

О. ЛИМАНСЬКИЙ

Інститут мікробіології та імунології ім. Мечникова АМН України,  
вул. Пушкінська, 14, м. Харків-57, 61057, Україна

E-mail: alex.limanskii@mail.ru

Laboratory of Plasma Membrane and Nuclear Signaling,  
Graduate School of Biostudies, Kyoto University,

Kyoto, 606-8502, Japan

## АМІНОМОДИФІКОВАНІ ЗОНДИ З ІММОБІЛІЗОВАНИМИ ЛІНКЕРАМИ ТА БІЛКАМИ ДЛЯ АТОМНО-СИЛОВОЇ МІКРОСКОПІЇ



*Отримано зонди для атомно-силової мікроскопії (АСМ), функціоналізовані бичачим сироватковим альбуміном (БСА), які можуть бути використані для вивчення процесів молекулярного пізнання. Процедура модифікації та функціоналізації АСМ зонда включає три етапи. Спочатку шляхом модифікації в парах похідного аміносилану був отриманий амінозонд, з поверхневими аміногрупами якого взаємодіє амінореакційний гомобіфункціональний лінкер. На заключному етапі зонд з ковалентно присланим лінкером був функціоналізований молекулами БСА. Отримані АСМ зонди було охарактеризовано на різних етапах модифікації за допомогою АСМ у режимі силових вимірювань — із силових графіків визначено силу адгезії. Процес модифікації поверхні зонда був підтверджений візуалізацією молекул БСА та суперспіральної ДНК pGEMEX, іммобілізованих на стандартній амінослуді та амінослуді, що модифікована лінкерним агентом.*

© О. ЛИМАНСЬКИЙ, 2006

70

**Вступ.** Безліч досліджень було виконано за допомогою атомно-силової мікроскопії (АСМ) з метою отримання зображень з високою роздільною здатністю ДНК, протеїнів, клітин та клітинних органел [1—6]. Інше застосування АСМ було розвинуто для безпосереднього вимірювання сили, необхідної для розділення молекулярних комплексів, що утворені молекулами, адсорбованими на поверхнях АСМ зонда та субстрату. Цей напрямок АСМ, що дозволяє визначати сили взаємодії поодиноких пар молекул, отримавши спочатку назву хімічної силової мікроскопії, згодом став потужним методом дослідження на молекулярному рівні — методом силової мікроскопії пізнання поодиноких молекул (single molecule recognition force microscopy) [7—9]. Ключовим моментом для проведення такого роду досліджень є іммобілізація молекул на поверхні АСМ зонда.

Функціоналізація АСМ зондів біомолекулами (в першу чергу білками) дозволяє не тільки досліджувати мікромеханічні властивості молекул, макромолекул та клітин, сили, що утримують протеїни у клітинній мембрані, але й визначати за допомогою зондів з іммобілізованими антитілами або іншими специфічними рецепторами локалізацію різних протеїнів, полісахаридів, іРНК з нанометровою роздільною здатністю всередині як живої клітини, так і клітинного ядра. Наприклад, оскільки локалізація іРНК в окремих частинах цитоплазми є важливим елементом посттранскрипційного контролю, був розроблений метод дослідження експресії генів у поодиноких живих клітинах без їхнього істотного порушення [10]. За допомогою модифікованого АСМ зонда, притиснутого до клітинної поверхні, із клітини екстрагували іРНК та за допомогою зворотнотранскриптазної ПЛР ампліфікували фрагменти молекул специфічних іРНК. Існує достатньо широкий спектр варіантів модифікації та наступної функціоналізації (тобто ковалентного зв'язування) біомолекул з поверхнею зонда. Загальна схема функціоналізації зонда, яка може бути виконана в 2—3 етапи (в залежності від використаних реактивів) виглядає таким чином: зонд → модифікований зонд (наприклад амінозонд) → функціоналізований зонд (зонд + біомакромолекула).

Найбільш широке розповсюдження отримали методи, що базуються на використанні

ISSN 0564–3783. Цитология и генетика. 2006. № 1

похідних аміносилану з наступним зв'язуванням макромолекули через гнучкий крослінкерний агент (часто як лінкер використовують похідні поліетиленгліколя (ПЕГ) різної молекулярної маси). Так, наприклад, у роботі [11] для іммобілізації біотину на поверхні зонда використали лінкер на основі ПЕГ-800, що має довжину 8 нм.

Відзначимо, що на кожному етапі модифікації, в свою чергу, можливо декілька варіантів. Широко розповсюдженим методом модифікації зондів є силіконування, яке, однак, має певні обмеження у випадку тривалих вимірювань. Як альтернативу силіконуванню використовують адсорбцію тіогруп на поверхні зондів, яка вкрита тонким шаром золота — при цьому утворюється ковалентний зв'язок Au-S. В свою чергу модифікація аміногрупами може бути виконаною або у рідині (з утворенням самоасоційованих моношарів, САМ) з використанням декількох реагентів (етаноламіну, похідного аміносилану АПТЕС, аміносилатрану) або у газовій фазі (з використанням АПТЕС) [12].

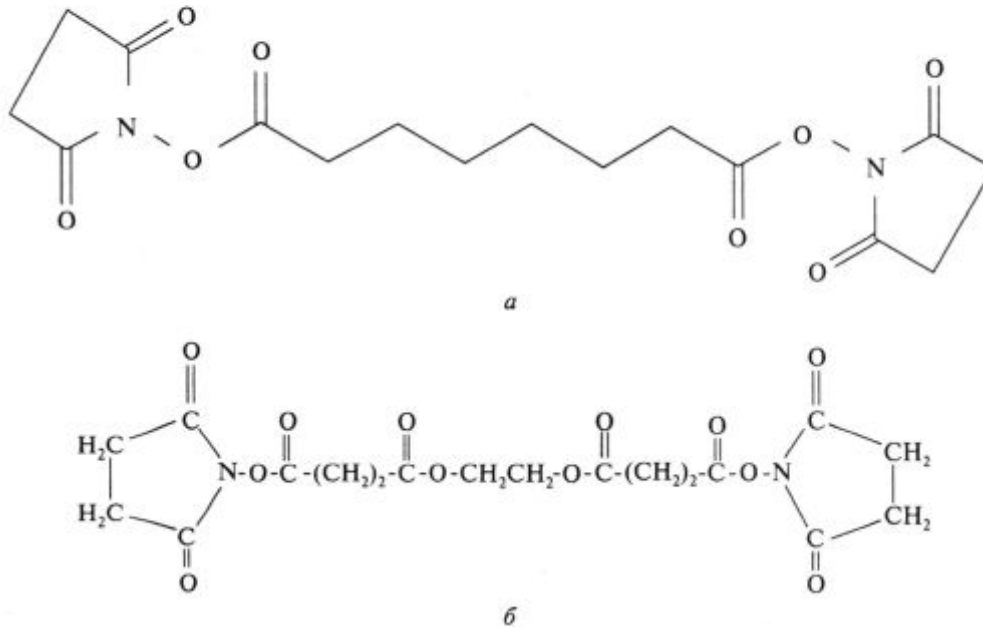
Модифіковані та функціоналізовані зонди повинні відповідати певним вимогам. По-перше, сильний зв'язок (як правило, ковалентний) повинен бути утворений між зондом та протеїном (або лінкером) з метою запобігання вилучення протеїна у процесі силових вимірювань. По-друге, неспецифічна адгезія між зондом та субстратом повинна бути мінімізованою. По-третє, дуже важливо, щоб після іммобілізації на поверхні зонда молекули білка зберігали нативний стан, тобто здатність зв'язуватися з комплементарними молекулами (лігандами). Також необхідно, щоб щільність лігандів на поверхні субстрату була достатньо високою, принаймні, 100 лігандів/мкм<sup>2</sup> для досягнення значної частоти актів пізнавання. Крім того, бажано передбачити можливість регулювання (а саме зменшення) щільності протеїнів, іммобілізованих на поверхні зонда. З цієї точки зору дуже перспективною виглядає раніше розроблена нами технологія отримання амінослюди з поверхневою щільністю заряду, що регулюється, — як зі зменшеною, так і зі збільшеною поверхневою щільністю аміногруп [13].

