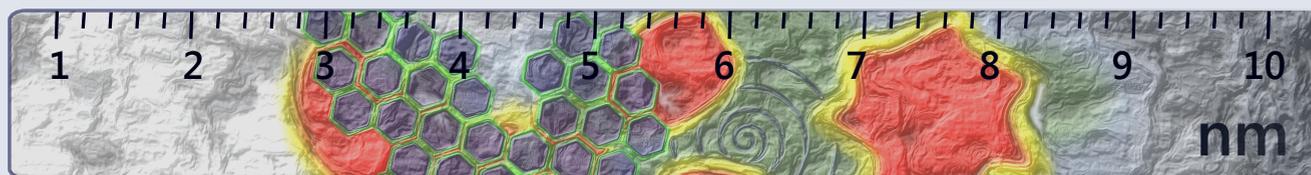


Современные достижения бионаноскопии

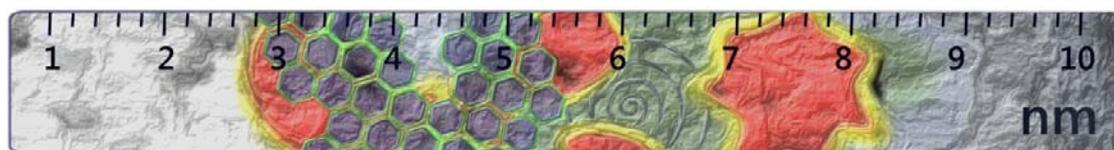


Сборник тезисов

Пятая международная конференция
15-17 июня 2011 г., Москва
МГУ имени М.В. Ломоносова

Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова
Москва-2011

Современные достижения бионаноскопии



Пятая международная конференция

15 – 17 июня 2011 года

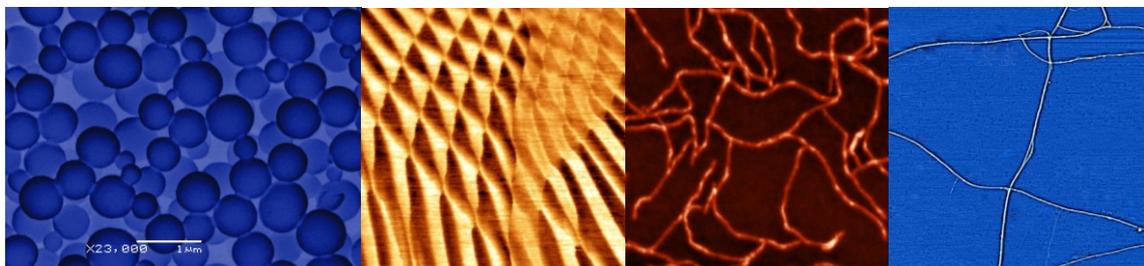
МГУ имени М.В. Ломоносова
Центр перспективных технологий

Программный комитет:

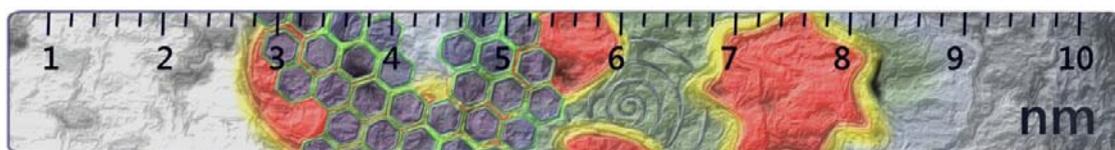
Атабеков И.Г. – академик РАН, Россия
Кирпичников М.П. - академик РАН, Россия
Лунин В.В. – академик РАН, Россия
Скулачев В.П. – академик РАН, Россия
Третьяков Ю.Д. – академик РАН, Россия
Хохлов А.Р. – академик РАН, Россия
Ахаев Д.Н. – доцент биологического факультета МГУ, Россия
Бонарцев А.П. – научный сотрудник биологического факультета МГУ, Россия
Гудилин Е.А. – член-корр. РАН, Россия
Клячко Н.Л. – профессор химического факультета МГУ, Россия
Курочкин И.Н. – профессор, Россия
Панов В.И. – профессор, Россия
Тимошенко В.Ю. – профессор физического факультета МГУ, Россия
Федянин А.А. – старший преподаватель физического факультета МГУ, Россия
Шайтан К.В. – профессор, Россия
Яминский И.В. – профессор, Россия
Kim T.S. – Professor, KIST, Korea
Lyubchenko Y.L. – Professor, Nebraska Medical Center, USA
Magonov S.N. – Research Scientist, Agilent, USA
Zinoviev K.E. – Research Scientist, Spain

Организационный комитет:

Яминский И.В. – профессор МГУ, Россия (председатель)
Дубровин Е.В. – научный сотрудник физического факультета МГУ, Россия (ответственный секретарь)
Протопопова А.Д. – инженер физического факультета МГУ, Россия
Мухин Д.В. – менеджер Центра перспективных технологий, Россия



Современные достижения бионаноскопии



Программа пятой международной конференции

«Современные достижения бионаноскопии»

1-й день (среда, 15 июня 2011 года)

- 9:30 – 10:00 Регистрация участников.
10:00 – 10:05 Яминский И.В. Вступительное слово.
10:05 – 10:45 Клинов Д. В. Перспективы картирования и секвенирования ДНК методом СЗМ.
10:45 – 11:05 Прохоров В.В. Структурное многообразие эпитаксиальных монослоев гексаглициламида на поверхности графита.
11:05 – 11:25 Дзюбенко Е.В. Исследование астроцитов в среде культивирования методом АСМ.

Кофе-брейк

- 11:50 – 12:35 Назарова А.И. Новые достижения флуоресцентной микроскопии высокого разрешения системы N-SIM и N-STORM Nikon.
12:35 – 13:15 Плескова С.Н. Взаимодействие нативных клеток крови с наноразмерными флюорофорами.
13:15 – 13:35 Шеваль Е.В. Изучение молекулярных взаимодействий белков в живой клетке с использованием микроскопических методов.
13:35 – 13:55 Андреев Д.С. Новые разработки НТ-МДТ.

Перерыв

- 15:00 – 16:30 Стендовая сессия.

Кофе-брейк

- 16:30 – 18:30 Практикум по зондовой микроскопии, организованный компаниями Аист-НТ, НТ-МДТ и Центр перспективных технологий.
18:30 – 19:30 Любченко Ю.Л. Nanocinematography: Real-Time AFM Imaging of Dynamics of Molecules.

2-й день (четверг, 16 июня 2011 года)

- 10:00 – 10:05 Яминский И.В. Вступительное слово.
10:05 – 11:05 Джайевер Айвор. ECIS: A whole cell biosensor.
11:05 – 11:30 Яминский И.В. Сканирующая зондовая микроскопия для медицины.
11:30 – 12:10 Сердюк И.Н. Биофизика одиночных молекул.

Кофе-брейк

- 12:30 – 12:50 Толстова А.П. Компьютерное моделирование как способ повышения информативности атомно-силовой микроскопии биополимеров.
12:50 – 13:35 Игнатов С.Г. Атомно-силовая микроскопия как инструмент в микробиологии.

Перерыв

- 14:30 – 15:00 Подведение итогов конкурса BioImage и конкурса на лучший стендовый доклад. Совместное фото участников конференции.
- 15:00 – 15:20 Хасин А.А. Визуализация взаимодействия патогенных бактерий с клетками эпителия человека.
- 15:20 – 15:40 Ефремов Ю.М. Изучение эмбрионов *Xenopus laevis* методами АСМ.

Кофе-брейк

- 16:00 – 17:00 Филонов А.С. Семинар. Новые возможности программы FemtoScan Онлайн по выделению и анализу биообъектов.

3-й день (пятница, 17 июня 2011 года)

- 10:00 – 10:20 Сергеев С.А. Исследование поведения и дифференцировки стволовых клеток при *in vitro* трансплантации в 3D культуру сетчатки.
- 10:20 – 10:40 Трушин М.В. AFM investigation of *Mycoplasma gallisepticum* S6 cells cultivated in different growth conditions.
- 10:40 – 11:00 Ермоленко Е.А. Использование АСМ для идентификации центрохелидных солнечников *Centrohelida protista*.

Кофе-брейк

- 11:20 – 11:40 Роскошная А.С. Применение АСМ для визуализации внутренней структуры клеток.
- 11:40 – 12:00 Дрозд Е.С. Оценка морфо-функционального состояния тромбоцитов методом АСМ.
- 12:00 – 12:20 Амионов С.В. Зарядовый биосенсор на основе подвешенного кремниевго нанопровода.
- 12:20 – 12:50 Подведение итогов конференции.

Перерыв

- 14:00 – 18:00 Экскурсия в музей холодной войны «Бункер».

СОДЕРЖАНИЕ

| | |
|--|-----------|
| Зарядовый биосенсор на основе подвешенного кремниевого нанопровода | 9 |
| В.А. Крупенин, Д.Е. Преснов, И.Н. Курочкин, Е.Г. Евтушенко, С.В. Амионов | |
| Изучение морфологии поверхности ультратонких пленок из поли(3-оксибутирата) 11 | 11 |
| Д.В. Багров, А.П. Бонарцев, И.И. Жаркова, Е.А. Иванов, А.П. Босхомджиев, Т.К. Махина, Е.В. Филатова, С.Г. Яковлев, В.В. Воинова, Г.А. Бонарцева, К.В. Шайтан | |
| Наноразмерные изменения оптической разности хода миелинового нерва при модификации его белкового и липидного состава | 13 |
| Н.Н. Родионова, Е.З. Бибинейшвили, А.И. Юсипович, Г.В. Максимов | |
| Свойства ионно-имплантированных каналов в алмазе, существенные для его биосенсорных применений | 15 |
| О.П. Будник, П.И. Будник | |
| Атомно-силовая микроскопия наночастиц гексацианоферрата железа – новой дискретной фазы в иммунохроматографии | 16 |
| С.Н. Скопинская, С.П. Ярков, В.Н. Злобин, Х.Х. Валиев, Ю.Н. Карнет, Г.Н. Ковалев, Н.С. Снегирева, Ю.Г. Яновский | |
| Лазерная обработка металлов для создания гидрофобных и антибактериальных поверхностей..... | 18 |
| В.Я. Шур, Е.В. Шишкина, С.Г. Васильев, Д.С. Петухова, А.Е. Тюрина | |
| Изучение влияния микробной рнказы на липидные бислой методами атомно-силовой микроскопии и дифференциальной сканирующей калориметрии | 19 |
| И.А. Гоечко, О.А. Коновалова, Н.В. Калачева, А.В. Филиппов | |
| Исследование астроцитов в среде культивирования методом атомно-силовой микроскопии..... | 20 |
| Е.В. Дзюбенко, Ю.М. Ефремов, Д.В. Багров, Г.В. Максимов, С.И. Шрам, К.В. Шайтан | |
| Оценка морфо-функционального состояния тромбоцитов методом АСМ..... | 22 |
| Е.С. Дрозд, Л.В. Кухаренко, С.В. Сыроежкин, Л.Г. Гелис, Е.А. Медведева, И.В. Лазарева | |
| Использование атомно-силовой микроскопии для идентификации центрохелидных солнечников (<i>centrohelida, protista</i>) | 23 |
| Е.А. Ермоленко, А.С. Васильченко, А.О. Плотников | |
| Изучение эмбрионов <i>xenopus laevis</i> методами атомно-силовой микроскопии | 25 |
| Ю.М. Ефремов, Е.А. Пухлякова, Д.В. Багров, Л.В. Белоусов, К.В. Шайтан | |
| Атомно-силовая микроскопия как инструмент в микробиологии | 26 |
| С.Г. Игнатов, А.Г. Волошин, Г.Н. Федюкина, С.В. Краевский, Т.Е. Игнатюк, Е.В. Дубровин | |

| | |
|---|-----------|
| Перспективы картирования и секвенирования ДНК методом СЗМ..... | 27 |
| Д.В. Клинов | |
| Создание сенсора для определения антител групп крови человека | 28 |
| Д.В. Колесов, Г.А. Киселев, М. Моисеев, А.А. Кудринский, И.В. Яминский | |
| Особенности взаимодействия амфифильных полимеров с порфиринами по данным атомно-силовой микроскопии | 29 |
| С.Л. Котова, В.А. Тимофеева, Н.А. Аксенова, А.Б. Соловьева | |
| AFM study on the structure and dynamics of complexes with single stranded DNA binding proteins | 30 |
| A.Y. Lushnikov, L.S. Shlyakhtenko, A. Miyagi, M. Li, L. Lackey, R.S. Harris, Yu.L. Lyubchenko | |
| Nanocinematography: real-time AFM imaging of dynamics of molecules..... | 31 |
| Yuri L. Lyubchenko | |
| Исследование взаимодействия одиночных молекул бета-амилоидного белка методом силовой спектроскопии | 32 |
| Е.В. Морозова, Ю.Л. Любченко | |
| Фибриллоподобные структуры белка hfq из <i>pseudomonas aeruginosa</i> | 33 |
| В.Н. Мурина, О.М. Селиванова, М.Б. Гарбер, С.В. Никонов, А.Д. Никулин | |
| Новые достижения флуоресцентной микроскопии высокого разрешения. Системы N-SIM и N-STORM Nikon | 34 |
| А.И. Назарова | |
| Локальная иммобилизация <i>chlamydia trachomatis</i> на микроструктурированной поверхности | 35 |
| И.В. Парибок, Г.К. Жавнерко, В.Е. Агабеков, А.Н. Асташонок, Л.В. Рубаник, Н.Н. Полещук | |
| Применение метода атомно-силовой микроскопии для исследования поверхностной структуры эритроцитов | 36 |
| Е.Ю. Паршина, А.И. Юсипович, В.Н. Рябоконт, Г.В. Максимов | |
| Получение золотых наночастиц для высокочувствительного иммуноанализа на основе ГКР | 37 |
| Ю.С. Пестовский, И.А. Будашов | |
| Искусственные вирусные частицы, образованные белком оболочки потексвируса и чужеродными вирусными РНК | 38 |
| Е.К. Петрова, М.В. Архипенко, Н.А. Никитин, А.Д. Протопопова, Е.В. Дубровин, И.В. Яминский, О.В. Карпова, И.Г. Атабеков | |

| | |
|--|-----------|
| Взаимодействие нативных клеток крови с наноразмерными флюорофорами | 39 |
| С.Н. Плескова, Э.Р. Михеева, Е.Н. Горшкова | |
| Структурное многообразие эпитаксиальных монослоев гексаглициламида на поверхности графита | 41 |
| В.В. Прохоров | |
| Применение атомно-силовой микроскопии для визуализации внутренней структуры клеток..... | 43 |
| А.С. Роскошная, Д.В. Багров, Г.Е. Онищенко, К.В. Шайтан | |
| Анализ дзета-потенциала клеток человека методом динамического рассеяния света | 45 |
| Д.В. Сайфуллина, И.И. Шахмаева, Т.И. Абдуллин | |
| Влияние наночастиц серебра на морфологические параметры и структурную целостность мембран эритроцитов | 46 |
| А.С. Сарычева, А.И. Юсипович, Е.Ю. Паршина, Н.А. Браже | |
| Исследование поведения и дифференцировки стволовых клеток при <i>in vitro</i> трансплантации в 3D культуру сетчатки | 47 |
| С.А. Сергеев, Ю.В. Храмова, Ю.М. Ефремов | |
| Локальное анодное окисление углеродных материалов – новый путь к созданию наноструктур | 49 |
| О.В. Синецкина, Г.Б. Мешков, И.В. Яминский | |
| Атомно-силовая микроскопия для оценки влияния фиксирования и окрашивания клеток..... | 50 |
| О.В. Стеряков, О.А. Коновалова, Л.И. Анчикова, И.Х. Валеева | |
| Современные методы СЗМ. новые разработки НТ-МДТ..... | 51 |
| А.А. Тихомиров, В.А. Быков | |
| Трактовка данных атомно-силовой микроскопии методом молекулярной динамики | 52 |
| А.П. Толстова, А.Д. Протопопова, И.В. Оферкин, Е.Г. Завьялова, М.Г. Годзи | |
| Изучение свойств искусственных вирусных частиц | 54 |
| Е.А. Трифонова, Н.А. Никитин, О.В. Карпова | |
| AFM investigation of mycoplasma <i>gallisepticum</i> s6 cells cultivated in different growth conditions..... | 55 |
| M.V. Trushin, V.M. Chernov, O.A. Konovalova, A.A. Mouzykantov, O.A. Chernova | |

| | |
|---|-----------|
| Комплексный анализ структуры пленок поливинилового спирта, модифицированного n-винилпирролидоном современными микроскопическими методами..... | 56 |
| Н.М. Филатова, Л.Д. Асулян, В.А. Алферов, А.А. Горячева, Г.Р. Ростовцев, К.В. Грачева | |
| Морфологическая характеристика передней большеберцовой мышцы и капилляров эндомизия по данным световой, сканирующей и трансмиссионной электронной микроскопии..... | 58 |
| Г.Н. Филимонова | |
| Исследование мембраносвязанного гемоглобина в эритроцитах с помощью спектроскопии гигантского комбинационного рассеяния с наночастицами серебра. | 60 |
| В.В. Хабатова, Н.А. Браже, А.Р. Браже, А.А. Семенова, Е.Ю. Паршина, Е.А. Гудилин, О.В. Сосновцева, Г.В. Максимов | |
| Визуализация взаимодействия патогенных бактерий с клетками эпителия человека | 62 |
| А.В. Зубрицкий, С.С. Абдураманов, А.А. Хасин, Е.Н. Ильина | |
| Сканирующая зондовая микроскопия графена | 64 |
| Е.А. Хестанова, О.В. Синицына, И.В. Яминский | |
| Визуализация молекулярной организации инулиназ методом атомно-силовой микроскопии..... | 65 |
| М.Г. Холявка, Т.А. Ковалева, В.Г. Артюхов, М.В. Гречкина | |
| Бесконтактный лазерный метод микрохирургии преимплантационных эмбрионов млекопитающих..... | 67 |
| Ю.В. Храмова, М.М. Ракитянский, С.А. Сергеев, И.В. Ильина, Д.С. Ситников, А.В. Овчинников, М.Л. Семенова, М.Б. Агранат | |
| Single particle reconstruction of n-terminus of a recombinant cap protein participating in actin cytoskeleton turnover | 68 |
| G.G. Sharov, B.L. Goode, F.A. Chaudhry, O.S. Sokolova | |
| Изучение молекулярных взаимодействий белков в живой клетке с использованием микроскопических методов..... | 70 |
| Е.В. Шеваль | |
| Использование метода лазерной интерференционной микроскопии для измерения размеров частиц древесины при ультраизмельчении | 71 |
| В.В. Шутова, А.И. Юсипович, Г.В. Максимов | |
| Поверхностно-зависимые различия в адсорбции РНКаз | 72 |
| О.А. Коновалова, М.Р. Ювакаева, Ф.В. Ширшиков, Н.В. Калачева, М.Э. Сибгатуллин | |

| | |
|--|-----------|
| Измерение характеристик нервного волокна при помощи метода лазерной интерференционной микроскопии | 73 |
| А.И. Юсипович, Н.Н. Родионова, Е.З. Бибинейшвили, В.Л. Минаев, Г.В. Максимов | |
| Визуализация тучной клетки <i>in vitro</i> в процессе дегрануляции методом лазерной интерференционной микроскопии | 75 |
| А.И. Юсипович, А.А. Байжуманов, Е.Э. Граевская, М.Я. Ахалая | |
| Конкурс изображений BioImage..... | 76 |
| Список участников конференции | 81 |

ЗАРЯДОВЫЙ БИОСЕНСОР НА ОСНОВЕ ПОДВЕШЕННОГО КРЕМНИЕВОГО НАНОПРОВОДА

В.А. Крупенин¹, Д.Е. Преснов², И.Н. Курочкин³, Е.Г. Евтушенко³,
С.В. АМИТОНОВ¹

1- Лаборатория криоэлектроники, Физический факультет МГУ имени М.В. Ломоносова

2- Научно-Исследовательский Институт Ядерной Физики МГУ имени М.В. Ломоносова

3 – Химический факультет МГУ имени М.В. Ломоносова

sam-msu@yandex.ru

Полевой транзистор на основе полупроводникового нанопровода является оригинальным устройством сверхмалых размеров, которое может быть использовано как для уникальных физических измерений, так и для построения сверхчувствительных сенсоров в биологии и медицине [1–5]. Зарядовая чувствительность такого устройства приближается к чувствительности одноэлектронных транзисторов [5], а биосенсоры на его основе способны детектировать сверхнизкие концентрации биомолекул, вплоть до регистрации единичных актов присоединения к поверхности нанопровода отдельных вирусов или молекул [2].

В качестве полупроводника для изготовления полевого транзистора на основе нанопровода был выбран кремний. Использовались пластины кремния на изоляторе (КНИ) со следующими характеристиками: верхний (рабочий) слой толщиной 50 нм – кремний *p*-типа, легированный бором, с удельным сопротивлением 8,5–11,5 Ом·см; изолирующий слой толщиной 100 нм – диэлектрик SiO₂; нижний слой – кремниевая пластина толщиной 700 мкм из кремния *p*-типа, легированного бором, с удельным сопротивлением 8,5–11,5 Ом·см. Структуры изготавливались с использованием процессов электронной литографии и реактивно-ионного травления верхнего слоя кремния через металлическую маску (рис. 1).

Для формирования контактных площадок и покрывающего их изоляционного слоя для проведения измерений в жидкости применялась как оптическая так и электронная литография. В качестве материала подводящих электродов использовался тонкий (30 нм) слой титана (рис. 1), изолированный для проведения измерений в жидкой среде слоем SiO₂ (200 нм). На заключительном этапе происходило кова-

лентное «пришивание» молекул антител к поверхности нанопровода.

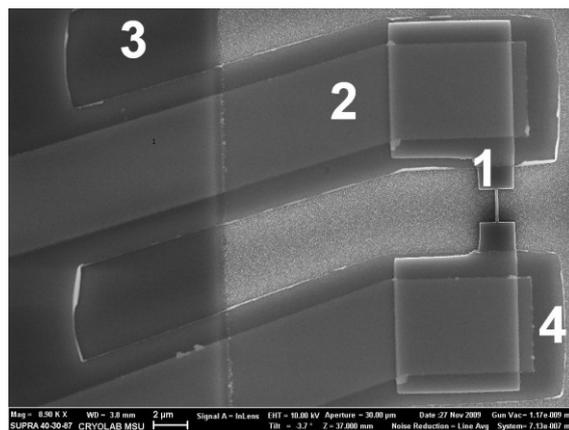


Рис. 1. Микрофотография готовой структуры. 1 – нанопровод и контактные площадки; 2 – металлические подводящие провода; 3, 4 – слои изолирующего диэлектрика для измерений в жидкости.

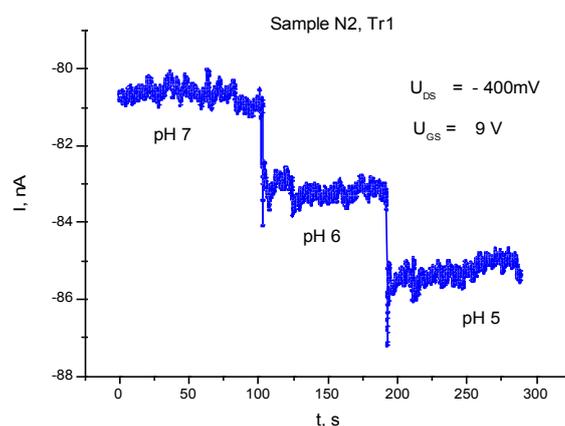


Рис. 2. Отклик транзистора на изменение величины pH раствора.

Измерения характеристик транзистора в жидкости происходили в режиме задания напряжения между стоком и истоком транзистора и измерения тока через нанопровод при различных напряжениях на подложке-затворе транзистора и электроде сравнения. Измерения продемонстри-

ровали чувствительность сенсора к изменению pH буферных растворов близкую к предельной (~ 60 мВ/pH) в диапазоне 5–8 (рис. 2).

Чувствительность изготовленного транзистора к специфичному связыванию типа «белок-антитело» позволяло регистрировать присоединение малого (~ 100 штук) количества молекул белка, которое определялось количеством молекул антител, расположенных на поверхности нанопровода (рис. 3).

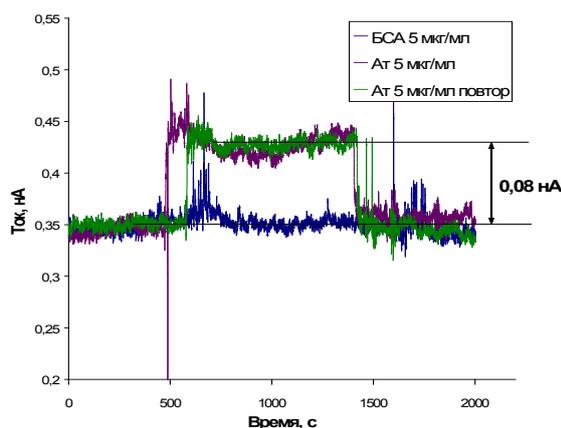


Рис. 3. Отклик от специфического (АТ) и неспецифического белка (БСА).

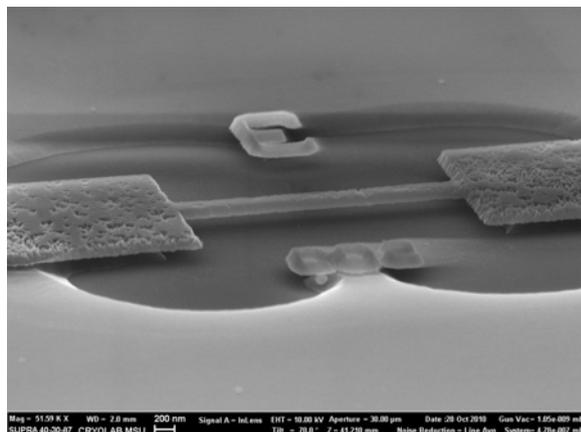


Рис. 4. Микрофотография структуры подвешенного нанопровода.

Использование подвешенных нанопроводов (рис. 4), позволяет увеличить количество антител, пришитых к поверхности на единицу длины, и, тем самым, повысить чувствительность биосенсоров. Создание подвешенного нанопровода можно осуществить путем удаления слоя SiO₂ под нанопроводом и вокруг него жидкост-

ным травлением. Прототип такого сенсора создан, а экспериментальное определение его количественных характеристик предстоит провести в дальнейшем.

Список литературы:

1. Y. Cui, O. Wei, H. Park and C. M. Lieber, *Science* 293, 1289 (2001).
2. F. Patolsky, G. Zheng, O. Hayden, M. Lakadamyali, X. Zhuang and C. M. Lieber, *PNAS* 101, 14017 (2004).
3. M. Curreli, R. Zhang, F. N. Ishikawa, H.-K. Chang, R. J. Cote, C. Zhou and M. E. Thompson, *IEEE Trans. Nanotechnol.* 7, 651 (2008).
4. E. Stern, E. R. Steenblock, M. A. Reed and T. M. Fahmy, *Nano Letters* 8, 3310 (2008).
5. Salfi, J., Savelyev, I.G., Blumin, M., Nair, S.V. & Ruda, H.E. *Nature Nanotech.* 5, 737-741 (2010).

ИЗУЧЕНИЕ МОРФОЛОГИИ ПОВЕРХНОСТИ УЛЬТРАТОНКИХ ПЛЕНОК ИЗ ПОЛИ(3-ОКСИБУТИРАТА)

Д.В. Багров¹, А.П. Бонарцев¹, И.И. Жаркова¹, Е.А. Иванов²,
А.П. Босхомджиев², Т.К. Махина², Е.В. Филатова², С.Г. Яковлев²,
В.В. Воинова¹, Г.А. Бонарцева², К.В. Шайтан¹

¹Биологический факультет МГУ имени М.В. Ломоносова, кафедра биоинженерии

²Институт биохимии имени А.Н. Баха РАН

dbagrov@gmail.com

Поли(3-оксибутират) (ПОБ) это природный биodeградируемый частично кристаллический полимер, являющийся перспективным материалом для биомедицинских применений, в частности, для изготовления имплантов и носителей лекарств. ПОБ является частично кристаллическим полимером, и способен формировать различные надмолекулярные структуры, такие как ламели и сферолиты. Для оптимизации способов обработки ПОБ и других природных полиэфигов актуально изучение особенностей их структуры, таких как форма и размеры ламелей, их взаимное расположение.

В данной работе методом атомно-силовой микроскопии (АСМ) были исследованы пленки из ПОБ, приготовленные методом спин-коатинга на слюде и на графите. Образцы готовили из раствора ПОБ в дихлорметане с концентрацией 0,03–0,5 г/л.

На слюде при увеличении частоты вращения подложки от 1000 об/мин до 3000 об/мин доминирующий тип морфологии изменялся от «пальцеобразных структур» к морфологии «двумерных сферолитов» (рис. 1). Такой переход может быть объяснен в рамках теории кристаллизации в квазидвумерной системе в диффузионно-контролируемом режиме [1]. Увеличение частоты вращения подложки ведет к увеличению скорости кристаллизации и росту пересыщения раствора, что приводит к формированию более компактных структур, таких как двумерные сферолиты. В отдельных областях между ними наблюдаются ламели, ориентированные на ребре («edge-on») – такая область выделена белым контуром на рис. 1 Б. Толщина ламелей в ультратонких пленках мала: при ориентации «edge-on» средний период, измеренный по сечениям, составляет $5,5 \pm 0,9$ нм, при ориентации «flat-on» (плоскость ламели параллельна плоскости подложки, рис. 1А) толщина составляет $3,5 \pm 0,2$ нм. Кристаллы ПОБ, в которых ламели имеют малую толщину, наблюдались ранее [2], и возможность их формирования

(4 нм соответствует 6–7 мономерным звеньям) на настоящий момент не имеет однозначного объяснения.

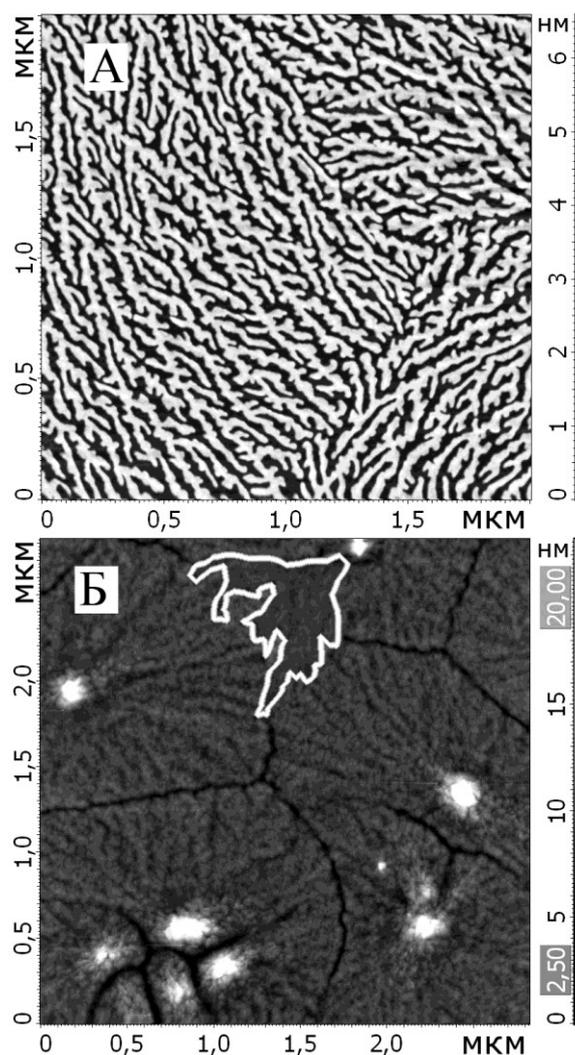


Рис. 1. Различные морфологии ПОБ на слюде. А – пальцеобразные структуры, Б – двумерные сферолиты, белой линией ограничена область, в которой ламели расположены на ребре.

Морфология пленок ПОБ на поверхности графита оказывается более сложной (рис. 2). При нанесении методом спин-коатинга большая часть поверхности образца была покрыта полимерной пленкой, в которой были различимы как отдельные ламели или ак-

сиалиты, так и крупные структуры, которые могут быть интерпретированы как «компактные дендриты» [2].

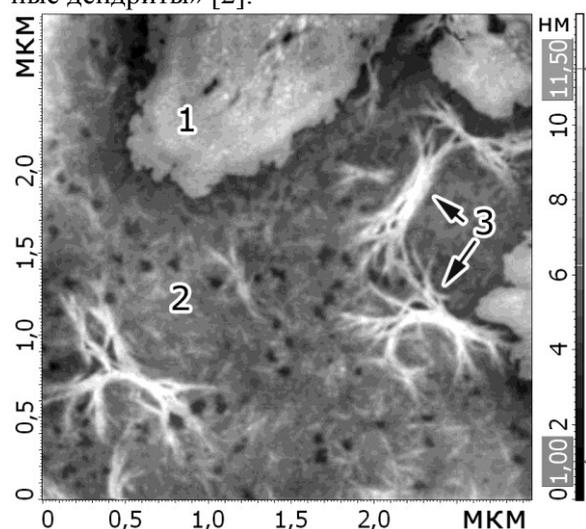


Рис. 2. Пленка ПОБ на графите, приготовленная при $\omega=1000$ об/мин. 1 – плотный кристалл типа «компактный дендрит», 2 – пленка, 3 – аксиалиты.

На поверхности пленок, приготовленных как на слюде, так и на графите, наблюдалось сосуществование ламелей, имеющих различную ориентацию относительно подложки. Это явление можно объяснять двумя способами. Во-первых, ламели имеют тенденцию к изгибу и повороту [3], которая при росте ламели приводит к изменению угла между плоскостью ламели и плоскостью подложки. Во-вторых, при кристаллизации полимера могут возникать зародыши, имеющие различную ориентацию плоскости ламели относительно подложки [4].

Для определения толщины ламелей ПОБ на графите были приготовлены пленки методом полива – капля раствора испарялась, оставляя неоднородную, но удобную для проведения измерений пленку (рис. 3). Поскольку дихлорметан является легколетучим растворителем, то кристаллизация происходила быстро, как и при нанесении на вращающуюся подложку. Приготовленная таким способом пленка состоит из островков, каждый из которых расположен на пластине толщиной $4,0 \pm 0,3$ нм – эти пластины были интерпретированы как ламели, плоскости которых ориентированы параллельно подложке, «flat-on». Толщина ламелей ПОБ на графите близка к толщине ламелей, формировавшихся на слюде (рис. 1А), то есть она слабо зависит от подложки и определяется свойствами полимера и большой скоростью кристаллизации.

Проведенные в данной работе эксперименты показывают, что ПОБ способен формировать различные частично кристаллические надмолекулярные структуры, морфология которых может быть объяснена в рамках существующих теорий кристаллизации полимеров в ультратонких пленках. Однако принципиальная возможность формирования тонких ламелей на настоящий момент остается не до конца объясненным фактом.

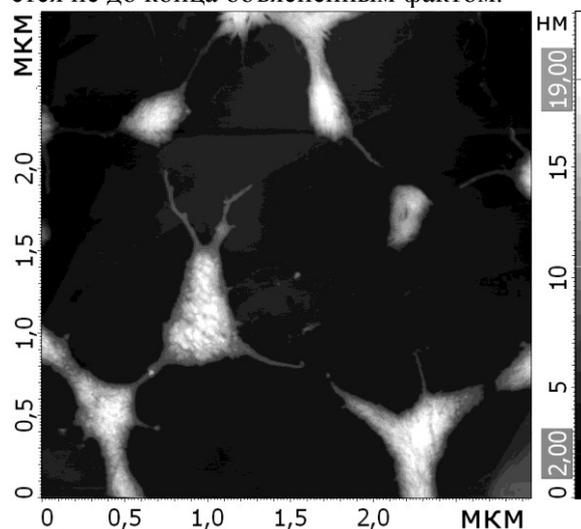


Рис. 3. Пленка ПОБ на графите, приготовленная методом полива. Образец приготовлен из раствора с концентрацией 0,03 г/л.

Работа выполнена в рамках реализации федеральных целевых программ Министерства образования и науки РФ №№ П548, П1351, 16.512.11.2019, 2011-1.2.2-207-008/115.

Список литературы:

1. Liu Y.-X., Chen E.-Q. *Polymer crystallization of ultrathin films on solid substrates* // Coordination Chemistry Reviews.– 2010.– Vol. 254.– p. 1011-1037.
2. Barham P.J., Keller A., Otun E.L., Holmes P.A. *Crystallization and morphology of a bacterial thermoplastic: poly-3-hydroxybutyrate* // Journal of materials science.– 1984.– Vol. 19.– p. 2781-2794.
3. Lotz B., Cheng S.Z.D. *A critical assessment of unbalanced surface stresses as the mechanical origin of twisting and scrolling of polymer crystals* // Polymer.–2005.– Vol.46.– 3.– p. 577-610.
4. Wang Y., Chan C.-M., Ng K.-M., Li L. *What Controls the Lamellar Orientation at the Surface of Polymer Films during Crystallization?* // Macromolecules.–2008.– Vol.41.– p. 2548-2553.

НАНОРАЗМЕРНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ ОПТИЧЕСКОЙ РАЗНОСТИ ХОДА МИЕЛИНОВОГО НЕРВА ПРИ МОДИФИКАЦИИ ЕГО БЕЛКОВОГО И ЛИПИДНОГО СОСТАВА

Н.Н. Родионова, Е.З. Бибицейшвили, А.И. Юсипович, Г.В. Максимов
Биологический факультет МГУ имени М.В. Ломоносова, кафедра биофизики
nrodionova@mail.ru, vedmezhanik@mail.ru

Миелиновое нервное волокно представляет собой длинный отросток нейрона – аксон, многократно обернутый плазматическими мембранами Шванновских клеток, формирующими миелин (рис. 1) [1]. Поддержание сложной структуры миелинового нервного волокна необходимо для выполнения нервным волокном своей основной функции – проведения возбуждения. Липиды, входящие в состав мембран нервной ткани, могут активно участвовать в таких процессах как передача гормонального сигнала, регуляция активности ряда ферментов и др. Нарушение липидного обмена в нерве может приводить к серьезным патологиям [2]. Важную роль играют мембранные белки, которые обеспечивают контакт между слоями миелина или между адаксональной мембраной Шванновской клетки и аксолеммой. Мутации генов этих белков приводят к нарушениям миелинизации и, следовательно, к неконтролируемому распространению возбуждения [3].

Целью данной работы было исследовать влияние изменения белкового и липидного состава миелина и аксолеммы нервного волокна на морфологию волокна и распределение оптической разности хода в нем.

Для достижения заданной цели исследование проводилось неинвазивным методом лазерной интерференционной микроскопии (ЛИМ). ЛИМ измеряет оптическую разность хода (ОРХ) – параметр, зависящий от геометрического размера исследуемого объекта и его показателя преломления. При исследовании нервного волокна с помощью ЛИМ нами были получены изображения распределения ОРХ в объекте (фазовые портреты) (рис. 2). Проводя скан-линию через объект на его фазовом портрете, мы анализировали распределение величины ОРХ вдоль этой скан-линии (рис. 2 в, г, д). По распределению ОРХ вдоль скан-линий, проводимых в различных участках нервного волокна (перехват Ранвье и интернодаля (межперехватный сегмент)) оценивали следующие параметры в различных областях нервного волокна: диаметр нервного волокна и диаметр аксона в перехвате Ранвье и интернодаля, длина пере-

хвата Ранвье (рис. 1), ОРХ в аксоне перехвата Ранвье и интернодаля, ОРХ в миелине интернодаля.

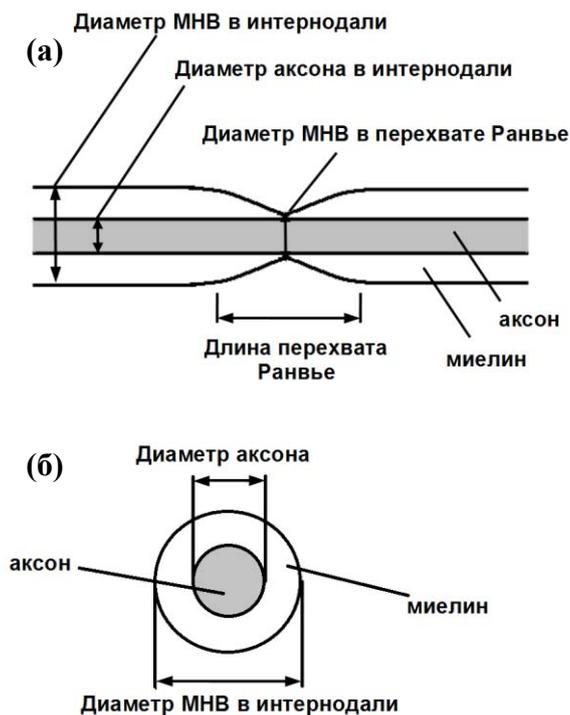


Рис. 1. Схематическое изображение продольного (а) и поперечного (б) сечений миелинового нервного волокна (МНВ) и морфологические параметры, измеряемые в настоящей работе.

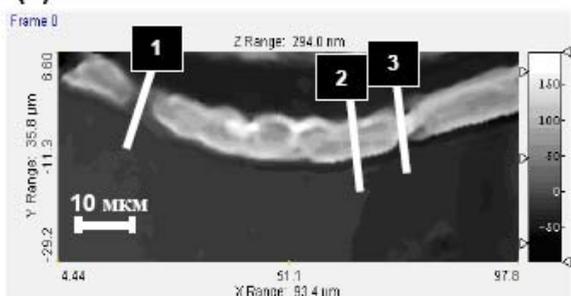
В работе было изучено воздействие реагентов, изменяющих белковый и липидный состав миелина и аксолеммы, на морфологию и распределение ОРХ в нервном волокне.

Для того, чтобы исследовать роль мембранных структурных белков миелинового нерва в формировании морфологии и распределения ОРХ, их экстраклеточные участки подвергались гидролизу при инкубации нерва в среде с протеазой проназа Е (Sigma) или действию блокатора SH-групп параклормеркурибензоата (Sigma). При действии блокатора SH-групп изменялась конформация белков, и, вероятно, нарушались взаимодействия между субъединицами белков и/или межбелковые взаимодействия. Для исследования роли липидного состава мембран мие-

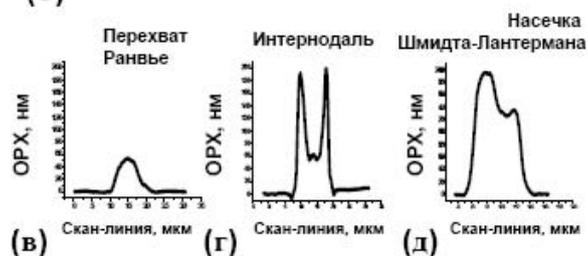
лина и аксолеммы в формировании морфологии и распределения ОРХ, использовали лизолецитин (Sigma) – лизофосфолипид, который встраивается в плазматические мембраны, и, обладая высокой биологической активностью, в больших концентрациях может действовать как детергент, вызывая солюбилизацию мембранных белков и липидов, а в небольших (сублитических) концентрациях индуцировать слияние мембран и ингибировать активность некоторых мембранных ферментов.



(а)



(б)



(в)

(г)

(д)

Рис. 2. (а) Нервное волокно, световая микроскопия в отраженном свете. (б) Распределение ОРХ в нервном волокне (фазовый портрет), ЛИМ. (в), (г), (д) – распределение ОРХ вдоль скан-линий 1, 2, 3, соответствуют перехвату Ранвье, интернодали и насечке Шмидта-Лангермана.

