

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ
БЕЛОРУССКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ
КАФЕДРА МЕДИЦИНСКОЙ И БИОЛОГИЧЕСКОЙ ФИЗИКИ

Л. В. КУХАРЕНКО

АТОМНО-СИЛОВАЯ МИКРОСКОПИЯ В ИССЛЕДОВАНИИ МЕДИКО-БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБЪЕКТОВ

Учебно-методическое пособие



Минск 2007

УДК 57.086.3–012.7 (075.8)
ББК 22.343 я 73
К 95

Утверждено Научно-методическим советом университета в качестве
учебно-методического пособия 30.05.2007 г., протокол № 9

Рецензенты: проф. Б. А. Слука; доц. Г. К. Ильич

Кухаренко, Л. В.

К 95 Атомно-силовая микроскопия в исследовании медико-биологических объектов :
учеб.-метод. пособие / Л. В. Кухаренко. – Минск : БГМУ, 2007. – 12 с.

ISBN 978–985–462–720–5.

Показаны уникальные возможности визуализации медико-биологических объектов с помощью атомно-силовой микроскопии (АСМ). Приведены примеры использования АСМ в исследованиях морфофункциональных особенностей тромбоцитов, различных конформационных состояний поверхности пурпурной мембраны галобактерий, дешифровки кода различных молекул нуклеиновых кислот. Продемонстрировано применение АСМ для манипулирования с биообъектами на наноуровне, а также для измерения локальных вязко-упругих характеристик поверхности биообъектов.

Предназначено для студентов всех факультетов, аспирантов и соискателей.

УДК 57.086.3–012.7 (075.8)
ББК 22.343 я 73

ISBN 978–985–462–720–5

© Оформление. Белорусский государственный
медицинский университет, 2007

Атомно-силовая микроскопия в исследовании медико-биологических объектов

Большинство исследований с помощью атомно-силовой микроскопии (АСМ) традиционно ставят своей задачей определение поверхностной морфологии медико-биологических объектов с высоким пространственным разрешением.

Исследование тромбоцитов с помощью АСМ

Форменные элементы крови явились одним из первых клеточных объектов АСМ. Кровяные пластинки, или тромбоциты, — это мелкие безъядерные клетки крови дисковидной или круглой формы с диаметром 2–4 мкм. Они играют первостепенную роль в остановке кровотечения (гемостаз), в свертывании крови, в образовании тромба и в прекращении кровотечения (тромбоз), а также в восстановлении стенки поврежденного кровеносного сосуда. Из основных функций тромбоцитов отметим адгезивную (прилипание к месту повреждения эндотелия или чужеродной поверхности) и агрегационную (склеивание тромбоцитов в виде сетки и образование тромбоцитарного тромба). Эти функциональные проявления связаны с изменением поверхностной морфологии тромбоцитов.

Циркулирующие *in vivo* в кровотоке неактивированные (интактные) тромбоциты представляют собой небольшие клетки дисковидной формы, покрытые мембраной и содержащие в цитоплазме много неполимеризованного белка актина, а также гранул разного состава. На рисунке 1 представлено изображение неактивированного (интактного) тромбоцита в форме диска диаметром 2,5 мкм, полученное с помощью АСМ.

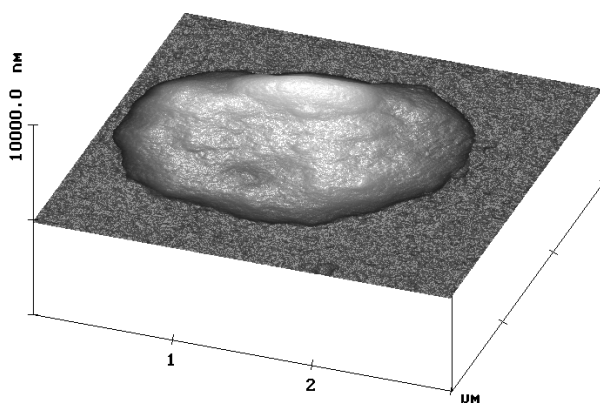


Рис. 1. Изображение интактного тромбоцита, полученное с помощью АСМ

Тромбоциты активируются под действием химических веществ, связывающихся с рецепторами на наружной стороне их мембраны, например, АДФ, либо при их соприкосновении с чужеродной поверхностью. Методом АСМ можно изучать структурную модификацию поверхности тромбоцитов при