В даній роботі проведена функціоналізація амінозондів гомобіфункціональним аміноре-

акційним лінкером з наступною іммобілізацією бичачого сироваткового альбуміну (БСА). Функціоналізовані зонди були охарактеризовані шляхом атомно-силової мікроскопії у режимі силових вимірювань — визначені сили адгезії як після кожного етапу модифікації та функціоналізації зондів, так і тільки після останнього етапу ковалентного приєднання білка для забезпечення максимальної нативності функціоналізованого зонда. Оскільки поверхні немодифікованого та функціоналізованого зондів за своїми поверхневими властивостями подібні до поверхонь свіжосколотої та модифікованої слюди відповідно, процес функціоналізації був також охарактеризований шляхом візуалізації молекул ДНК та БСА, іммобілізованих на модифікованій слюді.

**Матеріали та методи. Модифікація зондів.** Для передмодифікаційного очищення зонди з нітриду кремнію із золотим напилюванням промивали хромовою сумішшю, ретельно обполіскували ультрачистою водою з питомим опором ~17 Мом·см, отриманою за допомогою установки Milli Q (Millipore, США), обдували аргонном та на заключному етапі опромінювали короткохвильовим УФ-випромінюванням високої інтенсивності протягом 45 хв. Процедуру отримання амінозондів (модифікованих зондів, поверхня яких рівномірно покрита аміногрупами) здійснювали шляхом модифікації зондів аміногрупами в парах перегнаного 3-амінопропілтриетоксисилану (АПТЕС) та N,N-діізопропілетиламіну [14]. Після УФ/озонового очищення зонди відразу ж поміщали у скляний ексікатор об'ємом 2,5 л, заповнений аргонном, з розчинами АПТЕС та N,N-діізопропілетиламіну на 1 год. Модифіковані зонди зберігали в ексікаторі в атмосфері аргону. Реагенти були отримані від Aldrich (США) та Wakenyaku (Японія). Дистиляцію АПТЕС проводили на розробленій установці, що містить апаратуру для дистиляції АВ25В-1-2 (Kiryama, Японія) з невеликими модифікаціями, за зменшеного тиску в атмосфері аргону.

**Функціоналізація аміномодифікованих зондів.** Для функціоналізації амінозондів використовували два гомобіфункціональних лінкерних агенти, що містять на обох кінцях амінореакційну ефірну групу (NHS-ефір): дисукцинімідил суберат (Pierce, США) (ДСС-лінкер) та



**Рис. 1.** Гомобіфункціональні амінореакційні лінкерні агенти, використані для функціоналізації АСМ зондів: *a* — дисукцинімідил суберат (ДСС), що несе на обох кінцях дві термінальні NHS-ефірні групи, які реагують з первинними амінами. Довжина спейсера складає 11,4 Å; *б* — етиленгліколь-біс (N-гідроксисукцинімідний ефір янтарної кислоти) (ЕГС)

етиленгліколь-біс (N-гідроксисукцинімідний ефір янтарної кислоти) (ЕГС-лінкер) (Sigma, Японія) (рис. 1). Для наступної іммобілізації використовували бичачий сироватковий альбумін (БСА). Процедура функціоналізації, яку проводили у комерційній рідинній чашечці АСМ, складалася із наступних етапів. Спочатку в скляну чашечку із закріпленим амінозондом інжектували розчин ДСС-лінкера з концентрацією  $C = 2,7 \cdot 10^{-3}$  М у 0,5 % триетиламін/хлороформі та інкубували зонд протягом 15 хв. Після цього чашечку ретельно промивали 200 мкл PBS буфера та записували силові графіки для системи амінозонд, функціоналізований лінкером, — слюда (з якою також міг взаємодіяти ДСС-лінкер). Потім замінювали субстрат на свіжосколоту слюду та проводили силові вимірювання. Для іммобілізації молекул БСА у рідинну чашечку інжектували розчин БСА, інкубували протягом 5 хв, промивали PBS буфером, замінювали субстрат на свіжосколоту слюду та записували серію силових кривих для зонда з іммобілізованим БСА.

*Підготовка зразків ДНК та БСА для АСМ.* У роботі використовували суперспіральну ДНК pGEMEX1 довжиною 3993 п.н. («Promega»,

США), а також бичачий сироватковий альбумін (5-та фракція), отриманий від Pierce (США). Як субстрат використовували амінослюду або функціоналізовану лінкером амінослюду. На смугу амінослюди розміром 1 см<sup>2</sup> наносили краплю розчину БСА з концентрацією 0,001—0,02 мкг/мл в PBS буфері або краплю розчину ДНК з концентрацією 0,1—1 мкг/мл у ТЕ буфері об'ємом 10 мкл, промивали після двохвилинної експозиції деіонізованою водою, обдували потоком аргону та витримували зразок за тиску 100 мм рт. ст. протягом 20 хв.

*Силові вимірювання.* Усі вимірювання були виконані на атомно-силовому мікроскопі Nanoscope IV MultiMode System (Veeco Instruments Inc., США) з E-сканером та комерційною рідинною чашечкою. Графіки відхилення зонда — Z позиція (залежності відхилення зонда від відстані між поверхнями зонда та слюди, в подальшому — силові графіки) були записані за вертикальної частоти сканування 1 Гц та Z-амплітуди 50—200 нм. Графіки сила — відстань були отримані із залежностей відхилення зонда — Z позиція (тобто положення сканера по осі Z) за допомогою програмного

забезпечення Nanoscope (версія 5.12r3, Veeco Instruments Inc., США).

