

ИССЛЕДОВАНИЕ КЛЕТОЧНЫХ СТРУКТУР С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ СПЕЦИАЛИЗИРОВАННЫХ ТВЁРДОТЕЛЬНЫХ ЗОНДОВ МЕТОДОМ АТОМНО-СИЛОВОЙ МИКРОСКОПИИ

М.В. Жуков Санкт-Петербургский Национальный исследовательский университет информационных технологий, механики и оптики; Санкт-Петербург

И.В. Кухтевич Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт аналитического приборостроения РАН; Санкт-Петербургский Национальный исследовательский университет информационных технологий, механики и оптики; Санкт-Петербург

И.С. Мухин Санкт-Петербургский Национальный исследовательский университет информационных технологий, механики и оптики, Санкт-Петербургский академический университет – научно-образовательный центр нанотехнологий РАН; Санкт-Петербург

В.В. Левичев Санкт-Петербургский Национальный исследовательский университет информационных технологий, механики и оптики; Санкт-Петербург

Научный руководитель:

А.О. Голубок Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт аналитического приборостроения РАН; Санкт-Петербургский Национальный исследовательский университет информационных технологий, механики и оптики; Санкт-Петербург

Введение

Сканирующая зондовая микроскопия (СЗМ) является одним из основных методов исследования и модификации материалов с наноразмерным разрешением, объединяя в себе довольно широкий спектр современных методов исследования поверхности. Данное направление приобретает всё большую актуальность в сравнении с иными методами анализа поверхности, так как позволяет проводить не только изучение топологии поверхности материалов различной природы, но и определять шероховатость поверхности, распределение сил адгезии, электрические и магнитные поля, механические свойства образца и т.п. Более того, СЗМ-исследования можно проводить в различных средах, в том числе в буферных растворах, что позволяет использовать возможности СЗМ (в частности, атомно-силовой микроскопии (АСМ)) для изучения биологических и органических объектов с высоким разрешением.

В данной области в последнее время уже достигнут значительный прогресс. Так, в частности, известны работы по визуализации отдельных молекул ДНК [1] и исследование их состояния в жидких средах, изучение бактерий [2], клеточных структур и тканей [3]. Тем не менее, исследование биологических объектов, особенно в функциональных средах, остаётся наиболее сложной задачей зондовой микроскопии, что объясняется сложностью закрепления и неразрушающим анализом данных структур. Отдельной проблемой является изготовление специализированных типов зондов, позволяющих проводить более точную и менее инвазивную визуализацию тонкой структуры биообъектов [4].

Цель работы

Целью работы является проведение исследований объектов биологической природы с использованием специализированных твердотельных зондов с наноиглами в воздушной и жидкой средах методом атомно-силовой микроскопии, а также определение влияния параметров данных зондов на качество получаемых СЗМ изображений.

Базовые положения исследования

Создание и контроль параметров твердотельных зондов происходило с использованием сканирующего электронного микроскопа CrossBeam Neon 40 (Carl Zeiss, Германия). Исследование работы зондов с нановискерными структурами проводилось на СЗМ микроскопе Ntegra Aura (NT-MDT, Россия) в полуконтактной силовой моде. В качестве образцов использовались высушенные эритроциты и лейкоциты крови, а также бактерии E.Coli и фибробласты мышей в нативном состоянии (функциональная среда - натрий-фосфатный буфер).

Результаты и обсуждение

Твёрдотельные зонды нового типа представляют собой стандартные зонды с выращиваемыми на их основании нановискерными структурами, имеющими форму наноиголки. Данные структуры имеют достаточно большие продольные значения, значительно превышающие поперечный радиус вискера, что говорит о высокой проникающей способности данного типа зондов. Выращивание наноигол проводилось путём осаждения газов-прекурсоров ($C_9H_{16}Pt$) в вакуумной камере электронного микроскопа при воздействии электронного пучка.

В результате проведённых экспериментов на высушенных эритроцитах и лейкоцитах крови было выявлено значительное улучшение как контраста изображения, так и разрешающей способности сканирующего зондового микроскопа при использовании зондов с наноиголками. Сравнение проводилось в соответствии с традиционными зондами, которые смогли разрешить объекты с высокой точностью только на областях до 9 мкм^2 , тогда как новые зонды теряют свою точность только на размерах области около $0,16 \text{ мкм}^2$.

Кроме того, при сравнении был выявлен артефакт инверсии стандартных зондов, заключающийся в прорисовке нанопор в качестве выпуклых объектов при использовании стандартных зондов. Данное явление объясняется различиями в капиллярных силах, имеющих большее воздействие на стандартные гидрофобные Si зонды, тогда как Pt/C гидрофильные наноиголки практически не взаимодействуют с конденсатом, имеющим место на поверхности объектов при их изучении в воздушной среде при нормальных условиях.

В результате исследований в жидкости проведены работы по закреплению и изучению нативных бактерий *E.Coli*. Для закрепления были использованы гелеобразные покрытия агар-агара, нанесённые на слюдяные подложки. Исследование отдельных и одинаковых бактерий показало преимущества разрабатываемых типов зондов, также показавших лучшие значения контраста и разрешения получаемых изображений. Кроме того, были изучены клетки фибробластов, выращенные непосредственно на покровных стёклах и измеренные в нативном состоянии методом атомно-силовой микроскопии.

Заключение

Таким образом, в результате данных исследований были разработаны новые твёрдотельные зонды с наноиголками, предназначенные для высокоточной визуализации биологических объектов как в воздушной среде, так и в жидких средах. Показано, что зонды с наноиголками позволяют существенно улучшить разрешение и контраст получаемых изображений при работе в неразрушающем полуконтактном режиме, при сравнении с традиционными зондами. Выявлен и устранён артефакт инверсии, заключающийся в неправильной прорисовке малых пор и углублений стандартными зондами. Наконец, показаны преимущества разрабатываемых зондов при изучении нативных биологических объектов в жидких средах, что приобретает в последнее время особую актуальность.

Работа проведена при государственной финансовой поддержке ведущих университетов Российской Федерации (субсидия 074-U01), программы У.М.Н.И.К.

1. Liu Z1, Li Z, Zhou H, Wei G, Song Y, Wang L. Imaging DNA molecules on mica surface by atomic force microscopy in air and in liquid. // *Microsc Res Tech.*, 66(4), – 2005. – P. 179-185.
2. Kailas L., Ratcliffe E.C., Hayhurst E.J., Walker M.G., Foster S.J., Hobbs J.K.. Immobilizing live bacteria for AFM imaging of cellular processes // *Ultramicroscopy*, Vol. 109(7), – 2009. – P. 775-780.
3. PeiPei Chen, HongTao Dong, Long Chen, QuanMei Sun, Dong Han. Application of atomic force microscopy to living samples from cells to fresh tissues. // *Chinese Science Bulletin*, Vol. 54(14), – 2009. – P. 2410-2415.
4. M.V. Zhukov, I.V. Kukhtevich, V.V. Levichev, I.S. Mukhin. Study of biological objects by method of atomic force microscopy with specialized nanowhisker probes. // IV International Scientific conference STRANN 2014, Abstracts. – 2014. – P. 154-156.