

АТОМНО-СИЛОВАЯ МИКРОСКОПИЯ В ИССЛЕДОВАНИИ ТОНКИХ ПЛЕНОК ЛИЗОЦИМА И ИММУНОГЛОБУЛИНА М.

ТОЛСТИХИНА А.Л., КАЮШИНА Р.Л., СТЕПИНА Н.Д., ЛАПУК В.А.*

Институт кристаллографии РАН

* Институт органической химии РАН

Введение

В настоящее время уделяется большое внимание изучению и использованию принципов, лежащих в основе функционирования биологических систем. При создании чувствительных элементов иммуносенсоров необходимо получение упорядоченных пленок функционально активного белка, то есть создание иммобилизованных слоев иммуноглобулина или белковых ансамблей на твердой основе. Полученные моно- и многослойные высокоорганизованные ансамбли требуют детального изучения их структурной организации, потому что только после этого становится возможным контролируемый синтез пленок. При этом актуальны проблемы связывания белка на поверхности подложек и изучение морфологии полученного белкового слоя. Для исследования моно- и многослойных высокоорганизованных ансамблей на основе полиэлектролитной пленки (ПЭ) и белков мы использовали метод атомно-силовой микроскопии (АСМ), который позволил контролировать процесс осаждения слоев и выявить характерные особенности морфологии поверхности полученных образцов.

Экспериментальная часть

Нами проведены работы по созданию тонких упорядоченных пленок методом последовательной адсорбции противоположно заряженных полиэлектролитов (ПЭ), в том числе биомакромолекул, и получены различные молекулярные ансамбли на основе ПЭ пленки, лизоцима и иммуноглобулина М (IgM).

ПЭ пленки состава ПЭИ+(ПСС/ПАА) $_n$ получали методом зарядовой самосборки на твердых подложках - стеклянных или кварцевых пластинах (40мм×10мм×2 мм) [1]. Подготовку подложек перед нанесением на них ПЭ слоев проводили согласно процедуре, которая обеспечивает фиксированный начальный заряд на поверхности подложек. Далее наносили прекурсор, начинающийся с поликатиона (ПЭИ), который хорошо адсорбируется на слой окиси кремния и затем наносили чередующиеся бислои (ПСС/ПАА) - полианиона - полистиролсульфоната натрия (ПСС) и поликатиона - полиаллиламина (ПАА). Обычно в качестве прекурсоров использовали мультислойные пленки, состоящие из 8 полиэлектролитных бислоев.

Концентрирование белковых растворов проводили на ячейке для ультрафильтрации (модель 8050 фирмы Amicon, Голландия) с мембраной Diaflo PM-30

той же фирмы. Перед экспериментом растворы фильтровали через мембранный фильтр ME 25 (диаметр пор 0.45 мкм) (фирмы "Schleicher and Schuell, Германия). Белковые растворы готовились в 0,01 М трис-HCl буфере pH 8.3, содержащем 0,15 NaCl. Гомогенность и чистоту исходных препаратов белков контролировали методами иммуноэлектрофореза (микро - вариант) и аналитического ультрацентрифугирования.

Иммобилизацию IgM осуществляли погружением подложек, покрытых ПЭ пленкой, в раствор белка при комнатной температуре. Оптимальное время иммобилизации - 20 минут. Все эксперименты выполняли с растворами IgM в диапазоне концентраций $c = 0.690 - 0.0006$ мг/мл.

Топографические изображения поверхности образцов получали в различных режимах АСМ: контактном и модуляционном резонансном (ResonantMode). При этом в контактном режиме АСМ использовали кантилеверы Si_3N_4 (Park Scientific Instruments) длиной 85 мкм, с резонансной частотой 120 КГц и радиусом кривизны острия 50 нм, а в модуляционном резонансном режиме - проводящие кантилеверы Si (Нанотехнология-МДТ) длиной 90 мкм, с резонансной частотой 165 КГц и радиусом кривизны острия 20 нм. Изображения поверхности были получены с помощью сканирующих зондовых микроскопов P4-SPM-MDT и P47-SPM-MDT (Нанотехнология-МДТ).

Результаты и обсуждение.

В работе было проведено исследование процесса формирования слоя лизоцима и IgM на ПЭ пленках состава ПЭИ + n(ПСС/ПАА), где n - число ПЭ пар, и на свежем сколе слюды при различных концентрациях белка в растворе. Методами АСМ и рентгеновской рефлектометрии ранее нами было показано, что в пределах $n = 5 - 10$ морфология поверхности и шероховатость ПЭ пленок практически не изменяется [1].