Нами было обнаружено, что гидролиз экстраклеточных участков мембранных белков приводит к снижению ОРХ в аксоне и микровилли в области перехвата Ранвье и увеличению ОРХ в аксоне интернодали. При этом ОРХ в миелине не изменяется, а из изменений морфологии нервного волокна наблюдается только увеличение длины перехвата

Ранвье. Диаметр нервного волокна как в перехвате Ранвье, так и в интернодали не изменился.

Блокирование белковых SH-групп вызывает тенденцию к снижению уровня ОРХ в аксоне интернодали и тенденцию к уменьшению диаметра аксона. Изменения ОРХ в миелине интернодали или перехвате Ранвье (в аксоне или микровилли), а также изменения диаметра нервного волокна и длина перехвата Ранвье выявлены не были.

Встраивание в миелин и аксолемму лизолецитина приводит к уменьшению ОРХ в аксоне перехвата Ранвье, а также в аксоне и миелине интернодали, диаметр нервного волокна в интернодали при этом не изменяется, а длина перехвата Ранвье уменьшается.

Отметим, что все зафиксированные изменения ОРХ были порядка нескольких десятков нанометров (в зависимости от изначального диаметра исследуемого нервного волокна).

Помимо этого, нами показано, что наблюдаемые изменения морфологии и распределения ОРХ при модификации белкового и липидного состава нервного волокна коррелируют с изменением проведения возбуждения нервным волокном.

Таким образом, в настоящем исследовании показано, что модификация белкового и липидного состава миелина и аксолеммы нервного волокна приводит к изменению проведения возбуждения. При этом изменения морфологии нервного волокна могут быть выявлены (в случае действия проназы E или лизолецитина) или не выявлены (в случае действия пара-хлормеркурибензоата), что свидетельствует об изменении протекания внутриклеточных процессов. Изменение внутриклеточных процессов (например, изменение структуры цитоплазмы или распределения органелл) может быть определено по изменению ОРХ в нервном волокне.

Список литературы:

1. Сотников О.С., Функциональная морфология живого мякотного нервного волокна М.: Наука, 1976.
2. Болдырев А.А., Ещенко Н.Д., Нейрохимия, М.: Дрофа, 2010: 39-41.
3. Scherer S.S., Arroyo E.J., Recent progress on the molecular organization of myelinated axons, J Peripher Nerv Syst.; 7(1): 1-12 (2002).

СВОЙСТВА ИОННО-ИМПЛАНТИРОВАННЫХ КАНАЛОВ В АЛМАЗЕ, СУЩЕСТВЕННЫЕ ДЛЯ ЕГО БИОСЕНСОРНЫХ ПРИМЕНЕНИЙ

О.П. Будник¹, П.И. Будник²

¹Институт прикладной оптики НАН Украины, ²Институт физики НАН Украины
oksanalight@gmail.com

Алмаз считается оптимальным материалом для бионаносенсорики. Метод ионной имплантации позволяет контролируемо модифицировать электрические, структурные и оптические свойства алмаза, открывая путь к созданию интегрированных биосенсоров [1] на его основе. В частности, облучение потоком ионов ~ 1 МэВ позволяет создать в приповерхностном объеме материала проводящие каналы для передачи электрических сигналов. Вследствии аморфизации при прохождении потока ионов, каналы характеризуются особым распределением проводимости в объеме и рельефом поверхности над ними. Как было показано в предыдущем докладе [2], введенные каналы могут быть удалены путем отжига.

В предлагаемом докладе представлены экспериментальные данные (топографические карты и профили проводимости), полученные методами атомно-силовой микроскопии. Для примера, на рис.1 представлены топографическая и токовая карты для одного участка Не-имплантированного на глубину 3 мкм канала, записанные при приложенном смещении +10 В. В докладе также будет рассмотрена методика имплантации каналов, даны электрические и морфологические характеристики последних.

Для описания механизма возникновения проводимости алмаза вследствие превышения критического уровня повреждения облучением использована модель Баскина [4]. В рамках этой модели представляется, что электрическая проводимость возникающей вследствие введения дефектов в структуру материала и появления на энергетической диаграмме алмаза уровней позитивно заряженных вакансий V^+ . Дополнительно мы учитываем роль области пространственного заряда материала, выявленную при анализе вольт-амперных характеристик.

В целом полученные результаты позволили комплексно охарактеризовать ионно-имплантированные каналы в алмазе, проанализировать причины возникновения проводимости, а также пояснить особенности наблюдаемых электрических характеристик в рамках адаптированной модели.

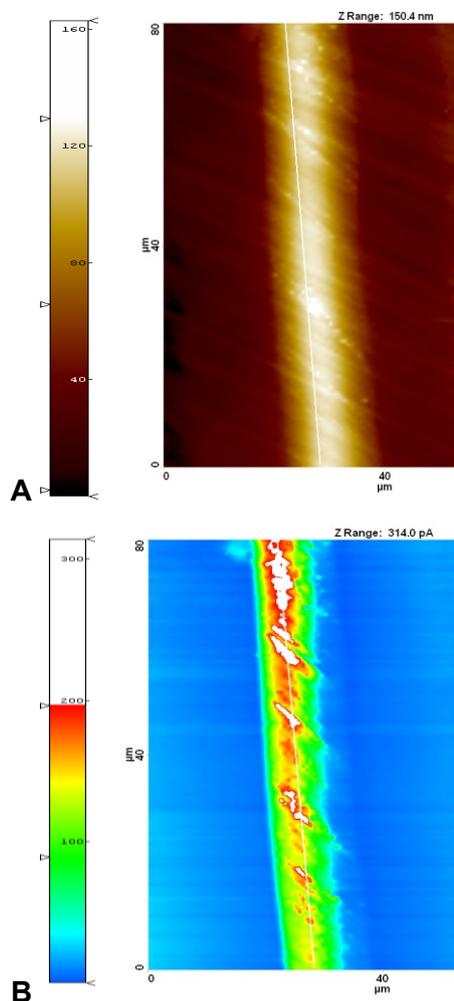


Рис. 1. Топографическая (а) и токовая (б) карты для части имплантированного канала.

Список литературы:

1. P. Olivero, G. Amato, F. Bellotti, O. Budnyk, E. Colombo, M. Jaksic, C. Manfredotti, Z. Pastuovic, F. Piccolo, N. Skukan, M. Vannoni, E. Vittone, *Diamond Relat. Mater.* 18 (2009) 870.
2. Будник О. «АСМ-исследование ионно-имплантированных каналов в биосенсоре на основе алмаза», *Материалы Бионаноскопия-2010*.
3. H. Wang, M. Bruna, P. Oliviero, S. Borini, F. Piccolo, O. Budnyk, F. Bosia, Z. Pastuovic, N. Skukan, M. Jaksic, E. Vittone, *IOP Conf. Series: Materials Science and Engineering* 16 (2010) 012004.
4. E. Baskin, A. Reznik, D. Saada, Joan Adler, R. Kalish, *Phys. Rev.*, B 64 (2001) 224110.

АТОМНО-СИЛОВАЯ МИКРОСКОПИЯ НАНОЧАСТИЦ ГЕКСАЦИАНОФЕРРАТА ЖЕЛЕЗА – НОВОЙ ДИСКРЕТНОЙ ФАЗЫ В ИММУНОХРОМАТОГРАФИИ

С.Н. Скопинская¹, С.П. Ярков¹, В.Н. Злобин¹, Х.Х. Валиев², Ю.Н. Карнет²,
Г.Н. Ковалев², Н.С. Снегирева², Ю.Г. Яновский²

¹ ФГУП «ГосНИИ биологического приборостроения»,

² Институт прикладной механики РАН

hhvly@mail.ru

В настоящее время анализ на основе иммунохроматографии (ИХА) на нитроцеллюлозных мембранах является признанным аналитическим инструментом, применяемым в медицинской диагностике, санитарии, ветеринарии, охране окружающей среды, контроле качества пищевых продуктов. В основе метода лежит перемещение реагентов за счет действия капиллярных сил вдоль узкой прямоугольной мембранной тест-полоски. Жидкая проба наносится на подложку для впитывания образца, соединенную с подложкой для конъюгата. Конъюгат представляет собой частицы дискретной фазы, соединенные с иммунными компонентами – антителами (АТ) (или антигенами – АГ). Проба переходит на подложку с конъюгатом и растворяет его. При наличии в образце искомого аналита – АГ (или АТ) происходит формирование иммунного комплекса АГ-АТ с конъюгатом. Комплекс переходит на мембрану и перемещается по ней, достигая аналитической зоны с фиксированными АТ или АГ к исследуемому аналиту, что приводит к захвату комплекса и формированию окрашенной полосы. Интенсивность окраски в аналитической зоне пропорциональна количеству аналита в образце и может быть выявлена визуально или с применением специальных оптических приборов.

В качестве дискретной фазы в ИХА применяют частицы коллоидного металла (золота, селена и др.), полимерные латексные частицы (окрашенные или люминесцентные), коллоидный углерод, ионы висмута, квантовые метки, липосомы и т. д. [1].

Актуальным является поиск новых носителей для проведения ИХА, что позволит создать тест-системы с улучшенными аналитическими характеристиками, в частности снизить время анализа. Гидрозоли гексацианоферрата (II) железа (III) (ГЦФЖ) обладают разветвленной поверхностью, способны к адсорбции, при определенных условиях, иммунных компонентов (АТ и АГ различной химической природы), имеют хорошую со-

храняемость во времени, а также обладают яркой окраской, что важно для применения частиц гидрозоля в ИХ-тестах.

В данной работе получены устойчивые гидрозоли ГЦФЖ, сенсibilизированных АГ различной природы или АТ к ним, и показана возможность их использования в иммунохроматографическом анализе для обнаружения АГ и токсинов, а также специфических АТ.

Гидрозольные препараты ГЦФЖ получали при смешивании растворов хлорного железа и железистосинеродистого калия. Наиболее устойчивыми оказались гидрозоли ГЦФЖ, полученные при смешивании эквимольных (0,005 N) концентраций железистосинеродистого калия и хлорного железа, поверхность которых была заряжена отрицательно. Эти гидрозоли сохраняли свою агрегативную устойчивость в течение всего срока наблюдения – 8–12 месяцев хранения в темноте при комнатной температуре или в холодильнике при температуре 4–8° С.

Для определения размеров частиц ГЦФЖ применяли метод атомно-силовой микроскопии (АСМ). Сканирование проводили на микроскопе easyScan (Nanosurf, Швейцария) в контактном режиме на воздухе при комнатной температуре [2].

В качестве подложки для нанесения ГЦФЖ использовался высоко ориентированный пиролитический графит ВОПГ (NT-MDT, Россия). Отобранная пипеткой капля гидрозоля ГЦФЖ наносилась на подготовленную поверхность ВОПГ, высушивалась на воздухе до полного удаления растворителя.

Изображения частиц ГЦФЖ, полученные с помощью АСМ, приведены на рис. 1А и 1Б. Площади сканирования составляют 54,1 x 54,1 мкм² и 4,08 x 4,08 мкм² соответственно. На изображениях наблюдали как отдельные частицы ГЦФЖ, так и их агрегаты. Анализ изображений, полученных при медленном высушивании образца при комнатной температуре, позволил выявить отдельные

наночастицы ГЦФЖ округлой формы с диаметром порядка 20 нм.

Частицы гидрозоля ГЦФЖ, а также их конъюгаты с антителами проходили через нитроцеллюлозную мембрану ровным фронтом сине-голубого цвета, практически не создавая «подтеков» и «наплывов».

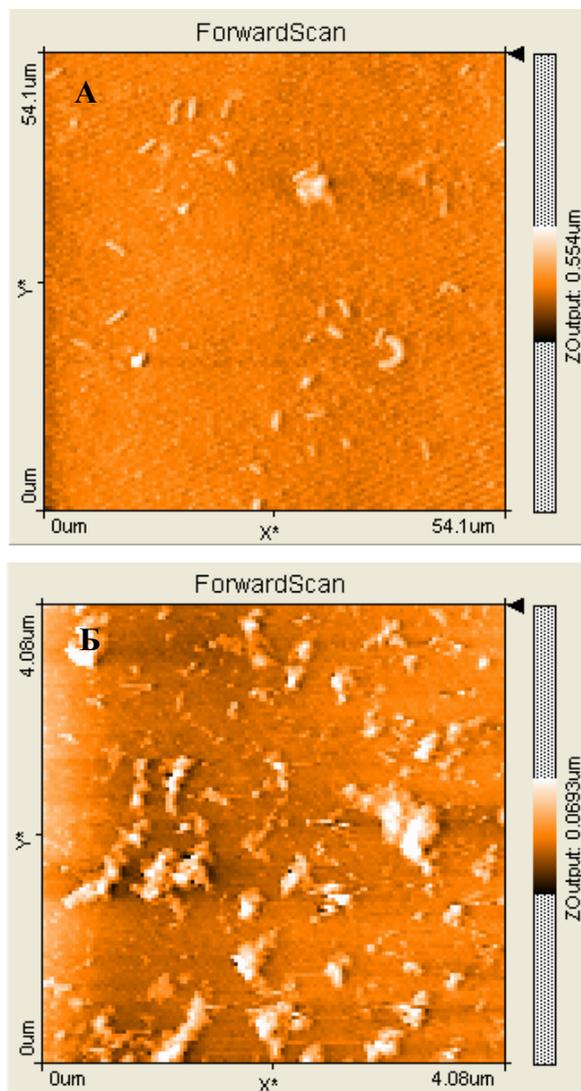


Рис. 1. АСМ изображения наночастиц и агрегатов наночастиц гидрозоля ГЦФЖ на поверхности ВОПГ.

Нужно отметить быстроту перемещения частиц гидрозоля ГЦФЖ по нитроцеллюлозной мембране и появления окрашенных полос в аналитической и контрольной зонах, что отличает ИХА с использованием гидрозолевых препаратов ГЦФЖ от ИХА на основе золотых зольей. При высоких концентрациях аналита, видимый глазом сигнал появлялся через 1–2 мин после введения аналита и прохождения фронта суспензии конъюгата через аналитическую зону теста.

Полученные данные показали возможность использования наноразмерных гидрозолевых препаратов ГЦФЖ для создания на их основе конъюгатов для последующего чувствительного и специфичного ИХА. Результаты могут быть зарегистрированы как визуально, по появлению четко видимых на фоне белых нитроцеллюлозных мембран полос сине-голубого цвета, так и с помощью специализированных рефлектометров, что позволяет повысить чувствительность и объективность анализа. Процедура ИХА не требует сложных манипуляций и пригодна для лабораторий различного уровня оснащённости, а также для проведения анализа во вне-лабораторных условиях.

Список литературы:

1. Ярков С.П., Шиленко И.В. В кн: «Современные методы индикации патогенов и токсинов в объектах окружающей среды и диагностики социально-значимых инфекционных заболеваний для обеспечения химической и биологической безопасности», под. ред. Злобина В.Н., М., 2010.-стр. 57-118.
2. Yarkov S. P., Shilenko I. V., Valiev H. H., Karnet Yu. N., Kovalev G. N., Snegireva N. S., Yanovsky Yu. G., and Bogdanov E. V., J. Vac. Sci. Technol. B 27, 839 – 842, (2009).

ЛАЗЕРНАЯ ОБРАБОТКА МЕТАЛЛОВ ДЛЯ СОЗДАНИЯ ГИДРОФОБНЫХ И АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫХ ПОВЕРХНОСТЕЙ

В.Я. Шур, Е.В. Шишкина, С.Г. Васильев, Д.С. Петухова, А.Е. Тюрнина
УЦКП «Современные нанотехнологии», Уральский государственный университет им.
А.М. Горького, Екатеринбург, Россия
vasilev@labfer.usu.ru

Современные разработки гидрофобных поверхностей ориентируются на использование полимерных покрытий и покрытий на основе жиров и восков, которые не выдерживают механического и теплового воздействия. Полимерные покрытия (например, тефлон) потенциально опасны для здоровья человека и окружающей среды, а покрытия на основе жиров и восков являются источником питания для бактерий и микроорганизмов. При создании антибактериальных покрытий широко используются ионы серебра, однако, такие поверхности не обладают гидрофобными свойствами и свойством «самоочистения».

Основной идеей работы является разработка способа создания поверхностей, обладающих гидрофобными и антибактериальными свойствами. Методом прецизионной лазерной обработки поверхности металлов и последующей лазерной абляции в жидкости создаются структуры, подобные хорошо известной структуре поверхности листа лотоса, который обладает крайне низкой смачиваемостью [1].

Низкую смачиваемость листа лотоса (эффект лотоса) обеспечивает особенная морфология его поверхности. Установлено, что поверхность листа покрыта микроскопическими бугорками размерами около 10 мкм, которые в свою очередь покрыты нановорсинками длиной около 10 нм.

| Образец | Угол смачивания |
|-----------------------------|-----------------|
| Полированная сталь | 72 |
| 2 Вт на полированной стали | 85 |
| 10 Вт на полированной стали | 102 |
| 20 Вт на полированной стали | 84 |
| Лист лотоса | >160 |

Табл. 1. Измеренные углы смачивания на исследуемых образцах.

Создание структуры на поверхности металла производилось методом лазерной абляции в воде при различных мощностях лазера. Как

видно из табл. 1, изменение структуры поверхности приводит к изменению краевого угла смачивания.

Полученная структура обеспечивает гидрофобные свойства поверхности металла, так как капля воды, попадающая на поверхность, имеет малую контактную поверхность с металлом и не проникает между микробугорками, благодаря высокому поверхностному натяжению жидкости. Наноразмерная структура дополнительно повышает гидрофобность за счет уменьшения площади контактной поверхности.

Кроме того, полученная структура придает поверхности антибактериальные свойства. Адгезия бактерий и микроорганизмов (количество микроорганизмов, осевших на поверхность) уменьшается с ростом степени гидрофобности поверхности [2, 3].

Также благодаря своей высокой гидрофобности поверхность обладает свойством «самоочистения». Капли воды, скатываясь по поверхности, смывают пылевые частицы, споры грибов, бактерии и микроорганизмы.

Для измерения рельефа поверхности с высоким пространственным разрешением используются методы сканирующей зондовой и оптической микроскопии.

Установлено, что угол смачивания слабо зависит от шероховатости и перепада высот структуры. Исследована зависимость краевого угла смачивания от фрактальной размерности структуры. Также проанализированы зависимости параметров формирующейся структуры от характеристик лазерного излучения: мощности, времени излучения и количества проходов.

Литература:

1. Е. В. Бармина, Э. Стратакис, Квантовая электроника, 40, 11, 1012–1020 (2010).
2. R. Oliveira, J. Azeredo, Biofilm community interactions: chance or necessity?, Cardiff : BioLine, 11–22 (2001).
3. Haiying Tang, Xuemei Liang, Journal of Biomedical Materials Research Part A, 88A, 2, 454–463 (2009).

ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ МИКРОБНОЙ РНКазы НА ЛИПИДНЫЕ БИСЛОИ МЕТОДАМИ АТОМНО-СИЛОВОЙ МИКРОСКОПИИ И ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНОЙ СКАНИРУЮЩЕЙ КАЛОРИМЕТРИИ

И.А. Гоенко, О.А. Коновалова, Н.В. Калачева, А.В. Филиппов
Казанский (Приволжский) Федеральный университет
olga.konvalova@bk.ru

Большинство процессов в организме человека происходят на различных поверхностях, в том числе, на клеточных мембранах. Первичным актом проявления биологического эффекта экзогенных белков также является взаимодействие с поверхностью клетки. Поэтому важно знать, как меняются свойства мембран при физической адсорбции белков на их поверхность.

Объектом исследования в настоящей работе является РНКаза *Bacillus intermedius* (РНКаза Vi), в проявлении многих биологических эффектов которой важную роль играет цитоплазматическая мембрана.

Цель работы заключалась в исследовании взаимодействия модельных бислоевых липидных мембран из дипальмитоилфосфатидилхолина (DPPC) с РНКазой Vi методом атомно-силовой микроскопии (АСМ) и дифференциальной сканирующей калориметрии (ДСК).

Визуализацию выполняли на атомно-силовом микроскопе Solver P47H, сканер 50×50 мкм (НТ-МДТ, Россия). Сканирование осуществляли на воздухе при комнатной температуре в полуконтактном режиме кремниевыми кантилеверами NSG11 (НТ-МДТ, Россия) и в контактном режиме кремниевыми кантилеверами CSG11 (НТ-МДТ, Россия) с радиусом закругления острия 10 нм. Сканирование проводилось с разрешением 512×512 точек.

Для приготовления образцов водный раствор липида с концентрацией 0,1 мМ наносили на поверхность свежесколотой слюды и инкубировали на термостойке 30 мин при температуре около 50°C. Затем тщательно промывали слюду дистиллированной водой и высушивали на воздухе при комнатной температуре. Для анализа влияния РНКазы на полученные липидные слои, на готовый высушенный образец дополнительно наносили раствор РНКазы концентрацией 50 мкг/мл и инкубировали 10 мин. Затем промывали и сушили на воздухе при комнатной температуре.

Методом АСМ установлены различия в структуре липидных слоев после взаимодействия их с РНКазой Vi (рис. 1 и 2). На поверхности бислоев наблюдали дополнительные нитеподобные структуры высотой 1–3 нм.

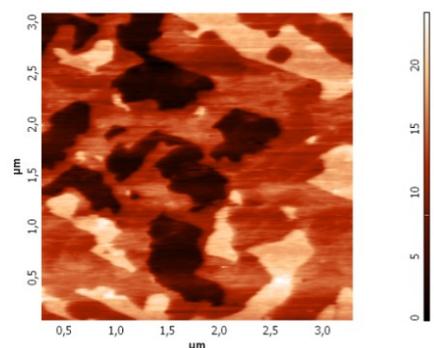


Рис. 1 Изображения множества бислоев DPPC на воздухе.

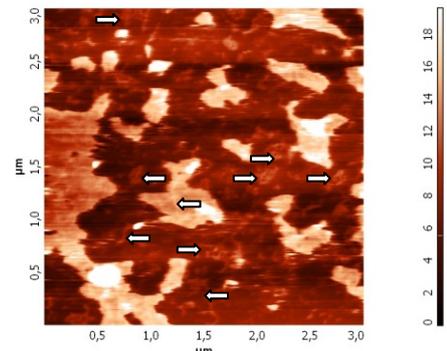


Рис. 2 Изображения бислоев DPPC после инкубации с микробной РНКазой на воздухе.

Наряду с методом АСМ влияние РНКазы Vi на липидные бислои было изучено с помощью метода ДСК.

Было показано, что присутствие РНКазы Vi приводит к увеличению температуры и энтальпии фазового перехода липида. Также наблюдается слабая тенденция к увеличению температурного интервала фазового перехода, который является характеристикой обратной кооперативности фазового перехода липида.

ИССЛЕДОВАНИЕ АСТРОЦИТОВ В СРЕДЕ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ МЕТОДОМ АТОМНО-СИЛОВОЙ МИКРОСКОПИИ

Е.В. Дзюбенко^{1,3}, Ю.М. Ефремов¹, Д.В. Багров^{1,2}, Г.В. Максимов¹,
С.И. Шрам³, К.В. Шайтан¹

¹Биологический факультет МГУ имени М.В. Ломоносова, ²Физический факультет МГУ имени М.В. Ломоносова, ³Лаборатория нейрофармакологии, Институт Молекулярной Генетики РАН
ejeek@yandex.ru

Исследование морфологии астроцитов представляет огромный интерес в связи с их участием в развитии нейродегенеративных заболеваний различной природы. Изменение структуры цитоскелета играет при этом весьма важную роль. В данной работе был отработан прямой метод анализа морфологии астроцитов с помощью атомно-силовой микроскопии (АСМ) на наиболее близкой к условиям организма системе – органотипичной культуре спинномозговых ганглиев (СМГ) эмбрионов курицы.

На полученных изображениях живых астроцитов можно видеть, что поверхность клетки имеет шероховатую структуру, обусловленную цитоскелетом под ней. Наиболее выраженными и жесткими структурами внутри клетки являются сети актиновых филаментов и микротрубочек [1]. Мы предполагаем, что, при сканировании в контактном режиме живых астроцитов в жидкости, удастся визуализировать структуру одной или обеих из этих сетей.

Для подтверждения этого предположения сравнили результаты, полученные методами АСМ и лазерной сканирующей конфокальной микроскопии при иммунофлуоресцентном окрашивании на α -тубулин и F-актин аналогичного астроцита (рис. 1В и 1С).

Были измерены профили высоты и интенсивности флуоресценции вдоль линий, обозначенных на рис. 1, отражающие наличие фибриллярных структур цитоскелета. Поскольку фибриллярные структуры присутствуют во всех трех случаях, нельзя сказать, что при сканировании в контактном режиме АСМ филаменты наверняка представляют собой микротрубочки или актиновые филаменты астроцита. Возможно, обе системы вносят вклад в формирование микрорельефа, подобного представленному на рис. 1А, однако некоторые исследователи считают определяющей роль именно актинового цитоскелета [21].

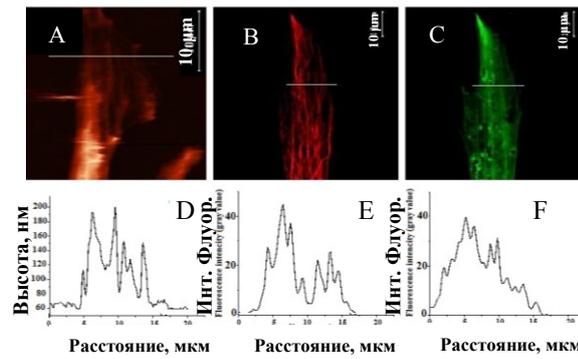


Рис. 1. Визуализация цитоскелета астроцита с помощью АСМ и конфокальной микроскопии. Представлены типичные изображения. Верху: А – топографическое изображение живого астроцита в жидкости; В – иммуноцитохимическое окрашивание на α -тубулин микротрубочек (DM1A+ Alexa594); С – окрашивание актиновых филаментов флуоресцентным фаллоидином. Внизу: D – профиль высоты астроцита, измеренный с помощью АСМ; E, F – профили интенсивности флуоресценции, измеренные на соответствующих флуоресцентных изображениях из верхнего ряда. Места измерения профилей обозначены белыми полосками.

Для получения более полной информации о цитоскелете была проведена силовая спектроскопия и измерены локальные значения модулей Юнга живых астроцитов. По сравнению с работой [3], где измерялся модуль упругости для нейронов диссоциированной культуры DRG адгезированной на полиорнитине – ламинине, получено намного меньшее среднее значение модуля Юнга: 2,2 кПа против 60 кПа. Это соответствует имеющимся в литературе данным [4, 5], согласно которым астроциты менее жесткие, чем нейроны.

Было проведено картирование модуля Юнга, для чего силовые кривые снимались в точках, расположенных в узлах сетки (рис. 2А) и вдоль линии (рис. 3В). В разных точках силовые кривые имеют разный вид (рис. 2В–2D). Кривые, снятые над подложкой, имеют резкий наклон, над краем клетки

– плавный изгиб, пока кантилевер не упирается в подложку, над ядром – просто плавный изгиб, и над фибриллами цитоскелета – более резкий изгиб.

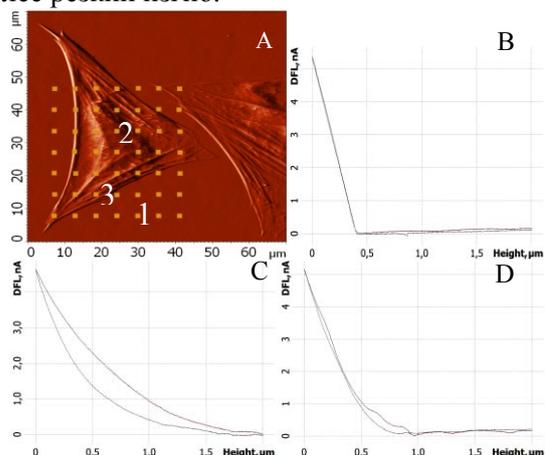


Рис. 2. Картирование модуля Юнга астроцита. А – изображение живого астроцита (сигнал ошибки обратной связи) и сетка, в точках которой снимались силовые кривые. В – силовая кривая, снятая в точке над подложкой (1 на рисунке А). С – силовая кривая, снятая в точке над ядром клетки (2). D – силовая кривая, снятая в точке над фибриллой цитоскелета (3).

При снятии силовых кривых вдоль линии было отмечено, что вид силовых кривых и значения получаемого модуля Юнга зависят от наличия или отсутствия цитоскелета под мембраной в каждой точке. При наличии элементов цитоскелета, которые видны на топографических изображениях, рассчитанные значения модуля Юнга больше (рис. 3С), что подтверждает данные статьи [2].

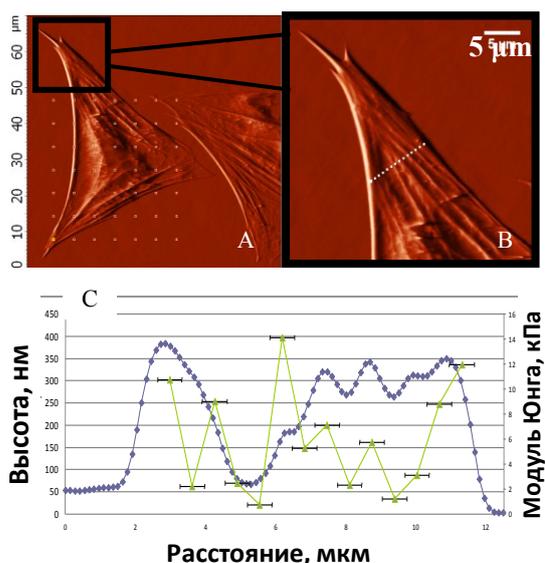


Рис. 3. Картирование модуля Юнга астроцита. А – изображение живого астроцита (сигнал ошибки обратной связи) и сетка, в

точках которой снимались силовые кривые; В – изображение участка астроцита и линия, вдоль которой снимались силовые кривые (14 точек) и был измерен профиль высоты; С – профиль сечения вдоль данной линии (синяя кривая) и значения модуля Юнга (зеленые точки) в соответствующих точках. Горизонтальные планки погрешностей отражают размер контактной площадки. Можно видеть, что в точках, попадающих на фибриллы цитоскелета ("пики" на синей кривой) модуль Юнга имеет более высокие значения.

Необходимо отметить, что при снятии силовых кривых получается усредненное значение модуля Юнга по контактной площадке между иглой кантилевера и поверхностью клетки. Площадь этой контактной площадки зависит от геометрии зонда и глубины продавливания, в данном эксперименте она составляет примерно 490 000 нм². Этим может объясняться разброс в значениях модуля упругости, получаемых на элементах цитоскелета. Кроме того, сами фибриллы цитоскелета могут представлять собой агрегаты различной плотности, что также будет влиять на локальную жесткость.

Проведенные эксперименты показывают, что морфология астроцитов органотипичной культуры СМГ эмбрионов курицы, культивируемых на желатиновой подложке, может быть эффективно исследована методом АСМ. Высокое разрешение данного метода позволяет наблюдать организацию цитоскелетных структур живой клетки в среде культивирования.

Список литературы:

1. Yamada K.M., Spooner B.S. and Wessells N.K. // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 1970 V. 66. P. 1206.
2. Yamane Y., Shiga H., Haga H., et al. // Journal of electron microscopy 2000 V. 49. P. 463.
3. Mustata M., Ritchie K. and McNally H.A. // Journal of neuroscience methods 2010 V. 186. P. 35–41.
4. Franze K., Reichenbach A. and K s J. // Mechanosensitivity of the Nervous System 2009 V. P. 173–213.
5. Lu Y.B., Franze K., Seifert G., et al. // Proceedings of the National Academy of Sciences 2006 V. 103. P. 17759.

ОЦЕНКА МОРФО-ФУНКЦИОНАЛЬНОГО СОСТОЯНИЯ ТРОМБОЦИТОВ МЕТОДОМ АСМ

Е.С. Дрозд¹, Л.В. Кухаренко², С.В. Сыроежкин¹, Л.Г. Гелис³,
Е.А. Медведева³, И.В. Лазарева³

Институт тепло- и массообмена им. А.В. Лыкова НАН Беларуси,

²Белорусский государственный медицинский университет,

³Республиканский научно-практический центр «Кардиология»

lizadr@tut.by

Цель данной работы состояла в выявлении ранних признаков повышения гемостатического потенциала крови с помощью АСМ. Для оценки внутрисосудистой активации тромбоцитов исследовали изменения их формы и размеров, а так же количество и размеры тромбоцитарных агрегатов. Для этого были разработаны алгоритмы для определения общего количества клеток на АСМ-изображении, количества агрегатов, количество клеток в каждом из агрегатов и количество отдельно расположенных клеток. Алгоритмы были реализованы в виде компьютерной модели в пакете MatLab.

На рис. 1 показан графический интерфейс пользователя программы по обработке АСМ-изображения тромбоцитов.

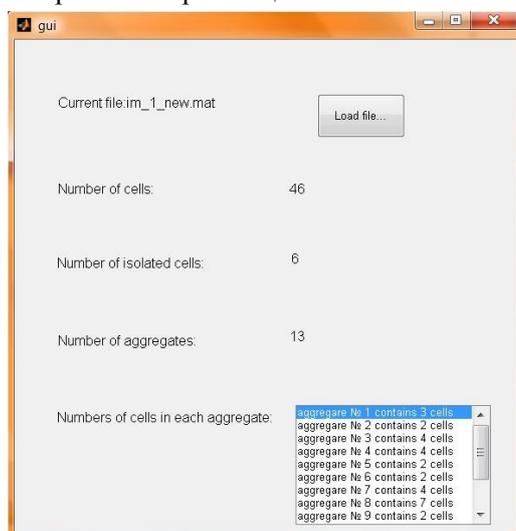


Рис. 1. Графический интерфейс пользователя программы по обработке АСМ-изображения тромбоцитов.

Забор крови из локтевой вены проводился максимально быстро, благодаря чему исследуемые морфологические признаки тромбоцитов соответствовали их функциональному состоянию в кровотоке. Кровь фиксировали в 0,125% глутарового альдегида. Фиксированную кровь сразу же центрифугировали 10 мин при 1000 об/мин для получения обога-

щенной тромбоцитами плазмы. Свежесколотая слюда использовалась в качестве подложки для исследуемых кровяных пластинок.

Оценка внутрисосудистой активации тромбоцитов осуществлялась с помощью атомно-силового микроскопа NT-206 (Микротестмашины, Беларусь), совмещающего функции сканирующей зондовой и оптической микроскопии, в режиме прерывистого контакта на воздухе с использованием стандартных кремниевых кантилеверов NSC11 (MikroMasch, Россия).

На рис. 2 представлено АСМ-изображение тромбоцитов пациента с ИБС. Видно, что тромбоциты имеют сферическую форму и их диаметр составляет 2,5–3 мкм, они окружены короткими филоподиями. Наблюдаются также небольшие тромбоцитарные агрегаты.

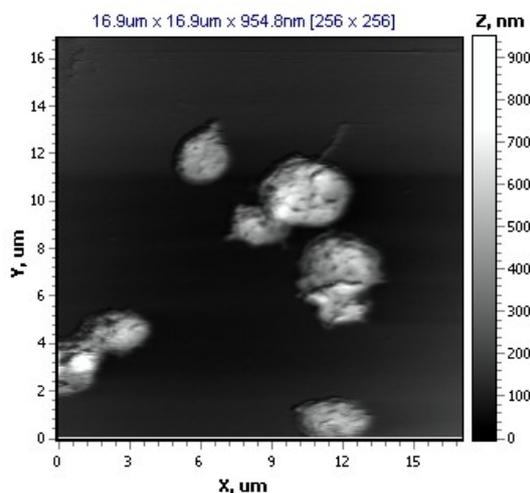


Рис. 2. АСМ изображение тромбоцитов пациента с ИБС.

Использование АСМ и программы по обработке АСМ-изображений тромбоцитов позволяет выявить ранние этапы их внутрисосудистой активации и контролировать применение фармакологических средств, влияющих на функции кровяных пластинок пациентов.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ АТОМНО-СИЛОВОЙ МИКРОСКОПИИ ДЛЯ ИДЕНТИФИКАЦИИ ЦЕНТРОХЕЛИДНЫХ СОЛНЕЧНИКОВ (CENTROHELIDA, PROTISTA)

Е.А. Ермоленко¹, А.С. Васильченко¹, А.О. Плотников²

¹Оренбургский государственный университет

²Институт клеточного и внутриклеточного симбиоза УрО РАН, Оренбург
ea-ermolenko@yandex.ru

Современные достижения в области таксономии требуют использования широкого круга методов, включая разные виды микроскопии. Атомно-силовая микроскопия (АСМ) занимает особое положение, благодаря возможности проведения исследований на ультраструктурном уровне и простоте подготовки препаратов, сохраняющей естественные свойства исследуемых объектов. Методы исследования клеточной поверхности с применением АСМ позволяют получать информативные изображения, анализ которых дает возможность изучения морфологии клеток.

Центрохелидные солнечники (*Centrohelida*) – обширная группа одноклеточных амебоидных простейших микроорганизмов, объединенных наличием мощной радиальной системы расходящихся лучей – аксоподий. Центрохелиды характеризуются консерватизмом внутренней организации и высокой вариабельностью структуры кремниевых элементов перипласта (наружной оболочки) – чешук и спикул, что определяет морфологическое и таксономическое разнообразие представителей данной группы. Низкая разрешающая способность традиционного метода оптической микроскопии делает затруднительным изучение тонкой морфологии элементов перипласта центрохелид этим методом. В то же время, эти элементы являются основными признаками для видовой идентификации данной группы простейших. В связи с этим при идентификации солнечников широко применяется сканирующая электронная микроскопия (СЭМ), которая требует предварительной подготовки образца путем напыления металла. В тоже время, в литературных источниках отсутствуют какие-либо данные об использовании АСМ для идентификации центрохелид.

В связи с этим целью данной работы явилась оценка возможности применения АСМ для исследования морфологии клеточной поверхности протистов отряда *Centrohelida* и последующего определения таксономического положения исследуемых образцов.

Отбор проб производился в сентябре–ноябре 2010 года из разнотипных водоемов на территории Оренбургской области и республики Башкортостан. Препараты центрохелид для АСМ готовили путем отсаживания клетки солнечника пипеткой из накопительной культуры на поверхность обезжиренного покровного стекла с последующей отмывкой дистиллированной водой.

Исследования элементов клеточной поверхности проводили с помощью атомно-силового микроскопа СММ-2000 (ЗАО «КПД», Россия) в режиме постоянного контакта. В процессе сканирования использовались кантилеверы MSCT-AUNM (Park Scientific Instruments, США) с жесткостью балки 0,01 Н/м и радиусом кривизны иглы порядка 15–20 нм. Морфометрический анализ полученных изображений проводили с использованием штатного программного обеспечения микроскопа. Идентификация солнечников проводилась с применением определителя К.А. Микрюкова [1].

В результате проведенных исследований были получены серии изображений, анализ которых позволил выделить и идентифицировать два морфологических варианта солнечников в исследуемых образцах.

Raineriophrys erinaceoides (рис. 1а) имеет перипласт диаметром $35,0 \pm 2,0$ мкм, представлен пластинчатыми чешуйками и спикулами одного вида (рис. 1б). Спикулы длиной 5,1–10,8 мкм, слегка изогнуты и сужаются к верхушке. Основание спикул представлено базальным крылом (1,2–

1,8 мкм шириной), расположенным под прямым углом к стволу, и двумя V-образно тянущимися латеральными крыльями, не достигающими половины длины ствола.

Пластинчатые чешуйки удлиненно-яйцевидные, с аксиальным гребнем, их длина 4,5–6,9 мкм, ширина 1,8–3,5 мкм.

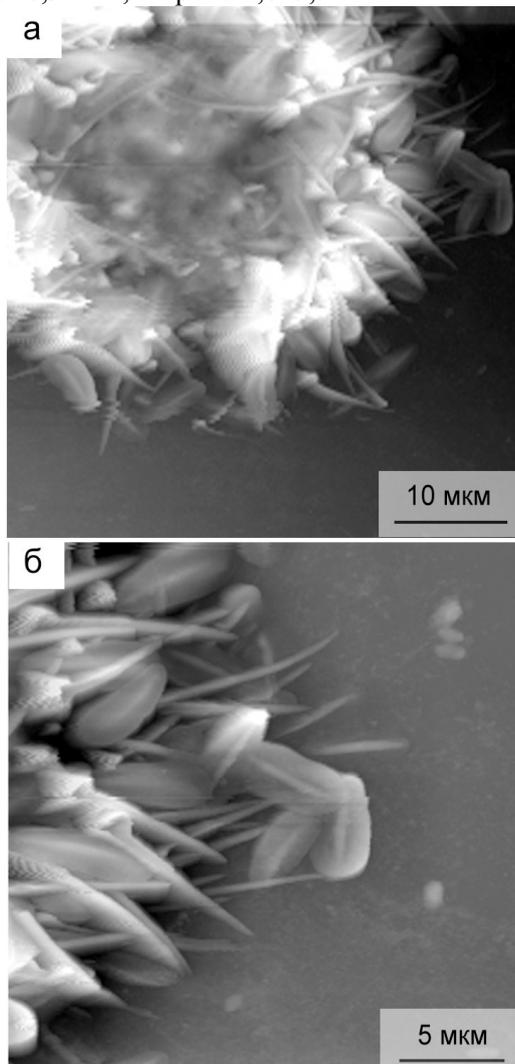


Рис. 1. АСМ-изображения элементов перипласта *Raineriophrys erinaceoides*. А – перипласт, Б – чешуйки и спикулы.

Polyplacocystis ambigua имеет перипласт диаметром $40,0 \pm 1,2$ мкм (рис. 2а). Характерной особенностью данного вида является наличие чешуек трех типов. К первому типу относятся длинные, узкие, веретеновидные чешуйки длиной 7,5–11,5 мкм и шириной 0,58–0,7 мкм. Ко второму типу – эллиптические, со слегка сужающимися полюсами длиной 4,1–7,4 мкм, шириной 1,9–3,2 мкм. Наконец, к третьему типу относятся овальные чешуйки с широко округлыми полями длиной 3,7–

6,2 мкм и шириной 1,5–2,9 мкм. Все виды чешуек обрамлены хорошо выраженной на АСМ-изображениях гладкой маргинальной каймой (рис. 2б).

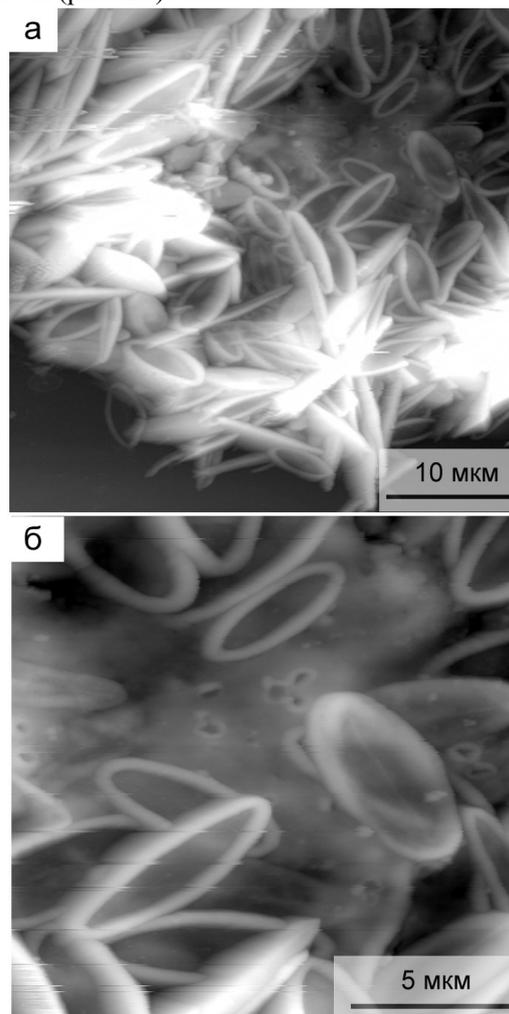


Рис. 2. АСМ-изображения элементов перипласта *Polyplacocystis ambigua* (а - перипласт, б - чешуйки).

