

УДК 57.088.1

ЯЧЕЙКА ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ ЕДИНИЧНЫХ МОЛЕКУЛ В ЕСТЕСТВЕННОЙ СРЕДЕ *IN VITRO* АТОМНО-СИЛОВОЙ МИКРОСКОПИЕЙ

¹Мухуров Н.И., ¹Гасенкова И.В., ²Чижик С.А.

¹ГНПО «Оптика, оптоэлектроника и лазерная техника», г. Минск, Беларусь

²Институт тепло- и массообмена им. А.В. Лыкова НАН Беларуси, г. Минск, Беларусь

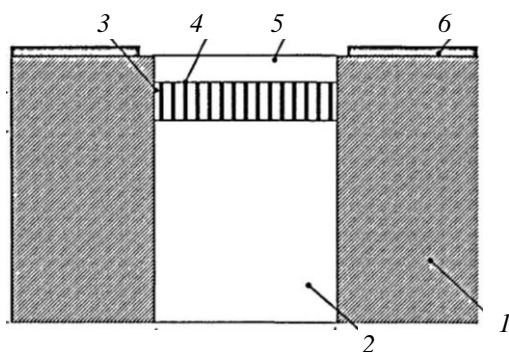
В экспериментальных методах классической химии, биохимии и биофизики наблюдения проводятся на системе, состоящей из огромного числа молекул [1-4]. Получаемые данные характеризуют усредненные свойства молекул изучаемой системы, из-за чего теряется значительная часть информации. В живом организме важные реакции, регулирующие жизнедеятельность, протекают именно между отдельными молекулами – ДНК и ДНК-полимеразой, миозином и актином, антителом и антигеном, рецептором и лигандом. Для биологических макромолекул, которые в ходе выполнения своей роли переходят из одного функционального состояния в другое, зачастую невозможно выяснить классическими методами ни количество этих состояний, ни последовательность перехода из одного в другое, ни время жизни каждого состояния. Методы изучения единичных молекул позволяют решить эти задачи, и непосредственно экспериментально охарактеризовать единичные межмолекулярные взаимодействия [5, 6]. Это методы на основе оптических [7, 8], магнитных [9] и оптоэлектронных пинцетов [10, 11], камеры ламинарного потока [12] и атомно-силовая микроскопия (АСМ) [4]. Во всех этих методах используется манипулирование единичными молекулами – с помощью лазера (оптический пинцет), магнитного поля (магнитный пинцет), потока жидкости (камеры ламинарного потока), механического зонда (АСМ). В последние годы все больше и больше новых экспериментальных данных в биологии дает изучение свойств и межмолекулярного взаимодействия отдельных биологических молекул. Одним из перспективных методов изучения единичных молекул, наряду с флуоресцентной микроскопией (конфокальная и TIRF-микроскопия), является зондовая (в том числе, атомная силовая) микроскопия [6].

Методы атомно-силовой микроскопии находят все более широкое применение в биологии, медицине и фармакологии. В отличие от электронной микроскопии, методы АСМ не требуют длительной подготовки образца к исследованию, этапов окрашивания, но дают возможность изучать трехмерную геометрию поверхности исследуемого объекта с нанометровым пространственным разрешением. Физической основой функционирования АСМ являются силы межатомного (или межмолекулярного) взаимодействия, возникающие между исследуемой поверхностью и зондом, находящимся на расстоянии порядка 0,1-10 нм.

Атомно-силовой микроскоп имеет ряд преимуществ перед оптическим или растровым электронным. Во-первых, он позволяет получать истинно трехмерный рельеф исследуемой поверхности. Во-вторых, при его использовании не требуется, чтобы образец проводил электричество. Кроме того, измерения можно осуществлять не только в вакууме, но и на воздухе, в атмосфере любого газа и даже в капле жидкости. Последнее обстоятельство открывает широкие возможности для изучения органических молекул и живых клеток. Большая часть работ по регистрации единичных межмолекулярных взаимодействий на сегодняшний день выполнена с использованием атомно-силовой микроскопии. В качестве подложки для исследований могут быть использованы различные материалы: полупроводниковые – кремний [12], проводящие электрический ток – серебро [13], диэлектрические – слюда, кварц и др. [14]. Основным преимуществом атомно-силовой микроскопии является возможность использования биологических объектов в жидкости с молекулярным разрешением.

