52

Институт теоретической и
экспериментальной физики

FERMILAB
AUG 15 2000
LIBRARY

43-99

ITEP-43-99

А.Л.Суворов, Т.Е.Игнатюк

# СКАНИРУЮЩАЯ ЗОНДОВАЯ МИКРОСКОПИЯ БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБЪЕКТОВ В ЖИДКИХ СРЕДАХ

## (ПОСТАНОВКА И РАЗВИТИЕ ИССЛЕДОВАНИЙ В ГНЦ РФ ИТЭФ)

Fermilab Library
0 1160 0069643 9

Москва 1999

УДК 616.076

**СКАНИРУЮЩАЯ ЗОНДОВАЯ МИКРОСКОПИЯ БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБЪЕКТОВ В ЖИДКИХ СРЕДАХ. (ПОСТАНОВКА И РАЗВИТИЕ ИССЛЕДОВАНИЙ В ГНЦ РФ ИТЭФ): Препринт ИТЭФ 43-99/**

А.Л.Суворов, Т.Е.Игнатюк - М., 1999 - 52 с.

Изучена возможность использования сканирующей туннельной и атомно-силовой микроскопии для создания метода обнаружения, идентификации и количественного учета патогенных вирусов человека в водных объектах окружающей среды. Рассмотрены особенности применения методов сканирующей зондовой микроскопии для изучения структуры и локальных свойств поверхности биологических объектов. Разработаны режимы наблюдения и получены изображения в сканирующем туннельном и атомно-силовом микроскопе модельного вируса (вирус полиомиелита типа 1 вакцинного штамма Сэбина). Определены основные этапы процедуры анализа питьевой воды на содержание определенных вирусов человека, оценены чувствительность, эффективность и длительность метода. Сформулированы основные задачи дальнейших исследований и пути их реализации. Выделены дополнительные перспективные направления развития работ для анализа других биологических объектов в воде, а также в жидких средах организма человека.

**SCANNING PROBE MICROSCOPY OF BIOLOGICAL OBJECTS IN AQUEOUS ENVIRONMENT. (PROPOUNDING AND DEVELOPMENT OF INVESTIGATIONS IN SSC RF ITEP)**

A.L.Suvorov, T.E.Ignatyuk

The possibility of use of scanning tunneling microscopy and atomic force microscopy to develop methods of human nosogenic viruses detection, identification and quantitative calculation in aqueous environment are studied. The special features of use of scanning probe microscopy methods for the investigation of biological objects structure and surface local properties are reviewed. The regimes of observation by scanning tunneling microscope and by atomic force microscope were developed and the images of model viruses (poliovirus type 1 vaccine Sebin's stamm) were received. The main stages of the procedure of the analysis of drinking water for certain human viruses were estimated. The sensibility, the effectiveness and the duration of method were valued. Definitions are given of the problems of further investigations and the ways of their realization. The additional perspective directions of the investigations for the analysis of another biological objects in water and also in aqueous medium of human organism are analysed.

Рис. - 14, список лит. - 49 наим.

© **Институт теоретической и экспериментальной физики, 1999**

## 1. **Введение**

Сканирующая зондовая микроскопия, представляющая собой современные методы исследования свойств поверхности, получила свое развитие как новое научное направление с момента создания в 1982 г. Биннигом и Рорером сканирующего туннельного микроскопа [1]. За прошедшие годы применение зондовой микроскопии в биологии позволило достичь уникальных научных результатов. В частности, применительно к исследованиям нуклеиновых кислот были достигнуты такие результаты как визуализация отдельных молекул ДНК [2], исследование их конформационного состояния в жидких средах, прямое измерение сил взаимодействия комплементарных нуклеотидов [3], визуализация процессов взаимодействия ДНК с белками [4].

В то же время сканирующая зондовая микроскопия биологических объектов и структур остается более сложной задачей в сравнении с исследованием поверхностей твердых тел. Это связано с такими особенностями биологических объектов, как низкая проводимость и невысокая механическая жесткость. Кроме того, объекты должны быть зафиксированы на поверхностях твердых подложек. В настоящее время применяются как физические, так и химические методы иммобилизации биологических объектов. Для решения этой задачи часто используется модификация свойств подложки путем контролируемого осаждения на ее поверхности тонких органических пленок с заданными свойствами. Универсальных методик приготовления образцов для решения задач сканирующей зондовой микроскопии пока не существует. Поэтому в каждом конкретном случае

специфика задачи требует экспериментального определения адекватной процедуры иммобилизации исследуемых структур на подложке.

Молекула ДНК была первой среди множества биологических объектов, которые исследовались методами сканирующей зондовой микроскопии. В настоящее время с помощью сканирующей туннельной микроскопии и атомно-силовой микроскопии получены изображения отдельных белков [5], белок-мембранных комплексов [6], липополисахаридов [7], рецепторных клеток [8], некоторых вирусов [9], бактерий [10] и других объектов.

Несколько лет назад группа специалистов ГНЦ РФ Института теоретической и экспериментальной физики, имеющих большой опыт в использовании современных ультрамикроспопических методов (обеспечивающих атомарное разрешение атомно-зондовой автоионной, сканирующей туннельной и атомно-силовой микроскопии) для исследования разнообразных радиационных эффектов в твердых телах, предложила распространить сканирующую туннельную и атомно-силовую микроскопию на анализ наличия в воде биологических объектов: патогенных вирусов и бактерий. Известно, что большая группа вирусных заболеваний человека вызывается агентами, которые имеют фекально-оральный путь передачи. К таким агентам относятся вирусы различных семейств, причем большая их часть относится к семейству Picornaviridae, роду Enterovirus. Вирусы этой группы могут вызывать такие заболевания, как полиомиелит, гастроэнтерит, гепатит А и др. Увеличение хозяйственно-бытового загрязнения и снижение эффективности процессов самоочищения в природе приводят к загрязнению естественных источников питьевого водоснабжения, нарастанию дефицита качественной питьевой воды. Существующие

микробиологические методы контроля качества питьевой воды не всегда гарантируют ее вирусологическую безопасность. Контроль качества воды с помощью традиционных вирусологических методов достаточно сложен и длителен [11]. В связи с этим возникает необходимость в разработке новых, современных, высокочувствительных и быстрых методов вирусологического контроля воды.

Инициатива ГНЦ РФ ИТЭФ была поддержана Правительством Москвы, которое после проведения (через Московский Комитет по науке и технологиям) тщательной экспертизы подготовленного ИТЭФ Проекта открыло его финансирование. Генеральным заказчиком работ стало Объединение «Мосводоканал». К работам были привлечены: Ассоциация «Ультрамикроскопия в науке и технологии»; разработчик и производитель микроскопов Акционерное Общество «КПД»; группа исследователей физического факультета Московского Государственного Университета им. М.В.Ломоносова; лаборатория НИИ экологии человека и гигиены окружающей среды им. А.Н.Сысина РАМН; лаборатория Института полиомиелита и вирусных энцефалитов им. М.П.Чумакова РАМН. Основными участниками работ, помимо авторов настоящего Препринта, на различных этапах являются вед. науч. сотр., доктор физ.-мат. наук И.В. Яминский, зав. лаб., канд. мед. наук О.Е.Иванова, ст. науч. сотр., канд. биол. наук Т.П.Еремеева, зав. лаб., канд. мед. наук А.Е.Недачин, ст. науч. сотр., канд. физ-мат. наук Н.Е.Лазарев, дир. АО «КПД» Б.А.Логинов , аспирант О.Н.Макеев, аспирант М.А.Козодаев. Всем им авторы приносят искреннюю благодарность.

Целью настоящей работы является знакомство с полученными результатами и со сложившейся ситуацией на сегодняшний день.

## 2. Вирусы в воде

Многие заболевания человека имеют вирусную природу (табл. 1). Вирус представляет собой микроорганизм, основной отличительной чертой которого является полная зависимость его репродукции от биологических структур и функций клетки-хозяина. Геном вирусов представлен нуклеиновой кислотой - дезоксирибонуклеиновой кислотой (ДНК) или рибонуклеиновой кислотой (РНК). Эта кислота репродуцируется в живых клетках и, используя их синтетический аппарат, заставляет клетки синтезировать специализированные частицы, или вирионы, содержащие геном вируса и способные передавать его в другие клетки [12].

Вне живой клетки вирус существует в форме вириона. Вирион, как правило, является полностью сформированной вирусной частицей, состоящей из нуклеиновой кислоты или генома, белковой оболочки или капсида и, для некоторых вирусов, внешней оболочки. Оболочка защищает геном от повреждений и обеспечивает начальные этапы взаимодействия вируса с восприимчивой клеткой. Вирион описывается по ряду признаков, главными из которых являются размер, форма, стабильность по отношению к физическим и химическим воздействиям, структура и химический состав компонентов, способ укладки структурных субъединиц или тип симметрии капсида. Характеристика вирионов основных вирусов человека, распространяемых водным путем, представлена в табл. 2.

Вирусы, выделяющиеся с фекалиями или мочой у многих видов животных, могут загрязнять воду. Особенно важны вирусы, которые поражают желудочно-кишечный тракт человека и экскретируются с фекалиями больных. Эти болезнетворные агенты передаются

Таблица 1

Основные вирусы человека и вызываемые ими болезни.

| Семейство | Тип генома | Основные роды (подгруппы) | Диаметр вириона, нм | Основные заболевания |
|---|---|---|---|---|
| Orhomyxoviridae | РНК | Вирусы гриппа А, В, С | 115 | Грипп А, В, С |
| Paramyxoviridae | РНК | Парамиксовирусы, пневмовирусы, коревые вирусы | 150 - 300 | Парагрипп, респираторно-синцитиальная инфекция, эпидемический паротит, корь |
| Picornaviridae | РНК | Энтеровирусы, кардиовирусы, реновирусы, автовирусы, гепатовирусы | 22 - 30 | Полиомиелит, серозный менингит, энцефалит, энтеровирусная экзантема, гепатит А |
| Togaviridae | РНК | Арбавирусы А, арбавирусы В, Rubivirus, Pestivirus | 40 - 70 | Краснуха, арбавирусные энцефалиты и энцефаломиелиты, клещевой энцефалит, геморрагические лихорадки |
| Rhabdoviridae | РНК | Вирус бешенства | 80 - 200 | Бешенство |
| Retroviridae | РНК | Т-лимфотропные вирусы человека | 80 - 100 | ВИЧ-инфекция |
| Onkornaviridae | РНК | | | Лейкозы, саркомы |
| Adenoviridae | ДНК | | 70 - 90 | Аденовирусная инфекция |
| Herpesviridae | ДНК | | 100 - 200 | Простой герпес, генитальный герпес, герпес плода и ребенка, цитомегалия, ветряная оспа |
| Pox-Viridae | ДНК | | 240 - 269 x 150 | Натуральная оспа |
| Hepadnaviridae | ДНК | | 42 | Гепатит В |
| Flaviviridae | РНК | Флавивирусы | 32 - 50 | Гепатит С, желтая лихорадка, энцефалиты, геморрагические лихорадки |

наиболее часто от человека к человеку фекально-оральным путем. Они также присутствуют в сточных водах, которые после различной степени

Таблица 2.