Таким образом, нами впервые была проведена идентификация различных представителей центрохелидных солнечников с использованием АСМ. Показано, что этот метод вполне адекватен для морфологического исследования центрохелид, и его использование позволяет получать более информативные данные о тонкой морфологии данного класса протист чем другие микроскопические методы.

Список литературы:

1. Микрюков К.А. Центрохелидные солнечники (Centroheliozoa). М.: Товарищество научных изданий КМК, 2002. 132 с.

ИЗУЧЕНИЕ ЭМБРИОНОВ *XENOPUS LAEVIS* МЕТОДАМИ АТОМНО-СИЛОВОЙ МИКРОСКОПИИ

Ю.М. Ефремов, Е.А. Пухлякова, Д.В. Багров, Л.В. Белоусов, К.В. Шайтан

МГУ имени М.В. Ломоносова

yu.efremov@gmail.com

Ооциты и эмбрионы шпорцевой лягушки *Xenopus laevis* являются широко используемым объектом для изучения многих механизмов развития [1]. Это обусловлено их достаточно большими размерами и удобством работы с ними. Также они используются для экспрессии и изучения различных белков. В процессе развития эмбриона происходят интенсивные скооперированные клеточные движения, которые изучены далеко не полностью. Новую информацию о взаимодействиях между клетками получают различными, в том числе и микроскопическими, методами. Основным методом исследования поверхности эмбриона – сканирующая электронная микроскопия (СЭМ) [2, 3], однако, он не позволяет работать с живыми эмбрионами. Поэтому целью данной работы было экспериментально подтвердить возможность исследования фиксированных и живых эмбрионов *Xenopus laevis* методом атомно-силовой микроскопии (АСМ). Для этого был разработан специальный метод закрепления эмбрионов в ямках, сделанных в агаровом доннышке. В ходе работы мы использовали АСМ для того, чтобы подтвердить и дополнить имеющиеся в литературе данные о структуре поверхности эмбрионов. Были исследованы живые и фиксированные эмбрионы *Xenopus laevis*, сопоставлена морфология поверхности клеток на разных стадиях развития. Данные АСМ сравнивались с данными СЭМ, полученными в параллельных экспериментах и известными из литературы. На живых образцах также исследовано движение клеточных границ, изменение поверхности со временем (рис. 1). Полученные результаты подтверждают возможность использования АСМ для исследования эмбрионов.

Работа выполнена при поддержке ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009–2013 годы, ГК № П717 и РФФИ, грант № 05-04-48681.

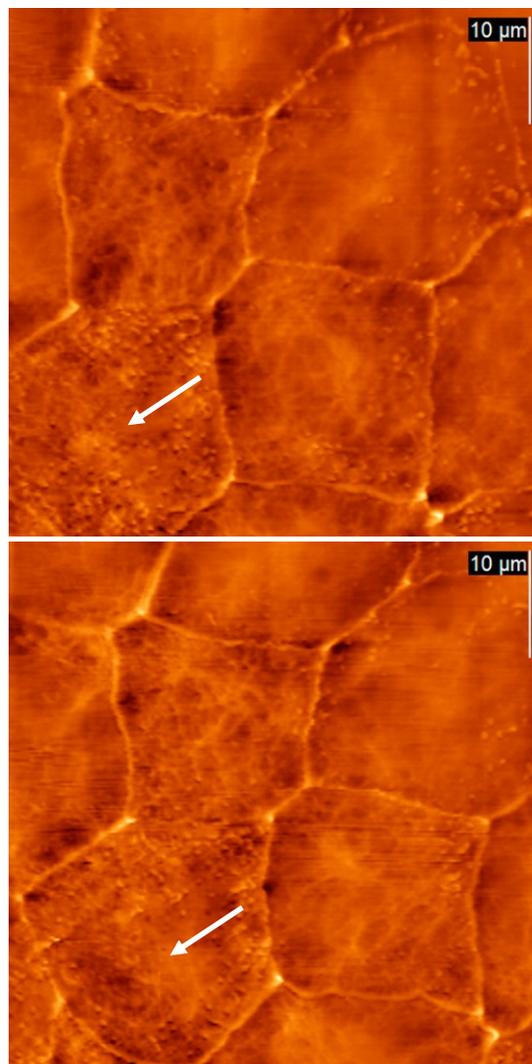


Рис. 1. Два последовательных кадра с анимального полюса живого эмбриона *X. laevis* (время на 1 кадр – 5 минут). Контактный метод АСМ, сигнал ошибки обратной связи. Видно, что клетка, помеченная стрелкой, на верхнем кадре несет много микроворсинок, по сравнению с остальными. На втором кадре число микроворсинок на ней уменьшилось. Видны также перестройки в цитоскелете, который выглядит как сеть на поверхности.

Список литературы:

1. Gurdon J.B., Hopwood N., International Journal of Developmental Biology 44, 43-50 (2000).
2. Monroy A., Baccetti B., Dennis-Donini S., Developmental Biology 49, 250-259 (1976).
3. Tarin D., 1971. Journal of Anatomy 109, 535.

АТОМНО-СИЛОВАЯ МИКРОСКОПИЯ КАК ИНСТРУМЕНТ В МИКРОБИОЛОГИИ

С.Г. Игнатов¹, А.Г. Волошин¹, Г.Н. Федюкина¹, С.В. Краевский²,
Т.Е. Игнатюк², Е.В. Дубровин³

¹ГНЦ Прикладной Микробиологии и Биотехнологии

²Институт теоретической и экспериментальной физики имени А.И. Алиханова

³Физический факультет МГУ имени М.В. Ломоносова

ignatov@obolensk.org

В последние годы в микробиологии появился новый способ исследования бактерий – атомно-силовая микроскопия (АСМ). АСМ обеспечивает получение 3D изображений поверхностных ультраструктур с молекулярным разрешением, в режиме реального времени и физиологических условиях. Понимание процессов адгезии и агрегации бактериальных клеток требует не только знания физико-химических свойств (гидрофобности и электрических свойств) и химического состава, но также наномеханических свойств и ультраструктуры их поверхности. Уникальная возможность АСМ представлять бактериальный мир в субнанометровом диапазоне и в водном растворе может быть использована для исследования как самих клеток, так и их поверхности в физиологических условиях.

Для специфической визуализации бактерий был разработан новый подход, основанный на иммобилизации специфических антител непосредственно на твердой подложке через связывание антител стафилококковым белком А. Белок А специфически узнает и связывает Fc-фрагменты антител.

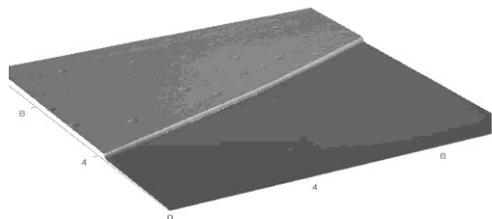


Рис. 1. Трехмерное АСМ изображение слоя белка А.

Получены изображение слоя белка А (рис. 1) и 3D изображения специфически иммобилизованных бактерий (рис. 2) с использованием слоя белка А для чувствительной иммобилизации специфических антител.

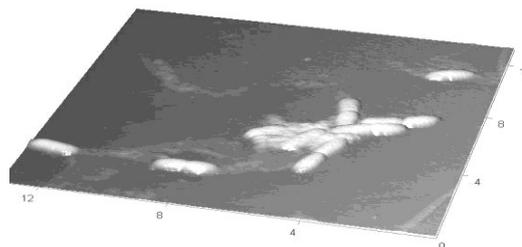


Рис. 2. Трехмерное изображение клеток *B. Thuringiensis*, нанесенных с использованием слоя белка А и антител против бактериальных клеток.

Был разработан протокол приготовления образцов для визуализации с помощью АСМ взаимодействия бактерий с бактериофагами.

На рис. 3 представлена визуализация специфического взаимодействия бактериальных клеток с супермагнитными микрочастицами, модифицированными белком G со специфическими антителами.

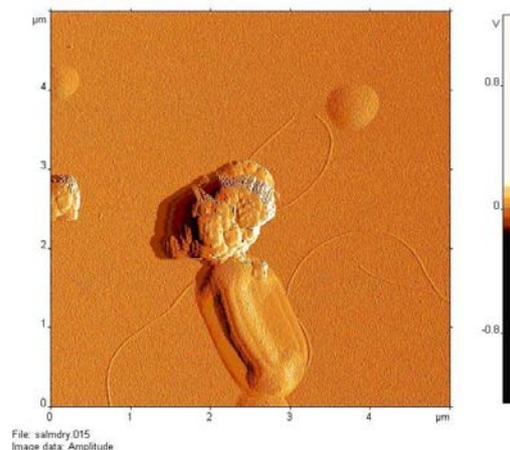


Рис. 3. Изображение взаимодействия клетки *S. enteritidis* с супермагнитными микрочастицами BioMagPlus на подложке, модифицированной белком G и специфическими антителами против клеток *S. enteritidis*.

АСМ открывает новые возможности в микробиологии при исследовании аффинных взаимодействий и nanoорганизации.

ПЕРСПЕКТИВЫ КАРТИРОВАНИЯ И СЕКВЕНИРОВАНИЯ ДНК МЕТОДОМ СЗМ

Д.В. Клинов
ИБХ РАН, Москва
klinov.dmitry@mail.ru

Одним из наиболее популярных методов в исследованиях биополимеров на сегодня является сканирующая зондовая микроскопия (СЗМ). Уникальность СЗМ состоит в том, что она позволяет визуализировать индивидуальные молекулы биополимеров, например ДНК. При помощи СЗМ можно локализовать участки специфического связывания в составе протяженных молекул ДНК длиной до нескольких десятков тысяч пар оснований. Нами была разработана методическая база для изучения структуры ДНК и комплексов ДНК с различными лигандами при помощи СЗМ. Одним из важнейших результатов наших исследований стала разработка высокоточного картирования молекул ДНК методами сканирующей зондовой микроскопии [1].

Недавно нами были изобретены сверхострые СЗМ-зонды (с радиусом острия 1 нм) [2], позволяющие значительно повысить разрешение этого метода. Так, впервые, при исследовании одиночных молекул ДНК при помощи сверхострых СЗМ-зондов (Рис. 1), было получено разрешение периода двойной спирали [3]. В ближайшем будущем мы надеемся существенно повысить точность картирования ДНК с использованием таких зондов.

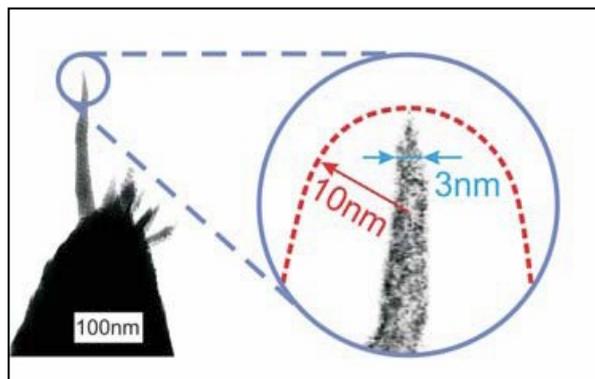


Рис. 1. Алмазо-подобные СЗМ-зонды, разработанные для сверхвысокого разрешения. Красный контур показывает форму стандартных кремниевых СЗМ-зондов.

Список литературы:

1. D.V. Klinov, I.V. Lagutina, V.V. Prokhorov, T. Neretina, P.P. Khil, Y.B. Lebedev, D.I. Cherny, V.V. Demin and E.D. Sverdlov, High resolution mapping DNAs by R-loop atomic force microscopy, *Nucleic Acids Research*, Vol.26, No 20, 1998, 4603–4610.
2. D. Klinov and S. Magonov, True molecular resolution in tapping-mode atomic force microscopy with high-resolution probes. *Applied physics letters*, 2004, 84 (14), 2697–2699.
3. Д.В. Клинов, Т.В. Неретина, В.В. Прохоров, Т.В. Добрынина, К.Г. Алдаров, В.В. Демин, Атомно-силовая микроскопия ДНК с высоким разрешением, *Биохимия*, 2009, 74 номер 10, стр. 1410–1415.

СОЗДАНИЕ СЕНСОРА ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АНТИТЕЛ ГРУПП КРОВИ ЧЕЛОВЕКА

Д.В. Колесов¹, Г.А. Киселев^{1,2}, М. Моисеев³, А.А. Кудринский³,
И.В. Яминский³

¹ ООО «Академия Биосенсоров»

² Институт физической химии и электрохимии им. А.Н. Фрумкина РАН

³ Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова
kolesov@polly.phys.msu.ru

Огромное число пациентов во всем мире ожидают подходящих для пересадки органов. Одним из решений этой проблемой может стать пересадка органов от доноров с несовпадающей группой крови. Группы крови человека определяются совокупностью антигенных характеристик красных кровяных телец – эритроцитов. Одной из наиболее важных систем групп крови в трансплантологии является система АВО. Она характеризуется наличием на эритроцитах 2-х типов антигенов: А и Б, и ассоциированными с ними антителами альфа и бета в плазме крови. В ряде работ [1] было показано, что очистка крови пациентов от антител групп крови анти-А и анти-Б уменьшает риск сверхострого отторжения трансплантата.

Для успешного решения задачи очистки крови должна быть разработана методика контроля наличия антител в сыворотке. Одним из наилучших кандидатов на роль сенсора являются микрокантилеверные датчики. Эта технология основана на преобразовании энергии комплементарного взаимодействия в механическую деформацию кантилевера и активно развивалась в последние два десятилетия. Данный тип сенсоров обладает высокой чувствительностью и селективностью, а также позволяет вести мониторинг в режиме реального времени.

Эксперименты по определению антител проводились на приборе Атомные Весы БиоСкан (ООО «Академия Биосенсоров»). Прибор одновременно позволяет регистрировать малые отклонения двух кантилеверных датчиков, вызванные изменением сил межмолекулярного взаимодействия в сенсорном слое при образовании комплексов антиген-антитело. Нами была разработана методика химической модификации золотой поверхности кантилевера антигенами типа А и Б. В качестве исследуемого объекта был взят раствор моноклональных антител бета, выделенных из мышинной сыворотки. Концентрация антител в буферном растворе была в 300

раз меньше природного содержания антител в плазме крови человека.

В ходе экспериментов, два кантилевера модифицировались антигенами А и Б, соответственно, и устанавливались в проточную жидкостную ячейку прибора. После установления равновесия в ячейку закачивался буферный раствор, содержащий антитела. Происходило комплементарное связывание антител из раствора с антигенами на поверхности одного из кантилеверов. Полезным сигналом являлась разность отклонений двух кантилеверов. После выхода зависимости на плато, итоговая разность сил поверхностного напряжения, вызванная взаимодействием комплексов антиген-антитело на поверхности кантилевера, составила 0,75 Н/м.

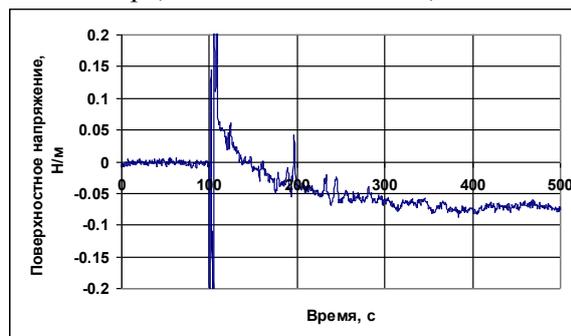


Рис. 1. Развитие сил поверхностного напряжения в процессе образования комплексов Ag-At на поверхности кантилевера.

Далее была проведена регенерация сенсорного слоя 10%-ным раствором мочевины и повторно введен исследуемый раствор. В результате второй части эксперимента разность сил поверхностного напряжения составила 0,65 Н/м. Время выхода на плато увеличилось с шести до десяти минут. Это свидетельствует о неполном распаде комплексов, образовавшихся на первом этапе.

Список литературы

1. Squifflet J.P. et al. Lessons learned from ABO-incompatible living donor kidney transplantation: 20 years later. *Exp Clin Transplant* 2004, 2:208–213

ОСОБЕННОСТИ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ АМФИФИЛЬНЫХ ПОЛИМЕРОВ С ПОРФИРИНАМИ ПО ДАННЫМ АТОМНО-СИЛОВОЙ МИКРОСКОПИИ

С.Л. Котова, В.А. Тимофеева, Н.А. Аксенова, А.Б. Соловьева
Институт химической физики им. Н.Н.Семенова РАН
slkotova@mail.ru

Использование комплексов порфириновых фотосенсибилизаторов (ПФС) с амфифильными полимерами (АП) при фотодинамической терапии (ФДТ) инфицированных ран и ожогов позволяет существенно уменьшить сроки выздоровления пациентов и существенно (на порядок и выше) понизить концентрацию ПФС и, соответственно, токсичность препаратов [1]. Для расширения спектра используемых ПФС и создания новых лекарственных форм для ФДТ важно выявить взаимосвязь между особенностями взаимодействия фотосенсибилизаторов и полимеров при образовании комплексов ПФС-АП и фотокаталитической активностью этих комплексов в генерации синглетного кислорода в воде.

В настоящей работе методом атомно-силовой микроскопии исследованы особенности структуры тонких пленок амфифильных тройных блоксополимеров этиленоксидов и пропиленоксидов – плуроников – в присутствии тетрафенилпорфирина (ТФП).

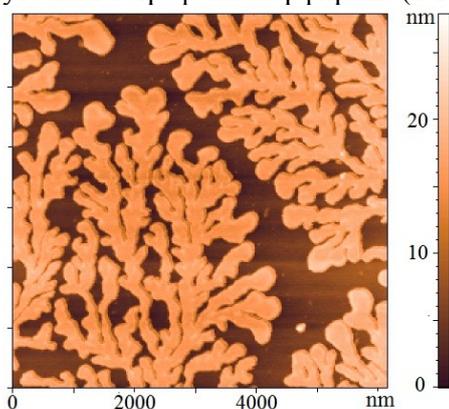


Рис. 1. Кристаллизация чистого плуроника в виде дендритов (на примере F87).

Использовали плуроники разной молекулярной массы и степени гидрофобности (Pluronic® F87, F108, F127, BASF Corp., Германия). Тонкие пленки плуроников получали из растворов в хлороформе на поверхности монокристаллического кремния методом спин-коутинга (скорость вращения 7000 об/мин), в отсутствие и в присутствии ТФП.

В отсутствие порфирина все изученные плуроники образуют характерные для кристаллизации полиэтиленоксида [2] дендрито-

подобные структуры высотой 11–13 нм (рис. 1).

В присутствии ТФП, как видно из рис. 2, структура тонких пленок плуроников существенно меняется – во всех случаях формируются выпуклые «островки», являющиеся частью фрагментов дендритоподобных структур. Высота «островков» может достигать 40–50 нм при ширине у основания до 1000 нм.

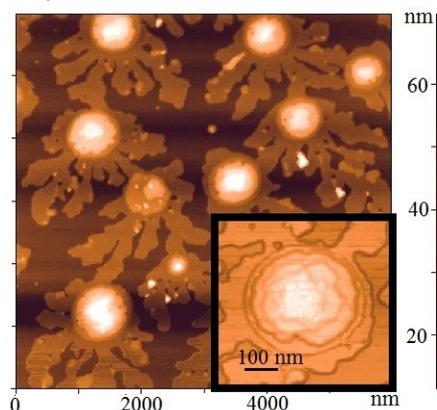


Рис. 2. Введение порфирина приводит к образованию «островков» (приведена система F87-ТФП). На вкладке показан отдельный «островок».

Такие «островки» многослойны и имеют свою внутреннюю микроструктуру (Рис.2, вкладка). Очевидно, малые агрегаты молекул ТФП взаимодействуют с гидрофобной частью макромолекул плуроника, изменяя локальные условия кристаллизации и инициируя послойную укладку ламелей полимера. При переходе в водную фазу комплексы ТФП-плуроник образуют ядро мицеллы плуроника. Единый механизм сольubilизации ТФП тремя изученными плурониками подтверждается одинаковой фотосенсибилизирующей активностью сольubilизированного ими порфирина в водной фазе в реакции окисления триптофана.

Список литературы:

1. Соловьева А.Б., Толстых П.И., Глаголев Н.Н. и др. Патент РФ 2396994.
2. Hobbs J.K. Lecture Notes in Physics, 714, 373–389 (2007).

AFM STUDY ON THE STRUCTURE AND DYNAMICS OF COMPLEXES WITH SINGLE STRANDED DNA BINDING PROTEINS

A.Y. Lushnikov¹, L.S. Shlyakhtenko¹, A. Miyagi¹, M. Li², L. Lackey²,
R.S. Harris², Yu.L. Lyubchenko^{1,*}

¹*Department of Pharmaceutical Sciences, College of Pharmacy, University of Nebraska Medical Center, 986025 Nebraska Medical Center Omaha, NE 68198, USA*

²*Department of Biochemistry, Molecular Biology, and Biophysics, Institute for Molecular Virology, Center for Genome Engineering, Masonic Cancer Center, University of Minnesota, Minneapolis, MN 55455, USA*

alushnikov@unmc.edu

Single stranded DNA (ssDNA) binding proteins are critical players in various genetic processes such as DNA replication, recombination, repair and restriction. Elucidating the structure of complexes of such proteins with the substrate provide a mechanistic picture of their role in the genetic processes. AFM is attractive structural means as it is capable of direct imaging of protein-DNA complexes. However, this progress was limited to double-stranded DNA. Single stranded DNA is much more flexible forming compact configurations stabilized by intrastrand interactions. Because of such compaction the AFM study of complexes of proteins with ssDNA is rather problematic. We have recently developed a novel approach to this problem [1] enabling us with AFM to reliably and unambiguously identify and analyze complexes of ssDNA with single strand binding proteins. In this approach, ssDNA was attached to a double-stranded DNA, so the protein after binding ssDNA appears at the end of the well-identified DNA duplex. Double stranded DNA plays a role of the tag facilitating imaging of the complex and is essential for measuring the specificity of the protein binding. The approach was tested with the use of two ssDNA binding proteins, ssDNA binding protein of *E.coli* (SSB) and APOBEC3G cytidine deaminase (A3G). SSB appeared on the AFM images as the end-bound blob with the size anticipated for the protein tetramer. The volume measurements were used to determine ssDNA binding proteins stoichiometry in both free and DNA-bound states. Oligomerization is supposed to be a regulatory factor for A3G enzymatic activity. We observed that free A3G is primarily monomeric, whereas ssDNA-complexed A3G is

mostly dimeric. A3G stoichiometry increases slightly with the addition of Mg^{2+} , but dimers still predominated when Mg^{2+} was depleted. High-speed AFM was applied to image dynamics of protein-DNA complexes of both types.

Conclusions.

- Novel approach for AFM imaging of ssDNA binding protein was developed and tested.
- Specificity of A3G and SSB proteins depends on ionic strength and the presence of divalent cations.
- Unbound A3G protein is primarily in monomeric state and oligomerization is increased upon binding to ssDNA.
- Dimers are the predominant A3G assemblies; larger oligomers are formed by the protein-protein interaction.

References:

1. Shlyakhtenko, L. S., Lushnikov, A. Y., Li, M., Lackey, L., Harris, R. S. & Lyubchenko, Y. L. (2011). AFM studies provide direct evidence for dimerization of the HIV restriction factor APOBEC3G. *J Biol Chem* **286**, 3387-3395.

The work was supported by grants from DOE (DE-FG02-08ER64579), NIH (1P01GM091743-01A1), NATO (SfP 983204), and the Nebraska Research Initiative (NRI, all to YLL).

NANOCINEMATOGRAPHY: REAL-TIME AFM IMAGING OF DYNAMICS OF MOLECULES

Yuri L. Lyubchenko

Department of Pharmaceutical Sciences, University of Nebraska Medical Center, 986025 Nebraska Medical Center, Omaha, NE 68198-6025, U. S. A.

In this talk, I overview our recent results on the study of dynamics of DNA and protein-DNA complexes made with the use of the time-lapse AFM. Several topics will be covered.

(1) The nanoscale dynamics of Holliday junctions. HJs are the key intermediates for DNA recombination. The goal of the time-lapse AFM study was to distinguish between different models of Holliday junction branch migration. We have shown that the textbook model with the parallel orientation of exchanging arms does not work and should be replaced with an alternative model in which the junction adopts fully unfolded configuration.

(2) Mechanisms of the search of specific sites by site-specific DNA binding proteins. Here the power in direct nanoscale imaging of transient states by high-speed AFM (HS AFM) will be illustrated. Specifically, with this technique we were able to identify a novel process for the site search by the two-site binding protein. We have shown that such proteins are able to pull DNA filaments keeping another DNA segment in place being bound to a specific binding site.

(3) Structure and dynamics of chromatin. A fundamental challenge of regulation of gene activity is the accessibility of DNA within nucleosomes. Recent studies performed with the use of single molecule approaches led to the realization that nucleosomes are quite dynamic rather than static systems. What is the range of dynamics of nucleosomes? Is a non-ATP dependent unwrapping of nucleosomes possible? What are the factors facilitating a large scale dynamics and unwrapping of nucleosomes? The time-lapsed AFM was instrumental in answering these questions and shedding a new light to the nanoscale dynamics of nucleosomes.

(4) Structure and dynamics of single-stranded DNA binding proteins. These are ubiquitous proteins involving in DNA replication, recombination, transcription and various modifications of DNA such as deamination (APOBEC proteins). The major challenge with structural studies of proteins working on ssDNA is the need in the unambiguous identification of the complexes distinguishing them from uncomplexed proteins and non-specific complexes with

double-stranded DNA (dsDNA). We have developed a novel approach for studies of ssDNA binding proteins with AFM in which a well-defined hybrid DNA substrate is used. In such designs, ssDNA of a specific length is either attached to one of the ends of dsDNA or inserted between the two DNA duplexes. The power of such an approach are illustrated by the AFM study of two proteins, ssDNA binding proteins from E. Coli (SSB protein) and DNA deaminase A3G. Time-lapse HS AFM was applied to look at the DNA-protein interaction dynamics including dissociation and association steps. The author's view on the future of the nano cinematography in various fields will be discussed.

References

1. Lyubchenko, Y. L. (2004). DNA structure and dynamics: an atomic force microscopy study. *Cell Biochem Biophys* 41, 75-98.
2. Gilmore, J. L., Suzuki, Y., Tamulaitis, G., Siksnys, V., Takeyasu, K. & Lyubchenko, Y. L. (2009). Single-molecule dynamics of the DNA-EcoRII protein complexes revealed with high-speed atomic force microscopy. *Biochemistry* 48, 10492-8.
3. Lyubchenko, Y. L. & Shlyakhtenko, L. S. (2009). AFM for analysis of structure and dynamics of DNA and protein-DNA complexes. *Methods* 47, 206-13.
4. Shlyakhtenko, L. S., Lushnikov, A. Y. & Lyubchenko, Y. L. (2009). Dynamics of nucleosomes revealed by time-lapse atomic force microscopy. *Biochemistry* 48, 7842-8 [The paper has been selected for Faculty of 1000 Biology].
5. Lyubchenko, Y. L. & Ando, T. (2011). Imaging of nucleic acids with atomic force microscopy. *Methods* in press.
6. Shlyakhtenko, L. S., Lushnikov, A. Y., Li, M., Lackey, L., Harris, R. S. & Lyubchenko, Y. L. (2011). AFM studies provide direct evidence for dimerization of the HIV restriction factor APOBEC3G. *J Biol Chem* 286, 3387-3395.

The work was supported by grants from DOE (DE-FG02-08ER64579), NIH (1P01GM091743-01A1), NATO (SfP 983204), and the Nebraska Research Initiative.

ИССЛЕДОВАНИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ОДИНОЧНЫХ МОЛЕКУЛ БЕТА-АМИЛОИДНОГО БЕЛКА МЕТОДОМ СИЛОВОЙ СПЕКТРОСКОПИИ

Е.В. Морозова, Ю.Л. Любченко

Department of Pharmaceutical Sciences,

College of Pharmacy, University of Nebraska Medical Center, Omaha, NE, US

elena.morozz@gmail.com

Нейродегенеративные заболевания напрямую связаны с неправильным фолдингом и агрегацией некоторых белков, таких как амилоид- β пептид ($A\beta$) в случае болезни Альцгеймера и α -синуклеин при болезни Паркинсона. Было установлено, что основным компонентом сенильных бляшек в мозге пациентов с болезнью Альцгеймера является амилоид- β пептид [1]. Процесс агрегации включает в себя формирование олигомеров, протофибрил и фибрилл. Долгое время считалось, что фибриллярные структуры приводящие к накоплению амилоидных бляшек являются причиной заболеваний, однако, в последнее время было предложено, что на самом деле цитотоксическими формами являются амилоидные олигомеры [2]. Однако, каким является молекулярный механизм олигомеризации и олигомеры какого порядка приводят к агрегации, на данный момент не известно.

В нашей лаборатории было установлено, что силовая спектроскопия дает возможность исследовать димеризацию отдельных молекул и неправильный фолдинг белков на самой первой стадии их взаимодействия, а также выявить время жизни тех или иных образованных комплексов [3]. Эксперимент проводится в жидкостной среде, естественной для биологических макромолекул. Это позволяет варьировать условия эксперимента, такие как pH среды и ионную силу раствора.

За формирование $A\beta_{40}$ фибрилл ответственны два бета-участка этого пептида [4]. Для понимания начальных процессов его олигомеризации нами было изучено димер-димерное взаимодействие $A\beta_{14-23}$ фрагментов, содержащих один из участков, ответственных за формирование фибриллярных структур.

Изучение таких модельных систем позволит продвинуться вперед в понимании процессов олигомеризации амилоид- β пептидов в организме.

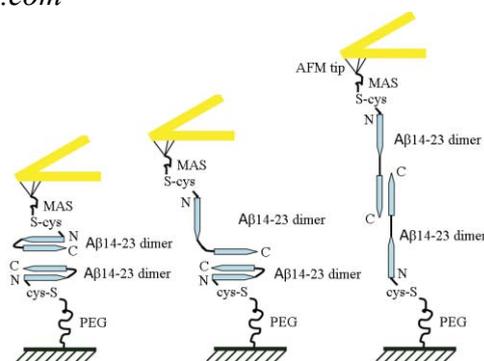


Рис. 1. Схема эксперимента, димер-димерное взаимодействие.

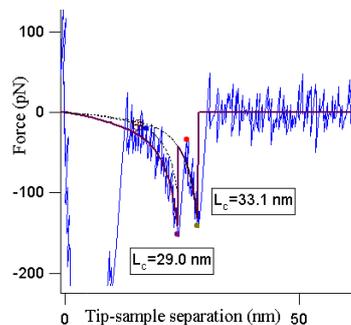


Рис. 2. Типичная силовая кривая отражающая взаимодействие молекул, закрепленных на подложке и зонде АСМ соответственно. L_c – контурная длина невзаимодействующей части молекул.

Список литературы:

1. Sipe, J.D., *The Beta Sheet Conformation and Disease*. Amyloid Proteins, 1, p. 385, (2005)
2. Sakono, M. and T. Zako, *Amyloid oligomers: formation and toxicity of Abeta oligomers*. FEBS J, 277(6), p. 1348-58, (2010)
3. Lyubchenko YL, Kim BH, Krasnoslobodtsev AV, & Yu J (2010) Nanoimaging for protein misfolding diseases. *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol* 2(5):526-543
4. Kim BH, et al. (2011) *Single molecule AFM force spectroscopy study of Abeta-40 interactions*. Biochemistry (in press)

The work was supported by grants to YLL from DOE (DE-FG02-08ER64579), NIH (1P01GM091743-01A1), NATO (SfP 983204), and the Nebraska Research Initiative.

ФИБРИЛЛОПОДОБНЫЕ СТРУКТУРЫ БЕЛКА Hfq ИЗ PSEUDOMONAS AERUGINOSA

В.Н. Мурина, О.М. Селиванова, М.Б. Гарбер, С.В. Никонов, А.Д. Никулин

Институт белка РАН

thyrada@rambler.ru

Бактериальный белок Hfq относится к семейству Sm-подобных белков. Он является глобальным регулятором экспрессии генов, принимает участие в регуляции транскрипции и трансляции различных мРНК, способствует связыванию малых нетранслируемых РНК с мРНК.

Недавно было показано, что белок Hfq способен связываться с ДНК *in vitro* и при избытке белка компактизовать ее в виде филамента.

Архейные Sm-подобные белки способны самопроизвольно формировать в растворе фибриллы. Несмотря на высокую гомологию с архейными белками, бактериальные белки Hfq не способны к самопроизвольному фибриллообразованию. Цель нашей работы – определить причины таких различий в свойствах бактериальных и архейных белков.

Был получен ряд мутантных белков с заменами аминокислотных остатков в белке Hfq *Pseudomonas aeruginosa*. Области замен были выбраны так, чтобы изменить физические свойства белка. Только один из полученных мутантных белков оказался способным к самопроизвольному образованию фибриллоподобных структур в растворе.

При выдерживании в растворе полученный нами мутантный белок образует организованные в цепочки, повторяющиеся идентичные цилиндрические частицы, диаметром и высотой около 15 нм, стенки которых составлены из слоев толщиной около 3 нм (см. рис. 1).

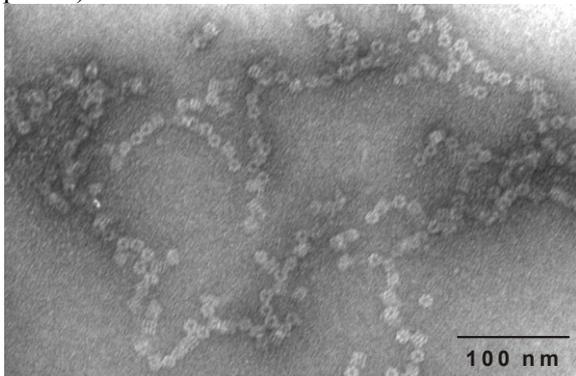


Рис. 1. ЭМ-фотография фибриллоподобных структур мутантного белка Hfq *P. aeruginosa*.

Такие фибриллоподобные структуры образуются самопроизвольно при инкубации в буфере 25 mM TrisHCl, pH=8,0.

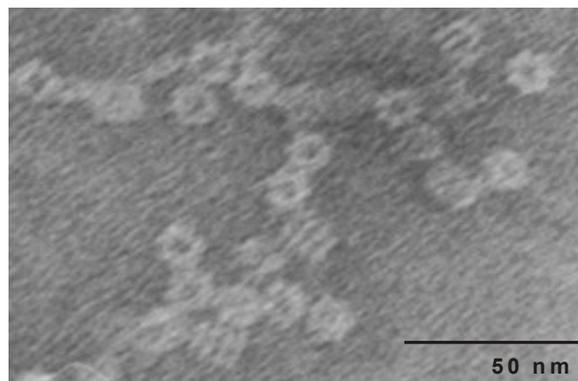


Рис. 2. Увеличенный фрагмент фотографии, приведенной на рис. 1. Можно выделить отдельные цилиндрические частицы размером примерно 15x15 нм.

При дальнейшей инкубации цилиндрические частицы имеют тенденцию к олигомеризации в фибриллоподобные структуры.

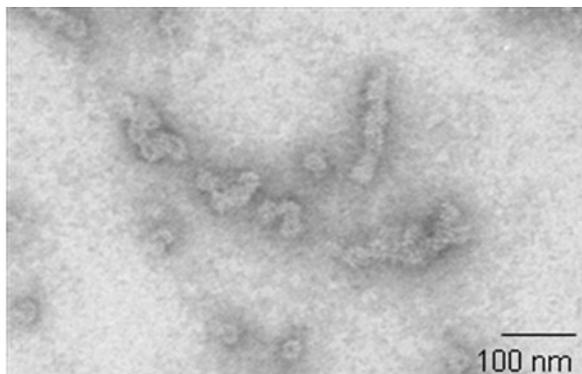


Рис. 3. Фибриллоподобные частицы мутантной формы белка Hfq длиной до 100 нм, по всей видимости, построенные из соединенных «торец-в-торец» цилиндров.

Таким образом, нами найдена область белка Hfq, которая предположительно является критичной для самопроизвольного формирования фибриллоподобных структур Sm-подобными белками.

Работа выполнена при поддержке программы Молекулярная и клеточная биология Президиума РАН и ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» ГК № 02.740.11.0295.

НОВЫЕ ДОСТИЖЕНИЯ ФЛУОРЕСЦЕНТНОЙ МИКРОСКОПИИ ВЫСОКОГО РАЗРЕШЕНИЯ. СИСТЕМЫ N-SIM И N-STORM NIKON

А.И. Назарова
STORMOFF group of companies
anna.nazarova@stormoff.com

В последнее время флуоресцентная микроскопия стала одним из наиболее востребованных, постоянно развивающихся методов исследования внутриклеточных процессов и механизмов в живых объектах (клетках, бактериях и др.) Появление лазерной сканирующей конфокальной микроскопии позволило существенно улучшить разрешение флуоресцентных микроскопов вдоль оптической оси, благодаря чему стало возможным построение 3-хмерных изображений микрообъектов. Исследование быстрых внутриклеточных и межклеточных процессов стало возможным с использованием резонансного сканирования в конфокальных микроскопах, вплоть до скоростей 420 кадров/сек (Nikon AIR). Многофотонная флуоресцентная микроскопия позволила изучать биологические процессы в толще тканей и органов без повреждений с разрешением 200 нм [1].

Дальнейшее развитие оптической микроскопии связано с преодолением дифракционных ограничений. И хотя новые технологии позволяют преодолеть разрешение оптических микроскопов (электронная микроскопия, атомно-силовая микроскопия и т.д.), наблюдение живых объектов в них крайне осложнено. Было разработано новое направление современной флуоресцентной микроскопии, получившее название микроскопии сверхвысокого разрешения. Данное направление включает в себя микроскопию структурированного освещения (3D-SIM), локализационную микроскопию (стохастическая оптическая реконструкционная микроскопия STORM) и микроскопию «снижения стимулированной эмиссии» (STED).

Микроскопия структурированного освещения (3D-SIM) проецирует образец структурированного света на объект [2]. Возбуждающий свет взаимодействует с флуорофорами объекта исследования, генерируя картину интерференционных полос. С помощью модуляции освещения, накопления и реконструкции последовательности изображений достигается улучшение разрешения изображений в 2 и более раз.

Используя высокочастотное структурированное освещение, системы Nikon N-SIM по-

зволяют достичь разрешения 85 нм и временного разрешения 0,6 сек на кадр. N-SIM дает возможность изучать динамику молекулярных взаимодействий внутри *живых* клеток, при этом получаются многоцветные трехмерные изображения всей клетки с высоким пространственным разрешением.

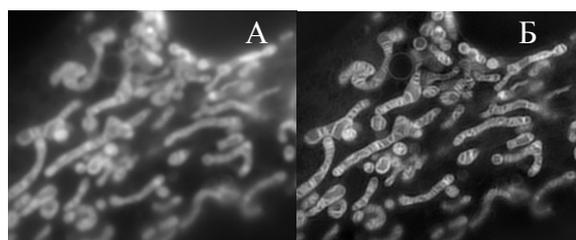


Рис. 1. Митохондрии в живых клетках HeLa, окрашенные Mito-Tracker red. А. Изображение с помощью конфокальной микроскопии Б. Изображение 3D-SIM.

Локализационная микроскопия позволяет определить положение отдельных флуорофоров благодаря использованию фотоактивируемых флуорофоров [3]. При возбуждении единичного флуорофора, его точное положение определяется по пику кривой Гаусса. Когда флуорофоры слишком близко расположены, их изображения перекрываются. Благодаря слабому освещению происходит активация отдельных флуоресцентных молекул объекта, определяется точечная локализация и строятся карты распределения флуорофора. N-STORM позволяет достичь пространственного разрешения 20 нм, что более, чем в 10 раз превышает наилучшее разрешение традиционных оптических микроскопов.

Микроскопия сверхвысокого разрешения открывает новые возможности для изучения межмолекулярных внутриклеточных взаимодействий, способствуя развитию геномики, протеомики, биотехнологии, цитологии.

Список литературы:

1. Gratton, Barry, N. P., Beretta, S. and Celli, A. Multiphoton fluorescence microscopy. *Methods* 25, 103–110 (2001).
2. Karadaglic, D., Wilson, T. Image formation in structured illumination wide-field fluorescence microscopy. *Micron* 39, 808–818 (2008).
3. Huang, B. Current Opinion in Chemical Biology 14, 10–14 (2010).

ЛОКАЛЬНАЯ ИММОБИЛИЗАЦИЯ *CHLAMYDIA TRACHOMATIS* НА МИКРОСТРУКТУРИРОВАННОЙ ПОВЕРХНОСТИ

И.В. Парибок¹, Г.К. Жавнерко¹, В.Е. Агабеков¹,
А.Н. Асташонок², Л.В. Рубаник², Н.Н. Полещук²

¹ ГНУ Институт химии новых материалов НАН Беларуси

² ГУ Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии МЗРБ
zhavn@ichnm.basnet.by

В настоящее время формирование биологических микро- и наноструктур на твердой поверхности является одной из актуальных задач при создании биосенсоров [1]. Цель исследования заключалась в разработке микроструктурированных сенсорных покрытий (СП), пригодных для локальной иммобилизации *Chlamydia Trachomatis*. Методом микроконтактной печати (МКП) [2] на поверхности гидрофильного кремния сформированы два типа СП, содержащих участки (полосы шириной 1,5 мкм), промотирующие и блокирующие клеточную адгезию. Для создания первого типа СП на поверхность кремния из водного раствора адсорбировали бычий сыровоточный альбумин (БСА) в виде сплошной пленки, после чего методом МКП формировали полосы положительно заряженного полиэлектролита – полиэтиленimina (ПЭИ). Далее на полосы ПЭИ из водного раствора осаждали гепарин. Результирующее СП представлено на рис. 1.

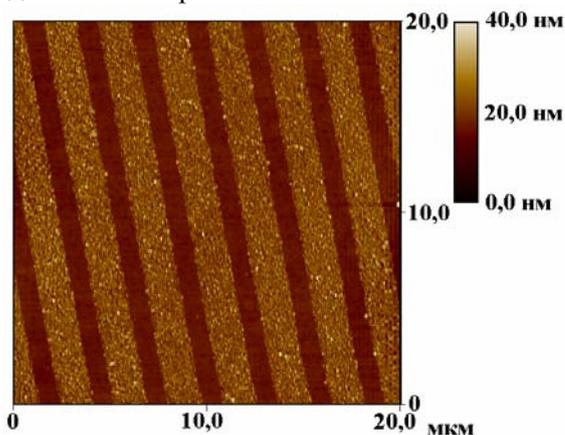


Рис. 1. АСМ-изображение микроструктурированной пленки гепарин/БСА на кремнии.

Для создания второго типа СП на поверхности гидрофильного кремния методом МКП формировали полосы БСА, далее из раствора на свободные от БСА участки адсорбировали стрептавидин, а на него – биотинилированные моноклональные антихламидийные антитела (МАТ).

Локальную иммобилизацию *Chlamydia Trachomatis* осуществляли, выдерживая аликвоты исследуемого материала на поверхности заранее подготовленных СП в течение 2–3 часов.

Методом атомно-силовой микроскопии (АСМ) показано, что внеклеточные формы данной популяции хламидий отличаются по морфологии и поверхностному заряду клетки и зависят от типа используемого СП.