Применение атомно-силовой микроскопии в биологических исследованиях обуславливает определенные требования, как к конструкции прибора, так и к самой ячейке, в которой можно выделять и манипулировать отдельными молекулами.

В качестве примера (среди множества вариантов) можно привести устройство для выращивания колоний микробных клеток (рис. 1). Устройство для выращивания колоний микробных клеток (биологических объектов) в естественной среде вне организма (*in vitro*), проведения наблюдения за ростом колоний, а также их исследования с помощью микроскопа (ячейка для исследования биологических объектов в естественной среде *in vitro* с помощью микроскопа) содержит пористую пластину из анодного оксида алюминия (АОА) со сформированными на ее верхней поверхности зонами роста колоний микробных клеток. Пористая пластина из АОА расположена в корпусе с образованием верхней и нижней емкостей корпуса, которые снабжены входом и выходом с клапанами для жидких сред, при этом нижняя емкость снабжена входом и выходом для питательной среды микробных клеток, а ее вход предназначен для соединения с внешним насосом. Верхняя емкость снабжена входом для суспензии микробных клеток и выходом для выросших микроколоний, а верхняя поверхность корпуса выполнена проницаемой для газов, но непроницаемой для влаги и частиц внешней среды. Нижняя емкость предназначена для формирования гидроудара, с силой, достаточной для отрыва колоний от зон роста, но не разрушающей колонии. Пористая пластина из анодного оксида алюминия имеет отверстия цилиндрической формы, сформированные ортогонально большой плоскости пластины и топологически кодированные, а в каждом отверстии расположены пористые мембраны из анодного оксида алюминия с порами, не пропускающими микробные клетки, образующие зоны роста, причем пористые мембраны расположены либо вровень с верхней поверхностью пористой пластины, либо с образованием лунки, при этом на поверхности пластины между зонами роста сформирована пленка, препятствующая прикреплению микробных клеток. Кроме того, крышка верхней емкости снабжена центральным окном, с закрепленным в нем оптическим стеклом для наблюдения за ростом колоний с помощью внешней видеокамеры. Исследования пористой пластины с результатами проведения инкубирования проводят с помощью микроскопа.



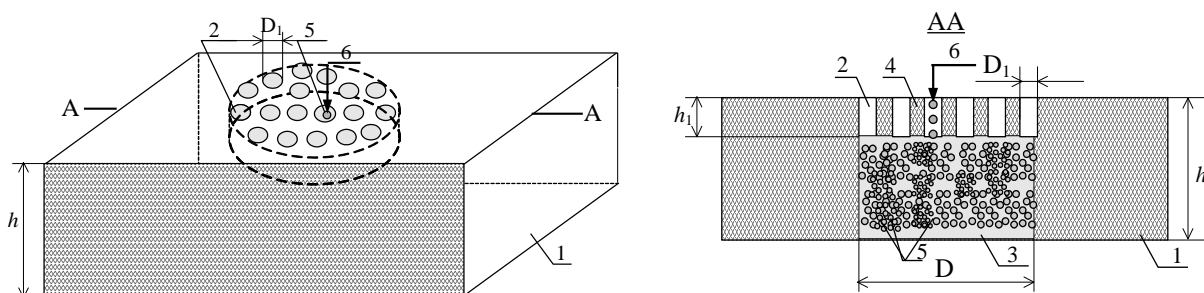
1 – пластина из пористого АОА, 2 - отверстие,
3 – пористая мембрана, 4 - поры, 5 - лунка,
6 - материал, препятствующий прикреплению к
нему клеток.