Изменение концентрации белка в исходных растворах, как показали АСМ исследования, приводит к различной морфологии поверхности адсорбированного слоя. При больших концентрациях (около 0.6 мг/мл) на поверхности прекурсора формировался практически сплошной слой белка, а при уменьшении концентрации до 0.006 мг/мл наблюдалось образование отдельных "белковых островков" одинаковой толщины. На рис.1 приведены топографические изображения поверхности прекурсора с полиэлектролитной пленкой состава ПЭИ+(ПСС/ПАА)8 (а) и после нанесения на нее из раствора с концентрацией 0.698 мг/мл слоя IgM (б). Пленка ПЭ сплошным однородным слоем покрывает стеклянную подложку (рис.1а). На поверхности различимы глобулы различного размера: 250-300 Å (по горизонтали) с высотой около 30-40 Å (основная составляющая ПЭ слоя) и отдельные редкие конгломераты, достигающие 900-1100 Å с высотой 100-127 Å. Изучение профилей поверхности и гистограммы распределения высот показывает, что размах высот достигает 155 Å, а наиболее часто встречающиеся высоты (около 57,7%) составляют порядка 30-40 Å.

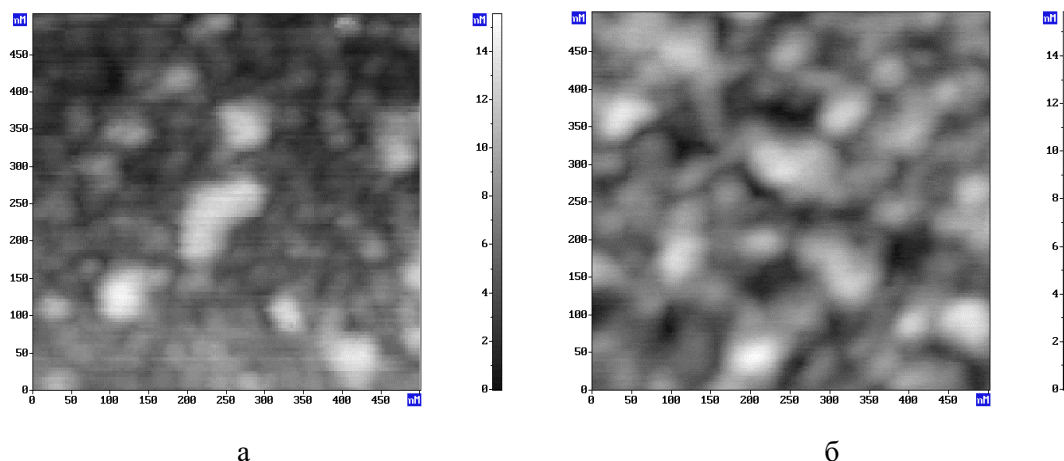
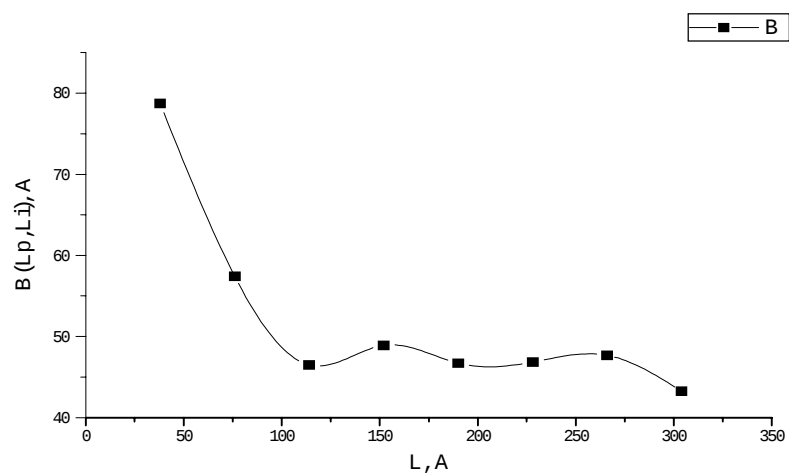


Рис.1 АСМ изображения (резонансный режим) поверхности ПЭ пленки состава ПЕИ+(ПСС/ПАА)8, нанесенной на стеклянную подложку (а) и IgM, полученного на ПЭ осаждением из раствора концентрации $c=0.698$ мг/мл при комнатной температуре (б).

