

## ФУНКЦИОНАЛИЗАЦИЯ АМИНОМОДИФИЦИРОВАННЫХ ЗОНДОВ ДЛЯ АТОМНО-СИЛОВОЙ МИКРОСКОПИИ

© 2006 г. А.П. Лиманский

*Институт микробиологии и иммунологии им. И.И. Мечникова АМН Украины, 61057, Харьков, Украина;*

*Laboratory of Plasma Membrane and Nuclear Signaling, Graduate School of Biostudies, Kyoto University,  
Kyoto, 606-8502, Japan*

*E-mail: o.lymunskiy@mail.ru*

Поступила в редакцию 26.08.05 г.

Получены зонды для атомно-силовой микроскопии, функционализированные бычьим сывороточным альбумином, которые могут быть использованы для изучения процессов молекулярного узнавания. Процедура модификации и функционализации зондов включает три этапа. Сначала посредством модификации в парах производного аминоксилана получают аминоконцы; затем к их поверхностным аминокетильным группам ковалентно присоединяется аминокетильный гомобифункциональный линкер. На заключительном этапе зонд функционализируется молекулами альбумина. Полученные зонды были охарактеризованы на различных этапах модификации посредством атомно-силовой микроскопии в режиме силовых измерений - из силовых графиков определены сила адгезии и работа силы адгезии. Процесс модификации поверхности зонда был подтвержден визуализацией молекул альбумина и суперспиральной ДНК pGEMEX, иммобилизованных на стандартной аминокетильной и аминокетильной, модифицированной линкерным агентом.

*Ключевые слова: силовые измерения, атомно-силовая микроскопия, функционализация зонда, гомобифункциональный линкер, силовая спектроскопия узнавания.*

С помощью атомно-силовой микроскопии (АСМ) было выполнено множество исследований с целью получения изображений с высоким разрешением ДНК, протеинов, клеток и клеточных органелл [1-5]. АСМ также успешно применялась для непосредственного измерения силы, требуемой для разделения молекулярных комплексов, образованных молекулами, которые адсорбированы на поверхностях АСМ-зонда и субстрата. Это направление АСМ, позволяющее определить силы взаимодействия единичных пар молекул, получило сначала название химической силовой микроскопии, а впоследствии стало мощным методом исследования на молекулярном уровне - методом силовой микроскопии узнавания единичных молекул (single molecule recognition force microscopy) [6-10]. Ключевым моментом для проведения такого рода исследований является иммобилизация молекул на поверхности АСМ-зонда.

Функционализация АСМ-зондов биомолекулами (в первую очередь белками) позволяет не только исследовать микромеханические свойства молекул, макромолекул и клеток, силы, удерживающие белки в клеточной мембране, но определять с помощью зондов с иммобилизованными антителами или другими специфическими рецепторами локализацию различных белков, полисахаридов, иРНК с нанометровым разрешением внутри как живой клетки, так и клеточного ядра. Например, поскольку локализация иРНК в отдельных областях цитоплазмы является важным элементом посттранскрипционного контроля, был разработан метод исследования экспрессии генов в единичных живых клетках без их существенного нарушения [11]. С помощью модифицированного АСМ-зонда, прижатого к клеточной поверхности, из клетки экстрагировали иРНК, и с помощью обратной транскрипции и последующей полимеразной цепной реакции амплифицировали фрагменты молекул специфических иРНК.

Существует достаточно широкий спектр вариантов модификации и последующей функционализации зонда (т.е. ковалентного присоединения, как правило, биомолекул к поверхно-

Сокращения: АСМ - атомно-силовая микроскопия, БСА - бычий сывороточный альбумин, ПЭГ - полиэтиленгликоль, АПТЭС - 3-аминопропилтриэтоксисилан, ДСС - дисукцинимидил субстрат, ЭГС - этиленгликоль-бис(Н-гидроксисукцинимидный эфир янтарной кислоты).

сти зонда). Общая схема функционализации зонда, которая может быть выполнена в два-три этапа (в зависимости от используемых реактивов), выглядит следующим образом:

зонд => модифицированный зонд =>  
=>функционализированный зонд.

В качестве модифицированного зонда в данной работе использован аминозонд, а в качестве функционализованного - аминозонд с присоединенной биомакромолекулой бычьего сывороточного альбумина (БСА).

Наиболее широкое распространение получили методы, основанные на использовании производных аminosилана с последующим связыванием макромолекулы через гибкий кросс-линкерный агент (зачастую в качестве линкера используют производные полиэтиленгликоля (ПЭГ) различной молекулярной массы). Так, например, в работе [12] для иммобилизации биотина на поверхности зонда использован линкер на основе ПЭГ 800, имеющий длину 8 нм. Отметим, что на каждом этапе модификации, в свою очередь, возможно несколько вариантов. Широко применяемым методом модификации зондов является силиконирование, которое, однако, имеет определенные ограничения в случае длительных измерений. Как альтернативу силиконированию используют адсорбцию тиогрупп на поверхности зондов, покрытой тонким слоем золота, - при этом образуется ковалентная связь Au-S. В свою очередь, модификация аминогруппами может быть выполнена либо в жидкости (с образованием самоассоциированных монослоев) с использованием ряда реагентов (этанолamina, 3-аминопропилтриэтоксисилана (АПТЭС), аminosилатрана), либо в газовой фазе (с использованием АПТЭС) [13].

Функционализированные зонды должны соответствовать определенным требованиям. Во-первых, между зондом и протеином (или линкером) должна быть образована сильная связь (как правило, ковалентная) для предотвращения удаления протеина в процессе силовых измерений. Во-вторых, неспецифическая адгезия между зондом и субстратом должна быть минимизирована. В-третьих, очень важно, чтобы после иммобилизации на поверхности зонда молекулы белка сохраняли нативное состояние, т.е. способность связываться с комплементарными молекулами (лигандами). Также необходимо, чтобы плотность лигандов на поверхности субстрата была достаточно высокой, по крайней мере 100 лигандов/мкм<sup>2</sup> для достижения значительной частоты актов узнавания. Кроме того,

желательно предусмотреть возможность регулировки (а именно уменьшения) плотности протеинов, иммобилизованных на поверхности зонда. С этой точки зрения, весьма перспективной выглядит разработанная ранее нами технология получения аминослюды с регулируемой поверхностной плотностью заряда - как с уменьшенной, так и с увеличенной поверхностной плотностью аминогрупп [14].