Основные вирусы человека, распространяемые водным путем.

| Наименование | Число серотипов | Морфологическая характеристика вириона: размер (нм), форма | Особенности генома: размер ядра (нм), тип генома |
|---|---|---|---|
| Вирус гепатита А | 1 | 27-30, икосаэдр, поверхность без особенностей | 10-15, одноцепочечная РНК |
| Вирусы полиомиелита | 3 | 24-28, икосаэдр, поверхность без особенностей | 10-15, одноцепочечная РНК |
| Вирусы Коксаки А Вирусы Коксаки В | 1-22, 24 1-6 | 22-28, икосаэдр, поверхность без особенностей | 10-15, одноцепочечная РНК |
| Вирусы ЕСНО | 1-9, 11-27, 29-34 | 25-30, икосаэдр, поверхность без особенностей | 10-15, одноцепочечная РНК |
| Энтеровирус человека 68-71 | 68-71 | 22-30, икосаэдр, поверхность без особенностей | 10-15, одноцепочечная РНК |
| Аденовирусы человека | 47 | 70-90, икосаэдр, имеет отростки 2х10-15 нм | 35-45, двухцепочечная ДНК |
| Ротавирусы | 3 | 70, икосаэдр, двухкапсидная структура, наружный капсид с четкими рельефными особенностями | 50-65, двухцепочечная фрагментированная РНК |

обработки спускаются в поверхностные воды или в землю. Поэтому энтеровирусы могут присутствовать в загрязненных сточными водами поверхностных и грунтовых водах, которые используются как источники питьевой воды. Вирусы, которые могут экскретироваться в

относительно больших количествах у больных, включают полиовирусы, вирусы Коксаки, вирусы ЕСНО, и другие энтеровирусы, аденовирусы, ротавирусы, вирусы гепатита А, Норволк вирусы (которые могут вызывать инфекционные небактериальные гастроэнтериты). За исключением вируса гепатита А, каждая группа состоит из нескольких серологических типов. По меньшей мере 37 различных вирусов человека выделены из питьевой воды во всем мире [13].

В умеренном климате пик энтеровирусов в сточных водах отмечается в конце лета и затем их уровень быстро падает. Исключением являются вирусы гепатита А, вирусы типа Норволка и ротавирусы, поскольку заболеваемость, обусловленная этими вирусами, растет в холодные месяцы [14]. Однако количественная информация о встречаемости этих последних вирусов в воде и сточных водах недостаточна, поскольку определение происходит по общепринятой методике на культуре клеток. Вирусы типа Норволка не культивируются в культуре каких-либо клеток, их можно определить только с помощью иммунохимических методов как антиген. Ротавирусы и вирусы гепатита А культивируются в культуре клеток, но методика сложна и требует использования иммуноанализа, такого как иммунофлуоресценция, или иммуноферментного анализа для обнаружения роста вируса. Сроки выживания энтеровирусов в воде колеблются от 20 дней до 2 лет. Низкая температура оказывает консервирующее действие. Экспериментально показано, что по сравнению с комнатной температурой (18-22°С) сроки выживания при 4-10°С удлиняются в 2-4 раза. Значительное удлинение сроков выживания энтеровирусов наблюдается при снижении загрязнения воды в естественных условиях (грунтовая, родниковая вода). На

выживаемость вирусов в воде влияет инсоляция (ультрафиолетовая часть спектра). Среди химических факторов ведущее значение имеют pH и общая минерализация. Энтеровирусы устойчивы к действию щелочных pH (до 8,0-8,5) [15].

Поскольку вирусы размножаются только в живых восприимчивых клетках, их число не может увеличиваться в сточных водах. Обработка сточных вод, разбавление, естественная инактивация и обработка питьевой воды еще более снижают число вирусных частиц. Хотя много вспышек вирусных заболеваний водного происхождения могут встречаться при массивном загрязнении сточными водами источников водоснабжения, передача вирусной инфекции и заболевания в технологически развитых странах зависит от того, могут ли минимальные количества вирусов вызвать инфекцию. Показано, что инфекция вызывается экспериментально очень низким числом вирусных частиц. Одна вирусная единица в некоторых случаях может заразить чувствительную клетку, хотя риск инфекции возрастает при увеличении поглощенной дозы [11, 16]. Предполагается, что передача небольшого числа вирусов через водоснабжение может вызвать бессимптомную инфекцию. Но при последующей передаче вирусов от вирусоносителей к чувствительным индивидуумам число вирусных частиц может значительно увеличиться. Это может привести к значительному количеству случаев инфекции, первоисточником которых является питьевая вода.

Присутствие в воде инфекционных агентов зависит от санитарных и социально-экономических условий региона. Например, в Мексике во время сезона дождей в питьевой воде энтеровирусы и ротавирусы были обнаружены в 10 пробах из 10, а вирусы Коксаки в 5 пробах из 10.

Во время сухого периода ротавирусы были обнаружены в 3, а энтеровирусы в 8 из 21 пробы питьевой воды [17]. Исследования проб морской воды и воды устья рек 40-километровой полосы вдоль Адриатического побережья Италии показали присутствие энтеровирусов в 33% проб и реовирусов в 80% проб [18]. В последние годы появился ряд сообщений о загрязнении энтеровирусами открытых водоемов, а также о возможности прохождения вирусов через этапы комплексной обработки воды на водопроводных станциях даже в технологически развитых странах. Водные объекты, которые являются источниками питьевой воды, во все возрастающей мере подвергаются антропогенному воздействию, в результате чего происходит интенсивное загрязнение воды сточными водами городов и промышленных предприятий.

В связи с этим еще более важное значение приобретает вопрос контроля качества воды. В нормативные документы на требования к качеству питьевой воды включен ряд новых биологических показателей, в том числе метод вирусологического контроля воды. Ранее оценка содержания вирусных частиц в воде проводилась по косвенному методу определения содержания колифагов. Однако этот метод не отражает загрязнение воды вирусами человека и не дает представление о качественном и количественном составе патогенных вирусов в образцах воды. Традиционный способ обнаружения и идентификации вирусов по методу культуры клеток обладает рядом недостатков, к которым относится отсутствие соответствующих линий клеток для ряда важных вирусов водного происхождения, большая длительность анализа (до 2 недель), проблемы с обнаружением

низкого числа вирусов, что является типичной ситуацией для образцов природной воды.

Таким образом, разработка нового современного метода обнаружения, идентификации и количественного учета с помощью сканирующей зондовой микроскопии вирусов и бактерий в водных объектах окружающей среды и, в первую очередь, в питьевой воде представляется актуальной задачей.

## 3. Современные методы сканирующей зондовой микроскопии для биологических исследований

Общей чертой всех сканирующих зондовых микроскопов является наличие микроскопического зонда, который приводится в контакт с исследуемой поверхностью и перемещается по некоторому заданному участку поверхности, осуществляя его зондирование или сканирование. Контакт зонда и образца подразумевает их взаимодействие. Информация о поверхности извлекается путем фиксации (при помощи обратной связи) или детектирования взаимодействия зонда и образца. В туннельном микроскопе это взаимодействие проявляется в протекании постоянного тока в туннельном контакте. В основе атомно-силовой микроскопии лежит детектирование сил притяжения и отталкивания между зондом и образцом. Большая часть биологических исследований с применением сканирующих зондовых микроскопов проведена на приборах, работающих на воздухе (не требующих вакуума). Общий вид туннельного атомно-силового микроскопа, на котором проводились исследования биологических объектов в ГНЦ РФ ИТЭФ, изображен на рис. 1.

3.1. *Сканирующий туннельный микроскоп*

Общий принцип работы сканирующего туннельного микроскопа основан на прохождении электроном потенциального барьера, который образован разрывом электрической цепи - небольшим промежутком между зондирующим микроострием и поверхностью образца. В основе

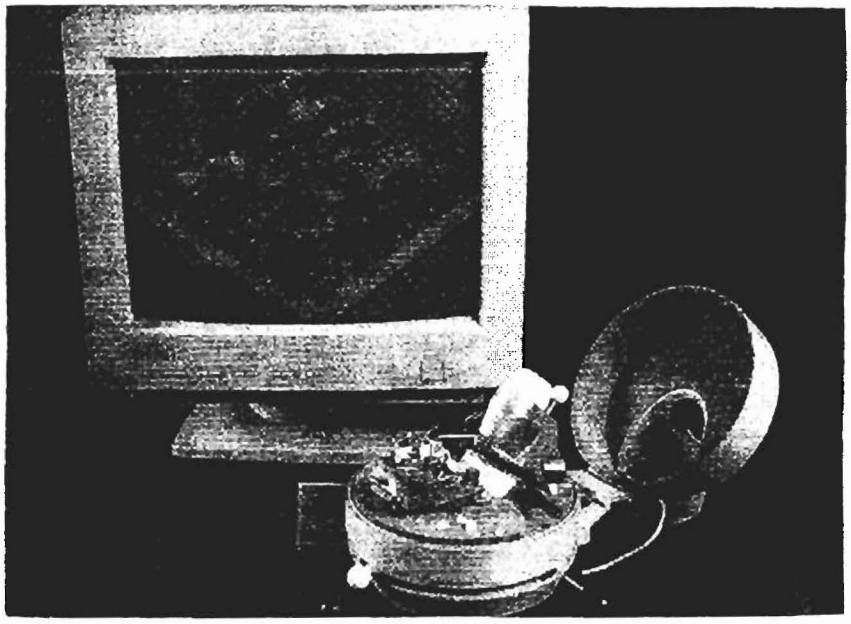


Рис. 1. Работающий на воздухе сканирующий туннельный - атомно-силовой микроскоп для исследования биологических объектов (общий вид).

работы прибора лежит туннельный эффект. Между металлическим острием (зондом) и поверхностью исследуемого проводника прикладывают электрическое напряжение (от единиц мВ до В) и зонд

приближают к поверхности образца до появления туннельного тока. Для получения изображения поверхности металлический зонд перемещают над поверхностью образца, поддерживая постоянной величину туннельного тока. При этом траектория движения зонда совпадает с профилем поверхности, зонд огибает возвышенности и отслеживает углубления. Устойчивые изображения многих поверхностей можно получить при величине туннельного тока в 1 нА. При этом зонд оказывается вблизи поверхности на расстоянии в доли нанометра. Для исследования биологических объектов и органических пленок используют значения туннельного тока порядка 1-100 пикоампер, чтобы не вызвать разрушения этих структур.

В сканирующем туннельном микроскопе в качестве зонда используется заточенное острие, приготовленное из металлической проволоки, например, вольфрамовой или из сплава благородных металлов (80% Pt; 20% Ir). Изготовление зонда осуществляют методом электрохимического травления или просто механическим срезом. В первом случае кончик проволоки опускают в раствор щелочи или при пропускании постоянного или переменного тока формируют микроострие. Во втором случае даже с помощью простых ножниц можно сделать срез проволоки под углом 30-60 градусов. Для исследования биологических объектов применяют зонды небольшого диаметра (1-2 мкм) при значительной длине (10-15 мкм). При изучении поверхности в жидких средах, в которых исключается повреждающее действие высушивания на биологические объекты, на поверхность иглы, за исключением самого кончика, наносят диэлектрическое покрытие - пленку полимера или иного материала [19].

Важной деталью сканирующего туннельного микроскопа является механический манипулятор, который обеспечивает перемещение зонда над поверхностью с шагом до сотых долей нанометра. Традиционно механический манипулятор изготавливают из пьезокерамического материала. С помощью манипулятора, состоящего из трех пьезодвигателей (Px, Py и Pz), можно перемещать зонд по трем координатам (рис. 2).

