

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МАГНЕТРОННОГО НАПЫЛЕНИЯ В НАНОСКОПИИ БИООБЪЕКТОВ

И.Д. Шумов¹, С.Л. Канашенко¹, Т.О. Плешакова¹, В.С. Зиборов², Ю.Д. Иванов¹
Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
«Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича»,
Погодинская 10 с.8, Москва, Россия¹.
Объединённый Институт Высоких Температур РАН, Ижорская 13 с.2, Москва, Россия².
shum230988@mail.ru

Ключевые слова: магнетронное напыление, электронная микроскопия, атомно-силовая микроскопия, детекция белка, вирусные частицы

В настоящей работе продемонстрирована перспективность использования магнетронного напыления применительно к визуализации наноразмерных биологических объектов, в частности, белковых молекул и их комплексов, а также вирусных частиц. Магнетронное напыление позволяет получать на поверхности образцов покрытия высокой чистоты с хорошей адгезией к подложкам (в том числе диэлектрикам [1]) даже при малых толщинах. Этот метод также позволяет варьировать скорость нанесения покрытий в широких пределах путем изменения давления плазмообразующего газа и мощности магнетронного разряда, позволяя получать сверхтонкие металлические пленки толщиной менее 10 нм [2].

Интересным приложением магнетронного напыления является контрастирование наноразмерных биообъектов в электронной микроскопии (ЭМ) при помощи сверхтонких пленок металлов. В настоящей работе магнетронное напыление сверхтонких (толщиной менее 1,5 нм) пленок вольфрама на поверхность исследуемых образцов позволило получить контрастные изображения частиц вируса табачной мозаики (ВТМ), адсорбированных на аморфных пленках углерода, методом электронной микроскопии (рис. 1а). Полученные данные о размере частиц ВТМ хорошо согласуются с данными ЭМ, полученными ранее [3, 4]. Необходимо отметить, что ЭМ-изображения частиц ВТМ, не подвергавшиеся напылению (рис. 1б) были менее контрастными, чем при использовании напыления (рис. 1а). Этот эффект особенно сильно проявляется при использовании увеличений порядка 600 000 и выше.

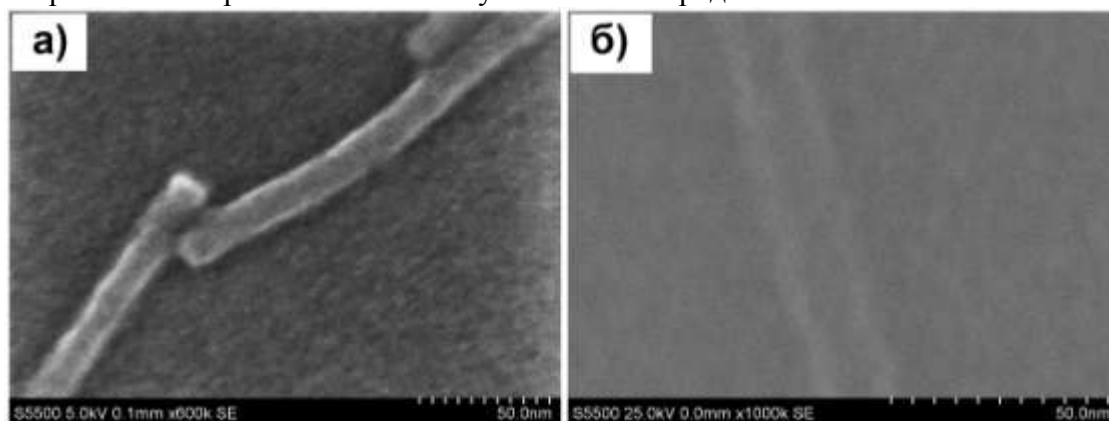


Рис. 1. СЭМ-изображения частиц ВТМ, полученные с использованием (а) и без использования (б). Увеличение 500 000X, шкала 50 нм (а); увеличение 1000 000X, шкала 50 нм (б).