В данной работе проведена функционализация аминозондов гомобифункциональным аминореакционным линкером с последующей иммобилизацией БСА. Функционализированные зонды были охарактеризованы посредством атомно-силовой микроскопии в режиме силовых измерений - определены сила адгезии и работа силы адгезии как после каждого этапа модификации и функционализации зондов, так и только после последнего этапа ковалентного присоединения белка для обеспечения максимальной нативности функционализованного зонда. Поскольку поверхности немодифицированного и функционализованного зонда по своим поверхностным свойствам подобны поверхностям свежесколотой и модифицированной слюды соответственно, в качестве дополнительного контроля процесса функционализации использовали визуализацию молекул ДНК и БСА, иммобилизованных на модифицированной слюде.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

**Модификация зондов.** Для предмодификационной очистки зонды из нитрида кремния с золотым напылением промывали хромовой смесью, тщательно ополаскивали ультрачистой водой с удельным сопротивлением ~ 17 МОм/см, полученной с помощью установки Milli Q (Millipore, США), обдували аргоном и на заключительном этапе воздействовали коротковолновым УФ-излучением высокой интенсивности в течение 45 минут. Процедуру получения аминозондов (модифицированных зондов, поверхность которых равномерно покрыта аминогруппами) осуществляли согласно [15] посредством модификации зондов аминогруппами в парах перегнанного АПТЭС и N,N-диизопропилэтиламина. После УФ-озоновой очистки зонды сразу же помещали в стеклянный эксикатор объемом 2,5 л, заполненный аргоном, с растворами АПТЭС и N,N-диизопропилэтиламина на один час. Модифицированные зонды хранили в эксикаторе в атмосфере аргона. Реагенты были получены от Aldrich (США) и Wakenyaku (Япония). Дистилляцию АПТЭС проводили на разработанной установке, содержащей аппаратуру для дистилляции АВ25В-1-2 (Kiryama,

Япония) с небольшими модификациями, при уменьшенном давлении в атмосфере аргона.

**Функционализация аминомодифицированных зондов.** Для функционализации аминозондов использовали два гомобифункциональных линкерных агента, содержащих на обоих концах аминореакционную эфирную группировку (NHS-эфир): дисукцинимидил суберат (Pierce, США) (ДСС-линкер) и этиленгликоль-бис (N-гидроксисукцинимидный эфир янтарной кислоты) (ЭГС-линкер) (Sigma, Япония). Для последней иммобилизации использовали бычий сывороточный альбумин. Процедура функционализации, которую проводили в коммерческой жидкостной ячейке АСМ, состояла из следующих этапов. Вначале в стеклянную ячейку с закрепленными аминозондами инжестрировали раствор ДСС-линкера с концентрацией  $C = 2,7 \cdot 10^{-3}$  М в 0,5% триэтиламин/хлороформе и инкубировали зонд в течение  $t = 15$  мин. После этого ячейку тщательно промывали PBS-буфером объемом  $V = 200$  мкл и записывали силовые графики для системы аминозонд, функционализированный линкером, - слюда (с которой также мог взаимодействовать ДСС-линкер). Затем заменяли субстрат свежесколотой слюдой и проводили силовые измерения. Для иммобилизации молекул БСА в жидкостную ячейку инжестрировали раствор БСА, инкубировали в течение  $T = 5$  мин, промывали PBS-буфером, меняли субстрат на свежесколотую слюду и записывали серию силовых кривых для зонда с иммобилизованным БСА.

**Приготовление образцов ДНК и БСА для АСМ.** В работе использовали суперспиральную ДНК pGEMEX1 длиной 3993 п.н. (Promega, США), а также бычий сывороточный альбумин (5 фракция), полученный от Pierce (США). В качестве субстрата использовали аминослюду или функционализированную линкером аминослюду. На полоску аминослюды площадью  $1 \text{ см}^2$  наносили каплю раствора БСА с концентрацией 0,001 - 0,02 мкг/мл в PBS-буфере или каплю раствора ДНК с концентрацией 0,1-1 мкг/мл в ТЕ-буфере объемом 10 мкл, промывали после двухминутной экспозиции деионизованной водой, обдували потоком аргона и выдерживали образец при давлении 100 мм рт. ст. в течение 20 минут.

**Силовые измерения.** Все измерения были выполнены на атомно-силовом микроскопе Nanoscope IV MultiMode System (Veeco Instruments Inc., США) с E-сканером и коммерческой жидкостной ячейкой. Графики отклонения зонда-Z-позиция (зависимости отклонения зонда от расстояния между поверхностями зонда и

слюды (в дальнейшем силовые графики)) были записаны при вертикальной частоте сканирования 1 Гц и Z-амплитуде 50-200 нм. Графики сила-расстояние были получены из зависимостей отклонения зонда-Z-позиция (т.е. положение сканера по оси Z) посредством программного обеспечения Nanoscope (версия 5.12г3, Veeco Instruments Inc., США). Для амплитуды 100 нм, при которой было записано большинство силовых графиков, скорость удаления и приближения поверхностей зонда и слюды составила 200 нм/с. Умножая это значение на величину эффективной константы жесткости зонда, получим скорость нагрузки 2,6 и 5 нН/с для кантилеверов длиной  $l = 200$  мкм и  $l = 100$  мкм соответственно.

Силовые графики были записаны в режиме force calibration plot mode. Значения силы адгезии и работы силы адгезии были усреднены для 50-196 графиков удаления для различных вариантов модификации АСМ-зонда. Всего в данной работе было записано и обработано 855 силовых графиков. В одном цикле силовых измерений (цикле сближения и удаления поверхностей зонда и субстрата) записывали данные для 512 точек. Все силовые измерения были проведены с треугольными (V-образными) кантилеверами OMCL-TR400PSA из нитрида кремния с золотым напылением, содержащими тонкий слой хрома (Olympus Optical Co., Япония). Каждый чип содержит два коротких и два длинных кантилевера, которые отличаются геометрическими размерами и, следовательно, константой жесткости. Резонансные частоты кантилеверов были определены с помощью встроенной опции программного обеспечения измерения частоты кантилевера в воздухе (без учета возможного сдвига резонансной частоты ввиду демпфирования воздуха).

Константа жесткости была определена индивидуально для каждого кантилевера посредством метода резонансной частоты Клевленда (Cleveland), в котором значение константы жесткости пропорционально величине резонансной частоты в третьей степени для ненагруженного кантилевера [16]:

$$K = 2\pi^3 l^3 \omega \sqrt{\frac{\rho^3}{E}} v_0^3, \quad (1)$$

где  $K$  - константа жесткости,  $E$  - модуль эластичности,  $v_0$  - измеренная резонансная частота,  $\rho$  - плотность композитного материала, из которого сделан кантилевер,  $\omega$ ,  $l$  - ширина и длина кантилевера соответственно.