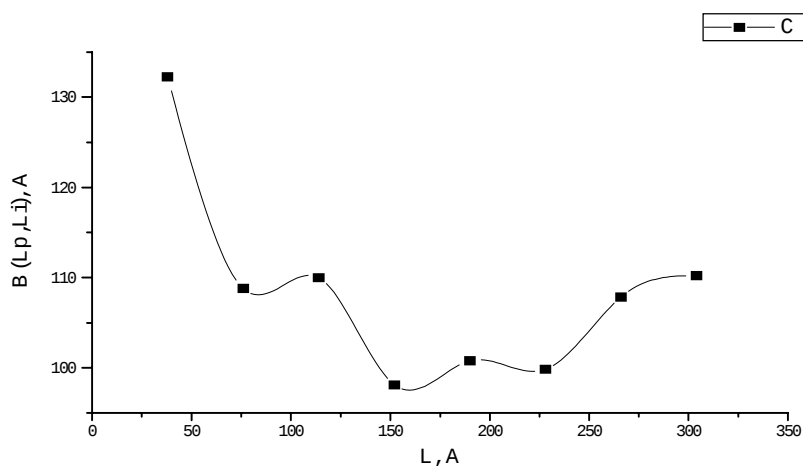
Белковая пленка прочно присоединяется к полиэлектролитной основе (рис.1б). Морфологически она кажется более ровной и однородной, чем ПЭ. Измерение дает характерные размеры белковых глобул на поверхности: 270-400 А (по горизонтали) при высоте 60-70 А. При этом размах высот практически не меняется по сравнению с ПЭ и составляет около 158 А, а доминирующая высота (около 60,5 %), согласно гистограмме высот, составляет 59-60 А.

На рис.2 приведены двумерные функции корреляционной шероховатости $V(L_p, L_l)$, вычисленные согласно [2], и дающие количественное представление о вариациях высот и корреляционной связи между выбранными областями. Так, можно заметить, что корреляционные связи сильнее проявляются для белковой пленки, чем для прекурсора. Из кривых $V(L_p, L_l)$ были найдены длины корреляции L_c и определены размеры зерен. В области 0 до 1500 А размер глобул ПЭ по горизонтали составляет 428 А, а для белковой пленки 476 А. Можно сделать заключение, что белок покрывает поверхность прекурсора почти сплошным однородным слоем, закрывая его неровности.

Дальнейшие эксперименты с растворами меньшей концентрации показали, что по данным АСМ можно охарактеризовать отдельные молекулы IgM. Для этого нами были исследованы пленки IgM на более гладкой поверхности слюды, полученной свежим сколом. Белок адсорбируется на межфазной границе слюда-белок за счет комбинации сил (электростатическое взаимодействие, гидрофобное взаимодействие). Он адсорбируется с нейтрализацией отрицательно заряженной поверхности слюды. Плотность отрицательных зарядов на свежем сколе слюды составляет около 2 e/nm^2 . Положительно заряженные участки белковой молекулы могут взаимодействовать с отрицательно заряженными местами слюды, но в то же время возможно взаимодействие соседних белковых молекул через гидрофобные места.



