



БЫСТРОДЕЙСТВУЮЩАЯ СКАНИРУЮЩАЯ ЗОНДОВАЯ МИКРОСКОПИЯ

FAST-SCANNING PROBE MICROSCOPE MICROSCOPY

DOI: 10.22184/1993-8578.2018.11.7-8.530.533

А.И.Ахметова^{1,2,3}, И.В.Яминский^{1,2,3}
A.I.Akhmetova^{1,2,3}, I.V.Yaminskiy^{1,2,3}

Быстродействующая сканирующая зондовая микроскопия позволяет изучать живые объекты на молекулярном уровне с миллисекундным временным разрешением, что открывает принципиально новые возможности для биомедицины и персонализированной медицины. Особенно интересно применение быстродействующей зондовой микроскопии при решении следующих комплексных задач: определения бактериальной антибиотикорезистентности, скрининга лекарств с использованием единичной клетки, адресной доставки веществ в локальную область биоткани и биообъекта, раннему обнаружению биологических агентов.

Fast-scanning probe microscopy makes it possible to study living objects at the molecular level with a millisecond time resolution, which opens the door for new opportunities in biomedicine and personalized medicine in principle. The most interesting field of high-speed probe microscopy is solving the following complex tasks: determining bacterial antibiotic resistance, screening drugs using a single cell, targeted delivery of substances to a local area of biological tissue and a biological object, and early detection of biological agents.

В настоящее время не удается визуализировать биологические процессы (рост бактерий и клеток, инфицирование клеток вирусом, конформационные переходы в хромосомах и пр.) в естественных средах с высоким пространственным разрешением (на уровне долей нанометра) и необходимой временной детализацией в единицы миллисекунд и менее. Для получения изображения размером 512×512 точек методом традиционной зондовой микроскопии при частоте сканирования 2 Гц потребуется примерно 4 мин [1].

Но с развитием техники быстродействующей зондовой микроскопии визуализация этих процессов вполне осуществима. Также с ее помощью возможна реализация нового подхода к определению антибиотикорезистентности бактериальных клеток: прекращение колебаний мембраны клетки, обусловленное внутренними метаболическими процессами под действием конкретного антибиотика, служит индикатором эффективности используемого антимикробного препарата. Структурные и динамические

характеристики белковой молекулы играют центральную роль в обеспечении их биологических функций. Быстродействующая сканирующая зондовая микроскопия открывает широкие перспективы изучения белковых макромолекул в динамике. Она становится практическим инструментом при проектировании белковых и ДНК биочипов, перспективных для дальнейшего использования в медицинской диагностике. При этом становится возможным широкое использование биосенсоров, построенных на биоспецифическом взаимодействии без использования каких-либо маркеров.

Другим примером применения быстродействующей сканирующей зондовой микроскопии является разработка оригинальных методов скрининга новых лекарственных средств с участием одиночных клеток высших организмов. В этом случае возможно использовать быстродействующую многоканальную сканирующую капиллярную микроскопию, в которой каждый из каналов выполняет свою функциональную

¹ МГУ имени М.В.Ломоносова, физический и химический факультеты / M.V. Lomonosov Moscow State University, Physical and Chemical departments.

² Центр перспективных технологий / Advanced Technologies Center.

³ Энергоэффективные технологии / Energy-efficient technologies.

роль: доставку лекарства в клетку, измерение активности клетки, определение электрохимических параметров клетки (наличие активных форм кислорода в непосредственной близости от мембраны клеток, потенциал мембраны, проводимость ионных каналов и пр.) [2].

В области медицинской диагностики с помощью быстродействующей зондовой микроскопии решается задача раннего обнаружения биологических агентов: вирусов и бактериальных клеток. Для достижения чувствительности на уровне единичных вирусов нами запатентована конструкция проточной ячейки зондового микроскопа с установленным в нем пьезокерамическим биочипом [2]. В экспериментах используются различные штаммы вируса гриппа А и сенсорные слои на основе полисахаридов с пришитыми сиаловыми кислотами, обеспечивающие высокую избирательность [3]. Также для этих целей было разработано кантилеверное биосенсорное устройство (регистрация статического изгиба кантилевера) с чувствительностью сто миллионов вирусов в 1 мл жидкости [4].