Для расчета  $K$  по методу Клевленда необходимо знание модуля эластичности и плотно-

сти материала кантилевера. Модуль эластичности композитного кантилевера определяли из соотношения [17]:

$$E_{\text{кантил}} = \frac{h_1 E_{\text{SiN}} + h_2 E_{\text{Au}} + h_3 E_{\text{Cr}}}{h_1 + h_2 + h_3}, \quad (2)$$

где  $E_{\text{SiN}} = 197$  ГПа и  $E_{\text{SiN}} = 214$  ГПа для кантилеверов длиной 100 и 200 мкм соответственно;  $E_{\text{Au}} = 81$  ГПа,  $E_{\text{SiN}} = 288,1$  ГПа;  $A_1 + h_2 + A_3$  - общая толщина кантилевера,  $A_1$ ,  $A_2$ ,  $A_3$  - толщина  $\text{Si}_3\text{N}_4$ , Au и Cr соответственно. Вычисленные значения модуля эластичности составили  $E_{\text{SiN}} = 197,2$  ГПа и  $E_{\text{SiN}} = 182,5$  ГПа для длинного и короткого кантилеверов соответственно.

Цвиттер-ионная природа поверхности нитрида кремния делает важным качество материала для получения из АСМ-измерений достоверных параметров ионизации поверхности.

Стехиометрия и плотность кантилеверов варьируют в широких пределах в зависимости от условий реакции их получения. Мы использовали значение плотности для нитрида кремния  $\rho_{\text{SiN}} = 2,8$  г/см<sup>3</sup>, которое соответствует стехиометрии N:Si = 1,1 [17],  $\rho_{\text{Au}} = 19,6$  г/см<sup>3</sup> и  $\rho_{\text{Cr}} = 7,2$  г/см<sup>3</sup>. Эффективное значение плотности композитного материала для кантилевера из  $\text{Si}_3\text{N}_4$ -Au-Cr было рассчитано из соотношения [17]:

$$\rho_{\text{кантил}} = \frac{\rho_{\text{SiN}} h_1 + \rho_{\text{Au}} h_2 + \rho_{\text{Cr}} h_3}{h_1 + h_2 + h_3}. \quad (3)$$

Для кантилеверов OMCL-TR400PSA толщина SiN составила  $A_{\text{SiN}} = 400 \pm 40$  нм, толщина слоя хрома  $h_{\text{Cr}} = 3$  нм, а толщина золотого напыления  $h_{\text{Au}} = 60$  нм согласно данным производителя.

Определенная таким образом плотность использованных в данной работе V-образных композитных кантилеверов составила  $\rho = 5,00$  г/см<sup>3</sup>.

Измерения проводили в следующих буферных растворах: 10 мМ трис-HCl, pH 7,6, 1 мМ ЭДТА (ТЕ-буфер); 137 мМ NaCl, 2,7 мМ KCl, 10 мМ  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 2 мМ  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , pH 7,4 (PBS-буфер).

Для проведения силовых измерений, как правило, использовали кантилеверы длиной 200 мкм, резонансная частота которых составляла  $f \sim 9-10$  кГц в воздухе. Статистическую обработку значений силы адгезии и работы силы адгезии проводили с помощью программного пакета Origin (версия 5, США).

**Атомно-силовая микроскопия.** АСМ-изображения ДНК и БСА были записаны посредством вибрирующего варианта АСМ в воздухе в режиме «высота» при комнатной температуре. Сканирование проводили с помощью OMCL-AC160TS кантилеверов (Olympus Optical Co., Япония), характеризующихся резонансной частотой 340 - 360 кГц и константой жесткости 42 Н/м, при частоте сканирования 3 Гц. Изображения были получены в формате 512 x 512 пикселей, сглажены и проанализированы с помощью программного обеспечения Nanoscope.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Существенные вариации значений константы жесткости коммерческих кантилеверов требуют индивидуальной калибровки каждого кантилевера, используемого для количественных измерений. Вычисленные из соотношения (1) константы жесткости составили  $K = 0,025$  Н/м и  $K = 0,008$  Н/м для используемых длинного ( $l = 200$  мкм) и короткого ( $l = 100$  мкм) кантилеверов соответственно.

Из силовых графиков (в одном цикле силовых измерений записывают два графика - график сближения и график удаления поверхностей зонда и субстрата) получают информацию об адгезивных свойствах (эластичности, жесткости), суммарном заряде каждой из взаимодействующих поверхностей. На рис. 1а приведены типовые силовые графики для немодифицированного зонда, записанные в ТЕ-буфере (в данном случае графики удаления и сближения практически совпадают; в качестве субстрата использована свежесколотая слюда). Характерный загиб графиков в левой части, отсутствие так называемого «прыжка зонда в контакт» указывают на то, что поверхности и зонда, и субстрата одинаково заряжены в данных условиях. Поскольку известно, что слюда при нейтральных значениях pH отрицательно заряжена [18], следовательно, и суммарный заряд немодифицированного зонда также отрицателен. Эти результаты подтверждают подобие поверхностных свойств слюды и зонда (окисленные поверхности как зонда из нитрида кремния, так и слюды покрыты ОН-группами), несмотря на присутствие на поверхности зонда эндогенных аминокрупп (в количестве примерно  $640 \pm 120$  на  $1 \text{ мкм}^2$  согласно данным работы [13]). Именно поэтому для отработки методики функционализации и характеристики модифицированной поверхности мы использовали визуализацию ДНК pGEMEX и БСА, иммобилизованных на модифицированной слюде. АСМ-изображения молекул ДНК pGEMEX и белка слу-

жили дополнительным контролем модификации поверхности зонда и предоставляли вспомогательные данные для интерпретации силовых графиков.

На силовой кривой удаления аминозонда (рис. 1б), поверхность которого покрыта протежированными аминогруппами, появляется характерный, похожий на зуб, пик, из максимального значения которого определяют силу адгезии, а из его площади - работу силы адгезии. Сила адгезии и работа силы адгезии характеризуют качество модификации зонда, показывая силу разрыва и работу силы адгезии, которые необходимо приложить и выполнить, соответственно, для того, чтобы вывести из контакта поверхность зонда и субстрата. Определенное из силового графика значение силы адгезии для аминозонда в ТЕ-буфере составило  $F = 103$  пН. При экранировании положительно заряженных аминогрупп в растворе высокой ионной силы (рис. 1в;  $I = 1$  М  $\text{Na}^+$ ) величина силы адгезии уменьшается ( $F = 93$  пН), но тем не менее адгезивный эффект сохраняется. Полученная зависимость силы адгезии от ионной силы хорошо согласуется с предыдущими результатами для V-образных кантилеверов с золотым напылением, характеризующихся более высокими константами жесткости [15].