Для устранения возможности врезания иглы в поверхность исследуемого образца или ее ухода из области существования

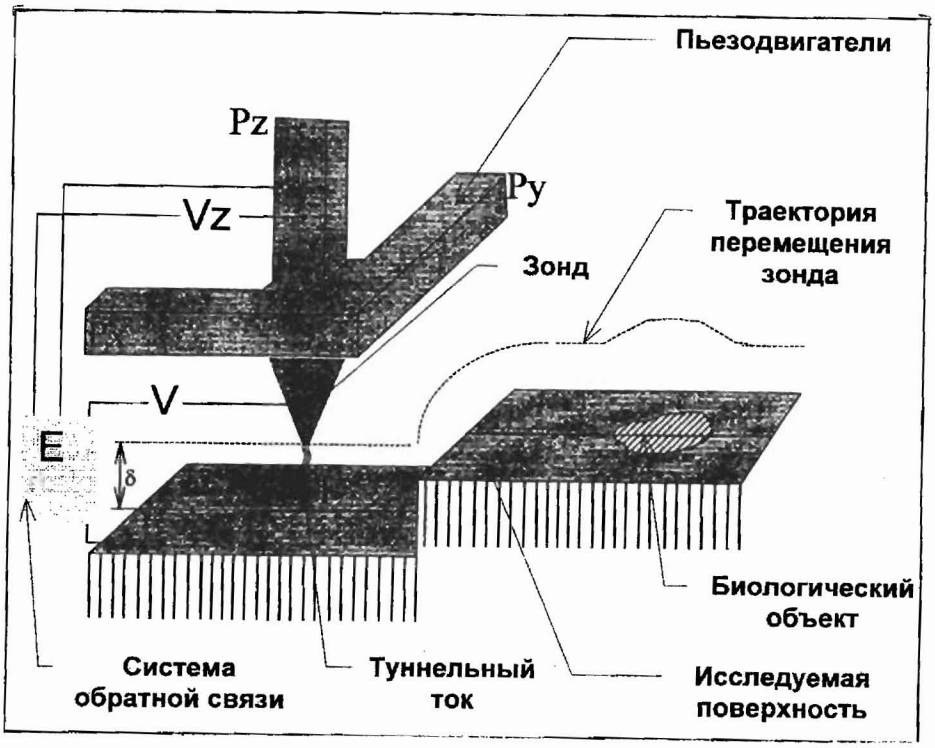



Рис. 2. Принципиальная схема сканирующего туннельного микроскопа.

туннельного тока используют систему обратной связи. Эта система постоянно регистрирует туннельный ток и делает такие поправки высоты зависания иглы, чтобы величина туннельного тока, заданная оператором, оставалась постоянной в каждой точке сканирования. Игла при этом остается на одном и том же расстоянии от поверхности, и коррекция высоты иглы прямо отражает рельеф поверхности образца.

Сканирующий туннельный микроскоп применяют, как правило, для исследования электропроводящих поверхностей. Изображения, которые получают с помощью этого микроскопа, дают информацию о пространственном распределении плотности электронных состояний вблизи поверхности. Биологические объекты представляют собой в основном диэлектрики. Поверхность таких диэлектриков можно исследовать лишь после нанесения на нее тонкой проводящей пленки.

3.2. *Атомно-силовой микроскоп*

В отличие от сканирующего туннельного микроскопа, основным измеряемым параметром которого является туннельный ток между иглой и образцом, в атомно-силовом микроскопе контролируется сила взаимодействия между зондом и поверхностью образца. В качестве зонда атомно-силового микроскопа используют микроминиатюрную упругую пластинку - кантилевер, на свободном конце которой располагается острие из твердого материала (нитрида кремния, кремния). Кантилевер как пружина прижимает острие к поверхности. При перемещении зонда вдоль поверхности регистрируют отклонения кантилевера с помощью луча лазера, который отражается на фотодиодное чувствительное устройство. С помощью

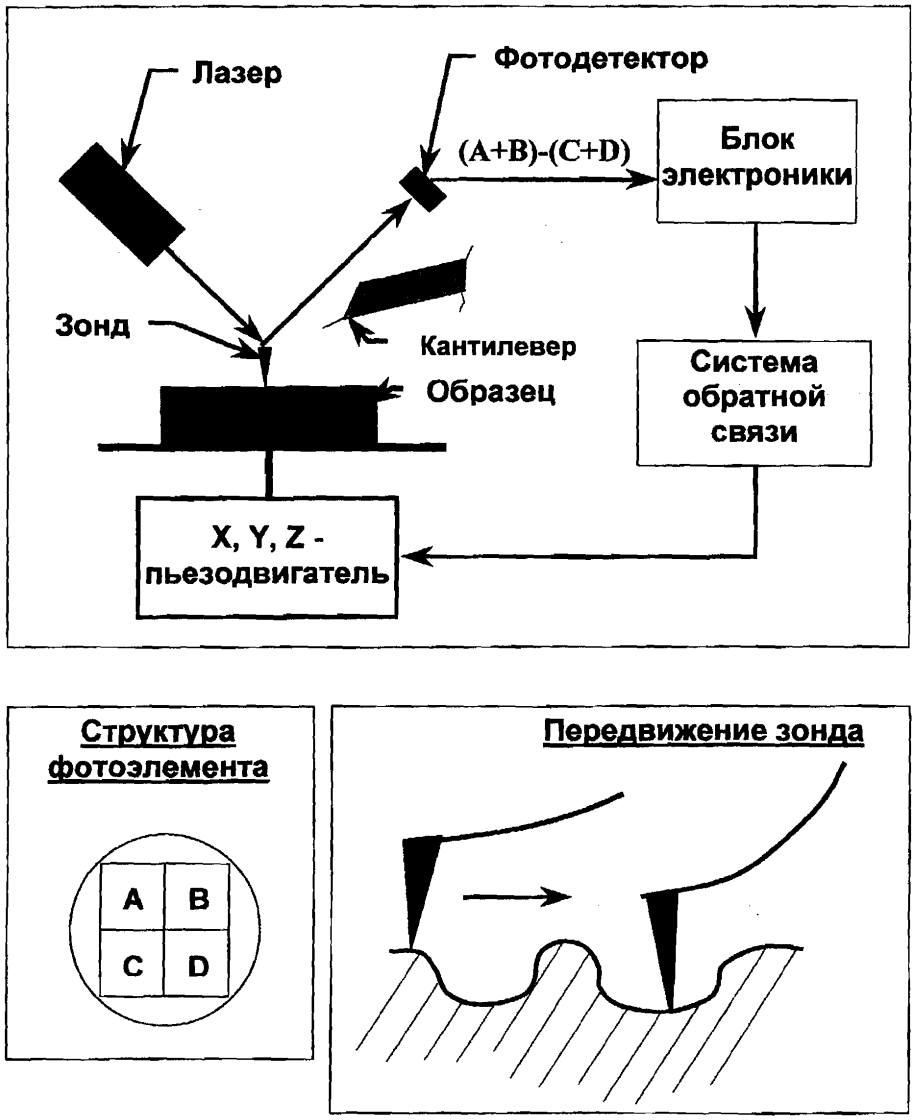



Рис. 3. Принципиальная схема атомно-силового микроскопа.

пьезоманипуляторов система обратной связи поддерживает отклонение кантилевера постоянным (рис. 3).

Атомно-силовой микроскоп позволяет измерять не только профиль поверхности, но и локальные силы трения, величину адгезии, упругие и вязкие свойства поверхности с субнанометровым пространственным разрешением. Широкое применение для исследования биополимеров, которые являются материалами с пониженной поверхностной жесткостью, нашли различные модуляционные методы. В этих методах кантилевер приводят в резонансные колебания, а взаимодействие с поверхностью вызывает изменения амплитуды, частоты или фазы резонансных колебаний. При этом уменьшается воздействие на поверхность образца, что позволяет изучать динамику явлений на поверхности с участием макромолекул [19].

### 3.3. *Сравнение с методом электронной микроскопии*

Методы сканирующей зондовой микроскопии занимают все более важное место в ряду традиционных исследовательских подходов к изучению биообъектов. Зондовая микроскопия по общей схеме эксперимента близка к электронной микроскопии и для многих объектов позволяет достигать разрешения, близкого к разрешению электронного микроскопа. В то же время в ряде случаев применение сканирующей зондовой микроскопии позволяет решать специфические задачи, сложные для электронной микроскопии. Например, по увеличению высоты локального участка изображения молекулы ДНК можно определить местоположение триплекса в составе молекулы [20]. Метод электронной микроскопии не дает высокой точности в определении высот объектов.

Общей чертой методов сканирующей зондовой микроскопии и электронной микроскопии является использование подложки. Поскольку приборы сканирующей зондовой микроскопии предназначены для изучения свойств поверхности, при исследовании биообъектов используют достаточно ровную подложку, на которую адсорбируют изучаемые структуры. Наиболее распространенные в сканирующей зондовой микроскопии подложки - атомарно гладкие сколы слюды, высоко ориентированного пиролитического графита, дисульфида молибдена.

Основные отличия и преимущества сканирующей зондовой микроскопии в сравнении с электронной микроскопией - возможность проведения исследований в различных средах, в том числе на воздухе и в жидкости; отсутствие необходимости какого-либо дополнительного контрастирования исследуемых структур; большая разрешающая способность; неразрушающий характер исследования. Процедура приготовления образцов для сканирующей зондовой микроскопии проще и исследования можно проводить в условиях, близких к нативным.

Тем не менее, в процессе исследования биообъектов следует уделять большое внимание возможным механизмам возникновения артефактов. Достаточно очевидным фактом является необходимость учитывать конечность размеров радиуса кривизны зонда, приводящую к завышению латеральных размеров исследуемых структур, а также эффект занижения высот, связанный с контактными деформациями недостаточно жестких биообъектов. При исследовании многокомпонентных образцов (например, комплекса антиген-антитело) необходимо проводить дополнительный анализ каждой из компонент с целью оценки их парциального влияния на результат исследования.

Это позволяет избежать ошибок в идентификации комплексов, полученных в результате взаимодействия исходных объектов [21].

## 4. Структурно-химические анализы биологических объектов в сканирующем туннельном и атомно-силовом микроскопе

Первым биологическим объектом, к исследованию которого были применены методы зондовой микроскопии, была молекула ДНК. Авторы работы [22] представили СТМ-изображения молекул ДНК, адсорбированных на подложку из высокоориентированного пиролитического графита. Наблюдались протяженные цепочки, обладающие продольной периодичностью (период около 2-3 нм), на основании чего авторы сделали вывод о визуализации витков двойной спирали. Однако позднее сходные «ДНК-подобные» структуры наблюдали при исследовании методом сканирующей туннельной микроскопии чистой свежесколотой поверхности пирографита [23]. В 1992 году были опубликованы первые стабильные и воспроизводимые результаты исследования ДНК методом атомно-силовой микроскопии [24]. Были впервые продемонстрированы уникальные возможности применения методов зондовой микроскопии к исследованию биологических объектов при условии использования адекватной методики иммобилизации исследуемых структур на подложке. Образцы ДНК наносили из капли буферного или водно-спиртового раствора на поверхность слюды, модифицированной ионами металлов $Mg^{2+}$, $Zn^{2+}$, $Co^{2+}$, $La^{2+}$. Эти ионы служат связующими мостиками между отрицательно заряженной слюдой и отрицательно заряженными фосфатными группами молекул ДНК. В дальнейшем было показано, что только при использовании связующих ионов металлов и

предшествующей сканированию промывки образцов молекулы ДНК адсорбируются на поверхность подложки в расправленном состоянии [25], а также было показано, что адсорбция молекул ДНК на поверхность подложки и величина силы адгезии существенно зависят от концентрации связующих ионов и показателя pH среды [26].

В настоящее время хорошо разработаны методики приготовления образцов нуклеиновых кислот для сканирующей зондовой микроскопии. Широко используется методика химической модификации слюды (силанизации) для стабилизации на ее поверхности молекул нуклеиновых кислот [27]. Модифицированная слюда используется для исследований как на воздухе, так и в водной среде, причем в последнем варианте разрешающая способность увеличивается за счет исключения негативного влияния капиллярных сил. Данные силы возникают из-за формирования водяного мениска между зондом и образцом за счет тонкой водяной пленки, покрывающей поверхность при проведении исследований на воздухе. Капиллярные силы увеличивают силовое воздействие зонда на образец. Это вызывает деформацию макромолекулы и ее нестабильность в процессе сканирования и приводит к уменьшению разрешающей способности [19]. Для увеличения разрешения применяют режим прерывистого контакта. Для разворачивания молекул ДНК на подложке применяют уранилацетат, хлорид бензилдиметилалкиламмония, хлорид цетилпиридиния и другие поверхностно активные вещества.