Силкові графіки були записані в режимі force calibration plot mode. Значення сили адгезії були усереднені для 10–30 графіків. В одному циклі силових вимірювань (цикл зближення та віддалення поверхней зонда та субстрату) записували дані для 256–512 точок. Усі силові вимірювання були проведені з трикутними (V-подібними) кантилеверами OMCL-TR400PSA з нітриду кремнію із золотим напилюванням, що містять також тонкий шар хрому (Olympus Optical Co., Японія) (рис. 2). Кожний чіп містить два коротких та два довгих кантилевери, які відрізняються геометричними розмірами та, отже, константою твердості. Резонансні частоти кантилеверів були визначені за допомогою вбудованої опції програмного забезпечення вимірювання частоти кантилевера у повітрі (без урахування можливого зсува резонансної частоти через демпфірування повітря).

Константу твердості визначали індивідуально для кожного кантилевера за допомогою методу резонансної частоти Клевленда (Cleveland), в якому значення константи твердості пропорційно резонансній частоті у третьому степені ненавантаженого кантилевера [15]

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

де  $K$  — константа твердості;  $E$  — модуль еластичності;  $v_0$  — виміряна резонансна частота;  $\rho$  — щільність композитного матеріалу, з якого зроблено кантилевер;  $\omega$ ,  $l$  — ширина та довжина кантилевера відповідно.

Для розрахунку  $K$  за методом Клевленда необхідно знання модуля еластичності та щільності матеріалу кантилевера. Модуль еластичності для композитного кантилевера визначали із співвідношення [16]

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

де  $E_{\text{SiN}} = 197$  ГПа та  $E_{\text{SiN}} = 214$  ГПа для кантилеверів довжиною  $l = 100$  мкм та  $l = 200$  мкм відповідно;  $E_{\text{Au}} = 81$  ГПа,  $E_{\text{SiN}} = 288,1$  ГПа;  $h_1 + h_2 + h_3$  — загальна товщина кантилевера,  $h_1$ ,  $h_2$ ,  $h_3$  — товщина  $\text{Si}_3\text{N}_4$ , Au та Cr відповідно. Обчислені значення модуля еластичності становили  $E_{\text{SiN}} = 197,2$  ГПа та  $E_{\text{SiN}} = 182,5$  ГПа

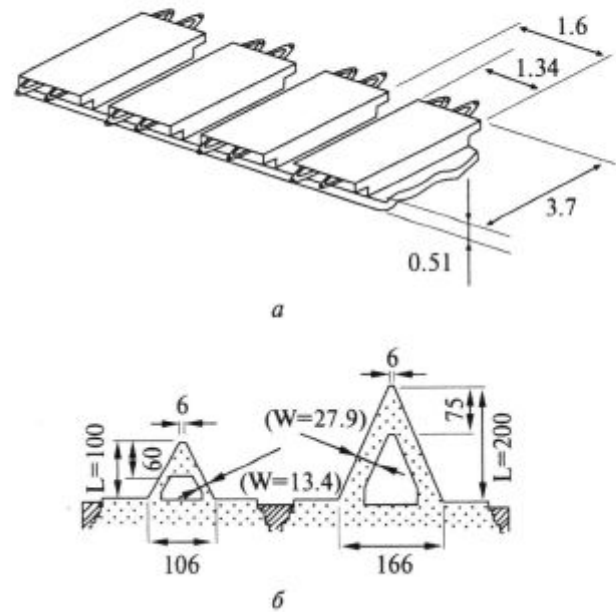


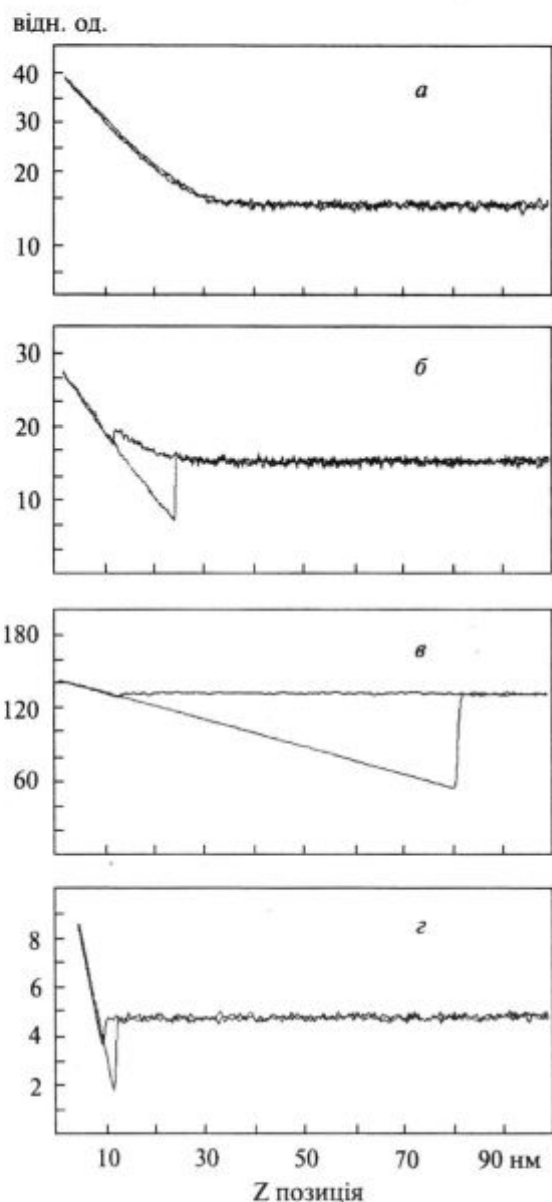
Рис. 2. Мікрочіпи, що містять кантилевери OMCL-TR400PSA (Olympus Optical Co., Японія) для атомно-силової мікроскопії: а — зображено чотири чіпи, закріплені на скляній підкладинці, кожний з яких має чотири кантилевери — два довжиною 100 мкм та два довжиною 200 мкм; б — переріз довгого та короткого трикутних кантилеверів; розміри наведено в мкм. Зонд розташований на відстані 4 мкм від краю кантилевера

для довгого та короткого кантилеверів відповідно.

Стехіометрія та щільність кантилеверів варіюють у широких межах в залежності від умов реакції їхнього отримання. Ми використовували значення щільності для нітриду кремнію  $\rho_{\text{SiN}} = 2,8$  г/см<sup>3</sup>, яке відповідає стехіометрії N : Si = 1,1 [16],  $\rho_{\text{Au}} = 19,6$  г/см<sup>3</sup> та  $\rho_{\text{Cr}} = 7,2$  г/см<sup>3</sup>. Ефективне значення щільності композитного матеріалу для кантилевера із  $\text{Si}_3\text{N}_4$ —Au—Cr було розраховано із співвідношення [16]

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

Для кантилеверів OMCL-TR400PSA товщина  $\text{SiN}$  становила  $h_{\text{SiN}} = 400 \pm 40$  нм, товщина шару хрому  $h_{\text{Cr}} = 3$  нм, а товщина золотого напилювання  $h_{\text{Au}} = 60$  нм відповідно до даних виробника. Визначена таким чином щільність використаних у даній роботі V-подібних композитних кантилеверів склала  $\rho = 5,00$  г/см<sup>3</sup>.