Общая схема модификации и последующей функционализации зондов представлена на рис. 2. Важной характеристикой зонда для силовой микроскопии узнавания единичных молекул является плотность молекул на поверхности зонда. Идеальным представляется модифицированный зонд с одной молекулой-рецептором для специфического связывания с субстратом. Отличительной особенностью аминомодификации зонда посредством АПТЭС (рис. 2б) является то, что одна молекула АПТЭС взаимодействует с тремя поверхностными ОН-группами зонда. Тем самым количество аминогрупп на поверхности зонда, обработанного АПТЭС, должно быть существенно меньше, чем для зонда, обработанного с использованием другой методики, - например, с помощью этаноламина с последующим образованием самоассоциированных монослоев. В работе [13] продемонстрировано, что количество аминогрупп на поверхности зонда, обработанного этаноламином, в 1,5 раза выше, чем для варианта модификации посредством АПТЭС из газовой фазы. Если принять количество аминогрупп для поверхности, обработанной АПТЭС, равным  $1730 \pm 200$  на  $1 \text{ мкм}^2$  [13], то для зонда с радиусом закругления  $R = 50$  нм на боковой поверхности зонда (т.е. на

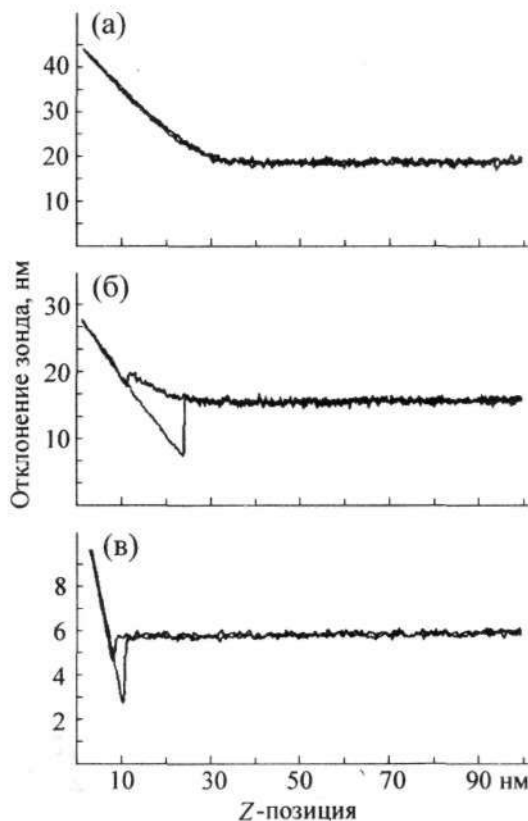


Рис. 1. Силовые графики (зависимости отклонения АСМ-зонда от положения сканера) для немодифицированного (а) и аминомодифицированных (б,в) зондов. (а,б) - Длина кантилевера 200 мкм, (в) - длина кантилевера 100 мкм. (а,б) - ТЕ-буфер; (в) - ТЕ-буфер, 1 М  $\text{NaCl}$ .

боковой поверхности полусферы) может быть локализовано 27 аминогрупп. Для заостренного же зонда с радиусом закругления  $R = 13$  нм [19,20] на боковой поверхности зонда было бы экспонировано две  $\text{NH}_2$ -группы. Кроме того, необходимо принять во внимание, что только 50% аминогрупп являются активными (протонированными) [21].

Использование гомобифункционального аминореакционного линкерного агента (например, ДСС) также направлено на уменьшение количества молекул-рецепторов на поверхности зонда. На рис. 2в показан только вариант, при котором один аминореакционный конец линкера (NHS-эфир) взаимодействует с аминогруппой зонда, а второй конец остается свободным - с этим реакционным концом линкера могут взаимодействовать аминогруппы лизиновых остатков БСА. Однако возможно связывание обоих NHS-концов линкера с аминогруппами зонда, что уменьшает количество свободных аминогрупп на поверхности аминозонда.

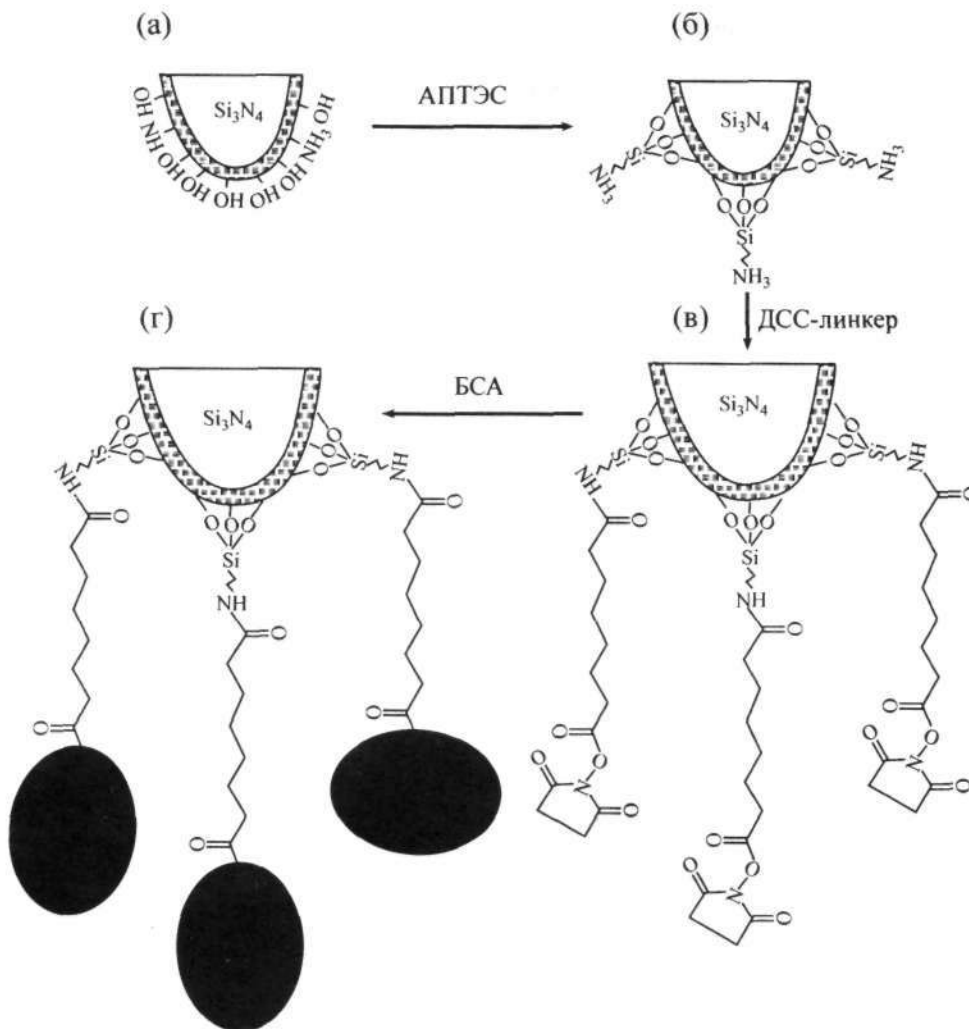
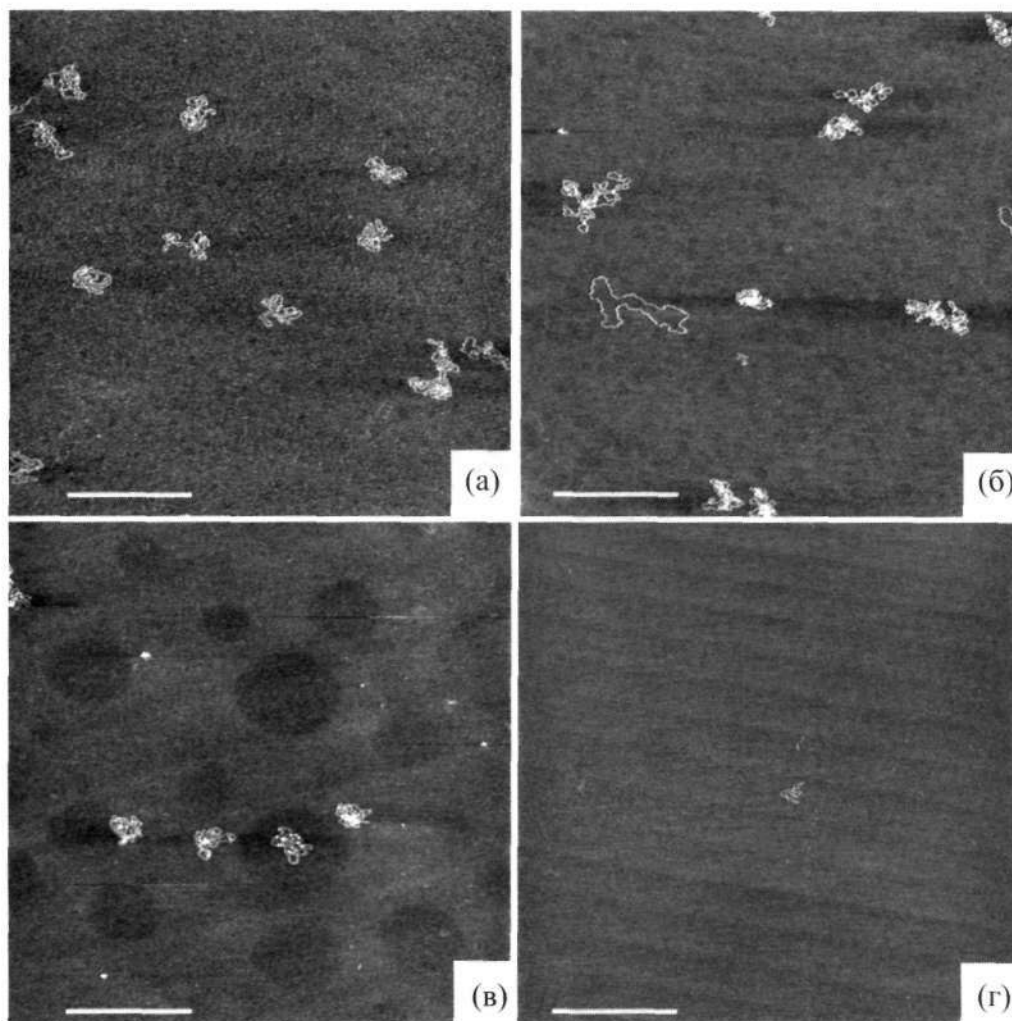