В настоящее время мы работаем над установкой, позволяющей проводить все

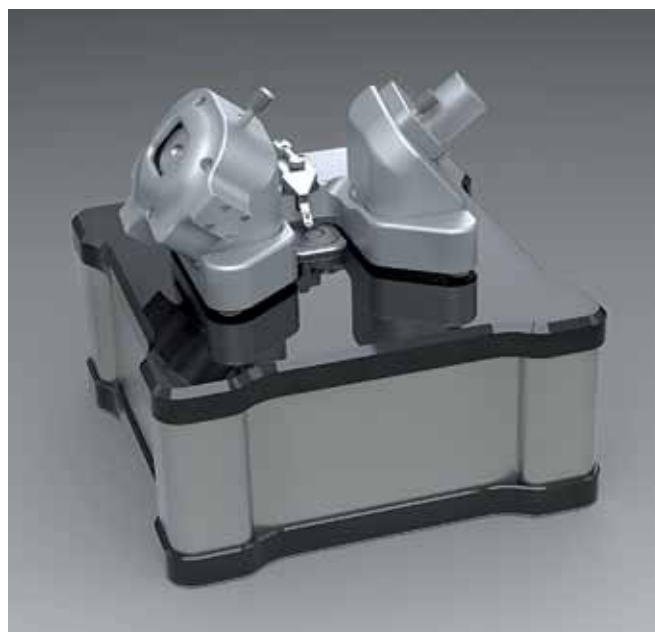


Рис.1. Механическая система сканирующего зондового микроскопа "ФемтоСкан X" имеет открытую архитектуру для удобного совмещения с оптическими методами наблюдений

Fig.1. Mechanical system of scanning probe microscope FemtoScan X has an open architecture for comfortable combining with optical methods of measurements

Nowadays, it is not possible to visualize biological processes (growth of bacteria and cells, infection of cells with a virus, conformational transitions in chromosomes, etc.) in natural medias at high spatial resolution (at nanometer fraction precision) and the required temporal detailing in milliseconds or less. To obtain an image of 512×512 pixel size using traditional probe microscopy at a scan frequency of 2 Hz, it takes about 4 minutes [1]. However, with the development of high-speed probe microscopy technology, the visualization of these processes is quite feasible. It is also possible to implement a new approach to determination of antibiotic resistance of bacterial cells: cessation of cell membrane oscillations due to internal metabolic processes under

the influence of a specific antibiotic serves as an indicator of the effectiveness of the antimicrobial drug used. The structural and dynamic characteristics of the protein molecule play a central role in ensuring their biological functions. High-speed scanning probe microscopy opens up broad avenues for a study of protein macromolecules in dynamics. It becomes a practical instrument for designing protein and DNA biochips that are promising for further use in medical diagnostics. In this case it becomes possible to widely use biosensors built on biospecific interaction without using any markers. Another example of the application of high-speed scanning probe microscopy is the development of original methods for screening new drugs that contain single

cells of higher organisms. In this case it is possible to use high-speed multichannel scanning capillary microscopy wherein each channel performs its functional role: drug delivery to the cell, measurement of cell activity, determination of cell electrochemical parameters (presence of active oxygen forms in the immediate vicinity of the cell membrane, membrane potential, conductivity ion channels, etc.) [2].

In the field of medical diagnostics with the aid of high-speed probe microscopy the problem of early detection of biological agents - viruses and bacterial cells - is being solved. To achieve sensitivity at the level of single viruses, we patented the design of a probe microscopy flow cell incorporating a piezoceramic biochip [3]. In the experiments, different