а

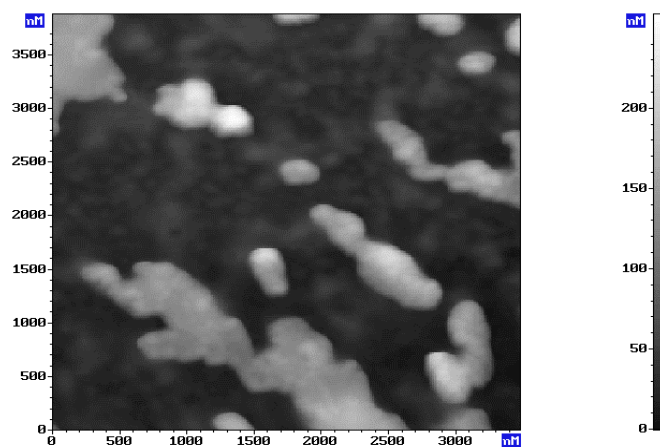


б

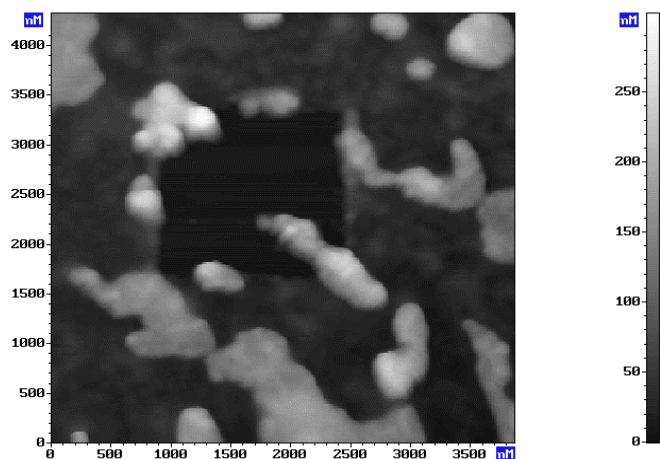
Рис.2 Двумерные функции корреляционной шероховатости для пленок ПЭ (а) и белка (б).

Для определения толщины пленки IgM, иммобилизованного из раствора белка ($c=0.69$ мг/мл) на поверхность слюды, был выполнен эксперимент по частичному ее снятию с помощью кантилевера (в условиях сканирования в контактном режиме и дополнительной нагружающей силе). На рис.3 приведено топографическое изображение поверхности белковой пленки, полученное в резонансном режиме, и этой же поверхности после сканирования небольшого участка в контактном режиме (рис.5 б). В результате в центре изображения можно видеть квадратную область (А) полностью очищенной от иммуноглобулина поверхности слюды. Снятый с подложки белок находится на краях области сканирования (А). По разности уровней поверхности слюды (внутри квадрата) (а) и поверхностного слоя IgM проведена оценка толщины пленки IgM, которая составила в среднем 120 - 150 Å. Следует отметить, что установить толщину белкового слоя на

прекурсором таким же образом удалив белок с прекурсора, не удастся, поскольку морфологически они схожи.



а



б

Рис.3 АСМ изображения поверхности белковой пленки IgM, адсорбированной на свежем сколе слюды до-(а) и после того (б) как был снят белковый слой путем многократного сканирования квадратного участка пленки в контактном режиме ($\sim 10^{-7}$ Н). Изображения были получены в резонансном режиме при давлении на кантилевер $\sim 10^{-8}$ Н.

При малых концентрациях IgM в растворе (0.068-0.006 мг/мл) на поверхности слюды можно видеть отдельные частицы белка (часто в виде димеров) размером по горизонтали 300-500 А и высотой 25-40 А (рис. 4). При оценке размеров молекул по горизонтали мы отдаем себе отчет в том, что их изображение в АСМ является по существу сверткой изображений поверхности и зонда, что приводит к отклонениям полученных изображений поверхности от истинных. Размеры изображения объектов (например, наноструктур или биополимеров) по горизонтали, как правило, оказываются завышенными вследствие конечного размера зондирующего острия [3-7].

Первостепенным фактором, ограничивающим разрешение по горизонтали, является радиус кривизны острия. Однако, уширение горизонтальных размеров изображения может сохраняться даже в случае использования очень острых зондов, вследствие действия на них в процессе сканировании боковых сил [8].

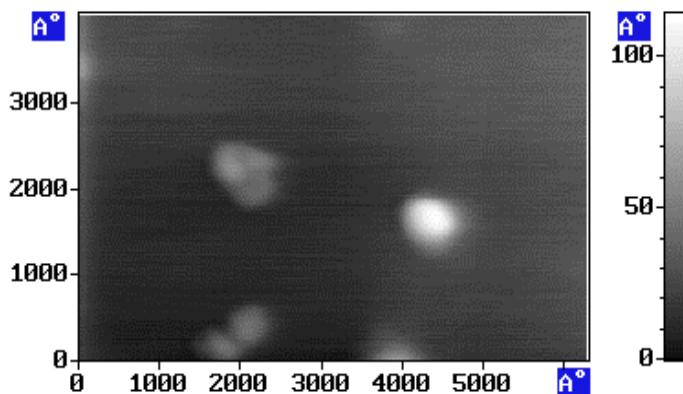


Рис. 4. АСМ изображения (резонансный режим) отдельных молекул и агрегатов IgM , полученных на слюде из белковых растворов малой концентрации ($c=0.006$ мг/мл).