Рис. 2. Схема функционализации зондов для атомно-силовой микроскопии, (а) - Немодифицированный АСМ-зонд из нитрида кремния, (б) - АСМ-зонд, поверхность которого покрыта аминогруппами. На первом этапе в результате обработки в парах производного аminosилана (АПТЭС) поверхность зонда модифицирована ковалентно присоединенными аминогруппами, (в) - Зонд, поверхность которого содержит ДСС-линкер, имеющий свободный аминореакционный конец (NHS-эфир). На втором этапе аминогруппы зонда реагируют с NHS-эфирной группировкой гомобифункционального аминореакционного ДСС-линкера. (г) - Зонд с ковалентно присоединенными молекулами бычьего сывороточного альбумина (БСА). На третьем этапе аминореактивные группы ДСС-линкера взаимодействуют с лизиновыми остатками БСА.

Отметим также, что молекулы линкера должны удовлетворять определенным требованиям: они должны (i) иметь определенную длину; (ii) обладать растворимостью в растворителях, в которых возможно проведение реакции комплексообразования с биомолекулами; (iii) их эластичность должна быть предсказуема [9].

В процессе предварительных экспериментов в качестве растворителя для обоих линкеров был выбран раствор 0,5% триэтиламина в хлороформе (v/v) (результаты для другого растворителя - диметилсульфоксида - не показаны). На рис. 3 показаны результаты исследования влияния времени обработки аminosлюды данным раствором и линкером ЭГС, растворенным

в нем, на адсорбционные свойства аminosлюды. Ранее мы показали, что силовые графики для пары поверхностей аminosлюда-зонд подобны и количественно, и качественно графикам, характеризующим пару аминозонд-слюда [22]. Поэтому полученные результаты для аminosлюды могут быть экстраполированы и на аминозонд. Наряду с формой суперспиральных молекул ДНК pGEMEX их количество на единице площади является показателем количества протонированных аминогрупп на поверхности аminosлюды, участвующих в электростатическом взаимодействии с фосфатными группами ДНК, т.е. своеобразным показателем качества аminosлюды. При переходе от стандартной ами-