**Рис. 3.** Силові графіки (залежності відхилення АСМ зонда від положення сканера) для немодифікованого (а) та аміномодифікованих (б–г) зондів: а–в — довжина кантилевера 200 мкм; г — довжина кантилевера 100 мкм; а, б — ТЕ буфер; в — ТЕ буфер, 0,5 М NaCl; г — ТЕ буфер, 1 М NaCl

Вимірювання проводили в таких буферних розчинах: 10 мМ трис(гідроксиметил)-амінометан (трис-НСІ) рН 7,6, 1 мМ ЕДТА (ТЕ буфер); 137 мМ NaCl, 2,7 мМ KCl, 10 мМ Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2 мМ КН<sub>2</sub>РО<sub>4</sub>, рН 7,4 (PBS буфер).

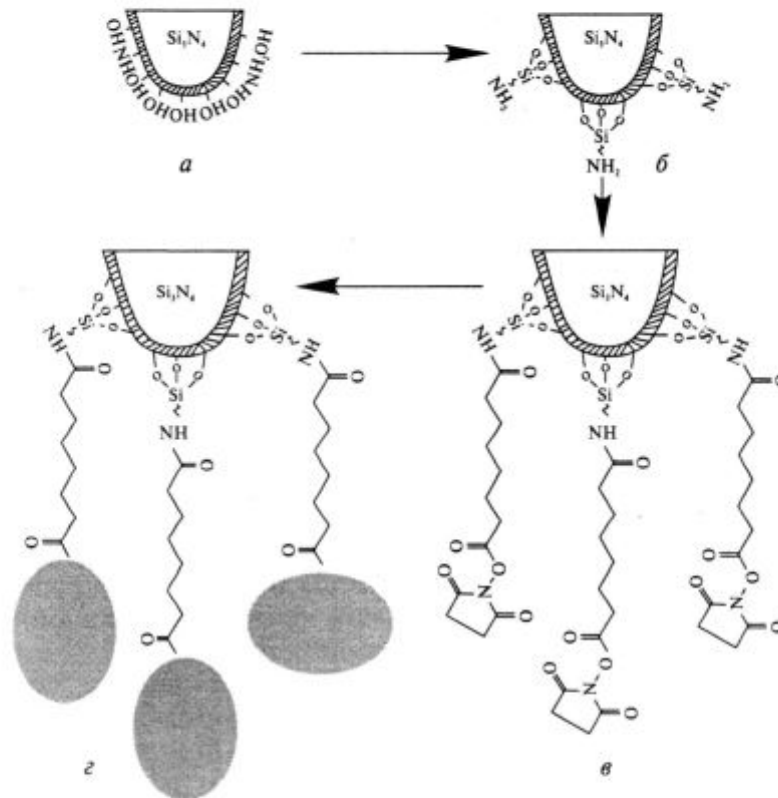
Для проведення силових вимірювань, як правило, використовували кантилевери дов-

жиною  $l = 200$  мкм, резонансна частота яких становила  $\nu_0 \sim 9\text{--}10$  кГц у повітрі. Статистичну обробку значень сили адгезії проводили за допомогою програмного пакету Origin (США).

**Атомно-силова мікроскопія.** АСМ зображення ДНК та БСА були записані за допомогою вібруючого варіанта АСМ у повітрі у режимі «висота» за кімнатної температури. Сканування проводили за допомогою OMCL-AC160TS кантилеверів (Olympus Optical Co., Японія), що характеризуються резонансною частотою  $\nu_0 = 340\text{--}360$  кГц та константою твердості  $K = 42$  Н/м, за частоти сканування 3 Гц. Зображення були отримані у форматі  $512 \times 512$  пікселей, згладжені та проаналізовані за допомогою програмного забезпечення Nanoscope.

**Результати досліджень та їх обговорення.** Істотні варіації значень константи твердості комерційних кантилеверів потребують індивідуальної калібровки кожного кантилевера, який використовують для кількісних вимірювань. Обчислені із співвідношення ( $l$ ) константи твердості склали  $K = 0,025$  Н/м та  $K = 0,008$  Н/м для застосованих довгого ( $l = 200$  мкм) та короткого ( $l = 100$  мкм) кантилеверів відповідно.

Із силових графіків (в одному циклі силових вимірювань записують два графіки — графік зближення та графік віддалення поверхнею зонда та субстрату) отримують інформацію про адгезивні властивості (еластичність, твердість), сумарний заряд кожної із взаємодіючих поверхней. На рис. 3, а наведено типові силові графіки для немодифікованого зонда, записані у ТЕ буфері (в даному випадку графіки віддалення та зближення практично збігаються; як субстрат використано свіжосколоту слюди). Характерний загин графіків у лівій частині, відсутність так званого «стрибка зонда в контакт» вказують на те, що поверхні і зонда, і субстрату однаково заряджені за даних умов. Оскільки відомо, що слюда за нейтральних значень рН негативно заряджена [17], отже, і сумарний заряд немодифікованого зонда також негативний. Ці результати підтверджують подібність поверхневих властивостей слюди та зонда (окислені поверхні як зонда з нітриду кремнію, так і слюди покриті ОН-групами), незважаючи на присутність на поверхні зонда ендогенних аміногруп (у кількості приблизно  $640 \pm 120$  на  $1 \text{ мкм}^2$  згідно з даними роботи [12]).



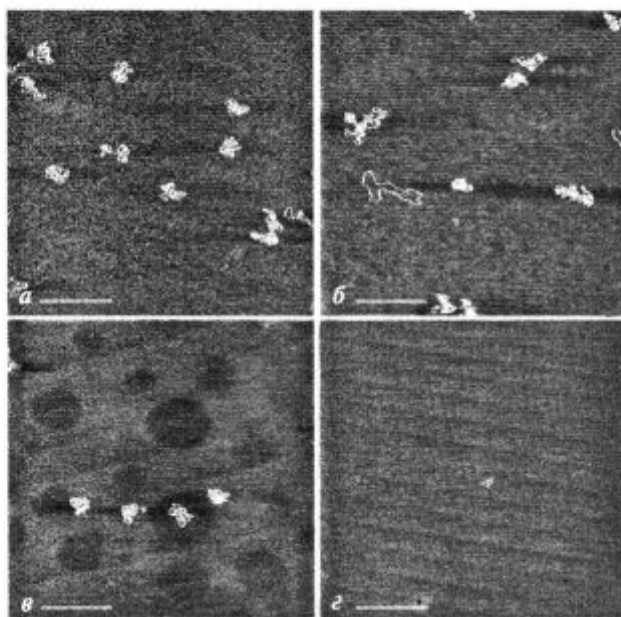
**Рис. 4.** Схема функціоналізації зондів для атомно-силової мікроскопії: *а* — немодифікований АСМ зонд з нітриду кремнію; *б* — АСМ зонд, поверхня якого покрита аміногрупами. На першому етапі в результаті обробки в парах похідного аminosилану (АПТЕС) поверхня зонда модифікована ковалентно приєднаними аміногрупами; *в* — зонд, поверхня якого містить ДСС-лінкер, що має вільний амінореакційний кінець (NHS-ефір). На другому етапі аміногрупи амінозонда реагують з NHS-ефірною групою гомобіфункціонального амінореакційного ДСС-лінкера; *г* — зонд з ковалентно приєднаними молекулами бичачого сироваткового альбуміну. На третьому етапі амінореакційні групи ДСС-лінкера взаємодіють з лізиновими залишками БСА

