

## СИЛОВАЯ СПЕКТРОСКОПИЯ ЕДИНИЧНЫХ МАКРОМОЛЕКУЛ И ИХ КОМПЛЕКСОВ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ АСМ

**В** основе всех биологических объектов лежат полимерные макромолекулы. В зависимости от внешней среды молекулы могут существенно менять свою трехмерную форму, а, следовательно, физические свойства и функции внутри живого объекта. Эти процессы, в первую очередь, определяются силами внутримолекулярных взаимодействий.

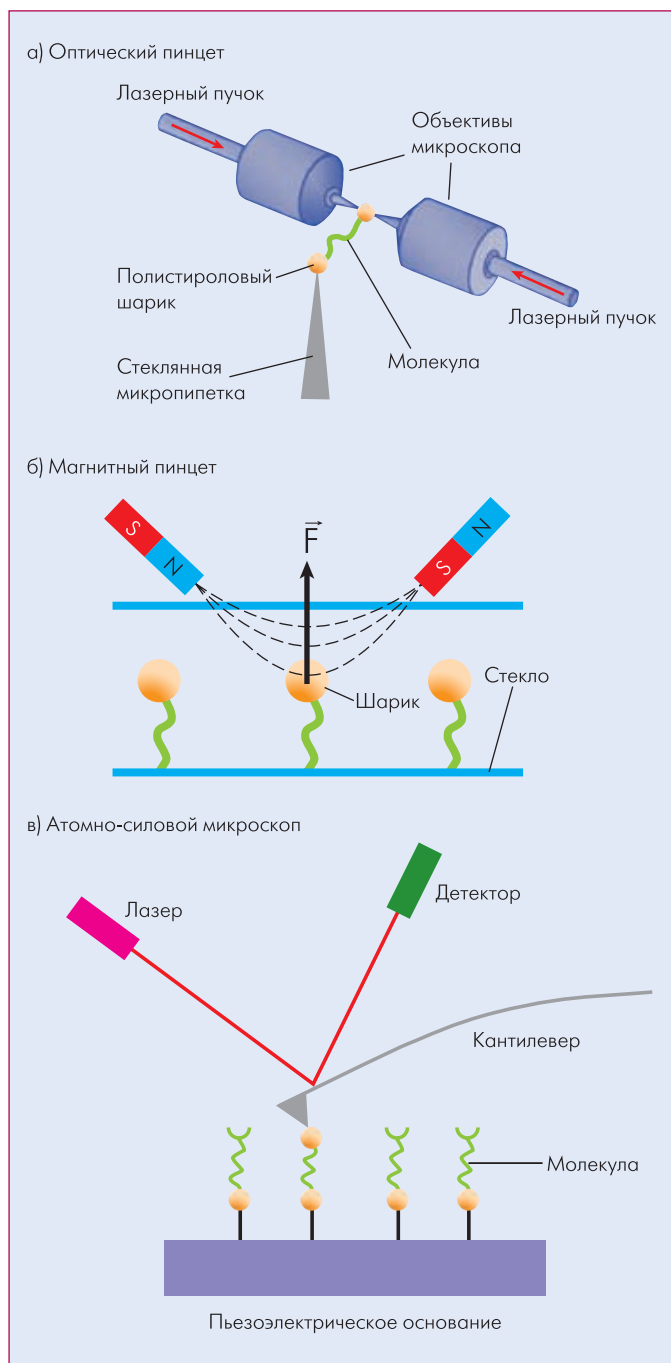
Для понимания механизмов, управляющих поведением тех или иных биологических структур, важным является умение определять эти силы. Метод силовой спектроскопии позволяет сделать выводы о гибких свойствах макромолекулы и о силах взаимодействий внутри нее.

С изобретением сканирующего туннельного (1981 г.), а затем атомно-силового (1986 г.) микроскопов началась новая эра в научном мире. Визуализация объектов до молекулярного и атомного уровня позволила разрешить многие вопросы, касающиеся строения объектов. Однако вопросы, касающиеся сил, определяющих такое строение, а также гибких свойств объектов, долгое время оставались в стороне.