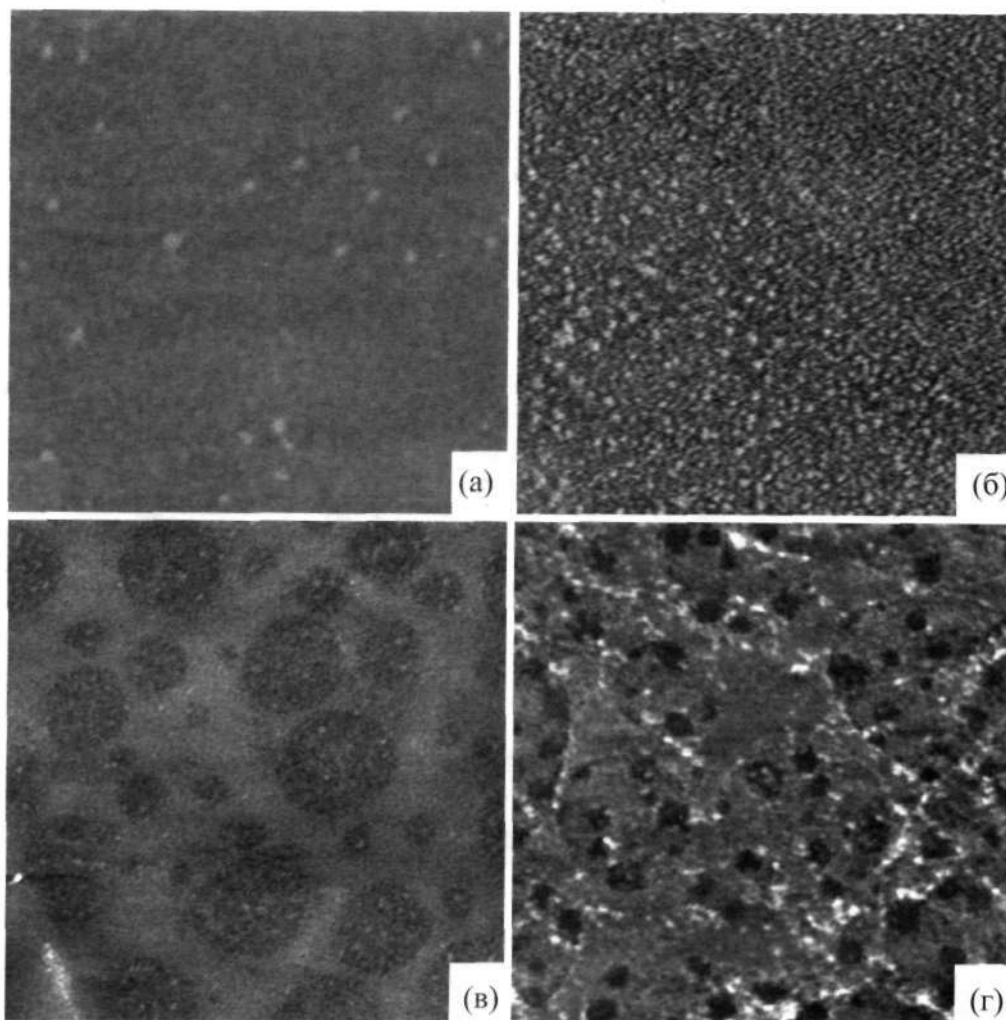


**Рис. 3.** АСМ-изображения суперспиральной ДНК рGEMEX (длина 3993 п.н.), иммобилизованной на различных субстратах, (а) - Аминослюда. Размер кадра - 2 x 2 мкм. (б) - Аминослюда, обработанная раствором 0,5% триэтиламина в хлороформе в течение  $t = 15$  мин. Размер кадра - 2 x 2 мкм; отрезок соответствует 500 нм. (в) - Аминослюда, обработанная раствором 0,5% триэтиламина в хлороформе в течение 30 мин. Размер кадра - 2 x 2 мкм; отрезок соответствует 500 нм. (г) - Аминослюда, функционализованная аминореакционным гомобифункциональным линкером ЭГС, полученная обработкой аминослюды раствором ЭГС в смеси 0,5% триэтиламин/хлороформ в течение 5 мин. Размер кадра - 4 x 4 мкм; отрезок соответствует 1 мкм.

нослюды (11-12 молекул ДНК рGEMEX на площади 4 мкм<sup>2</sup>, рис. 3а) количество иммобилизованных молекул ДНК на аминослюде уменьшается до 10-11 молекул (при времени обработки раствором 0,5% триэтиламина в хлороформе  $t = 15$  мин, рис. 3б) и до 4 молекул (при  $t = 30$  мин, рис. 3в). Эти результаты показывают, что при времени обработки аминослюды, не превышающем  $t = 15$  мин, количество молекул ДНК сохраняется на уровне, характерном для необработанной аминослюды. Кроме того, молекулы ДНК рGEMEX сохраняют плектономичную конформацию даже при  $t = 30$  мин. Таким образом, при небольших временах экспозиции ( $t < 15$  мин) на обработанной раствором 0,5% триэтиламин/хлоро-

форм аминослюде сохраняется практически такое же количество аминогрупп, как и на поверхности необработанной аминослюды.

После функционализации аминослюды ЭГС-линкером суммарное количество аминогрупп на поверхности аминослюды резко уменьшается. Так, на рис. 3г можно видеть только одну молекулу ДНК рGEMEX, иммобилизованную на площади 16 мкм<sup>2</sup>, т.е. на площади, в четыре раза превышающей размер кадра на рис. 3а-в. После обработки ЭГС-линкером в течение 15 и 30 мин молекулы ДНК на функционализованную слюду не адсорбируются. Напомним, что возможны два варианта взаимодействия ЭГС-линкера с аминослюдой - (i) оба



**Рис. 4.** АСМ-изображения бычьего сывороточного альбумина после иммобилизации на аминоклуде, обработанной различными реагентами, (а) - БСА на аминоклуде, полученной обработкой в парах АПТЭС. Размер кадра - 700 x 700 нм. (б) - БСА на аминоклуде, обработанной раствором 0,5% триэтиламина в хлороформе в течение 15 мин. Размер кадра - 2 x 2 мкм. (в) — БСА на аминоклуде, обработанной раствором 0,5% триэтиламина в хлороформе в течение 30 мин. Размер кадра - 2 x 2 мкм. (г) - БСА на аминоклуде, функционализованной аминокреакционным гомобифункциональным ЭГС-линкером, растворенным в смеси 0,5% триэтиламин/хлороформ. Размер кадра - 4 x 4 мкм.

аминокреакционных конца линкера связываются с аминоклудой, и в этом случае количество свободных аминокреакционных групп на поверхности слюды резко уменьшается и (ii) линкер связывается одним NHS-эфирным концом с аминоклудой, а второй аминокреакционный конец остается свободным, и сохраняется возможность последующего связывания ДНК с субстратом.

С целью прояснения механизма связывания ЭГС-линкера с аминоклудой были получены АСМ-изображения бычьего сывороточного альбумина, иммобилизованного на различных субстратах (рис. 4). Можно видеть, что БСА связывается в равной степени и с аминоклудой (рис. 4а), и с аминоклудой, обработанной 0,5%

триэтиламином в хлороформе в течение 15 мин (рис. 4б) и в течение 30 мин (рис. 4в), а также, что наиболее важно, и со слюдой, функционализованной ЭГС-линкером (рис. 4г). Хотя аминокреакционные группы, присутствующие на N-конце белков, реагируют с NHS-эфирами, в белках они имеются в незначительном количестве. Поэтому реакции с боковыми цепями аминокреакционных аминокислот являются важными. Из пяти аминокреакционных аминокислот, несущих азот в своих боковых цепях, только при взаимодействии NHS-эфира с аминокреакционной группой лизина образуется стабильный продукт за счет образования ковалентной амидной связи и с высвобождением N-гидрокси-сукцинимид.