их активации, которая является начальным этапом тромбообразования. При активации тромбоциты меняют дисковидную форму на сферическую с многочисленными выростами (филоподиями), благодаря которым тромбоциты могут слипаться друг с другом (агрегировать) или прилипнуть к поврежденной сосудистой стенке. Молекулярной основой образования филоподий является полимеризация актиновых микротрубочек (микрофиламентов) из растворимого белка актина. К микрофиламентам присоединяются белок миозин и другие молекулы. Создаются актин-миозиновые тяжи. В результате филоподии могут сокращаться и способны прикрепляться к различным поверхностям. АСМ-исследования показали, что при активации тромбоцитов в суспензии при добавлении АДФ тромбоциты из дисковидной формы превращаются в сферические с многочисленными короткими выпячиваниями мембраны и с длинными филоподиями (рис. 2).

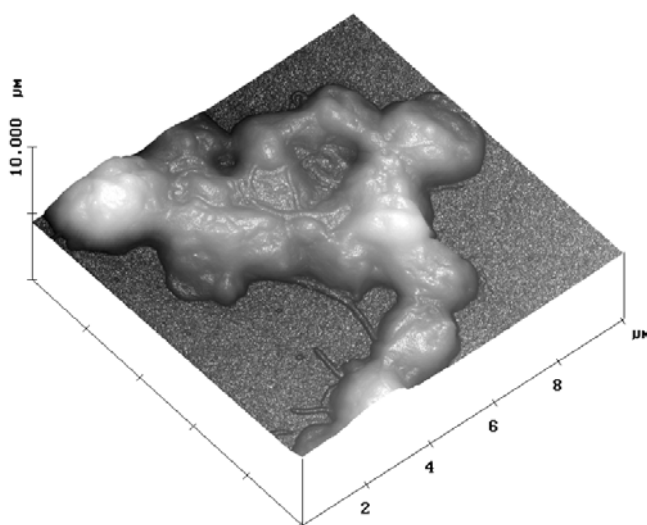


Рис. 2. Изображение АДФ-активированных тромбоцитов, полученное с помощью АСМ

Метод АСМ позволяет визуализировать две разные актиновые структуры — филоподии и ламеллоподий, образующиеся при прилипании (адгезии) тромбоцитов к чужеродной поверхности. На начальной стадии адгезии к чужеродной поверхности тромбоциты приобретают сферическую форму с образованием длинных и коротких филоподий (рис. 3).

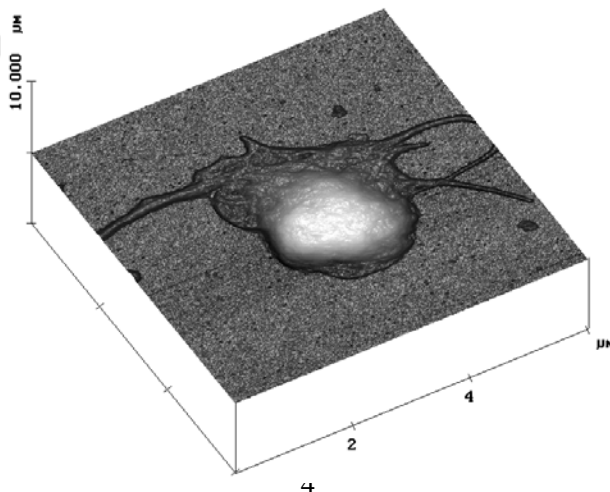


Рис. 3. Изображение тромбоцита на начальной стадии адгезии к слюде, полученное с помощью АСМ

Дальнейшая адгезия приводит к расширению филоподий и превращению их в ламеллаподии (рис. 4).

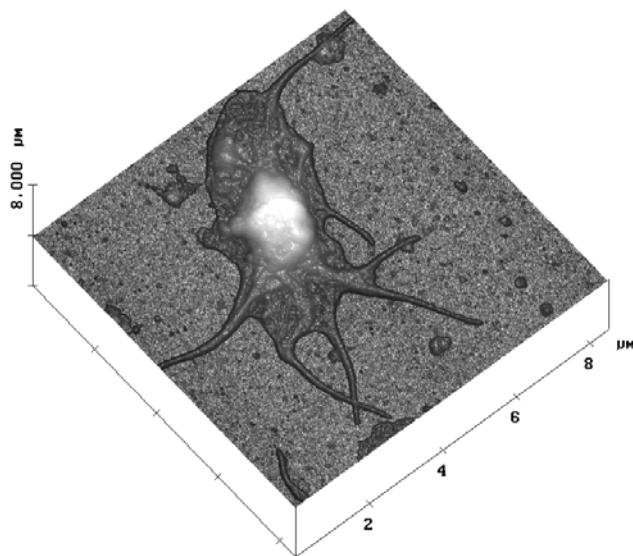


Рис. 4. Изображение тромбоцита на промежуточной стадии адгезии к слюде, полученное с помощью АСМ