Рисунок 1. – Конструкция устройства для выращивания клеток.

Недостатками приведенного устройства являются сложность конструкции, невозможность манипулирования и исследования единичных молекул из естественной среды.

Нами предложена конструкция ячейки для исследования единичных молекул в естественной среде *in vitro* с помощью микроскопа на основе нанопористой подложки из АОА [17]. Ячейка для исследования единичных молекул в естественной среде *in vitro* атомно-силовой микроскопией содержит пористую пластину из анодного оксида алюминия 1 с расположенной вровень с ее поверхностью пористой мембраной 4 (рис. 2). Пористая мембрана 4 образована над колодцем 3, выполненным в нижней части пористой пластины из анодного оксида алюминия 1. В колодце 3 диаметром D , составляющим не менее 1 мм, расположен питательный раствор с молекулами. Образованная над колодцем 3 по-

ристая мембрана 4 позволяет исследовать через ее пору 2 единичную молекулу 5 из питательного раствора, ближайшую к кантелеверу 6 атомно-силового микроскопа.



1 – пористая пластина из анодного оксида алюминия; 2 – пора; 3 – колодец; 4 – пористая мембрана; 5 – молекулы; 6 – кантелевер атомно-силового микроскопа; D – диаметр колодца; D_1 – диаметр пор; h – толщина пористой пластины из анодного оксида алюминия; h_1 – толщина пористой мембраны.
Рисунок 2. - Ячейка для исследования единичных молекул в естественной среде *in vitro* атомно-силовой микроскопией

Толщина h пористой пластины из анодного оксида алюминия 1 составляет не менее 40 мкм, что обеспечивает достаточную механическую прочность. Диаметр D_1 пор 2 пористой мембраны 4 составляет не менее $3d_{\text{мол. мин.}}$, где $d_{\text{мол. мин.}}$ – минимальный диаметр исследуемых единичных молекул 5, а толщина пористой мембраны 4 над колодцем 3 определена из соотношения:

$$3d_{\text{мол. средн.}} < h_1 \leq 10 \text{ мкм},$$

где $d_{\text{мол. средн.}}$ – средний диаметр исследуемых единичных молекул, нм,

h_1 – толщина пористой мембраны, мкм.

Ячейка для исследования единичных молекул в естественной среде *in vitro* атомно-силовой микроскопией работает следующим образом. При введении кантелевера атомно-силового микроскопа в одну из пор пористой мембраны и приложении к кантелеверу электрического потенциала под действием сил притяжения ближайшая к нему из единичных молекул в питательном растворе колодца, притягивается на кончик кантелевера. Далее возможно манипулирование такой молекулой для исследования ее свойств.

Экспериментальные образцы пористых пластин из анодного оксида алюминия изготовлены путем электрохимического анодирования исходной пластины алюминия до требуемой толщины и последующего травления не прореагировавшего алюминия. С использованием процесса фотолитографии и травления в нижней части пористой пластины из анодного оксида алюминия сформирован колодец диаметром, составляющим не менее 1 мм, что определяется объемом питательной среды для длительного свободного существования единичных молекул в естественной среде. Над колодцем в пористой пластине из АОА образована пористая мембрана. Толщина пористой пластины определяется механической прочностью конструкции, удобством работы с ней и определена экспериментально. Толщина пористой мембраны над колодцем определяется механической прочностью конструкции, возможностью кантелевера при вхождении в отдельную пору обеспечивать требуемые величины воздействия на единичные молекулы из питательного раствора в колодце. Диаметр пор пористой мембраны также определен экспериментально.

Предложенная конструкция обеспечивает возможность манипулирования единичными молекулами и их исследования из естественной среды.

Список использованных источников

1. Андреева, Н.В. Физика и диагностика биомолекулярных систем. Исследования методами зондовой микроскопии: учебное пособие / Н.В. Андреева, П.Г. Габдуллин. – СПб. Изд-во СПбГПУ, 2012. – 149 с.

