

Сканирующая зондовая микроскопия: получение трехмерных изображений

Дубровин Е.В., Мешков Г.Б., Яминский И.В.

Лабораторная работа «Сканирующая зондовая микроскопия: получение трехмерных изображений» – это вводная работа, предназначенная для начального знакомства с универсальным методом исследования поверхности материалов и нанообъектов – атомно-силовой микроскопией. Работа состоит из трех частей. Первая из них знакомит с правилами настройки цепи обратной связи. Вторая часть – это изучение структуры поверхности высокоориентированного пиролитического графита – определение формы ступеней и дефектов, оценка параметров шероховатости. Заключительная часть работы – наблюдение морфологии частиц вируса табачной мозаики – совершенства молекулярной сборки от самой природы. Лабораторная работа способствует приобретению начальных навыков по изучению свойств поверхности и нанообъектов с помощью сканирующего зондового микроскопа.

1. Введение

Сканирующая зондовая микроскопия представляет собой совокупность большого числа экспериментальных методов по изучению структуры и свойств поверхности, как на микроуровне, так и на уровне отдельных молекул и атомов. Сканирующий зондовый микроскоп измеряет параметры поверхности в небольшой локальной зоне нанометровых размеров вблизи острия зонда. Постепенно перемещая зонд вдоль исследуемой поверхности удается получить представление о свойствах области, размер которой может быть от сотни нанометров до десятков и сотен микрон.

Из всего многообразия сканирующей зондовой микроскопии в настоящей работе рассмотрена атомно-силовая микроскопия. Этот метод находит самое широкое применение при исследовании свойств поверхности на воздухе, в газах и жидкостях.

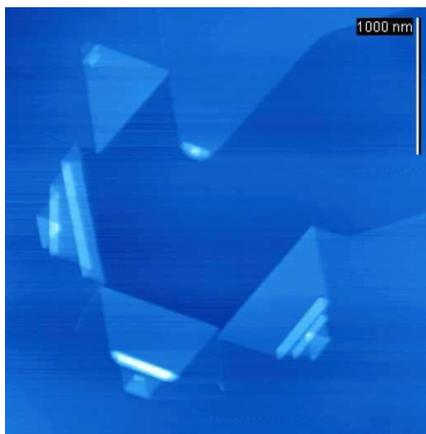


Рис. 1. Изображение дефекта на поверхности графита. Атомно-силовая микроскопия (топография).

Атомно-силовой микроскоп – это сложный прибор, для его полноценного использования необходимы определенные знания и навыки. Интерпретация данных в атомно-силовой микроскопии зависит от экспериментатора. Это требует определенной подготовки в области поверхностных явлений, потенциалов взаимодействия, теории деформаций, механики наноконтактов, материаловедения и пр.

Вместе с тем, данные зондовой микроскопии являются в высшей степени наглядными и для начального знакомства с атомно-силовым микроскопом можно использовать простые и интуитивно понятные модели. На рисунке 1 приведено изображение дефекта на поверхности графита, полученного с помощью атомно-силового микроскопа. Разрыв поверхности графита произошел по выделенным кристаллографическим направлениям, и соответствует гексагональной упаковке.

2. Принцип работы атомно-силового микроскопа

Легче всего понять принцип работы атомно-силового микроскопа, если провести аналогию с граммофонным проигрывателем. В обоих приборах игла движется по поверхности, отслеживая ее рельеф. Положение иглы преобразуется в сигнал, в случае граммофона – это звук, который мы слышим, а в атомно-силовом микроскопе – это изображение поверхности, которое мы видим на экране монитора. В чем существенное отличие микроскопа от звукового проигрывателя? В атомно-силовом микроскопе сила взаимодействия между иглой (зондом) и исследуемой поверхностью в 10 миллионов раз меньше, чем в проигрывателе. Это позволяет использовать острую иглу с радиусом закругления в 1-10 нм, а иногда, и иглу с одним атомом в ее вершине. В результате получается беспреце-

дентный результат – мы можем видеть отдельные атомы и молекулы.