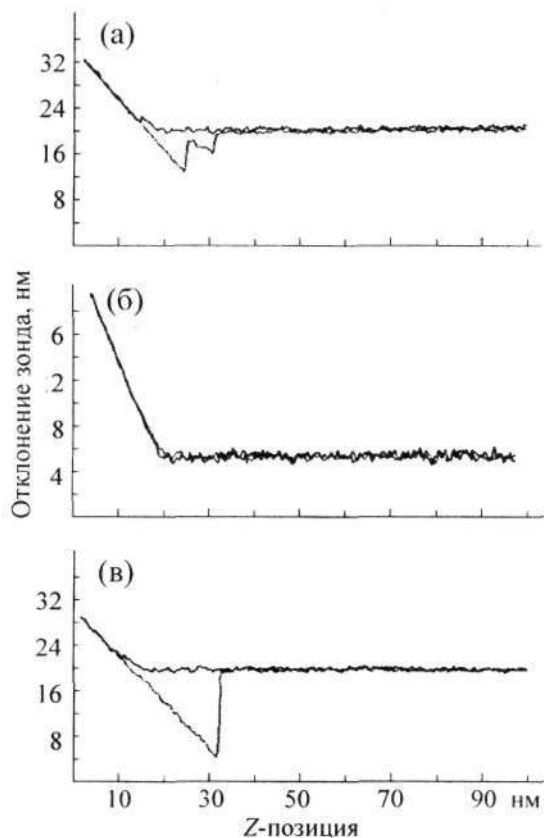


Рис. 5. Силовые графики аминомодифицированного зонда на различных этапах функционализации аминореакционным гомобифункциональным ДСС-линкером (а) и иммобилизации бычьего сывороточного альбумина (б,в), (а) - Измерения проведены на замененной после функционализации ДСС-линкером свежесколотой слюде, (б,в) - Силовые графики после этапов модификации аминозонда ДСС-линкером и иммобилизации БСА соответственно. После иммобилизации БСА измерения проводили на свежесколотой слюде. Графики (а,в) были записаны в процессе модификации одного кантилевера. Все измерения выполнены в PBS-буфере.

Таким образом, результаты по визуализации суперспиральной ДНК рGEMEX (рис. 3) и бычьего сывороточного альбумина (рис. 4) на аминослюде, функционализованной аминореакционным ЭГС-линкером, показывают, что (i) ЭГС-линкер взаимодействует с аминослюдой, (ii) БСА взаимодействует с ЭГС-линкером, которым функционализована аминослюда. Эти результаты послужили основанием для функционализации аминозондов другим аминореакционным агентом - ДСС-линкером.

На рис. 5 приведены силовые графики для взаимодействующих поверхностей зонда и субстрата после этапов модификации и функционализации зонда бычьим сывороточным аль-

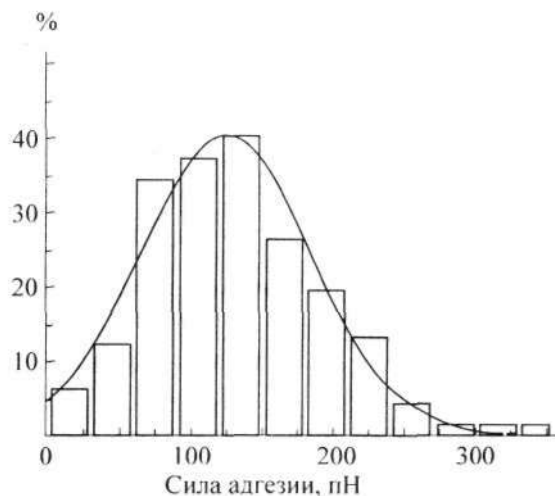


Рис. 6. Гистограмма силы адгезии для аминомодифицированного зонда с ковалентно присоединенным БСА через ДСС-линкер. Сила адгезии, измеренная только после последнего этапа функционализации зонда бычьим сывороточным альбумином, составляет  $F = 26,9 \pm 7,2$  пН; линия представляет нормальное распределение.

бумином. При этом на рис. 5а изображены силовые графики для зонда после этапа модификации ДСС-линкером, а на рис. 5б,в - после иммобилизации БСА на поверхности модифицированного ДСС-линкером зонда, записанные для разных кантилеверов. Значение силы адгезии для модифицированного ДСС-линкером зонда, вычисленное из гистограммы распределения силы адгезии, составило  $F - 93 \pm 20$  пН в PBS-буфере. Форма силовых графиков, а также уменьшение силы адгезии по сравнению с аминозондом (сила адгезии для аминозонда составляет  $F = 103 \pm 23$  пН в ТЕ-буфере) указывают на то, что ДСС-линкер взаимодействует с поверхностью аминозонда.

В таблице представлены значения силы адгезии и работы силы адгезии для различных вариантов модификации и функционализации аминозонда, вычисленные из соответствующих гистограмм (одна из таких гистограмм показана на рис. 6). В качестве субстрата была использована свежесколотая слюда, за исключением варианта модификации зонда ДСС-линкером, при котором силовые графики были записаны и для свежесколотой слюды, и для слюды, модифицированной ДСС-линкером. Поскольку модификацию аминозонда проводили в жидкостной ячейке АСМ, силовые кривые были записаны для субстрата, при котором проводили модификацию (этот субстрат обозначен в таблице как слюда + ДСС-линкер), а также после

Сила адгезии и работа силы адгезии для аминокондов с длиной кантилевера  $\neq 200$  мкм, модифицированных ДСС-линкером с последующей функционализацией бычьим сывороточным альбумином в PBS-буфере

№	Модифицированный зонд	Сила адгезии, $F$ , пН	Работа силы адгезии, $W$ , пДж
1	Аминоконд (ТЕ-буфер)	$103 \pm 23$	$580 \pm 190$
2	Аминоконд(1 М NaCl)/ $\neq 100$ мкм	$93 \pm 15$	$251 \pm 71$
3	Аминоконд + ДСС-линкер - слюда + ДСС-линкер	$44 \pm 15$	$107 * 43$
4	Аминоконд + ДСС-линкер - свежесколотая слюда	$93 \pm 21$	$450 \pm 160$
5	Аминоконд + ДСС-линкер + БСА	$27 \pm 7$	$62 \pm 17$

замены этого субстрата на свежесколотую слюду. Сравнение значений силы адгезии и работы силы адгезии для этих двух вариантов (позиции 3 и 4 в таблице) показывает, что и слюда, и аминоконд модифицируются ДСС-линкером. Поскольку величину силы адгезии рассчитывают из максимального значения силы силового графика, а работу силы адгезии - из площади, ограниченной силовым графиком, значение работы силы адгезии позволяет получить более точную информацию о характере взаимодействующих поверхностей. Так, например, для аминоконда (позиция 2 в таблице) и аминоконда, модифицированного ДСС-линкером (позиция 4 в таблице) при равенстве значений силы адгезии, работа силы адгезии для аминоконда, модифицированного ДСС-линкером, в четыре с лишним раза выше. Это указывает на то, что поверхность аминоконда + ДСС-линкер качественно отличается от поверхности аминоконда, что находит подтверждение в необходимости приложения существенно большей силы для разделения поверхностей аминоконда + ДСС-линкер и слюды по сравнению с парой поверхностей аминоконд-слюда.