2. Chang, Kai-Chih. Atomic force microscopy in biology and biomedicine / Kai-Chih Chang, Yu-Wei Chiang, Chin-Hao Yang, Je-Wen Liou // Tzu Chi Medical Journal. – 2012. – Vol. 24, No.4. – P. 162–169.
3. Плескова, С.Н. Атомно-силовая микроскопия в биологических и медицинских исследованиях: Учебное пособие / С.Н. Плескова. - Долгопрудный: Интеллект, 2011. - 184 с.
4. Мошников, В.А. Атомно-силовая микроскопия для исследования наноструктурированных материалов и приборных структур: учеб. пособие / В.А. Мошников, Ю.М. Спивак, П.А. Алексеев, Н.В. Пермяков. - СПб. Изд-во СПбГЭТУ «ЛЭТИ», 2014. - 144 с.
5. Фенюк, Б.А. Методы исследования единичных биологических молекул: учебный курс / Б.А. Фенюк. - М.: МГУ имени М.В. Ломоносова, 2012. – 182 с.
6. Сафенкова, И.В. Применение атомно-силовой микроскопии для характеристики единичных межмолекулярных взаимодействий / И.В. Сафенкова, А.В. Жердев, Б.Б. Дзантиев // Успехи биологической химии. – 2012. - Т. 52. - С. 281–314.
7. Juan, M. L. Plasmon nano-optical tweezers // M.L. Juan, M. Righini, R. Quidant // Nat. Photon. – 2011. Vol. 5. – P. 349–356.
8. Maragò, O.M. Optical trapping and manipulation of nanostructures // O.M. Maragò [et. al.] // Nat. Nanotechnol. – 2013. – Vol. 8. – P. 807–819.
9. Де Вламник, I. Последние достижения в области магнитных пинцетов / Де Вламник I., Деккер К. // Ежегодный обзор биофизики. – 2012. – Т. 41. - P. 453–472.
10. Wu, M. C. Optoelectronic tweezers / M.C. Wu // Nat. Photon. – 2011. Vol. 5. - P. 322–324.
11. Zhang, S. Manipulating and assembling metallic beads with Optoelectronic Tweezers / S. Zhang, J. Juvert, J.M. Cooper, S.L. Neale // Sci. Rep. – 2016 – Vol.6 – P. 32840-6.
12. Alon, R. Lifetime of the P-selectin-carbohydrate bond and its response to tensile force in hydrodynamic flow // R. Alon, D.A. Hammer, T.A. Springer // Nature. - 1995. – Vol. 374. – P. 539–542.
13. Rusimova, K.R. Regulating the femtosecond excited-state lifetime of a single molecule / K.R. Rusimova [et. al.] // Science. – 2018. -Vol. 361, Iss. 6406. - P. 1012-1016.
14. Esat, T. A standing molecule as a single-electron field emitter / T. Esat, N. Friedrich, F. S. Tautz & R. Temirov // Nature. – 2018. - Vol. 558. – P. 573–576.
15. Мошников, В.А. Атомно-силовая микроскопия для нанотехнологии и диагностики: учеб. пособие / В.А. Мошников, Ю.М. Спивак // СПб.: СПбГЭТУ ЛЭТИ. – 2009. - 80 с.
16. Пат. № 2522005 РФ. Способ выращивания колоний микробных клеток и устройство для его реализации / Т.М. Зими́на и др. // Оpubл.: 10.07.2014. - Бюл. № 19.
17. Пат. № 11431 РБ. Ячейка для исследования единичных молекул в естественной среде *in vitro* атомно-силовой микроскопией / Н.И. Мухуров, И.В. Гасенкова, С.А. Чижик, С.О. Абетковская // Заявка u20170022 от 30.01.2017. П.р. 28.02.17.