Регистрация малых сил (единиц наноньютонов) и применение острых зондов накладывает строгие требования на конструктивное и инженерное исполнение атомно-силового микроскопа. В результате он имеет мало внешнего сходства с граммофонным проигрывателем.

Атомно-силовой микроскоп не возник из граммофонного проигрывателя. Судьба распорядилась иначе. Первый атомно-силовой микроскоп появился в 1986 году на основе сканирующего туннельного микроскопа. В тот самый год, в котором Герду Биннигу и Хайнриху Рореру была вручена Нобелевская премия за изобретение сканирующего туннельного микроскопа. Первый сканирующий туннельный микроскоп был создан ими всего лишь за пять лет до этого знаменательного события, 16 марта 1981 года.

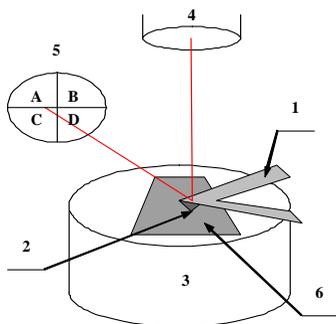


Рис. 2. Схема механической части АСМ. 1 – кантилевер, 2 – зонд, 3 – пьезосканер, 4 – лазер, 5 – четырехсекционный фотодиод, 6 – образец.

Механическая система атомно-силового микроскопа представлена на рисунке 2. Для осуществления сканирования, образец или зонд размещается на трехкоординатном манипуляторе. В нашем случае, манипулятор осуществляет перемещение образца. Точность перемещений составляет сотые доли ангстрема (тысячные доли нанометра). Такую точность позволяют достичь манипуляторы, изготовленные из пьезокерами-

ческих материалов. При подаче электрического напряжения на электроды манипулятора за счет обратного пьезоэффекта происходит изменение его геометрических размеров по всем трем направлениям, и соответственно перемещение образца по этим направлениям (например, вдоль взаимно перпендикулярных осей X, Y и Z). От размера сканера (максимальное поле сканирования, которое на нем допустимо) зависит качество картинки на сильных увеличениях. Если с помощью 10-ти микронного сканера Вы хотите увидеть атомную решетку на графите, относительная точность поддержания напряжения должна быть лучше 10^{-6} .

Ключевым элементом микроскопа является зонд, который в атомно-силовой микроскопии называется кантилевером (рис. 2). Он представляет собой упругую пластинку – микроконсоль, на свободном конце которой сформировано острие – остроконечная пирамидка высотой в 5-10 мкм. Как правило, кантилеверы изготавливаются из кремния или нитрида кремния. Геометрические размеры микроконсоли определяют ее механическую жесткость. Механическая жесткость кремниевого кантилевера длиной 250 мкм, шириной 35 мкм и толщиной 1 мкм составляет 0,1 Н/м.

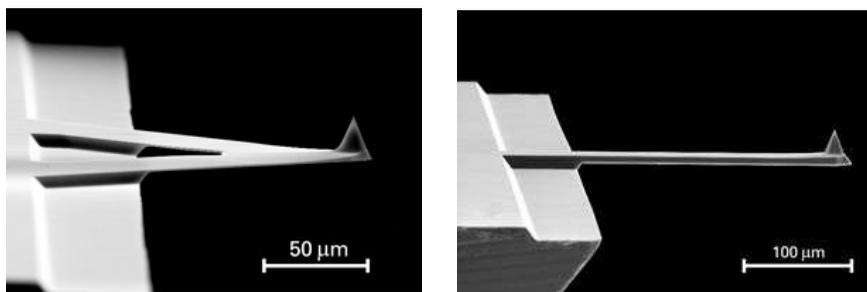


Рис. 3. Изображение кантилеверов для атомно-силовой микроскопии.

Во время сканирования атомно-силовой микроскоп осуществляет прецизионную регистрацию положения кантилевера. Это делается с помощью оптической системы. Луч лазера направляется на гладкую поверхность кантилевера, отражается от нее и попадает на приемный фотодиод, который определяет

положение светового пятна. За счет применения такой оптической схемы малые перемещения кантилевера можно преобразовать в существенно большие сдвиги светового пятна по чувствительной зоне фотодиода. Выигрыш в перемещениях при размере кантилевера в 100 мкм и расстоянии от кантилевера до фотоприемника 5 см составляет 1000 раз. Таким образом, при нанометровых перемещениях кантилевера надо регистрировать микронные сдвиги светового пятна на фотодиоде.