Обнаружено, что для СП первого типа преимущественная адсорбция хламидий (как отдельных, так и колоний) происходит на полосах гепарина (рис. 2).

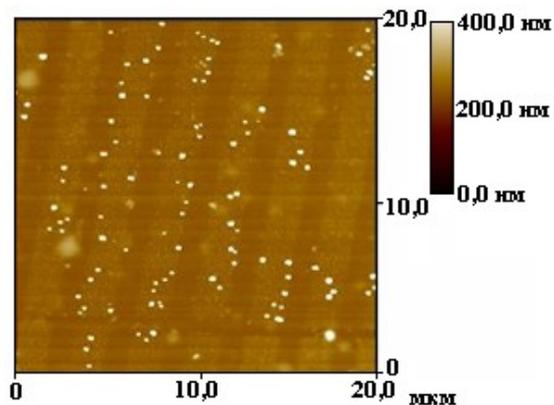


Рис. 2. АСМ-изображение локально иммобилизованных *Chlamydia Trachomatis*.

Установлено, что на локально активированных МАТ поверхностях (СП второго типа) встречаются два вида частиц: ретикулярные тельца возбудителя сферической или овальной формы размером от 0,8 до 1,3 мкм и элементарные тельца диаметром от 100 до 280 нм.

Предложенный подход может быть использован для обнаружения и идентификации *Chlamydia Trachomatis* методом АСМ.

Список литературы:

1. Hook A.L., Voelcker N.H., Thissen H., Acta Biomaterialia, 5, 2350–2370 (2009).
2. Парибок И.В., Жавнерко Г.К., Агабеков В.Е., Змачинская Ю.А., Янцевич А.В., Усанов С.А., Журнал общей химии, 77, 395–399 (2007).

ПРИМЕНЕНИЕ МЕТОДА АТОМНО-СИЛОВОЙ МИКРОСКОПИИ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ ПОВЕРХНОСТНОЙ СТРУКТУРЫ ЭРИТРОЦИТОВ

Е.Ю. Паршина¹, А.И. Юсипович¹, В.Н. Рябоконт², Г.В. Максимов¹

¹Биологический факультет МГУ имени М.В. Ломоносова

²ЗАО "НТ-МДТ"

parshinae@gmail.com

Определение шероховатости при помощи метода атомно-силовой микроскопии широко используется для оценки состояния различных объектов, однако существует лишь небольшое число работ, где он использовался для анализа поверхности клеток. В то же время использование интегрального параметра удобно при оценке действия на клетку различных физиологически и экзогенных факторов.

Ранее было показано [1], что параметр шероховатости эритроцитов является надежной характеристикой образца, не зависит от типа фиксации клеток и одинаков для фиксированных и высушенных в мазке клеток. Кроме того, показано, что шероховатость поверхности эритроцитов связана с состоянием цитоскелета. Целью нашей работы было разработать методику и изучить применимость параметра шероховатости для исследования влияния состояния окружающей среды на поверхностную структуру эритроцита.

Суспензии эритроцитов инкубировали в средах с различной осмолярностью. В работе были использованы эритроциты крови человека, фиксированные 0,5% глутаровым альдегидом. АСМ-изображения получены с использованием зондовой нанолaborатории Ntegra Spectra компании НТ-МДТ (Россия, Зеленоград).

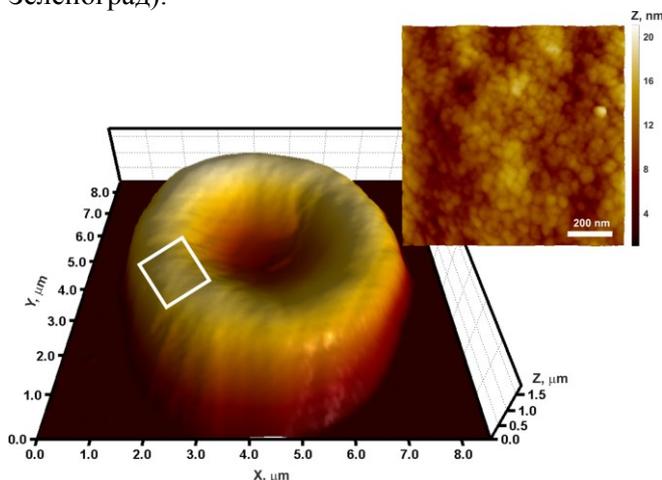


Рис. 1. Типичное изображение эритроцита.

Сканирование производили в полуконтактном режиме с использованием полуконтактных кантилеверов NSG 10-A, частота сканирования 0,5-1,0 Гц.

Типичное изображение эритроцита приведено на рис. 1. Параметр шероховатости (средняя шероховатость, S_a) определяли по формуле:

$$S_a = \frac{1}{MN} \sum_{k=0}^{M-1} \sum_{l=0}^{N-1} |z(x_k, y_l)|$$

Показано, что с увеличением осмолярности среды инкубации шероховатость поверхности эритроцита увеличивается (рис.2).

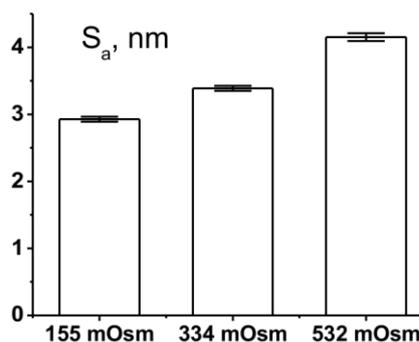


Рис. 2. Влияние осмолярности среды инкубации на параметр шероховатости эритроцитов.

Изменения, происходящие в эритроцитах при варьировании осмолярности окружающего раствора, связаны с выходом из клетки или поступлением в клетку воды и соответствующим изменением клеточного объема. Эти изменения могут затрагивать также форму клетки, ее цитоскелет и распределение трансмембранных белков, что и вызывает изменение шероховатости.

Список литературы:

1. Girasole M., Pompeo G., Cricenti A., Congiu-Castellano A., Andreola F., Serafino A., Frazer B.H., Boumis G., Amiconi G. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1768, pp. 1268–1276 (2007).

ПОЛУЧЕНИЕ ЗОЛОТЫХ НАНОЧАСТИЦ ДЛЯ ВЫСОКОЧУВСТВИТЕЛЬНОГО ИММУНОАНАЛИЗА НА ОСНОВЕ ГКР

Ю.С. Пестовский, И.А. Будашов

Химический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова
organics@mail.ru

Спектроскопия гигантского комбинационного рассеяния (ГКР) обладает рядом уникальных возможностей, которые делают ее перспективным методом исследования широкого класса биомолекул. Прежде всего, это связано с высокой чувствительностью метода. Дополнительным преимуществом метода является возможность его объединения со сканирующей зондовой микроскопией. Кроме того, спектроскопия ГКР все более широко применяется в качестве метода детекции в иммуноанализе. Наиболее высокая чувствительность достигается при использовании золотых или серебряных наночастиц с иммобилизованным красителем.

Данный подход представляется перспективным, в частности, при исследовании прионов – принципиально нового класса белковых патогенов, вызывающих ряд неизлечимых в настоящее время заболеваний центральной нервной системы человека и животных. Патогенная изоформа прионного белка, богатая β -листами, обладает способностью к самопроизвольной полимеризации в высокоупорядоченные фибриллы (рис. 1), которые повреждают нейроны. В настоящее время необходимо достижение пределов обнаружения прионовых белков на уровне десятков-сотен молекул/мл.

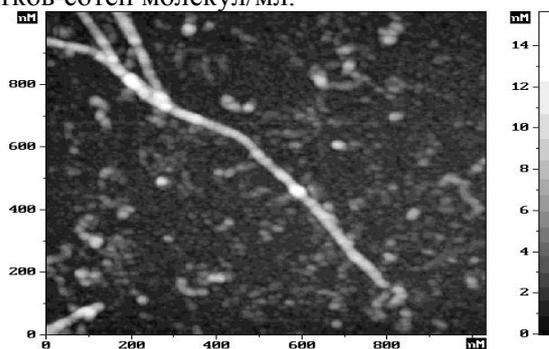


Рис. 1. АСМ-изображение фибрилл рекомбинантного прионного белка, адсорбированных на слюде.

Нами разработан способ иммобилизации 5,5'-дитиобис(2-нитробензойной кислоты) (ДТНБ) на поверхности золотых наночастиц со средним диаметром 45 нм. Данный краси-

тель ковалентно связывается с поверхностью золота и имеет карбоксильные группы, которые могут быть использованы для конъюгации с антителами, в частности, к β -листам прионного белка. Он имеет интенсивный характеристический максимум при 1325–1340 см^{-1} , соответствующий нитрогруппе. Известна методика его иммобилизации на поверхности золотых наночастиц, которая проводится в этиловом спирте [1], что, согласно нашим данным, может привести к осаждению наночастиц. В нашей работе был предложен способ проведения реакции в воде, как в присутствии, так и в отсутствие буферных растворов, что значительно расширяет границы ее применения. В качестве метода контроля полученных меток была использована их электростатическая адсорбция на поверхности алюминия, обработанной раствором хлорида полидиметилдиаллиламмония (ПДДА) в присутствии солей КСl и КI (рис. 2) или без них. В случае использования раствора ПДДА, содержащего KI, интенсивность характеристического максимума выше, что позволяет рекомендовать данный вариант адсорбции наночастиц как метод контроля при получении меток для иммуноанализа с использованием спектроскопии ГКР в качестве метода детекции.

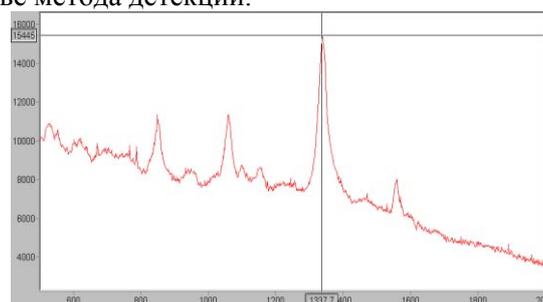


Рис. 2. Спектр ГКР наночастиц с иммобилизованным ДТНБ, адсорбированных на алюминии, покрытом ПДДА в присутствии KI.

Список литературы:

1. Temur E., Boyacı İ.H., Tamer U., Unsal H., Aydoğan N., Anal. Bioanal. Chem., 397, 1595–1604 (2010).

ИСКУССТВЕННЫЕ ВИРУСНЫЕ ЧАСТИЦЫ, ОБРАЗОВАННЫЕ БЕЛКОМ ОБОЛОЧКИ ПОТЕКСВИРУСА И ЧУЖЕРОДНЫМИ ВИРУСНЫМИ РНК

Е.К. Петрова¹, М.В. Архипенко¹, Н.А. Никитин¹, А.Д. Протопопова^{2,3},
Е.В. Дубровин², И.В. Яминский^{2,3}, О.В. Карпова¹, И.Г. Атабеков¹
МГУ имени М.В. Ломоносова: ¹Биологический факультет; ²Физический факультет;
³НПП «Центр перспективных технологий»
katerina519@mail.ru

Х-вирус картофеля (ХВК) и ряд других потексвирусов способны к реконструкции *in vitro* из вирусного белка оболочки (БО) и вирусной РНК. БО потексвирусов способен упаковать не только гомологичную РНК, но и гетерологичные нуклеиновые кислоты, образуя при этом искусственные («смешанные») вирусные рибонуклеопротеиды (вРНП). Нами изучены особенности структуры вРНП, полученных *in vitro* при инкубации БО ХВК с РНК ряда вирусов растений и животных, относящихся к различным таксономическим группам. В качестве гетерологичных были использованы РНК потексвирусов (ВМН – вирус мозаики нарцисса, ВАМК – вирус аукуба мозаики картофеля, ВМАльт – вирус мозаики альтернантеры), тобамовируса табачной мозаики (ВТМ), бромовируса мозаики костра (ВМК) и пикорнавируса Менго (вирус животных). Полученные вРНП были исследованы с помощью электронного и атомно-силового микроскопов и в трансляционном тесте.

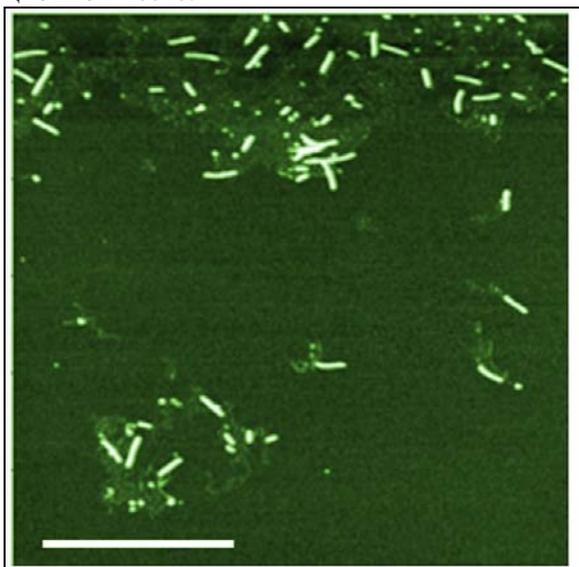


Рис. 1. Искусственные вРНП, собранные *in vitro* при инкубации БО ХВК и РНК ВТМ. Метка соответствует 1 мкм.

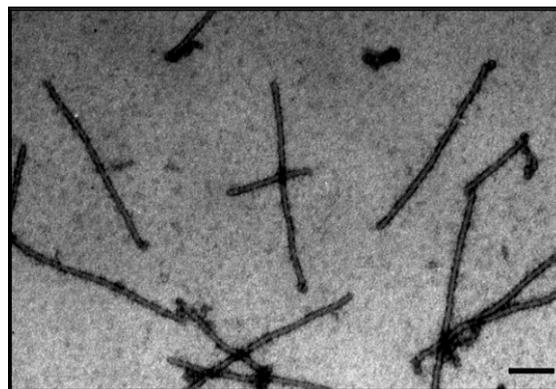


Рис. 2. вРНП, собранные *in vitro* при инкубации БО ХВК и РНК ВМН. Электронная микроскопия. Метка соответствует 100 нм.

Показано, что при взаимодействии гетерологичных РНК с БО ХВК образуется белковая оболочка, сходная по структуре и свойствам с белковой оболочкой гомологичных частиц и нативного вируса. Кроме того, по-видимому, инициация сборки «смешанных» вРНП *in vitro* так же, как и гомологичных, начинается с 5'-концевого района РНК. Вероятно, образование *in vitro* гетерологичных вРНП с участием БО ХВК не зависит от специфической нуклеотидной последовательности 5'-конца РНК, и БО ХВК способен упаковать чужеродный генетический материал различного размера и состава в вирусоподобные искусственные частицы. В составе вРНП гетерологичная РНК так же, как и гомологичная, не доступна для рибосом. Однако она становится трансляционно активной при инкубации полученных вРНП с транспортным белком 1 ХВК. Его связывание с одним из торцов вириона ХВК приводит к последующей разборке частиц с высвобождением свободной РНК и субъединиц белка на ранних стадиях трансляции. Вероятно, подобный механизм реализуется и в случае искусственных вРНП.

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ НАТИВНЫХ КЛЕТОК КРОВИ С НАНОРАЗМЕРНЫМИ ФЛЮОРОФОРАМИ

С.Н. Плескова, Э.Р. Михеева, Е.Н. Горшкова

Научно-образовательный центр физики твердотельных наноструктур Нижегородского государственного университета им. Н.И. Лобачевского
pleskova@mail.ru

Активное развитие нанотехнологии представляет широкий круг новых классов флюорофоров, которые могут быть использованы в биологических исследованиях и медицинской практике. Однако перед использованием они должны тестироваться на биосовместимость.

Для исследования влияния квантовых точек на жизнеспособность нейтрофильных гранулоцитов первоначально оценивалась жизнеспособность интактных клеток. Для этого в течение 10 часов нейтрофилы, изолированные из кровяного русла и находящиеся в забуференном физиологическом растворе в концентрации 500 тыс. кл/мл в термостатируемой ячейке конфокального микроскопа, наблюдали в режиме реального времени. За все время наблюдения клетки демонстрировали высокую степень активности: быстрое передвижение гранул в цитоплазме, миграционную активность, образование псевдоподий. При наблюдении за клетками методом атомно-силовой микроскопии миграционная активность клеток не отмечалась, однако, в течение 3 часов с 15 минутным интервалом сканирования морфология клеток оставалась неизменной. Тест с пропидиум йодидом показал значение жизнеспособности нейтрофилов в 97–99%, как в начале наблюдения за клетками, так и по окончании процесса.

В дальнейшем к нейтрофильным гранулоцитам добавляли квантовые точки разного состава с эмиссией 620 нм, 617 нм, 590 нм, 570 нм. Моделировалось две ситуации. В первой серии экспериментов клетки инкубировали с квантовыми точками (0,1 мг/мл) в темноте, после чего высаживали на стекло, где происходила спонтанная адгезия к подложке и клетки фиксировали метанолом. Эта серия позволяла оценивать темновую токсичность. Во второй серии экспериментов клетки вносили в термостатируемую жидкостную ячейку (37° С), после чего происходила спонтанная адгезия и в течение 2 часов наблюдали за интактными клетками, затем вносили квантовые точки – исследования фототоксичности.

В первой серии экспериментов зафиксировали ярко выраженный цитотоксический эффект квантовых точек, даже в том случае, когда клетки не праймированы адгезией к субстрату, а фототоксическое воздействие исключено условиями проведения эксперимента. Инкубация нейтрофилов с квантовыми точками в течение 5 мин не являлась опасной – отмечалась только голубая автофлюоресценция. Но уже через 10 мин клетки начинают поглощать квантовые точки, при этом четко отмечается зависимость между наполненностью клеток квантовыми точками и структурой: эмиссия в красной области спектра, характерная для квантовых точек, коррелирует с потерей клеткой ядра и разрушением мембраны. Через 90 мин после инкубации с CdSe/ZnS-меркапто-уксусная кислота (0,1 мг/мл) количество поврежденных клеток постепенно нарастает, отмечается гибель нейтрофилов по механизму нетоза.

Дополнительную информацию дает использование метода АСМ: даже клетки, сохраняющие целостность мембраны и ядро, образуют псевдоподии, не характерные для нейтрофилов, фрагменты псевдоподий на некоторых участках выглядят как «расплавленные», в отличие от всегда четко структурированных псевдоподий, формируемых клетками при фагоцитозе микроорганизмов (рис. 1).

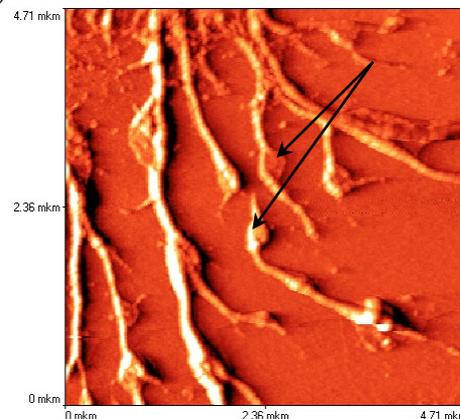


Рис. 1. АСМ-микроскопия псевдоподий нейтрофилов, поглощающих квантовые точки. Стрелками обозначены фрагменты «расплавленных» псевдоподий. Изображение по-

лучено на микроскопе SolverBio (NT-MDT, Россия), обработано в программе Topometrix.

Та же концентрация квантовых точек была использована при инкубации с клетками, адгезированными и распластанными на субстрате. Обнаружено, что квантовые точки в концентрации 0,1 мг/мл образуют крупные конъюгаты, а для клеток отмечались следующие феномены. Во-первых, наблюдается активное поглощение квантовых точек нейтрофильными гранулоцитами. Во-вторых, клетки, поглотившие квантовые точки, сохраняют способность к хемотаксису и даже обмену наноразмерными флюорофорами. В-третьих, нейтрофилы еще больше укрупняют конъюгаты квантовых точек, и пытаются экскретировать их на одном из полюсов. Достаточно продолжительное время клетки еще сохраняют высокую подвижность, но через 60 мин она сменяется характерным истончением мембраны по периферии, свидетельствующем о гибели клеток. В-четвертых, у части нейтрофилов наблюдается эффект «избегания» квантовых точек, когда они не просто активно выводят конъюгаты квантовых точек либо в среду, либо передавая их другим клеткам, но формируют выпячивание мембраны в месте концентрации CdSe/ZnS-МУК (рис. 2).

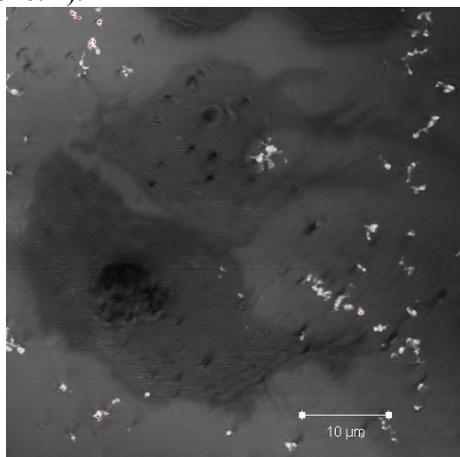


Рис. 2. Углубление участка мембраны нейтрофильного гранулоцита в месте концентрации квантовых точек CdSe/ZnS-МУК (0,1 мг/мл). Изображение получено на конфокальном микроскопе Carl Zeiss Axiovert 200M LSM 510 META (Германия), увеличение объектива x100.

Через 100 мин после внесения квантовых точек неизбежно наступает «вскипание» клетки. Морфологические признаки такого «вскипания» не однородны. В основном можно выделить две группы клеток. Первая группа характеризуется быстрым некрозом, в

результате которого при микроскопии визуализируется только «тень» клетки. Вторая группа начинает образовывать не характерные для нативного нейтрофила крупные гранулы, быстро концентрирует весь цитоплазматический материал в центре клетки, после чего периферическая часть истончается и клетка формирует характерные «волдырчатые» тени. Летальность CdSe/ZnS в концентрации 0,1 мг/мл подтверждена и в отношении клеток линии HeLa и в отношении человеческих гепатоцитов, однако в этих работах авторы фиксировали цитотоксический эффект в течение 24 часовой инкубации [1].

Обсуждая механизмы цитотоксичности, авторы отмечают, что кадмий вызывает гибель клеток в концентрации 100 – 400 мМ, поскольку ионы токсиканта способны связывать сульфгидрильные группы многих, в том числе митохондриальных белков. При этом тиогруппы инактивируются, что приводит к митохондриальной дисфункции и гибели клеток по механизму некроза. Морфологическое описание некротической гибели гепатоцитов полностью соответствуют тем, что наблюдались в наших экспериментах в отношении нейтрофильных гранулоцитов, т.е. после воздействия квантовыми точками, покрытыми меркапто-уксусной кислотой, обнажается гранулированная цитоплазма, границы клеток становятся нечеткими и расплывчатыми, ядро не определяется и формируются очевидные волдырчатые структуры.

Таким образом, сочетание двух методов высокоразрешающей микроскопии: атомно-силовой и конфокальной позволяет давать комплексную оценку процессов воздействия на нативные клетки разных классов биогенных и абиогенных веществ, а также оценивать динамику и феноменологию таких сложных процессов, как клеточная гибель.

Работа выполнена при поддержке ФЦП, № ГК 14.740.11.0456.

Список литературы:

1. Shiohara A., Hoshino A., Hanaki K., Suzuki K., Yamamoto K. *Microbiology and Immunology*, V.48, 669–675 (2004).

СТРУКТУРНОЕ МНОГООБРАЗИЕ ЭПИТАКСИАЛЬНЫХ МОНОСЛОЕВ ГЕКСАГЛИЦИЛАМИДА НА ПОВЕРХНОСТИ ГРАФИТА

В.В. Прохоров

Advanced Integrated Scanning Tools for Nano-Technology (AIST-NT), Зеленоград

vprokh@gmail.com

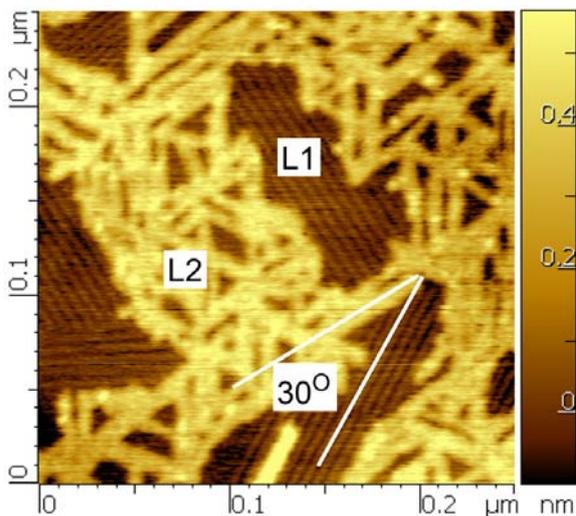


Рис. 1. АСМ изображение ламелей L1 и L2.

Недавно методом АСМ высокого разрешения было обнаружено, что при адсорбции из водных растворов короткого олигопептида гексаглицил-амида (ГГА) поверхность графита плотно покрывается высокоупорядоченными эпитаксиальными ламеллярными монослоями [1]. Уникальным для эпитаксии полимеров и олигомеров на неограниченных кристаллических субстратах является существование, в зависимости от концентрации, двух типов морфологически различных структур ГГА с направлениями роста ламелей, сдвинутыми относительно друг друга на 30° (или 90°) (рис. 1). Был проведен качественный анализ энергетики водородных связей для всего набора возможных двумерных упаковок молекул ГГА с учетом их размещения на решетке графита со следующими выводами (рис.2): 1) L1 и L2 ламели являются соответственно параллельными и антипараллельными β -листами с двумя молекулами ГГА в элементарной ячейке, упакованными нормально сторонам ламелей, 2) молекулярная ориентация относительно решетки графита в L1 и L2 ламелях различна – соответственно вдоль $\langle 11\bar{2}0 \rangle$ и $\langle 10\bar{1}0 \rangle$ направлений, 3) L1 ламели являются сдвоенными параллельными β -листами, ориентированными по типу «голова к голове», 4) L2 ламели являются сборками из нескольких молекулярных рядов (антипараллельных β -листов),

сшитых межрядными водородными связями. Обнаружение высокоупорядоченных ламеллярных монослоев ГГА неожиданно как по самому его факту (всюду плотное покрытие сильно гидрофобной поверхности графита наблюдалась до сих пор только для гидрофобных же алканов и их производных, но не для водо-растворимых олигопептидов), так и по богатству наблюдающегося на наноуровне структурного многообразия.

При сильных разбавлениях наблюдались исключительно ламели L1 вне зависимости от времени адсорбции, в то время как L2 ламели появлялись при концентрациях $\sim 0,5$ мкг/мл и более и не наблюдались при меньших. Возможное объяснение образования и сосуществования двух типов структурно-различных групп ламелей предполагает димеризацию ГГА в растворе (при $\sim 0,5$ мкг/мл) и рост ламелей L1 из мономеров, а L2 – из димеров ГГА (рис. 3). Единичные ГГА молекулы ориентируются при адсорбции преимущественно вдоль $\langle 11\bar{2}0 \rangle$ направлений решетки графита, так как в этом направлении имеет место соразмерность пе-

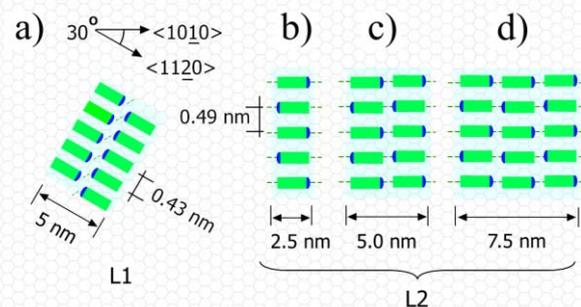


Рис. 2. Схематическое изображение ламелей L1 и L2 соответственно с параллельной и антипараллельной упаковками молекул ГГА, различным межмолекулярным расстоянием и ориентацией молекул относительно решетки графита. Концевые амидные группы показаны синим, межрядные водородные связи – пунктиром.

риодичности 0,74 нм графита и периодичности вдоль олигопептидной цепи ($\sim 0,7$ нм). Напротив, для димеров энергетически более выгодной является ориентация вдоль направ-

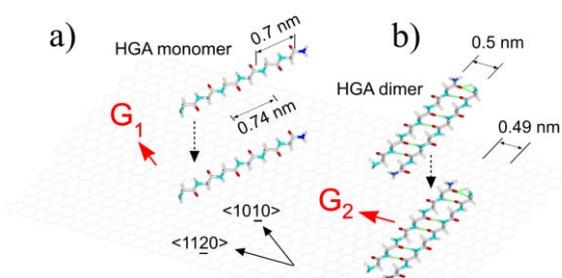


Рис. 3. Модель роста ламелей L1 и L2 из мономеров (a) и димеров (b) соответственно.

ления графита $\langle 1010 \rangle$, при которой имеется соразмерность в направлении *вдоль ламели* (периодичность графита 0,492 нм вдоль $\langle 1120 \rangle$ близка к оптимальному расстоянию $\sim 0,5$ нм между соседними молекулами в димере (и ламеле).

В дополнение к изложенному в [1] в данном докладе сообщается о новых АСМ наблюдениях: 1) структурные модели (рис. 2) прямо подтверждаются АСМ изображениями ультра-разрешения (рис. 4), полученными на высокоточном АСМ приборе Smart-SPM (AIST-NT), 2) наблюдаются новые ламеллярные структуры с периодичностью $\sim 3,7$ нм, соответствующей «полупторной» длине молекулы ГГА (рис. 5). Последний результат сви-

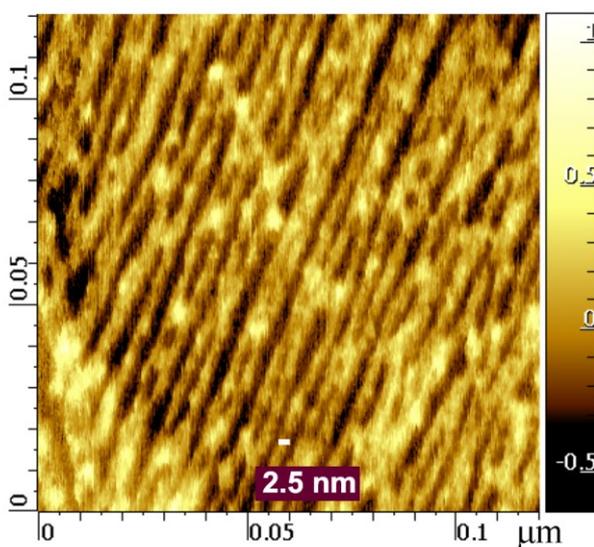


Рис. 4. АСМ изображение «элементарных» L2 ламелей с шириной 2,5 нм (длина молекулы ГГА), группирующихся в связки из 2–4 ламелей, наблюдающиеся как единые структуры при недостаточном латеральном разрешении.

детельствуют о том, что многообразие молекулярных упаковок в ламеллярных структу-

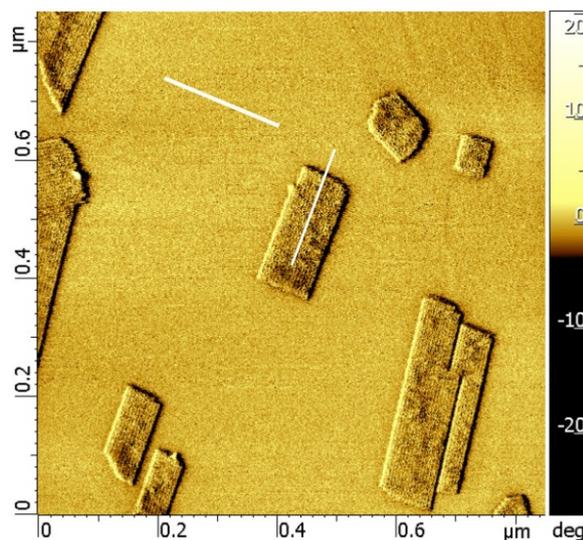


Рис. 5. АСМ фазовое изображение ламеллярных нанокристаллов ГГА с периодом $\sim 5,4$ нм в окружении монослоя ламелей с периодом $\sim 3,7$ нм. Ориентация ламелей в кристаллах – вдоль их длинных осей, в монослое – показана более жирной белой линией.

рах ГГА на графите моделями на рис. 2 не исчерпывается.

АСМ наблюдения ламеллярных структур ГГА на графите демонстрируют ряд новых черт, не наблюдавшихся при эпитаксии непептидных молекул: существование альтернативных молекулярных ориентаций, полидисперсность ширины ламелей L2, зависимость структур от концентрации раствора. В совокупности они свидетельствуют о структурно-богатой и до сих пор неисследованной области. Источником структурного многообразия является присущее олигопептидам свойство образовывать сети межмолекулярных водородных связей и несоответствие их кристаллических структур с решеткой графита. С практической точки зрения покрытие графита высокоупорядоченными олигопептидными монослоями может найти широкое применение для модификации и «биомодификации» поверхностных свойств как самого графита, так и карбоновых наноматериалов типа углеродных нанотрубок и графена.

Список литературы:

1. Prokhorov V.V., Klinov D.V., Chinarev A. A., Tuzikov A.B., Gorokhova I.V., Bovin N.V., "High-resolution Atomic Force Microscopy Study of Hexaglycyclamide Epitaxial Structures on Graphite" Langmuir, 2011, in press.

ПРИМЕНЕНИЕ АТОМНО-СИЛОВОЙ МИКРОСКОПИИ ДЛЯ ВИЗУАЛИЗАЦИИ ВНУТРЕННЕЙ СТРУКТУРЫ КЛЕТОК

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

Биологический факультет МГУ имени М.В. Ломоносова

annarosk@gmail.com

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

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

В работе было показано, что АСМ применима для изучения поверхности ультратонких срезов и блоков эпоксидной смолы, при этом обнаруживаются рельеф и неоднородность свойств на поверхности, которые соответствуют структуре биологического материала.

Предлагаемые методики визуализации были опробованы на образцах тканей животных (препараты печени и селезенки крыс), и растений (меристема корешка риса), а также на культуре (A549). Исследуемые объекты фиксировались, проходили процедуру обезвоживания, заливки в смолу и приготовления ультратонких срезов. После этого осуществлялось сканирование блоков или срезов

на АСМ. На поверхности блоков эпоксидной смолы с залитыми образцами с использованием различных режимов работы атомно-силового микроскопа были получены изображения субклеточных структур.

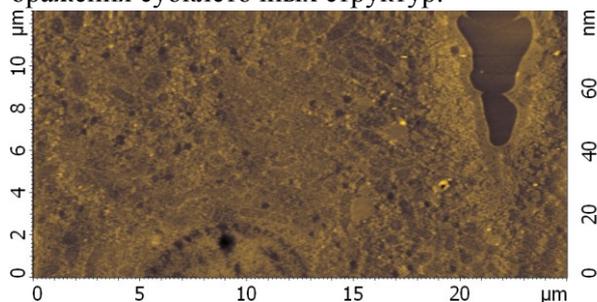


Рис. 1. Поверхность эпоксидного блока, препарат печени мыши.

Некоторые полученные изображения исследуемых образцов представлены на рис. 1 и 2. На рис. 1 представлено изображение поверхности блока эпоксидной смолы с тканью печени мыши, зафиксированной в нем. На изображении видна структура гепатоцита – фрагмент ядра и цитоплазмы, так же видны митохондрии, липосомы и вакуоли. В правой части изображения видна цитоплазма соседней клетки с органеллами, а немного сверху – кровеносный капилляр с фрагментами нескольких эритроцитов.

Другим объектом исследования являлся препарат меристемы корешка риса (рис. 2). При заливке препарата в эпоксидную смолу растительная ткань пропитывается хуже, чем животная, ввиду особенностей анатомического строения (наличия толстых клеточных стенок). На изображении видны клетки меристемы и хорошо различимые клеточные стенки, а так же ядра, располагающиеся в середине клеток.

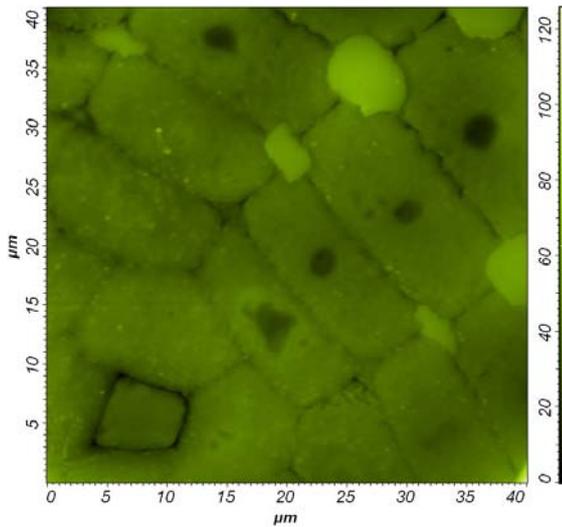


Рис. 2. Поверхность эпоксидного блока, препарат меристема корешка риса.

Измерения, проведенные на нескольких блоках, показывают, что наиболее заметными объектами всегда являются ядра и ядрышки: на топографических изображениях они выглядят как углубления до 100 нм, которые очень заметны на фоне относительно гладкой цитоплазмы.

На полученных изображениях видна структура клеток: ядерная оболочка и хроматин ядер, плазматическая мембрана, мембраны вакуолярной системы (аппарат Гольджи, везикулы), митохондрии (рис. 3) и другие органеллы. Было показано, что при использовании алмазного ножа поверхность для исследования получается более ровной, а рельеф – более информативным, чем при резке стеклянным ножом.

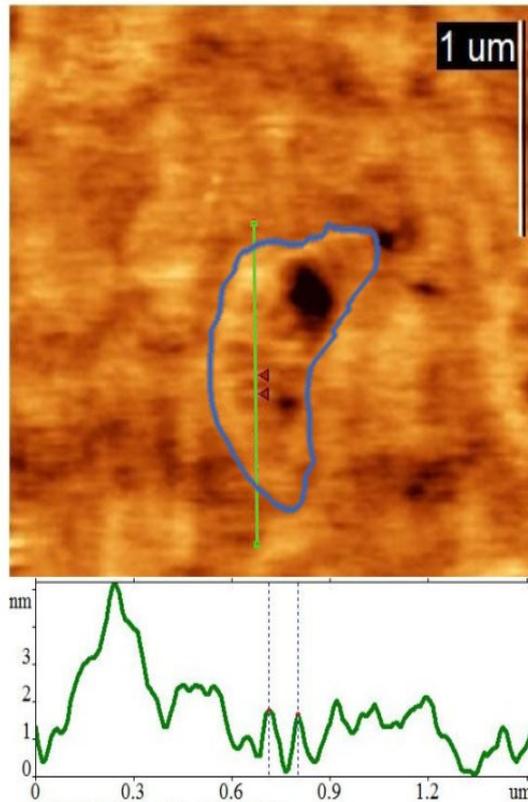


Рис. 2. Изображение митохондрии в препарате культуры клеток. Видны кристы, расстояние между ними около 100 нм.

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

АНАЛИЗ ДЗЕТА-ПОТЕНЦИАЛА КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА МЕТОДОМ ДИНАМИЧЕСКОГО РАССЕЯНИЯ СВЕТА

Д.В. Сайфуллина, И.И. Шахмаева, Т.И. Абдуллин
Казанский (Приволжский) федеральный университет
saifudivit@gmail.com

Мембрана животных клеток – многокомпонентная функциональная структура, образованная липидами, белками и их гликоконъюгатами. Важной характеристикой клеточных мембран является их поверхностный заряд, зависящий от биохимического состава мембранных компонентов и состояния клеток.

Перспективным методом анализа поверхностного заряда клеток является динамическое рассеяние света, ДРС (фотонная корреляционная спектроскопия).

Этот метод находит широкое применение для исследования клеточной стенки микроорганизмов [1].

Актуальной задачей представляется создание на основе ДРС способов характеристики состояния плазмалеммы клеток человека и животных, что представляет интерес для медицинской диагностики и клеточных биотехнологий.

Целью настоящей работы явился анализ поверхностного заряда клеток человека в норме и при индукции апоптоза методом ДРС на анализаторе Malvern Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments). Объектами исследования служили эритроциты человека и опухолевые культуры клеток HeLa и MCF-7.

Апоптоз клеток в суспензии индуцировали путем добавления 2 мМ дексаметазона или температурной обработки в ФСБ.

Установлено, что при pH 7 клетки HeLa, MCF-7 и эритроциты имеют отрицательный дзета-потенциал, который составляет около $-19,4 \pm 0,8$, $-20,9 \pm 0,4$ и $-31,8 \pm 1,1$ мВ соответственно (рис.1). Подобный отрицательный заряд клеток, вероятно, обусловлен присутствием фосфо- и гликолипидов в составе цитоплазматической мембраны клеток.

Более высокое значение дзета-потенциала эритроцитов, почти на 10 мВ, по сравнению с культивируемыми клетками можно объяснить наличием большого количества остатков сиаловой кислоты на поверхности эритроцитов [2].

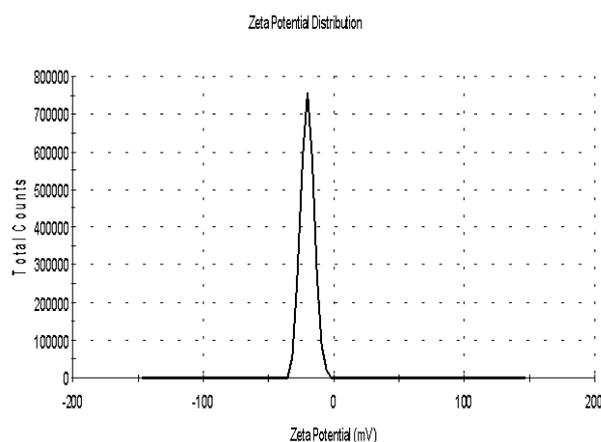


Рис. 1. Кривая распределения дзета-потенциала клеток HeLa, полученная на анализаторе Malvern Zetasizer Nano ZS.

По данным проточной цитометрии и флуоресцентной микроскопии, обработка клеток повреждающими факторами в условиях опыта сопровождалась уменьшением метаболической активности клеток, но не приводила к фрагментации ДНК. По данным ДРС в этих условиях происходило увеличение значений отрицательного дзета-потенциала исследуемых клеток. Это увеличение можно объяснить повышением содержания на внешнем липидном слое клеток фосфатидилсерина – раннего маркера апоптоза, который имеет большую плотность отрицательного заряда, чем фосфатидилхолин.

Результаты проведенного исследования свидетельствуют о перспективности применения метода динамического рассеяния света для анализа поверхностной структуры клеток человека и оценки их состояния в норме и при различных воздействиях.

Список литературы:

1. Wilson W.W., Wade M.M., Holman S.C., Champlin F.R., J. Microbiol. Meth., 43, 153–164 (2001).
2. Eylar E.H., Madoff M.A., Brody O.V., Oncley J.L. J.Biol. Chem., 6, 1992–2000 (1962).

ВЛИЯНИЕ НАНОЧАСТИЦ СЕРЕБРА НА МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ПАРАМЕТРЫ И СТРУКТУРНУЮ ЦЕЛОСТНОСТЬ МЕМБРАН ЭРИТРОЦИТОВ

А.С. Сарычева¹, А.И. Юсипович², Е.Ю. Паршина², Н.А. Браже²

¹МГУ имени М.В. Ломоносова, факультет наук о материалах

²МГУ имени М.В. Ломоносова, биологический факультет

assergevna@gmail.com

Одним из актуальных направлений современной науки является создание подходов для усиления сигнала комбинационного рассеяния света, регистрируемого от живых клеток. На кафедре биофизики биологического факультета разработан подход, позволяющий получать сигнал гигантского комбинационного рассеяния (ГКР) от интактных эритроцитов [1]. В то же время известно, что коллоидные частицы благородных металлов, ввиду своей реакционной способности, могут вызывать повреждение мембран живых клеток. Целью данной работы является определение характера влияния наночастиц серебра на эритроциты млекопитающих.