Благодаря развитию методов приготовления образцов нуклеиновых кислот для сканирующего зондового микроскопа оказалось возможным исследовать на молекулярном уровне ряд свойств этих сложных макромолекул: конформационные свойства ДНК в чистом виде и в

комплексе с белками и поверхностно активными веществами, конформационные превращения молекул ДНК в различных средах, моделирующих внутреннюю часть липидного бислоя биологических мембран [28]. Метод атомно-силовой микроскопии позволяет решать задачи картирования ДНК. Специфические участки макромолекулы ДНК помечаются маркерами, анализ местоположения которых на АСМ-изображениях позволяет составлять карты относительного расположения определенных участков нуклеотидной последовательности [29, 30].

При исследовании изолированных белков также возникла проблема адекватной подготовки препаратов, поскольку в естественных условиях большинство белков окружены водой и растворами солей, а при высушивании образцов изменяется нативная конфигурация белковых молекул. Разработаны специальные методы иммобилизации макромолекул белков на подложке: применяют ковалентную пришивку либо заключают белковые молекулы в состав ленгмюровских пленок. Работа в жидкой среде, помимо уменьшения воздействия на объект со стороны зонда и улучшения качества изображения, позволила наблюдать некоторые биологические процессы in vitro непосредственно на подложке атомно-силового микроскопа. Удалось наблюдать in vitro самосборку филаменов из мономеров актина на подложке из слюды [31]. Самосборка актиновых филаменов in vivo происходит в присутствии заряженных мембран. Плотность поверхностного заряда на слюде оказалась сравнима с поверхностной плотностью отрицательного заряда липидных мембран.

В режиме прерывистого контакта в жидкой среде стала возможной не только визуализация адсорбированных на слюде молекул лизоцима,

но и прямое наблюдение его ферментативной активности - лизис мембран бактериальных клеток [32].

Помимо индивидуальных изолированных белков методом атомно-силовой микроскопии удалось наблюдать также белки, входящие в состав мембран. Одной из первых работ в этой области стало наблюдение нативных пурпурных мембран Habacterium halobium [33]. При работе в жидкой среде была определена толщина пурпурной мембраны и ее зависимость от pH окружающего раствора. При улучшении разрешения микроскопа до 0,7 нм удалось наблюдать структуру фотореакционной единицы, различая составные части, отстоящие друг от друга на расстоянии 1,45 нм [34].

Атомно-силовой микроскоп нашел применение также для изучения белков в кристаллическом виде. Удалось наблюдать даже процесс роста кристаллов лизоцима [35], канавалина [36] и тауматина [37]. Атомно-силовая микроскопия позволяет не только добиться высокого разрешения, что возможно и в электронной микроскопии, но также видеть сам процесс роста непосредственно in situ: формирование кристалла, образование дефектов, скорость роста и ее зависимость от направления на уровне отдельных молекул.

Помимо прямой визуализации биологических структур, атомно-силовая микроскопия дает возможность непосредственно измерить силу адгезии между лигандами и рецептором, в частности, между биотином и стрептавидином путем регистрации зависимости отклонения кантилевера от расстояния до поверхности [38]. Аналогичным образом можно использовать антитело в качестве сенсора на антиген и регистрировать узнавание антигена антителом [39]. Непосредственная визуализация комплексов антиген/антитело с

помощью сканирующего туннельного или атомно-силового микроскопа дает возможность констатировать связывание антитела с антигеном без применения меток как в флуоресцентной микроскопии. Так при специфическом связывании иммуноглобулина G с иммобилизованным на подложке бычьим сывороточным альбумином топография поверхности существенно отличается от случая неспецифических антител или чистого бычьего сывороточного альбумина [40]. Возможно, что регистрация акта связывания антител с антигеном в ряде случаев заменит широко распространенный в биологии и медицине иммуноферментный анализ.

Атомно-силовая микроскопия была использована также для исследования особенностей структуры поверхности бактерий различных таксономических групп. Основными преимуществами метода атомно-силовой микроскопии для изучения тонких структур бактериальной клетки перед традиционными способами - растровой и электронной микроскопией, являются: возможность изучения реальной поверхности клетки без применения специальных методов подготовки образца (напыление металлами, приготовление реплик), возможность исследования живых бактерий на воздухе и в различных жидких средах, высокое пространственное разрешение (доли нанометра в плоскости образца и сотые доли нанометра по нормали к образцу), одновременное исследование локальных свойств клеточной стенки, в том числе, жесткости, пластичности и адгезивности [19].

Наиболее широко изучены штаммы Escherichia coli, кишечной палочки, которая является типичным представителем нормальной микрофлоры кишечника млекопитающих и классическим объектом микробиологических и молекулярно-генетических исследований. С

помощью атомно-силового микроскопа зарегистрировано изменение структуры липополисахаридов клеточной стенки бактерий E. coli, наследующих генетическую детерминанту синтеза первичных боковых цепей дизентерийных бактерий [41]. Непосредственное наблюдение образования микропор в бактериальной стенке при воздействии ионов Са приведено в работе [42]. Размер наблюдаемых пор 30 нм.

Визуализация различных мутантов штамма E. coli K12 позволила получить дополнительные сведения о структуре бактериальной поверхности. Для штамма E. coli K12 J62 характерно наличие на поверхности бактериальной клетки длинных отростков - жгутиков. Жгутик служит для перемещения бактерий в пространстве и представляет собой относительно жесткую спираль, состоящую только из белка - флагеллина. На поверхности бактерии E. coli JM109 наблюдаются отростки другого вида - реснички или пили. Они представляют собой прямолинейные белковые отростки круглого поперечного сечения. Для штамма бактерий E. coli HB101 характерно полное отсутствие ресничек [43].

Разработанные простые методы нанесения бактерий на подложку позволили наблюдать на слюде монослойные островковые структуры, образуемые энтеробактериями. Можно было наблюдать различное строение таких монослоев, построенных из разных видов бактерий. Авторы полагают, что подобные монослойные пленки бактерии образуют на поверхности кишечного эпителия в естественных условиях [43].

Метод атомно-силовой микроскопии был применен также в генетических исследованиях различных видов бактерий. В настоящее время с помощью методов генетического обмена возможно

конструирование заданных по характеристике пар штаммов бактерий, различающихся по структуре биополимеров, которые входят в состав клеточных стенок. Проведены исследования клеточной поверхности исходного родительского штамма E. coli K12 J62 his- Ra-хемотипа и трансдуктанта E. coli K12 J62 his+, приобретшего способность синтезировать первичные S-специфические боковые цепи липополисахарида О-антигена Shigella flexneri. Сравнительный анализ изображений генетически связанной пары штаммов E. coli K12 J62 выявил существенные различия в топографии поверхностных структур сравниваемых бактериальных клеток. Для модифицированного штамма характерна высокая структурированность поверхности с образованием ламелий в форме продолговатых пластинок. Отдельные ламели имели длину 200-500 нм при ширине 30-40 нм. Ламели на поверхности штамма плотно упакованы и образуют единую поверхность бактериальной клетки. Для исходного штамма на АСМ-изображениях характерно практически полное отсутствие ламелярной поверхности клеточной стенки [41].

Из всей группы многочисленных вирусов методами сканирующей зондовой микроскопии наиболее полно изучен вирус табачной мозаики. Это первый вирус, открытый Д.И.Ивановским, который имеет характерную морфологию: палочки размером 3000x15 Ангстрем. Он часто служит моделью для исследования различных свойств этих болезнетворных агентов, поскольку безопасен для человека.

Взаимодействие РНК вируса табачной мозаики и белка вирусной оболочки играет важную роль в размножении вируса в клетках организма-хозяина. В работе [44] было исследовано последовательное освобождение РНК от белковой оболочки под действием

диметилсульфоксида, мочевины и в водных растворах с щелочным значением pH. Исследование методом атомно-силовой микроскопии промежуточных стадий разрушения вирусных частиц показало, что процесс высвобождения протекает одинаково под действием всех агентов. Вирусные частицы имели разную длину за счет агрегации. РНК выходит из торца одиночной вирусной частицы. На заключительной стадии процесса наблюдалось полное освобождение от белковой оболочки молекул РНК.

В работе [45 ] атомно-силовая микроскопия была использована для анализа риккетсий и вирусов. Получены АСМ-изображения клеток Coxiela burnetii, ротавируса и вируса венесуэльского энцефалита лошадей, иммуносорбированных на полимер-антительную пленку. В качестве подложки был использован высокоориентированный пиролитический графит, на который антительная пленка переносилась методом Ленгмюра-Шефера. Идентификация вирусов проводилась по специально разработанной программе анализа изображений.

Таким образом, методы сканирующей туннельной микроскопии и атомно-силовой микроскопии позволяют решать ряд биологических задач на субмолекулярном и молекулярном уровне, причем, уникальным достоинством и преимуществом методов зондовой микроскопии перед традиционными методами является возможность наблюдать биологические объекты в условиях, близких к нативным с минимальной химической обработкой (характерной для электронной микроскопии) и без введения метки (как в флуоресцентной микроскопии).

## 5. Первые опыты со сканирующим туннельным и атомно-силовым микроскопами; нерешенные проблемы

Для решения задачи разработки метода экспресс-анализа питьевой воды на наличие вирусов с использованием сканирующего туннельного и атомно-силового микроскопа на первом этапе необходимо было получить изображения вирусов человека водного происхождения и научиться идентифицировать вирусы. В качестве модельного вируса был выбран полиовирус типа 1 вакцинного штамма Сэбина Lse2ab, очищенный от клеточных обломков. Размер вируса 25-30 нм. Выделение и очистку вирусных частиц проводили методом высокоскоростного осаждения (100000 g) через сахарозную «подушку». Концентрация вируса в препарате составляла $10^8$- $10^9$ частиц/мл. Очищенный препарат вируса предоставлен институтом полиомиелита и вирусных энцефалитов им. М.П.Чумакова.

В качестве подложки использовали пирографит, свежесколотую слюду, пленки золота, сплавов золота и палладия, никеля, модифицированную органическими растворителями слюду, окись титана. На поверхность подложки наносили каплю буферного раствора препарата вируса объемом 2 мкл. Состав буфера: 10 мМ трис-HCl, 100 мМ NaCl, 1 мМ динатриевая соль этилендиаминтетрауксусной кислоты. Наблюдение образца проводили сразу же после высыхания капли на воздухе - через 3-5 мин. после нанесения. Сканирующую туннельную микроскопию проводили с помощью мульти-микроскопа СМТ (ЗАО «КПД», Зеленоград). Для атомно-силовой микроскопии использовали Наноскоп Ш фирмы «Digital Instruments» (Санта-Барбара, США), работавший в контактном режиме на воздухе. Применяемые ливера имели жесткость 0.06Н/м. Обработка АСМ- изображений проведена на

специализированном программном обеспечении «ФемтоСкан-001». Исследования на атомно-силовом микроскопе проводились в рамках совместной деятельности на физическом факультете Московского Государственного Университета им. М.В.Ломоносова.

Наблюдения проводили в середине и на краю пятна, образовавшегося после высыхания капли. Высыхание капли происходит с краев. Соль (в основном NaCl) выпадает преимущественно в середине пятна, так как при высыхании капли концентрация соли увеличивается и при некотором значении концентрации раствор становится перенасыщенным, что приводит к выпадению кристаллов соли. Выпадение же вирусных частиц происходило во всей области контакта раствора с подложкой. Количество точек в полученных изображениях - 512x512. Скорость сканирования - около 6 Гц.