Исторически первым и широко используемым режимом работы в атомно-силовой микроскопии является контактный режим. В нем кантилевер скользит по поверхности образца в условиях механического контакта. При этом между зондом и поверхностью образца действуют силы отталкивания.

В контактном режиме регистрируют перемещение кантилевера по нормали к образцу. Перемещение кантилевера повторяет рельеф образца. Изгибные перемещения кантилевера, обусловленные силами взаимодействия вдоль плоскости образца, другими словами – силами трения, дают информацию о фрикционных свойствах поверхности – пространственную карту коэффициента трения.

Для получения достоверной информации о характере рельефа поверхности исследуемого образца необходимо поддерживать минимальной силу взаимодействия зонд-образец. Это обеспечивает наименьший уровень искажений, вносимых за счет деформаций исследуемой поверхности и зонда, неизбежных при механическом воздействии.

Сканирование удобно осуществлять таким образом, чтобы при сканировании сила взаимодействия между зондом и образцом была постоянной. Добиваются этого следующим образом. Во время сканирования образец перемещают по вертикали, приближая или удаляя от кантилевера таким образом, чтобы его изгиб оставался постоянным. В процессе измерений сила взаимодействия зонд-образец остается постоянной, и такой метод носит название контактный режим постоянной силы. В реальном микроскопе удается поддерживать постоянную силу с некоторой погрешностью. Величиной этой по-

грешности можно управлять при помощи системы обратной связи. Аналогичные системы используются во многих устройствах с автоматическим регулированием. Например, крылатая ракета летит к цели, отслеживая профиль поверхности. Для этого она использует дальномер и систему обратной связи. В системах обратной связи крылатой ракеты и атомно-силового микроскопа много общего и часто используются аналогичные алгоритмы и элементы электронных схем. Для построения обратной связи используется пропорционально-интегральная схема. В этой схеме управляющий сигнал формируется на основании отклонения регистрируемого параметра от заданного (пропорциональное звено) с одной стороны и путем суммирования ошибки отклонения (интегральное звено) с другой. Для контактного режима в моде постоянной силы надо выбирать большие значения интегрального и пропорционального звеньев. Беда в том, что если выбрать слишком большие значения пропорционального и интегрального звеньев, то система перейдет в режим автоколебаний – образец будет хаотически соударяться с кантилевером.

Пользователи микроскопа часто прибегают к эмпирической настройке цепи обратной связи, что во многом оправдано в атомно-силовой микроскопии. Учитывая локальность взаимодействия зонд-образец, сложность этого взаимодействия и вариации локальных свойств при сканировании неоднородных образцов, не удастся заранее предсказать характер поведения всей системы в целом. Первая часть лабораторной работы направлена на приобретение начальных навыков по настройке цепи обратной связи атомно-силового микроскопа. Для этой цели в эксперименте используется полноценная электронная система сканирующего зондового микроскопа, однако вместо реальной механической системы используется весовой макет. Если мы подаем напряжение на пьезокерамический манипулятор, то образец меняет свое положение относительно кантилевера, кантилевер изгибается, световое пятно на фотодиоде смещается и изменяется величина протекающего через него тока. На выходе электронный блок вырабатывает электриче-

ское напряжение, а на его вход попадает токовый сигнал. То есть, простейшим эквивалентом сложной механической системы микроскопа с точки зрения электроники является электрический резистор. Строго говоря, этот резистор должен обладать сложной зависимостью электрического сопротивления от напряжения и времени, однако для простейшей модели можно использовать постоянный резистор.

3. Настройка цепи обратной связи атомно-силового микроскопа с помощью весового макета

В любом методе зондовой микроскопии отслеживается изменение состояния зонда при сканировании. В атомно-силовой микроскопии – это отклонение D кантилевера от начального положения. Оно является измеряемой величиной.