В ходе работы, по методу, описанному в [2] были получены коллоидные растворы серебра, различающиеся по размеру частиц. Оценку диаметра наночастиц серебра проводили методом динамического светорассеяния (Zetasizer Nano ZS, Malvern). Полученные коллоидные растворы различались по положению максимума плазмонного резонанса и коэффициенту усиления сигнала комбинационного рассеяния от целых эритроцитов. Так же была измерена цитотоксичность полученных коллоидных растворов серебра, а именно доля разрушившихся эритроцитов в образце с коллоидным раствором и в его отсутствии. Обнаружено, что степень гемолиза зависит от диаметра наночастиц серебра.

Для оценки влияния наночастиц серебра на структуру эритроцитов были получены изображения эритроцитов методом лазерной интерференционной микроскопии. Были оценены площадь поверхности, средняя фазовая высота и распределение вещества. Показано, что присутствие в среде инкубации наночастиц серебра не оказывает существенного влияния на морфологические параметры эритроцитов.

Для исследования локализации наночастиц серебра на поверхности эритроцитов были получены изображения фиксированных эритроцитов методами атомно-силовой и конфокальной микроскопии в присутствии коллоидных растворов серебра. АСМ и кон-

фокальные изображения получены с использованием Зондовой нанолaborатории NTEGRA SPECTRA (НТ-МДТ, Россия).

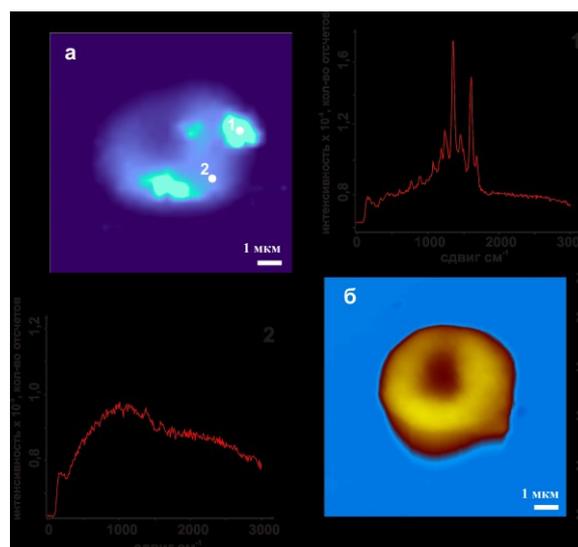


Рис. 1. Конфокальное изображение (а) и изображение полученное методом атомно-силовой микроскопии (б) эритроцита человека с коллоидами серебра. Точками отмечены спектр комбинационного рассеяния агрегатов наночастиц (1) и спектр комбинационного рассеяния от эритроцита (2).

На конфокальном изображении эритроцита видны участки, имеющие характерную для агрегатов наночастиц серебра форму спектра. Видно, что наночастицы серебра образуют агрегаты на поверхности мембраны эритроцитов и, таким образом, могут вызывать усиление сигнала комбинационного светорассеяния примембранного гемоглобина. На атомно-силовом изображении не зарегистрировано повреждений мембраны в области локализации наночастиц.

Список литературы:

1. Brazhe N.A., Abdali S., Brazhe A.R., Luneva O.G., Bryzgalova N.Y., Parshina E.Y., Sosnovtseva O.V., Maksimov G.V. *Biophysical Journal* V. 97, P. 3206–3214 (2009).
2. Leopold, N., Lendl B. *J. Phys. Chem.*, B 107, P.5723–5727 (2003).

ИССЛЕДОВАНИЕ ПОВЕДЕНИЯ И ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ПРИ IN VITRO ТРАНСПЛАНТАЦИИ В 3D КУЛЬТУРУ СЕТЧАТКИ

С.А. Сергеев, Ю.В. Храмова, Ю.М. Ефремов

МГУ имени М.В. Ломоносова

embryossa@gmail.com

Одним из наиболее интенсивно развивающихся и перспективных направлений восстановления сетчатой оболочки глаза после травмы является трансплантация стволовых и прогениторных клеток. Возможность направленной и контролируемой дифференцировки стволовых клеток является одной из актуальных задач современной биологии развития. Накопленные к настоящему времени данные по решающему значению микроокружения для дальнейшего развития трансплантированных стволовых клеток позволили применить принципиально новые подходы для их терапевтического введения.

Однако вопросы функционального замещения утраченных нейронов сетчатки трансплантированными клетками остаются открыты. Применение методов атомно-силовой микроскопии и органотипического культивирования позволяет детально описать морфологические преобразования, происходящие с клетками, введенными в ткань реципиента, проследить их пути миграции и оценить перспективность применения в регенеративной медицине.

Культивирование сетчатки проводили в виде эксплантатов в стандартных условиях в среде DMEM/F12 с 20 нг/мл FGF и EGF, 7% FCS, гепарином, добавками B12 и N2. Для трансплантации использовали EGFP+ клетки стромы костного мозга (ММСК) 4-го пассажа, нейрональные стволовые/прогениторные клетки (НСПК), вводимые стеклянным микрокапилляром в концентрации 1000–3000 клеток в 0,1 мкл среды под контролем микроманипуляторов Nareshige.

Для повреждения сетчатки использовали инфракрасный лазер (1480 nm) Zilos-tkTM (Hamilton Thorne) мощностью 300 мВ. Выбирали квадрат со стороной 100 мкм средней области разрастания края эксплантата сетчатки. Повреждение сетчатки проводили 15-ю импульсами лазера длительностью 1000–3000 мс на 14 сутки культивирования.

АСМ-изображения были получены на микроскопе Solver BIO Olympus (НТ-МДТ, Россия), с полем сканирования 100x100x7 мкм³ и системой емкостных дат-

чиков. С помощью совмещенного с прибором инвертированного оптического микроскопа осуществлялся подвод кантилевера к образцу, установка места сканирования. Сканы 256x256 точек, скорость сканирования подбиралась для получения оптимального результата (0,3–1,5 Гц). Размер скана от 20x20 до 90x90 мкм². Изображения были обработаны средствами программы Nova (НТ-МДТ, Россия).

При нанесении на поверхность эксплантата сетчатки НСПК практически отсутствовала их миграционная активность и процессы нейрональной дифференцировки. В популяции трансплантированных клеток присутствовали лишь единичные β -III-тубулин позитивные клетки. Это объясняет незначительный терапевтический эффект трансплантированных НСПК в клинической практике при супрахориоидальной или ретробульбарной инъекции. При инъекции НСПК вглубь слоев нейросетчатки трансплантированные клетки активно мигрировали и изменяли свою морфологию, выпускали длинные ветвящиеся отростки, приобретали фенотип, характерный для нейронов. При достижении зоны повреждения наблюдалась остановка миграции клеток, отмечено образование ими ассинаптических дендритов, распространяющихся во всех плоскостях, и агрегация трансплантированных клеток друг с другом. Пришедшие в поврежденную область клетки оставались в ней на протяжении всего времени эксперимента и полностью утрачивали миграционную активность, образуя густую сеть нейритов. Первые клетки, пришедшие в зону воздействия лазера, детектировали спустя 1 час после трансплантации при введении их на расстоянии 100 мкм, через 12 часов – при инъекции на удалении в 500 мкм и через 3–5 суток – при дальних областях трансплантации (>1000 мкм). Наиболее активное привлечение клеток в поврежденную область происходило на протяжении первых 3-х суток после создания дефекта сетчатки и резко угасало в последующие. При исследовании распределения трансплантированных НСПК в эксплантате с несколькими зонами лазерного

повреждения, находящимися на различном расстоянии от места инъекции (600 мкм, 1000 мкм, 3000 мкм), было показано заселение трансплантированными клетками всех зон повреждения через 7 суток после инъекции. Однако было отмечено уменьшение количества клеток в зонах повреждения по мере их удаления от области введения. При удалении зоны повреждения от зоны введения клеток на 1000 мкм клеточная популяция, детектируемая в поле зрения, включающем поврежденный лазером участок, составляла 56% от количества клеток зоны, удаленной на 600 мкм и 27% – в зоне, удаленной на 3000 мкм от места трансплантации.

В отличие от НСПК, способ введения ММСК не влиял на активность миграции трансплантируемых клеток. Как при нанесении на поверхность, так и при инъекции вглубь эксплантата, ММСК мигрировали по всем направлениям от места введения в течение первых суток. С началом дифференцировки клеток их миграция останавливалась, что позволяет говорить о важности первых часов после трансплантации для миграции введенных клеток, занятия ими новых ниш, пролиферации и дифференцировки с последующей возможностью репарации дефектов. При трансплантации ММСК движение клеток не было аттрагировано к области травмы сетчатки. В то же время, при нанесении повреждения эксплантату, ММСК быстрее изменяли свою морфологию по сравнению с введенными клетками в контрольные образцы, не подверженные воздействию лазера. В данной серии экспериментов морфологические изменения ММСК детектировали спустя 24 часа после инъекции, в то время как в контроле лишь через трое суток. Эти данные позволяют сделать предположение, что для морфологической дифференцировки трансплантированных клеток, отвечающей условиям их нового микроокружения, чрезвычайно важны регуляторные факторы, высвобождающиеся при гибели клеток в районе нанесения повреждения.

При помощи методов АСМ было показано морфологическое преобразование трансплантированных ММСК в клетки с нейрональным фенотипом, их активная миграция до 3-х суток после инъекции и образование биполярных и мультиполярных нейритоподобных выростов. Выселению клеток из эксплантата сетчатки предшествовало образование ламеллоподиальных выростов (средняя длина $10,1 \pm 2,0$ мкм, средний диаметр $3,7 \pm 0,5$ мкм). К 7 суткам культивирования

наблюдалось увеличение их протяженности (средняя длина $21,7 \pm 5,0$ мкм, средний диаметр $0,78 \pm 0,23$ мкм). По поверхности глиальных и эндотелиальных клеток происходило распространение нейритоподобных отростков ММСК, которые достигали нескольких миллиметров в длину и до 0,47 мкм в диаметре. Показано достоверное отличие ($p < 0,01$) в величине отростков, формируемых глиальными и эндотелиальными компонентами сетчатки и высотами отростков нейронов и трансплантированных ММСК. Показано отсутствие достоверных отличий ($p = 0,52$) в средней квадратичной шероховатости поверхности трансплантированных ММСК, изменивших свою морфологию на нейроноподобную и нейронов сетчатки, а также отсутствие достоверных отличий ($p = 0,26$) при сравнении асимметрии распределения отростков трансплантированных клеток и нейронов эксплантата сетчатки. Не удалось выявить достоверных различий и в размахе высот отростков между ММСК и нейронами сетчатки при наличии достоверных различий ($p < 0,01$) высот отростков этих клеток с высотами отростков глиальных и эндотелиальных клеток сетчатки. Получены АСМ-изображения синаптических расширений, формируемых трансплантированными ММСК на концах нейритоподобных выростов. Так же прослежено взаимодействие между такими синапсами и клетками эксплантата. С применением красителя Di-I было показано, что слияние трансплантированных ММСК и клеток сетчатки не происходило. Кроме того при применении потенциалчувствительного красителя удалось выявить возможность изменения потенциала мембраны некоторых трансплантированных ММСК, изменивших свою морфологию в ответ на внешнее раздражение. Однако таких клеток было выявлено всего около 0,01% после трансплантации.

Таким образом, полученные данные позволяют говорить о наличии истинных процессов трансдифференцировки и морфологическом преобразовании ММСК в нейроноподобные клетки, способные к установлению взаимосвязей с клетками сетчатки, и в некоторых случаях функциональному встраиванию в имеющиеся нервные сети, что делает этот тип клеток перспективным для терапии нейродегенеративных заболеваний сетчатки.

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

ЛОКАЛЬНОЕ АНОДНОЕ ОКИСЛЕНИЕ УГЛЕРОДНЫХ МАТЕРИАЛОВ – НОВЫЙ ПУТЬ К СОЗДАНИЮ НАНОСТРУКТУР

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

Учреждение Российской Академии наук

Институт элементоорганических соединений им. А.Н. Несмеянова РАН;

МГУ имени М.В.Ломоносова;

Центр перспективных технологий

sinitsyna@gmail.com



Рис. 1. Название института, выгравированное на графите методом локального анодного окисления. Изображение получено с помощью атомно-силового микроскопа «ФемтоСкан».

Новые углеродные материалы (углеродные нанотрубки, графен, тонкие пленки графита) демонстрируют уникальные физические и химические свойства. Спектр потенциальных применений этих материалов обширен: наноэлектромеханические системы, сенсоры, элементы наноэлектроники, гибкие дисплеи и др. Среди методов наноструктурирования углеродных материалов особенно перспективно локальное анодное окисление, в котором используется сканирующий туннельный или атомно-силовой микроскоп. Между зондом и поверхностью подается напряжение, поверхность является анодом. Литография для углеродных материалов с sp^2 -гибридизацией может проводиться в двух режимах. В первом режиме атомы углерода поверхности окисляются до газообразных оксидов, а на поверхности образуются углубления. Во втором режиме в области под зондом формируется структура оксида графена или оксида графита в случае нескольких углеродных слоев (рис. 1).

Стандартные зонды для атомно-силовой микроскопии с металлическим покрытием позволяют проводить окисление в первом режиме. Для проведения литографии с обра-

зованием структур из оксида графита авторами работы предложена новая конструкция зонда [1-3]. Показано, что скорость формирования оксида графита зависит от ряда параметров: напряжения, скорости движения зонда, формы острия, относительной влажности воздуха (эксперименты выполнены на поверхности высокоориентированного пиролитического графита производства «Атомграф-кристалл»). Проведен поиск условий, при которых возможно формирование оксида графита с помощью сканирующего туннельного микроскопа. Обнаружена область напряжений, в которой формируются единичные бугорки на поверхности графита. Верхняя граница области соответствует напряжению начала образования полостей на поверхности графита. В процессе литографии напряжение может быть понижено, при этом также образуются полости. При напряжении меньшем, чем нижняя граница выше указанной области, окисление поверхности графита останавливается.

Работа авторов поддержана Министерством образования и науки Российской Федерации (госконтракт №14.740.11.0906), НАТО (программа «Наука для мира» грант CBN.NR.NRSFP 983204), грантом FP7 №257511 (проект EU-RU.NET), Фондом содействия развитию малых форм предприятий в научно-технической сфере (программа УМНИК).

Список литературы:

1. Мешков Г.Б., Синицына О.В., Яминский И.В. Патент на изобретение «Зонд для локального анодного окисления материалов» №2383078, 27.02.2010, бюл. № 6.
2. Мешков Г.Б., Синицына О.В., Яминский И.В. Патент на полезную модель «Зонд для локального анодного окисления материалов (Варианты)» №86342, 27.08.2009, бюл. № 24.
3. Sinitsyna O.V., Meshkov G.B., Yaminsky I.V. A novel tool for the local anodic oxidation of graphite. Proc. IMechE, Part N: J. Nanoengineering and Nanosystems, 224(N3-4), p.133-138 (2010).

АТОМНО-СИЛОВАЯ МИКРОСКОПИЯ ДЛЯ ОЦЕНКИ ВЛИЯНИЯ ФИКСИРОВАНИЯ И ОКРАШИВАНИЯ КЛЕТОК

О.В. Стеряков¹, О.А. Коновалова¹, Л.И. Анчикова², И.Х. Валеева³

¹Казанский (Приволжский) Федеральный университет

²Казанская государственная медицинская академия Росздрава

³Казанский государственный медицинский университет

olga.konvalova@bk.ru

При подготовке биологических объектов к микроскопическим исследованиям к клеткам, находящимся в естественном физиологическом состоянии, применяются различные способы фиксации и окраски. Задачей настоящего исследования явилось сравнение методами атомно-силовой микроскопии морфологических характеристик клеток тимуса мыши, фиксированных и окрашенных общепринятыми методами, и нефиксированных никакими препаратами.

При этом соблюдались все требования Хельсинкской декларации по гуманному обращению с животными (1975, 1993), Директивы Совета Европейского Сообщества по защите животных, используемых в экспериментальных и других научных целях (1986).

Визуализацию тимоцитов на поверхности покровного стекла выполняли на атомно-силовом микроскопе Solver P47H, сканер 50×50 мкм (НТ-МДТ, Россия). Сканирование осуществляли на воздухе при комнатной температуре в полуконтактном режиме кремниевыми кантилеверами NSG11 и в контактном режиме кремниевыми кантилеверами CSG11 с радиусом закругления острия 10 нм (НТ-МДТ, Россия). Сканирование проводилось с разрешением 512×512 точек. Силу адгезии и модуля Юнга измеряли методом силовой спектроскопии. Структура поверхности клеточной мембраны тимоцитов анализировалась, используя феноменологические параметры: параметры шероховатости, параметр перепада высот и энтропию [1].

Выделенные клетки тимуса наносили на предметное стекло и инкубировали во влажной среде при 20°C 10–15 мин. За это время происходила спонтанная адгезия тимоцитов к стеклянной подложке. Фиксация клеток осуществлялась 2,5%, 1%, 0,6% глутаровым альдегидом, метанолом в течение 2 мин и смесью этилового спирта с эфиром (1:1) в течение 10 мин. Окраска образцов производилась по Рамановскому-Гимза 1 мин. Затем образец тщательно отмывали и высушивали при 20°C.

Сканирование клеточной поверхности не фиксированных тимоцитов в полуконтактном

режиме позволяет визуализировать некоторые детали внутреннего строения клетки. На изображении можно различить расположенные под мембраной элементы цитоскелета и ядро (рис. 1а). Исследование показало, что основные параметры тимоцитов в нефиксированных препаратах значительно и достоверно отличаются от фиксированных аналогов. Параметры шероховатости и перепада высот в 3–4 раза выше, а высота клеток в 3–6 раз больше у фиксированных тимоцитов в отличие от характеристик тимоцитов без применения фиксации.

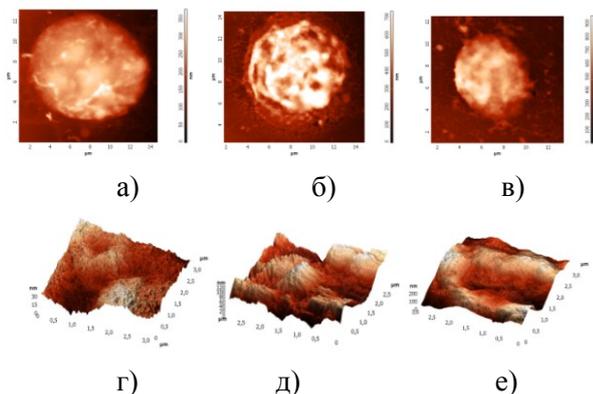


Рис. 1 АСМ-изображения тимоцитов а) не фиксированных б) фиксированных 0,6% глутаровым альдегидом, в) фиксированных метанолом. Изображения мембраны тимоцитов: г) не фиксированных, д) фиксированных 0,6% глутаровым альдегидом, е) фиксированных метанолом.

Окрашивание клеток незначительно сказывалось на феноменологических параметрах мембраны клеток, кроме тимоцитов, фиксированных 0,6% глутаровым альдегидом, у которого все параметры при окрашивании увеличивались более чем в два раза.

Данные силовой спектроскопии также показали различия в силах адгезии между зондом и поверхностью тимоцитов, фиксированных и окрашенных, и нефиксированных.

Список литературы:

1. Арутюнов П.А., Толстихина А.Л., Демидов В.Н., Микроэлектроника, 26, 426–439 (1998)

СОВРЕМЕННЫЕ МЕТОДЫ СЗМ. НОВЫЕ РАЗРАБОТКИ НТ-МДТ

А.А. Тихомиров, В.А. Быков

Группа компаний «НТ-МДТ»

spm@ntmdt.ru

В настоящее время во всем мире наблюдается рост научного интереса к нанотехнологии, что делает необходимым и оправданным разработку новых исследовательских инструментов и контрольно-измерительного оборудования, позволяющего регистрировать процессы с субмолекулярным уровнем пространственного разрешения, формировать и контролировать свойства наноструктур.

В результате проведенных научных исследований стала очевидной необходимость применения нанометрологии и в промышленности для контроля качества новых материалов, качества обработки поверхностей, в особенности в таких областях, как микро и нанoeлектроника. Современные методы медицинской диагностики в свою очередь требуют создания приборов для контроля ДНК, РНК, распознавания белков и вирусов, контроля состояния и реакций живых клеток конкретных организмов на различные химические вещества, в том числе лекарства.

Реальность нанотехнологии – одной из образующих технологий современности – ощущается в появлении новых материалов, компьютеров, лекарств. Производства в свою очередь требуют новой метрики, а следовательно разработки и утверждения стандартов, тестовых структур специальных приборов на которых можно производить контрольные измерения и поверки.

Внедрение нанотехнологии в промышленность требует подготовки соответствующих специалистов, для чего необходимо введение соответствующих курсов и специальностей как в ВУЗах, так и профессиональных училищах, а в недалеком будущем и в общеобразовательных школах. Это требует разработки соответствующего оборудования для лабораторий, виртуальных приборов, учебников, курсов лабораторных работ.

К настоящему времени в России уже созданы более 120 классов при университетах и колледжах, оборудованных специальными приборами, Наноэдыкаторами, которые позволили вести практические занятия со студентами и школьниками физико-математических школ. Создано уже второе поколение этих приборов – низкобюджет-

ных, но высококачественных зондовых микроскопов, на которых можно параллельно с обучением вести и научные работы по исследованию наноматериалов с разрешением вплоть до атомарного.



Рис. 1. Сканирующий зондовый микроскоп Наноэдыкатор II.

Разработаны курсы лабораторных работ, учебники. Введены специальности Нанoeлектроника, Наноматериалы.

Расширение областей применения потребовало создание автоматизированных сканирующих зондовых микроскопов со встроенными алгоритмами, обеспечивающими возможность работы на них специалистов-материаловедов.

Для исследовательских целей простые зондовые микроскопы перестали обеспечивать уровень. Потребовалась разработка систем, интегрирующих внутри себя целые группы методов. Это так называемые Наноллабы. Этот класс приборов позволяет наряду с данными СЗМ получать информацию о молекулярном составе поверхности и объема, реконструировать трехмерное распределение физических свойств объектов с нанометровым разрешением, изучать кинетику изменения состояний отдельных молекулярных фрагментов и кластеров в широком интервале температур, осуществлять автоматическую диагностику большого ансамбля объектов.

ТРАКТОВКА ДАННЫХ АТОМНО-СИЛОВОЙ МИКРОСКОПИИ МЕТОДОМ МОЛЕКУЛЯРНОЙ ДИНАМИКИ

А.П. Толстова, А.Д. Протопопова, И.В. Оферкин, Е.Г. Завьялова, М.Г. Годзи
МГУ имени М.В. Ломоносова
solly8@mail.ru

Одна из актуальных задач современной биофизики – изучение конформационных особенностей адсорбированных белковых структур в условиях *in vitro*. Существующие экспериментальные методы не в состоянии разрешить структуру адсорбированного биополимера с требуемой точностью. На сегодняшний день атомно-силовая микроскопия (АСМ) представляется наиболее перспективным для улучшения методом с точки зрения разрешения адсорбированных конформаций белков [1, 2, 3]. Для уточнения данных АСМ было предложено использовать данные компьютерного моделирования.

В качестве объектов эксперимента были выбраны белки лизоцим и фибриноген. Для начала были получены четкие изображения мономеров лизоцима в АСМ на слюде в дистиллированной воде, при нейтральном pH. Затем методами молекулярной динамики была построена модель адсорбции молекулы лизоцима на поверхность оксида кремния (моделировал слюду) в программе NAMD и силовом поле CHARMM [4]. По результатам моделирования была построена модель АСМ-изображения белка. Компьютерное и реальное АСМ-изображения сравнивались.

Далее был проведен эксперимент с белком фибриногеном: были получены четкие изображения фибриногена, адсорбированного на поверхности слюды и слюды, обработанной гексаметилдисилазаном (ГМДС) (рис. 1.); были построены модели адсорбции белка на эти подложки в воде, вакууме, и в процессе высыхания (рис. 2).

Исследования конформационных преобразований фибриногена имеют научный интерес, поскольку этот белок участвует в процессе образования фибриновых сгустков в крови, информация о характере адсорбции молекул фибриногена на поверхности разного рода важна, например, в имплантологии.

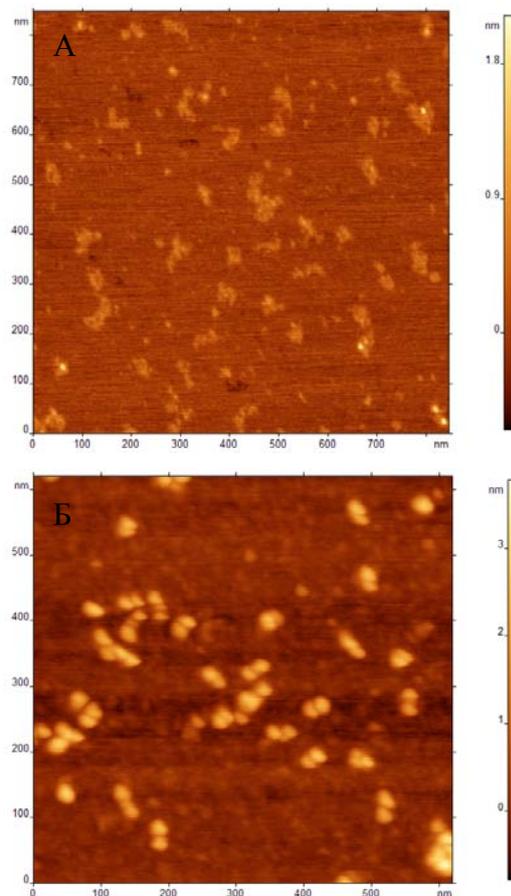


Рис. 1. АСМ-изображения фибриногена на поверхности ГМДС (А) и слюды (Б).

Особенность используемых подложек в том, что на слюде фибриноген находится в компактной форме, концевые домены в виде глобул. На ГМДС фибриноген частично теряет третичную структуру, разворачиваясь и взаимодействуя с поверхностью подложки максимальной площадью. Из рис. 1 видно, что на гидрофильной поверхности белок сохраняет гантелеобразную форму, тогда как на гидрофобной происходит его частичная деградация и, таким образом, уплощение. При этом высоты единичных молекул на этих подложках различались в среднем в 2 раза (на гидрофобной подложке фибриноген на 45% ниже). В моделях было получено расхождение конечных конформаций концевых доменов в зависимости от подложки (рис. 2).

Тем не менее, существенной деградации третичной структуры белка замечено не было, что говорит о медленной скорости этого процесса.

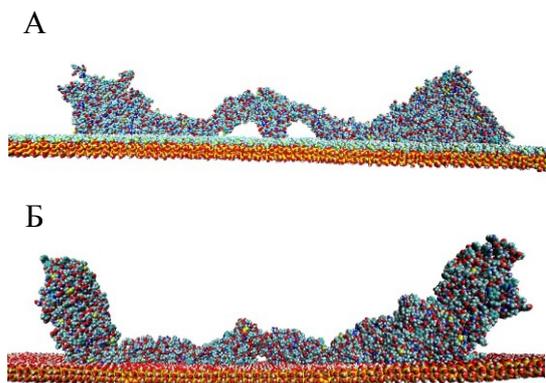


Рис. 2. Конечные конформации фибриногена в модели на ГМДС (А) и слюде (Б).

Как видно из рисунка 2, характер взаимодействия белка с поверхностью существенно меняется в зависимости от вида поверхности, несмотря на то, что адсорбция происходит в обоих случаях. Можно выделить гидрофобные и гидрофильные домены, а также оценить высоты объектов. Для этого, как и в работе с лизоцимом, было построено модельное АСМ-изображение фибриногена. Разница в высотах фибриногена на разных подложках составила 27%. Это несколько меньше, чем в эксперименте, однако, в модели не учитывалось приминание образца зондом в процессе сканирования, что вносит свои искажения в высоты.

Тем не менее, полученные в модели количественные данные подтверждаются многочисленными публикациями по АСМ, одновременно дополняя их [5,6,7].

В перспективе предложенный метод может открыть следующие возможности:

1. получение дополнительных данных о структуре исследуемого биополимера:

- соотношение и природа сил, действующих на зонд;
- аминокислоты, связанные с подложкой;
- сила связи биополимера с подложкой;

2. свойства биополимера в растворе (размеры, заряд, функциональная активность);

3. возможность проведения исследований конформационных преобразований биополимеров *in vitro*;

4. существенное улучшение точности зондовой микроскопии.

Проблема зондовой микроскопии состоит в неполной объективности получаемых данных. Проблема компьютерных моделей – в обилии аппроксимаций, их ограниченной применимости, однако поскольку в качестве исходных данных моделирования используются высокоточные экспериментальные данные ЯМР и РСА, то соединение этих двух методов даст уверенное, неиллюзорное понимание молекулярных процессов, происходящих в биополимерах.

Список литературы:

1. Matsko N.B. Ultramicroscopy. – 2007, № 107 (2-3). – С. 95–105.
2. Schneider S.W., LaMermer J., Henderson R.M., Oberleithner H. Pflugers Archiv European Journal of Physiology. – 1998, № 435 (3), – С. 362–367.
3. Kiselyova O.I., Galyamov M.O., Nasion N.S., Yaminsky I.V., Karpova O.V., Novikov V.K. Frontiers of Multifunctional Nanosystems (Eds. Buzanaeva E.V., Scharff P. – Kluwer Academic Publishers, Dordrecht). – 2002, – С. 321–330
4. M. G. Godsie, A. P. Tolstova, and I. V. Oferkin. Biophysics 55(3) (2010) pp. 370–376.
5. D. J. Taatjes, A. S. Quinn, R. J. Jenny, P. Hale, E. G. Bovill, J. McDonagh, Cell Biol. Int. 21 (1997) 715–726.
6. R. E. Marchant, M. D. Barb, J. R. Shainoff, S. J. Eppell, D. L. Wilson, C.A. Siedlecki, Thromb. Haemost. 77 (1997) 1048–1051.
7. A. Agnihotri, C. A. Siedlecki, Langmuir 20 (2004) 8846–8852.

ИЗУЧЕНИЕ СВОЙСТВ ИСКУССТВЕННЫХ ВИРУСНЫХ ЧАСТИЦ

Е.А. Трифонова, Н.А. Никитин, О.В. Карпова
Биологический факультет МГУ имени М.В. Ломоносова
katecat88@mail.ru

Ранее нами был описан новый тип искусственных вирусных частиц сферической формы (СЧ), полученных путем термической обработки вируса табачной мозаики (ВТМ) [1]. Нагревание раствора ВТМ до 94–98°C сопровождается денатурацией и структурной перестройкой белка оболочки ВТМ, что приводит к формированию СЧ, размер которых лежит в пределах от 50 нм и выше и зависит от концентрации вирусного препарата. Так, средний диаметр СЧ, образуемых нативным ВТМ при концентрации 0,1, 1 и 10 мг/мл, составляет, соответственно, 50–160, 100–350 и 250–800 нм.

Показано, что СЧ являются высоко стабильными: их размер и форма остаются неизменными при хранении при 4°C в течение года, после осаждения СЧ при центрифугировании (10 000 g), при повторном нагревании до 98°C и при циклах заморозки-разморозки.

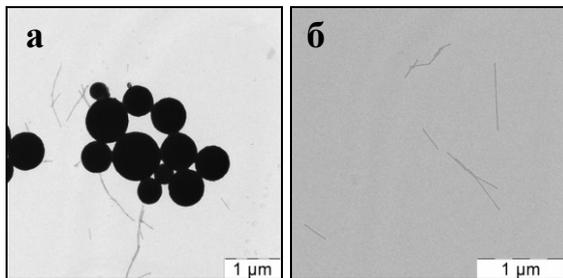


Рис. 1. Микрофотографии смеси СЧ и нативного ВТМ до (а) и после (б) обработки протеиназой К. Просвечивающая электронная микроскопия, контрастирование 2% уранил ацетатом.

Результаты экспериментов свидетельствуют о том, что структурные перестройки белка оболочки в ходе термической денатурации ВТМ делали белковые молекулы чувствительными к протеолитическому расщеплению. В данной работе была изучена возможность биodeградации СЧ в присутствии протеиназы К. В качестве контроля использовали вирионы ВТМ, устойчивые к протеолитическому расщеплению. В результате об-

работки смеси СЧ и нативного ВТМ (рис. 1а) протеиназой К произошел селективный протеолиз СЧ, в то время как частицы ВТМ не подверглись воздействию фермента (рис. 1б).

С помощью методов иммунофлуоресцентной и иммуноэлектронной микроскопии были изучены антигенные свойства СЧ (рис. 2 а,б).

Обнаружены высокие адсорбционные свойства СЧ. Показано, что на 50 мкг СЧ с диаметром 500 нм может быть адсорбировано до 10 мкг модельного белка. В качестве модельного белка использовался бычий сывороточный альбумин или белок оболочки Х-вируса картофеля.

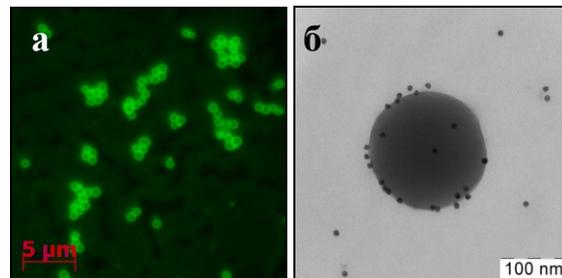


Рис. 2. Изучение антигенных свойств искусственных вирусных частиц. (а) иммунофлуоресцентная микроскопия с использованием вторичных антител, конъюгированных с флуорофором Alexa 488, и (б) иммуноэлектронная микроскопия с использованием частиц коллоидного золота размером 12 нм.

Способность к эффективной адсорбции белковых молекул, а также возможность к биodeградации протеолитическими ферментами позволяют рассматривать искусственные вирусные частицы как перспективные платформы для презентации целевых биологически активных веществ, в том числе антигенов и антигенных детерминант различных патогенов

Список литературы:

1. Atabekov J., Nikitin N., Arkhipenko M., Chirkov S., Karpova O. J. Gen. Virol., V. 92, P. 453–456 (2011).

AFM INVESTIGATION OF MYCOPLASMA GALLISEPTICUM S6 CELLS CULTIVATED IN DIFFERENT GROWTH CONDITIONS

M.V. Trushin^{1,2}, V.M. Chernov², O.A. Konovalova¹,

A.A. Mouzykantov², O.A. Chernova²

¹Kazan Federal University,

²Kazan Institute of Biochemistry and Biophysics, Russian Academy of Sciences

mtrushin@mail.ru

Mycoplasma gallisepticum is a widely distributed causative agent for respiratory diseases of poultry. Poultry infection with this mycoplasma may also mediate pathology and death of embryos as well as contamination of vaccines developed on their base. It was recently reported on some features of *M. gallisepticum* S6 adaptation [1, 2]: this process was connected with alterations in morphophysiology, ultrastructure, DNA topology, protein expression and pathogenicity. The aim of the present study was to investigate *M. gallisepticum* S6 cells cultivated in different growth conditions using atomic force microscopy. To prepare samples for AFM studies, 1 mL of the corresponding *M. gallisepticum* S6 cells were centrifuged at 12000 rpm for 20 min at room temperature. The pellet was resuspended in 1 mL of PBSx1 (pH=7.2). Then, cells were again centrifuged at 12000 rpm for 15 min at room temperature and repeatedly resuspended in 0.5 mL of the same buffer. The prepared cells (5 μ L) were placed onto the mica (Advanced Technologies Center, Moscow, Russia) with removed upper layer. Cells were dried at air and then were rinsed twice with redistilled water, and after each rinsing the samples were dried in air in both instances. AFM imaging was performed with Solver P47H atomic force microscope (NT-MDT, Moscow, Russia) operating in the tapping mode using fpN11S cantilevers ($r \leq 10$ nm, Advanced Technologies Center, Moscow, Russia). The height, Mag (signal from lock-in amplifier), RMS (signal from RMS detector) and Phase (signal from the phase detector) were performed with the Nova 1.0.26 RC1 software (NT-MDT, Moscow, Russia). The scan rate was 1 Hz. Image resolution was 512 x 512.

We imaged hundreds of individual mycoplasma cells cultivated *in vitro*. For the first time, it was found that cultivation of these mycoplasma cells in unfavorable growth conditions resulted in intensive appearance of nanostructures with diameter of 20–70 nm (Fig. 1) similar to membrane vesicles (MV) mediating in bacteria protein secretion, intercellular interactions and pathogenesis [3].

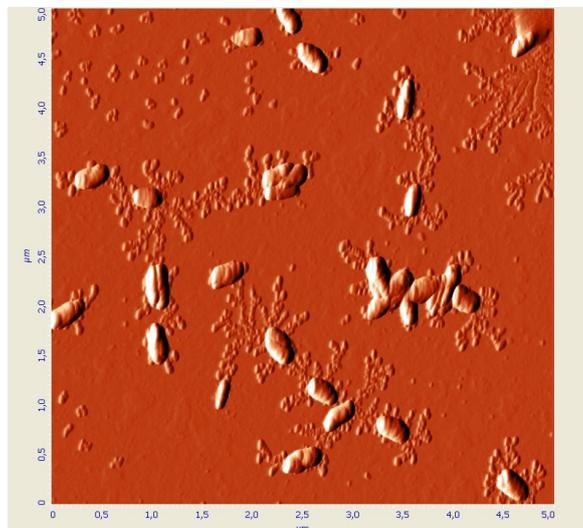


Fig. 1. AFM image (5x5 μ m scan area) of typical cells and MV-like formations of *M. gallisepticum* S6 (signal from lock-in amplifier). Typical mycoplasma cells (large ones) are surrounded with nanostructures similar to MV of bacteria.

This work was supported by the grants of the President of Russian Federation (MK-3372.2009.4 and MK-4894.2010.4), grant of the Russian Fund for Basic Research (Project #11-04-01406a), Scientific School (Project #6992.2010.4, Head – Academician A.N. Grechkin), and Government contract #02.740.11.0391.

References:

1. Chernov VM, Chernova OA, Gorshkov OV, Muzykantov AA, Shaimardanova GF, Pelnikevich AD, Margulis AB, Kolpakov AI, Ilinskaya ON. *Mikrobiologiya* 77, 777-781 (2008).
2. Chernova OA, Trushin MV, Mouzykantov AA, Chernov VM. *TheScientificWorldJOURNAL* 8, 1104-1110 (2008).
3. Lee EY, Choi DS, Kim KP, Gho YS. *Mass Spectrom Rev.* 27, 535-55 (2008).

КОМПЛЕКСНЫЙ АНАЛИЗ СТРУКТУРЫ ПЛЕНОК ПОЛИВИНИЛОВОГО СПИРТА, МОДИФИЦИРОВАННОГО N-ВИНИЛПИРРОЛИДОМ СОВРЕМЕННЫМИ МИКРОСКОПИЧЕСКИМИ МЕТОДАМИ

Н.М. Филатова, Л.Д. Асулян, В.А. Алферов, А.А. Горячева,
Г.Р. Ростовцев, К.В. Грачева

Тульский государственный университет
kizuza-333@mail.ru

Синтетические полимеры являются перспективными носителями для иммобилизации клеток микроорганизмов. Их использование позволяет получать пленки и гели, длительное время удерживающие биологический материал, при сохранении каталитической активности микроорганизмов. Среди таких синтетических полимеров широкое распространение получил поливиниловый спирт (ПВС).

Матрицы на основе ПВС применяются в биотехнологии для создания гетерогенных катализаторов на основе иммобилизованных ферментов. Такие матрицы используют в виде пленок, образующихся под действием УФ-излучения, или криогеля. Однако, УФ-облучение губительно влияет на микроорганизмы, а рецепторные элементы с использованием криогеля показали неудовлетворительные результаты по долговременной стабильности, что объясняется недостаточной механической прочностью криогеля, образующегося за счет водородных связей [1].

В связи с этим целью настоящей работы является получение нового носителя, модификацией поливинилового спирта N-винилпирролидоном, что позволило бы увеличить механические характеристики матрицы при получении в мягких условиях биокатализаторов на основе иммобилизованных клеток микроорганизмов.

Модификацию ПВС проводили в присутствии нитрата церия-аммония в качестве инициатора, который используют в реакции взаимодействия ПВС с N-винилпирролидоном [2].

В ходе эксперимента варьировали соотношение ПВС : N-винилпирролидон : инициатор. Исчезновение двойных связей в N-винилпирролидоне контролировали методом ИК-спектроскопии. Показано, что увеличение содержания инициатора в реакционной смеси приводит к исчезновению в ИК-спектре полосы 1625 см⁻¹ характерной для области валентных колебаний С=C связи, что

подтверждает разрыв двойных связей в N-винилпирролидоне (рис. 1).

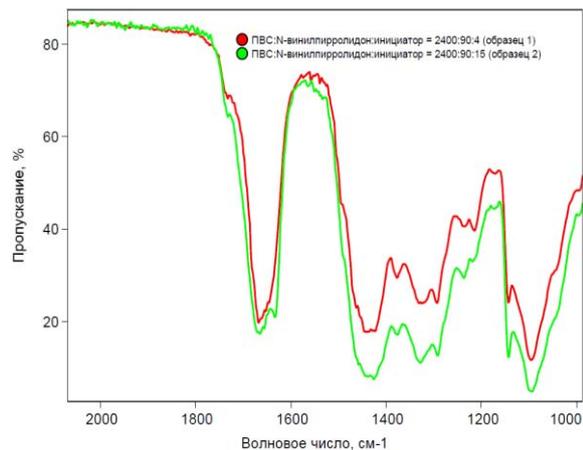


Рис. 1. ИК-спектры поливинилового спирта, модифицированного N-винилпирролидоном.

Пленки, полученные смешиванием растворов ПВС и поливинилпирролидона, после высушивания растворяются в буферном растворе, а пленки на основе ПВС, модифицированного N-винилпирролидоном в присутствии инициатора, набухают, но не растворяются, что служит доказательством сетчатой структуры полученного полимера.

Определение содержания сшитого полимера проводили методом экстракции, для этого образец пленки взвешивали, заливали водой и перемешивали в течение 4–6 часов, затем воду сливали, а набухшую пленку сушили до постоянной массы. Опыт повторяли несколько раз, пока масса образца после высушивания не перестанет изменяться. Показано, что увеличение количества инициатора при модификации приводит к увеличению содержания сшитого полимера для образца 1 на 11%, для образца 2 – на 13%.

Анализ структуры ПВС, модифицированного N-винилпирролидоном проводили методом световой микроскопии (световой микроскоп AXIO imager A1).

Известно, что характерной особенностью строения ПВС является наличие протяжен-

ных пор со средним сечением 0,18–0,26 мкм (рис. 2)[3].

Модифицированный полимер имеет линейные участки, характерные для ПВС и участки с сетчатой структурой (рис. 3).

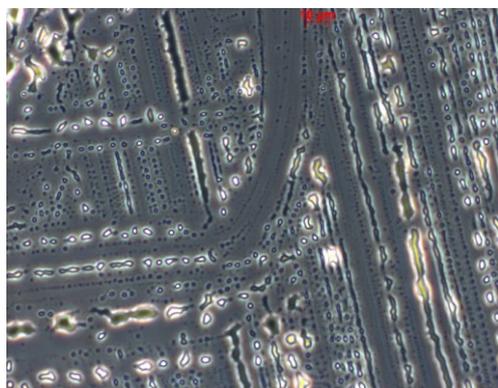


Рис. 3. Фотография модифицированного поливинилового спирта (увеличение в 100 раз), 195×150 мкм².