Другим актуальным направлением исследований в современной биохимии является разработка методов анализа белковых маркеров заболеваний человека в

низких и сверхнизких концентрациях. В этой связи перспективным является использование для анализа белков нанотехнологических подходов с использованием молекулярных детекторов [5], в том числе АСМ. Метод АСМ позволяет регистрировать и подсчитывать на поверхности подложки (АСМ-чипа) единичные молекулы белков и их комплексы [6-8], и достигать концентрационной чувствительности анализа $<10^{-15}$ М [5, 7]. Для анализа белков методом АСМ применяется предварительное концентрирование молекул белка на поверхности АСМ-чипа за счет специфического межмолекулярного взаимодействия определяемых белков с молекулярными зондами, иммобилизованными на поверхности чипа [7]. Экспериментально продемонстрировано использование биоспецифического АСМ-фишинга для высокочувствительного определения биомаркеров вирусного гепатита С [7] и ВИЧ [9].

Тем не менее, в предыдущих работах [7, 9, 10] один АСМ-чип использовался для определения только одного белка, так как содержал на поверхности только одну сенсорную зону с иммобилизованными молекулярными зондами и контрольную зону. Формирование на поверхности АСМ-чипа массива из сенсорных зон, в каждой из которых могут быть иммобилизованы различные типы молекулярных зондов, позволит проводить мультиплексный анализ белковых биомаркеров с использованием АСМ. В связи с малой площадью сканирования АСМ (порядка нескольких мкм^2) при АСМ-сканировании поверхности АСМ-чипа необходимо обеспечение точности позиционирования зонда АСМ относительно каждой исследуемой зоны. Задача зрительного ориентирования при позиционировании зонда АСМ решена в настоящей работе за счет формирования массива меток на поверхности чипа с помощью магнетронного напыления металлов.

Выбор метода для формирования массива сенсорных зон обусловлен требованиями к качеству поверхности при АСМ-анализе. Белковые молекулы, как правило, имеют размеры до 5 нм [11], поэтому шероховатость поверхности АСМ-чипа не должна превышать 1 нм. Следовательно, в процессе формирования меток на поверхности чипа не должно образовываться продуктов, вызывающих появление неровностей на поверхности АСМ-чипа. Также формируемые метки должны быть устойчивыми на поверхности АСМ-чипа, то есть иметь хорошую адгезию к этой поверхности и не разрушаться в процессе анализа. В настоящей работе для создания массива меток на поверхности АСМ-чипов авторы использовали метод магнетронного напыления хрома и вольфрама. Далее на поверхности этого чипа формировали массив сенсорных зон с иммобилизованными молекулярными зондами против биомаркера вирусного гепатита С (HCVcoreAg).

На рисунке 2 приведены оптические изображения АСМ-чипа с металлическими метками после процедуры иммобилизации молекулярных зондов на поверхность АСМ-чипа, а также после отмывки чипа после инкубации. Из рисунка 1 видно, что сформированные методом магнетронного напыления метки не претерпели видимых изменений в процессе отмывки поверхности чипа.

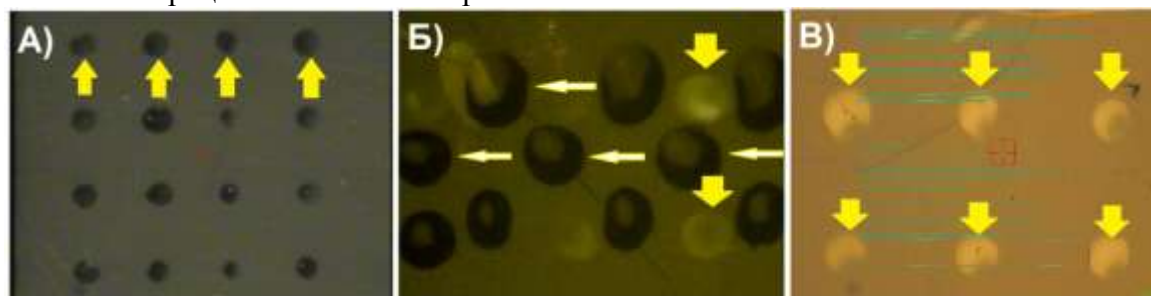


Рис. 2. Оптические изображения АСМ-чипа до (А), во время (Б, фрагмент массива) и после (В, фрагмент массива) процедуры иммобилизации молекул-зондов. Жирными стрелками показаны метки, тонкими стрелками — сенсорные зоны. Диаметр

металлических меток 450 нм, расстояние между метками 1450 нм. Объем каждой микрокапли в сенсорной зоне ~3 пл.

