Галлямов и др., 1998] — рис. 5.

Возможный механизм образования данных структур состоит в том, что в присутствии спирта противоионы натрия сближаются с отрицательно заряженными фосфатными группами молекулы ДНК, экранируя тем самым электростатическое отталкивание витков двойной спирали и переводя макромолекулу в компактное тороидальное состояние.

Возможность АСМ-визуализации молекулярных процессов продемонстрирована в работе [Guthold *et al.*, 1994] на основе последовательного анализа процесса образования неспецифичных комплексов молекулы ДНК и РНК-полимеразы в реальном масштабе времени. Схема эксперимента включала в себя адсорбцию макромолекул ДНК на слюду из 10 мМ HEPES буфера в присутствии ионов магния (1–10 мМ $MgCl_2$), затем следовали промывка и высушивание образцов в эксикаторе. После этого образцы помещали в жидкостную ячейку микроскопа, начинали процесс сканирования, а затем в раствор вводили РНК-полимеразу. Было показано, что образование комплексов белок-ДНК наблюдается уже через несколько секунд после добавления полимеразы, что свидетельствует о сохранении нативной конфигурации РНК-полимеразы и ДНК в процессе приготовления образцов и

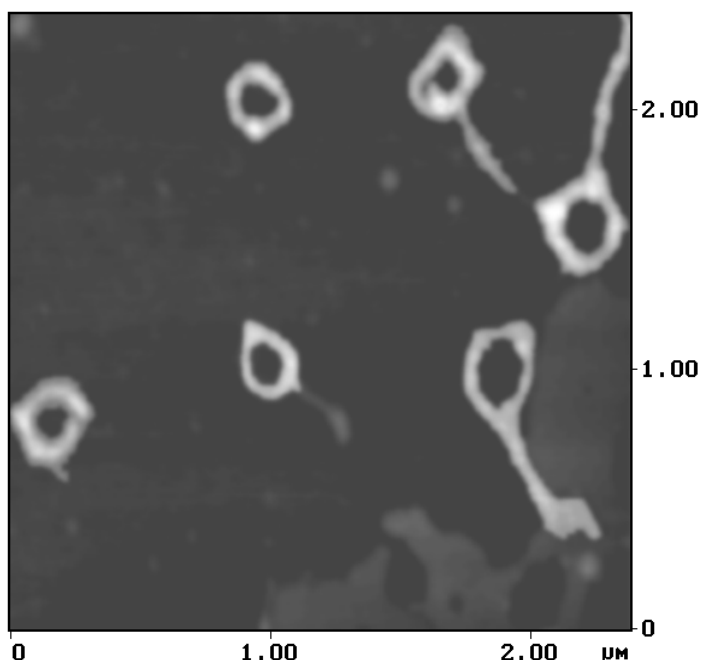


Рис. 5. Тороидальные структуры, образованные молекулами ДНК в 50%-ной смеси изопропанола и буфера, нанесены на поверхность слюды

АСМ-исследование, контактный режим.

Размер кадра $2,5 \times 2,5 \text{ мкм}^2$

проведения исследований. На основе анализа распределения участков связывания белка относительно концов ДНК делался вывод о преобладании неспецифичного взаимодействия, однако диффузия РНК-полимеразы вдоль молекулы ДНК не наблюдалась, что, возможно, объясняется влиянием подложки. Данные результаты демонстрируют возможность использования зондовой микроскопии для исследования процессов, ответственных за распознавание и сборку макромолекулярных комплексов в физиологических условиях.

Большое прикладное значение имеет возможность решения методом АСМ задачи картирования ДНК. Специфические участки макромолекулы помечаются определенными маркерами, анализ местоположения этих маркеров на получаемых АСМ-изображениях позволяет составлять карты относительного расположения определенных участков последовательности нуклеотидов. Так, в работе [Murray *et al.*, 1993] продемонстрирована возможность визуализации местоположения биотина, ковалентно привязанного к первому нуклеотиду праймера. Биотин помечался белковым комплексом стрептавидин-стафилококковый белок А (стрептавидин имеет высокую способность связывания с

биотином, а белок А увеличивает размеры маркера для однозначной его идентификации на АСМ-изображениях).

В работе [Клинов, 1997] был предложен метод картирования клонированных в плазмидный вектор последовательностей LRT (длинные концевые повторы) с помощью R-петель, наблюдаемых в АСМ. R-петли формировались последовательностями РНК из 345 и 380 нуклеотидных оснований, комплементарными к U3 и U5 областям LTR человеческого эндогенного ретровируса К-10 (HERV-K10). Различная длина зондов позволяла уже из одной гистограммы определить как положение, так и ориентацию LTR. Полученные результаты позволяют предположить, что в будущем разрешение приборов СЗМ может быть достаточным для определения последовательности нуклеотидов ДНК.

Взаимодействие РНК вируса табачной мозаики и вирусного белка играет важную роль в процессах размножения вирусов. Важный вклад в понимание механизма данных процессов может дать исследование последовательного освобождения РНК от белковой оболочки под действием соответствующих реагентов. Подобное исследование было проведено методом АСМ [Drygin *et al.*, 1997]. В данной работе представлены результаты исследования разрушения вирусных частиц под действием диметилсульфоксида (ДМСО), мочевины и в водных растворах с щелочным значением pH. АСМ-исследование промежуточных стадий разрушения вирусных частиц показало, что процесс высвобождения молекулы РНК протекает одинаково во всех трех случаях. На рис. 6 представлены АСМ-изображения цельных вирусных частиц до начала процесса обработки. Высота вирусных частиц составляет 20 нм над поверхностью подложки. Неравномерное распределение длин вирусных частиц объясняется, по-видимому, межвирусной агрегацией “торец в торец” двух, трех и более вирусов (в предположении монодисперсности препарата вируса).

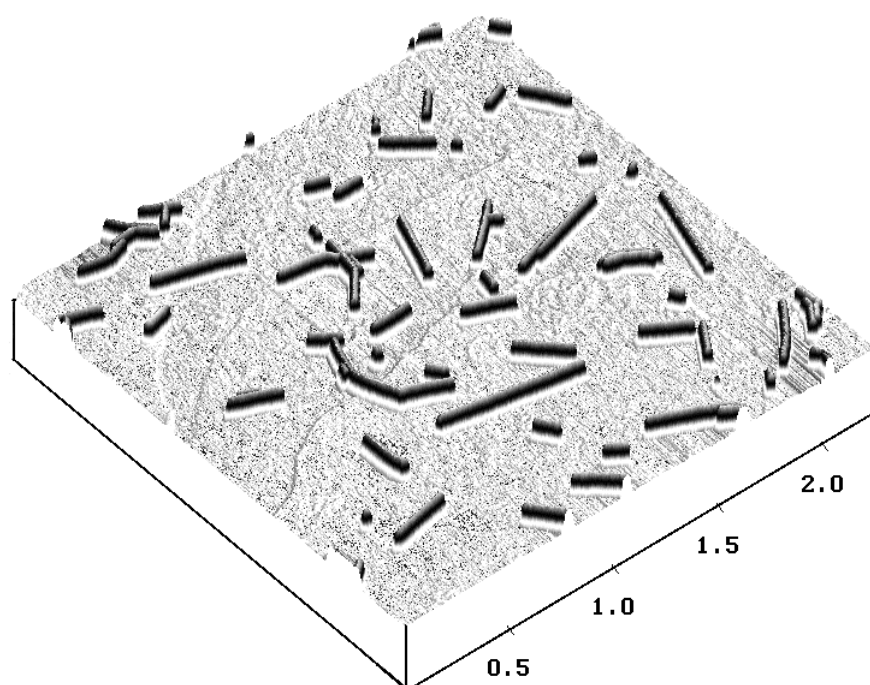


Рис. 6.
Отдельные
частицы вируса
табачной
мозаики
адсорбированы
на поверхность
пирографита

АСМ-
исследование,
режим
прерывистого
контакта.

Размер кадра
 $2,5 \times 2,5 \text{ мкм}^2$

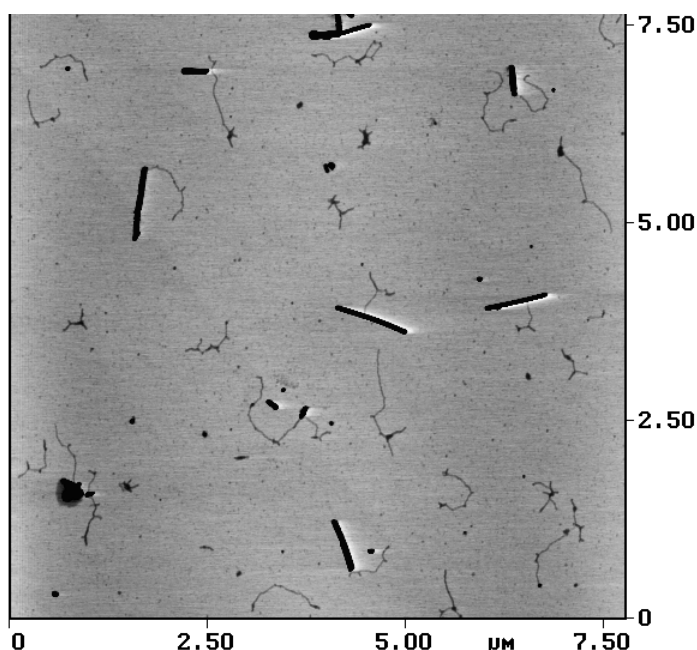


Рис. 7. Промежуточная стадия обработки вирусных частиц диметилсульфоксидом (ДМСО)

Наблюдаются частично разрушенные вирусы и выходящие из белковой оболочки молекулы РНК. Структуры адсорбированы на подложку из слюды. АСМ-исследование, контактный режим.

Размер кадра $7,5 \times 7,5 \text{ мкм}^2$

На рис. 7 изображены частично разрушенные вирусные частицы: наблюдаются отдельные молекулы РНК, выходящие из вирусных остатков. Набранная статистика свидетельствует о том, что в большинстве случаев РНК выходит из торца одиночной вирусной частицы. Наблюдаемые исключения из данного правила являются следствием той же агрегации “торец в торец” частично разрушенных вирусных структур. В случае, когда несколько вирусных остатков образуют агрегат, нити РНК, выходящие из агрегатной структуры, могут служить маркерами для концов вирусных частиц. На рис. 8 приведены результаты исследования заключительной стадии процесса обработки — визуализированы полностью освобожденные от белковой оболочки молекулы РНК. Результатом работы является демонстрация применимости АСМ для исследования взаимодействия РНК с белками — в частности, возможности решения задачи картирования данного взаимодействия.

Еще одно важное преимущество прибора зондового микроскопа как средства, позволяющего проводить прецизионные исследования локальных свойств поверхности, продемонстрировали авторы работы [Lee *et al.*, 1994]. Они проводили прямые исследования силового взаимодействия, ответственного за формирование витков молекулы ДНК, по следующей схеме.

На поверхностях подложки и кремниевого микрозонда создавались два типа покрытия, представляющего собой слой ковалентно привязанных за один из концов определенных комплементарных олигомеров — в одном случае (АЦТТ)₅, в другом (ЦАГТ)₅. В процессе взаимодействия пары данных нуклеотидов (длиной в 20 оснований) возможно образование комплексов с 20, 16, 12, 8 и 4 парами взаимодействующих оснований.

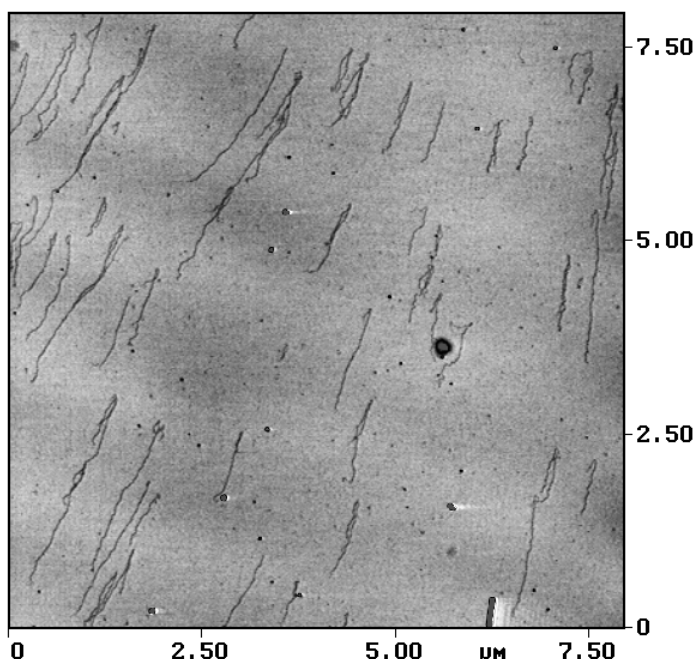


Рис. 8. Макромолекулы РНК полностью освобождены от белковой оболочки в результате обработки вирусных частиц 70%-ным раствором ДМСО

Структуры стабилизированы на поверхности слюды. АСМ-исследование, контактный режим.

Размер кадра $7,5 \times 7,5 \text{ мкм}^2$

В ходе эксперимента многократно измерялась кривая силового взаимодействия $F(z)$ между зондом и подложкой. На основании этих результатов определяли силу адгезии и строили гистограммы ее распределения. В случае отсутствия специфического взаимодействия между комплементарными участками наблюдалось бы однородное гауссово распределение для силы адгезии. Однако на полученных гистограммах четко прослеживались отдельные пики ($1,52 \pm 0,19$; $1,1 \pm 0,13$; $0,83 \pm 0,11 \text{ нН}$), ответственные за специфическое взаимодействие между 12, 16 и 20 образованными парами оснований для единичной пары комплементарных нуклеотидов (авторы указывают, что комплексы с 8 и 4 взаимодействующими парами оснований термодинамически нестабильны при 27°C — температуре проведения исследований).

Сходная экспериментальная схема — с образованием между взаимодействующими поверхностями “мостиков” в виде отдельных нитей молекулы ДНК длиной в 160 оснований — использовалась для анализа внутримолекулярных упругих свойств. Таким образом, авторам удалось продемонстрировать возможность применения АСМ для прямого количественного анализа межмолекулярного и внутримолекулярного взаимодействия в комплексах биологических и синтетических макромолекул, что открывает новые перспективы для обнаружения и локализации специфических последовательностей нуклеотидов с ангстремным разрешением.

БЕЛКИ И БЕЛОК-МЕМБРАННЫЕ КОМПЛЕКСЫ

Атомно-силовая микроскопия

С помощью АСМ удается добиться атомного разрешения на твердой кристаллической поверхности, например пиррографите [Binnig *et al.*, 1987]. Однако при работе с “мягкими” биологическими объектами дело обстоит далеко не так хорошо. Одним из примеров молекулярного разрешения в АСМ на биологических объектах является изображение пленки Ленгмюра-Блоджет (ЛБ пленки) бегеновой кислоты (период 0,45 нм) и смешанных ЛБ пленок бегеновой кислоты и фермента глюкозы оксидазы на графите, позволяющих выявить отдельные молекулы глюкозы оксидазы и элементы их пространственной организации [Dubreuil *et al.*, 1995] (рис. 1).