Саме тому для відпрацювання методики функціоналізації та характеристики модифікованої поверхні ми використовували візуалізацію ДНК pGEMEX та БСА, іммобілізованих на модифікованій слюді. АСМ зображення молекул ДНК та білка слугували додатковим контролем модифікації поверхні зонда та надавали допоміжні дані для інтерпретації силових графіків.

На силовій кривій віддалення амінозонда (рис. 3, *б*), поверхня якого покрита протонованими аміногрупами, з'являється характерний, схожий на зуб, пік, з якого визначають силу адгезії. Величина сили адгезії характеризує якість модифікації зонда, показуючи силу розриву, яку необхідно прикласти для того, щоб вивести з контакту поверхні зонда та субстрату. Визначене із силового графіка значення сили адгезії для амінозонда у ТЕ буфері стано-

вить  $F = 0,18$  нН. При екрануванні позитивно заряджених аміногруп у розчині високої іонної сили (рис. 3, *г*;  $I = 1$  М  $\text{Na}^+$ ) величина сили адгезії істотно зменшується ( $F = 0,03$  нН), проте адгезивний ефект зберігається. Отримана залежність сили адгезії від іонної сили добре узгоджується з попередніми результатами для V-подібних кантилеверів із золотим напилюванням, що характеризуються більш високими константами твердості [14].

Загальна схема модифікації та наступної функціоналізації зондів представлена на рис. 4. Важливою характеристикою зонда для силової мікроскопії пізнання поодиноких молекул є щільність молекул на поверхні зонда. Ідеальним уявляється модифікований зонд з однією молекулою-рецептором для специфічного зв'язування з субстратом. Відмітною особливістю аміно-



**Рис. 5.** АСМ зображення суперспіральної ДНК рGEMEX (довжина 3993 п.н.), іммобілізованої на різних субстратах: *a* — амінослюда, розмір кадру 2 мкм × 2 мкм; *б* — амінослюда, оброблена розчином 0,5 % триетиламіну в хлороформі протягом 15 хв, розмір кадру 2 мкм × 2 мкм, відрізок відповідає 500 нм; *в* — амінослюда, оброблена розчином 0,5 % триетиламіну в хлороформі протягом 30 хв, розмір кадру 2 мкм × 2 мкм, відрізок відповідає 500 нм; *г* — амінослюда, функціоналізована амінореакційним гомобіфункціональним лінкером ЕГС, отримана обробкою амінослюди розчином ЕГС у суміші 0,5 % триетиламіну/хлороформ протягом 5 хв, розмір кадру 4 мкм × 4 мкм; відрізок відповідає 1 мкм

модифікації зонда шляхом АПТЕС (рис. 4, *б*) є те, що одна молекула АПТЕС взаємодіє з трьома поверхневими ОН-групами зонда. Тим самим кількість аміногруп на поверхні зонда, обробленого АПТЕС, повинна бути істотно меншою, ніж для зонда, обробленого за іншою методикою, наприклад, за допомогою етаноламіну з наступним утворенням САМ. У роботі [12] продемонстровано, що кількість аміногруп на поверхні зонда, обробленого етаноламіном, у 1,5 раза вище, ніж для варіанта модифікації за допомогою АПТЕС із газової фази. Якщо прийняти, що кількість аміногруп для поверхні, обробленої АПТЕС, дорівнює  $1730 \pm 200$  на  $1 \text{ мкм}^2$  [12], то для зонда з радіусом заокруглення  $R = 50 \text{ нм}$  на боковій поверхні зонда (тобто на боковій поверхні напівсфери) може

бути локалізовано 27 аміногруп. Для загостреного ж зонда з радіусом заокруглення  $R = 13 \text{ нм}$  [18, 19] на боковій поверхні зонда може бути експоновано дві  $\text{NH}_2$ -групи. Крім того, необхідно прийняти до уваги, що тільки 50 % аміногруп є активними (протонованими) [20].

Використання гомобіфункціонального амінореакційного лінкерного агента (наприклад, ДСС) також направлено на зменшення кількості молекул-рецепторів на поверхні зонда. На рис. 4, *в* показаний тільки варіант, при якому один амінореакційний кінець лінкера (NHS-ефір) взаємодіє з аміногрупою зонда, а другий кінець залишається вільним — з цим реакційним кінцем лінкера можуть взаємодіяти аміногрупи лізинових залишків БСА.

Однак можливо зв'язування обох NHS-кінців лінкера з аміногрупами зонда, що зменшує кількість вільних аміногруп на поверхні амінозонда.

Відзначимо також, що молекули лінкера повинні задовольняти деяким вимогам, тобто вони повинні мати певну довжину, достатню розчинність у розчинниках, у яких можливо проведення реакції комплексоутворення з біомолекулами, а також їхня еластичність повинна бути прогнозованою [21].

У процесі попередніх експериментів найбільш придатним розчинником для обох лінкерів був вибраний розчин 0,5 % триетиламіну в хлороформі (v/v) (результати для іншого розчинника — диметилсульфоксиду — не показано). На рис. 5 наведено результати дослідження впливу часу обробки амінослюди даним розчином та лінкером ЕГС, розчиненим у ньому, на адсорбційні властивості амінослюди. Раніше ми показали, що силові графіки для пари поверхней амінослюда — зонд є подібними і кількісно, і якісно до графіків, що характеризують пару амінозонд — слюда [22]. Тому отримані результати для амінослюди можуть бути екстрапольованими і на амінозонд. Поряд з формою суперспіральних молекул ДНК рGEMEX їхня кількість на одиниці площі є показником кількості протонованих аміногруп на поверхні амінослюди, що беруть участь в електростатичній взаємодії з фосфатними групами ДНК, тобто своєрідним показником якості амінослюди. При переході від стандартної амінослюди (11–12 молекул ДНК рGEMEX

на площі 4 мкм<sup>2</sup>, рис. 5, *a*) кількість іммобілізованих молекул ДНК на амінослюді зменшується до 10–11 молекул (час обробки розчином 0,5 % триетиламіну в хлороформі 15 хв, рис. 5, *b*) та до 4 молекул (30 хв, рис. 5, *в*). Ці результати показують, що за часу обробки амінослюди, що не перевищує 5 хв, кількість молекул ДНК зберігається на рівні, характерному для необробленої амінослюди. Крім того, молекули ДНК рGEMEX зберігають плектономічну конформацію навіть за часу обробки 30 хв. Таким чином, за невеликого часу експозиції ( $T \leq 15$  хв) на обробленій розчином 0,5 % триетиламін/хлороформ амінослюді зберігається практично така ж кількість аміногруп, як і на поверхні необробленої амінослюди.