Анализ поверхности пленок модифицированного поливинилового спирта, проводили методом атомно-силовой микроскопии в контактном режиме (Solver-PRO ЗАО «НТ-МДТ», Россия). Результаты обрабатывали с помощью программы Nova.

На рис. 4 представлено 3D изображение поверхности образца полимера, размером 10×10 мкм² и профилограмма сечения поверхности пленки модифицированного ПВС. Рассчитали статистические параметры геометрических свойств поверхности, полученные значения приведены в табл. 1.

| | образец 1 | образец 2 |
|--|-----------|-----------|
| Объем выборки | 65536 | 65536 |
| Среднее арифметическое отклонение профиля, R_a | 32,74 нм | 32,23 нм |
| Среднее квадратическое отклонение профиля, R_q | 38,49 нм | 37,43 нм |

Табл. 1. Статистические параметры геометрических свойств поверхности.

В данной работе получен полимер сетчатой структуры, который может быть использован в качестве носителя для иммобилизации микроорганизмов. Исследована его структура. Показано, что содержание инициатора при модификации не влияет на топографию поверхности модифицированного поливинилового спирта.

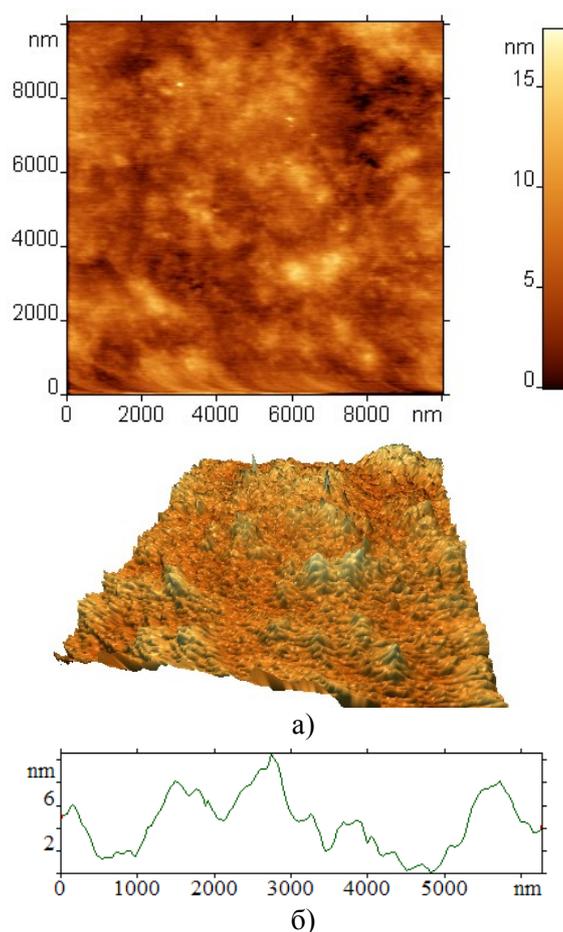


Рис.4. а) АСМ-изображение модифицированного ПВС образец 2; б) профилограмма сечения поверхности.

Список литературы:

1. Асулян Л.Д., Ануфриев М.А., Арляпов В.А., Карташова Т.Д., Блохин И.В., Власова Ю.А. Иммобилизация клеток *Glucanobacter oхydans* для создания стабильных рецепторных элементов биосенсоров // Изв. ТулГУ. Сер. Химия, 6, 137–144 (2006).
2. Bin Li, Li Niu, Wenpeng Kou, Qing Deng, Guangjin Cheng, Shaojun Dong. Synthesis of a Self-Gelatinizable Grafting Copolymer of Poly (vinyl Alcohol) for Construction of an Amperometric Peroxidase Electrode// Analytical Biochemistry, 130–132 (1998).
3. Шаскольский Б.Л. Композитные иммобилизованные биокатализаторы с частицами ферментных препаратов, включенных в матрицу криогеля поливинилового спирта: Автореф. Дис. к-та хим. наук. – М., 2009.- 22 с.

МОРФОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ПЕРЕДНЕЙ БОЛЬШЕБЕРЦОВОЙ МЫШЦЫ И КАПИЛЛЯРОВ ЭНДОМИЗИЯ ПО ДАННЫМ СВЕТОВОЙ, СКАНИРУЮЩЕЙ И ТРАНСМИССИОННОЙ ЭЛЕКТРОННОЙ МИКРОСКОПИИ

Г.Н. Филимонова

Федеральное государственное учреждение «Российский научный центр «Восстановительная травматология и ортопедия» имени академика Г.А. Илизарова» Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации
E-mail: malina63fil@yandex.ru

Исследовали переднюю большеберцовую мышцу взрослых собак в условиях хронического дистракционного остеосинтеза голени с темпом 1,0 мм в сутки с различной дробностью.

Фрагменты мышцы, фиксированные в жидком азоте, разлагали на поперечные криостатные срезы, в которых выявляли активность миозиновой АТФ-азы [1], активность лактатдегидрогеназы (ЛДГ). Изображения препаратов (АТФ), полученные посредством светового микроскопа "Opton" (Германия) и АПК «ДиаМорф», программа Color (Россия), использовали для стереологического анализа: в программе PhotoFiltre тестовую решетку из 100 точек [2], совмещали с изображениями. Рассчитывали объемную, численную плотность миоцитов и микрососудов, относительный объем эндомизия.

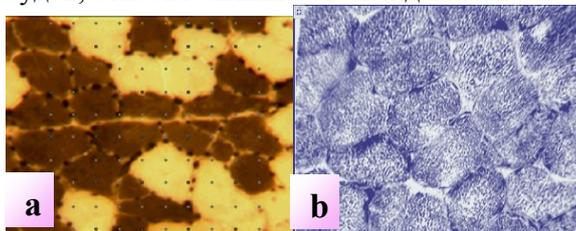


Рис. 1. Фрагменты криостатных срезов мышцы: а – активность АТФ-азы по Radicula, German, pH 9,0; б – активность ЛДГ. Увеличение – 200х.

Фрагменты мышцы, фиксированные в параформглутаральдегидном фиксаторе, с постфиксацией в осмиевой кислоте, обезвоживанием и заключением в эпоксидные смолы, на ультратоме "Nova" (LKB, Швеция) разлагали на полутонкие (окраска по М.Онтелл) и ультратонкие (контрастирование по Рейнольдцу) срезы. Полутонкие срезы исследовали посредством той же техники, что криостатные, изображения редактировали в программе PhotoFiltre (рис.2).

Данные световой микроскопии полутонких и криостатных срезов необходимы для представления общей морфологической кар-

тины, а так же особенностей метаболизма мышечной ткани.

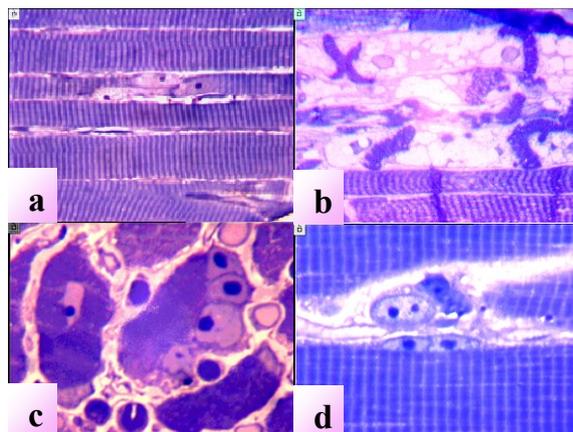


Рис. 2. Фрагменты полутонких срезов: а – нормальная гистоструктура мышцы, б – различные стадии контрактур миоцитов, с – центрально расположенное ядро и группа регенерационных ядер в миоцитах (справа), d – парный миобласт. Окраска по М.Онтелл, увеличение а, б – 500х, с, d – 1250х.

Эпоксидные блоки после изготовления полутонких срезов было предложено использовать для выявления ультраструктуры мышц на частично коррозионных препаратах, полученных методом протравливания в 2% растворе алкоголята натрия (4 часа). После высушивания в вакууме, напыляли серебром, исследовали при помощи сканирующего электронного микроскопа "JSM-840" (рис.3).

На ультратонких срезах исследовали капилляры эндомизия передней большеберцовой мышцы, используя электронный микроскоп JEM-100В при стандартном увеличении 11800х (рис.4). Полученные изображения безъядерных зон капилляров проецировали посредством фотоувеличителя «Нева-5» (Россия) на открытую тестовую решетку коротких отрезков, получая увеличение 44840х.

Определяли: а) измеряемые величины, выявленные в признаках 1–4: P_i – число тестовых точек, попавших на i -структуру, соответствует числу единиц объема: 1 – просвета

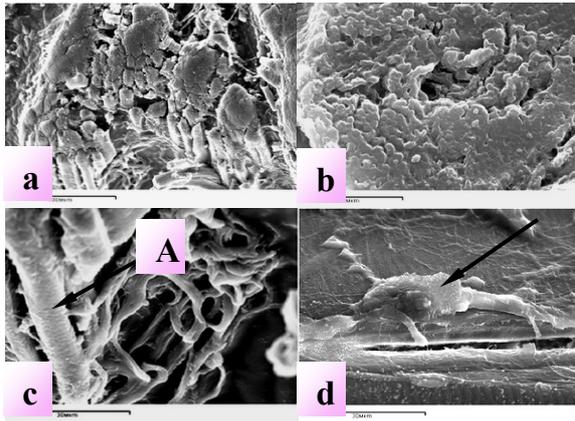


Рис. 3. Электронные сканограммы мышцы: а – миоциты, их пучки, 400х, б – идентифицированы миофибриллы, 4000х, с – артериола (А) и отходящие микрососуды в интерстиции, 1500х, д – активированный фибробласт с отростками (стрелка), 1200х.

капилляра, 2 – эндотелия капилляра, 3 – гранулярного эндоплазматического ретикулума (ГЭР), 4 – митохондрий (МТХ); б) расчетные величины, выявляемые в признаках 5–10: 5 – число единиц объема эндотелия на единицу объема просвета капилляра, признаки 6, 7, 8 – доля объема, занимаемая люминальными, базальными и цитоплазматическими микропиноцитозными везикулами, в объеме эндотелия; 9 – доля объема, занимаемая ГЭР, от объема эндотелия; 10 – доля объема, занимаемая МТХ, от объема эндотелия.

Первичные данные анализировали методами непараметрической статистически в программе M.Excel-2000, достоверность различий определяли на основании критерия Вилкоксона и рандомизации компонент для независимых выборок [3, 4].

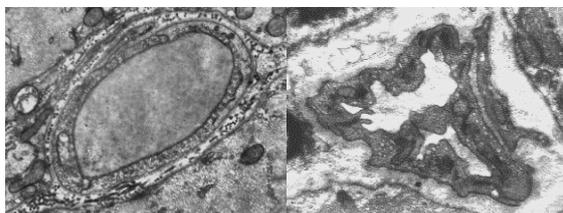


Рис. 4. Электронограммы капилляров эндомизия передней большеберцовой мыш-цы. Увеличение 11800х.

По результатам ультраструктурно-стереологического анализа капилляров эндомизия сделан вывод о механизмах адаптации сосудистого эндотелия к высокочеткой круглосуточной автодистракции и режиму 4-кратной дробности дозированного удлинения. Однако однозначных выводов о пре-

имуществе одного из режимов дистракции сделать не удалось.

С целью получения дополнительной скрытой информации о биологическом объекте как целостной системе, был проведен информационный анализ по данным ультраструктуры капилляров эндомизия. Рассчитывали: значения информационной энтропии (H, бит), относительной энтропии (h), избыточности (R, %), организации (O, бит) системы, пользовались общепринятыми формулами [5, 6].

Установлено, что в условиях 4-кратной дробности дистракции для эндотелия капилляров характерны признаки повышенной метаболической активности и интенсификации окислительно-восстановительных процессов, при этом отмечены минимальные значения коэффициента избыточности и абсолютной организации – показатели надежности системы, а так же максимальные значения информационной и относительной энтропии. Продемонстрировано несомненное преимущество круглосуточной автодистракции, при которой по окончании периода растяжения коэффициент избыточности и абсолютная организация выше в 2,4 раза по сравнению с 4-кратной дробностью, через месяц фиксации разница составила 1,2, соответственно; в условиях автодистракции отмечались минимальные значения информационной и относительной энтропии.

Список литературы:

1. Лойда, З. Гистохимия ферментов / З. Лойда., Р. Госсрау, Т. Шиблер и др. – М.: Мир, 1982. - С. 87-88.
2. Щудло М.М., Ступина Т.А., Щудло Н.А. Количественный анализ метахромазии суставного хряща в телепатологии // Известия Челябинского НЦ (УРО РАН). 2004. Специальный выпуск (25). С. 17-22.
3. Мюллер, П. Таблицы по математической статистике / М.: Финансы и статистика, 1982. - 271 с.
4. Рунион, Р. Справочник по непараметрической статистике / Р. Рунион. - М.: Финансы и статистика, 1982. - 198 с.
5. Автандилов, Г.Г. Системная стереометрия в изучении патологического процесса / Г.Г. Автандилов, Н.И. Яблучанский, В.Г. Губенко. - М.: Медицина, 1981. - 189 с.
6. Бандарин, В.А. Применение информационных методов для анализа биохимических показателей живых организмов / В.А. Бандарин // Проблемы бионики. – №3. – 1976. – С. 12-26.

ИССЛЕДОВАНИЕ МЕМБРАНОСВЯЗАННОГО ГЕМОГЛОБИНА В ЭРИТРОЦИТАХ С ПОМОЩЬЮ СПЕКТРОСКОПИИ ГИГАНТСКОГО КОМБИНАЦИОННОГО РАССЕЯНИЯ С НАНОЧАСТИЦАМИ СЕРЕБРА

В.В. Хабатова¹, Н.А. Браже¹, А.Р. Браже¹, А.А. Семенова², Е.Ю. Паршина¹,
Е.А. Гудилин^{2,3}, О.В. Сосновцева⁴, Г.В. Максимов¹

¹ Биологический факультет МГУ имени М.В. Ломоносова

² Факультет наук о материалах МГУ имени М.В. Ломоносова

³ Химический факультет МГУ имени М.В. Ломоносова

⁴ Кафедра биомедицинских наук, факультет наук о здоровье,

Копенгагенский университет, Дания

venera_khabatova@mail.ru

Спектроскопия комбинационного рассеяния (КР) является перспективным методом в клеточной биофизике и различных биомедицинских исследованиях (обнаружение опухолевых тканей, атеросклеротических бляшек, оценивание оксигенации крови и т.д.). Преимуществом спектроскопии КР является то, что она дает информацию о конформации и, следовательно, свойствах биомолекул *in vivo*, без влияния на целостность клетки. Однако, КР сигнал большинства биомолекул слабый и для его регистрации требуется высокая концентрация исследуемых молекул (во многих случаях более 1 мМ), недостижимая при использовании большинства живых клеток.

Спектроскопия гигантского комбинационного рассеяния (ГКР, surface enhanced Raman spectroscopy, SERS) с использованием наночастиц (НЧ) серебра или золота позволяет на много порядков усилить КР молекул, расположенных вблизи от поверхности наночастиц. Использование спектроскопии ГКР позволяет исследовать молекулы в наномолярных концентрациях, как изолированные, так и находящиеся внутри целых живых клеток.

Несмотря на преимущества спектроскопии ГКР, существует ряд трудностей в ее применении к исследованиям живых клеток. Прежде всего, необходимо оптимизировать экспериментальные условия для обеспечения целостности и жизнеспособности клетки в растворе с НЧ и сохранения свойств плазмона НЧ. Кроме того, нужно определить зависимость усиления КР сигнала от свойств НЧ (их размера и длины волны плазмонного резонанса (ПР)). Последнее особенно важно, так как серия приготовлений коллоидных растворов дает НЧ с немного разными свойствами и, следовательно, разной способностью усиливать КР сигнал, что может приво-

дить к неверной интерпретации полученных результатов. В связи с этим, при изучении клеток необходимо быть уверенным, что регистрируемый эффект является следствием изменений в клетке, а не изменений морфологии и агрегации НЧ. Таким образом, необходим удобный объект исследований, на котором можно изучить все особенности применения метода ГКР в условиях *in vivo*.

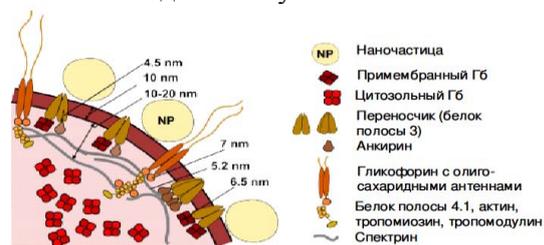


Рис. 1. Схема участка мембраны и примембранного пространства эритроцита с НЧ благородного металла на его поверхности.

Эритроцит — один из наиболее распространенных объектов в биомедицинских исследованиях и медицинских тестах. Это относительно простая клетка, основное содержание которой — гемоглобин (Гб) — обладает интенсивным КР благодаря наличию гемопорфирина. Особенностью эритроцитов является наличие двух популяций гемоглобина: мембраносвязанный (не более 0,5% от общего количества, Гб_{мс}) и цитозольный (99,5%, Гб_ц). Наночастицы благородного металла усиливают сигнал от молекул Гб, находящихся не дальше 20 нм от поверхности НЧ. В случае эритроцита (рис. 1) на плазматическую мембрану приходится около 10 нм, а оставшиеся 10 нм на фракцию Гб_{мс}, который связан с цитозольным участком белка полосы 3 (анионный переносчик). Мы показали, что добавление к суспензии эритроцитов наночастиц серебра или золота приводит к усилению сигнала только от Гб_{мс} [1].

В представленной работе было проведено исследование того, как свойства НЧ серебра (размер и положение длины волны плазмонного резонанса) влияют на усиление КР от Гб_{мс} в интактных эритроцитах.

Были использованы коллоидные растворы серебра, приготовленные по методике, предложенной Leopold and Lendl [2] с модификацией. Полученные коллоиды представляют собой раствор, содержащий NaCl (в концентрации 3 мМ) и НЧС со сферической формой (рис. 2) и содержат 2 фракции НЧС: малые по размеру частицы (около 10 нм в диаметре) и относительно большие (около 40–70 нм).

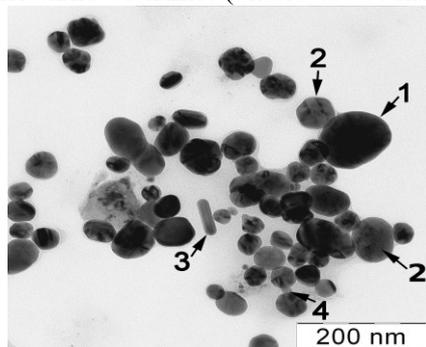


Рис. 2. Изображение наночастиц серебра, полученное при помощи просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ). 1 – фракция крупных НЧ; 2 – фракция НЧ среднего размера; 3 – НЧС вытянутой формы; 4 – НЧС ограненной формы.

Положение ПР варьировалось для коллоидов из разных проб от 400 до 422 нм, при этом оно смещалось в более длинноволновую область при увеличении размера НЧ. Экспериментальный образец получали двухэтапным разведением крови в 10000 раз с последующим смешиванием с коллоидным раствором в объемном соотношении 3:2. При помощи трех независимых методов было показано, что при таком приготовлении образца эритроциты не изменяют морфологию, вязкость плазматической мембраны и устойчивость к гемолизу.

Было установлено, что интенсивность спектров увеличивается со сдвигом ПР в более коротковолновую область (рис. 3) и с уменьшением размера наночастиц.

Для количественной оценки усиления КР сигнала нами был посчитан коэффициент усиления (enhancement factor — EF) для трех характерных наиболее интенсивных полос в ГКР спектре гемопорфирина гемоглобина в эритроцитах: 1375, 1588 и 1640 см⁻¹ (рис. 3). Было получено, что EF для всех полос увеличивается при сдвиге ПР в коротковолновую область и при уменьшении размера НЧ, при

этом полосы 1588 и 1640 см⁻¹ усиливаются в большей степени, чем полоса 1375 см⁻¹. Таким образом, коллоидные растворы с разными свойствами НЧ по-разному усиливают КР Гб_{мс} в целых эритроцитах. Мы предполагаем, что подобная зависимость будет наблюдаться и для КР других типов молекул в клетках, что должно быть принято во внимание при проведении серии экспериментов с использованием разных коллоидов. Кроме того, варьируя свойства НЧС, можно получать усиление интересующей области спектра КР от клеток.

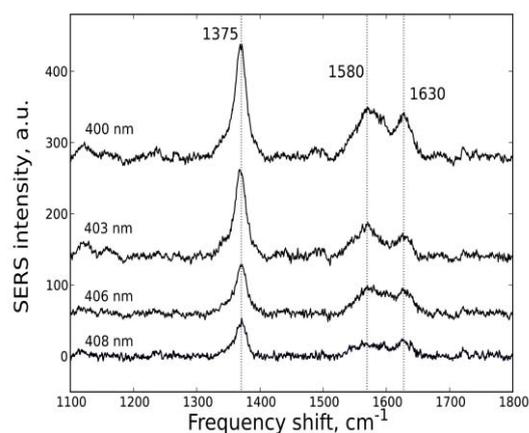


Рис. 3. Спектры ГКР Гб_{мс} в эритроцитах. Над спектрами указаны значения положения плазмонного резонанса в спектре поглощения использованных коллоидов.

Список литературы:

1. Brazhe N.A., Abdali S., Brazhe A.R., Luneva O.G., Bryzgalova N.Y., Parshina E.Y., Sosnovtseva O.V., Maksimov G.V. New insight into erythrocyte through in vivo surface-enhanced Raman spectroscopy. *Biophysical Journal*, Volume 97, Issue 12, 3206–3214, 2009.
2. Leopold N., Lendl B. A new method for fast preparation of highly surface-enhanced Raman scattering (SERS) active silver colloids at room temperature by reduction of silver nitrate with hydroxylamine hydrochloride. *J. Phys. Chem. B.*, 107, 5723–5727, 2003.

ВИЗУАЛИЗАЦИЯ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ПАТОГЕННЫХ БАКТЕРИЙ С КЛЕТКАМИ ЭПИТЕЛИЯ ЧЕЛОВЕКА

А.В. Зубрицкий, С.С. Абдураманов, А.А. Хасин, Е.Н. Ильина
ФГУ «НИИ Физико-химической медицины» ФМБА России
a.zubrit@gmail.com

В ходе эволюции у возбудителей инфекционных заболеваний сформировался ряд механизмов, обеспечивающих их проникновение сквозь эпителий и развитие инфекции [1]. Известно, что патогенные микроорганизмы рода *Neisseria* секретируют на своей поверхности белки, обеспечивающие транспортировку гонококков «силами самой клетки» в нижележащий эпителий [2].

Нами исследованы два изогенных штамма *Neisseria gonorrhoeae* (NG3 и NG3mut). В ходе стандартного тестирования адгезионных свойств этих штаммов было установлено их отличие в связывании с поверхностью культивируемых эпителиальных клеток. В част-

ности показано, что в идентичных условиях эксперимента штамм NG3 связывается с поверхностью культивируемых эпителиальных клеток эффективнее, чем NG3mut. Особенности адгезии и транспортировки клеток через эпителий были изучены с помощью атомно-силовой микроскопии. Использовали микроскоп NTegra prima (НТ МДТ, Россия), сканирование в полуконтактном режиме на воздухе, зонды HA-NC с высоким аспектным соотношением 5:1, жёсткостью балки кантилевера $\sim 3,4$ Н/м. Обработку данных проводили при помощи Gwyddion 2.23 и Nova 1.1.0.1780.

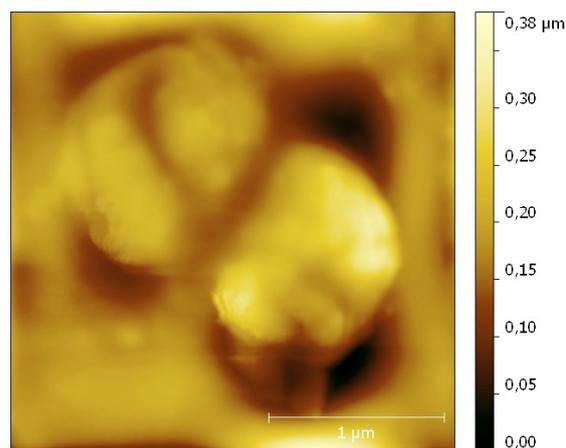
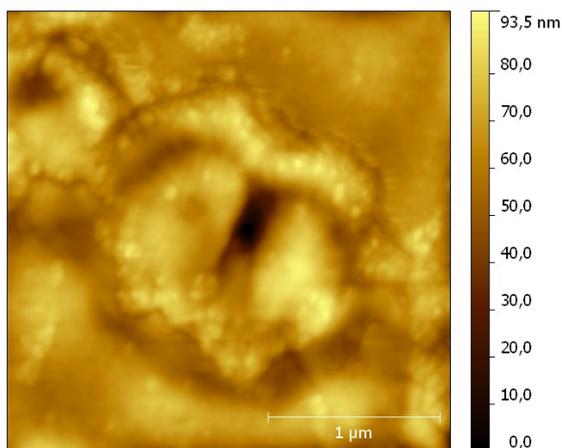
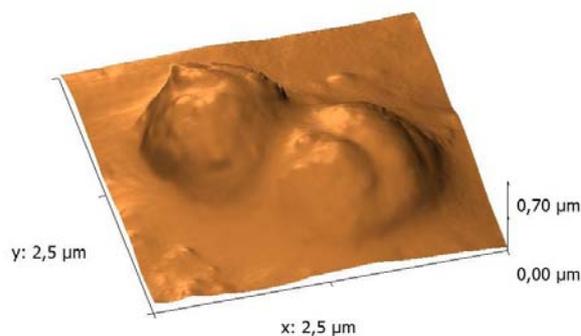
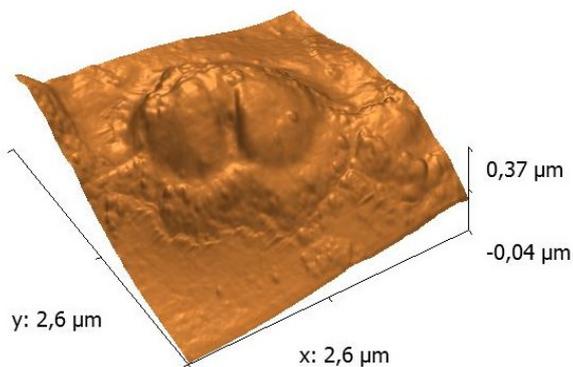


Рис. 1. Изометрическая проекция рельефа диплококка NG3 на поверхности эпителиальной клетки через 3 часа после нанесения бактериальной суспензии (вверху). Результат вычитания полиномиальной аппроксимации рельефа (фона) позволяет выявить мелкие подробности рельефа (внизу).

Рис. 2. Изометрическая проекция рельефа диплококков NG3mut на поверхности эпителиальной клетки через 3 часа после нанесения бактериальной суспензии (вверху). Результат вычитания полиномиальной аппроксимации рельефа (внизу).

Для получения препарата в 1 мл культуральной среды, покрывающей эпителиальные клетки (линия HT-29) на поверхности предметного стекла, добавляли 100 мкл суспензии, содержащей $\sim 10^8$ бактерий. Для фиксации препаратов использовалась кратковременная (~5 сек.) отмывка предметного стекла от культуральной среды в дистиллированной воде с последующим высушиванием на воздухе.

На полученных микрографиях видны особенности рельефа эпителиальной клетки вблизи её контакта с бактериальной. Характерные выросты цитоплазматической мембраны, возникающие на начальной стадии проникновения гонококка в эпителиальную клетку, наблюдаются для всех клеток штамма NG3 и значительно менее выражены при взаимодействии эпителиальных клеток и штамма NG3mut.

Полученные образы подтверждают выявленные в ходе классических адгезионных тестов различия в эффективности связывания штаммов NG3 и NG3mut с клетками эпителия.

Дальнейшее понимание особенностей взаимодействия патогенных микроорганизмов с клетками эпителия человека требует наблюдения этого процесса в реальном времени *in vitro*, что возможно с использованием атомно-силовой микроскопии в термостатированной проточной жидкостной ячейке.

Авторы признательны компании HT-МДТ (Россия) за предоставление атомно-силового микроскопа для исследований.

Список литературы:

1. Cossart P., Sansonetti P.J., Science, Vol. 304 no. 5668, pp. 242-248 (2003).
2. Harvey H.A., Jennings M.P., Campbell C.A., Williams R., Apicella M.A., Molec. Microbiol., Vol. 42, no. 3, pp. 659–672 (2001).

СКАНИРУЮЩАЯ ЗОНДОВАЯ МИКРОСКОПИЯ ГРАФЕНА

Е.А. Хестанова, О.В. Сеницына, И.В. Яминский

Центр перспективных технологий

e.khestanova@gmail.com

На сегодняшний день сканирующая зондовая микроскопия (СЗМ) является одним из основных методов определения топологии тонких плёнок и такого интересного материала как графен [1]. Следует так же отметить, что СЗМ является одной из немногих методик, позволяющих манипулировать объектами с чрезвычайно большой точностью (10 нм) [2].

Тем не менее, применение методики зондовой микроскопии несёт в себе некоторые трудности, связанные с интерпретацией получаемых изображений. Помимо этого нельзя исключать возможность влияния зонда на исследуемый материал, что может привести к нежелательному изменению топологии.

В данной работе была изучена топология графеновых кластеров, осаждённых из суспензии на подложки из золота. Данные образцы были получены при термическом расширении высокоориентированного пиролитического графита с интеркалированным железом между кристаллическими плоскостями (0001).

Исследование графеновых кластеров проводилось в контактной моде в режиме атомно-силовой микроскопии (АСМ). В результате были получены изображения графеновых листов (рис. 1) высотой 2–3 нм, что соответствует 6–10 графитовым слоям. Малая толщина изучаемых слоёв также подтверждается их «прозрачностью»: на изображении видна не только топология графеновых листов, но и рельеф подложки под ними – сферические частицы золота. Влияние зонда в таком случае незначительно, так как сила взаимодействия зонда с образцом поддерживалась равной 5 нН, что достаточно мало.

Для топологии данных кластеров было отмечено наличие складок толщиной 4–6 нм. Такие складки часто наблюдаются при изучении топологии графена на подложке. В литературе [3] их образование объясняется минимизацией потенциальной энергии. Помимо наличия складок на полученных изображениях наблюдалось присутствие частиц высотой 10–30 нм, что не характерно для графеновых кластеров, полученных, например, методом микромеханического расщепления. Данные вкрапления могут соответствовать частицам железа.

Для установления природы данных частиц планируется провести измерения в режиме магнитно-силовой микроскопии. Данная методика является двухпроходной и позволяет изучать топологию поверхности и её магнитные свойства. Таким образом, наличие магнитных свойств у обнаруженных в составе графеновых кластеров частиц подтвердит наше предположение о том, что они содержат атомы железа.

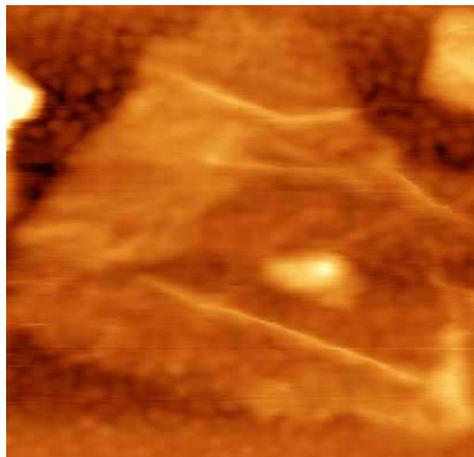


Рис. 1. АСМ изображение листа графена с предполагаемой частицей железа. Размер кадра 500×500 нм.

Автор выражает благодарность всему коллективу ЗАО «Центр перспективных технологий» за техническую и информационную поддержку, в особенности генеральному директору, профессору Яминскому И.В. и директору по научному развитию, к.х.н. Сеницыной О.В. Измерения проведены на сканирующем зондовом микроскопе «ФемтоСкан». Образцы предоставлены Червонобородовым С.П.

Список литературы:

1. Образцова Е.А., Диссертация на соискание учёной степени кандидата физ.-мат. наук, Москва, 2008.
2. Sinitsyna O.V., Meshkov G.B., Yaminsky I.V., A novel tool for the local anodic oxidation of graphite, Practical Applications in Nanoengineering, 2010.
3. Тюрина А.В., Диссертация на соискание учёной степени кандидата физ.-мат. наук, Москва, 2010.

ВИЗУАЛИЗАЦИЯ МОЛЕКУЛЯРНОЙ ОРГАНИЗАЦИИ ИНУЛИНАЗ МЕТОДОМ АТОМНО-СИЛОВОЙ МИКРОСКОПИИ

М.Г. Холявка, Т.А. Ковалева, В.Г. Артюхов, М.В. Гречкина
ГОУ ВПО Воронежский государственный университет
holyavka@rambler.ru

Изучение структурных особенностей и функциональных свойств инулиназ (КФ 3.2.1.7) имеет теоретическое и прикладное значение. Эти ферменты участвуют в углеводном метаболизме высших растений и микроорганизмов, являются важнейшими компонентами сигнальных путей, играют одну из ключевых ролей в контроле процессов клеточной дифференцировки и развития. Они также могут быть использованы в циклах производства сахаров с различной степенью полимеризации, в частности, фруктозы и инулоолигосахаридов – неотъемлемых компонентов функционального питания, снижающих риск возникновения сахарного диабета, кариеса и ожирения.

Актуальными и перспективными являются исследования особенностей надмолекулярной организации инулиназ и родственных им ферментов. Модели пространственной структуры предложены только для инвертазы *Thermotoga maritima* [1], экзо-инулиназы *Aspergillus awamori* [2] и фруктан 1-экзогидролазы *Cichorium intybus* [3], до сих пор не выяснено, какие энзимы группы гликозидгидролаз (GH 32) образуют олигомеры, а какие существуют в мономерной форме.

Цель данной работы заключалась в изучении молекулярной организации инулиназ из различных продуцентов. Объектами исследования были инулиназы из *Kluyveromyces marxianus* и *Aspergillus niger*, а также три фракции, выделенные из *Helianthus tuberosus*, обладающие инулиназной активностью, которые мы условно назвали инулиназа I, инулиназа II и инулиназа III.

Для исследования особенностей молекулярной организации белковых глобул в настоящее время успешно применяются различные сочетания классических методов биохимического анализа и современные биофизические подходы, в том числе метод атомно-силовой микроскопии (АСМ). В последние годы зондовая микроскопия становится одним из основных методов прямой визуализации ДНК, отдельных вирусов, клеток, белков и мембран.

В связи с вышесказанным для изучения молекулярной организации инулиназ нами был

использован комплексный подход, заключающийся в сочетании АСМ с методами динамического светорассеивания, гель-хроматографии, электрофореза, инфракрасной спектроскопии.

Установлено, что инулиназы из *Kluyveromyces marxianus* и *Aspergillus niger*, а также инулиназа I из *Helianthus tuberosus* являются гетеродимерами, а инулиназы II и III представлены мономерной формой.

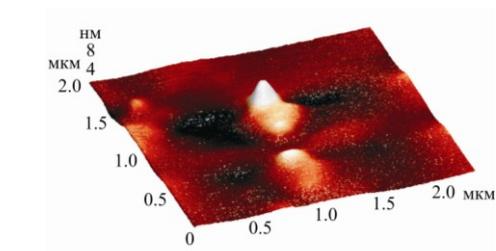
На объемном изображении поверхности молекулы инулиназы из *Kluyveromyces marxianus*, полученном с помощью АСМ, отчетливо видно, что данный белок имеет димерную структуру (рис. 1 А1, Б1). Показано, что высота субъединицы № 1 превышает высоту субъединицы № 2 в 2 раза. Анализ профиля сечения позволяет определить высоту и латеральные размеры инулиназы и ее субъединиц. Длина нативной глобулы намного превышает ее высоту, возможно, такое уплотнение молекулы происходит за счет многоочечного связывания заряженных аминокислотных остатков с поверхностью слюды.

Показано, что инулиназа из *Aspergillus niger* также является гетеродимером (рис. 1 А2, Б2).

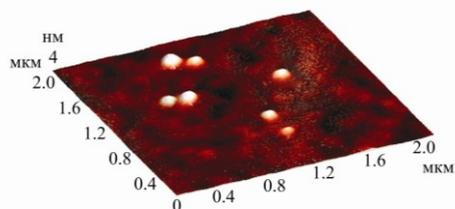
Методом АСМ продемонстрировано, что инулиназа I из *Helianthus tuberosus* (рис. А3, Б3) образует димеры (причем на изображении встречаются в равной степени как димеры, так и момеры), а инулиназы II (рис. А4, Б4) и III (рис. А5, Б5) существуют в мономерной форме.

Исследования пространственных особенностей молекул инулиназ из различных продуцентов необходимо расширять и развивать, так как вопрос о существовании и типе надмолекулярной организации у этой группы энзимов окончательно не решен.

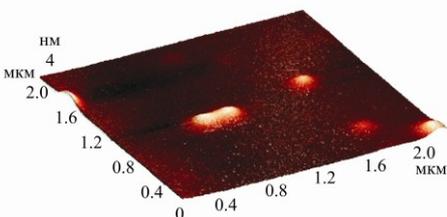
Возможно, процессы ассоциации-диссоциации инулиназы и родственных ей ферментов играют важную роль в регуляции метаболизма растений и микроорганизмов, использующих в качестве запасных питательных веществ инулин, различные фруктаны и фруктоолигосахариды.



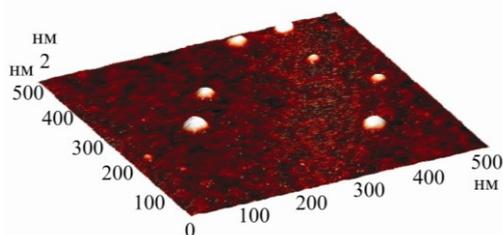
A1



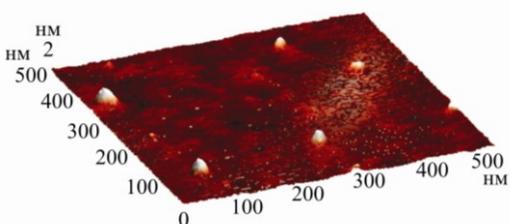
A2



A3



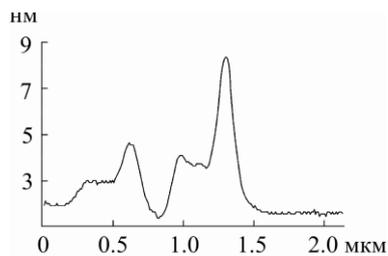
A4



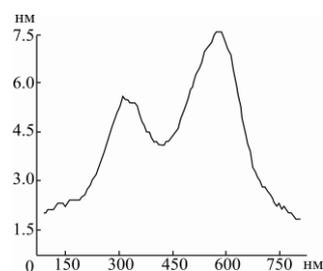
A5

Рис. 1. Визуализация молекул инулиназ из различных продуцентов методом атомно-силовой микроскопии (А – трехмерное изображение, Б – сечение рельефа поверхности):

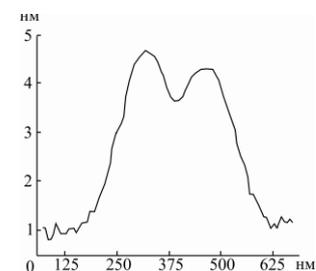
- 1 – инулиназа из *Kluyveromyces marxianus*,
- 2 – инулиназа из *Aspergillus niger*,
- 3 – инулиназа I из *Helianthus tuberosus*,
- 4 – инулиназа II из *Helianthus tuberosus*,
- 5 – инулиназа III из *Helianthus tuberosus*.



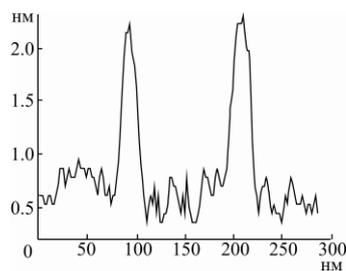
Б1



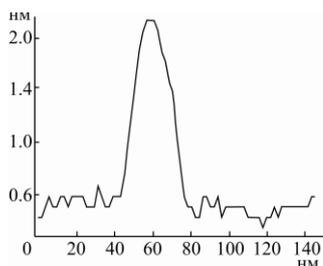
Б2



Б3



Б4



Б5

Список литературы:

1. Alberto F., Jordi E., Henrissat B., Czjzek M., Biochem. J., Vol. 395, P. 457–462 (2006).
2. Nagem R.A.P., Rojas A.L., Golubev A.M., Korneeva O.S., Eneyskaya E.V., Kulminskaya A.A., Neustroev K.N., Polikarpov I., J. Mol. Biol., Vol. 344, P. 471–480 (2004).
3. Verhaest M., Ende W.V., Roy K.L., Ranter C.J.D., Laere A.V., Rabijns A., The Plant Journal., Vol. 41, P. 400–411 (2005).

БЕСКОНТАКТНЫЙ ЛАЗЕРНЫЙ МЕТОД МИКРОХИРУРГИИ ПРЕИМПЛАНТАЦИОННЫХ ЭМБРИОНОВ МЛЕКОПИТАЮЩИХ

Ю.В. Храмова¹, М.М. Ракитянский², С.А. Сергеев¹, И.В. Ильина²,
Д.С. Ситников², А.В. Овчинников², М.Л. Семенова¹, М.Б. Агранат²

¹МГУ имени М.В. Ломоносова

²Объединенный институт высоких температур РАН

yul.khramova@gmail.com

В настоящее время широкое распространение, как в экспериментальных исследованиях, так и в клинической практике получили методы микрохирургии преимплантационных эмбрионов млекопитающих. Целью настоящей работы была разработка методов микрохирургии эмбрионов при помощи современных лазерных технологий. В работе была использована установка с функциями «оптический скальпель – оптический пинцет» на основе фемто-секундного хромфорстеритового лазера (оптический скальпель), непрерывного иттербиевого волоконного лазера (оптический пинцет), разработанная в отделе лазерной плазмы Объединенного института высоких температур РАН.

Эксперименты проводили на преимплантационных эмбрионах мышей линии C57Bl/СВА. Нами были проведены микрохирургические процедуры двух типов: 1) слияние blastomerov эмбрионов 1,5 сут. развития с помощью «оптического скальпеля»; 2) биопсия клеток троф-эктодермы эмбрионов 3,5 сут. развития с помощью системы «оптический скальпель – оптический пинцет». Процедуру слияния blastomerov проводили в каплях среды для манипуляций M2 (MR-015P-5D, Millipore), покрытых минеральным маслом. Перед биопсией эмбрионы помещали в инкубатор и культивировали в стандартных условиях (37°C, 5%CO₂) в среде M16 (MR-016-D, Millipore) до стадии blastocysty, приступающей к хэтчингу, а саму процедуру биопсии клеток трофэктодермы проводили в бескальциевом растворе. После лазерного воздействия эмбрионы культивировали в течение суток (после биопсии) и 3-х сут. (после слияния blastomerov) для проверки их жизнеспособности.

Ранее нами была разработана методика слияния клеток эмбриона на стадии 2-х blastomerov с помощью серии лазерных импульсов. Эта методика была нами усовершенствована: при энергии импульса порядка 300 нДж клетки сливались с одного лазерного импульса. После процедуры слияния эм-

брионы были жизнеспособны и развивались до стадии blastocysty (рис. 1).