На рис. 3 представлены АСМ-изображения поверхности сенсорных зон АСМ-чипа с иммобилизованными аптамерами против HCVcoreAg и соответствующее сечение (Б).

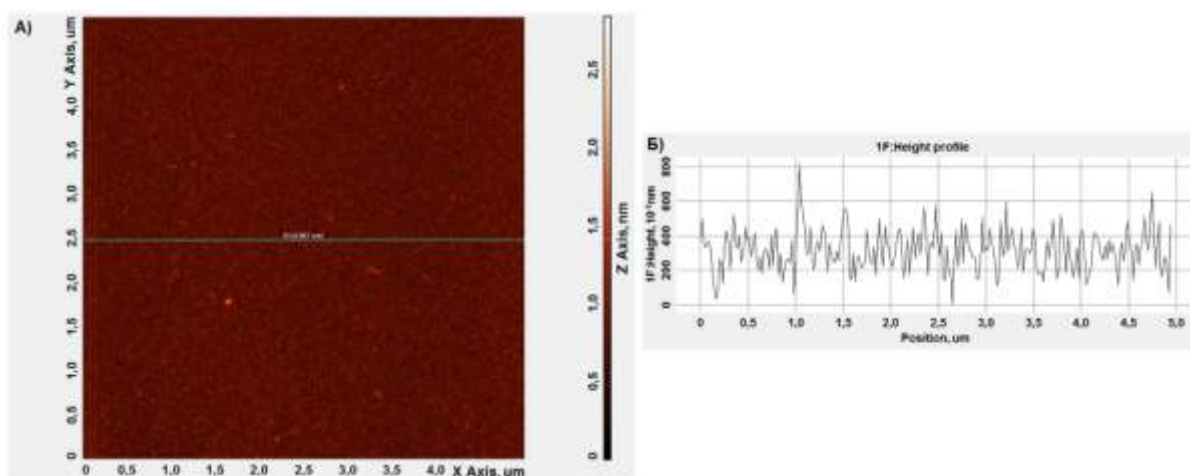


Рис. 3. АСМ-изображения поверхности сенсорных зон АСМ-чипа с иммобилизованными аптамерами (А) и соответствующее сечение (Б). Размер АСМ-скана 5×5 мкм, шкала высот 3 нм. Данные получены при помощи АСМ NTEGRA Aura (NT-MDT, Россия).

Из представленного АСМ-изображения участка поверхности чипа с иммобилизованными молекулярными зондами видно, что процесс формирования меток и массива сенсорных зон на поверхности АСМ-чипа методом магнетронного напыления не вызывает появления посторонних объектов высотой более 1 нм, что соответствует рельефу поверхности силанизированной слюды с иммобилизованными аптамерами [9]. Полученные данные позволяют сделать вывод о достаточной устойчивости сформированных методом магнетронного напыления меток на поверхности АСМ-чипа, что позволяет использовать полученные в работе чипы для проведения АСМ-фишинга HCVcoreAg.

Использование магнетронного напыления металлических покрытий, в том числе сверхтонких пленок вольфрама перспективно для использования применительно к визуализации биологических объектов субмикронных размеров. Предложенный в нашей работе метод может быть использован для изучения других типов вирусных частиц при помощи ЭМ высокого разрешения. Также полученные в настоящей работе результаты могут быть использованы для создания новых высокочувствительных систем для мультиплексного анализа белков с использованием молекулярного детектора на базе АСМ.

Работа выполнена в рамках Программы фундаментальных научных исследований государственных академий наук на 2013-2020 годы при поддержке стипендии Президента Российской Федерации молодым ученым и аспирантам, осуществляющим перспективные научные исследования и разработки по приоритетным направлениям модернизации российской экономики на 2016-2018 годы (СП-4280.2016.4).