Після функціоналізації амінослюди ЕГС-лінкером сумарна кількість аміногруп на поверхні амінослюди різко зменшується. Так, на рис. 5, *г* можна бачити тільки одну молекулу ДНК рGEMEX, іммобілізовану на площі 16 мкм<sup>2</sup>, тобто на площі, що в чотири рази перевищує розмір кадру на рис. 5, *a–в*. Після обробки ЕГС-лінкером протягом 15 та 30 хв молекули ДНК на функціоналізовану слюду не адсорбуються. Нагадаємо, що можливі два варіанти взаємодії ЕГС-лінкера з амінослюдою: 1) обидва амінореакційних кінця лінкера зв'язуються з амінослюдою, і в цьому випадку кількість вільних аміногруп на поверхні слюди різко зменшується; 2) лінкер зв'язується одним NHS-ефірним кінцем з амінослюдою, а другий амінореакційний кінець залишається вільним, та зберігається можливість наступного зв'язування ДНК з субстратом.

З метою прояснення механізму зв'язування ЕГС-лінкера з амінослюдою були отримані АСМ зображення бичачого сироваткового альбуміну, іммобілізованого на різних субстратах (рис. 6). Можна бачити, що БСА зв'язується рівною мірою і з амінослюдою (рис. 6, *a*), і з амінослюдою, обробленою 0,5 % триетиламіном у хлороформі протягом 15 хв (рис. 6, *b*) та протягом 30 хв (рис. 6, *в*), а також, що є найважливішим, і зі слюдою, функціоналізованою ЕГС-лінкером (рис. 6, *г*).

Хоча  $\alpha$ -аміногрупи, що є присутніми на N-кінці білків, реагують з NHS-ефірами, в протеїнах вони існують у незначній кількості. Тому реакції з боковими ланцюгами амінокислот

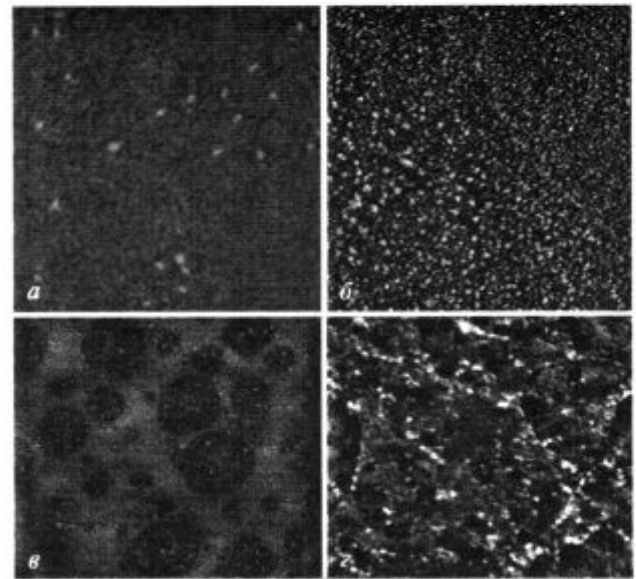


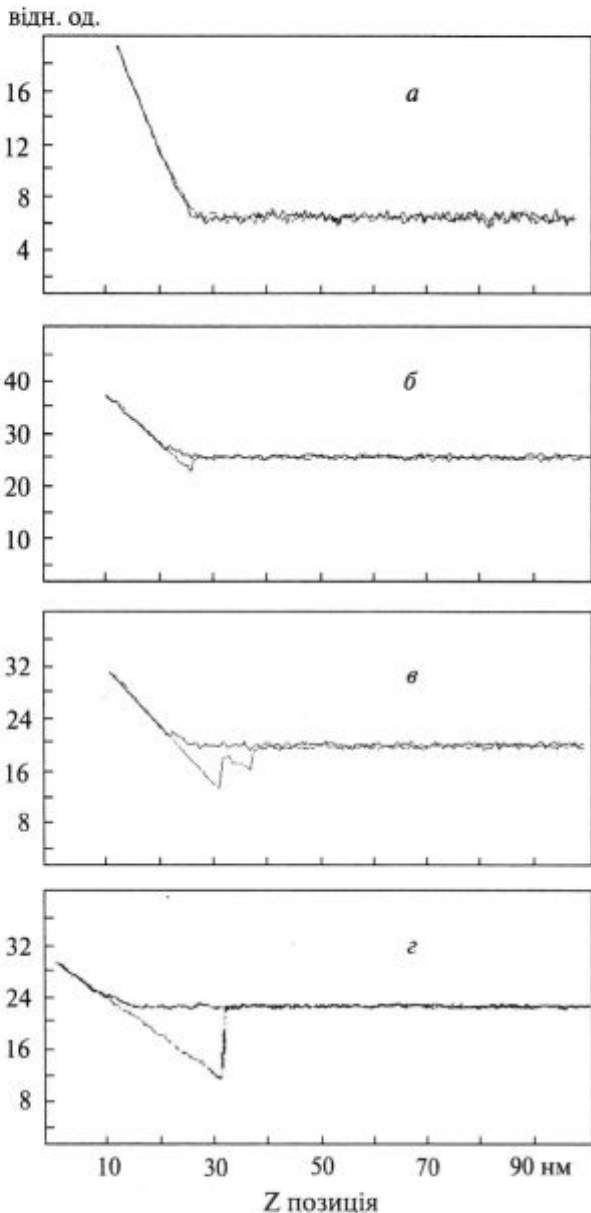
Рис. 6. АСМ зображення бичачого сироваткового альбуміну після іммобілізації на амінослюді, обробленій різними реагентами: *a* — БСА на амінослюді, отриманій обробкою в парах АПТЕС, розмір кадру — 700 нм  $\times$  700 нм; *b* — БСА на амінослюді, обробленій розчином 0,5 % триетиламіну в хлороформі протягом 15 хв, розмір кадру 2 мкм  $\times$  2 мкм; *в* — БСА на амінослюді, обробленій розчином 0,5 % триетиламіну в хлороформі протягом 30 хв, розмір кадру 2 мкм  $\times$  2 мкм; *г* — БСА на амінослюді, функціоналізованій амінореакційним гомобіфункціональним ЕГС-лінкером, розчиненим у суміші 0,5 % триетиламін/хлороформ, розмір кадру 4 мкм  $\times$  4 мкм

є важливими. З п'яти амінокислот, що мають азот у своїх бокових ланцюгах, тільки при взаємодії NHS-ефіру з аміногрупою лізину утворюється стабільний продукт за рахунок утворення ковалентного амідного зв'язку та з утворенням N-гідроксисукциніміду.