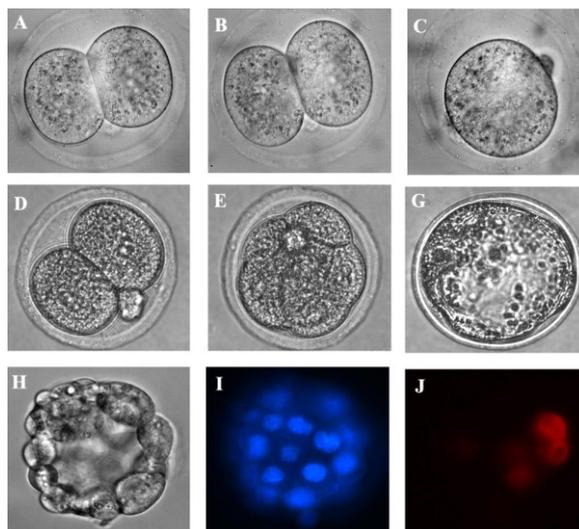


Рис. 1. Слияние blastomerov на стадии двух клеток: до выстрела (А), через 10 мин. (В) и через 45 мин. после выстрела (С); последующее развитие эмбриона: 1-й, 2-й, 3-й и 4-й дни после слияния (D, E, G и H соответственно), окрашивание флуоресцентными красителями на живые (I) и мертвые клетки (J).

После процедуры биопсии трофэктодермы, в ходе которой лазерными импульсами отрезали небольшое количество клеток трофэктодермы, эмбрионы на следующий день были жизнеспособны, только единичные клетки в зоне биопсии окрашивались иодидом пропидия (P1304MP, Invitrogen) через сутки после процедуры. Ранее нами была разработана процедура биопсии редуцированного тельца (РТ) с помощью системы «оптический пинцет», после которой эмбрионы также сохраняли жизнеспособность и развивались до стадии blastocysty.

Таким образом, разработанные нами методики слияния blastomerov эмбриона на стадии 2-х клеток и бесконтактной лазерной биопсии трофэктодермы не оказывают негативного влияния на жизнеспособность клеток эмбрионов.

SINGLE PARTICLE RECONSTRUCTION OF N-TERMINUS OF A RECOMBINANT CAP PROTEIN PARTICIPATING IN ACTIN CYTOSKELETON TURNOVER

G.G. Sharov¹, B.L. Goode², F.A. Chaudhry², O.S. Sokolova¹

1. Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, Russia

2. Brandeis University, USA

sharov.grigory@gmail.com

Many essential cellular processes are provided with regulated dynamics of actin filaments. Comprehensive study of this problem becomes possible with structural data that allows revealing actin filament interactions with different biomolecules like actin binding proteins (ABP). So we can make a step towards understanding the precise mechanism of work of the actin system in living cell. One of the ABP, CAP, found in most eukaryotic cells, is a complex molecular machine, providing the assembly and disassembly of filaments in those parts of the cell, where it is necessary at a particular periods of time [1]. Research on full-length CAP is almost impossible using such structural biology methods as X-ray analysis or NMR, since CAP forms high-molecular-weight complex [2], also because of complication with obtaining sufficient quantities of purified full-length protein for crystallization. Using the X-ray, crystal structures of isolated C- and N-terminal [3] domains of the protein have been obtained so far. Crystal structures are dimers of monomers of corresponding fragment (fig. 1). In spite of this the organization of oligomeric complex seems to be ambiguous, so it becomes obviously try to obtain data on the structure by electron microscopy of macromolecules. This method requires very small amounts of protein for analysis. Although the resolution of this method is worse than the crystallographic one, it is an effective solution to the problem of crystallization. Three-dimensional reconstruction of the CAP protein, obtained by interpretation of particles as the projections from different angles relative to electron micrographs, is a very good approximation, it provides an illustration of three-dimensional structure of the protein and its oligomeric structure.

The aim of the work was to obtain three-dimensional reconstruction of the N-terminal fragment of recombinant CAP-protein.

N-terminus of CAP was expressed in *E. coli* and purified (fig. 2) using affine chromatography with two tags: His and GST.

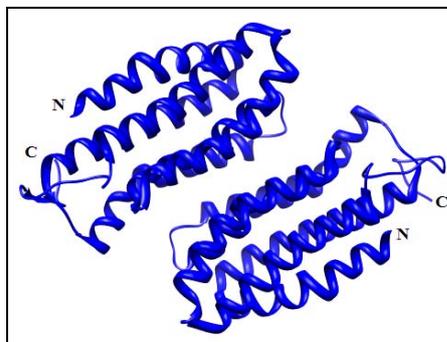


Fig. 1. Crystal structure of N-CAP dimer from *D. discoideum* (PDB 1S0P).

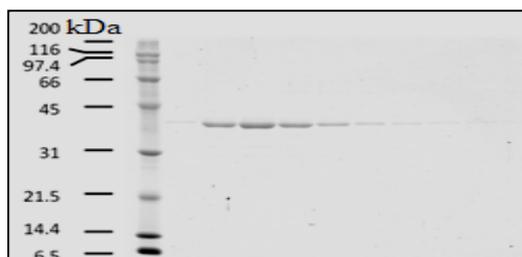


Fig. 2. Fractions of purified N-CAP on SDS-PAGE.

We obtained micrographs (fig. 3) treated with 2% uranyl acetate for negative staining on TEM FEI CM-12 (120 kV, 60 kx, defocus 1.5 μ m). We have picked up 1878 and 22274 protein particles with His- and GST-tag, respectively. IMAGIC [4] was used as a software for single particle analysis (fig. 4).

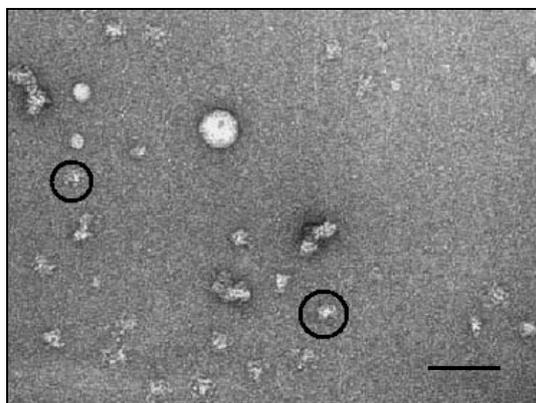


Fig. 3. Electron micrograph with N-CAP particles purified using His-tag. Scale bar represents 50 nm.

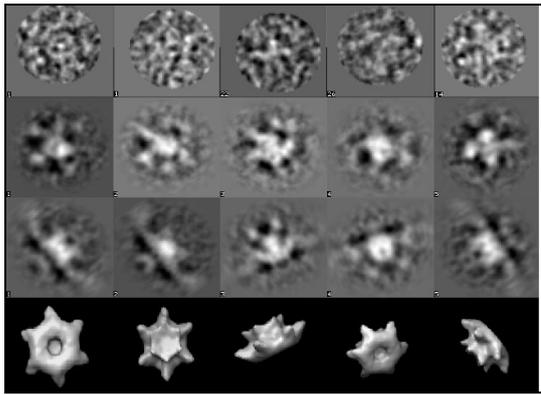


Fig. 4. Reconstruction in IMAGIC from top to bottom row: band-pass filtered original particles; class averages selected for reconstruction; reprojections from 3D model; 3D model.

Reconstruction and docking of N-CAP with His-tag is shown on fig. 5. Hexameric complex of N-CAP termini includes 6 “petals” associated in cup-shaped structure. The size of the model corresponds to molecular weights of its components: 240 kD for six 40 kD monomers. We interpreted our model using automatic docking in Situs program [5]. We show that only six monomers of N-CAP can be docked into electron density of the model. We suppose the upper part of the “cup” to be a complex of coiled coil domains, which were not crystallized in X-ray, but shown to stimulate the oligomerization process. In this case we propose C-CAP fragments to connect to the edges of cup’s petals. So N-CAP seems to form the central part of the huge complex and C-CAP are at the periphery. This corresponds well to a hypothesis about involving CAP complex in actin treadmiling and ABP binding simultaneously [2].

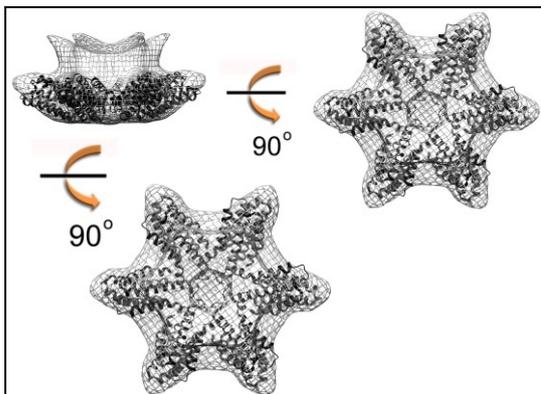


Fig. 5. Model of N-CAP with His-tag (resolution is about 20 Å).

The further analysis on more number of images of N-CAP, purified with GST-tag, allowed obtaining the three-dimensional reconstruction with higher resolution (fig. 6). The overall molecular weight of complex with GST-tag is about

350 kD. This complex is supposed to form pentamer, possibly because of steric interactions explained by huge size of GST-tag (25 kD).

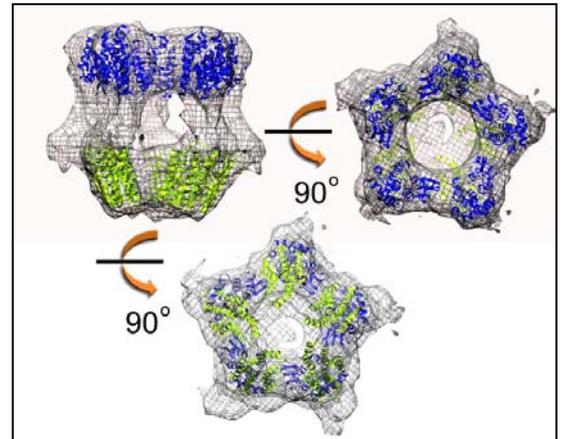


Fig. 6. Model of N-CAP with GST-tag (resolution is about 18 Å).

We accomplished a comparison of two reconstructions and shown the bigger domain (lower part of model on fig. 6) is CAP, while the upper part, as we suppose, is formed by residues of GST. The interpretation of obtained results has been done using docking of CAP and GST monomers. We show docking of crystal structure of CAP is more suitable in the bigger (lower) part of 3D-reconstruction.

Thereby we pointed out that three-dimensional structure of N-terminal fragments of CAP protein, obtained so far using TEM and single particle analysis, leads us to revealing the oligomerization state of the complex. We show N-CAP fragments associated in hexameric or pentameric structure. This complex is stabilized by N-terminal coiled coil domains of CAP.

References:

1. Balcer H.I., Goodman A.L., Rodal A.A., Smith E., Kugler J., Heuser J.E., Goode B.L., *Current Biology*, 13, 2159–2169 (2003).
2. Quintero-Monzon O., Jonasson E.M., Bertling E., Talarico L., Chaudhry F., Sihvo M., Lappalainen P., Goode B.L., *The Journal of Biological Chemistry*, 284, 10923–10934 (2009).
3. Ksiazek D., Brandstetter H., Israel L., Bourenkov G.P., Katchalova G., Janssen K.-P., Bartunik H.D., Noegel A.A., Schleicher M., Holak T.A., *Structure*, 11, 1171–1178 (2003).
4. van Heel M., Harauz G., Orlova E.V., Schmidt R., Schatz M., *J Struct Biol.*, 116, 17–24 (1996).
5. Wriggers W., *Biophysical Reviews*, 2, 21–27 (2010).

ИЗУЧЕНИЕ МОЛЕКУЛЯРНЫХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ БЕЛКОВ В ЖИВОЙ КЛЕТКЕ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МИКРОСКОПИЧЕСКИХ МЕТОДОВ

Е.В. Шеваль

*НИИ физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского МГУ
sheval_e@genebee.msu.su*

Клеточное ядро содержит в своем составе большое число различных структурных доменов, каждый из которых характеризуется специфическим набором белков и РНК. Удивительным представляется то, что различные домены не отделены от окружающей их нуклеоплазмы мембранами, а сами белки не находятся в структурах постоянно, а непрерывно перемещаются между доменами и нуклеоплазмой. Возникает вопрос – каким образом происходит накопление в локальных областях ядра тех или иных белков?

В настоящее время мы проводим исследование механизмов создания высокой концентрации специфических белков в самой крупной из ядерных структур – в ядрышке. Сейчас уже очевидно, что механизмов накопления белков в ядрышке множество. Использование современных методов световой и электронной микроскопии позволяет выявлять такие механизмы непосредственно в живых клетках. Ниже приведены данные по изучению одного из механизмов – накоплению белков за счет специфических сигнальных последовательностей.

Сигналы ядрышковой локализации представляют собой специализированные аминокислотные последовательности, определяющие неспецифическое накопление белков в ядрышке. Выраженность действия различных сигналов ядрышковой локализации может варьировать в широких пределах, что, по-видимому, связано с молекулярными механизмами реализации функциональной активности этого типа сигнальных мотивов. Последнее делает актуальной разработку методов количественной оценки выраженности их действия.

Для этого мы использовали конструкторы, образованные зеленым флуоресцирующим белком (EGFP) и тестируемой последовательностью. Увеличение накопления содержащего тестируемый мотив химерного белка, по сравнению с EGFP, будет свидетельствовать о потенциальной способности последовательности играть роль сигнала ядрышковой локализации. Количественной мерой накопления может служить отношение концен-

траций белка в ядрышке к концентрации белка в нуклеоплазме. Использование отношения, а не абсолютной величины, снимает проблему большого разброса в содержании белка в разных клетках популяции экспрессирующих белок клеток.

Так как уровень флуоресценции EGFP пропорционален его концентрации, то измерение этого параметра производится достаточно легко в живых клетках с использованием лазерного сканирующего конфокального микроскопа. Для анализа мы выбрали две экспериментальные системы.

Во-первых, был детально проанализирован ранее открытый нами неспецифический сигнал ядрышковой локализации в гистоне H2B [1]. Результаты измерений показывают, что выраженность действия тестируемой последовательности коррелирует с ее зарядом. То есть механизм действия сигнала ядрышковой локализации имеет, по-видимому, электростатическую природу

Во-вторых были созданы несколько серий искусственных сигналов ядрышковой локализации, отличающихся двумя параметрами – количеством положительно-заряженных аминокислот или плотностью их расположения. Результаты измерения подтверждают наблюдения, сделанные при изучении сигнала ядрышковой локализации гистона H2B. При этом выраженность накопления обратно пропорциональна скорости обмена белка в ядрышке, измеренной методом FRAP.

Таким образом, результаты работы подтверждают высказанную ранее гипотезу о том, что сигналы ядрышковой локализации реализуют свою функциональную активность путем электростатического взаимодействия с компонентами ядрышка.

Список литературы:

1. Musinova Y.R., Lisitsyna O.M., Golyshev S.A., Tuzhikov A.I., Polyakov V.Y., Sheval E.V. Nucleolar localization/retention signal is responsible for transient accumulation of histone H2B in the nucleolus through electrostatic interactions. *Biochim. Biophys. Acta*, 1813, 27–38 (2011).

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МЕТОДА ЛАЗЕРНОЙ ИНТЕРФЕРЕНЦИОННОЙ МИКРОСКОПИИ ДЛЯ ИЗМЕРЕНИЯ РАЗМЕРОВ ЧАСТИЦ ДРЕВЕСИНЫ ПРИ УЛЬТРАИЗМЕЛЬЧЕНИИ

В.В. Шутова¹, А.И. Юсипович², Г.В. Максимов²

¹ Мордовский государственный университет им. Н.П. Огарева, г. Саранск

² МГУ имени М.В. Ломоносова

vshutova@yandex.ru

В настоящее время в связи с сокращением запасов ископаемого топлива ставится вопрос о получении альтернативных видов горючего из возобновляемых ресурсов. Из-за распространенности и дешевизны древесное, целлюлозосодержащее сырье наиболее перспективно для производства биоэтанола. Однако древесина является очень устойчивым к гидролизу материалом и требует дополнительной обработки для облегчения доступа фермента к молекулам целлюлозы. Ультразмельчение – процесс обработки материала на энергонагруженных установках, конечным продуктом которого являются частицы субстрата с размерами 10^{-6} – 10^{-9} м. Оценить размеры частиц можно при помощи метода лазерной интерференционной микроскопии.

Цель работы заключалась в изучении возможности использования метода лазерной интерференционной микроскопии для измерения размеров частиц древесины при ультразвуковом измельчении.

Измельчение осиновых опилок проводили с помощью планетарной шаровой мельницы Retsch PM-100 (Германия) при скорости вращения 400 и 600 об./мин в течение 20 и 40 минут. Для определения размеров ультрасдисперсных частиц (УДЧ) их помещали в дистиллированную воду на 24 ч. Оценка размеров частиц была выполнена с использованием лазерной интерференционной микроскопии (ЛИМ). ЛИМ позволяет количественно с высокой точностью измерять оптическую разность хода (ОРХ), пропорциональную высоте объекта и показателю преломления. Исследования проводились с использованием автоматизированного интерференционного микропрофилометра, разработанного в институте ВНИИОФИ (Москва, Россия) на базе микроинтерферометра Линника МИИ-4

(ЛОМО, Россия) с длиной волны лазера 650 нм.

Если предположить, что частицы являются однородными сферическими, то максимальная толщина (максимальное значение ОРХ) соответствует диаметру частиц.

При измерении УДЧ методом ЛИМ было обнаружено, что в супернатанте находятся частицы различного размера (рис. 1).

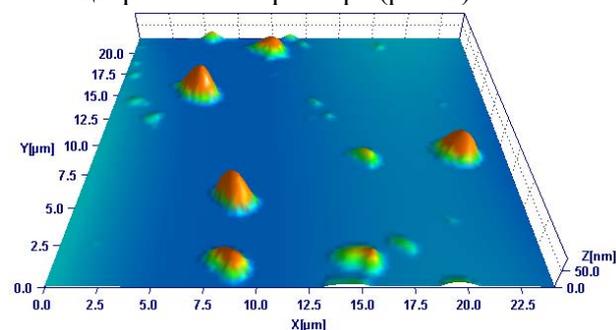


Рис. 1. Изображение УДЧ в супернатанте. Время ультразвуковом измельчения 20 мин, скорость вращения 600 об./мин.

Установлено, что, несмотря на большой разброс в размерах, наибольшее число частиц в супернатанте составляют частицы нанометрового диапазона. При этом показано, что увеличение времени вращения приводит к уменьшению размера наиболее часто встречаемых частиц примерно в два раза.

Кроме того, судя по изменению величины стандартного отклонения, характеризующего разброс размеров измеренных частиц, можно предположить, что увеличение скорости вращения мельницы приводит к некоторому увеличению дисперсности системы.

Увеличение времени обработки субстратов при измельчении от 20 до 40 мин приводит к появлению в среде частиц от 2 до 200 нм.

ПОВЕРХНОСТНО-ЗАВИСИМЫЕ РАЗЛИЧИЯ В АДСОРБЦИИ РНКаз

О.А. Коновалова, М.Р. Ювакаева, Ф.В. Ширшиков,
Н.В. Калачева, М.Э. Сибгатуллин
Казанский (Приволжский) Федеральный университет
olga.konovalova@bk.ru

Взаимодействие белков с поверхностью твердых адсорбентов часто сопровождается перестройкой в структуре адсорбированного белка. Это явление может оказать огромное влияние на биологические свойства белков, в которых адсорбция играет ключевую роль. Поэтому изучение особенностей физической адсорбции белков на различные подложки является актуальной проблемой.

Объектом исследования в настоящей работе являются РНКазы, в проявлении биологической активности которых важную роль играет цитоплазматическая мембрана.

В работе методом атомно-силовой микроскопии исследована физическая адсорбция панкреатической РНКазы и РНКазы *Bacillus intermedius* на отрицательно заряженную поверхность слюды и гидрофобную поверхность пирографита.

Визуализацию адсорбции РНКаз на поверхностях выполняли на атомно-силовых микроскопах Solver P47H, сканер 50×50 мкм и Solver Pro, сканер 3×3 мкм (НТ-МДТ, Россия). Исследуемые поверхности сканировали на воздухе при комнатной температуре в полуконтактном режиме стандартными кремниевыми кантилеверами NSG11 (НТ-МДТ, Россия) с гарантированным радиусом закругления острия 10 нм. Сканирование проводилось при рабочей амплитуде колебаний кантилевера 15–25 нм с разрешением 512×512 точек, используя 3 режима сканирования: постоянной амплитуды, регистрации фазы и сигнала рассогласования. Время взаимодействия РНКаз с поверхностью варьировалось от 30 сек до 10 мин, концентрация варьировалась от 1 мкг/мл до 50 мкг/мл. Для исследования кинетики сорбции белков использовался программный пакет MatLab.

Анализ кинетики адсорбции РНКаз на слюду показал, что с увеличением времени взаимодействия количество адсорбированного белка на единицу площади слюды возрастало для обоих ферментов. При этом РНКазы *Bacillus intermedius* адсорбировалась в 3–5 раза эффективнее, чем панкреатическая РНКазы. Адсорбция РНКазы *Bacillus intermedius* на слюду сопровождалась агрегацией молекул фермента.

Адсорбция РНКаз на незаряженную гидрофобную поверхность пирографита качественно отличалась от их адсорбции на слюду.

Молекулы белков, адсорбированных на пирографите, представляли собой слипшиеся структуры, в то время, как на поверхности слюды их можно дифференцировать по размеру и форме (рис. 1 и 2).

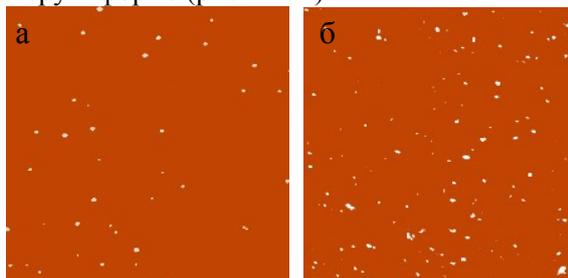


Рис. 1. АСМ-изображения молекул панкреатической РНКазы (а) и РНКазы *Bacillus intermedius* (б), адсорбированных на слюде. Время взаимодействия со слюдой 2 мин. Размер кадров 5×5 мкм.

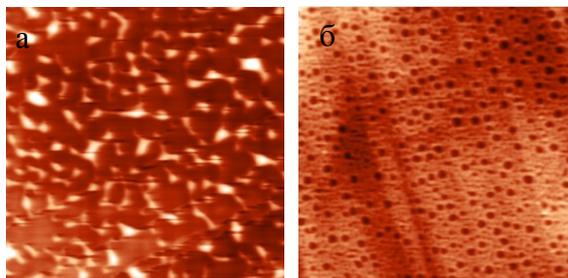


Рис. 2. АСМ-изображения молекул панкреатической РНКазы (а) и РНКазы *Bacillus intermedius* (б), адсорбированных на пирографите. Время взаимодействия с пирографитом 2 мин. Размер кадров 2×2 мкм.

При этом РНКазы *Bacillus intermedius* адсорбировалась на незаряженную поверхность пирографита, так же как и на заряженную поверхность слюды, – более эффективно, чем панкреатическая РНКазы.

Полученные в работе результаты позволяют заключить, что физическая адсорбция РНКаз зависит как от их физико-химических свойств и нативной структуры, так и от химической природы поверхности, и может сопровождаться перестройкой в структуре адсорбированного белка.

ИЗМЕРЕНИЕ ХАРАКТЕРИСТИК НЕРВНОГО ВОЛОКНА ПРИ ПОМОЩИ МЕТОДА ЛАЗЕРНОЙ ИНТЕРФЕРЕНЦИОННОЙ МИКРОСКОПИИ

А.И. Юсипович¹, Н.Н. Родионова¹, Е.З. Бибинейшвили¹, В.Л. Минаев²,
Г.В. Максимов¹

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

²Всероссийский научно-исследовательский институт оптико-физических измерений
nrodionova@mail.ru

При помощи метода лазерной интерференционной микроскопии (ЛИМ) неинвазивно оценивались морфофункциональные характеристики нервного волокна.

ЛИМ позволяет значительно увеличивать контраст биологических объектов без использования красителей. Это в первую очередь относится к клеткам и тканям. Также ЛИМ позволяет количественно измерять оптическую разность хода (ОРХ) – параметр, зависящий от геометрического размера исследуемого объекта по вертикали, и от его показателя преломления. ОРХ определяется по формуле:

$$\text{ОРХ}=(k-k_0)z, \quad (1)$$

где k_0 – показатель преломления окружающей среды, равный 1,34 для используемого физиологического раствора, k – показатель преломления объекта, зависящий от его состава, а z – высота объекта в точке измерения. Значение ОРХ в каждой точке составляет фазовое изображение объекта.

В работе использовался автоматизированный интерференционный микропрофилометр, разработанный в институте ВНИИОФИ (Москва, Россия) на базе микроинтерферометра Линника МИИ-4 (ЛОМО, Россия) с длиной волны лазера $\lambda=650$ нм.

Латеральное разрешение метода ЛИМ соответствует традиционному разрешению оптических микроскопов и определяется критерием разрешения Релея, однако, ЛИМ гораздо более чувствителен к изменению вертикальных размеров объекта. При исследовании нервного волокна разрешение по вертикали составляет $\lambda/200$, и равно 3,25 нм.

Миелиновое нервное волокно имеет достаточно сложное строение и представляет собой длинный отросток нейрона – аксон, многократно обернутый плазматическими мембранами Шванновских клеток, формирующими миелин (рис. 1) [1]. Поддержание сложной структуры миелинового нервного волокна необходимо для выполнения нерв-

ным волокном своей основной функции – проведения возбуждения.

Используя метод ЛИМ мы оценивали следующие параметры нервного волокна (рис. 1): диаметр нервного волокна и диаметр аксона в перехвате Ранвье, интернодали и насечке, длину перехвата Ранвье.

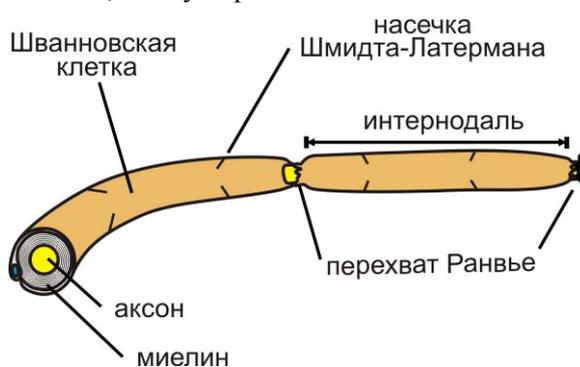


Рис. 1. Схематичное изображение миелинового нервного волокна.

Типичное фазовое изображение нервного волокна, а также сечения фазового изображения на различных его участках представлены на рис. 2.

Величина ОРХ зависит как от геометрии так и от показателя преломления объекта, что приводит к некоторым особенностям отображения нервного волокна при помощи метода ЛИМ (рис. 2).

Показатели преломления различаются на различных участках нервного волокна. Показатель преломления миелина определяется, главным образом, липидами и равен 1,43, показатель преломления цитоплазмы определяется водой и растворенными в ней белками и составляет около 1,35. Наличие разницы в показателях преломления приводит к тому, что участки, содержащие большое количество миелина имеют большую величину ОРХ (интернодаль, рис. 2г), чем участки, не имеющие миелиновой оболочки (перехват Ранвье, рис. 2в). Наличие заполненных различными гранулами каналов в области насечек также приводят к изменению фазового изображения волокна (рис. 2д).

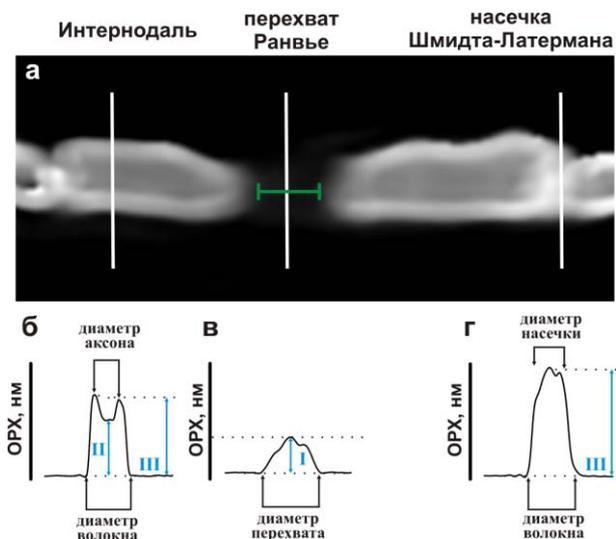


Рис. 2. Типичное фазовое изображение нервного волокна (а). Белыми линиями обозначены сечения различных участков нервного волокна, приведенных на рисунках б–г. Основываясь на сечениях определяли диаметр волокна на различных участках, а также диаметр аксона и насечки. Зеленый отрезок соответствует дине перехвата Ранвье. Синими стрелками указаны измеряемые величины ОРХ, характеризующие состояние волокна на различных участках: I – на перехвате Ранвье, II – в центральной части интернодали (характеризует состояние аксона), III – в области компактного расположения миелина (характеризует состояние миелина).

Различие показателей преломления на различных участках волокна приводит к тому, что мы оцениваем изменение высоты волокна по формуле (1) с разной точностью.

В той области, где вклад миелина в толщину волокна максимален (края интернодальной области), точность измерения составляет около 40 нм. В области перехвата Ранвье, где минимальна доля мембран, точность составляет около 300 нм. В остальных областях точность будет варьироваться в зависимости от доли миелина. Таким образом, в области интернодали можно оценивать нанометровые изменения геометрии миелинового волокна.

Следует также учитывать, что величина ОРХ зависит не только от толщины, но и от свойств объекта, главным образом от его показателя преломления. Таким образом, изменение величины ОРХ может отражать изменение внутренних структур волокна и отражать изменение его функциональных характеристик.

Оценивая ширину волокна на разных участках можно оценить его геометрию, а оценивая величину ОРХ и сравнивая с изменением геометрии, еще и функциональное состояние нервного волокна.

Список литературы:

1. Сотников О.С., Функциональная морфология живого мякотного нервного волокна М.: Наука, 1976.

ВИЗУАЛИЗАЦИЯ ТУЧНОЙ КЛЕТКИ *IN VITRO* В ПРОЦЕССЕ ДЕГРАНУЛЯЦИИ МЕТОДОМ ЛАЗЕРНОЙ ИНТЕРФЕРЕНЦИОННОЙ МИКРОСКОПИИ

А.И. Юсипович, А.А. Байжуманов, Е.Э. Граевская, М.Я. Ахалая
Кафедра биофизики биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова
yavor@newmail.ru

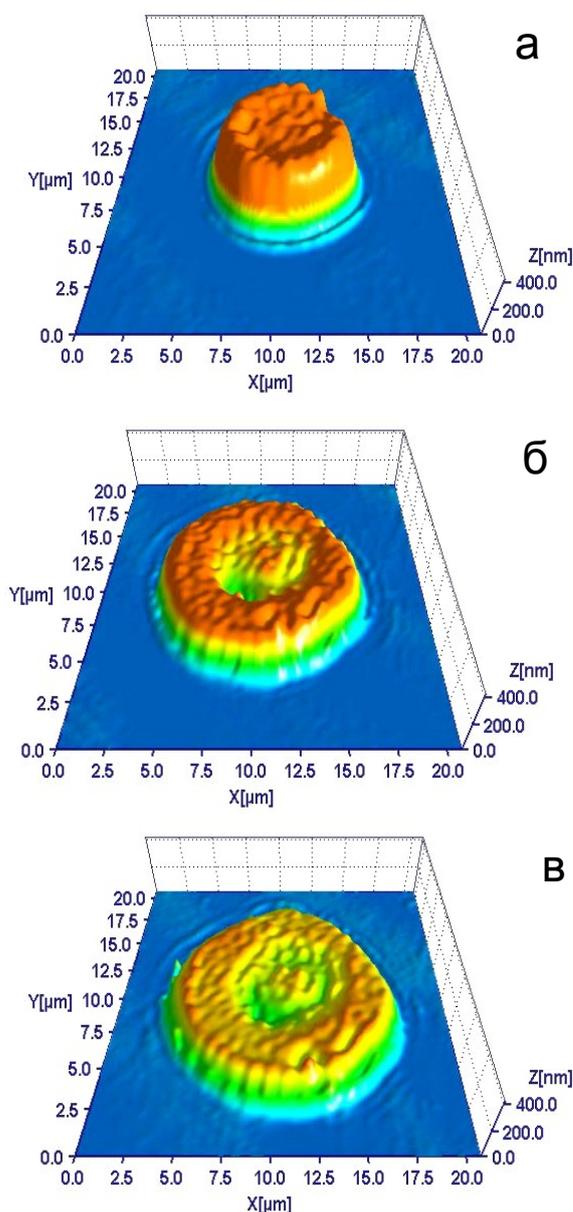


Рис. 1. Фазовое изображение тучной клетки в процессе дегрануляции через 0 (а), 20 (б) и 40 (в) минут после начала активации.

Для визуализации изменений, происходящих в тучной клетке (мастоците) крысы в процессе дегрануляции, использовали метод лазерной интерференционной микроскопии (ЛИМ).

Метод ЛИМ позволяет без применения красителей увеличить контраст изображения,

а также позволяет количественно оценить величину оптической разности хода (ОРХ) в каждой точке объекта. Величина ОРХ, или фазовая высота, зависит от произведения толщины объекта на разность показателей преломления объекта и среды (величины пропорциональной концентрации вещества в клетке).

Изменение величины ОРХ в каждой точке объекта называется *фазовым изображением* объекта. Используя это изображение можно оценить латеральные размеры (площадь) клетки, а также среднее значение ОРХ для нее.

Тучная клетка содержит гранулы, содержащие ряд медиаторов (гистамин, серотонин, цитокины, гепарин и другие), которые высвобождаются из клетки при дегрануляции. При этом, как было показано на фиксированных клетках [1], происходит миграция гранул к мембране, а затем слияние мембран гранул и внешней мембраны с последующим выбросом содержимого.

Активацию клетки проводили при помощи нецитотоксического либератора гистамина – вещества 48/80 в концентрации 0,25 мкг/мл.

Методом ЛИМ в условиях *in vitro* было установлено, что неактивированный мастоцит представляет из себя плотную однородную (поскольку все компоненты имеют похожие показатели преломления) клетку, содержащую большое количество гранул, которые на изображении выглядят как небольшие «бугорки» на поверхности (рис. 1а). В процессе дегрануляции наблюдается увеличение площади клетки и уменьшение средней величины ОРХ (величины, пропорциональной толщине клетки). В процессе дегрануляции на фазовом изображении начинает хорошо просматриваться ядро, что обусловлено перераспределением вещества в клетке, тем что гранулы скапливаются вблизи мембраны клетки.

Список литературы:

1. Deng Z, Zink T, Chen HY, Walters D, Liu FT, Liu GY., *Biophys J.*, 96(4), 1629–39 (2009).

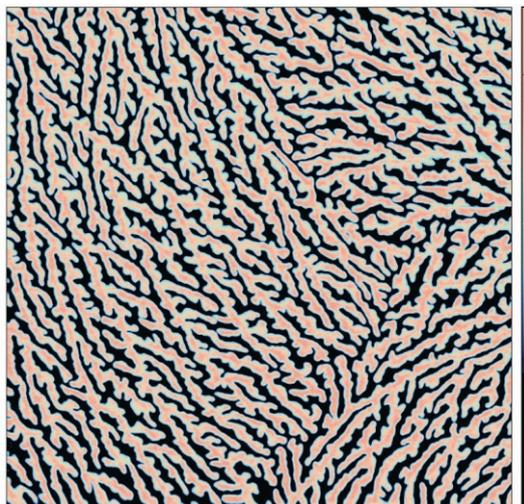
Конкурс изображений

BioImage

Багров Дмитрий Владимирович

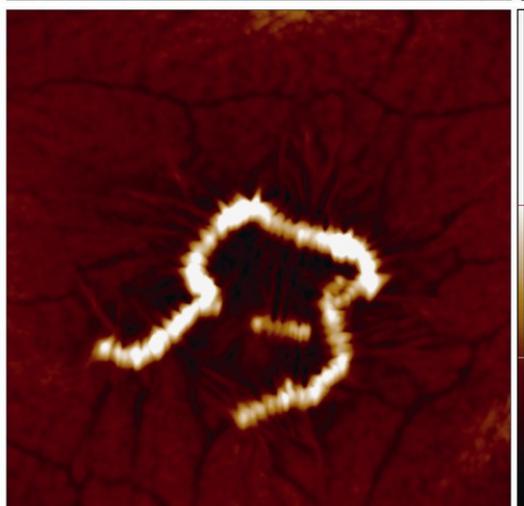
Биологический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова

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

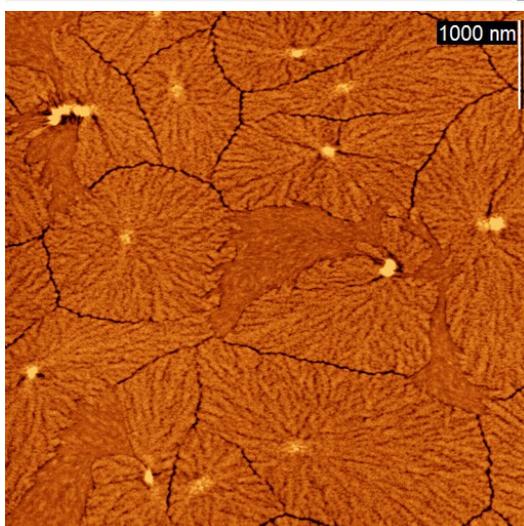


Водоросли. Разветвленная структура из поли(оксибутирата) на слюде, плоскость ламели параллельна плоскости подложки.

Размер кадра $2 \times 2 \text{ мкм}^2$, перепад высот 6,6 нм. Изображение получено на приборе Solver PRO.



Сороконожка. сложная структура из стопок ламелей поли(оксибутирата) на слюде. Размер кадра 2 мкм x 2 мкм x 41 нм. Изображение получено на приборе Solver PRO.

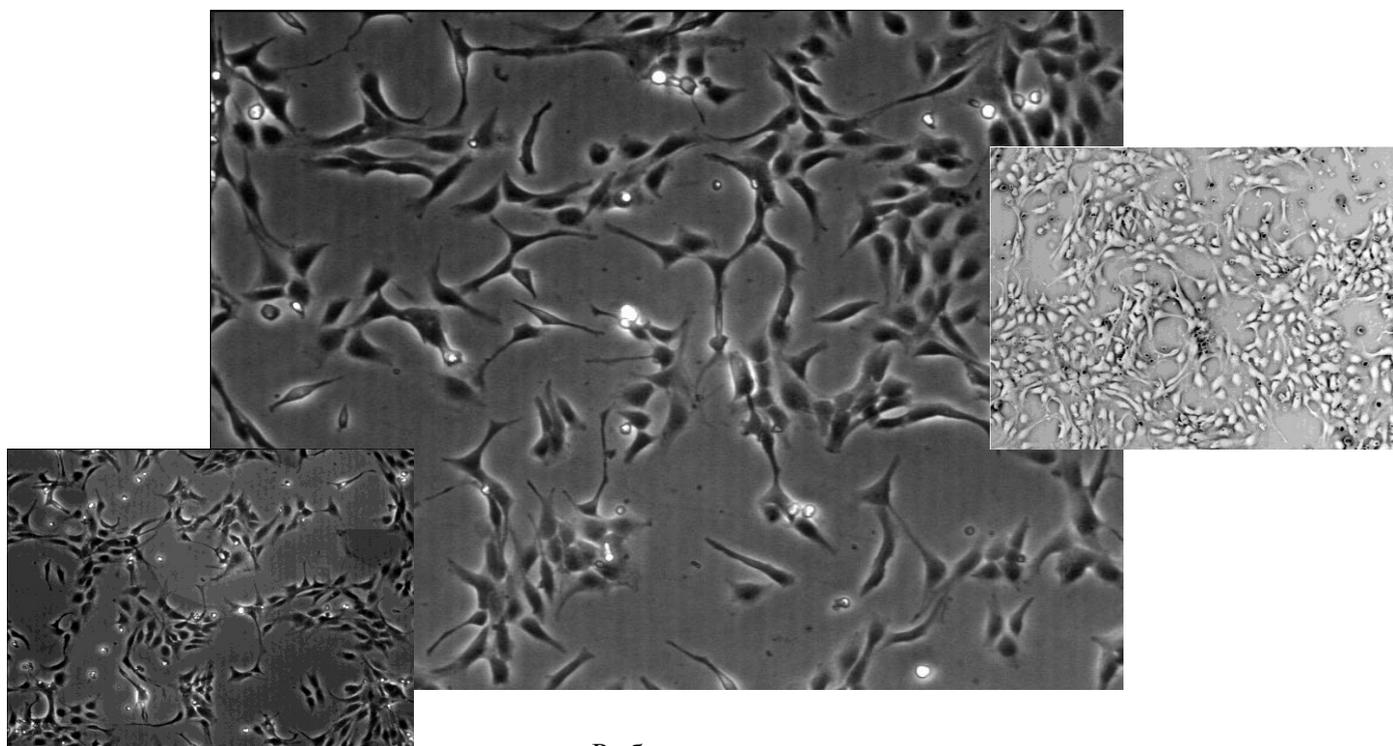


Цветы. двумерные сферолиты из поли(оксибутирата) на слюде. Между ними наблюдаются области, заполненные ламелями расположенными на ребре, и по-видимому, аморфным полимером. Изображение получено на приборе Solver PRO.

BioImage

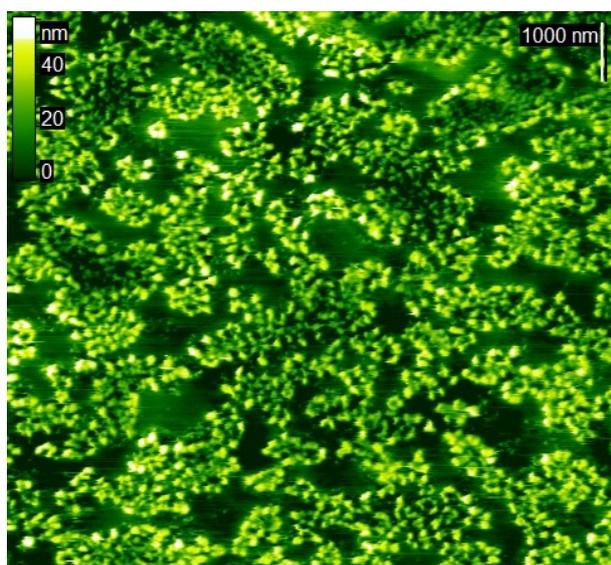
Будник Оксана

*Международный центр «Институт прикладной оптики», Киев, Украина
Микроскоп: инвертирующий микроскоп TE 200 (Nikon, Япония)*



Рыбки игры

Изображения нейронных клеток (GT1-7, иммортализованные клетки гипоталамуса) на пластиковой подложке, полученные на инвертирующем микроскопе. Картинки получены в соавторстве с Паоло Ариано (Туринский Университет) и Андреем Будник (Институт физики НАНУ).