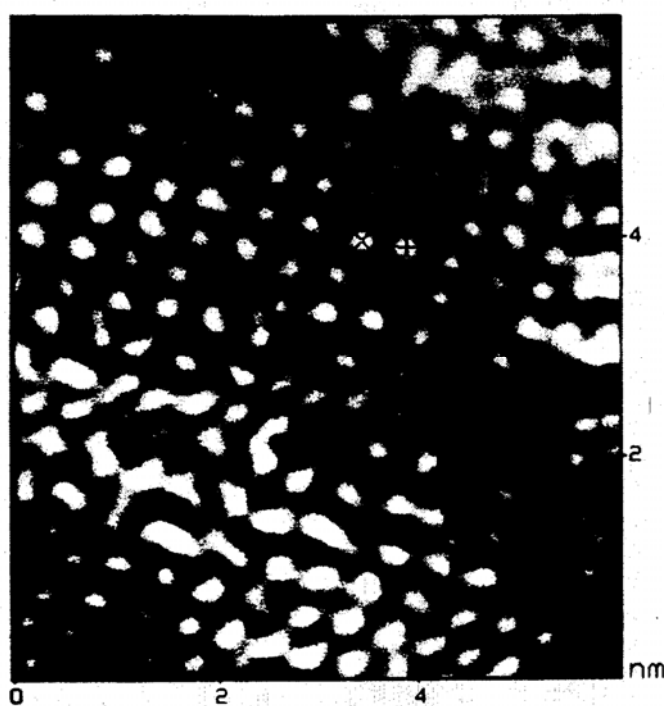


Рис. 1. АСМ-изображение смешанного бислоя бегеновой кислоты и глюкозы оксидазы, перенесенного на графит. Расстояние между соседними молекулами 0,45 нм. Размер кадра $6 \times 6 \text{ нм}^2$

Авторы работы [McMaster *et al.*, 1996] получили изображение периодической структуры газовых везикул из цианобактерий *Anabaena flos-aquae* в пропанол, состоящих из блоков размером 4,6 нм. Детальный анализ изображений позволяет восстановить структуру везикул, согласующуюся с данными рентгено-структурного анализа.

Возможность применения АСМ для изучения белковых пленок на границе раздела сред после перенесения на подходящую подложку продемонстрирована в [Gunning *et al.*, 1996]. Пленки бычьего сывороточного альбумина (БСА) переносили с плоской границы раздела гексадекан/вода, а α -казеина с границы вода/воздух на слюду. С помощью жидкостной ячейки образцы изучались в бутаноле. Пленка БСА представляет собой сеть, состоящую из глобулярных структур, размер которых (несколько нанометров) позволяет считать их отдельными молекулами белка. АСМ дает возможность исследовать внеклеточный матрикс непосредственно без фиксации, приготовления реплики, высушивания в критической точке, прокрашивания. С учетом формы и размеров острия, качество

измерения ширины фибриллы можно считать близким к предельному - 8 нм при данных рентгеновского рассеяния 1,5 нм [Chernoff E.A., Chernoff D.A., 1992].

Сопоставление изображений в режимах постоянной высоты и силы трения помогает отличить особенности рельефа подложки от адсорбированных биологических объектов, если сила трения на последних отлична от силы трения на материале подложки. Особенно часто это используется при изучении мембран и ленточных пленок липидов и других поверхностно активных веществ. В этом режиме наблюдали организацию в филаменты с-концевого фрагмента тау белка [Masai *et al.*, 1996].

В контактном режиме из-за наличия латеральной составляющей прикладываемой силы адсорбированные на подложку биологические объекты при сканировании могут увлекаться острием, как бы счищаться. Устранение латеральных сил между образцом и зондом достигается в режиме прерывистого контакта: при сканировании игла зонда совершает дополнительные колебания по нормали к поверхности образца с амплитудой ≈ 100 нм на частоте 100–300 кГц. Измерение силы взаимодействия в режиме прерывистого контакта затруднено. Из механических деформаций мягких молекул ее можно приближенно оценить как не превышающую 200 пН [Fritz *et al.*, 1995].

Уменьшение силы воздействия на образец со стороны зонда достигается при наблюдении в жидкости. Погружение лезвия в жидкость имеет ряд преимуществ. Происходит уменьшение сил Ван-дер-Ваальса, исчезают капиллярные силы, вносящие основной вклад во взаимодействие зонд/образец в воздушной среде. При наблюдении в жидкости удается избежать типичных загрязнений поверхности образца при его высушивании от раствора. Однако здесь самое важное для биолога – это возможность исследовать биологически важные процессы *in vitro* и на границе раздела жидкость/твердое тело.

Было замечено, что лезвие в процессе работы в этом режиме очищается от органического загрязнения. При вибрации налипший материал стряхивается или остается на поверхности, когда острие соприкасается с ней [Hansma *et al.*, 1994].

Сочетание режима прерывистого контакта с наблюдениями в жидкой среде позволяет минимизировать силы воздействия на поверхность образца. В этом случае отпадает необходимость в специальной фиксации биообъекта. Его закрепление на подложке происходит за счет физадсорбции. Вследствие этого возможная деформация биообъекта, вызванная силами, действующими со стороны подложки, уменьшена.

При прямой адсорбции молекул белка на подложку горизонтальные размеры в режиме прерывистого контакта получаются завышенными из-за уширения, вызванного конечным радиусом кривизны зонда, как и в контактном режиме. Например, для толщины фибриллы G-актина данные рентгеновской кристаллографии составляют 5,5 нм, а при адсорбции на подложку в буферном растворе на АСМ-изображении в режиме прерывистого контакта фибриллы уширены до 15 нм [Fritz *et al.*, 1995].

Кажущаяся высота молекул белка в режиме прерывистого контакта также оказывается завышенной, тогда как в контактном режиме она, как правило, занижена или близка к ожидаемой. Так, для адсорбированного на слюде лизоцима в режиме прерывистого контакта в жидкости она составляет 6–8 нм против ожидаемых 3 нм в контактном [Fritz *et al.*, 1995]. Существует несколько возможных объяснений этого эффекта.

Во-первых, кажущееся изменение высоты может быть обусловлено упругими свойствами мягких белков. Представим себе мысленный эксперимент. Пусть левый сканирует над физически однородным образцом, где присутствует только топографический рельеф. При приближении к возвышению расстояние между острием зонда и поверхностью сокращается, вызывая снижение амплитуды резонансных колебаний левера. Тогда пьезокерамика будет удалять образец от левера до тех пор, пока не будет восстановлено прежнее значение амплитуды. Теперь вообразим себе топографически однородный образец, включающий область, где сильно притяжение между поверхностью и зондом. Над этой областью зонд будет притягиваться к образцу, что вызовет уменьшение зазора между ними и, как следствие, снижение амплитуды колебаний. Обратная связь начнет удалять образец, и на изображении это будет выглядеть как наличие в данной области топографического возвышения. Если белок адсорбирован на слюде, то областям топографических неровностей присущ отличный от подложки характер взаимодействия с острием зонда. Таким образом, изображение в режиме прерывистого контакта отражает не только топографическую картину, но и характер сил взаимодействия между образцом и зондом одновременно.

Во-вторых, взаимодействие между зондом и образцом может быть вызвано локальным изменением заряда из-за электростатических свойств белка.

В-третьих, не исключено, что белки непрерывно движутся с характерным временем порядка миллисекунд, что близко к периоду резонансных колебаний левера. При работе с белками не стоит забывать, что белок не является неподвижной системой, и каждой молекуле присущи собственные внутренние движения. Если отключить сканирование вдоль медленной оси, можно построить временную зависимость высоты белков, адсорбированных на подложке [Thomson *et al.*, 1996]. Размер флуктуаций оказывается больше, чем в случае просто мягкого материала подложки. Это свидетельствует о том, что флуктуации вызваны не только взаимодействием зонда и образца, как в случае мягкого материала, а изменением состояния белковой молекулы, ее собственным движением.

В-четвертых, белок может быть окружен шубой слабо адсорбированных ионов и молекул, что приводит к увеличению кажущихся размеров.

Однако по сравнению с режимом прерывистого контакта, контактный режим гораздо проще в обращении и настройке, используемые левый значительно дешевле, а главное он позволяет получать хорошие изображения при сканировании с большей частотой 5–15 Гц, в зависимости от размера кадра (для сравнения в режиме прерывистого контакта скорость сканирования обычно ограничена 1,5 Гц), что не только существенно экономит время экспериментатора, но и позволяет регистрировать изменения, происходящие в образце за меньшие промежутки времени.

В бесконтактном режиме используется тот же принцип, что и в режиме прерывистого контакта, с той лишь разницей, что в нижней точке колебания зонд не касается образца. Так как зонд и образец не находятся в прямом контакте, горизонтальные силы, могущие привести к разрушению, практически отсутствуют. Расстояние между образцом и зондом (обычно 3–5 нм) выбирают так, чтобы, с одной стороны, обеспечить достаточную величину силы притяжения, а с другой – не допустить разрушительного столкновения зонда с образцом.

Выявить преимущества бесконтактного режима по сравнению с контактным позволяет сопоставление качества изображения и разрешения на одних и тех же образцах [Braunstein, 1995]. Для филаментов F-актина завышенная ширина (около 20 нм) по

сравнению с данными электронной микроскопии (7– 8 нм) в бесконтактном режиме несколько меньше, чем в контактном, а полученное значение шага спирали значительно ближе к этим данным.

В контактном режиме асимметрия и дефекты зонда сильно сказываются на его разрешающей способности. Так, для тех же F-актиновых филаментов [Braunstein, 1995] разрешение элементов спирали в одном и том же кадре зависело от угла между филаментом и направлением сканирования. При изгибе филамента разрешение могло ухудшиться или вовсе исчезнуть. В бесконтактном же режиме этот эффект значительно слабее, что свидетельствует о меньшем влиянии формы зонда на разрешающую способность.

Так как сила притяжения гораздо слабее, чем сила отталкивания, для детектирования сигнала требуется дополнительное усиление, приводящее к повышению уровня шума. Кроме того, работа в этом режиме часто оказывается нестабильной, так как леввер может “залипнуть”. Значение градиента силы в бесконтактном режиме часто превышает величину константы жесткости леввера, что приводит к нестабильности при регистрации отклонения. Для сведения нестабильности к минимуму применяются левверы с большой константой жесткости (100 Н/м), что, в свою очередь, снижает чувствительность прибора [Yang *et al.*, 1994a].

Изолированные белки

Естественным окружением огромного количества белков является вода или растворы солей. Для наблюдения в АСМ молекулы белков должны быть иммобилизованы на твердой подложке. Современная техника АСМ позволяет работать с поверхностью, погруженной в жидкость, и при приготовлении образцов вовсе не подвергать высушиванию исследуемый объект. Поэтому основным достоинством такого подхода при работе с водорастворимыми белками является возможность помещения их в условия, максимально приближенные к нативным.

Не менее существенным преимуществом жидкой среды оказывается значительное снижение контактных сил до величин менее 0,1 нН. При этом уменьшается воздействие на объект со стороны острия, и для многих биологических объектов удается получить качественные изображения. Однако даже при таких малых силах очень сложно наблюдать слабо адсорбированные молекулы в контактной моде, особенно в буферных растворах, так как при движении зонда сохраняются латеральные (лежащие в плоскости образца) силы трения. Молекулы часто увлекаются острием, что мешает их визуализации и, кроме того, может приводить к загрязнению острия, и, следовательно, потере разрешения. Применение режима прерывистого контакта особенно эффективно при исследовании адсорбированных белковых молекул, так как в этом случае они “закреплены” слабее, чем при ковалентной пришивке или в составе ленгмюровских пленок или мембран. В режиме прерывистого контакта можно получить изображения отдельных адсорбированных молекул на слюде. Комплексы цитохрома P450 2B4 и NADPH-P450 редуктазы показаны на рис. 2.

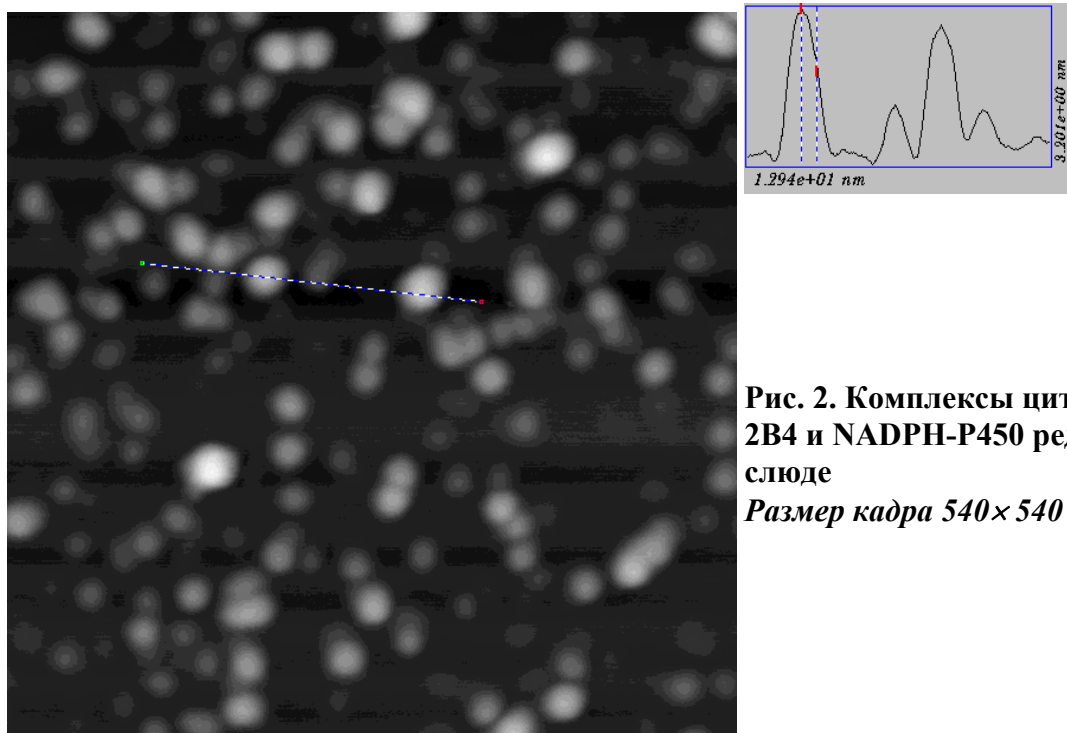


Рис. 2. Комплексы цитохрома Р450 2В4 и NADPH-Р450 редуктазы на слюде
Размер кадра 540×540 нм²

Тем не менее, специально разработанные методы приготовления объекта наблюдения помогают избежать проблемы иммобилизации и в контактном режиме. Так, например, разработан интересный метод ковалентной пришивки исследуемого белка к перенесенным на подложку искусственным липидным мембранам [Weisenhorn *et al.*, 1990].