Таким чином, результати з візуалізації суперспіральної ДНК рGEMEX (рис. 5) та бичачого сироваткового альбуміну (рис. 6) на амінослюді, функціоналізованій амінореакційним ЕГС-лінкером, показують, що ЕГС-лінкер взаємодіє з амінослюдою, а також БСА взаємодіє з ЕГС-лінкером, яким функціоналізовано амінослюду. Ці результати послужили підставою для функціоналізації амінозондів іншим амінореакційним агентом — ДСС-лінкером.

На рис. 7 наведено силові графіки для поверхней, що взаємодіють, зонда та субстрату після різних етапів модифікації та функціоналіза-





**Рис. 7.** Силкові графіки аміномодифікованого зонда на різних етапах функціоналізації амінореакційним гомобіфункціональним ДСС-лінкером (б, в) та іммобілізації бичачого сироваткового альбуміну (а, з): а — силкові графіки після послідовних етапів модифікації амінозонда ДСС-лінкером, промивання та іммобілізації БСА. Після іммобілізації БСА вимірювання проводили на свіжосколотій слюді; б — слюду не було замінено після функціоналізації зонда ДСС-лінкером; в — вимірювання проведено на заміненій після функціоналізації ДСС-лінкером свіжосколотій слюді; з — зонд з іммобілізованим бичачим сироватковим альбуміном. Графіки (б—з) було записано в процесі модифікації одного кантилевера. Усі вимірювання виконано в PBS буфері

ції зонда бичачим сироватковим альбуміном. При цьому на рис. 7, а зображено силкові графіки для зонда з іммобілізованим БСА, записані після заключної стадії — зв'язування БСА з поверхнею зонда, а графіки на рис. 7, б—з записані після етапів модифікації ДСС-лінкером (рис. 7, б, в) та після іммобілізації БСА на поверхні функціоналізованого ДСС-лінкером зонда (рис. 7, з). Зменшення сили адгезії для модифікованого ДСС-лінкером зонда як у випадку свіжосколотої слюди (рис. 7, в), так і для слюди, поверхню якої частково модифіковано ДСС-лінкером (про що свідчить різниця силкових графіків до та після заміни слюди, рис. 7, б та рис. 7, в відповідно) через наявність на ній ендогенних аміногруп у незначній кількості, до значень  $F = 0,10$  нН та  $F = 0,06$  нН вказує на те, що ДСС-лінкер взаємодіє з поверхнею амінозонда (сила адгезії для амінозонда складає  $F = 0,18$  нН, рис. 3, б).

Збільшення сили адгезії для зонда, функціоналізованого БСА ( $F = 0,27$  нН, рис. 7, з) порівняно з зондом, модифікованим ДСС-лінкером ( $F = 0,17$  нН, рис. 7, в), якісно та кількісно підтверджує отримані результати із взаємодії БСА зі слюдою, функціоналізованою амінореакційним ЕГС-лінкером (рис. 6, з).

Таким чином, у даній роботі представлено схему та проведено модифікацію з наступною функціоналізацією зондів для атомно-силової мікроскопії бичачим сироватковим альбуміном. Зонди з ковалентно приєднаним амінореакційним гомобіфункціональним лінкером ДСС та БСА було охарактеризовано шляхом силкових вимірювань — визначено значення сили адгезії як після кожного етапу модифікації, так і тільки для зонда з приєднаним БСА.

*Робота була частково підтримана Japanese Society for the Promotion of Science (Японія), а також грантом Академії медичних наук України. Автор висловлює подяку Лиманській О. (Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини УААН) за допомогу та критичні зауваження при підготовці статті.*

**SUMMARY.** Functionalized by bovine serum albumin (BSA) probes for atomic force microscopy (AFM) which can be used for molecular recognition studies has been obtained. Modification and functionalization procedure of AFM probe includes three stages. First, amino probes were

obtained by modification in vapors of amino silane derivative. Then surface amino groups of the amino probe interacted with homobifunctional amino reactive crosslinker. And finally, the probe with covalently attached crosslinker was functionalized by BSA molecules. Obtained AFM probes were characterized on the different stages of the modification by force measurements and the adhesion forces were determined. Process of modification was confirmed by visualization of BSA and supercoiled pGEMEX DNA molecules immobilized on the standard amino mica and amino mica modified by crosslinker.

**РЕЗЮМЕ.** Получены зонды для атомно-силовой микроскопии (АСМ), функционализированные бычьим сывороточным альбумином (БСА), которые могут быть использованы для изучения процессов молекулярного узнавания. Процедура модификации и функционализации АСМ зонда включает три этапа. Сначала посредством модификации в парах производного аminosилана был получен аминозонд, с поверхностными аминогруппами которого взаимодействовал аминореакционный гомобифункциональный линкер. На заключительном этапе зонд с ковалентно присоединенным линкером был функционализован молекулами БСА. Полученные АСМ зонды были охарактеризованы на различных этапах модификации посредством АСМ в режиме силовых измерений — из силовых графиков определена сила адгезии. Процесс модификации поверхности зонда подтвержден визуализацией молекул БСА и суперспиральной ДНК pGEMEX, иммобилизованных на стандартной аминослюде и аминослюде, которая модифицирована линкерным агентом.

#### СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Pelling A.E., Li Y., Shi W., Gimzewski J.K. Nanoscale visualization and characterization of *Myxococcus xanthus* cells with atomic force microscopy // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* — 2005. — **102**, № 18. — P. 6484—6489.
2. Larson S.B., Kuznetsov Y.G., Day J., Zhou J., Glaser S., Braslawsky G., McPherson A. Combined use of AFM and X-ray diffraction to analyze crystals of an engineered, domain-deleted antibody // *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* — 2005. — **61**, Pt 4. — P. 416—422.
3. Conwell C.C., Vilfan I.D., Hud N.V. Controlling the size of nanoscale toroidal DNA condensates with static curvature and ionic strength // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* — 2003. — **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., Oosterkamp T.H., Hinterdorfer P. Covalent immobilization of single proteins on mica for molecular recognition force microscopy // *Chemphyschem.* — 2003. — **4**. — P. 1367—1371.
5. Dame R.T. The role of nucleoid-associated proteins in the organization and compaction of bacterial chromatin // *Mol. Microbiol.* — 2005. — **56**, № 4. — P. 858—870.
6. Yamada T., Arakawa H., Okajima T., Shimada T., Ikai A. Use of AFM for imaging and the measurement of the mechanical properties of light-convertible organelles in plants // *Ultramicroscopy.* — 2002. — **91**. — P. 261—268.
7. Blank K., Mai T., Gilbert J., Schiffman S., Rank L.J., Zivin R., Tackney T., Nicolaus T., Spinnler K., Oesterhelt F., Benoit M., Clausen-Schaumann H., Gaub H. A force-based protein biochip // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* — 2003. — **100**, № 20. — P. 11357—11360.
8. Baumgartner W., Hinterdorfer P., Schindler H. Data analysis of interaction forces measured with the atomic force microscope // *Ultramicroscopy.* — 2000. — **82**. — P. 85—95.
9. Okajima T., Arakawa H., Alam M.T., Sekiguchi H., Ikai A. Dynamics of partially stretched protein molecule studied using an atomic force microscope // *Biophys. Chemistry.* — 2004. — **107**. — P. 51—61.
10. Uehara H., Osada T., Ikai A. Quantitative measurement of mRNA at different loci within an individual living cell // *Ultramicroscopy.* — 2004. — **100**. — P. 197—201.
11. Riener C.K., Kienberger F., Hahn C.D., Buchinger G.M., Egwim I.O.C., Haselgrubler T., Ebner A., Romanin C., Klampfl C., Lackner B., Prinz H., Blaas D., Hinterdorfer P., Gruber H.J. Heterobifunctional crosslinkers for tethering single ligand molecules to scanning probes // *Anal. Chim. Acta.* — 2003. — **497**. — P. 101—114.
12. Riener C., Stroh C., Ebner A., Klampfl C., Gall A., Romanin C., Lyubchenko Y., Hinterdorfer P., Gruber H. Simple test system for single molecule recognition force microscopy // *Anal. Chim. Acta.* — 2003. — **479**. — P. 59—75.
13. Лиманський О. Надсуперспіралізація та компактизація суперспіралісної ДНК // *Цитологія і генетика.* — 2005. — **39**, № 2. — С. 65—72.
14. Limansky A., Shlyakhtenko L., Schaus S., Henderson E., Lyubchenko Y. Aminomodified probes for atomic force microscopy // *Probe microscopy.* — 2002. — **2**. — P. 227—234.
15. Cleveland J., Manne S., Bocek D., Hansma P. Nondestructive method for determining the spring constant of cantilever for scanning force microscopy // *Rev. Sci. Instrum.* — 1993. — **64**. — P. 403—405.
16. Hazel J., Tsukruk V. Spring constants of composite ceramic/gold cantilevers for scanning probe microscopy // *Thin Solid Films.* — 1999. — **339**. — P. 249—257.
17. Butt H. Measuring electrostatic, van der Waals and hydration forces in electrolyte solutions with an atomic force microscope // *Biophys. J.* — 1991. — **60**. — P. 1438—1444.
18. Kitazawa M., Toda A. Fabrication of sharp tetrahedral probes with platinum coating // *Japan. J. Appl. Phys.* — 2002. — **41**. — P. 4928—4931.
19. Kitazawa M., Shiotani K., Toda A. Batch fabrication of sharpened silicon nitride tips // *Japan. J. Appl. Phys.* — 2003. — **42**. — P. 4844—4847.
20. Shlyakhtenko L., Gall A., Weimer J., Hawn D., Lyubchenko Y. Atomic force microscopy imaging of DNA

covalently immobilized on a functionalized mica substrate // *Biophys. J.* — 1999. — 77. — P. 568—576.

21. *Kudera M., Eschbaumer C., Gaub H.E., Schubert U.S.* Analysis of metallo-supramolecular systems using single-molecule force spectroscopy // *Adv. Funct. Mater.* — 2003. — 13, № 8. — P. 615—620.

22. *Лиманский А.* Исследование аминомодифицированных зондов для атомно-силовой микроскопии биомолекул // *Биополимеры и клетка.* — 2002. — 18. — С. 62—70.

Поступила 23.06.05

## ПРОГРАММА «АКУШЕРСКИЙ СКРИНИНГ» КАК ПРОФИЛАКТИКА ВРОЖДЕННОЙ ПАТОЛОГИИ У ПЛОДА

Основная цель пренатального скрининга — выявление группы беременных женщин с высоким риском рождения детей с хромосомной патологией. При внедрении скрининговых программ необходимо учитывать следующие факторы: заболевание, выявляемое с помощью скрининга, четко распознается; ранняя диагностика и профилактические мероприятия дают хороший результат; проведение скрининга обходится дешевле, чем лечение обнаруженного заболевания.

Одной из наиболее современных и информативных скрининговых программ сегодня является «Акушерский скрининг», в основу которого положен «Интегрированный тест», описанный Wald et al., 1999.

Пакет «Акушерский скрининг» включает в себя:

1) ультразвуковое исследование (УЗИ) в 11—13 нед беременности для целенаправленного поиска маркеров хромосомной патологии (увеличение толщины воротникового пространства, отсутствие носовой косточки, изменение кровотока в венозном протоке и т.д.);

2) двойной биохимический тест по исследованию крови матери: ассоциированные с беременностью плазменный протеин-А и хорионический гонадотропин;

3) УЗИ внутренних органов и систем плода а также экстраэмбриональных структур в 16—18 нед беременности;

4) тройной биохимический тест в 16—18 нед беременности: альфафетопротеин, хорионический гонадотропин, несвязанный эстриол;

5) подсчет риска рождения ребенка с хромо-

сомной патологией на основании обработки данных биохимических и ультразвуковых исследований с помощью компьютерной программы «Альфа-6» (Великобритания), которая соответствует требованиям, предъявляемым к современным медицинским компьютерным программам — базируется на опубликованных научных данных и утвержденной научной методологии.

б) консультация врача-генетика по результатам проведенных исследований;

7) При суммарном риске, превышающем 1:300, — проведение инвазивных исследований (биопсия хориона, плаценты, амниоцентез, кордоцентез);

8) цитогенетическое и молекулярно-цитогенетическое («fluorescence in situ hybridization») исследование ворсин хориона, плаценты, амниоцитов, лимфоцитов пуповинной крови для определения кариотипа плода;

9) плановое УЗИ в 21—22 нед беременности;

10) плановое УЗИ в 30—32 нед беременности.

В клинике «Исида» с помощью «Акушерского скрининга» обследовано свыше 4000 беременных женщин. Эффективность составила 82 %.

Всем беременным женщинам в возрасте, превышающем 38 лет, рекомендуются инвазивные исследования (независимо от результатов биохимических маркеров) для определения кариотипа плода, так как риск рождения ребенка с хромосомной патологией только по возрасту очень высок.

*Н.И. СОПКО*  
Клиника «Исида»