В ламеллаподии микрофиламенты образуют густую уплощенную сеть. Толщина ламеллаподия варьирует от 5 до 70 нм. С помощью АСМ можно визуализировать от 5 до 20 гранул размером от 250 до 400 нм, которые образуют «псевдоядро» (рис. 5).

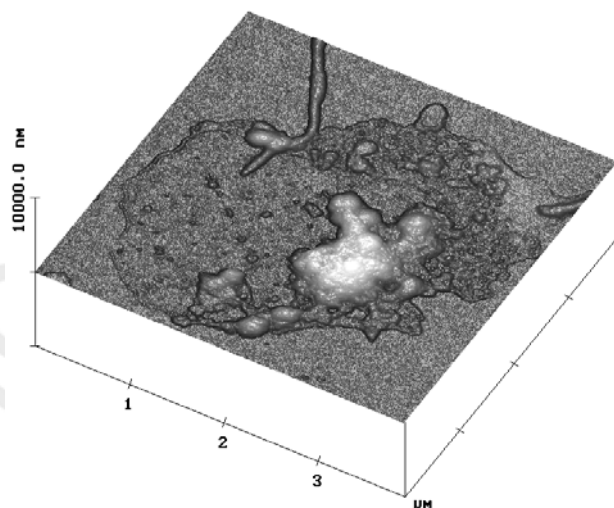


Рис. 5. Изображение тромбоцита на последней стадии адгезии к слюде, полученное с помощью АСМ

Гранулы, собранные в центральной части цитоплазмы активированного тромбоцита, сливаются с наружной мембраной и секретируют свое содержимое в среду (кровь или тканевую жидкость). При этом активные вещества, вышедшие из таких гранул, действуют на белки крови, стимулируя дальнейшее тромбообразование. Процесс высвобождения содержимого гранул оставляет

вогнутости (кратеры) на поверхности ламеллоподия (рис. 5). Диаметр визуализированных кратеров составляет 290 нм, а глубина — 16 нм.

ИССЛЕДОВАНИЕ МЕМБРАННЫХ БЕЛКОВ С ПОМОЩЬЮ АСМ

Метод АСМ привлекателен прежде всего из-за возможности визуализации с высоким пространственным разрешением живых биообъектов в жидкой среде, поскольку только в таких исследованиях можно проследить за изменениями морфологии поверхности в реальном времени. Примером использования АСМ в жидкости является исследование нативных пурпурных мембран и визуализация пространственной двумерной решетки бактериородопсина. Мембрана *Halobacterium halobium* — бактерии соленых вод — может быть разделена на три фракции: желтую, красную и пурпурную. Отличительное свойство мембраны галобактерий — наличие интегрального белка бактериородопсина, состоящего из белка бактериоропсина и ретиналя (вещество, которое содержится и в сетчатке глаза человека). В пурпурной мембране молекулы бактериородопсина собраны в большие двумерные кристаллы, в которых отдельные белковые молекулы фиксированы по отношению друг к другу.

При погружении пурпурной мембраны в жидкость становится возможным с помощью АСМ проследить, как молекулы бактериородопсина изменяют свое конформационное состояние в зависимости от силы взаимодействия между поверхностью мембраны и острием иглы. На рисунке 6 показаны изображения двух конформационных состояний цитоплазматической пурпурной мембраны галобактерий. Если при силе взаимодействия, равной 300 пН, составные части структуры тримеров бактериородопсина отстоят друг от друга на расстояние $1,45 \pm 0,1$ нм, то при силе взаимодействия, равной 150 пН, это же расстояние составляет $2,65 \pm 0,1$ нм.