Помимо возможного улучшения качества изображения работа в жидкости открывает новые возможности для наблюдения биологических процессов *in vitro*. Например, самосборку филаментов из мономеров актина *in vitro* удалось наблюдать, используя в качестве подложки слюду [Weisenhorn *et al.*, 1990]. Самосборка актиновых филаментов происходит в присутствии заряженных мембран, в условиях, при которых в объеме полимеризация не наблюдается. Известно, что плотность поверхностного заряда на слюде сравнима с поверхностной плотностью отрицательного заряда липидных мембран. Наблюдение процесса образования монослоев IgG на поверхности слюды при его сорбции из раствора указывает на существование латеральных сил взаимодействия между соседними молекулами IgG [Lin *et al.*, 1990]. Это не является неожиданным, так как этот белок склонен к самоагрегации. В режиме прерывистого контакта в жидкости стала возможной не только визуализация адсорбированных на слюде молекул лизоцима, но и прямое наблюдение его ферментативной активности [M. Radmacher, M. Fritz, H. Hansma, P. Hansma, 1994].

Так как электростатическая компонента силы взаимодействия между леввером и поверхностью образца является одной из важнейших компонент и во многом определяется поверхностной плотностью электрического заряда, экранирование поверхностных зарядов можно считать одним из самых эффективных приемов для получения стабильных АСМ-изображений в водных растворах.

Погашение зарядов на границе раздела пленок отрицательно заряженного ферритина и положительно заряженного полипептидного монослоя поли-1-бензил-L-гистидина (PBLH) – один из примеров такого рода [Onishi *et al.*, 1993]. Создание такого эффекта “самоэкранирования” зарядов, содержащихся в самом образце, позволяет снизить силу взаимодействия между зондом и образцом до величины значительно меньшей, чем 10^{-10} Н,

что дает возможность получать воспроизводимые устойчивые изображения двумерной упорядоченной решетки молекул ферритина в буферном растворе (рис. 3).

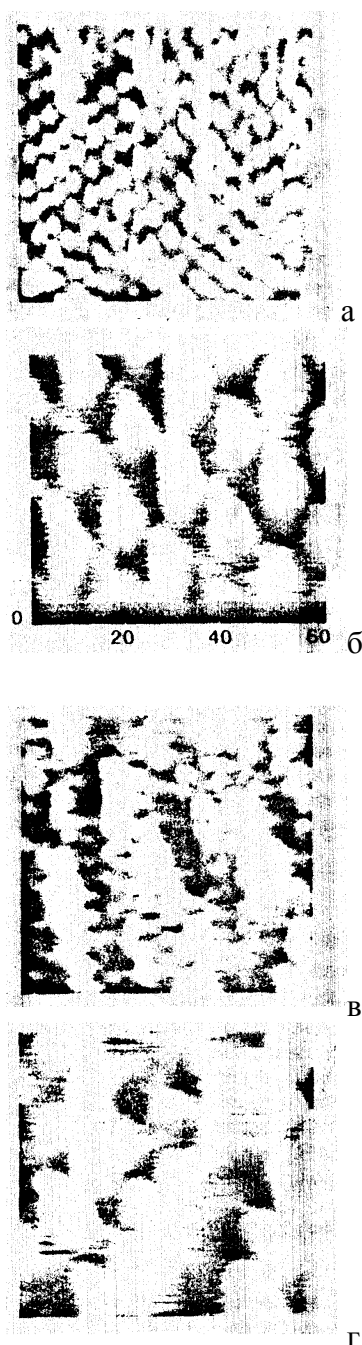


Рис. 3. Гексагональная плотная упаковка молекул ферритина (а, б) и области с упаковкой неоднородного характера (в, г) Изображения получены в контактном режиме.

Размер кадра: $210 \times 210 \text{ нм}^2$ (а, в), $63 \times 63 \text{ нм}^2$ (б, г)

С этой точки зрения приготовление образца с использованием эффекта “самозекранирования” – один из наиболее подходящих методов получения АСМ изображений водорастворимых белков. Этим же методом изучали структуру двумерного кристалла каталазы [Onishi *et al.*, 1996]. Отрицательно заряженные молекулы каталазы электростатически связываются с положительно заряженным PBLH.

Известно, что отрицательно заряженные молекулы слабо адсорбируются на слюду, которая в воде тоже отрицательно заряжена [Butt *et al.*, 1990]. Так как пурпурные мембраны отрицательно заряжены при нейтральном pH, для их иммобилизации на слюде требуется компенсация заряда путем подбора соответствующего pH [Butt *et al.*, 1990].

При рассмотрении водорастворимых белков стабилизирующий эффект липидного бислоя отсутствует, и экспериментатору остается надеяться только на прямое взаимодействие между макромолекулами и подложкой. Из-за довольно большой силы, действующей со стороны зонда (в пределах единиц наноньютонов), и термических флуктуаций при комнатной температуре прямая адсорбция не всегда оказывается достаточной для наблюдения белков в АСМ. Для преодоления этих сложностей было предложено несколько методик: пришивка к искусственному молекулярному слою, модификация белка таким образом, чтобы он мог связываться со специально приготовленными подложками [Weisenhorn *et al.*, 1990]. Однако такой подход является материалоспецифичным и, что хуже всего, изменяет структуру белка. В связи с этим, особенную важность имеет подбор экспериментальных условий для прямой адсорбции.

Одной из лучших подложек не только для иммобилизации мембран, но и для прямой адсорбции макромолекул является слюда. Многочисленные эксперименты свидетельствуют о том, что наилучшие результаты дают образцы, где слюда покрыта одним сплошным или неполным слоем макромолекул. Подобное покрытие достигается подбором концентрации раствора и времени сорбции для каждого конкретного случая [Onishi *et al.*, 1993]. Если же подложка покрыта несколькими слоями, то слабо связанные молекулы в верхних слоях налипают на зонд, создавая большое количество артефактов. Налипание исследуемого вещества на зонд является неконтролируемым процессом, что ставит перед экспериментатором задачу поиска новых материалов для изготовления зондов.

Однако в ряде случаев присутствие жидкости приводит к повреждению образца или подложки [Gathercole *et al.*, 1993].

Мембранные белки

Работы по наблюдению мембранных белков в АСМ были начаты с наиболее хорошо изученных ранее объектов. Одним из первых стало исследование нативных пурпурных мембран *Halobacterium halobium* [Worchester *et al.*, 1988] и визуализация пространственной двумерной решетки бактериородопсина [Worchester *et al.*, 1990].

С развитием экспериментальной техники удалось достичь дальнейших успехов в этой области. Разрешения, даваемого АСМ на воздухе в режиме модуляции силы на образцах, приготовленных из фотосинтетических мембран (хроматофоров), достаточно для визуализации отдельных фотореакционных единиц, удаленных друг от друга на расстояние 10–12 нм [Yamada *et al.*, 1995]. Однако оно не позволяет различить внутри фотореакционной единицы более мелкие детали, например, сам реакционный центр. Контактный режим (режим постоянной силы) позволяет определить толщину мембраны и мембраны со встроенными белковыми единицами, но не дает возможности их разрешить.

При погружении образца АСМ в жидкость становится возможным не только определить толщину пурпурной мембраны, но и проследить ее зависимость от рН окружающего раствора [Muller *et al.*, 1995]. Кроме того, при правильном выборе экспериментальных условий разрешение улучшается до 0,7 нм, что позволяет разрешить структуру фотореакционной единицы, различая составные части, отстоящие друг от друга на расстояние 1,45 нм (рис. 4).

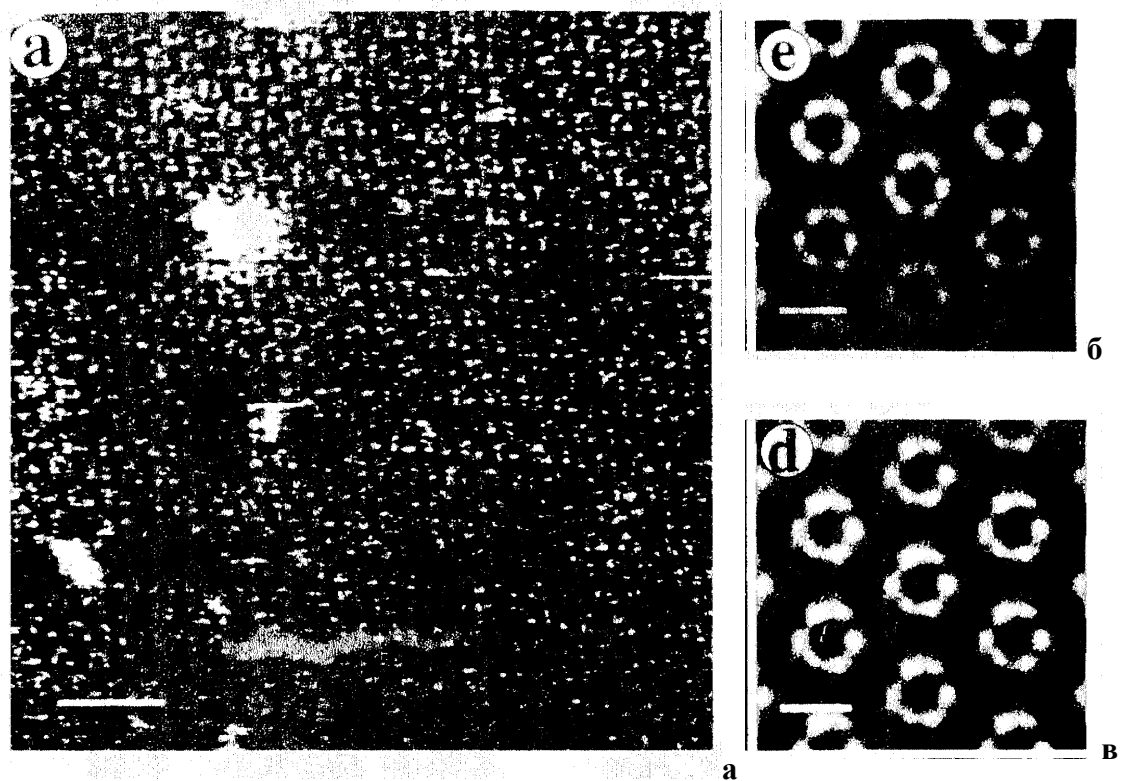


Рис. 4. Топография поверхности пурпурной мембраны, полученная на АСМ с высоким разрешением

а - воспроизводимая субструктура тримеров бактериородопсина;

б - среднее по четырем независимым кадрам;

в - результат симметризации третьего порядка.

Высота рельефа составляет 0,41 нм. Масштабный отрезок соответствует 20 нм для а, 4 нм для б, в

Наблюдаемая толщина пурпурной мембраны зависит также от выбора подложки, что вызвано, видимо, различным взаимодействием между левером и подложкой [Butt *et al.*, 1990].

Хотя разрешения, даваемого АСМ, далеко не всегда достаточно для разрешения структуры белковой молекулы, оно оказывается достаточно хорошим для изучения процессов образования белковых кластеров в фосфолипидных слоях на твердой подложке. Так, продолговатые кластеры грамицидина А, образовавшиеся в бислоях насыщенного фосфатидилхолина, наблюдали в растворе соли при комнатной температуре [Mou *et al.*, 1996]. Удалось обнаружить разницу толщины липидного бислоя в непосредственной близости от грамицидиновых кластеров и в областях, свободных от пептида.

При исследовании структуры и структурных изменений мембранных белков, например, рецепторов и каналоформеров, не образующих периодических структур в мембране и плохо кристаллизующихся, методы зондовой микроскопии обладают явными преимуществами над методами рентгеноструктурного анализа и электронной микроскопии.

Структуру *pertussis toxine* наблюдали в АСМ в буферном растворе [Yang *et al.*, 1994б]. Диаметр отдельной субъединицы равен примерно 2 нм. Сравнивая изображения интактного токсина и его В-олигомера, авторы установили, что А-субъединица

расположена в центре и окружена еще пятью субъединицами. Из-за неизвестного и переменного вертикального сжатия не удалось установить объемные соотношения между ними. Уширение, даваемое зондом, очень невелико в сравнении с ранее полученными данными [Hoh *et al.*, 1993].

Аналогичной структурой обладает другой важный мембранный белок – *cholera toxine* (рис. 5). Пентамерная структура его В-олигомера, связанного с ганглиозидами, разрешена с помощью АСМ в слабом растворе соли [Yang *et al.*, 1993]. При визуализации полной молекулы этого токсина не удалось разрешить расположенную в центре А-субъединицу.

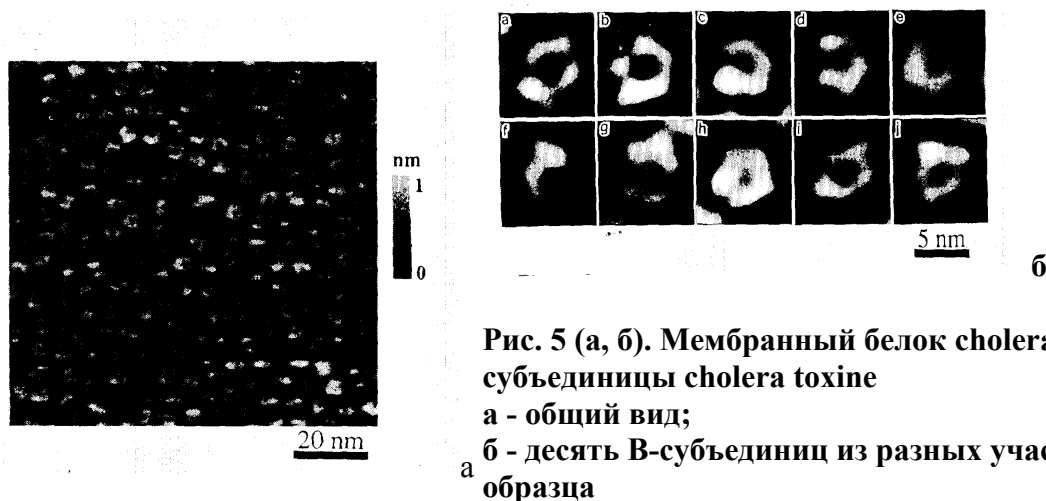


Рис. 5 (а, б). Мембранный белок cholera toxine. В-субъединицы cholera toxine

а - общий вид;
б - десять В-субъединиц из разных участков
а образца

Дополнительным преимуществом обладает использование ковалентных поперечных сшивок в обоих слоях бислойной липидной мембраны на твердой подложке. При этом повышается стабильность и, возможно, разрешение. Латеральная подвижность встроенных мембранных белков ограничивается, так как отдельные молекулы липида оказываются пространственно зафиксированными [Yang *et al.*, 1993]. Кроме того, такой подход позволяет добиваться молекулярного разрешения на самом липидном бислое при работе в жидкости.