Микрокристаллы соли наблюдаются в виде ярко выраженной структуры с характерными ортогонально ориентированными направлениями. На всех образцах, кроме поверхности оксида титана, вирус в большей концентрации располагался на поверхности кристаллов соли, чем непосредственно на подложке. На графите адсорбция наблюдалась преимущественно на поверхностных дефектах (рис. 4). Адгезия частиц была невысокой, вследствие чего при долгом сканировании одного и того же участка поверхности адсорбированные вирусные частицы перемещались по поверхности графита под действием сканирующей иглы. На графите были обнаружены плотно упакованные небольшие скопления вирусных частиц (5-30) (рис. 5). На поверхности оксида титана на поле размером 500x500 нм зарегистрировано большое количество частиц (около 100), одиночную

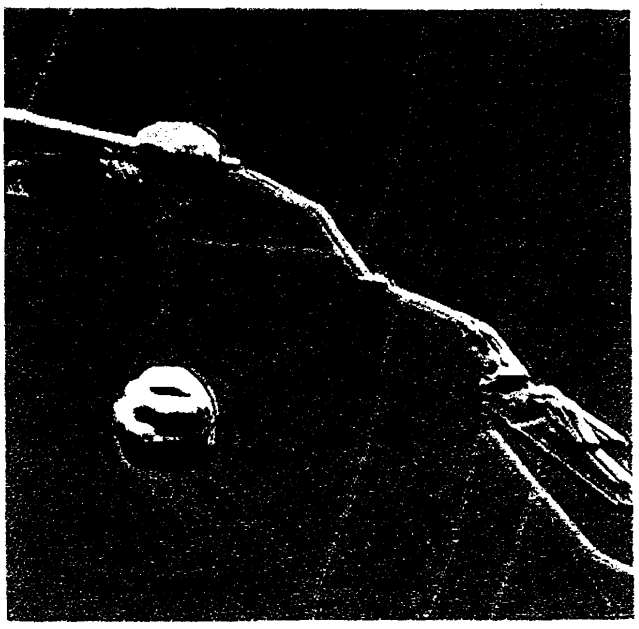


Рис. 4. Частицы вируса полиомиелита на поверхности пиролитического графита. Размер поля 1,1x1,1 мкм$^2$ (атомно-силовой микроскоп).

частицу на этой подложке увидеть не удалось (рис. 6). На рис. 7 и 8 помимо вирусных частиц хорошо видны кристаллы соли в виде дендритов. Вирусные частицы расположены как непосредственно на подложке, так и на кристаллах соли. На рис. 9 в большом масштабе показаны вирусные частицы, расположенные на кристаллах соли на поверхности слюды.

На рис. 8а и 8б представлены изображения одного и того же участка поверхности образца, но при построении изображения на рис. 8б применена боковая подсветка для оттенения мелких рельефных

Рис. 5. Плотная упаковка вирусных частиц, адсорбированных на поверхности пирографита. Размер поля – 1,1x1,1 мкм$^2$ (атомно-силовой микроскоп).

деталей. На измененном изображении лучше видны детали поверхности, но иногда затрудняется интерпретация топографии поверхности. На рис. 8а хорошо видны дендриты соли, а на рис. 8б - вирусные частицы. Видимый размер частиц составляет 70 нм, вертикальный размер частицы около 6 нм.

С помощью сканирующей туннельной микроскопии получены изображения вирусных частиц на подложке из кварца, шлифованной до среднеквадратичной шероховатости в 0,5 нм (рис. 10). После высыхания капли вирусного образца подложка была помещена в специально разработанную установку напыления и покрыта сплошной пленкой вольфрама толщиной около 2 нм. При этом не наблюдалось

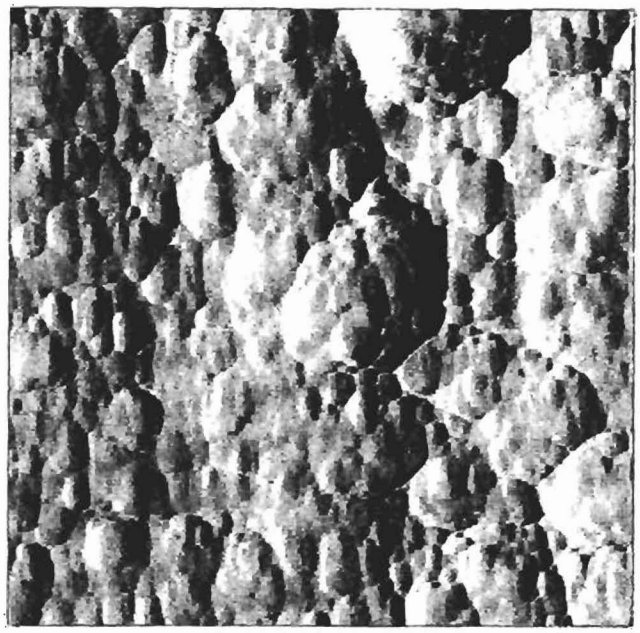


Рис. 6. Скопление вирусных частиц на поверхности оксида титана. Размер поля - 1,1x1,1 мкм$^2$ (атомно-силовой микроскоп).

уширения вируса, диаметр которого на изображении составлял 24 нм, несмотря на два слоя пленки толщиной 2,0 нм по бокам.

Чувствительность метода атомно-силовой микроскопии по концентрации вирусных частиц в пробе была оценена по следующему расчету. Реальные размеры частиц около 30 нм, но из-за конечного размера и конусообразной формы сканирующего зонда видимый размер увеличивается до 70 нм. При таких условиях одиночную частицу можно наблюдать при размере кадра 10x10 мкм$^2$. Это соответствует поверхностной концентрации - $10^6$ частиц/см$^2$. При осаждении вирусных частиц из колонны высотой 1 см, необходимая

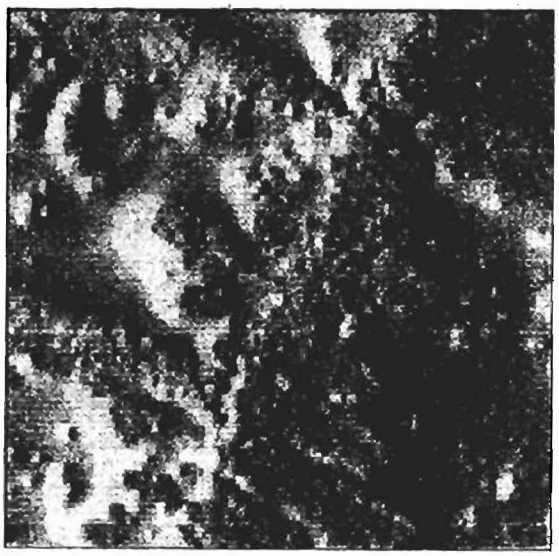


Рис. 7. Вирусы полиомиелита на поверхности слюды. Размер поля - 5,8x5,8 мкм$^2$ (атомно-силовой микроскоп).

объемная концентрация частиц - $10^6$ частиц/мл. Эта величина не является предельной чувствительностью метода, а соответствует тому случаю, когда при равномерном осаждении вирусных частиц на поверхность подложки метод сканирующей зондовой микроскопии дает информацию о наличии вирусных частиц в течение 1-2 минут. При увеличении времени сканирования возможно повышение чувствительности метода на 2-3 порядка.

В процессе работы над Проектом выявился ряд нерешенных проблем.

1. При нанесении капли солевого раствора вирусных частиц непосредственно на подложку невозможно получить картину равномерного распределения вирусов, что является необходимым условием для подсчета их концентрации в исходной пробе.

Рис. 8а. Неизмененное изображение вирусных частиц на поверхности сплава золота и палладия. Видны кристаллы соли в виде дендритов. Размер поля – 1,9x1,9 мкм$^2$ (атомно-силовой микроскоп).

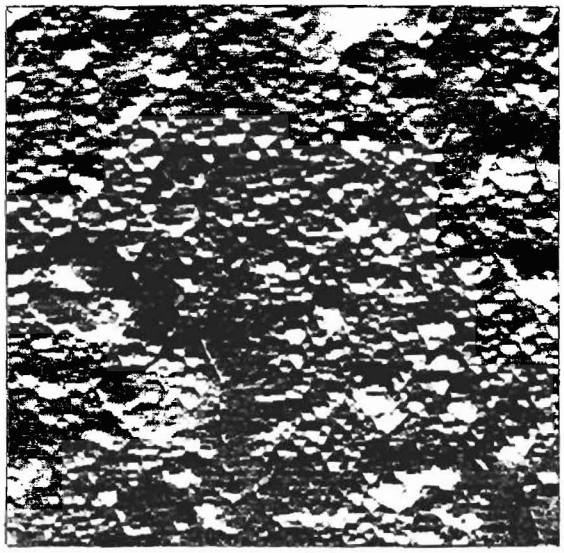


Рис. 8б. Тот же участок поверхности сплава золота и палладия, что и на рис. 8а, но с обработкой изображения боковой подсветкой (контрастное выделение мелких структурных деталей рельефа)

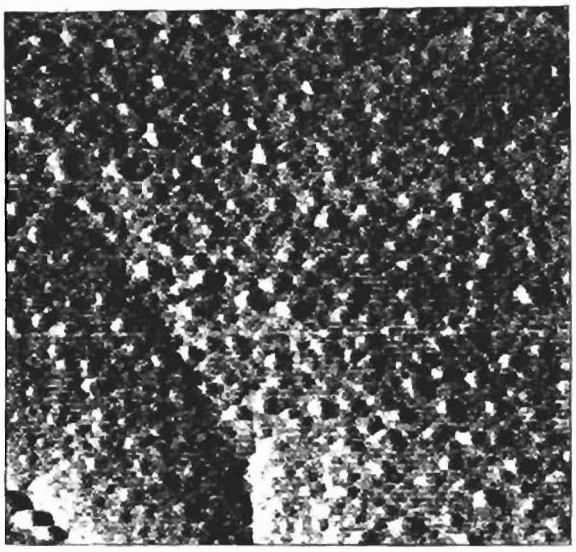
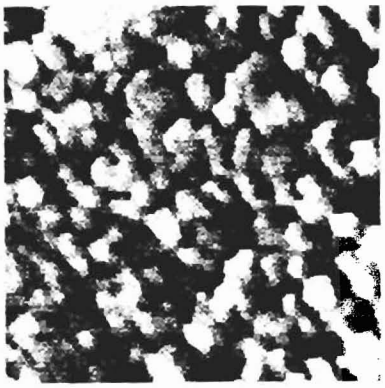


Рис. 9. Вирусные частицы на кристалле NaCl. Подложка - слюда. Размер поля - 1,6x1,6 мкм$^2$ (атомно-силовой микроскоп).

2. Сложность идентификации вирусов человека водного происхождения заключается в том, что многие из них имеют схожие морфологические характеристики. Вирионы всех энтеровирусов имеют форму икосаэдра размером 22-30 нм, причем их оболочка не имеет выступов и отростков. Только ротавирусы существенно отличаются от энтеровирусов по размерам вириона (70 нм). Значительно отличаются по морфологическим признакам аденовирусы, имеющие размер 70-90 нм, а также 12 отростков вершинных капсомеров размером 10-15x2 нм. Задача идентификации осложняется еще и тем, что почти каждый вид вирусов имеет множество серотипов: полиовирус - 3 , Коксаки А - 23, Коксаки В - 6, ЕСНО - 30, аденовирусы - 47, ротавирусы - 3 серотипа.

а)



б)

в)

Рис. 10. Вирусы полиомиелита в сканирующем туннельном микроскопе на кварцевой подложке после нанесения вольфрамовой пленки толщиной ~0,2 нм. Размер вируса – 24 нм.