В 1999 г. атомно-силовой микроскоп был впервые использован для изучения механических свойств двухцепочечной ДНК при ее растяжении [1]. В экспериментах ДНК  $\lambda$ -бактериофага закреплялась между покрытой золотом поверхностью и  $\text{Si}_3\text{N}_4$  кантилевером. Молекулы ДНК сначала ковалентно присоединялись к поверхности, затем подводился кантилевер, поверхность которого была модифицирована таким образом, чтобы при контакте образовывать ковалентные свя-

зи с молекулами ДНК. После связывания кантилевера с молекулой зонд отводили и вновь подводили к поверхности несколько раз, заставляя молекулу проходить последовательные циклы растяжения и релаксации. При подводе и отводе зонда от поверхности снимались зависимости силы взаимодействия между кантилевером и молекулой от перемещения по вертикали пьезосканера. По снятым кривым определялись зависимости силы, действующей на кантилевер со стороны молекулы, от расстояния между ее концами – так называемые *силовые кривые*. Метод был применен для изучения конформационного перехода ДНК под действием растяжения от двухцепочечной к одноцепочечной форме.

Эксперимент стал основой использования АСМ в качестве инструмента метода *силовой спектроскопии*. Сам метод исследования растяжения макромолекул применялся и ра-



**Рис. 1** Приборы, используемые для исследования внутри- и межмолекулярных взаимодействий [2]

нее – в качестве растягивающих устройств использовались оптические или магнитные пинцеты, или поток жидкости с переменной интенсивностью (рис.1).

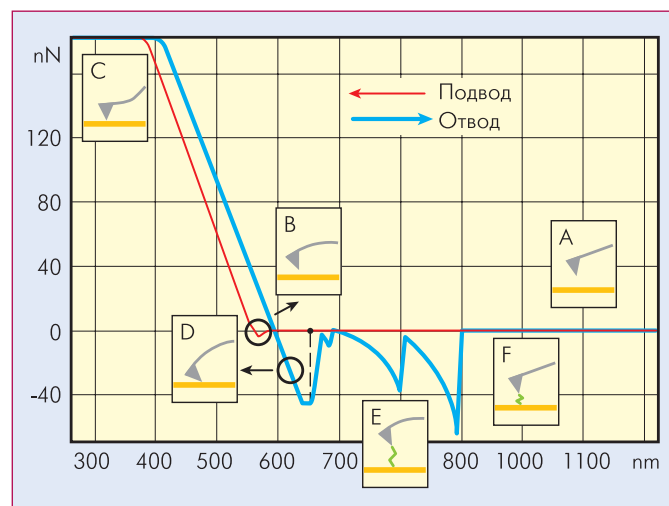
Получаемые силовые кривые несут в себе множество ценной информации. По одному внешнему виду уже могут быть сделаны выводы о характере внутримолекулярных взаимодействий.

Обычно кривые подвода и отвода рассматриваются в комплексе (рис.2). При подводе к поверхности кантилевер долгое время находится в недеформированном состоянии, и действующая на него сила равна нулю. На силовой кривой под-

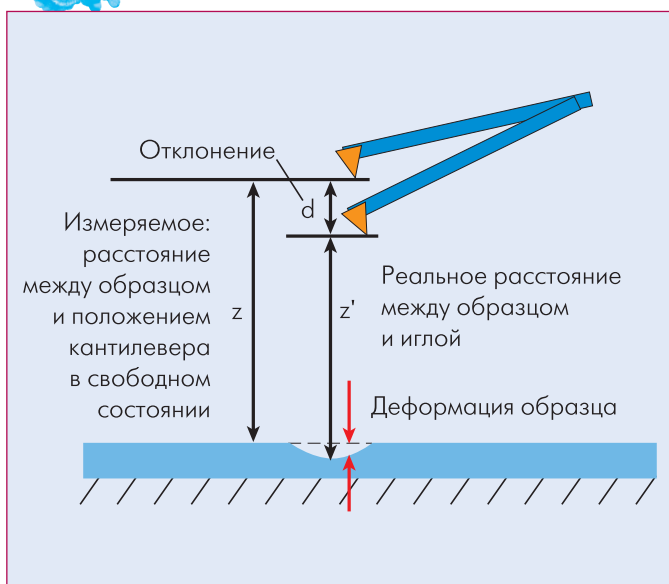
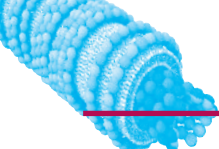
вода этому соответствует горизонтальный отрезок в правой части (А). При приближении к поверхности кантилевер может отклониться вниз (к образцу) за счет сил притяжения (В) до тех пор, пока зонд не придет в контакт с образцом. Это происходит, когда сумма сил притяжения станет больше суммы силы упругости кантилевера и сил отталкивания (С). При отводе зонда от поверхности часто наблюдается явление гистерезиса, связанное с так называемыми силами адгезии (D), которые вынуждают зонд и образец оставаться в контакте. Кантилевер изгибается до тех пор, пока сила упругости не станет больше сил адгезии, и кантилевер не оторвется от поверхности. Этому событию соответствует пик в начале силовой кривой отвода.