Если мембранный белок образует двумерную упорядоченную структуру, к тому же обладающую симметрией вращения, существенную помощь исследователю оказывают корреляционные методы. Гексагонально упакованный промежуточный белковый слой (НРІ слой) – природный двумерный кристалл белка, покрывающего поверхность бактерии *Deinococcus radiodurans*, изучался в АСМ не в жидкости, но в условиях гидратации [Wiegrabe *et al.*, 1991]. Полученное разрешение дает возможность определить период, однако оно хуже, чем для СТМ и ТЭМ. Если при визуализации этого же объекта работать в буферном растворе, а при обработке изображений применить усреднение корреляционными

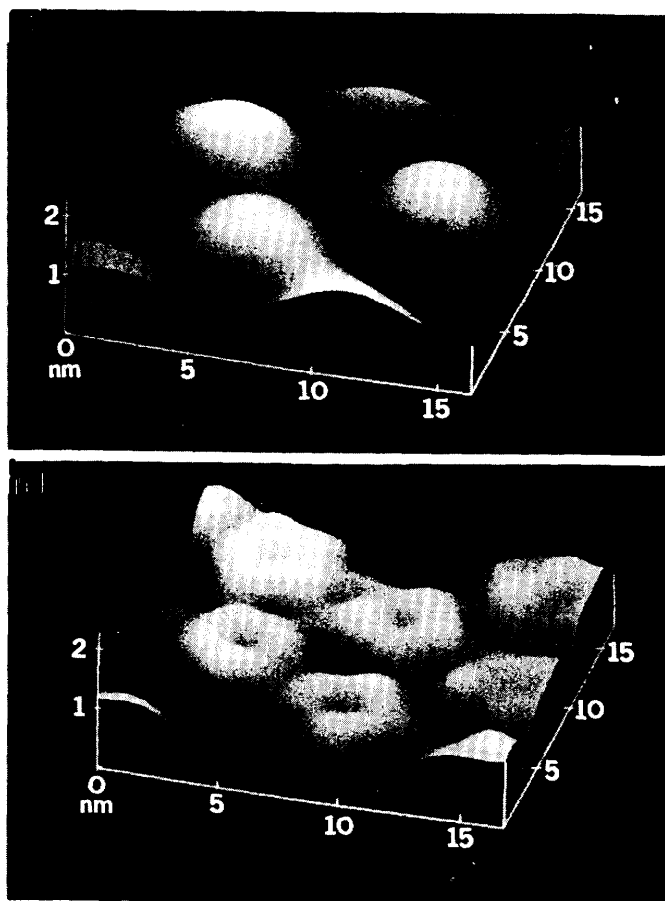


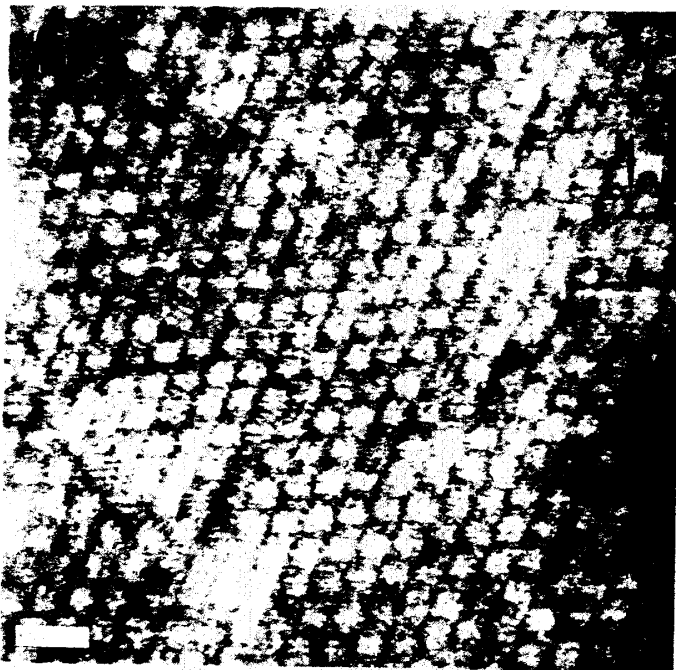
Рис. 5 (в, г).
 в - трехмерное изображение
 молекул cholera toxine;
 г - трехмерное изображение его В-
 субъединиц
*Изображение получено в режиме
 постоянной силы в слабом
 растворе соли*

Г

методами, а также подвергнуть отдельную ячейку симметризации вращения шестого порядка, полученное изображение не уступит по качеству данным ТЭМ [Karrasch *et al.*, 1994].

Еще одним примером получения молекулярного разрешения с применением фильтрации, усреднения между ячейками и симметризации вращения третьего порядка является АСМ-визуализация бактериородопсина в пурпурных мембранах в буферном растворе [Butt *et al.*, 1990].

АСМ позволяет работать с целыми клетками и участками клеточных мембран. Изображение внеклеточной поверхности межклеточных соединительных пор получено в буферном растворе [Hoh *et al.*, 1993].



**Рис. 6. АСМ-изображение
внеклеточной поверхности
межклеточных соединительных пор
в буферном растворе
Длина масштабного отрезка
составляет 20 нм**

На внеклеточной поверхности наблюдали гексагональную решетку, состоящую из отдельных межклеточных каналов с расстоянием между центрами 9,4 нм (рис. 6). Частицы размером 40– 80 нм, возможно, имеют белковую природу, их кластеры наблюдали на поверхности целого нейрона [Umemura *et al.*, 1993].

Белковые кристаллы и их рост

АСМ нашел широкое применение для изучения белков в кристаллическом виде. С помощью АСМ удалось наблюдать даже процесс роста кристаллов лизоцима [Durbin, Carlson, 1992], канавалина [McPherson *et al.*, 1995; Land *et al.*, 1995] и тауматина [McPherson *et al.*, 1995]. АСМ является единственным методом, который позволяет не только добиться высокого разрешения, что возможно и в электронной микроскопии, но и видеть сам процесс роста непосредственно *in situ* (рис. 7).

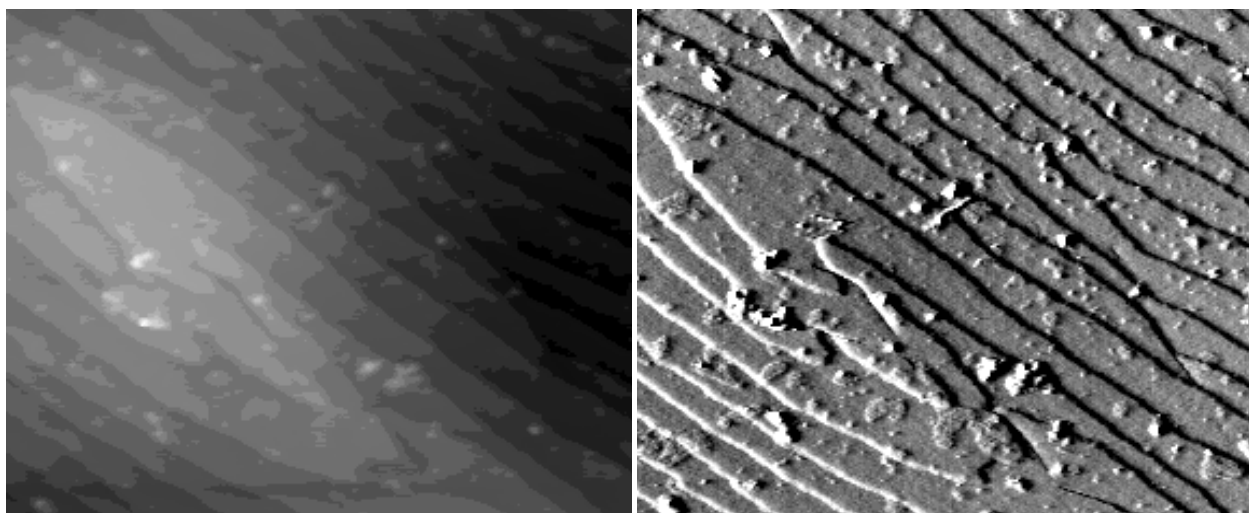


Рис. 7. Единичный кристалл из молекул лизоцима

а - топографическое изображение;

б - изображение с применением боковой подсветки.

Режим постоянной силы.

Размер кадра 5×4 мкм². Высота отдельной ступеньки соответствует моно-слою (~ 4 нм).

Заимствовано из работы Л.Н. Рашковича и др. [Рашкович и др., 1998]

Кроме того, высокая точность позиционирования АСМ позволяет последовательно получать изображения одних и тех же площадок размером порядка микрона на протяжении нескольких дней и, таким образом, контролировать медленно протекающие процессы распространения ступенек, раскручивания спиралей и образования новых поверхностей.

Одной из причин, по которой не всегда удается добиться молекулярного разрешения на АСМ-изображениях кристаллов белков, считается их относительная мягкость и постоянное движение. Молекулы на поверхности не так сильно связаны, как в объеме и, возможно, имеют больший диапазон для движения. Если масштаб таких временных изменений высоты сравним с размером пространственных изменений высоты поверхности, молекулярное разрешение может оказаться недостижимым [Durbin, Carlson, 1992].

Несмотря на это, для кристаллов лизоцима, канавалина и тауматина молекулярное разрешение в АСМ было получено [Konnert *et al.*, 1994; Kuznetsov *et al.*, 1997]. Такие данные имеют значение для изучения динамики роста кристаллов, так как АСМ в настоящее время является единственным методом, позволяющим исследовать формирование кристалла, образование дефектов, скорость роста и ее зависимость от направления на уровне отдельных молекул, т.е. отдельной ячейки, что недоступно интерференционным методам. Кристалл белка является модельной системой для изучения кристаллов любой природы, обладая тем преимуществом, что относительно большие размеры одной молекулы (десятки нанометров) позволяют наблюдать их в АСМ с молекулярным разрешением.

Измерение сил межмолекулярного взаимодействия

Помимо прямой визуализации биологических структур АСМ открывает новые возможности их изучения, недоступные другим методам. Например, непосредственное измерение сил адгезии между лигандами и рецептором, в частности, биотином и стрептавидином [Lee *et al.*, 1994; Moy *et al.*, 1994], путем регистрации зависимости отклонения лавера от расстояния до поверхности. Отрыв лавера от поверхности происходит в момент, когда сила адгезии достигает максимального значения. Полученная величина силы составляет десятые доли наноニュтона, что достаточно для надежной регистрации в АСМ. Авторы работ [Lee *et al.*, 1994; Moy *et al.*, 1994] впервые измерили силу взаимодействия между парой поверхностей, покрытых биотином, поверхностями, покрытыми биотином и стрептавидином, а также одной поверхностью, покрытой биотином, а другой – биотином со связанным стрептавидином. Для этого к лаверу

прикрепляли стеклянный микрошарик, который, как и подложку из слюды, покрывали биотином и стрептавидином. При этом использовалась их ковалентная пришивка к молекулам бычьего сывороточного альбумина (БСА), которые, в свою очередь, неспецифически и необратимо адсорбируются к стеклу и слюде. Отсутствие остаточных сил притяжения между двумя биотинированными поверхностями делает их подходящими для измерения силы взаимодействия между биотином и стрептавидином.

Аналогичным образом можно использовать антитело в качестве сенсора на антиген и регистрировать узнавание антигена антителом [Hinterdorfer *et al.*, 1996]. Кривая зависимости силы от расстояния при приближении зонда с антителом к поверхности, покрытой антигеном, имеет характерную форму, из которой можно получить информацию об узнавании и связывании одной единственной пары антиген/антитело, а из обратной ветви кривой определить величину силы их взаимодействия.

Констатировать связывание антитела с антигеном без применения меток можно и с помощью непосредственной АСМ-визуализации комплексов антиген/антитело. Так, при специфическом связывании иммуноглобулина G с иммобилизованным на подложке БСА топография поверхности существенно отличается от случая неспецифических антител или чистого БСА [Browning-Kelley *et al.*, 1997].

Количественно охарактеризовать специфические иммунологические реакции с помощью АСМ помогает определение шероховатости поверхности с использованием такого параметра, как среднеквадратичное отклонение высоты поверхности от среднего значения [Perrin *et al.*, 1997]. Количество образовавшихся комплексов антиген/антитело в зависимости от концентрации антигена в растворе можно определять по увеличению шероховатости поверхности, покрытой иммобилизованными антителами, на которую наносят исследуемый раствор. На этой основе создан биосенсор, позволяющий детектировать концентрации ферритина до 0,06 мкг/мл [Perrin *et al.*, 1997].

Снимая силовую кривую в каждой точке исследуемой поверхности, можно определить максимальную величину силы адгезии зонда к образцу. На этом принципе был сконструирован АСМ, позволяющий составлять карту величины сил адгезии на данной поверхности [Van der Werf *et al.*, 1994].

Для молекул лизоцима и их агрегатов, адсорбированных на слюду, были получены такие карты сил адгезии и величины модуля упругости [Radmacher, Fritz, Cleveland *et al.*, 1994]. Адгезия, определяемая по величине гистерезиса, оказалась для слюды большей, чем для лизоцима. На кривых снятых в области, где адсорбирован лизоцим, наблюдалось отклонение от линейности на участке, соответствующем контакту, вызванное упругой деформацией лизоцима. Отрыв лезера от поверхности слюды происходит быстрее, чем от поверхности агрегата лизоцима. Величина, называемая скоростью отрыва лезера, используется для подсчета вязкости лизоцима.

При работе с жидкими липидными пленками сила взаимодействия между зондом и образцом оказывается зависящей от скорости сканирования. Удачные, хорошо воспроизводимые изображения получаются при скорости сканирования выше некоторого критического значения (в данном случае 6 мкм/с). Если скорость сканирования оказывается ниже, получить изображения не удастся. Объяснение этого эффекта аналогично модели человека, скользящего на водных лыжах [Rddler *et al.*, 1994].

Последние достижения в этой области показывают, что в ближайшем будущем можно будет использовать АСМ для сверхчувствительного иммуноаналитического

детектирования без применения каких-либо меток как в качественных, так и в количественных исследованиях.

Туннельная микроскопия

Требование проводимости исследуемого в СТМ объекта сужает область его применимости по сравнению с АСМ. Однако адсорбция органических молекул на проводящую подложку в ряде случаев делает возможной визуализацию молекул вещества, не обладающего объемной проводимостью. Теоретическое обоснование таких экспериментальных фактов до сих пор остается предметом дебатов. Единой квантово-механической теории, объясняющей механизмы туннельной проводимости и формирования СТМ-изображений диэлектрических объектов, в настоящее время не существует, что сильно осложняет интерпретацию полученных данных. Для объяснения наблюдаемого эффекта авторы в каждом случае предлагают различные механизмы возникновения туннельного тока достаточной для регистрации величины (0,1–1 нА). К сожалению, ни одна из предложенных моделей в полной мере не описывает происходящие процессы и не дает полного объяснения наблюдаемым явлениям. По всей видимости, в разных случаях природа и механизм возникновения тока различны, что не позволяет построить единую теоретическую модель наблюдения диэлектрических объектов методом СТМ.

Существующие модели формирования туннельных изображений можно разделить на несколько классов. Перечислим основные из них. Это резонансное туннелирование [Yuan, Shao, 1990; Keller *et al.*, 1989; Lindsay *et al.*, 1990], нерезонансное туннелирование [Michel *et al.*, 1989], инжекция внешним полем [R. Garcia, N. Garcia, 1990], туннелирование через поверхностные состояния [Amrein *et al.*, 1989; Garcia *et al.*, 1987], автоэлектронная эмиссия [Garcia *et al.*, 1995], электрический пробой [Tang *et al.*, 1993], ионная проводимость адсорбированной пленки воды [Yuan *et al.*, 1991; Guckenberger *et al.*, 1994]. Последним механизмом наиболее часто пользуются для объяснения формирования низкоточковых изображений в условиях контролируемой влажности.