Синицына Ольга

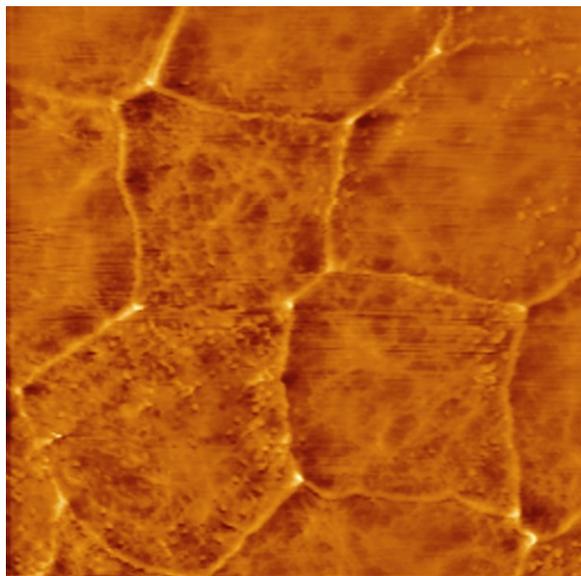
ИНЭОС РАН, Москва

*Микроскоп: атомно-силовой микроскоп
ФемтоСкан (ЦПТ, Россия)*

Цветы сульфида меди на полимерной поляне

АСМ-изображение поверхности органо-неорганической наноконпозиции, содержащей кремнийорганический блоксополимер и частицы сульфида меди. Образец получен Н.В. Черкун, Н.В. Сергиенко, Б.Г. Завином в ИНЭОС РАН.

BioImage



Ефремов Юрий

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

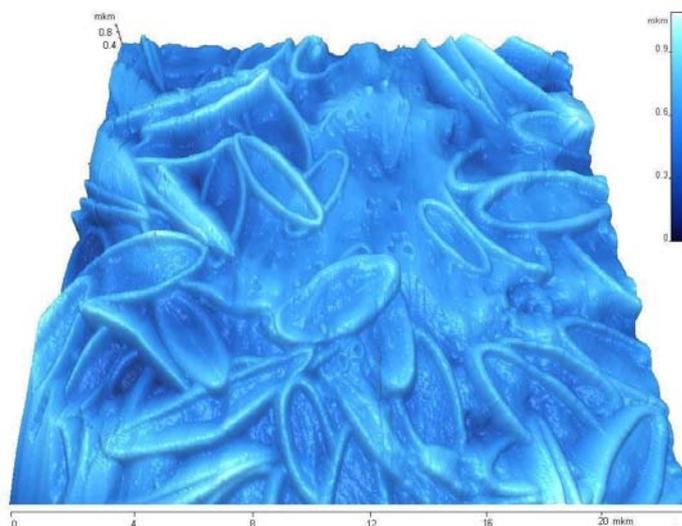
Изображения поверхности живого эмбриона шпорцевой лягушки *Xenopus laevis*.

Е.А. Ермоленко, А.С. Васильченко, А.О. Плотников

Оренбургский государственный университет

Институт клеточного и внутриклеточного симбиоза УрО РАН, Оренбург

Микроскоп: атомно-силовой СММ-2000 (ЗАО «КПД», Россия)



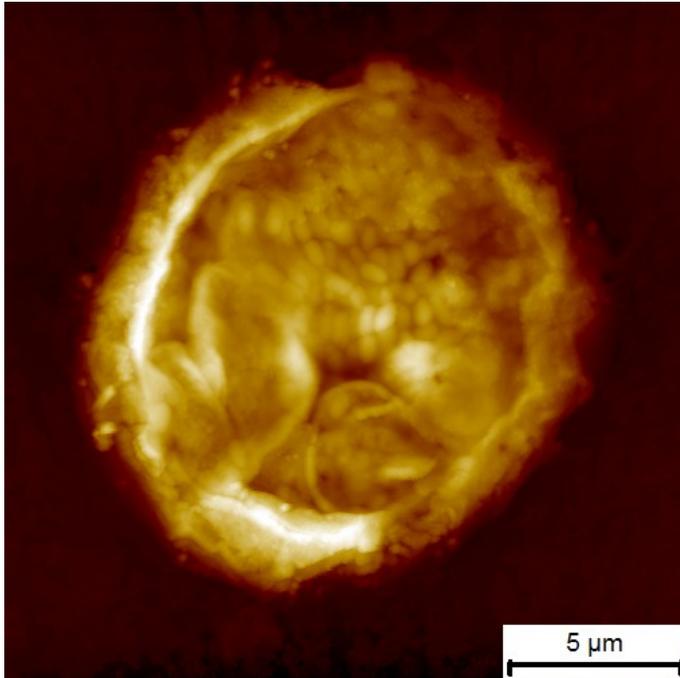
Представлены АСМ-изображения элементов клеточной поверхности протистов отряда *Centrohelida*, для дифференциации и таксономии которых используются основные морфологические признаки элементов наружной клеточной оболочки – чешуек и спикул. Изображение получено в режиме постоянного контакта кантилеверами MSCT-AUNM (PSI, США).

Обработка изображений производилась с использованием программы Femtoscan.2.3.106.

BioImage

Петухова Дарья

УЦКП «Современные нанотехнологии» УрГУ имени А.М.Горького
Микроскоп: атомно-силовой микроскоп NTEGRA Thermo (НТ-МДТ, Россия)



За мембраной.

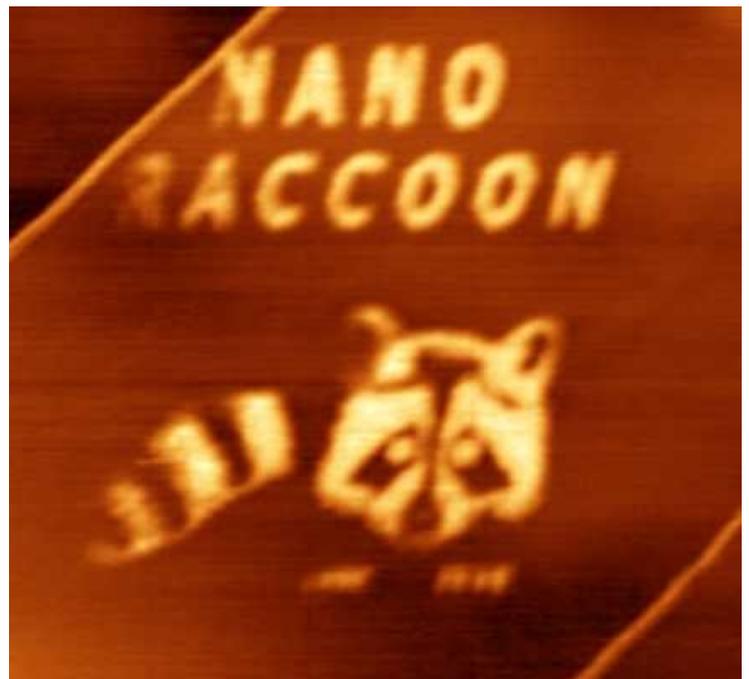
Изображение альвеолярного макрофага крысы на слюде, полученное полуконтактной методикой атомно-силовой микроскопии.

Швец Виолетта

Физический факультет МГУ имени М.В. Ломоносова
Микроскоп: атомно-силовой микроскоп ФемтоСкан (ЦПТ, Россия)

Наноенот.

Изображение енота получено с помощью локального анодного окисления ВОПГ. Размер кадра 1144×1144 нм².

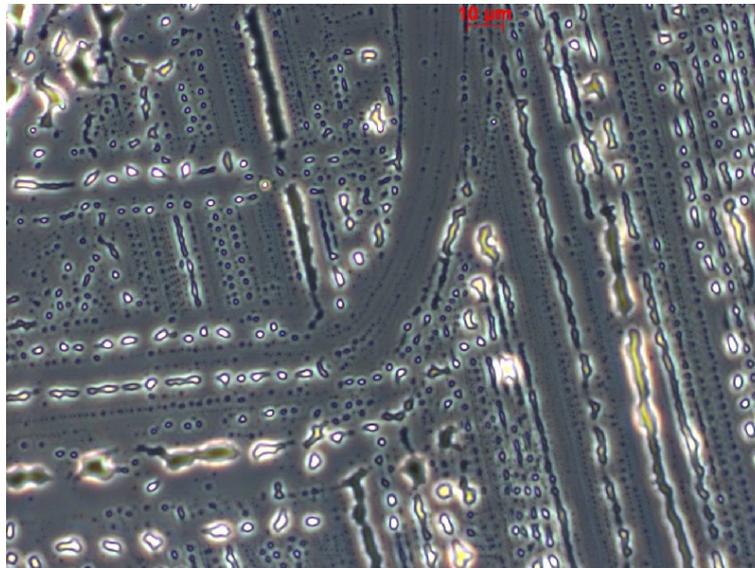


BioImage

Филатова Наталия

Тульский государственный университет

Микроскоп: оптический микроскоп AXIO imager A1 (Zeiss, Германия)

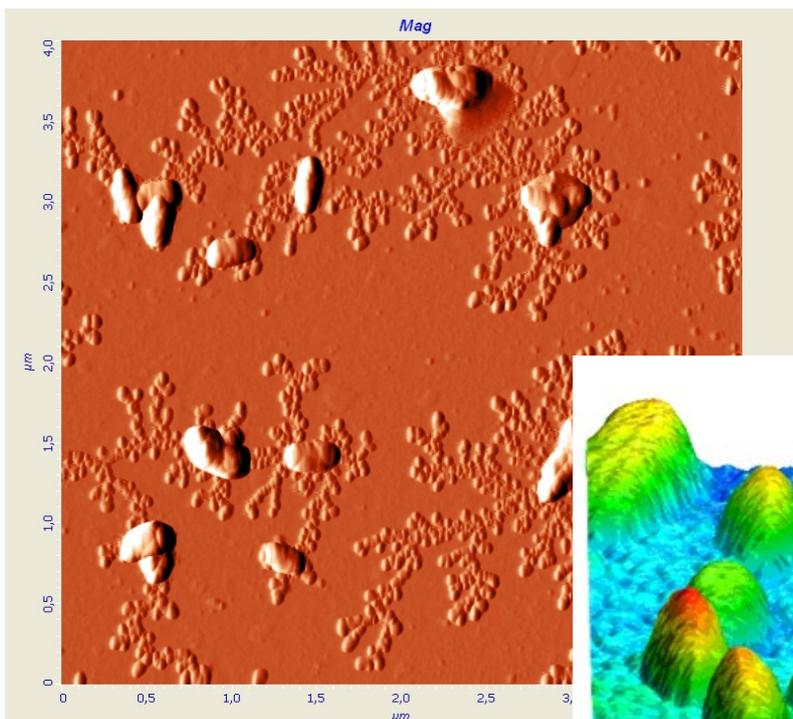


Модифицированный поливиниловый спирт.

Трушин Максим Викторович

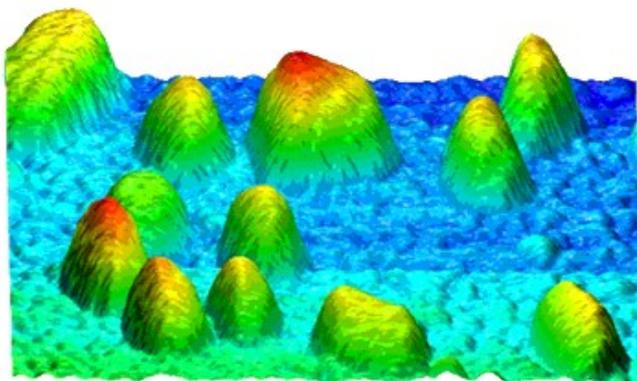
Казанский федеральный университет

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



M. gallisepticum S6 cells. AFM image of typical *M. gallisepticum* S6 cells surrounded with numerous formations similar to membrane vesicles. Signal from lock-in amplifier.

3D AFM image *A. laidlawii* PG8 cells cultivated at cold stress.



ФемтоСкан Онлайн

наноскопия в формате 3D

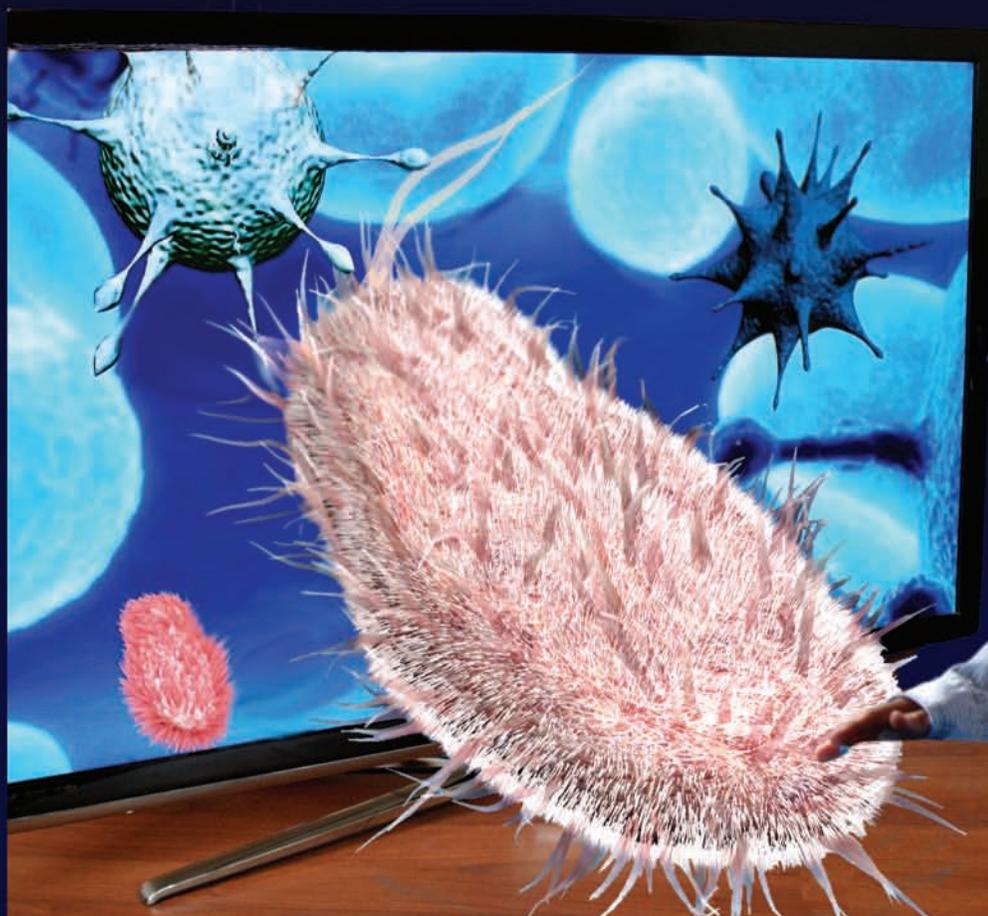
Уникальное программное обеспечение ФемтоСкан Онлайн позволяет не только дистанционно управлять микроскопом, но и строить стерео изображения. Теперь с помощью микроскопа ФемтоСкан Вы сможете по-настоящему погрузиться в увлекательное путешествие в мир нано

В комплект входят:

- сканирующий зондовый микроскоп ФемтоСкан
- персональный компьютер
- широкоформатный 3D монитор
- программное обеспечение для управления микроскопом и построения трехмерных изображений
- комплект образцов и расходных материалов

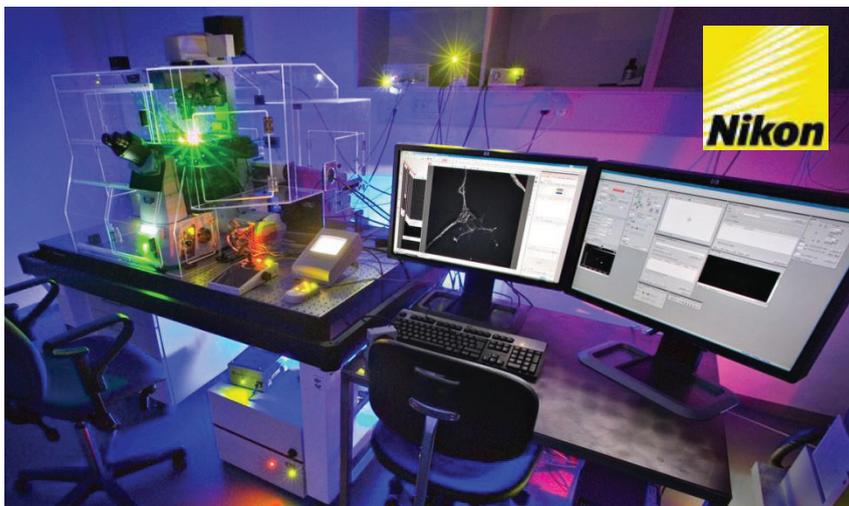


Взгляд в наномир в полном объеме



Инновационные технологии Nikon (Япония) для получения изображений высокого и сверхвысокого разрешения

- Системы микроскопии Nikon сверхвысокого разрешения позволяют достичь разрешения 20 нм.
- Исследования быстрых процессов с помощью резонансных лазерных сканирующих конфокальных микроскопов Nikon (до 420 кадр/сек) позволяют получать 3-мерные изображения с высоким разрешением и чувствительностью.
- Микроспектральные исследования с шагом спектра 2 нм, точностью 0,25 нм и скоростью регистрации изображений 4 кадра/с в системах A1Rsi.



Микроскопия Nikon

Nikon мировой лидер в области технологий визуализации с 1917 года. Компания Nikon производит готовые оптические и цифровые системы микроскопии для любого приложения. Высочайшее качество оптики, фирменные алгоритмы обработки изображения и связанная с этим престижность обладания техникой Nikon – это конкурентные преимущества компании на рынке световой микроскопии.

- Микроскопы сверхвысокого разрешения N-SIM / N-STORM
- Многофотонные микроскопы A1RMP
- Лазерные сканирующие конфокальные микроскопы серий A1, A1R, C2
- Биостанции
- Измерительные микроскопы
- Системы анализа и обработки изображений
- Поляризационные микроскопы
- Микроскопы для электрофизиологии
- Стереомикроскопы
- Исследовательские и учебные микроскопы
- Настольный растровый электронный микроскоп NeoScope

О компании Stormoff

Компания Stormoff основана в 1992 году и в настоящее время является крупной международной торговой компанией с головным офисом в Москве, занимающейся оснащением медицинских учреждений, научно-исследовательских институтов и центров ВРТ.

- Команда квалифицированных менеджеров и инженеров
- Официальный дистрибьютор более 50 производителей медицинской техники
- Поставка оборудования с заводов-производителей и со склада готовой продукции в Москве
- Адаптация оборудования под отечественные условия работы и ввод ее в эксплуатацию
- Обучение специалистов новым методикам и технологиям работы
- Гарантийное и постгарантийное обслуживание поставляемого оборудования

Работая с нами, Вы используете богатый опыт нашей компании и других лабораторий, с которыми мы сотрудничаем.

НАНОЭДЬЮКАТОР II

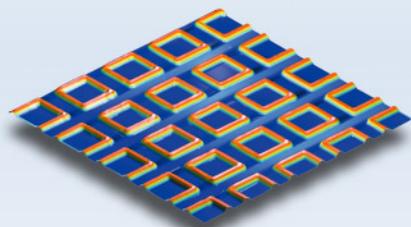
10⁻⁹ m

Учебно-научный комплекс на основе сканирующего зондового микроскопа, подходящий как для формирования обучающей нанолаборатории, так и для научных исследований.

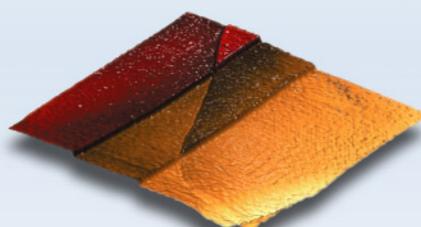


- Полностью цифровой контроллер
- Сканер 100x100 мкм с емкостными датчиками
- Атомарное разрешение
- Простота и удобство настроек

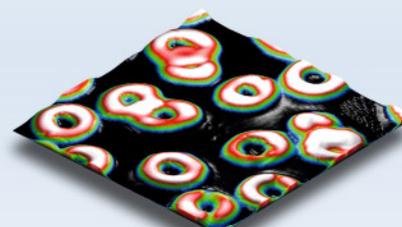
- Защита от случайных поломок
- Комплект учебно-методических пособий
- Управление через Интернет
- Доступная цена



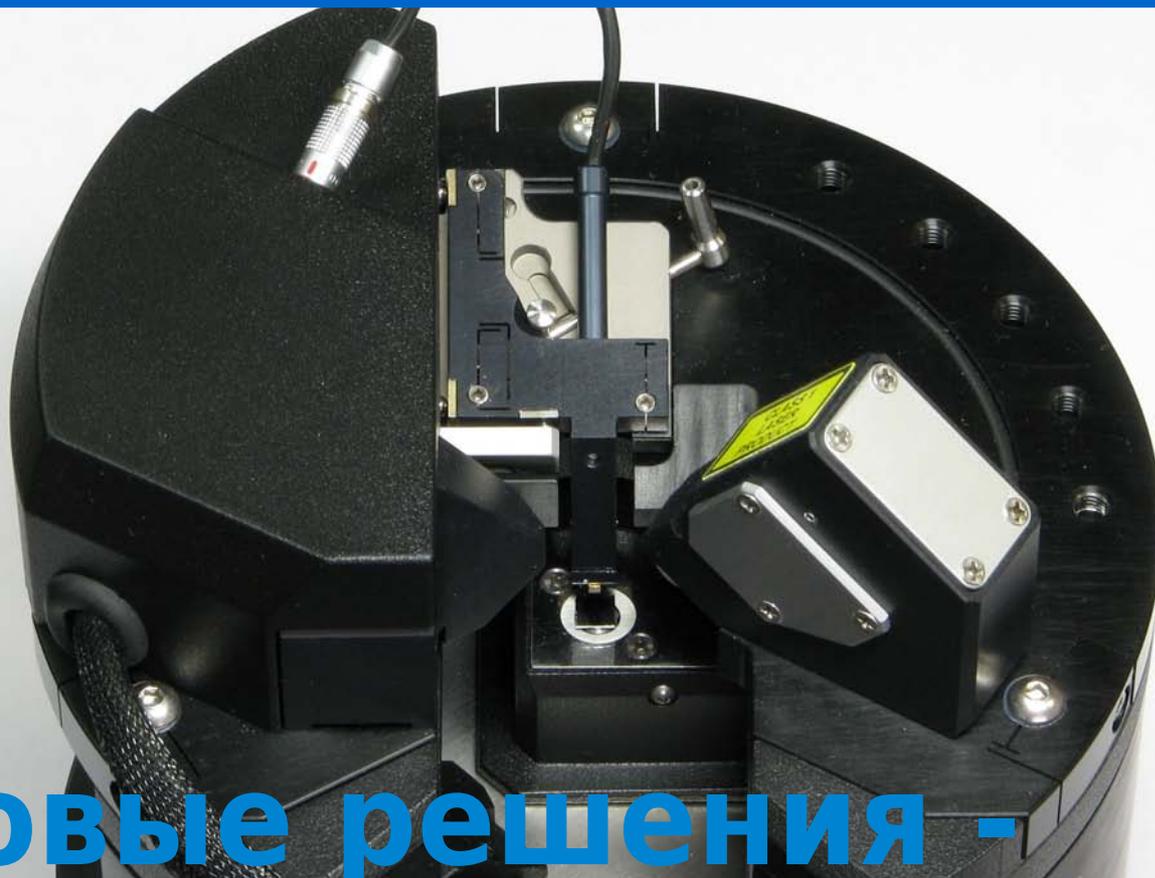
АСМ изображение калибровочной решетки.
Размер 70x70x1 мкм



СТМ изображение поверхности графита.
Размер 800x800 нм



АСМ изображение эритроцитов человека.
Размер 35x35 мкм

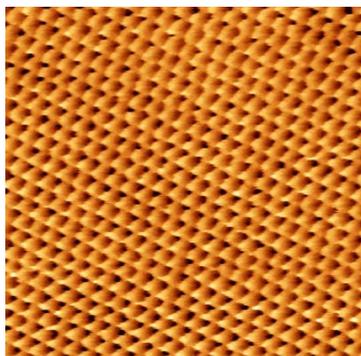


Новые решения -

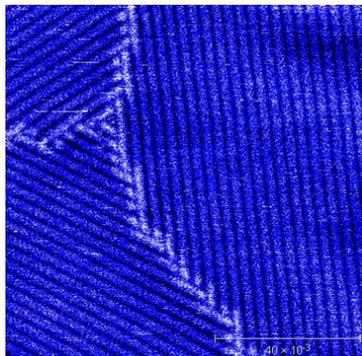
Новые возможности

для изучения свойств поверхности на нанометровом уровне

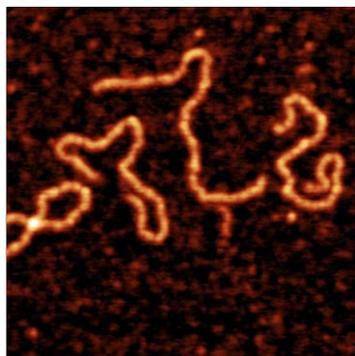
- ✓ Полностью автоматическая настройка прибора - меньше 5 минут от включения до сканирования
- ✓ Уникальный быстрый сканер
- ✓ Высокая точность сканирования (нелинейность по XY < 0.03%, по Z < 0.1%)
- ✓ Сверхвысокое разрешение, вплоть до атомарного, на 100 мкм сканере
- ✓ Возможность измерять фоточувствительные образцы, не оказывая на них влияния, благодаря применению ИК лазера регистрирующей системы с длиной волны 1300 нм
- ✓ Удобное решение для интеграции СЗМ с оптическими методами (рамановская и конфокальная микроскопия)



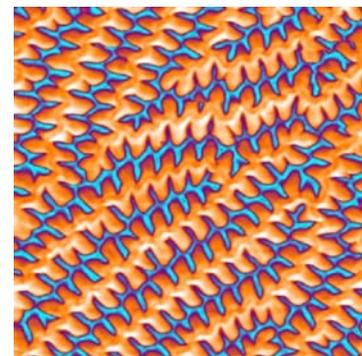
Графит (ВОПГ)
Контактный АСМ, скан 3.2 нм



Алкановый слой C₂₈H₅₈
Бесконтактный АСМ, скан 100 нм



Молекулы ДНК (832 bp)
Бесконтактный АСМ, скан 220 нм



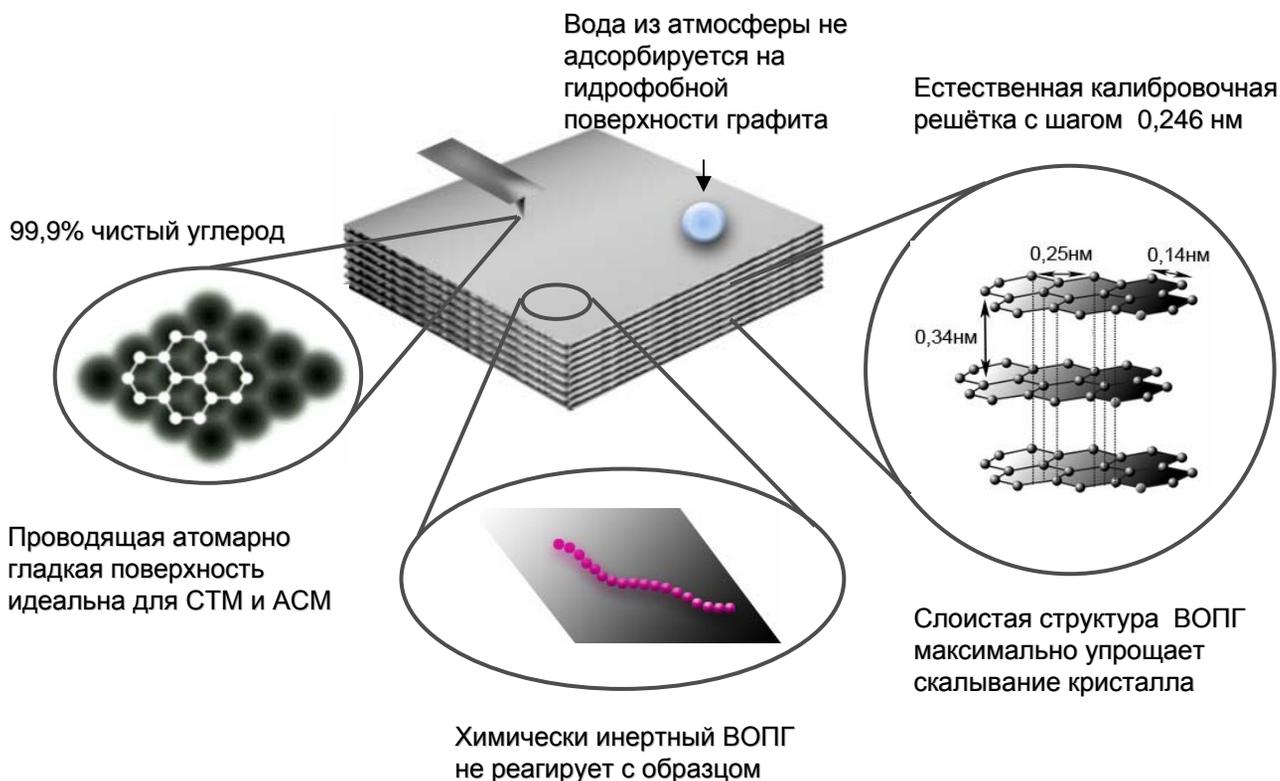
Пленка железоиттриевого граната
МСМ изображение, скан 42 мкм

ООО "АИСТ-НТ"

Россия 124460, Москва, Зеленоград
2-й Западный проезд, д. 1, стр. 1
Тел.: +7-499-995-09-54
Факс: +7-499-995-09-56
E-mail: info@aist-nt.ru
Web: http://www.aist-nt.ru

AIST-NT
Advanced Integrated Scanning Tools for Nano-Technology

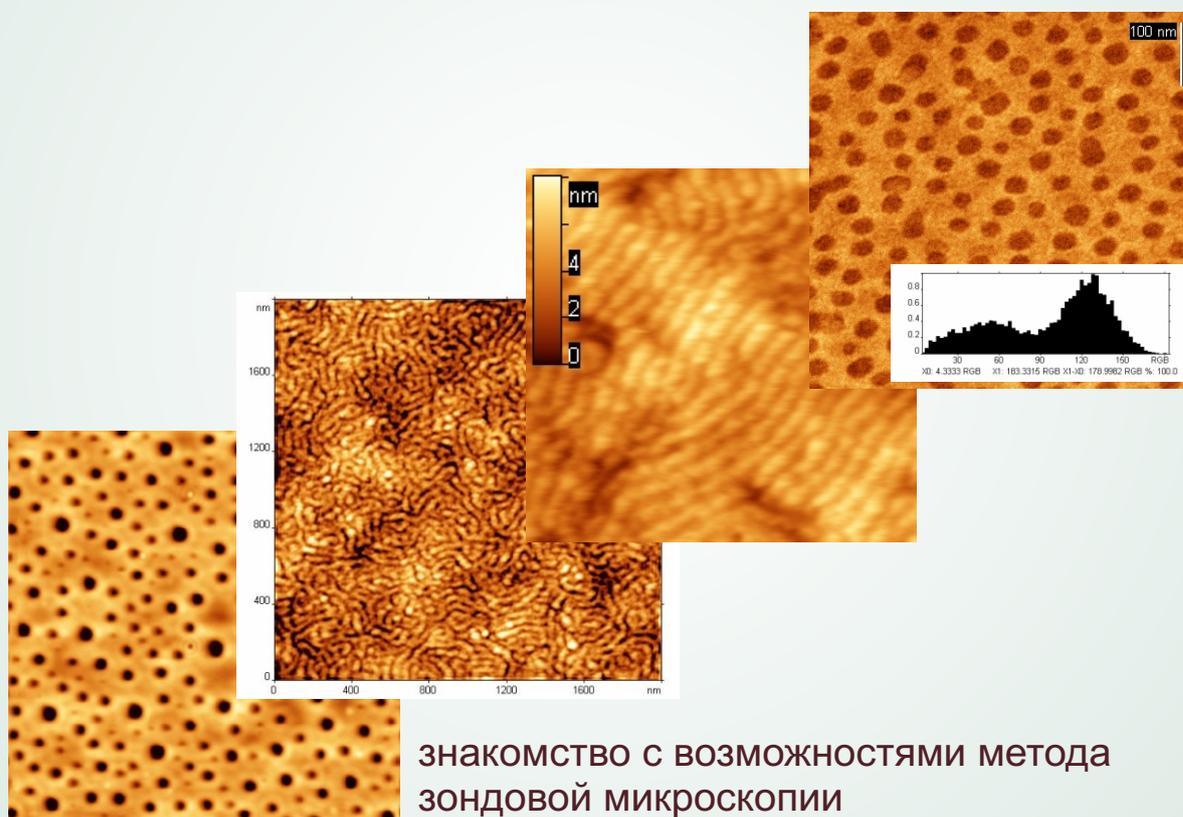
ВОПГ подложки для сканирующей зондовой микроскопии Центр перспективных технологий



| | |
|--|---|
| Межплоскостное расстояние (002) | 3.354-3.358 Å |
| Плотность | 2.24-2.25 г/см ³ |
| Теплопроводность параллельно (002) | 1700+/-100Вт/(м·К) |
| Теплопроводность перпендикулярно (002) | 8+/-1 Вт/(м·К) |
| Коэффициент теплового расширения параллельно (002) | -1x10 ⁻⁶ К ⁻¹ |
| Коэффициент теплового расширения перпендикулярно (002) | 20x10 ⁻⁶ К ⁻¹ |
| Электропроводность параллельно (002) | 2.1+/-0.1x10 ⁶ [(Вт·м) ⁻¹] |
| Электропроводность перпендикулярно (002) | 5x10 ² [(Вт·м) ⁻¹] |
| Чистота | > 99.99 % |

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

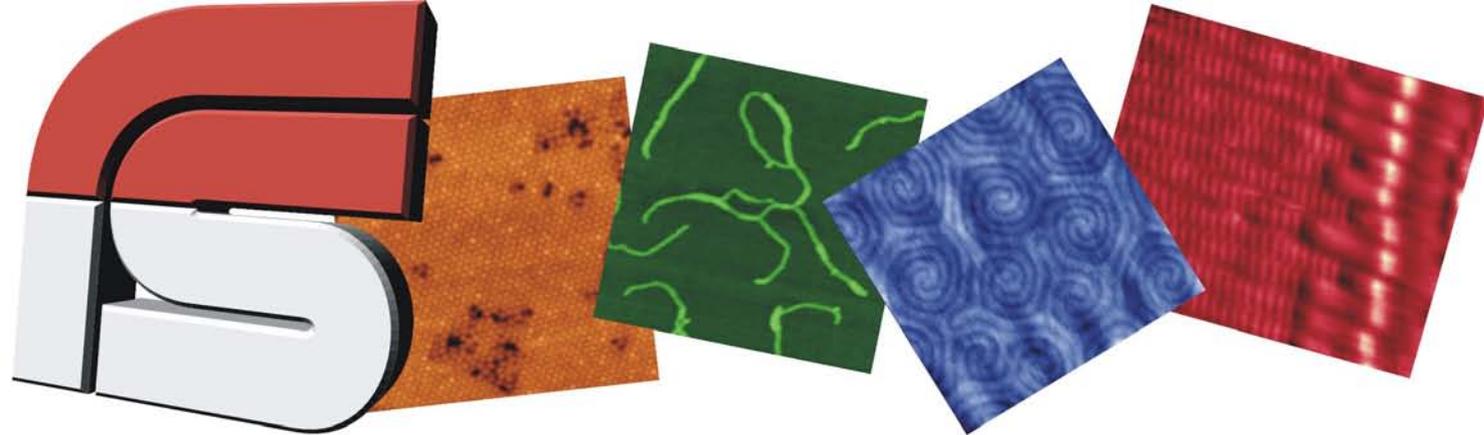
Большакова А.В., Киселёва О.И., Никонорова Н.И., Яминский И.В.



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

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

**Москва
2008**



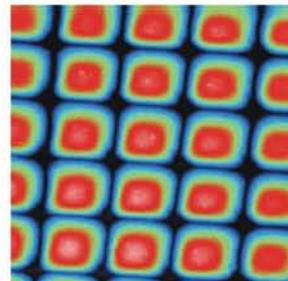
Центр перспективных технологий

www.nanoscopy.net, sptm@nanoscopy.net, (495) 926-37-59

Практикум по наноскопии – это увлекательное путешествие в мир атомов и молекул

Практикум комплектуется

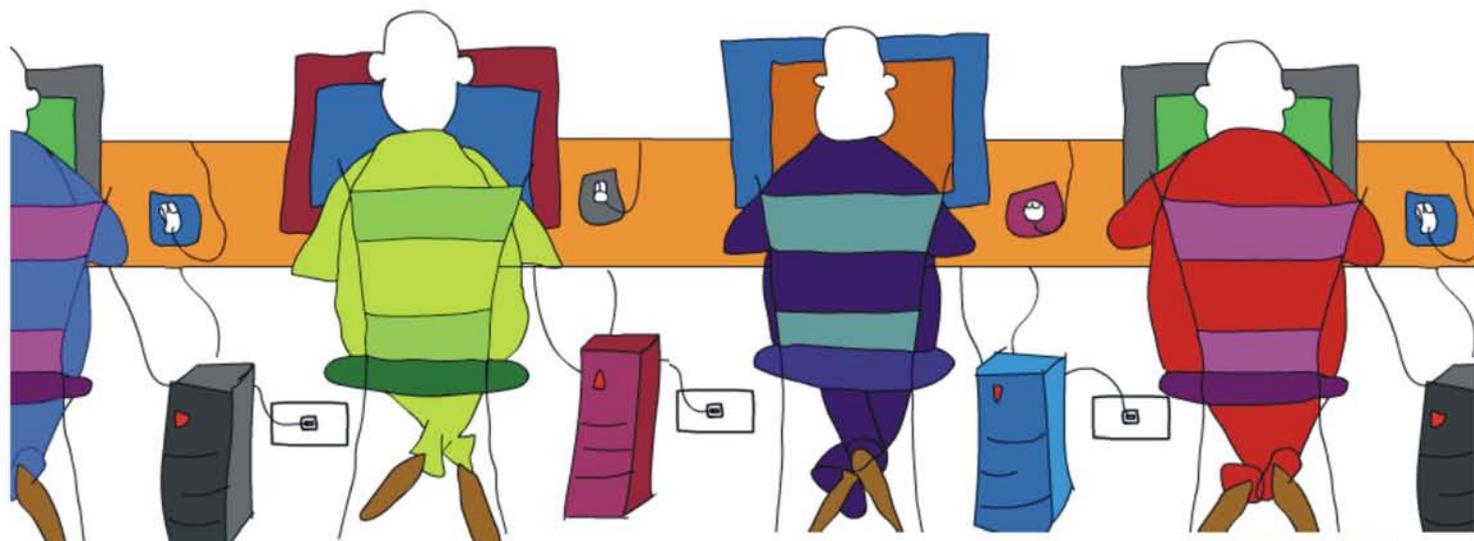
- ✎ сканирующим зондовым микроскопом “ФемтоСкан”
- ✎ компьютерами с большими экранами
- ✎ наборами образцов и наглядными описаниями
- ✎ программным обеспечением для управления микроскопом и построения трехмерных картинок



В практикуме Вы приобретаете полезные навыки работы на микроскопе. Доступны режимы туннельной, атомно-силовой, резистивной, электростатической, магнитно-силовой микроскопии и нанолитографии.

**Технологии открытого
интернет образования по
наноскопии**

5+

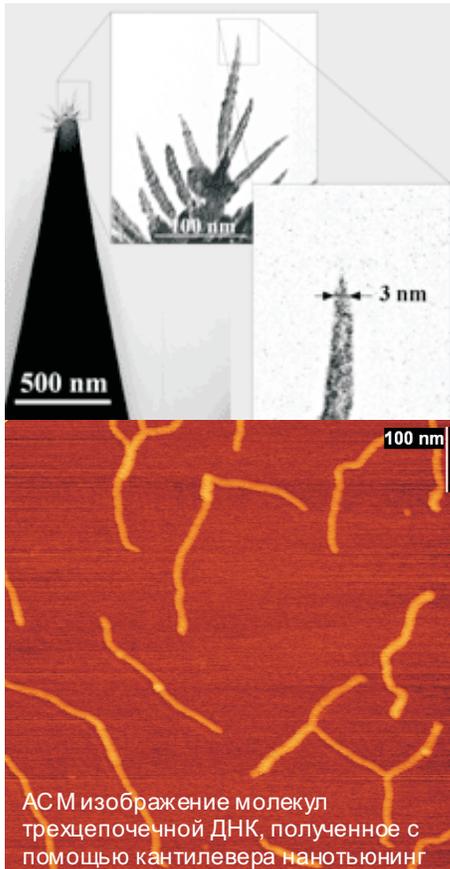


ФемтоСкан™. Сканирующие зондовые микроскопы, программное обеспечение, расходные материалы и аксессуары для нанотехнологии.

ATC
ADVANCED TECHNOLOGIES CENTER



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

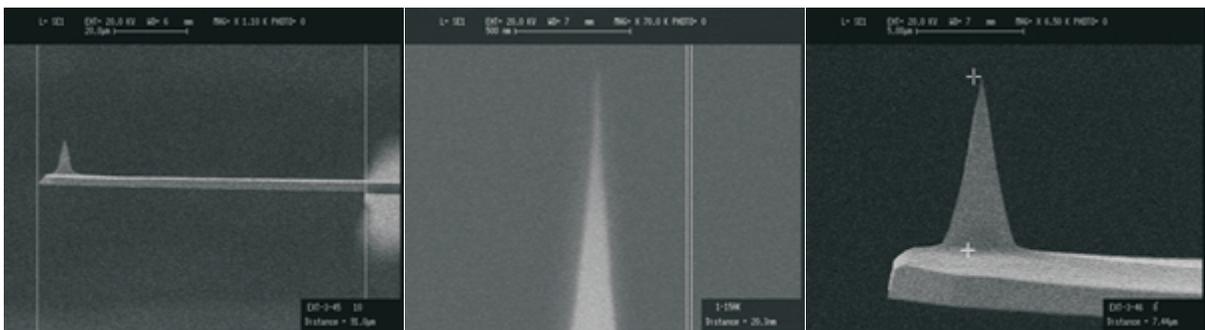


АСМ изображение молекул
трехцепочечной ДНК, полученное с
помощью кантилевера нанотьюнинг

Нанотьюнинг – кантилевер высокого разрешения

- Сверхострые зонды из алмазоподобного углерода
- Радиус зонда ~1 нм
- Наблюдаемый диаметр молекул ДНК 14-17 нм

Кремниевые кантилеверы



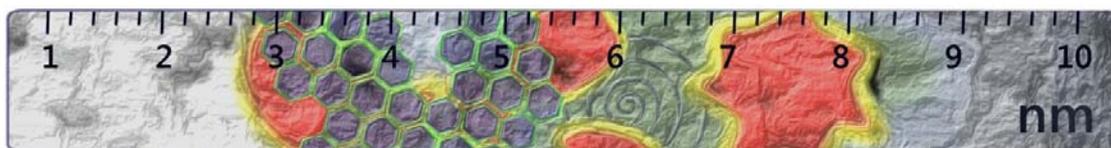
- Кантилеверы для всех видов зондовой микроскопии
- Большой выбор размеров и характеристик
- Категория "Super" — радиус скругления иглы менее 10 нм
Категория "Standard" — радиус скругления иглы менее 25 нм
- Проводящее и магнитное покрытие

Многофункциональный сканирующий зондовый микроскоп ФемтоСкан



- Более 50 режимов сканирования
- Регулируемая температура образца
- Полное управление микроскопом через Интернет
- Возможность сканирования на воздухе и в жидкости

Современные достижения бионаноскопии



Сборник тезисов пятой международной конференции
"Современные достижения бионаноскопии". 15–17 июня 2011
года, Москва, физический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова
— 90 с.

Генеральный спонсор:

ЗАО «Центр перспективных технологий»

Спонсоры:

ЗАО «НТИ»

ООО «STORMOFF group of companies»

ООО «Аист-НТ»

ООО «Нано Скан Технологии»

ЗАО «Техносистема Н»

<http://www.nanoscopy.org/bionanoscopy/>