Литература

1. Swann S. Magnetron sputtering. // Phys. Technol. – 1988. – V. 19. – P. 67-75.
2. Petroff P., Sheng T. T., Sinha A. K., Rozgonyi G. A., Alexander F. B. Microstructure, growth, resistivity, and stresses in thin tungsten films deposited by rf sputtering // J. Appl. Phys. 1973. –V. 44. – P. 2545-2654.
3. Williams R. C., Wyckoff R. W. G. Electron shadow micrography of the tobacco mosaic virus protein // Science. – 1945. – V. 101. –P. 594-596.

4. Stanley W. M., Anderson T. F. A study of purified viruses with the electron microscope. // *J. Biol. Chem.* – 1941. – V. 139. – P. 325-338.
5. Плешакова, Т.О. АСМ-технологии как путь к обратному числу Авогадро / Т.О. Плешакова, И.Д. Шумов, Ю.Д. Иванов, К.А. Мальсагова, А.Л. Кайшева, А.И. Арчаков, // *Биомедицинская химия.* - 2015. - № 61. – Вып. 2. - С. 239-253.
6. Ramacviciene, A. AFM-study of complement system assembly initiated by antigen-antibody complex / A. Ramacviciene, V. Snitka, R. Mieliauskiene, A. Ramanavicius, // *Cent. Eur. J. Chem.* - 2006. - V. 4. - No. 1. - P. 194 - 206.
7. Archakov, A.I. Biospecific irreversible fishing coupled with atomic force microscopy for detection of extremely low-abundant proteins / A.I. Archakov, Yu.D. Ivanov, A.V. Lisitsa, V.G. Zgoda, Zgoda V.G. // *Proteomics.* - 2009. - V. 9. – P. 326-343.
8. Иванов, Ю.Д. Химический необратимый фишинг низкокопийных белков / Ю.Д. Иванов, В.В. Даничев, Т.О. Плешакова, И.Д. Шумов, В.С. Зиборов, Н.В. Крохин, М.Н. Загуменный, В.С. Устинов, Л.П. Смирнов, А.В. Широин, А.И. Арчаков, // *Биомедицинская химия.* - 2014. - № 60. – Вып. 1. - С. 28-50.
9. Ivanov, Y.D. Atomic force microscopy fishing and mass spectrometry identification of gp120 on immobilized aptamers / Y.D. Ivanov, N.S. Bukharina, T.O. Pleshakova, P.A. Frantsuzov, E.Yu. Andreeva, A.L. Kaysheva, V.G. Zgoda, A.A. Izotov, T.I. Pavlova, V.S. Ziborov, S.P. Radko, S.A. Moshkovskii, A.I. Archakov, // *Int. J. Nanomedicine.* - 2014. - V. 9. – P. 4659-4670.
10. Ivanov, Y.D. Detection of hepatitis C virus core protein in serum by atomic force microscopy combined with mass spectrometry / Y.D. Ivanov, A.L. Kaysheva, P.A. Frantsuzov, T.O. Pleshakova, N.V. Krohin, A.A. Izotov, I.D. Shumov, V.F. Uchaikin, V.A. Konev, V.S. Ziborov, A.I. Archakov, // *Int. J. Nanomedicine.* - 2015. - V. 10. – P. 1597-1608.
11. Kuznetsov, V.Yu. Atomic force microscopy revelation of molecular complexes in the multiprotein cytochrome P450 2B4-containing system / V.Yu. Kuznetsov, Yu.D. Ivanov, A.I. Archakov, // *Proteomics* - 2004. - V. 4. - P. 2390-2396.

Сведения об авторах

Шумов Иван Дмитриевич – к.б.н., младший научный сотрудник лаборатории нанобиотехнологии ИБМХ;

Канашенко Сергей Леонидович – ведущий инженер лаборатории нанобиотехнологии ИБМХ;

Плешакова Татьяна Олеговна – к.х.н., старший научный сотрудник лаборатории нанобиотехнологии ИБМХ;

Зиборов Вадим Серафимович – к. ф.-м.н., старший научный сотрудник лаборатории №1.1.1. – ударно-волновых воздействий ОИВТ РАН

Иванов Юрий Дмитриевич – д.б.н., профессор, заведующий лабораторией нанобиотехнологии ИБМХ.