Сколь бы многообещающей ни была перспектива использования такого высокоразрешающего метода, как СТМ, для изучения структуры и электронных свойств биологических материалов, но при работе с биообъектами мы сталкиваемся с рядом существенных трудностей, вызванных свойствами именно самих биообъектов. Это прежде всего их низкая электрическая проводимость, существенная именно для СТМ и не играющая роли для АСМ. Кроме того, нельзя не отметить их мягкость и слабую адгезию к проводящей подложке, что препятствует их успешной визуализации, так как силы, возникающие в туннельном контакте, могут быть значительными. К осложняющим обстоятельствам также следует отнести трудности интерпретации изображений, так как внутренние движения и деформации приводят к смазыванию картины. Несмотря на вышеперечисленные обстоятельства, на настоящий момент уже достигнуты значительные успехи в этой области.

Одним из первых доказательств возможности использования СТМ для изучения белков стала визуализация на графите альбумина яичного куриного белка, сывороточного альбумина человека и фибриногена [Feng *et al.*, 1989].

Низкая проводимость биообъектов диктует экспериментаторам необходимость уменьшать рабочее значение туннельного тока и/или повышать напряжение, прикладываемое к туннельному переходу. Сконструированы СТМ, работающие в низкотокковом режиме при рабочих значениях туннельного тока равных десятым долям пикоампер [Dunlap *et al.*, 1993]. В условиях контролируемой влажности при таких значениях туннельного тока и величине напряжения на переходе до 10 В стала возможной визуализация НРІ слоя *Deinococcus radiodurans* [Guckenberger *et al.*, 1989] (рис. 8).

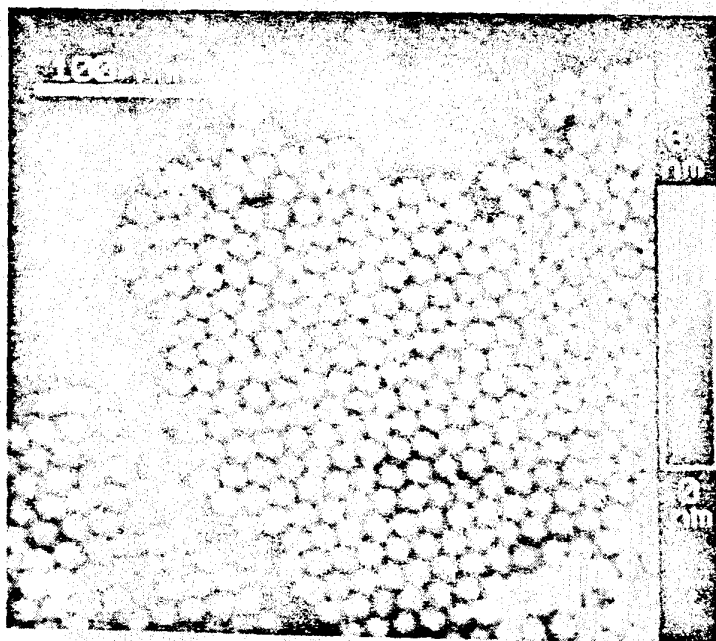


Рис. 8. Природный двумерный кристалл белка НРІ слоя из *Deinococcus radiodurans*
Параметры СТМ-изображения:
туннельное напряжение -1,0 В,
туннельный ток 20 пА

Иногда для преодоления низкой проводимости в белках к туннельному переходу прикладывают напряжение, превышающее работу выхода образца. В этом режиме, называемом режимом ближнего поля, наблюдали пурпурные мембраны *Halobacterium halobium* [Tamayo *et al.*, 1995].

Одним из важнейших факторов, влияющих на качество СТМ изображений биообъектов, является контроль относительной влажности. Для *Deinococcus radiodurans* [Guckenberger *et al.*, 1989] наилучшее изображение было получено при 35- 45%; при 25– 35% были обнаружены только его характерные черты, а периодическая структура вообще не наблюдалась. При влажности менее 10% вообще не было никаких следов присутствия НРІ слоя. Такая зависимость указывает на то, что адсорбция воды гигроскопичным белком создает поверхностную проводимость. Это представляется тем более верным, если учесть, что толщина НРІ слоя 7 нм весьма значительна для СТМ. Сама структура НРІ слоя тоже удобна для СТМ, так как содержит много пор, создающих, возможно, дополнительные каналы проводимости между верхней частью слоя и подложкой [Guckenberger *et al.*, 1989].

Требование проводимости ограничивает для СТМ выбор подложек по сравнению с АСМ. Адсорбция белковых молекул на проводящую подложку – один из простых и удобных способов их визуализации. Для получения качественных изображений, как правило, необходимо поддерживать такой образец влажным. Таким образом на графите получено СТМ-изображение комплекса гесА-ДНК (рис. 9), на котором различимы отдельные гесА-протомеры [Amrein *et al.*, 1989].

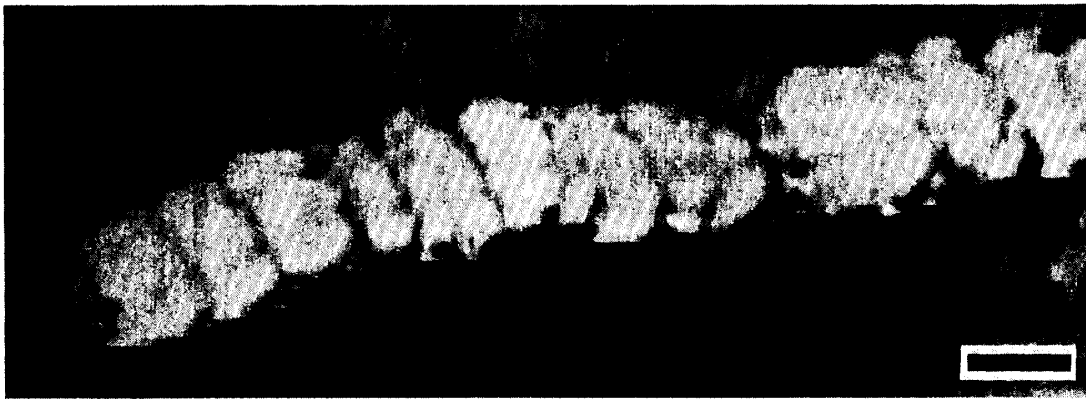


Рис. 9. СТМ-изображение отдельного непокрытого комплекса *recA*-ДНК, адсорбированного на проводящую подложку
Масштабный отрезок соответствует 10 нм

Несмотря на названные трудности, были достигнуты значительные успехи по СТМ-визуализации белковых структур. Сообщается о получении СТМ-изображения F_1 комплекса субъединиц H^+ -АТФазы термофильных бактерий, встроенного в липосомы [Masai *et al.*, 1992]. Раствор липосом наносили на графит и высушивали. Везикулы, выделенные из нативных пурпурных бактерий, изучали с помощью СТМ на графитовой подложке [Golubok *et al.*, 1992]. Авторы достигли пространственного разрешения, позволяющего различить отдельные белковые глобулы. Хотя гексагональная структура наблюдаемых кластеров соответствует существующей модели ячейки фоторецептора пурпурной мембраны, структуру самой ячейки разобрать на полученных изображениях невозможно. Упорядоченные, плотно упакованные полипептидные слои, различаемые авторами, содержат более 200 белков и имеют гексагональную структуру.

Функционально активные фрагменты выделенных из галобактерий пурпурных мембран, включающих бактериородопсин, также изучались в СТМ [Кононенко и др., 1990]. Диспергированные мембраны высаживали на графитовую подложку. Отчетливо видна гексагональная структура, состоящая из отдельных "пирамид", каждая из которых, видимо, представляет собой тример молекулы бактериородопсина. Среднее расстояние между кластерами несколько больше значений, полученных в дифракционных экспериментах, что можно объяснить "растеканием" по поверхности подложки за счет ван-дер-ваальсова притяжения.

Интересным наблюдением стало получение СТМ-изображений ацетилхолинового рецептора постсинаптической мембраны электрического органа *Torpedo californica* [Bertazzon *et al.*, 1992]. Молекула представляет собой пентамер с четырьмя основными и одним минорным возвышением над поверхностью, окружающими центральную "впадину".

Если покрыть туннельную иглу диэлектрической пленкой, например парафином или лаком, оставив незаизолированным только самый кончик, можно работать, погрузив образец и иглу в жидкость. Такой подход открывает перспективы работы в условиях, максимально приближенных к нативным, и наблюдений биологически важных процессов *in situ*. В некоторых случаях это является необходимым условием получения хороших результатов.

Успешное наблюдение в СТМ целых хлоропластов [Dahn *et al.*, 1992] возможно только в растворе буфера. На внешней поверхности хлоропластов наблюдается структура

молекулярного масштаба. В некоторых областях она имеет почти периодический кристаллический вид. Причина этого пока не ясна, но это указывает на то, что мембранные белки образуют упорядоченную решетку хотя бы в некоторых областях мембраны.

Работа в электрохимической ячейке СТМ *in situ* позволила наблюдать при денатурации пероксидазы хрена смену глобулярной формы молекул V-образной [Zhang *et al.*, 1996].

При работе с целыми клетками в физиологическом растворе проводимость оказывается недостаточной и острей проникает внутрь клетки и “показывает” мембранные структуры и элементы цитоскелета, которые расположены внутри клетки вплотную к части клеточной мембраны, обращенной к подложке [Ruppersberg *et al.*, 1989].

Прямой адсорбции молекул белка на гидрофобную поверхность графита часто оказывается недостаточно для их СТМ-визуализации. Для иммобилизации на проводящей подложке белков разработаны специальные методы модификации подложек и ковалентной пришивки белков, позволяющие ограничить их подвижность и получить хорошее разрешение.

Одной из основных проблем при получении четких СТМ-изображений фосфолипидных монослоев, нанесенных по технологии Ленгмюра-Блоджет на поверхность графита, является, вероятно, их нестабильность, вызванная слабой адгезией. Недавно был предложен новый метод, включающий ковалентную пришивку фосфолипида к поверхности графита, который обеспечивает лучшую механическую стабильность, контроль ориентации и распределения, повышение разрешающей способности [Heckl *et al.*, 1989]. Техника иммобилизации позволяет однозначно различать отдельные фосфолипидные молекулы на СТМ-изображениях, стабильных на протяжении часов, но достичь атомного разрешения все же не удастся. Ковалентная пришивка изменяет нативную организацию липидного слоя и вместе с химической обработкой не позволяет использовать этот метод для исследования встроенных белков.

Мягкое электроокисление графита делает его поверхность гидрофильной и пригодной для СТМ-визуализации адсорбированного цитохрома с *in situ* [Zhang, Wang, 1997]. Методом электрохимического нанесения на такую поверхность готовили образцы для изучения на СТМ структуры свернутого и развернутого гемоглобина [Zhang *et al.*, 1995].

Одним из основных преимуществ СТМ по сравнению с АСМ, безусловно, является лучшее разрешение. Помимо наблюдения атомарной структуры графита и жестких ЛБ пленок жирных кислот, получено молекулярное разрешение на упорядоченной ЛБ пленке соевого фосфатидилхолина (РС) на графите и пленки бактериородопсина в липидном матриксе на воздухе (рис. 10) [Niemi *et al.*, 1993].

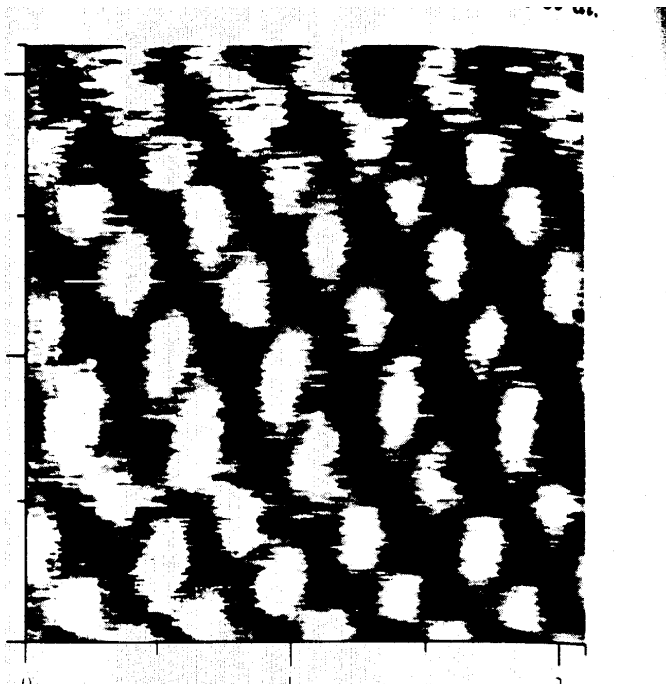


Рис. 10. Молекулярное разрешение на упорядоченном участке бислойной пленки бактериородопсина в липидном матриксе

Размер STM-изображения $2,14 \times 2,14$ нм².

Средние межмолекулярные расстояния 0,33 и 0,37 нм. Величина туннельного напряжения 50 мВ, туннельного тока 1 нА

Период упорядоченной решетки РС составляет 0,4 нм, тогда как наилучшее разрешение на подобных объектах в АСМ составляет 0,7 нм в жидкости. В АСМ детально не различима система полос в составе повторяющегося блока фибриллы коллагена, хорошо различимая на тех же образцах в СТМ [Gathercole *et al.*, 1993].

Тем не менее, разрешение СТМ для биологических объектов оказывается почти на порядок хуже, чем для неорганических кристаллов. Так, для киназы фосфоорилазы это 0,3–0,5 нм [Edstrom *et al.*, 1989, 1990]. Это вызвано, по-видимому, внутренней подвижностью аминокислотных цепей, и при низких температурах ожидается значительное улучшение разрешения.

Еще одной иллюстрацией сравнения разрешающей способности СТМ и АСМ служит пример получения атомного разрешения ионного кристалла ферритина, наблюдаемого при повреждении туннельной иглой полипептидной оболочки [Yang *et al.*, 1992]. АСМ позволяет видеть только полипептидную оболочку отдельных молекул этого белка (средний размер 15 нм) (см. раздел “Изолированные белки”). Размер ячейки наблюдаемого в СТМ кристалла $0,5 \times 0,5$ нм² (рис. 11), а проекция комплекса O^{2-}/Fe^{3+} демонстрирует гексагональную решетку $0,15 \times 0,15$ нм².

Высота адсорбированных биообъектов, как правило, оказывается меньше реальной. Например, для киназы фосфоорилазы высота составляет 30% от измеренной независимым методом [Edstrom *et al.*, 1990]. Помимо

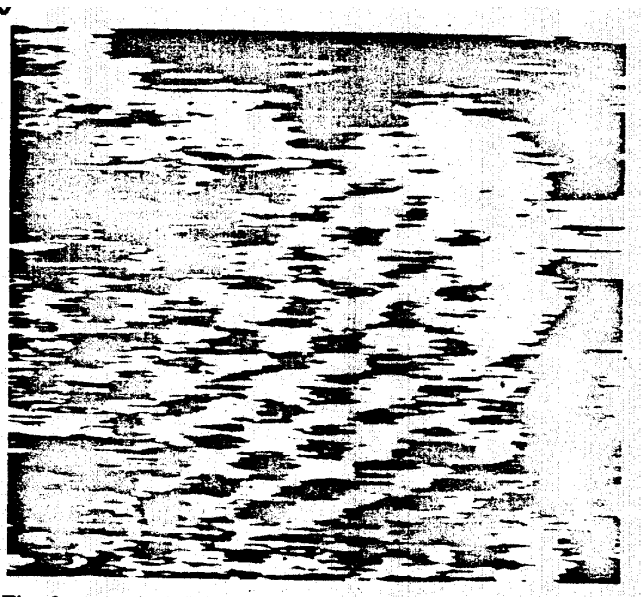


Рис. 11. Типичное СТМ-изображение молекулы ферритина с частично разрушенной оболочкой. Гексагональная решетка с периодом 0,49 нм хорошо разрешена. Размер кадра 5×5 нм². Туннельное напряжение 174 мВ, туннельный ток 0,49 нА

возможной деформации, вызванной взаимодействием с иглой, подложкой или процессом высушивания, важной причиной этого является большая работа выхода и меньшая локальная плотность электронных состояний вблизи уровня Ферми.