а) размер поля - 1,3x1,3 мкм$^2$, размах высот - 109 нм;

б) размер поля - 660x660 нм$^2$, размах высот - 33 нм;

в) размер поля - 160x160 нм$^2$, размах высот - 28 нм.

3. Концентрация вирусов, вызывающих заболевания человека, в питьевой воде и в воде, используемой для получения питьевой воды, крайне низка. Питьевая вода считается чистой, если концентрация вирусов в ней составляет 0.1-10 частиц/л. Для получения пробы для микроскопирования, в которой концентрация вирусов составляет $10^6$ частиц/мл, необходимо сконцентрировать 100 л воды на 4 порядка, то есть увеличить концентрацию вирусных частиц в 10000 раз.

## 6. Сегодняшнее видение решения проблемы

6.1. *Методика Ленгмюра-Блоджетт*

Задача идентификации однородных по морфологии вирусов человека водного происхождения может быть решена за счет иммунного связывания их пленкой специфических антител непосредственно на подложке микроскопа. Нанесение монослойной пленки на подложку по технологии Ленгмюра-Блоджетт [46] было использовано в сканирующей туннельной и атомно-силовой микроскопии для получения изображения липидных и белковых структур [21, 47].

Ленгмюровская пленка представляет собой упорядоченный нерастворимый мономолекулярный слой вещества, сформированный на границе фаз жидкость-газ. Образующее пленку вещество должно быть амфифильным, то есть состоящим из полярной головки (гидрофильной) и гидрофобного фрагмента (длинного алкильного радикала). Процесс формирования ленгмюровской пленки заключается в следующем. Вначале при нанесении на поверхность раздела фаз пленкообразующего вещества в подходящем растворителе площадь поверхности пленки сохраняется достаточно

большой, чтобы после испарения растворителя с поверхности жидкости образовалась двумерная газообразная пленка. При сокращении площади, занимаемой пленкой, с помощью подвижного барьера происходит ориентация и упорядочивание молекул в пленке и она последовательно проходит различные двумерные фазовые состояния от газообразного до твердого [48]. Перенос пленки на твердую поверхность по методу Ленгмюра-Блоджетт осуществляют, пропуская подложку через сформированный монослой вертикально (или горизонтально) при погружении, либо при извлечении, причем давление в пленке поддерживают постоянным путем сокращения площади пленки на поверхности жидкости подвижным барьером в процессе переноса монослоя (рис. 11). Специально разработанная камера для нанесения на подложки пленок специфических белков изображена на рис. 12.

Технология Ленгмюра-Блоджетт позволяет контролировать толщину пленки во время выделения (количество наносимых слоев). Свойства пленок зависят от структуры полярной головки амфифильной молекулы, от состава монослоя (двух и многокомпонентные смеси молекул), от условий выделения (состава субфазы и поверхностного давления). При получении пленок белков, которые не являются амфифильными соединениями, возможно использование смеси белков с подходящими амфифильными веществами [45].

6.2. *Фиксирование вирусов*

Для получения пленок антител к вирусам, имеющим несколько серотипов, мы предполагаем использовать так называемые «поливариантные» антитела. В зависимости от конкретной задачи анализа пленки могут включать антитела к одному или нескольким

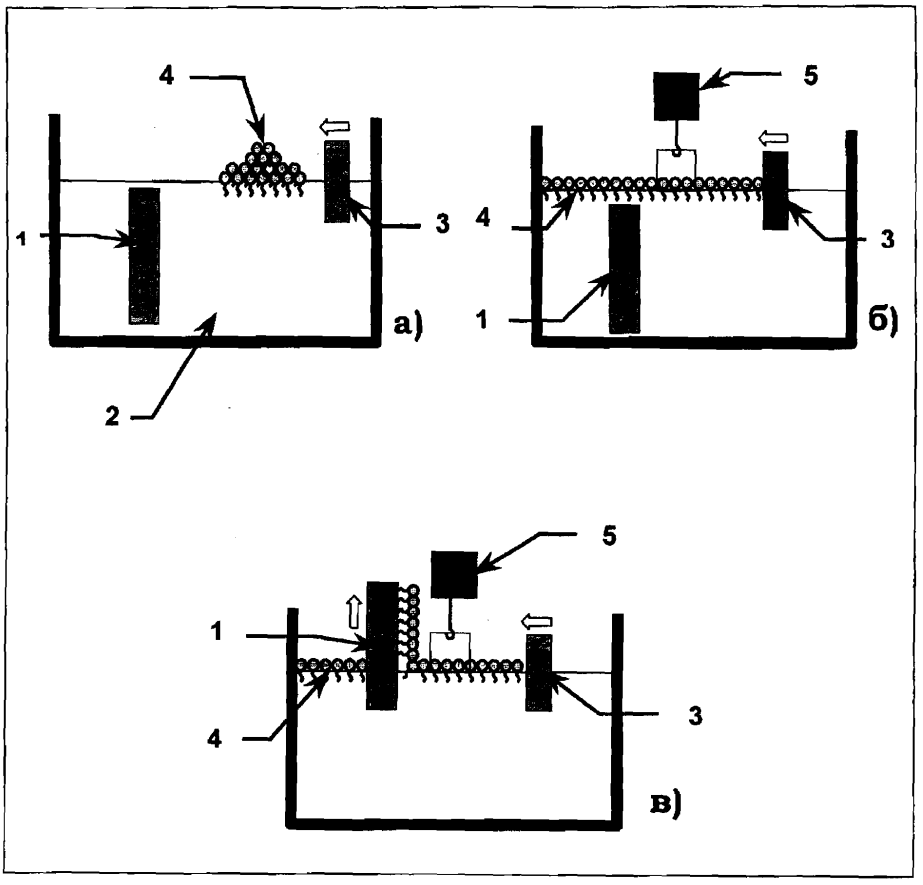



Рис. 11. Схема нанесения тонких пленок белков на поверхность твердой подложки методом Ленгмюра-Блоджетт; 1 - подложка, 2 - субфаза (деионизованная вода или органический растворитель), 3 - барьер, 4 - специфический белок, 5 - датчик давления; а - нанесение исходной капли специфического белка, б - формирование монослоя, в - нанесение монослоя на подложку.

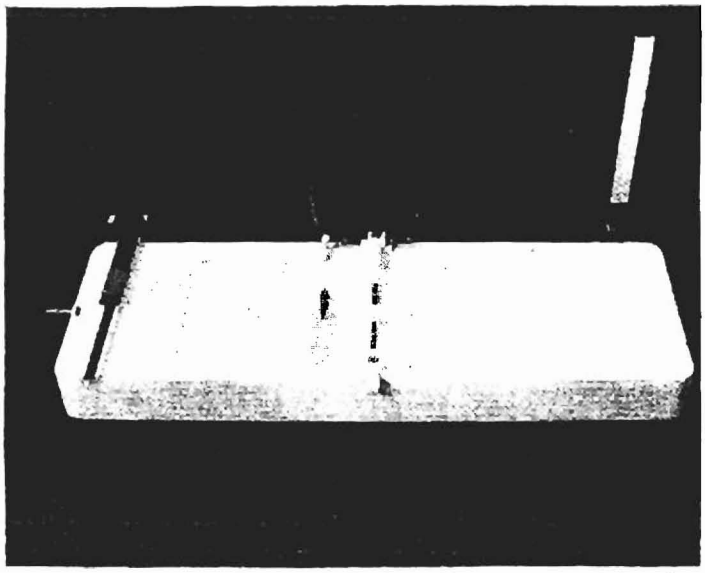


Рис. 12. Камера для нанесения на подложки тонких пленок специфических белков методом Ленгмюра-Блоджетт.

типам вирусов. Для фиксирования вирусов на подложке с пленкой антител достаточно нанести сконцентрированную пробу вирусных частиц на подложку и выдержать препарат при 37° С в течение некоторого времени (около 1 часа), исключая высыхание, для осуществления реакции антиген-антитело. Затем препарат необходимо промыть для смывания несвязавшихся частиц.

Иммунное связывание вирусных частиц из пробы воды с соответствующими антителами, закрепленными в виде монослоя на подложке микроскопа, позволит не только идентифицировать тип вируса человека, но также позволит исключить из рассмотрения другие частицы (возможно вирусы растений или бактериофаги), схожие по

внешним морфологическим признакам (прежде всего по размеру) с вирусами человека, так как они будут удалены с поверхности при промывки. Вследствие равномерного распределения антител в пленке и более высокой концентрации антител по отношению к вирусным частицам будет исключена агрегация вирусов, что позволит проводить их количественный анализ в пробе.

### 6.3. *Анализы в атомно-силовом и сканирующем туннельном микроскопе*

Оптимальным режимом подготовки нанесенных на подложку вируссодержащих препаратов для наблюдения является покрытие препаратов тонкой (2-5 нм) пленкой графита (или другого электропроводящего материала), придающей поверхности препаратов жесткость и электропроводность. Жесткость необходима для реализации любого из режимов микроскопа (сканирующего туннельного или атомно-силового), проводимость - только для режима сканирующего туннельного микроскопа, имеющего хорошее разрешение (1 нм) при наблюдении морфологии вирусов.

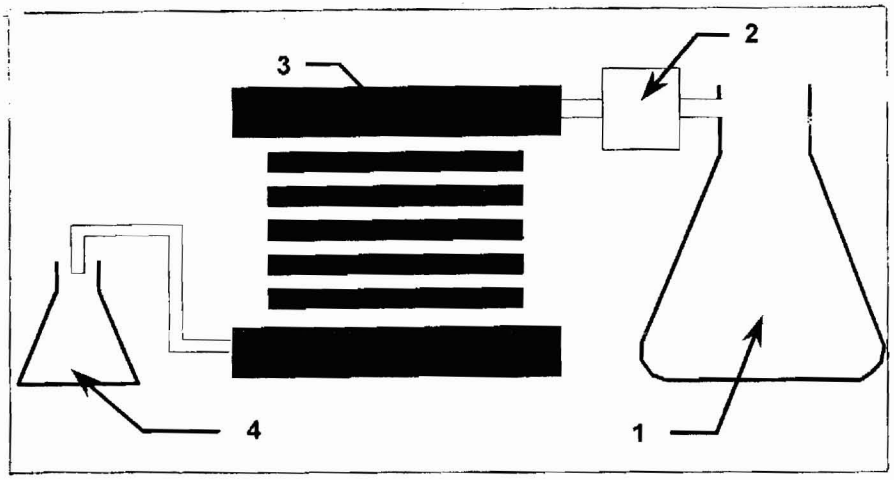
Поскольку идентификация вирусов производится за счет иммунного связывания их пленкой специфических антител, то допускается разрешение микроскопа на уровне 1 нм, тогда как программа идентификации вирусов должна производить отсев лишь сильно отличающихся по морфологии обнаруженных на подложке частиц.

### 6.4. *Концентрирование вирусов в пробах воды*

Отдельной проблемой, решение которой необходимо для реализации целей проводимой работы, является подготовка

вируссодержащего образца из проб воды. Для питьевой воды и других относительно незагрязненных вод, где содержание вирусов крайне низкое, требуется концентрировать десятки и сотни литров, чтобы увеличить вероятность обнаружения вирусов.