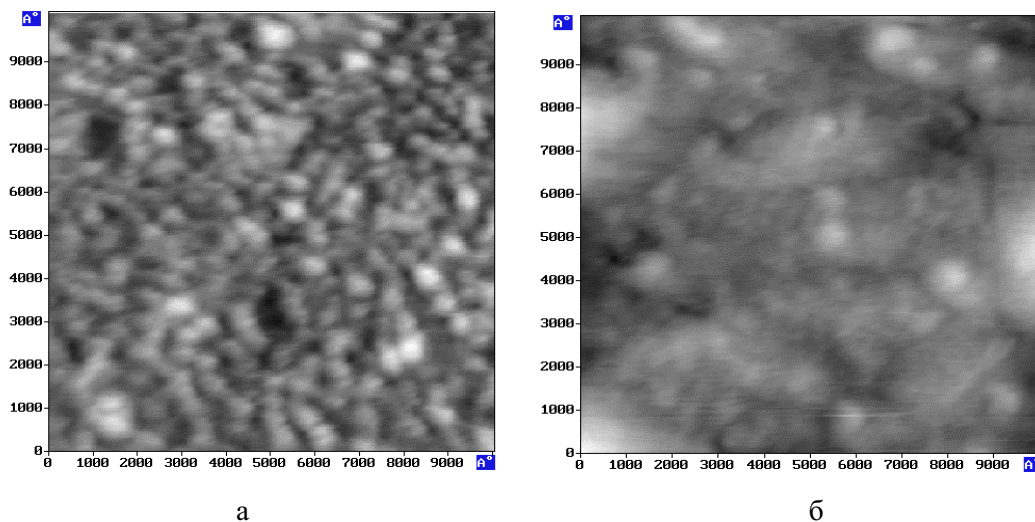


Рис.5 АСМ-изображения (контактный режим) поверхности ПЭ пленки (верхний слой ПСС) (а), и после нанесения на нее лизоцима (б) из раствора концентрации 0,6 мг/мл при рН 4.

Методом самоорганизации получены мультислойные структуры, включающие глобулярный белок лизоцим. Иммобилизацию молекул лизоцима белка куриного яйца проводили на ПЭ, но непосредственно перед адсорбцией белка (в отличие от IgM) на прекурсор наносили свежий слой ПСС. На нем образуются функциональные группы, которые могут взаимодействовать с положительно заряженными участками молекулы

лизосома [9]. На рис.5а можно видеть, что поверхность ПЭ пленки в этом случае достаточно однородная. Пленка лизосома почти равномерно покрывает ПЭ (рис.5б).

Заключение

На твердых подложках ПЭ и слюды получены почти сплошные, однородные по своей морфологии слои IgM. Показано, что осаждение из достаточно концентрированного раствора белка приводит к формированию сплошного белкового слоя толщиной 100-150 Å, что соответствует размерам белковой молекулы. При меньших концентрациях до 0.006 мг/мл сплошность полученной белковой пленки, по-видимому нарушается, и в случае использования атомно-гладких поверхностей типа слюды имеется возможность наблюдать отдельные молекулы IgM и их агрегаты. Показано, что на ПЭ пленке, покрытой свежим слоем ПСС, может быть сформирован однородный слой лизосома.

Работа выполнена при частичной поддержке Российского фонда фундаментальных исследований и в рамках Государственной научно-технической программы "Перспективные технологии и устройства микро- и нанoeлектроники" по проекту N 02.04.3.2.32.Э26.

Список литературы

1. Беляев В.В., Толстихина А.Л., Степина Н.Д., Каюшина Р.Л. // Кристаллография. 1998. Т.43. N 1. С.134-138.
2. Арутюнов П.А., Толстихина А.Л., Демидов В.Н. // Микроэлектроника. 1998. Т.27. N6. С.431-439.
3. Арутюнов П.А., Толстихина А.Л. // Микроэлектроника. 1998. Т.27. N4. С.304-316.
4. Wilson D.L., Dalal P., Kump K.S. et al. // J.Vac.Sci.Technol. 1996. V.B14. N4. P.2407-2416.
5. Westra K.L., Mitchell A.W., Thomson D.J. // Appl.Phys.Lett. 1993. V.74. N5. P.3608-3610.
6. Nagase M., Namatsu H., Kurihara K. et al. // Jpn.J.Appl.Phys.1995. V.34. P.3382-3387.
7. Bustamante C., Keller D. // Physics Today. 1995. V.48. N 12. P.32-38.
8. Tegenfeldt J.O., Montelius L. // Appl.Phys.Lett. 1995. V.66. N9. P.1068-1070.
9. Каюшина Р.Л., Степина Н.Д., Беляев В.В., Хургин Ю.И. // Кристаллография. 1996. Т.41. N1. С.156-161.