Нельзя также не отметить неизбежно присутствующее и в АСМ возможное поперечное уширение, создаваемое иглой. Так, кажущаяся ширина фибриллы коллагена в СТМ составляет 3 нм вместо предсказываемых моделью 1,5 нм [Zhu *et al.*, 1991].

Помимо получения изображений на молекулярном уровне, СТМ позволяет осуществлять микроманипулирование объектами. Эффект электростатического притяжения можно использовать для извлечения отдельных биомолекул и помещения на выбранный чистый участок подложки [Aleksperov *et al.*, 1989]. Повышение отрицательного напряжения на игле до $-1,5$ В вызывает вырывание молекулы из кластера на подложке. Последующее снижение до $-0,3$ В позволяет осадить ее после переноса в желаемое место. Понижение температуры до 15–80 К повышает стабильность молекул и точность позиционирования, облегчая создание наноструктур [Meyer *et al.*, 1996].

При визуализации *Halobacterium halobium* [Tamayo *et al.*, 1995] увеличение туннельного тока до 20 пА привело к тому, что мембрана не в состоянии пропускать носители и приближаемая обратной связью игла протыкает мембрану, оставляя при быстром сканировании вырезанную метку. При медленном сканировании наблюдается эффект саморепарации мембраны. Если она не сидит на ступеньках графита, такое манипулирование приводит к ее разрыву.

Возможность обходиться без металлического запыления образца в СТМ и АСМ является одним из главных преимуществ перед просвечивающей и сканирующей электронной микроскопией. Однако в ряде случаев, когда при работе с биологическими объектами их собственной проводимости недостаточно, одним из путей преодоления этого служит металлическое запыление. Хотя такой подход неизбежно приводит к потере латерального разрешения, он улучшает разрешение в направлении, перпендикулярном плоскости образца. Запыленная поверхность становится однородной по своим электронным свойствам. При этом исчезает вклад в формирование рельефа, даваемый различием локальной плотности электронных состояний вблизи уровня Ферми чистой подложки и подложки с адсорбированными объектами, что существенно упрощает интерпретацию данных, позволяя однозначно определить высоту объекта.

Применение металлического напыления дает возможность с помощью не только АСМ, но и СТМ с субнанометровой точностью количественно характеризовать толщину планарной пурпурной мембраны и детектировать изменения ее толщины после обработки ферментами [Fisher, Whitfield *et al.*, 1990; Fisher, Yanagimoto *et al.*, 1990].

Пожалуй самым существенным и принципиальным преимуществом СТМ перед АСМ является возможность изучения электронных свойств белков и мембран. Производная туннельного тока по напряжению на переходе пропорциональна локальной плотности электронных состояний вблизи уровня Ферми. Динамический режим СТМ позволяет исследовать электронную структуру системы, определять ширину запрещенной зоны, работу выхода и другие электронные свойства.

При адсорбции реакционных центров фотосистемы I хлоропластов шпината на золото вольт-амперная характеристика была типична для полупроводников с запрещенной зоной [Lee *et al.*, 1995]. Измеренная ширина запрещенной зоны соответствовала области сильного оптического поглощения. При обработке реакционных центров платиной наблюдалась зависимость контраста изображения от полярности туннельного напряжения, а асимметричная вольт-амперная характеристика напоминала характеристику допированного полупроводника n-типа, что и объясняет асимметрию протекания туннельного тока по отношению к полярности напряжения.

Выделенные фотосинтетические реакционные центры из *Rhodobacter sphaeroides* наблюдали на графите [Aleksperov *et al.*, 1989]. Анализ вольт-амперных характеристик реакционных центров на свету и в темноте показал наличие в темноте резонансного пика, соответствующего разности потенциалов 3,16 В. Наличие пика характеризует функциональные свойства реакционных центров, а именно: перенос электронов с бактериородофила на хинон [Facci *et al.*, 1994]. Это доказывает возможность индуцировать перенос электронов даже при отсутствии излучения путем приложения соответствующей разности потенциалов.

Асимметрия процесса протекания туннельного тока через молекулы цитохрома P450 2B4, встроенные в липосомы, показана в [Uvarov *et al.*, 1996]. При отрицательном напряжении на игле молекулы белка видны как выступающие над поверхностью липосом, а при смене полярности – как углубления. Плотность электронных состояний вблизи уровня Ферми для липосомы на графите, а следовательно, и вольт-амперная характеристика, также оказывается асимметричной по отношению к знаку приложенного напряжения [Gallyamov *et al.*, in press]. Полученные данные указывают на сходство электронной структуры рассматриваемой системы с электронной структурой допированных полупроводников.

Принципиально новым в подходе сканирующей зондовой микроскопии стала возможность изучения конформации и свойств белков в на уровне отдельной молекулы или группы молекул, а также взаимодействия между ними. Возможность регистрации акта связывания антигена с антителом сможет в будущем заменить иммуноферментный анализ. Рентгеноструктурный анализ кристаллизующихся белков требует создания достаточно крупных кристаллов, а значит, и затрат большого количества белка, что, несомненно, не выгодно с финансовой точки зрения. Туннельная сканирующая микроскопия и спектроскопия открывают возможность изучения электронных свойств белков в изолированном виде и в составе ленточных пленок. В перспективе видится регистрация и управление процессом электронного транспорта в белках, реконструкция и создание искусственных цепей электронного транспорта с последующим созданием на этой базе различных устройств биоэлектроники

ЛИПОПОЛИСАХАРИДЫ, КЛЕТОЧНЫЕ СТЕНКИ, ЖИВЫЕ БАКТЕРИАЛЬНЫЕ КЛЕТКИ

Атомно-силовая микроскопия является перспективным методом, позволяющим исследовать особенности структуры поверхности бактерий различных таксономических групп при решении фундаментальных и практических задач биологии и медицины. Авторы осуществили визуализацию бактериальных клеток: *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Helicobacter pylori*, *Lactobacillus fermentum* и *Bifidobacterium longum*.

Основными преимуществами метода атомно-силовой микроскопии, используемого для изучения тонких структур бактериальных клеток, по сравнению с традиционными способами — растровой и просвечивающей электронной микроскопии — являются:

- 1) возможность изучения реальной поверхности клетки без применения специальных методов подготовки образцов (напыления металлами, приготовления реплик и пр.);
- 2) возможность проведения исследований живых бактерий на воздухе или в различных жидких средах;
- 3) высокое пространственное разрешение (доли нанометра в плоскости образца и сотые доли нанометра по нормали к образцу);
- 4) одновременное исследование с субнанометровым пространственным разрешением локальных свойств клеточной стенки, в том числе, жесткости, пластичности и адгезивности.

При измерении упругих свойств бактериальной стенки можно получать информацию о внутреннем строении клетки. Недавно с помощью атомно-силовой микроскопии зарегистрировано изменение структуры липополисахаридов клеточной стенки бактерий *Escherichia coli*, наследующих генетическую детерминанту, которая контролирует синтез первичных боковых цепей дизентерийных бактерий [Яминский, Демин, Бондаренко, 1997]. Такие бактерии могут быть использованы в качестве штаммов-носителей при изготовлении живых векторных вакцин.

Атомно-силовая микроскопия продемонстрировала возможность наблюдения динамических изменений в структуре бактерий. В работе Г. Оберлейтнера и др. [Oberleithner *et al.*, 1993] приведены результаты прямых наблюдений образования микропор в бактериальной стенке при воздействии ионов кальция. Размер наблюдаемых пор составлял 30 нм.

В науке о клетках — цитологии — ключевую роль играет прокариотическая микробная клетка — кишечная палочка, или эшерихия (*Escherichia coli*). Благодаря экспериментам с *E. coli* были изучены основные процессы, происходящие с клетками: рост, деление, деградация, бактериолиз и др.



Рис. 1. *Escherichia coli* K12 J62
Размер кадра $7,8 \times 8,2$ мкм²

Эшерихия (*Escherichia coli*), или кишечная палочка, — грамотрицательная микробная клетка семейства кишечных. Имеет слегка вытянутую форму палочки с закругленными концами ($0,4\text{--}0,8 \times 1\text{--}3$ мкм). В естественных условиях подвижна, факультативный анаэроб, сбраживает глюкозу, лактозу и другие углеводы. Эшерихии — одни из наиболее типичных представителей нормальной микрофлоры кишечника млекопитающих. Является классическим объектом микробиологических и молекулярно-генетических исследований. Изучение разнообразных мутантов штамма *E. coli* K12 позволило составить наиболее полную генетическую карту бактериальной хромосомы. Культуры *E. coli* K12 используются в генной инженерии в качестве штаммов-носителей при передаче клонированных генов, контролирующих синтез интерферона, инсулина и ряда важных ферментов.

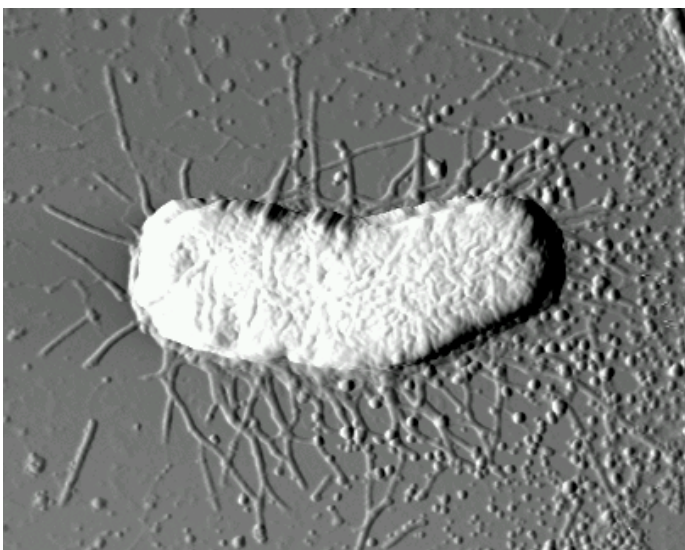


Рис. 2. Изображение одиночной бактерии *E. coli* JM109, осажденной на поверхность слюды
Размер изображения $3 \times 2,5$ мкм².
Изображение получено с помощью атомно-силового микроскопа в режиме постоянной силы. Для оттенения мелких деталей при построении изображения применена боковая подсветка. Воспроизводится из работы [Яминский, Пышкина и др., 1997]

Для штамма *E. coli* K12 J62 (рис. 1) характерно наличие на поверхности бактериальной стенки длинных отростков — жгутиков. Жгутик представляет собой относительно жесткую спираль, состоящую только из белка — флагеллина. Кишечная палочка — подвижная бактерия, перемещение которой осуществляется с помощью жгутиков.

Отростки другого вида (фимбрии, реснички или пили) наблюдаются на поверхности бактерий *E. coli* JM 109 (рис. 2). Такие ворсинки построены также только из одного вида белка, в данном случае — пилина. Они представляют собой прямолинейные белковые отростки круглого поперечного сечения.

Размеры бактерий *E. coli* JM109, по данным наблюдений, составляют: длина 1–4 мкм, высота 0,6–1,5 мкм. При высыхании бактерий на твердой подложке заметно их некоторое уплощение. Возвышение бактерий над плоской поверхностью подложки составляет 0,2–0,4 мкм. Результаты атомно-силовой микроскопии указывают на однотипную морфологию поверхности бактериальных клеток. Поверхность клеток имеет структурированную поверхность с характерным периодом 50 нм. На изображении одиночной бактерии (рис. 2) хорошо различимы характерные отростки (пили) длиной в 1–2 мкм.

Для штамма бактерий *E. coli* HB101 характерно полное отсутствие ресничек (пилей), что хорошо видно на рис. 3.

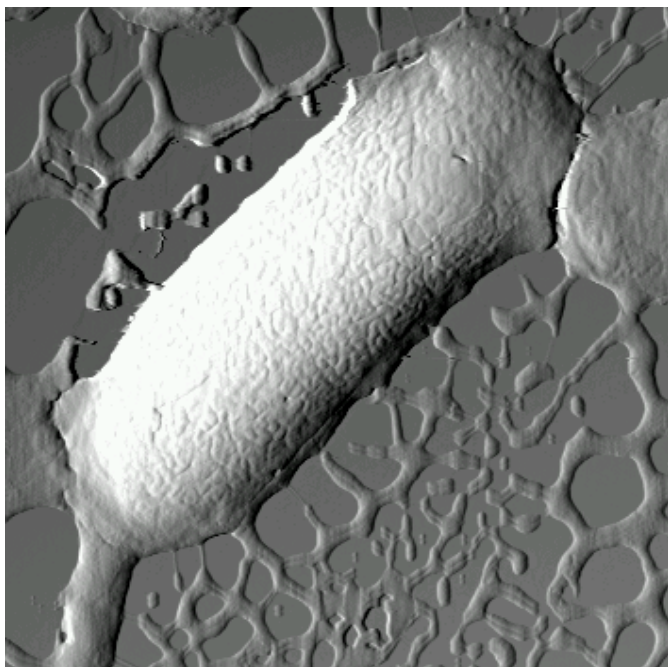


Рис. 3. Изображение одиночной бактерии *E. coli* штамма HB101
Изображение получено в режиме постоянной высоты. Размер кадра 2,8×2,5 мкм². Для оттенения мелких деталей применена боковая подсветка. Воспроизводится из работы [Яминский, Пышкина и др., 1997]

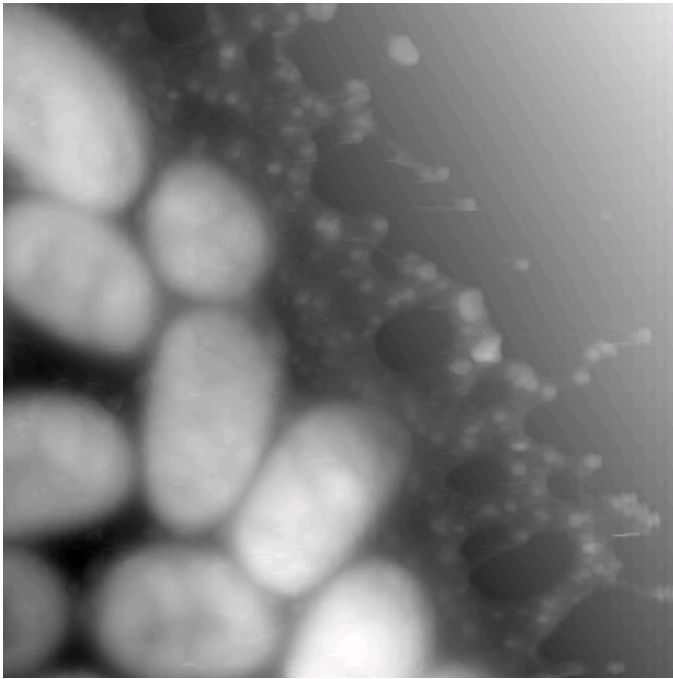


Рис. 4. Изображения бактерий *Klebsiella pneumoniae* K1 5054
Размер кадра $5,3 \times 5,3$ мкм²

Клебсиелла (*Klebsiella*) — граммотрицательная, неподвижная, неспорообразующая энтеробактерия, факультативный анаэроб. *Klebsiella pneumoniae* — наиболее изученная бактерия рода *Klebsiella*. Обитает на слизистой оболочке носа, рта и кишечника здоровых людей. Условно патогенна: может вызывать воспаление легких и гнойно-воспалительные процессы другой локализации. Сбраживает сахара с образованием 2,3-бутандиола, этанола и органических кислот. На изображениях, полученных с помощью атомно-силового микроскопа, видно, что клебсиеллы не имеют боковых отростков (рис.4). Снаружи клеточная стенка окружена слизистым веществом, плотно обволакивающим клетку. Слизистое образование — капсула — сохраняет механическую связь с клеточной стенкой и имеет аморфное строение. Наблюдаемая в атомно-силовой микроскоп толщина капсулы составляет 0,1 мкм. Капсула является результатом биосинтеза прокариотами органических полимеров и отложения их вокруг клеток.