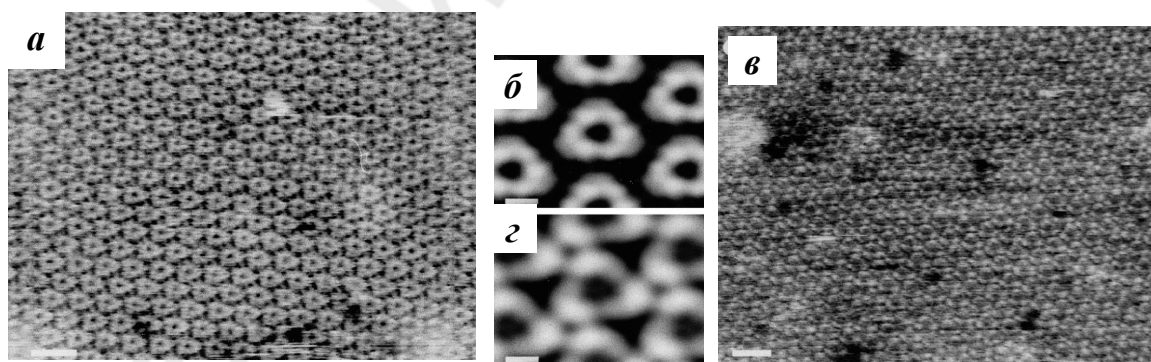


Рис. 6. Топография поверхности двух различных конформационных состояний поверхности пурпурной мембраны галобактерий, полученная с помощью АСМ:

a — изображение, полученное при силе взаимодействия между острием иглы и поверхностью мембраны <300 пН; *б* — изображение участка поверхности пурпурной мембраны, полученное с более высоким пространственным разрешением, где показана структура тримеров бактериородопсина при силе взаимодействия <300 пН; *в* — при силе взаимодействия <150 пН; *г* — изображение участка поверхности пурпурной мембраны, полученное с более высоким пространственным разрешением, где показана структура тримеров бактериородопсина при силе взаимодействия <150 пН. Масштабный отрезок на *a*, *с* соответствует 10 нм, на *б*, *д* — 2 нм

ИССЛЕДОВАНИЕ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ С ПОМОЩЬЮ АСМ

Молекулы нуклеиновых кислот — рибонуклеиновой (РНК) и дезоксирибонуклеиновой (ДНК), являющиеся основными носителями генетической информации — один из самых интересных объектов для АСМ-исследований (рис. 7). Согласно модели, предложенной Уотсоном и Криком, молекула ДНК представляет собой две нити, закрученные в спираль. При этом каждая нить является последовательностью четырех типов звеньев (нуклеотидов), расположенных в определенном порядке вдоль нити.

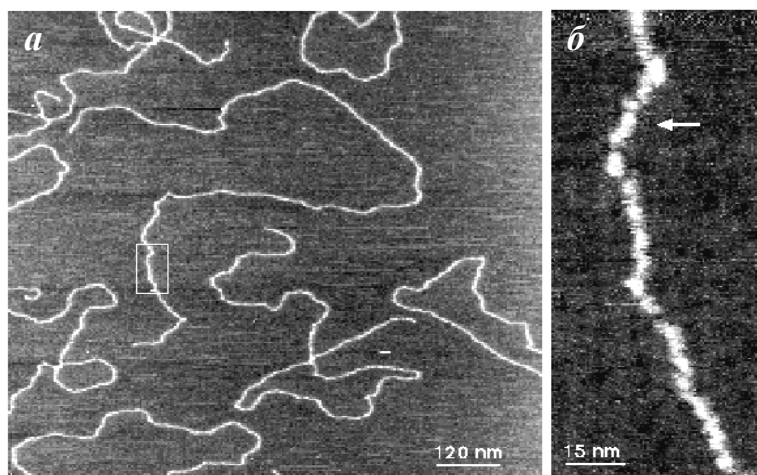


Рис. 7. Изображение молекул ДНК, полученное с помощью АСМ: *а* — типичное; *б* — увеличенное изображение участка молекулы ДНК, выделенного прямоугольником на *а*

Последовательность нуклеотидов можно рассматривать как запись информации в «четвертичном» (по числу нуклеотидов) коде.

Одной из основных задач в современной молекулярной биологии является дешифровка данного кода для различных молекул нуклеиновых кислот. Метод физического картирования с использованием маркеров («меток») является одним из способов частичной дешифровки кода. Маркерами служат лиганды, основным свойством которых является распознавание специфической последовательности нуклеотидов и связывание с ней. Лиганды — это молекулы или ионы в химических комплексных соединениях, непосредственно связанные с центральным атомом — комплексообразователем.