Если на кривой отвода наблюдается не один пик, а несколько, это свидетельствует о связывании его с отдельной макромолекулой. Повторное возрастание силы воздействия на кантилевер после ее спада практически до нуля свидетельствует о растяжении непосредственно изучаемой молекулы (Е). Если внутри молекулы присутствуют между соседними звеньями лишь ковалентные связи – такая молекула будет растягиваться равномерно вплоть до разрыва, после которого кантилевер вновь окажется в свободном состоянии (силовая кривая выйдет на нулевой уровень).

Если же между звеньями молекулы существуют слабые взаимодействия, и молекула обладает сложной третичной структурой, то ее растяжение происходит через последовательность конформационных переходов, в каждом из которых будут рваться некоторые связи, обуславливающие данную упаковку.



**Рис.2** Силовая кривая. А – свободное состояние кантилевера при подводе к поверхности; В – притяжение к образцу перед контактом; С – контакт с поверхностью; D – удержание силами адгезии иглы кантилевера у поверхности образца после начала отвода; Е – растяжение связанной макромолекулы; F – разрыв молекулы и переход кантилевера в недеформированное состояние



**Рис.3** Взаимодействие между кантилевером и поверхностью образца.  $d$  – разница между смещением образца  $z$  и реальным расстоянием между иглой и образцом  $z'$

Каждый разрыв приводит к появлению специфического пика на силовой кривой. Растяжение происходит до тех пор, пока молекула не разорвется, о чем будет свидетельствовать выход силовой кривой на нулевой уровень ( $F$ ). По высоте пиков можно судить о силах и энергиях связей, существовавших в исходном состоянии, по расположению пиков – об эффективных длинах молекул в моменты разрыва связей.

Так как энергия слабых взаимодействий не превышает энергии ковалентных связей, то можно быть уверенным, что все слабые внутренние связи будут разорваны раньше, чем сама молекула.

Методика силовой спектроскопии перспективна не только для изучения растяжения единичной макромолекулы, но и для определения сил, необходимых для разрыва связи между двумя молекулами, одна из которых закреплена на поверхности, а другая – на острие.

Для получения дополнительной информации силовая кривая аппроксимируется с помощью различных физических моделей. Одна из наиболее часто употребляемых – персистентная модель полимерной цепи, в рамках которой сила  $F$ , действующая на молекулу при ее растяжении, и расстояние  $Z$  между ее концами связаны следующим соотношением:

$$F(z) = \frac{k_B T}{L_p} \left\{ \frac{1}{4(1 - z/L)^2} - \frac{1}{4} + \frac{z}{L} \right\}, \quad (1)$$

где  $L$  – контурная длина цепи,  $L_p$  – персистентная длина,  $k_B$  – константа Больцмана,  $T$  – температура, Кельвин [3]. С помощью этой модели можно аппроксимировать каждую из областей равномерного растяжения, ограниченную пиками по краям, и тем самым вычислить величины контурной и персистентной длины молекулы.

Для реализации вышеописанных алгоритмов анализа силовых кривых и нахождения интересующих величин требует-

ся создание программного обеспечения. Подобный продукт должен содержать определенный ряд функций.

В первую очередь должна быть получена кривая зависимости действующей на молекулу силы от расстояния между ее концами. Данные, приходящие с микроскопа, представляют собой график зависимости электрического напряжения на фотодетекторе от вертикального положения пьезосканера.