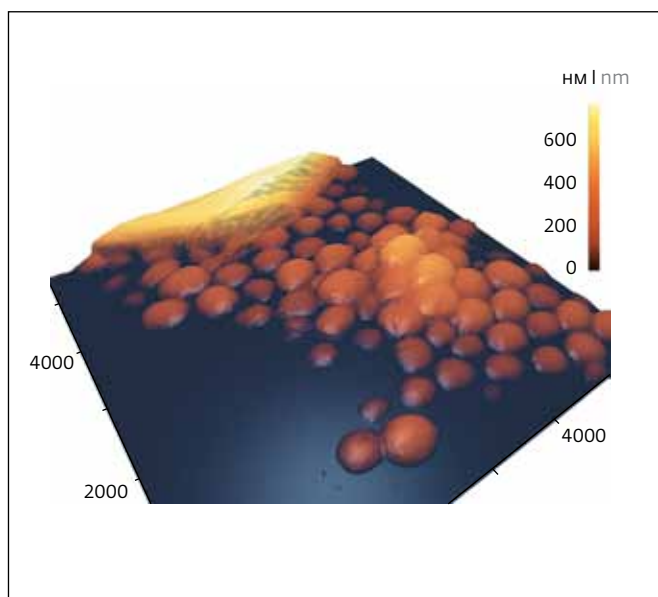


Рис.2. Изображение *Staphylococcus aureus* (золотистый стафилококк). Использовано программное обеспечение "ФемтоСкан Онлайн"

Fig.2. The image of *Staphylococcus aureus* obtained with FemtoScan online software

вышеперечисленные исследования, в частности, над созданием оригинальных программных и аппаратных комплексов сверхбыстрой цифровой обработки больших потоков данных в режиме реального времени на предельно высокой скорости, необходимых для создания биологического сканирующего зондового микроскопа.

Наша научная группа имеет большой практический опыт в зондовой микроскопии. Разработанные сканирующие зондовые микроскопы серии "ФемтоСкан" и программное обеспечение "ФемтоСкан Онлайн" активно используются во многих зарубежных и отечественных научных центрах (например, в Медицинском центре Университета Небраски (США), Университете г. Катанья (Италия), Амурском государственном университете, Алтайском государственном политехническом университете им. И.И.Ползунова, Брянском государственном университете имени академика И.Г.Петровского, Тамбовском государственном университете имени Г.Р.Державина, в МГУ имени М.В.Ломоносова и др.) при проведении медико-биологических и материаловедческих исследованиях. В МГУ имени М.В.Ломоносова в обучении и при проведении научных исследований успешно работает 18 микроскопов "ФемтоСкан". В лабораторном практикуме сканирующей зондовой микроскопии установлено шесть микроскопов "ФемтоСкан" с полным интернет-доступом ко всем режимам измерений. По отзывам пользователей, эти микроскопы удобны и надежны в использовании, не имеют отказов в эксплуатации, позволяют проводить широкий спектр измерений более чем в 100 различных режимах. Более продвинутая модель "ФемтоСкан X" (рис.1) позволяет достигать скорости сканирования одного кадра 4096×4096 точек за 34 с [6]. При разрешении 128×128 точек уже достигается видеорежим 30 кадров в секунду. В настоящее время проводится

strains of the influenza A virus and sensory layers based on polysaccharides with cross-linked sialic acids are used, that ensures high selectivity [4]. For the same purposes a cantilever biosensor device (recording static bending of a cantilever) with a sensitivity of one hundred million viruses in 1 ml of liquid was developed [5].

We are currently working on an installation that allows us to carry out all of the above studies, in particular, to create original software and hardware complexes of ultrafast digital processing of large data streams in real time at extremely high speeds necessary

to create a biological scanning probe microscope.

Our research team has extensive practical experience in probe microscopy. The developed FemtoScan series scanning probe microscopes and FemtoScan Online software are widely used in many foreign and domestic research centers (for example, at the University of Nebraska Medical Center (USA), University of Catania (Italy), Amur State University, I.I.Polzunov Altai State Polytechnic University, Academician I.G.Petrovsky Bryansk State University, G.R.Derzhavin Tambov State

University, at M.V.Lomonosov Moscow State University, et al.) when conducting medical, biological and materials research. In the M.V.Lomonosov Moscow State University there are 18 FemtoScan microscopes successfully used in teaching and research. In the laboratory of scanning probe microscopy, 6 FemtoScan microscopes with Internet access to all measurement modes were installed. In the opinion of researches, these microscopes are convenient and reliable in use, do not fail in operation, and allow of making a wide range of measurements in more than 100 different modes. The