В настоящее время используют три различных принципа концентрирования вирусов в пробах воды: абсорбция и элюция на микрофильтрах, коагуляция и осаждение с помощью солей и гидроксидов трехвалентных ионов, экстракция и диализ с помощью полиэтиленгликоля. Однако только первый метод применяют для концентрирования вирусов из больших объемов воды. Определенный объем воды пропускают через различные фильтры, размер пор которых меньше, чем размер вирусных частиц. В качестве материала для микрофильтров используют органические вещества, обладающие развитой поверхностью, такие как нитроцеллюлозы, полисульфоны, полиакрилы, найлон, эпоксидное стекловолокно и другие. Разработаны аппараты для концентрирования различных биологических жидкостей. Например, в аппарате Pellicon производства фирмы Millipore с батареей полисульфоновых мембран использован принцип тангенциального потока. Постоянное движение жидкости параллельно поверхности ультрафильтров предотвращает образование плохо проницаемого слоя из задерживаемых частиц на поверхности фильтров и поэтому не происходит существенного замедления скорости фильтрации больших объемов воды (рис. 13). В аппарате Virozorb производства фирмы Cuno используются электроположительные адсорбентные фильтры. Состав фильтров - смесь целлюлоз с модифицированной поверхностью и модифицированное стекловолокно. Адсорбция вирусов на этих фильтрах связана с их поверхностным зарядом. В этом аппарате



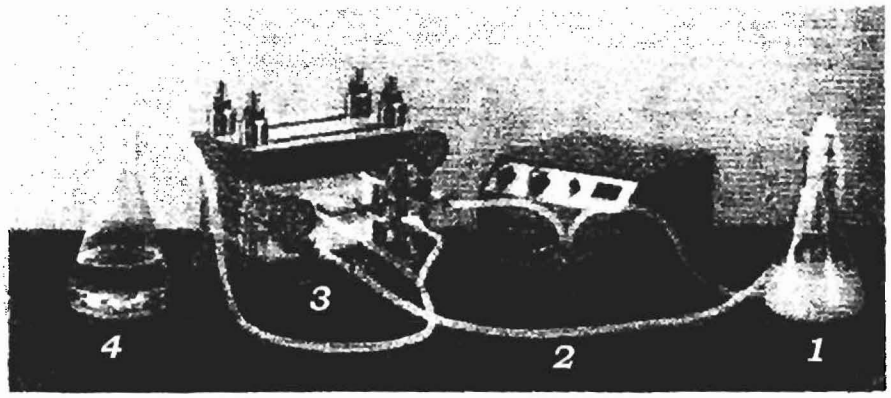




Рис. 13. Схема концентрирования вирусов из пробы воды методом ультрафильтрации в аппарате Pellicon фирмы Millipore: 1 – образец воды, 2 – насос, 3 – блок фильтров, 4 – концентрат.

можно получить концентрирование на три порядка.

После адсорбции вирусов на микрофильтрах проводят их сорбцию буферным раствором с щелочным pH. При исследовании вирусов в

больших объемах воды степень концентрирования после однократной процедуры ультрафильтрации оказывается недостаточной для дальнейшей идентификации вирусов при любом методе распознавания. Для достижения большей степени концентрирования применяется вторая ступень обработки. Реконцентрирование проводят либо методом ультрафильтрации на микрофильтрах меньшей площади (например, в микроконцентраторе Mini-ultrasette) [18], либо методом органической флокуляции [49], либо методом ультрацентрифугирования [17]. Метод органической флокуляции с использованием гидроокиси алюминия дает большие ошибки за счет потери вирусных частиц. Метод ультрацентрифугирования при использовании современной аппаратуры может обеспечить концентрирование на 1-2 порядка с минимальными потерями анализируемых частиц и получением концентрата вирусов, пригодного для проведения реакции антиген-антитело на подложке сканирующего зондового микроскопа. Следует отметить, что несмотря на большое число работ по концентрированию вирусов из воды, эта проблема далека от окончательного решения.

### 6.5. *Процедура анализа в целом*

В настоящее время процедура проведения анализа питьевой воды на содержание определенных вирусов человека включает следующие основные этапы:

- подготовку подложек с пленками специфических антител (заранее специально подобранных и соответствующих различным типам вирусов);
- отбор проб воды и концентрирование до объема в несколько мл;

- нанесение концентрата на подложки с разными видами антител, их экспозиция, отмывка и сушка;
- нанесение на подложки электропроводящих пленок;
- контроль и подсчет прикрепленных к подложкам вирусов с помощью сканирующего туннельного/атомно-силового микроскопа;
- обработку результатов микроскопических данных и выдачу заключения о наличии в пробе воды тех или иных вирусов и их концентрации.

Подложки с пленками антител могут быть приготовлены заранее и храниться в холодильнике (+4° С) до полугода. Наиболее длительной в анализе является процедура концентрирования, которая при анализе 200 л воды может занимать до 33 час. Время осуществления анализа пробы воды после приготовления концентрата составит около 3,5 часов, что существенно меньше, чем время анализа с применением метода культуры клеток (около 2 недель) или иммуноферментного метода (около 10 часов). Последовательные стадии, время проведения анализа и эффективность обнаружения вирусов в пробах воды разной степени загрязнения и разных объемов приведены на рис. 14 а , б.

## 7. Перспективы проводимых работ

В процессе проведения исследований были выявлены дополнительные весьма перспективные направления развития работ.

Данный метод дает возможность идентифицировать вирусы и определить их концентрацию в пробе по антигенным свойствам вирусов. Однако в водной среде могут встречаться невирулентные вирусные антигены, которые представляют собой белковую оболочку вируса, не содержащую нуклеиновой кислоты. Задача определения

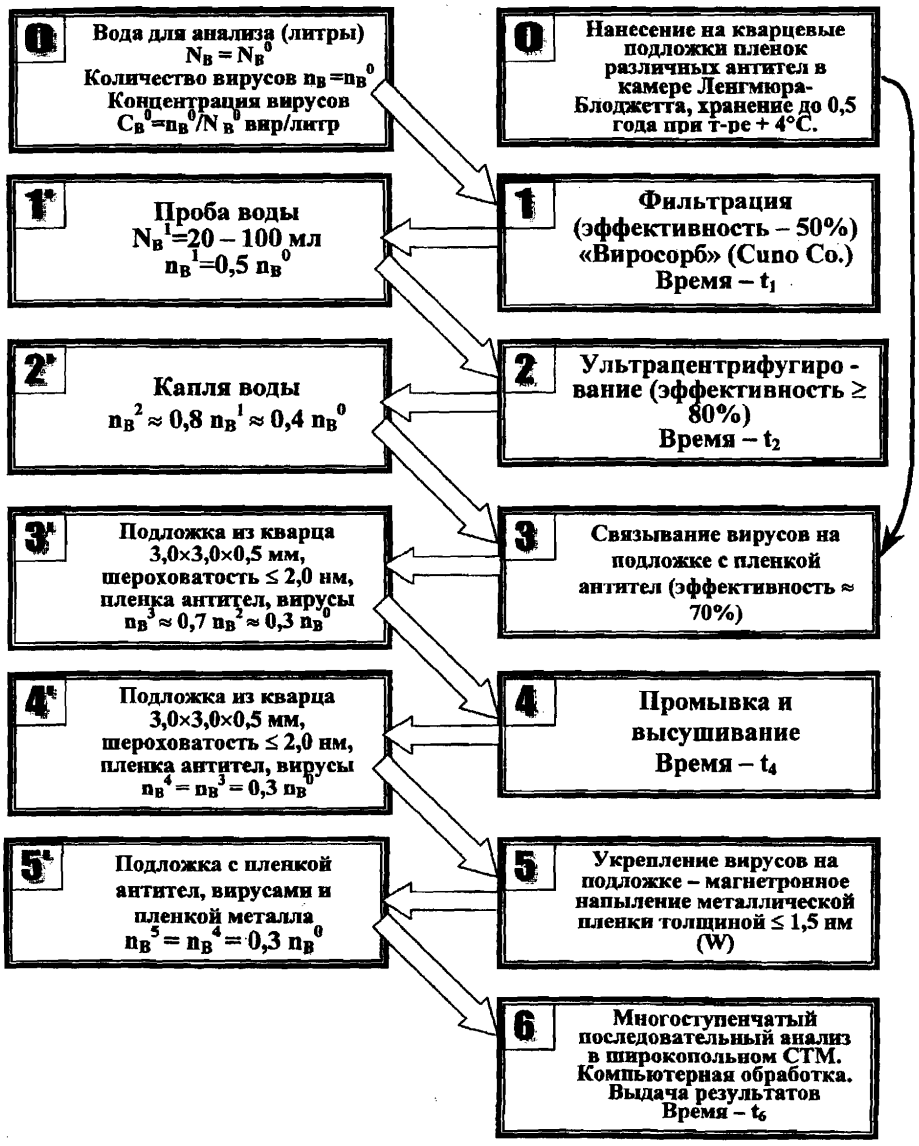



Рис. 14а. Последовательные стадии процедуры обнаружения вирусов в пробах воды при использовании сканирующего туннельного микроскопа.

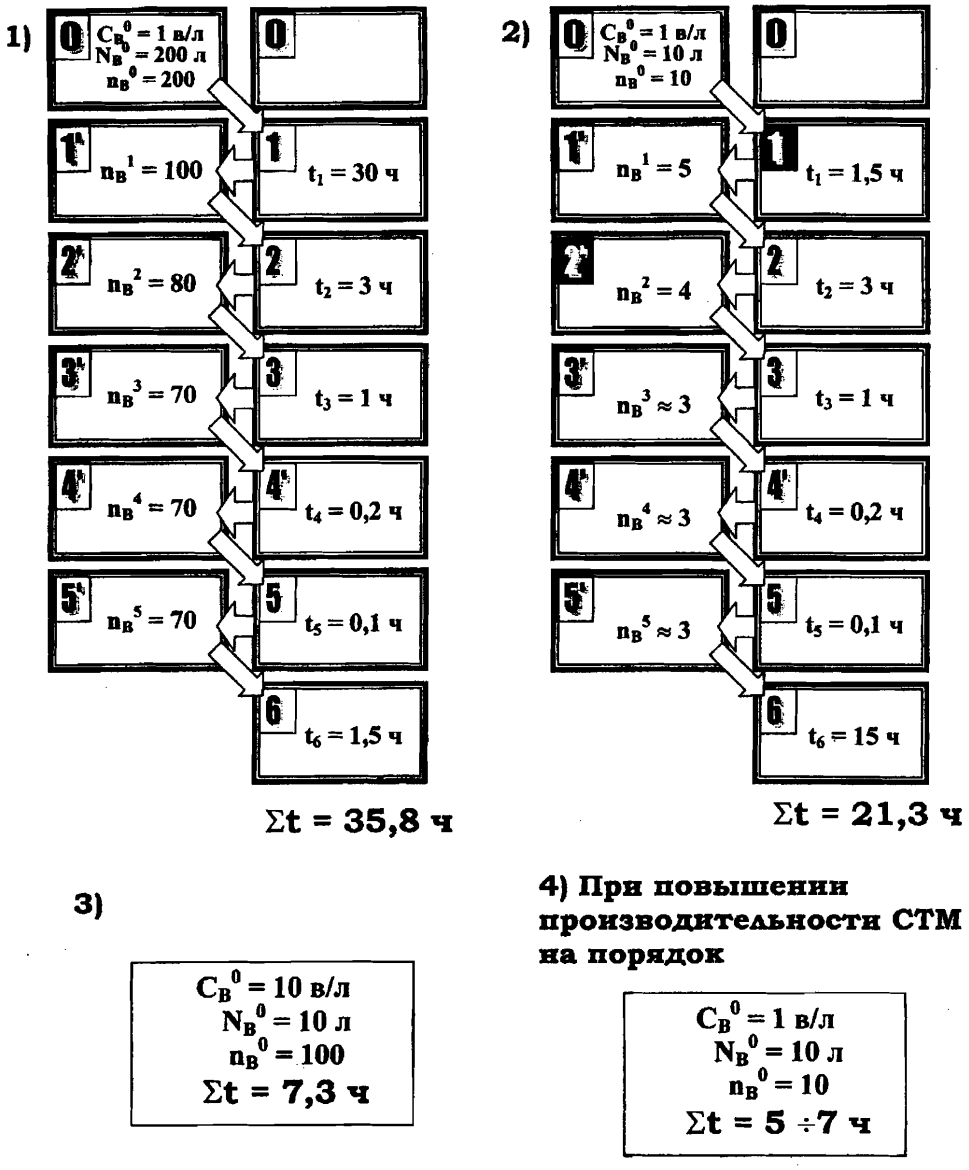



Рис. 14б. Время анализа и эффективность обнаружения вирусов в пробах воды разных объемов и разной степени загрязнения.