Уменьшение силы адгезии для зонда, функционализованного БСА ( $F = 27 \pm 7$  пН, рис. 6), по сравнению с зондом, модифицированным ДСС-линкером, качественно и количественно подтверждает полученные результаты по взаимодействию БСА со слюдой, функционализованной аминокондом ЭГС-линкером (рис. 4г).

Таким образом, в данной работе представлена схема и проведена модификация с последующей функционализацией бычьим сывороточным альбумином зондов для атомно-силовой микроскопии. Зонды с ковалентно присоединенным аминокондом ЭГС-линкером ДСС и БСА были охарак-

теризованы посредством силовых измерений - определены значения силы адгезии и работы силы адгезии как после каждого этапа модификации, так и только для зонда с присоединенным БСА. Разработанная нами технология аминокондации зондов в парах АПТЭС позволяет получать поверхность с регулируемой плотностью аминокондов, в отличие от ранее предложенных схем модификации с постоянной поверхностной плотностью заряда [12,13,15,23]. Использование аминокондов с уменьшенной поверхностной плотностью заряда даст возможность, по нашему мнению, минимизировать количество взаимодействующих протонированных аминокондов при проведении дальнейшей модификации и функционализации зонда, что, в свою очередь, позволит уменьшить количество молекул белков, присоединенных к поверхности зонда.

Автор выражает благодарность О. Лиманской (Институт экспериментальной и клинической ветеринарной медицины УААН) за полезные дискуссии и критические замечания при подготовке статьи.

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке Japanese Society for the Promotion of Science (Япония), а также гранта Академии медицинских наук Украины.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Pelling A.E., Li Y., Shi W., Gimzewski J.K.* II Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2005. V. 102, № 18. P. 6484-6489.
2. *Larson S.B., Kuznetsov Y.G., Day J., Zhou J., Glaser S., Braslawsky G., McPherson A.* II Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr. 2005. V. 61, Pt 4. P. A\|b-A22.
3. *Conwell C.C., Vilfan I.D., Hud N.V.* II Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2003. V. 100, № 16. P. 9296-9301.
4. *Klein D.C.G., Stroh C.M., Jensenius H., van Es M., Kamruzzahan A.S.M., Stamouli A., Gruber H.J., Oos-*

- terkamp T.H., Hinterdorfer P.* // *Chemphyschem.* 2003. V. 4. P. 1367-1371.
5. *Yamada T., Arakawa H., Okajima T., Shimada T., Ikui A.* // *Ultramicroscopy.* 2002. V. 91. P. 261-268.
6. *Blank K., Mai T., Gilbert J., Schiffman S., Rank L.J., Zivin R., Tackney T., Nicolaus T., Spinnler K., Oesterbell F., Benoit M., Clausen-Schuumann H., Gaub H.* // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2003. V. 100, № 20. P. 11357-11360.
7. *Buumgartner W., Hinterdorfer P., Schindler H.* // *Ultramicroscopy.* 2000. V. 82. P. 85-95.
8. *Okajima T., Arakawa H., Alum M.T., Sekiguclii H., Ikai A.* // *Biophys. Chemistry.* 2004. V. 107. P. 51-61.
9. *Kudera M., Eschbaumer C., Gaub H., Schubert U.* // *Advanced Functional Materials.* 2003. V. 13, № 8. P. 615-620.
10. *Friedsam C., Becures A., Jonas U., Gaub H., Seitz M.* // *Chem. Phys. Chem.* 2004. № 5. P. 388-393.
11. *Uebara H., Osadu T., Ikai A.* // *Ultramicroscopy.* 2004. V. 100. P. 197-201.
12. *Riener C.K., Kienberger F., Halm CD., Buchinger G.M., Egwim I.O.C., Haselgrubler T., Ebner A., Romanin C., Klampfl C., Lack nez B., Prinz H., Blaas D., Hinterdorfer P., Gruber H.J.* // *Analitica Chimica Acta.* 2003. V. 497. P. 101-114.
13. *Reiner C., Stroll C., Ebner A., Klampfl C., Gall A., Romanin C., Lviibchenko Y., Hinterdorfer P., Gruber H.* // *Analytica'Chimica Acta.* 2003. V. 479. P. 59-75.
14. *Лиманский А.* // *Цитология и генетика.* 2005. Т. 39, № 2. С. 64-71.
15. *Limansky A., Shlyukhlenko L., Schaus S., Henderson E., Lvubchenko Y.* // *Probe microscopy.* 2002. V. 2. P. 227-234.
16. *Cleveland J., Manne S., Bocek D., Hansma P.* // *Rev. Sci. Instrum.* 1993. V. 64. P. 403-405.
17. *Hazel J., Tsukruk V.* // *Thin Solid Films.* 1999. V. 339. P. 249-257.
18. *Butt H.* // *Biophys. J.* 1991. V. 60. P. 1438-1444.
19. *Kituzawa M., Toda A.* // *Jpn. J. Appl. Phys.* 2002. V. 41. P. 4928-4931.
20. *Kitazawa M., Shiotani K., Toda A.* // *Jpn. J. Appl. Phys.* 2003. V. 42. P. 4844-4847.
21. *Shlvukhtenko L., Gall A., Weimer J., Huwn D., Lvubchenko Y.* // *Biophys. J.* 1999. V. 77. P. 568-576!
22. *Лиманский А.* // *Биополимеры и клетка.* 2002. Т. 18. С. 62-70.
23. *Лиманский А.* // *Успехи соврем, биологии.* 2003. Т. 123. С. 531-542.

## Functionalization of Aminomodified Probes for Atomic Force Microscopy

A. Limanskii

*Institute of Microbiology and Immunology, Ukrainian Academy of Medical Sciences, Kharkov, 61057 Ukraine*

*Laboratory of Plasma Membrane and Nuclear Signaling, Graduate School of Biostudies, Kyoto University, Kyoto, 606-8502, Japan*

Probes for atomic force microscopy functionalized by bovine serum albumin were obtained, which may be used for molecular recognition studies. The procedure of the modification and functionalization of probes includes three stages. First, amino probes are obtained by modification in vapors of amino silane derivative. Then a homobifunctional amino reactive cross-linker is covalently linked to surface amino groups of the amino probe. And finally, the probe with the covalently attached cross-linker is functionalized by bovine serum albumin molecules. The probes obtained were characterized at different stages of the modification by atomic force microscopy: the adhesion force and the work of adhesion force were determined from histograms. The modification of probe surface was confirmed by visualization of bovine serum albumin and supercoiled pGEMEX DNA molecules immobilized on the amino mica and amino mica modified by cross-linker.

*Key words: force measurements, atomic force microscopy, AFM, probe functionalization, homobifunctional cross-linker, recognition force spectroscopy*