Процесс «мечения» состоит в следующем: в раствор, содержащий нуклеиновые кислоты, добавляются специфические лиганды (например, определенные белковые молекулы), которые связываются со своими специфическими участками молекулы нуклеиновой кислоты. Таким образом, возникает система, состоящая из молекулы нуклеиновой кислоты и молекулы белка, прикрепленной к ней в определенном месте. АСМ используется для частичной дешифровки кода молекулы нуклеиновой кислоты как метод визуализации молекул нуклеиновых кислот и идентификации связанных с ней лигандов — белков. По сравнению с классической электронной микроскопией

АСМ позволяет определять молекулярную массу белка и четко различать мономеры и димеры белковых молекул. Возможность визуализации местоположения лиганд-белка биотина ковалентно привязанного к первому нуклеотиду ДНК продемонстрирована на рисунке 8.

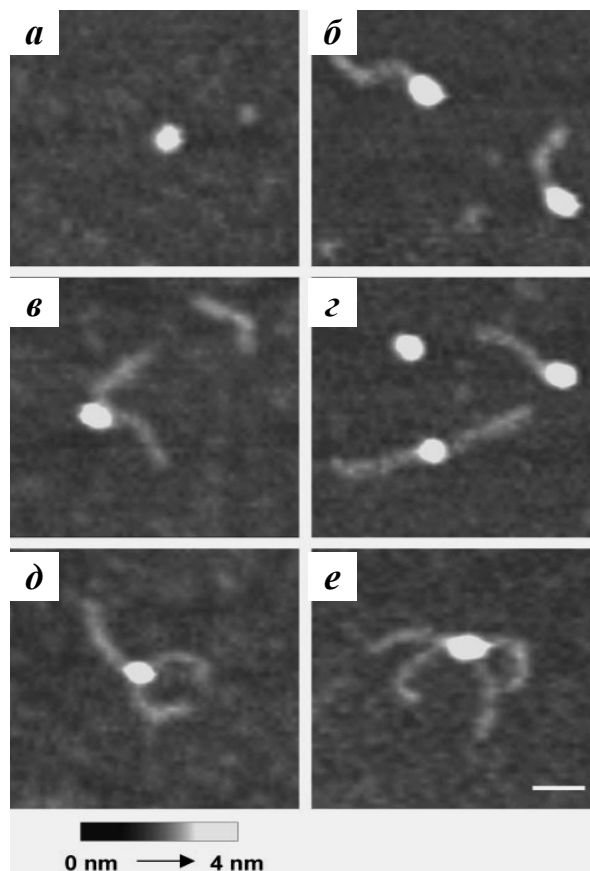


Рис. 8.

a — изображение несвязанного стрептавидина в виде белковой глобулы; *б* — изображение связанного стрептавидина с одной молекулой ДНК, имеющей лиганд-биотин; *в*, *г* — изображение связанного стрептавидина с двумя молекулами ДНК; *д* — изображение стрептавидина связанного с тремя молекулами ДНК; *е* — изображение стрептавидина, связанного с четырьмя молекулами ДНК. Изображения получены с помощью АСМ

Биотин помечался белком стрептавидином, имеющим высокую способность связывания с биотином. По его месторасположению можно определить, где находится белок биотин, привязанный к первому нуклеотиду ДНК. Черно-белая шкала от 0 до 4 нм показывает изменение высоты визуализированных объектов.

ИССЛЕДОВАНИЕ МЕХАНИЧЕСКИХ СВОЙСТВ МЕМБРАНЫ С ПОМОЩЬЮ АСМ

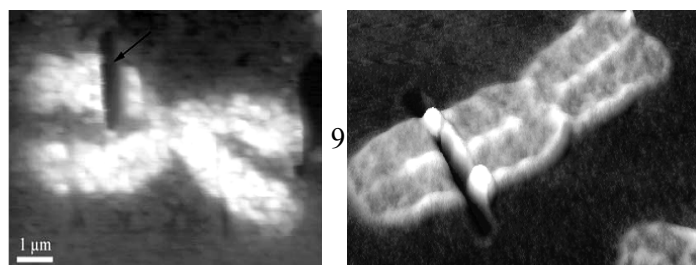
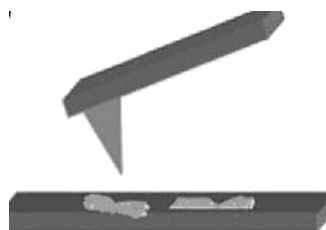
Во многих жизненно важных процессах в эукариотических клетках определяющую роль играют механические свойства (жесткость, вязкость, пластичность) мембраны. Локальные механические свойства клеток определяют межклеточное взаимодействие при развитии тканей и органов в процессе эмбриогенеза. Локальное изменение механического напряжения мембраны приводит к росту и морфологическим изменениям в нейронах.