Геликобактер пилори (*Helicobacter pylori*) — энтеробактерия, открытая австралийскими учеными в 1983 г. В настоящее время общепризнанно, что *H. pylori* является возбудителем язвенной болезни двенадцатиперстной кишки (100% случаев заболеваний) и желудка (70% заболеваний). Отдельные бактерии имеют продолговатую форму со средней длиной в 1,5 мкм (рис. 5.).

Методами атомно-силовой микроскопии изучены также другие энтеробактерии [Яминский, Бондаренко, 1998].

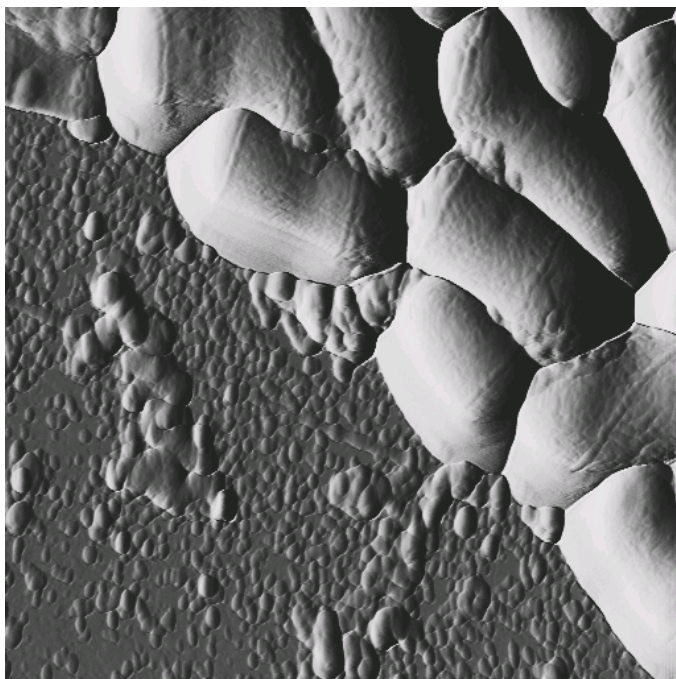


Рис. 5. Изображения бактерий *Helicobacter pylori*
Бактерии нанесены на поверхность
слюды. Размер кадра 3,8×3,8 мкм²

Лактобациллы (*Lactobacillus*) — обычно неподвижные и бесспорные молочнокислые бактерии, которые могут осуществлять ферментативное молочнокислое брожение. Являются представителями нормальной микрофлоры кишечника и репродуктивного тракта женщин. Встречаются в молочных, мясных и растительных продуктах, колонизируют эпителий ротовой полости, кишечного и мочевого трактов теплокровных животных.

Бифидобактерии (*Bifidobacterium*) — грамположительные, бесспорные, неподвижные бактерии. Составляют 80–90% нормальной кишечной микрофлоры детей и молодняка сельскохозяйственных животных в период молочного вскармливания.

Приготовление образцов

Для визуализации поверхности микробных клеток методами атомно-силовой микроскопии не требуются специальные подготовительные операции, обязательные для различных видов электронной микроскопии.

Процедура подготовки образцов для атомно-силовой микроскопии заключается в их иммобилизации на ровной подложке. Материал подложки можно варьировать в широких пределах в зависимости от поставленных задач. Традиционно в качестве субстрата используются атомно-гладкие подложки из слюды, графита и других слоистых материалов, а также различные стекла, полимерные материалы и металлические поверхности. Варьируя подложки, можно изучать адгезивные свойства бактерий на поверхности различных материалов.

Хорошо зарекомендовавшая методика нанесения бактерий на поверхность подложки (субстрата) состоит в следующем. Бактерии переносятся в дистиллированную воду и

капля воды (~ 4 мкл) с концентрацией около 10^9 бактерий в 1 мл помещается на поверхность подложки.

В работе И.В. Яминского с соавторами [Яминский, Пышкина и др., 1997] приведено описание методики приготовления микробных клеток *E. coli* JM 109 и HB 101 и их нанесения на поверхность подложки. Культура клеток была выращена в жидкой среде LB (на 150 мл.: 1,5 г Bacto-trypton, 0,75 г Bacto-yeast extract, 1,5 г NaCl, раствор NaOH до pH 7,5) путем заражения среды соответствующим штаммом в соотношении 1:100 до средней логарифмической фазы ($D=0,5$ при $\lambda = 600$ нм) при 37°C. Полученные колонии клеток высевались на чашки Петри со средой LB, содержащей агар до 2,25 % и выдерживались при температуре 37°C в течение 8–12 ч. С полученных отдельных колоний скалывали определенное количество клеток для нанесения на соответствующий субстрат.

Свежесколотые бактерии с помощью петли перемещали в дистиллированную воду. Контроль требуемой концентрации бактерий проводили визуально по мутности раствора. Концентрация бактерий перед нанесением составляла 10^9 в 1 мл. Каплю приготовленного раствора помещали на подложку из свежесколотой слюды размером 6 x 6 мм². Осаждение бактерий осуществляли также на плоские подложки из других материалов (стекло, полированный титан, пленка из сплава золото-палладий). Первоначальные наблюдения на микроскопе проводили непосредственно через 10–15 мин после нанесения образцов. Последующие измерения осуществляли через более продолжительные интервалы времени (сутки–месяцы). В зависимости от времени наблюдения деградации поверхности бактерий обнаружено не было.

Следует заметить, что кратковременное помещение микробных клеток в дистиллированную воду в процессе приготовления образцов, по наблюдениям зондовой микроскопии, не приводит к лизису (разрушению) клеток. При длительном нахождении клеток в дистиллированной воде (30–60 мин) происходит лизис некоторого количества клеток.

Визуализацию поверхности бактериальных клеток можно осуществлять в различных режимах атомно-силовой микроскопии. В связи с высокой жесткостью клеточной стенки бактерий наблюдения можно проводить в контактном режиме, не предпринимая специальные меры для минимизации силы воздействия острия на поверхность клетки. Режим прерывистого контакта особых преимуществ, как правило, не дает.

Весьма примечательно, что достаточно простой способ фиксации энтеробактерий приводит к тому, что образуемые островковые структуры являются монослойными. Характерной особенностью наблюдаемой картины является практически полное отсутствие многослойных образований бактерий. Формирование монослойных покрытий, по всей видимости, связано с адгезивными свойствами, присущими энтеробактериям. Можно предположить, что в естественных условиях бактерии также образуют монослойные пленки на поверхности эпителия.

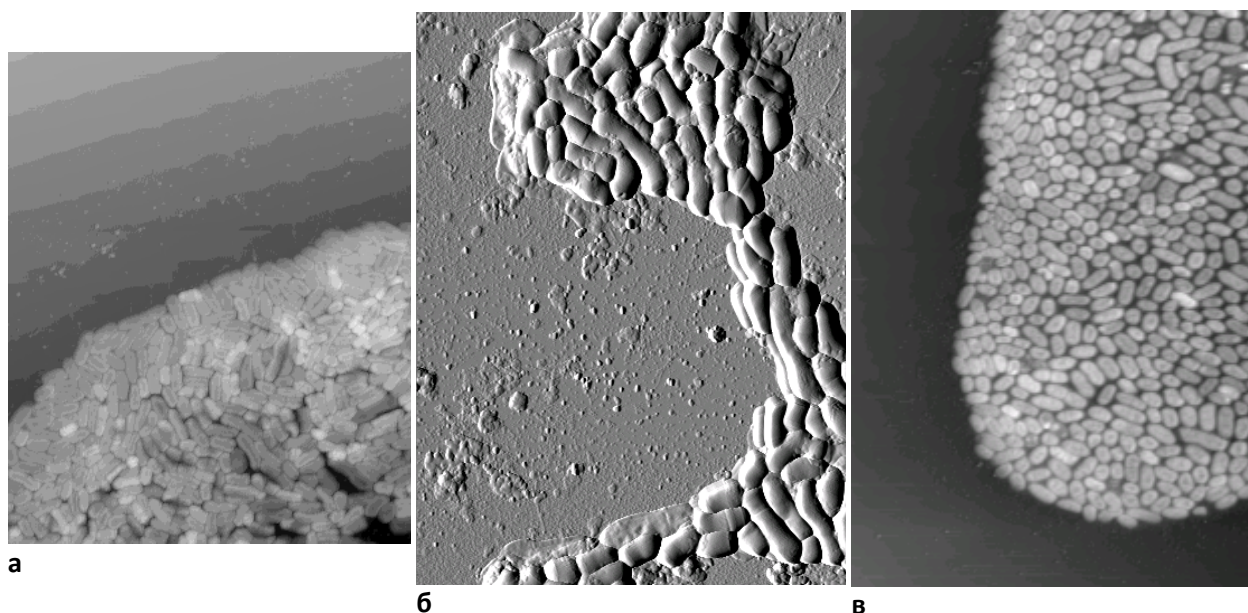


Рис. 6. Изображения монослойных островковых структур, образованных различными бактериями: *Escherihia coli* (а), *Klebsiella pneumoniae* (б), *Helicobacter pylori* (в) .

Размеры кадров: $31 \times 28 \text{ мм}^2$ (а), $40 \times 43 \text{ мкм}^2$ (б) и $14 \times 14 \text{ мкм}^2$ (в). Бактерии нанесены на поверхность свежесколотой слюды

Наблюдение бактериальных клеток осуществлялось также на других подложках (покрывное стекло, полированный титан, пленки из сплава золота и палладия). При адгезии бактерий на поверхности этих субстратов также происходило образование только монослойных островковых структур. При нанесении образцов на поверхность этих подложек высокого смачивания и, соответственно, растекания препарата не наблюдалось. В результате осаждение остаточных примесей из воды происходило в меньшей области подложки, что приводило к декорированию адсорбированными из раствора примесями мелких структурных деталей. Наблюдаемые изображения не давали высокой четкости и контраста. Для высококонтрастного наблюдения бактерий на таких субстратах необходимо предпринимать специальные меры по предварительной отмывке образцов в дистиллированной воде.

Проведенные измерения убедительно демонстрируют возможности метода атомно-силовой микроскопии применительно к визуализации бактериальных клеток с нанометровым пространственным разрешением. Зондовая микроскопия может быть применена для изучения структуры и локальных механических свойств различных прокариотических клеток. С помощью атомно-силового микроскопа становится реальным изучение адгезии клеток к различным субстратам, что может быть чрезвычайно полезным при разработке детергентов для стерилизации хирургического инструмента, при создании новых материалов для пластиковой и полимерной посуды и различных медицинских изделий, при создании контактных глазных линз с антибактерицидными свойствами.

Клеточная стенка прокариот играет роль защитного барьера, предохраняющего бактерию от механического воздействия. В ее состав входят специфические полимерные комплексы, состоящие из липидов, белков и углеводов. Химический состав и строение клеточной стенки постоянны для определенного вида и являются важным свойством, который может служить диагностическим признаком для зондовой микроскопии.

Генетически связанные штаммы бактерий

Внешняя оболочка клеточной стенки грамотрицательных бактерий состоит по большей части из липополисахаридов. Липополисахариды являются углеводсодержащими биополимерами, состоящими из липида А, олигосахаридного остова и O(S)-специфических полисахаридных цепей. Структура этой цепи построена из повторяющихся олигосахаридных блоков и определяет специфичность иммунного ответа высшего организма на инфекцию данным штаммом микроорганизма. Наибольший интерес представляет разработка методов визуализации специфических структур белковой и липополисахаридной природы, важных для физиологических функций бактериальной клетки.

В настоящее время с помощью методов генетического обмена возможно конструирование заданных по характеристике пар штаммов различных видов бактерий, различающихся по структуре биополимеров, которые входят в состав клеточных стенок. Антигены, представленные на поверхности клеток этими биополимерами, детально изучены у ряда патогенных бактерий. Для нас интерес представили штаммы *E. coli* K12, которые наследуют генетические детерминанты *Shigella flexneri*, контролирующие синтез основной антигенной структуры из первичных S-специфических боковых цепей липополисахарида O-антигена (антиген 3,4). Так как ранее в генетических экспериментах с шигеллами использовали хорошо изученные многочисленные мутанты штамма *E. coli* K12 J62, являющегося шероховатым, то в качестве исходного реципиента нами и был применен исходный клон, зависимый по гистидину и удобный для передачи *gfb*-генов *Shigella flexneri*, которые сцеплены с *his*-маркером их хромосомы. Целью настоящей работы явилось выяснение возможности использования атомно-силовой микроскопии для дифференциации поверхности бактериальных клеток *E. coli* K12, различающихся по наличию первичных S-специфических боковых цепей липополисахарида O-антигена, контролируемых наследуемым кишечными палочками *gfb*-геном *S. flexneri*.

В опытах использовали изогенную пару штаммов: исходный реципиентный штамм *E. coli* K12 J62 *his*⁻ *trp*⁻ *pro*⁻ и его гибрид *E. coli* K12 J62 *his*⁺ а 3,4⁺, полученный путем трансдукции фагом P1 *his*⁺ маркера от донорного штамма *S. flexneri* 2a 516 (II:3,4). Трансдуктант, обозначенный как *E. coli* K12 J62 *his*⁺ а 3,4⁺ №16-95, агглютинирует с адсорбированной монорецепторной сывороткой 3,4 *S. flexneri* на стекле в течение 30 с (сразу под петлей). Бактерии трансдуктанта, в отличие от исходной родительской культуры *E. coli* K12 J62 (Ra-хемотипа), утратили способность лизироваться шероховатым фагом F8 и приобрели лизабельность S-фагом F1.