активности вируса может быть в принципе реализована путем наблюдения процесса проникновения вируса в клетку. Для этого следует нанести на ряд подложек пленку клеток, в которых вирус способен размножаться, далее на них наносят пробы воды и далее последовательно через определенные промежутки времени стабилизируют активность вируса путем нанесения на подложки тонкой электропроводящей пленки. При изначальной активности вирусов в пробе будут наблюдаться картины последовательного проникновения вирусов в клетку. В случае же изначальной непатогенности вирусов пробы их проникновение в клетку наблюдаться не будет.

Разрабатываемые методики могут быть применены для наблюдения и анализа других биологических объектов в пробах воды - фагов, бактерий при покрытии этих объектов электропроводящей пленкой. Метод может быть использован для вирусологического и бактериологического контроля качества воды на городских станциях водоснабжения, в санитарно-эпидемиологических лабораториях, для изучения распространенности вирусов разных типов в озерной, прудовой, речной и морской воде в различных регионах.

Наконец, метод наблюдения вирусов в сканирующем туннельном и атомно-силовом микроскопах может быть использован для анализа наличия вирусов в жидких средах организма человека: в крови, слюне, моче и т. п. Поскольку для анализа требуются пробы небольшого объема (несколько мкл), а время проведения анализа невелико, метод мог бы найти применение , например, для обследования доноров на станциях переливания крови, при эпидемиологических обследованиях некоторых групп людей, в хирургической практике при проведении экстренных операций.

В заключение следует отметить, что полученные в процессе проведения настоящей работы результаты имеют на данном этапе в существенно большей степени чисто научное, нежели практическое значение. Однако они являются безусловно обнадеживающими в плане достижения практических целей - развития и реализации современных методов анализа биологических объектов в жидких средах.

## 8. Литература


1. Binning G., Rohrer H. Scanning tunneling microscopy.// Helv. Phys. Acta, 1982, V. 55, P. 726.
2. Bustamante C., Vesenka J., Tang C.L. et al. Circular DNA molecules imaged in air by scanning force microscopy.// Biochemistry , 1992, V. 31, P. 22.
3. Lee G.U., Chrisey L.A., Colton R.J. Direct measurements of the forces between complementary strands of DNA.// Science, 1994, V. 266, P. 771.
4. Guthold M., Bezanilla M., Erie D.A. et al. Following the assembly of RNA polymerase-DNA complexes in aqueous solutions with the scanning force microscope.// Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1994, V.91, № 26, P. 12927.
5. Onishi S., Hara M., Furuno T., Sasabe H. Imaging two-dimentional crystals of catalase by atomic force microscopy.// Jpn. J. Appl. Phys., 1996, V. 35, P. 6233.
6. Uvarov V. Yu., Ivanov Yu.D., Romanov A.N. et al. Scanning tunneling microscopy study of cytochrome P450 2B4 incorporated in proteoliposomes.// Biochimie, 1996, V.78, P. 780.
7. Simmons D.A.R. Immunochemisrty of Shigella flexnery O-antigenes: a study of structural and genetic aspects of the biosynthesis of cell-surface antigens.// Bacteriological Reviews, 1971, V. 35 № 2, P. 117.
8. Пермяков Н.К., Ананян М.А., Сороковой В.И., Лускинович П.Н. Сканирующая зондовая микроскопия и медико-биологическая нанотехнология: история и перспективы. // Архив патологии, 1999, № 5, С. 9.
9. Baro A.M., Miranda R., Carrascosa J.L. // IBM J. Res. Dev., 1986, V. 30, P. 380.
10. Suzuki H., Tanaka T., Sasaki T. et al. MFM observation of magnetic particle chain of magnetic bacterium AMB-1.// Preliminary Proceedings of

STM-99. 10th Conference on Scanning Tunneling Microscopy/Spectroscopy and Related Proximal Probe Microscopy, Korea, Seoul, 1999, P. 566.

11. Спыну К.И. Энтеровирусы в окружающей среде и их эпидемическая значимость. Кишинев, Штиинца, 1990.
12. Лурия С., Дарнелл Дж. Общая вирусология. Москва, Мир, 1970.
13. Gerba C.P., Rose J.B. Viruses in source and drinking water. In Drinking water microbiology. Springer-Verlag. New York, 1990, P. 380.
14. Detection of enteric viruses. In Standart methods for the examination of water and wastewater. Ed. Franson M.A.H., 17 edition, American Public Health Association, Washington, 1988.
15. Бондаренко А.П., Гирин Л.В., Григорьева Е.А. и др. Экология энтеровирусов. Киев, Здоровья, 1988.
16. Салата О.В. Гигиеническое обоснование эффективных естественных и искусственных сорбентов для освобождения питьевых и сточных вод от энтеровирусов и энтеробактерий. Диссертация на соискание ученой степени доктора мед. наук, Киев, 1990.
17. Deetz T.D., Smith E.M., Goyal S.M. et al. Occurrence of rota- and enteroviruses in drinking and environmental water in a developing nation. // Water Res., 1984, V. 18, № 5, P. 567.
18. Muscillo M., Carducci A., La Rosa G. et al. Enteric virus detection in adriatic seawater by cell culture, polymerase chain reaction and polyacrylamide gel electrophoresis. // Water Res., 1997, V. 31, № 8, P. 1980.
19. Сканирующая зондовая микроскопия биополимеров. Сб. статей./ Под ред. Яминского И.В., М., Научный мир, 1997.
20. Черный Д.И. Электронно-микроскопические исследования специфических комплнксов ДНК. Диссертация на соискание ученой степени доктора биол. наук. М., Институт молекулярной генетики РАН, 1999.
21. Галлямов М.О. Сканирующая зондовая микроскопия нуклеиновых кислот и тонких органических пленок. Диссертация на соискание ученой степени кандидата физ.-мат. наук. М., МГУ им. М.И.Ломоносова, 1999.
22. Travaglini G., Rohrer H., Amrein M., Gross H. Scanning tunneling microscopy on biological matter. // Surf. Sci., 1987, V. 181, P. 380.
23. Clemmer C.R., Beebe T.P. Graphite: A mimic for DNA and other biomolecules in scanning tunneling microscopes studies. // Science, V. 251, P. 640.

24. Heckl W.M., Binning G. Domain walls on graphite mimic DNA. // Ultramicroscopy, 1992, V. 42-44, P. 1073.
25. Thundat T., Allison D.P., Warmack R.J. et al. Atomic force microscopy of DNA on mica and chemically modified mica. // Scanning Microsc., 1992, V. 6, № 4, P. 911.
26. Thomson N.H., Kasas S., Smith B. Et al. Reversible binding of DNA to mica for AFM imaging. // Langmuir, 1996, V. 12, P. 5905.
27. Hu J., Wang M., Weier H.-U.G. et al. Imaging of single extended DNA molecules on flat (aminopropyl)triethoxysilanemica by atomic force microscopy. // Langmuir, 1996, V. 12, № 7, P. 1697.
28. Пышкина О.А. Комплексы ДНК-ПАВ в малополярных органических растворителях. Дисертация на соискание ученой степени кандидата хим. наук. М., МГУ им. М.В.Ломоносова, 1997.
29. Murray M.N., Hansma H.G., Bezanilla M. Et al. Atomic force microscopy of biochemically tagged DNA. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1993, V. 90, P. 3811.
30. Клинов Д.В. Исследование биополимеров методами сканирующей зондовой микроскопии. Диссертация на соискание ученой степени кандидата физ.-мат. наук. М., МФТИ, 1997.
31. Weisenhorn A.L., Drake B., Prater C.B. et al. Immobilized proteins in buffer solution at molecular resolution by atomic force microscopy. // Biophys., 1990, V. 58, P. 1251.
32. Radmacher M., Fritz M., Cleveland J.P. et al. Imaging adhesion forces and elasticity of lysozyme adsorbed on mica with the atomic force microscope. // Langmuir, 1994, V. 10 № 10, P. 3809.
33. Worcester D.L., Miller R.G., Bryant P.J. Atomic force microscopy of purple membranes. // J. Of Microscopy, 1988, V. 152, Pt 3, P. 817.
34. Muller D.J., Schabert F.A., Buldt J., Engel A. Imaging purple membranes in aqueous solutions at sub-nanometer resolution by atomic force microscopy. // Boiphys., 1995, V.68, P. 1681.
35. Durbin S.D., Carlson W.E. Lysozyme crystal growth studied by atomic force microscopy. // Journal of Crystal Growth, 1992, V. 122, P. 71.
36. Land T.A., Malkin A.J., Kuznetsov Yu. G., De Yoreo J.J. Mechanisms of protein crystal growth: An atomic force microscopy study of canavalin crystalization. // Phys. Rev. Lett., 1995, V. 75, P. 2774.
37. McPherson A., Malkin A., Kuznetsov Y. The science of macromolecular crystalization. // Structure, 1995, V. 3, P. 759.
38. Lee G.U., Kidwell D.A., Colton R.J. Sensing streptavidin-biotin interactions with atomic force microscopy. // Langmuir, 1994, V. 10, № 2, P. 354.

39. Hinterdorfer P., Baumgartner W., Gruber H.J. et al. Detection and localization of individual antibody-antigen recognition events by atomic force microscopy. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1996, V. 93, P. 3477.
40. Browning-Kelley M.E., Wadu-Mesthrige K., Hari V., Liu G.Y. Atomic force microscopy study of specific antigen/antibody binding. // Langmuir, 1997, V. 13, № 2, P. 343.
41. Яминский И.В., Демин В.В., Бондаренко В.М. Различия в клеточной поверхности гибридных бактерий Escherichia coli K12, наследующих rfb-a3,4 ген Shigella flexneri, выявляемые с помощью атомно-силовой микроскопии.// Журн. микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии, 1997, № 6, P. 15.
42. Oberleithner H., Giebisch G., Geibel G. // European Journal of Physiology, 1993, V. 425, P. 506.
43. Яминский И.В., Пышкина О.А., Сергеев В.Г. и др. Визуализация прокариотических клеток с помощью атомно-силовой микроскопии.// Зондовая микроскопия-97: Всероссийское совещание по зондовой микроскопии. Новгород: Институт физики микроструктур РАН 1997, С. 124.
44. Drygin Yu.F., Gallyamov M.O., Yaminsky I.V. AFM investigation of tobacco mosaic virus RNA.// Presentation Abstracts of 1997 International Nanoscope Users Conference, 1997, USA, Santa Barbara: Digital Instruments, P. 39.
45. Будашов И.А., Курочкин И.Н., Денисов А.К. и др. Использование атомно-силовой микроскопии для анализа микробиологических объектов.// Журн. микробиол., 1997, № 6, С. 11.
46. DeRose J.A., Leblanc R.M. Scanning tunelling and atomic force microscopy studies of Langmuir-Blodgett films.// Surface Science Reports, 1995, V. 22, P. 73.
47. Dubreuil N., Alexandre S., Foil C. et al. Characterization of enzymatic structures in mixed Langmuir-Blodgett films by scanning force microscopy.// Langmuir, 1995, V. 11, № 6, P. 2098.
48. Адамсон А. Физическая химия поверхностей. М., Мир, 1979, С. 568.
49. Morris R., Waite W.M. Evaluation of procedures for recovery of viruses from water - 1 Concentrations systems.// Water Research, 1980, V. 14, P. 791.