Изменение механической жесткости цитоплазматической мембраны может оказывать влияние на функционирование ионных каналов. Например, функциональная активность кальций-активируемых калиевых каналов прямо зависит от микровязкости липидного бислоя мембраны. АСМ дает уникальную возможность прямого измерения локальных вязкоупругих свойств плазматической мембраны живых клеток. Для этого острие зонда постепенно подводится к исследуемой поверхности. В момент касания появляется отталкивающая сила. При дальнейшем движении зонда эта сила, измеряемая по величине изгиба кантилевера, увеличивается. Набор кривых «отклонение–сила», полученных в различных точках клетки, дает возможность картировать с высоким пространственным разрешением локальные механические характеристики плазматической мембраны и сопоставлять их с топографией клеточной поверхности.

Так, исследуя поверхность культивируемых миоцитов из предсердия крысы методом АСМ обнаружено, что наименьшей жесткостью обладает участок мембраны, расположенный над ядром, а по направлению к периферии клетки жесткость увеличивается. Жесткость поверхности клеток увеличивалась вдвое при повышении наружной концентрации ионов кальция от 0 до 5 мМ. С помощью этого метода удается зарегистрировать не только изменения высоты клеток, но и динамические изменения жесткости их поверхности при сокращении.

МАНИПУЛИРОВАНИЕ С БИООБЪЕКТАМИ НА НАНОУРОВНЕ С ПОМОЩЬЮ АСМ

АСМ может применяться не только для визуализации и измерения локальных вязкоупругих характеристик поверхности различных биологических объектов, но и для направленного силового воздействия. Так, АСМ можно использовать для «вырезания» участков хромосомы (рис. 9). Для этого сначала при малой силе давления зонда или в режиме прерывистого контакта визуализируют отдельную хромосому (разрешение при этом может достигать 30–50 нм). Затем увеличивают силу давления острия до величин, достаточных для физического «отрезания» выбранного участка хромосомы и в заданном месте хромосомы осуществляют сканирование. «Отрезанный» фрагмент хромосомы прилипает к острию зонда и может быть затем отделен и использован для дальнейшего генетического анализа.



Атомно-силовая микроскопия находит все большее применение в исследовании медико-биологических объектов. Ее преимущества по сравнению с другими видами микроскопий делают этот метод исследования лидирующим в современной биологии и медицине.

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. Приведите примеры использования АСМ для визуализации медико-биологических объектов с высоким пространственным разрешением.
2. Приведите примеры использования АСМ для определения локальных механических свойств клеток.
3. Приведите примеры использования АСМ для манипулирования с биообъектами на наноуровне.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Сканирующая зондовая микроскопия биополимеров* / под ред. И. В. Яминского. М., 1997.
2. *Procedures in Scanning Probe Microscopies* / Editors: R. J. Colton [et al.]. England, 1998.

ОГЛАВЛЕНИЕ

Атомно-силовая микроскопия в исследовании медико-биологических объектов... 3	3
Исследование тромбоцитов с помощью АСМ..... 3	3
Исследование мембранных белков с помощью АСМ..... 6	6
Исследование нуклеиновых кислот с помощью АСМ..... 6	6
Исследование механических свойств мембраны с помощью АСМ 8	8
Манипулирование с биообъектами на наноуровне с помощью АСМ..... 9	9
Контрольные вопросы..... 10	10
Литература 10	10

Репозиторий БГМУ

Учебное издание

Кухаренко Людмила Валентиновна

**АТОМНО-СИЛОВАЯ МИКРОСКОПИЯ
В ИССЛЕДОВАНИИ
МЕДИКО-БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБЪЕКТОВ**

Учебно-методическое пособие

Ответственная за выпуск Л. В. Кухаренко

Редактор О. В. Иванова

Корректор Ю. В. Киселёва

Компьютерная вёрстка Н. В. Тишевич

Подписано в печать 31.05.07. Формат 60×84/16. Бумага писчая «КюмЛюкс».

Печать офсетная. Гарнитура «Times».

Усл. печ. л. 0,7. Уч.-изд. л. 0,45. Тираж 100 экз. Заказ 529.

Издатель и полиграфическое исполнение –

Белорусский государственный медицинский университет.

ЛИ № 02330/0133420 от 14.10.2004; ЛП № 02330/0131503 от 27.08.2004.

220030, г. Минск, Ленинградская, 6.