работа по увеличению скорости снятия изображения примерно в 100 раз с использованием высокоскоростной электроники и сверхбыстрой механики. Это позволит снятие мегабайтного изображения поверхности в видеорежиме. Для достижения этой задачи используются комбинированные цифро-аналоговые и аналого-цифровые преобразователи, быстродействующие fpga-контроллеры, цифровые синтезаторы частоты и другие элементы быстродействующей электроники. Сканер выполнен в виде многозвенной структуры. У каждого звена своя резонансная частота и, соответственно, разный диапазон скоростей сканирования, как у коробки передач в автомобиле. Зонд имеет миниатюрную конструкцию, обеспечивающую высокую скорость отклика при крайне малых размерах и массе. Резонансная частота кантилевера должна находиться в диапазоне сотен мегагерц.

Повышение быстродействия зондовой микроскопии до значений десятков кадров в секунду позволяет существенно повысить временное разрешение и наблюдать многие процессы на поверхности в режиме реального времени [7]. Изучение картины деления бактериальной клетки, определение спектра характерных механических колебаний мембраны клетки в различных циклах жизнедеятельности – с помощью быстродействующей сканирующей зондовой микроскопии эти процессы предстают совершенно под другим углом.

Таким образом, сканирующая зондовая микроскопия в настоящее время является передовым методом для характеристики динамики

сложного молекулярно-биологического механизма *in vivo*.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований, проект № 17-52-560001.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. **Lyubchenko Yu.L.** Direct AFM visualization of the nanoscale dynamics of biomolecular complexes. *Journal of Physics D: Applied Physics*, 2018, 51, 403001 (17pp).
2. **Yaminsky I.V.** Scanning capillary microscopy // *Nanoindustry*, 2016, № 1 (63), 76–79.
3. **Yaminsky I.V., Akhmetova A.I., Sosnin V.S., Yaminsky D.I., Meshkov G.B., Olenin A.V.** Flowing liquid cell for scanning probe microscopy. Patent RF # 2645884 28.02.18.
4. **Yaminsky I.V., Akhmetova A.I., Meshkov G.B.** Physical methods for detecting viruses and bacteria using scanning probe microscopy tools // *Nanoindustry*, 2017. № 3 (73), 56–59.
5. **Nazarov I.A., Akhmetova A.I., Yaminsky I.V., Meshkov G.B., Sagitova A.V.** Biosensor device for detection of biological micro- and nano-objects. Patent RF # 2016141844 17.11.17.
6. **Filonov A., Savinov S., Sinityna O., Meshkov G., and Yaminsky I.** The FemtoScan X is a new scanning probe microscope. *Nanoindustry*, 2012, № 3 (33), 48–49.
7. **Magazov I., Savinov S., Yaminsky I.** Electronics for Nanotechnology // *Nanoindustry*, 2011, № 5 (29), 74–75.

more advanced model FemtoScan X (Fig.1) makes it possible to achieve a scan rate of one 4096 × 4096 pixel frame 34 seconds [6]. At 128 × 128 pixels resolution, the video mode is already 30 frames per second. Currently, the work is underway to increase a speed of image capture about 100 times using high-speed electronics and ultra-fast mechanics. It will allow to remove a megabyte image of the surface in video mode. To achieve this task, combined digital-analog and analog-digital converters, high-speed fpga-controllers, digital frequency synthesizers and other elements of high-speed electronics are

applied. The scanner is designed as a multi-link structure. Each link has its own resonant frequency and, accordingly, a different range of scanning speeds, like a gear box of a car. The probe has a miniature design that provides high response speed with extremely small size and weight. The resonant frequency of the cantilever should be in the range of hundreds of MHz. Improving the speed of probe microscopy to tens of frames per second can significantly increase the temporal resolution and make it possible to observe many surface processes in real time [7]. Study of the bacterial

cell division process, determination of the spectrum of characteristic mechanical vibrations of the cell membrane in various life cycles using high-speed scanning probe microscopy – these processes appear from a completely different angle.

Thus, currently the scanning probe microscopy is an advanced method for characterizing dynamics of a complex molecular-biological mechanism *in vivo*. ■

The research was accomplished with a financial support of the Russian Foundation for Basic Research (project No 17-52-560001).