Бактерии генетически связанной пары штаммов *E. coli* K12 J62 и *E. coli* K12 J62 №16-95 выращивали в мясо-пептонном бульоне или мясо-пептонном агаре в течение 16 ч при 37°C. Бактерии в объеме 0,1 мл бульонной культуры разводили в 0,9 мл дистиллированной воды, или готовили смыв с агара в концентрации 1х10⁹ микробных клеток в 1 мл дистиллированной воды. Далее каплю раствора объемом 4 мкл наносили на поверхность свежесколотой слюды. Промежуток времени от приготовления раствора до нанесения его на поверхность подложки варьировали в пределах 1–15 мин. Для этого интервала результаты последующих измерений с помощью АСМ были идентичны. Измерения проводились после естественного высыхания капли раствора, происходившего

в течение 15–30 мин. Осуществлялись также контрольные измерения образцов через 15 и 60 дней после их приготовления.

В экспериментальных исследованиях структуры поверхности бактерий применялся атомно-силовой микроскоп Наноскоп-2 фирмы Digital Instruments (Санта-Барбара, США). В качестве зонда был использован кантилевер с острием из нитрида кремния, механическая жесткость кантилеверов составляла 0,06 и 0,12 Н/м. Величина силы взаимодействия между острием и исследуемой поверхностью составляла $\approx 10^{-9}$ Н.

Изображения, полученные с помощью атомно-силового микроскопа, показывают, что осаждение бактерий на поверхность слюды при высыхании раствора происходило, как правило, в виде плотноупакованных монослойных островковых образований. Многослойные структуры на изображениях замечены не были. Типичная островковая структура, образованная отдельными бактериями, представлена на рис. 6. Размеры отдельных бактерий варьируются в пределах 1,5–2,5 мкм по длине и 0,4–0,5 мкм по видимой ширине. Высота бактерии составляет 0,05–0,2 мкм и указывает на некоторую деформацию бактерии при адгезии на поверхности слюды. На изображениях одиночных бактерий хорошо различимы длинные отростки — флагеллы длиной 1–6 мкм. Оболочка бактерии имеет хорошо различимую на изображении структурированную поверхность. На основании полученных изображений можно утверждать, что при помещении бактерий в процессе приготовления для исследования в дистиллированную воду лизис клеток не происходил. Применение дистиллированной воды позволило исключить образование солевых отложений, присутствующих в большом количестве при осаждении бактерий из солевого буфера. На АСМ-изображениях иногда заметно незначительное количество вещества, расположенного на поверхности слюды вблизи бактерий и являющегося, по всей видимости, результатом метаболизма бактерий.

Методом атомно-силовой микроскопии [Яминский, Бондаренко, Демин, 1997] проведены исследования клеточной поверхности исходного родительского штамма *E. coli* K12 J62 *his⁻* Ra-хемотипа и трансдуктанта *E. coli* K12 J62 *his⁺*, приобретшего способность синтезировать первичные S-специфические боковые цепи липополисахарида O-антигена *Shigella flexneri* (группоспецифический фактор 3,4). Сравнительный анализ изображений генетически связанной пары штаммов *E. coli* K12 J62 выявил существенные различия в топографии поверхностных структур сравниваемых бактериальных клеток, отличающихся по способности синтезировать S-специфические боковые цепи (фактор 3,4) *Shigella flexneri*, которые представлены повторяющимися молекулами L-рамнозы и N-ацетил-D-глюкозамина.

На рис. 7 представлены изображения исходного штамма *E. coli* K12 J62 и модифицированного штамма *E. coli* K12 J62 №16-95, приготовленных описанным выше образом. Заметно общее сходство изображений с предыдущими наблюдениями исходного, немодифицированного, генетически связанного штамма. Атомно-силовая микроскопия выявляет существенные различия в морфологии поверхности сравниваемых штаммов *E. coli* J62.

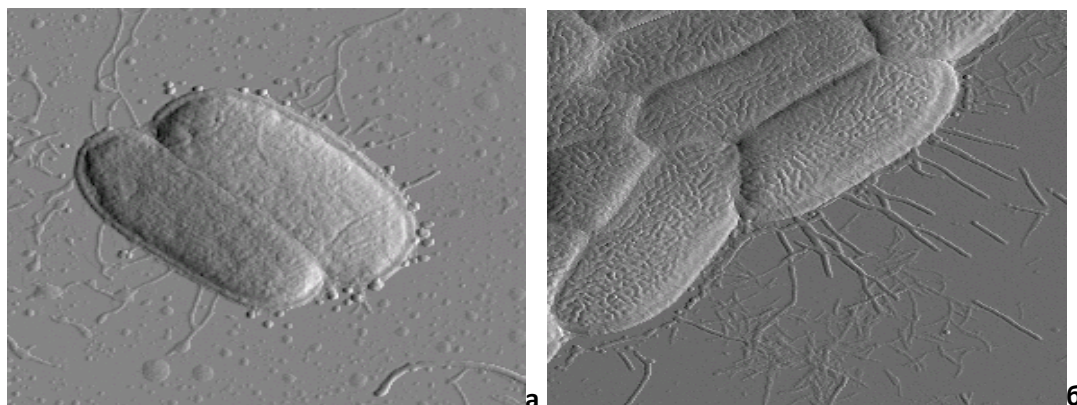


Рис. 7. Изображения исходного родительского (а) и трансдуктантного (б) штамма *E. coli*
Размер кадра 4 × 4 мкм²

Для штамма бактерий *E. coli* K12 J62 №16-95 характерна высокая структурированность поверхности с образованием ламелей в форме продолговатых пластинок. Отдельные ламели имеют длину в диапазоне 200–500 нм при ширине 30–40 нм. Ламели на поверхности штамма плотно упакованы и образуют единую поверхность бактериальной клетки. Для исходного штамма *E. coli* K12 J62 изображения, полученные с помощью атомно-силового микроскопа, указывают на практически полное отсутствие ламелярной поверхности клеточной стенки. При этом наблюдаются поверхностные структуры, видимая граница раздела между которыми имеет округлую форму. Характерный диаметр этих структур колеблется в пределах 30–50 нм.

Общепризнана роль липополисахарида О-антигена в вирулентности грамотрицательных бактерий. Кластеры генов *rfa-rfb* обеспечивают биосинтез липополисахарида О-антигена *Shigella flexneri*, который, как полагают, защищает бактерии от разрушающего действия кислого рН желудочного сока, желчных кислот в просвете желудочно-кишечного тракта, а также местных антител и фагоцитов.

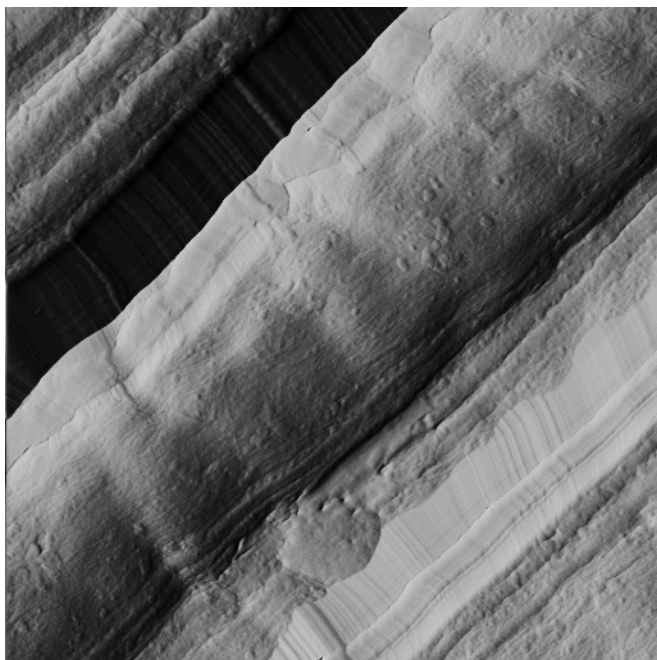
В серии исследований иммунохимической структуры липополисахарида О-антигена *S. flexneri*, начатых Д. Симмонсом [Simmons, 1971], показано, что в основе липополисахарида сероваров *S. flexneri* 1-5 лежит структура группового антигена 3,4. Этот антиген включает полисахаридные цепи, содержащие L-рамнозу и N-ацетил-D-глюкозамин. Исключение составляет серовар 6 *S. flexneri* (*S. newcastle*). Основная структура антигена V1 включает N-ацетил-галактозамин. Эти данные подтверждены в генетических экспериментах, в которых доказана возможность перехода *S. flexneri* сероваров 1-5 в исходный “у” вариант в результате замещения при конъюгации с *E. coli* K12 Hfr-штаммами *lac-rfa*-области хромосомы.

Типовые антигены *S. flexneri* 1-5 являются модификацией основной структуры (антигена 3,4) и у *S. flexneri* 2a, и представлены цепями α -глюкозы.

На основании полученных методом атомно-силовой микроскопии изображений мы предполагаем, что наблюдаемые различия в клеточной поверхности гибридных бактерий *E. coli* K12 обусловлены изменениями морфологии мутантного штамма, наследующего *rfa-a3,4* ген *Shigella flexneri*.

ВМЕСТО ПОСЛЕСЛОВИЯ: *ANETHUM GRAVEOLENS*, ИЛИ О ПОЛЬЗЕ ЭКСПЕРИМЕНТИРОВАНИЯ

На рис. 1 представлено изображение стебелькового растения *Anethum graveolens*. Структурную основу стебелька составляют продольные и поперечные волокна. Продольные волокна имеют диаметр в несколько микрон. Что удивительно, атомно-силовой микроскоп позволил увидеть структуру поперечных микроволокон — фибрил, диаметр которых составляет 10–30 нм (рис. 2).



**Рис. 1. Фрагмент среза стебелька
Anethum graveolens
Размер кадра $5,4 \times 5,4 \text{ мкм}^2$**

Следует заметить, что *Anethum graveolens* — это обычный укроп, который является вкусной и полезной добавкой к нашей еде. Укроп незадолго до наблюдений был куплен на Черемушкинском рынке Москвы и предназначался для выздоравливающего сотрудника нашего физического факультета МГУ. В зимнее время насыщенный зеленый цвет укропа особенно радует глаз, а тонкий запах будоражит гастрономические ощущения. И велик соблазн был проверить, что же увидит атомно-силовой микроскоп на свежем срезе стебелька только что выращенного укропа. Казалось, что надежд на успех мало. Свежий укроп содержит в себе много влаги, срез может иметь слишком шероховатую поверхность и т.д. Преодолевая опасения, мы поместили небольшой участок стебелька укропа в форме лепестка на предметный столик микроскопа. Каково же было наше удивление, когда буквально сразу микроскоп стал показывать устойчивые изображения волокнистой структуры стебля.

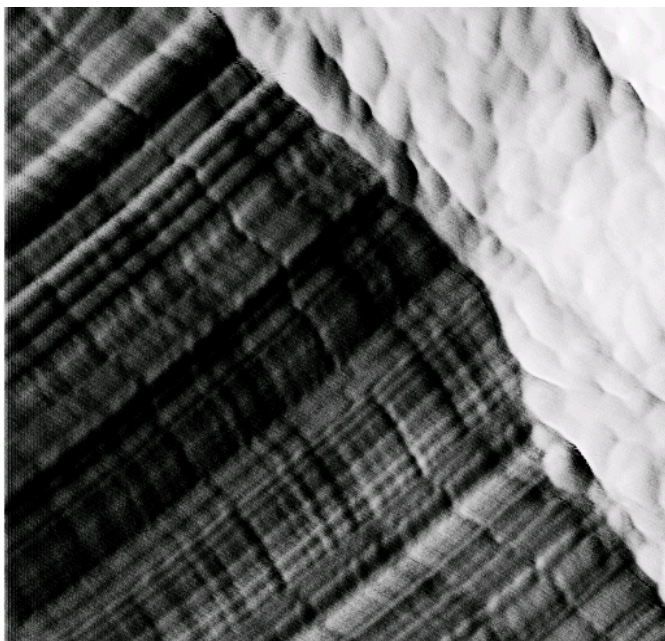


Рис. 2. Изображение структуры поперечных волокон стебелька *Anethum graveolens*

Размер кадра $1 \times 1 \text{ мкм}^2$

Вслед за укропом мы решили провести эксперименты с *Allium sativum*, или, иными словами, с чесноком, приобретенном на том же Черемушкинском рынке. Теперь мы заметили, что тонкая пленочка, обволакивающая каждую дольку чеснока, имеет четко выраженную структурированную поверхность. Чтобы убедиться, посмотрите на рис. 3. Эти наблюдения произвел автор при участии и с помощью сотрудников физического факультета Т.Г. Черневич и О.А. Шустина.

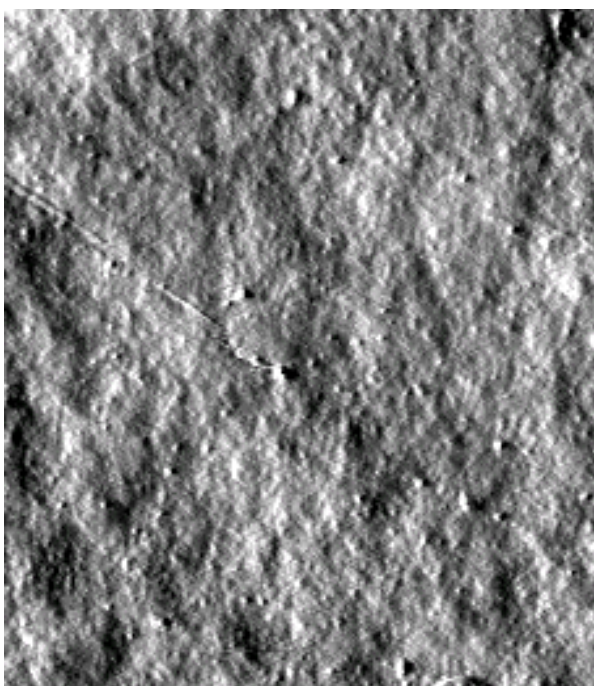


Рис. 3. Изображение поверхности тонкой пленки, обволакивающей поверхность дольки чеснока

Размер кадра $8 \times 9 \text{ мкм}^2$

Этот частный случай напомнил нам о многих удивительных фактах из истории создания и развития зондовых микроскопов. Даже само рождение сканирующего туннельного микроскопа было неожиданным для самих изобретателей. Первоначальной целью работы швейцарских ученых Хайнриха Рорера и Герда Биннига была разработка прибора для спектроскопических исследований участков поверхности сверхпроводников. Тогда в их рабочей тетради были произведены теоретические оценки того, что вряд ли удастся получить разрешение лучше десятков нанометров. Созданный ими прибор предвосхитил

их ожидания. Они сумели разглядеть отдельные атомы на поверхности кремния! Смелое экспериментирование, опыт, знания и тонкая интуиция обеспечили им достижение столь блестящих результатов. Первой и естественной реакцией было неверие в то, что с помощью простой заостренной иглы можно увидеть отдельные атомы. Но теоретическое недоверие практически сразу сменилось искренним восторгом по поводу красивой экспериментальной работы. Еще ни один раз в истории зондовой микроскопии экспериментальные работы приводили в удивление теоретиков. Зондовая микроскопия, по сути, стала тем уникальным направлением науки, в котором эксперимент значительно опережал теоретические работы. Теория как бы говорила, что это невозможно, а эксперимент выдавал “на гору” новые открытия.

Зондовая микроскопия показала уникальные возможности визуализации биологических объектов в их нативном состоянии в естественном окружении. Здесь она сделала лишь первые шаги, новые достижения еще впереди.

Таким образом, вся история развития зондовой микроскопии говорит о пользе разумного научного экспериментирования.