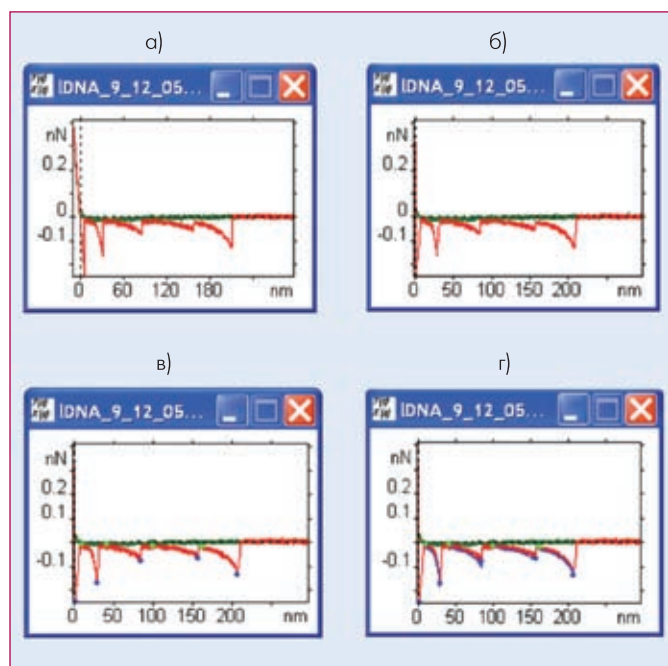
Сразу после получения с помощью калибровки кривой в области, где образец и зонд находятся в контакте, напряжение в вольтах конвертируется в отклонение кантилевера в нанометрах по линейному закону. Сила взаимодействия определяется по закону Гука:

$$F = kd,$$

где  $k$  – жесткость кантилевера,  $d$  – отклонение кантилевера.

В результате получается кривая зависимости силы ( $F$ ) от перемещения по вертикали пьезосканера ( $z$ ). Эта кривая отличается от необходимой для дальнейшего анализа силовой кривой. Смещение пьезосканера фактически является расстоянием между уровнем поверхности и уровнем, на котором находилась бы игла недеформированного кантилевера. Реальное расстояние между иглой и образцом складывается из смещения пьезосканера и отклонения кантилевера.

В случае связывания кантилевера с прикрепленной к поверхности образца макромолекулой, расстояние между ее концами в каждый момент процесса растяжения равно рас-



**Рис.4** Анализ силовой кривой на примере программного обеспечения Фемтоскан Онлайн [4]: а – исходная кривая; б – построение кривой зависимости силы от реального расстояния между кантилевером и поверхностью подложки; в – нахождение пиков (синие точки – локальные минимумы, зеленые точки – локальные максимумы); г – аппроксимация участков равномерного растяжения (от максимума до минимума) с помощью персистентной модели

стоянию между образцом и иглой. Для получения кривой, действительно несущей информацию о силе, необходимой для растяжения молекулы до определенной длины, требуется произвести замену переменных:

$$z \rightarrow z' = z+d, \quad (2)$$

где  $z$  – старая координата по горизонтальной оси,  $z'$  – новая координата по горизонтальной оси,  $d$  – отклонение кантилевера (на рис.3  $d$  – отрицательная величина).

Далее необходимо выделить пики на силовой кривой и ассоциировать первый из них с адгезионным, а остальные – с пиками, соответствующими разрывам внутримолекулярных связей. Эта задача сводится к поиску локальных минимумов на кривой с определенным уровнем зашумленности данных.

Когда участки равномерного растяжения выявлены, каждый из них необходимо аппроксимировать с помощью формулы (1). Таким образом, будут найдены контурные и персистентные длины; силы, требуемые для разрыва связей внутри молекулы; расстояния между концами молекулы в моменты разрыва этих связей (рис.4).

Несмотря на относительную новизну, метод уже доказал свою действенность. Его использование помогает решать недоступные ранее для понимания вопросы, в частности, активно ведутся работы по изучению структурных особеннос-

тей белковых молекул. Возможно, в будущем метод силовой спектроскопии станет ключом к нахождению способа борьбы с целым классом неизлечимых болезней, связанных с потерей белками природной структуры.

Метод может найти успешное применение также и в различных областях наноматериаловедения, например, для количественного подтверждения данных молекулярного ди-зайна при создании синтетических полимерных молекул с новыми функциональными, в том числе механическими, свойствами.

## ЛИТЕРАТУРА

1. **Rief M., Clausen-Schaumann H., Gaub H.E.** Sequence-dependent mechanics of single DNA molecule // *Nature structural biology*, 1999, v.6, N.4. pp. 346-349.
2. **Mark C. Williams, Kiran Pant, Ioulia Rouzina and Richard L. Karpel.** Single molecule force spectroscopy studies of DNA denaturation by T4 gene 32 protein // *Spectroscopy*, 2004, 18. pp. 203–211.
3. **Bustamante C., Marko J.F., Siggia E.D., Smith S.** Entropic elasticity of lambda-phage DNA // *Science*, 265 (1994). pp. 1599-1600.
4. **Филонов А., Яминский И.** Обработка и анализ данных в сканирующей зондовой микроскопии: алгоритмы и методы. // *Наноиндустрия*, 2007, №2, с.32-34.