Обычно при сканировании поверхности без использования системы обратной связи мы получаем карту распределения отклонения кантилевера по поверхности образца, то есть массив данных $D(x,y)$. Существование связи отклонения D и вертикального положения z образца делает возможным использование системы обратной связи, для поддержания постоянной силы взаимодействия зонда с поверхностью при сканировании. Отклонение кантилевера D в случае контактного режима работы атомно-силового микроскопа совпадает с изменением положения образца по вертикали: $D = \Delta z$.

Методика сканирования поверхности с использованием обратной связи заключается в следующем. Зонд приближают к поверхности до тех пор, пока кантилевер в результате взаимодействия с поверхностью не отклонится на заранее заданную величину. После этого запускают сканирование по горизонтальным координатам (x,y) , а отклонение кантилевера поддерживают постоянным, для чего при сканировании

используют связь отклонения с положением образца. Положение образца по вертикали изменяют с помощью системы обратной связи, так чтобы отклонение кантилевера от начального свободного положения над поверхностью было постоянным в каждой точке. Таким образом, движение образца будет повторять профиль исследуемой поверхности $Z(x, y)$. Сканирование по координатам (x, y) осуществляется по известному закону, и полученные данные будут зависеть от скорости движения зонда и времени.

При работе стандартной схемы обратной связи величина перемещения образца по вертикальной оси Δz в каждой точке определяется на основании отклонения кантилевера, измеренного в этой и предыдущих точках. Смещение образца по вертикали происходит после перемещения кантилевера в данную точку поверхности и его отклонения от предыдущего положения. Это отклонение кантилевера обычно называется ошибкой обратной связи. Ошибка обратной связи принципиально не может быть устранена, поскольку само движение зонда по вертикали должно предшествовать реакции системы обратной связи на это движение.

Для реализации весовой макета контактного режима работы атомно-силового микроскопа используется электронный блок микроскопа, в котором выходной сигнал обратной связи, перемещающий образец для поддержания постоянного отклонения кантилевера, замкнут на вход измерительной системы через постоянный резистор.

Системы обратной связи могут быть реализованы разными способами. Существуют схемы с использованием различных комбинаций интегральных, пропорциональных, дифференциальных и других видов звеньев цепи обратной связи. Наиболее распространенной в СЗМ является цепь обратной связи с использованием интегрального и пропорционального звена. Такая система для вычисления значения сигнала обратной связи в данной точке поверхности $Z(x, y)$ использует с определенными весовыми коэффициентами значения откло-

нения, измеренные в данной и всех предыдущих точках поверхности. В общем, виде такая схема может быть записана следующей формулой:

$$Z(x, y) \equiv Z(t) = \xi_p \Delta Z(t) + \xi_I \int_0^t \Delta Z(\psi) d\psi,$$

где ξ_p, ξ_I – коэффициенты пропорционального и интегрального звена цепи обратной связи.

В используемо для построения весового макета электронном блоке реализована цифровая система обратной для обработки сигналов, поэтому для приближенного вычисления интеграла используется рекурсивная разностная схема для каждого момента времени. Сигнал в текущий момент вычисляется с учетом изменения сигналов в предыдущие моменты времени и скорости работы системы обратной связи:

$$Z(t_n) = Z(t_{n-1}) + \xi_I \Delta Z_n \cdot T + \xi_p (\Delta Z_n - \Delta Z_{n-1}).$$

где T – шаг дискретизации системы обратной связи по времени.

Для настройки весовых коэффициентов звеньев цепи обратной связи в выходной сигнал блока электроники добавляется сигнал $Z_0(t)$, который меняется во времени по определенному закону. Система обратной связи обрабатывает поступающие к ней данные и вырабатывает соответствующий сигнал движения образца $Z(t)$, который вычитается из $Z_0(t)$. Получившаяся разность подается на вход измерительной системы электронного блока и опять попадает в систему обратной связи.

Основной задачей подстройки параметров цепи обратной связи является повторение микроскопом заданного сигнала с минимальным отклонением от его величины и формы. При работе на весовом макете пользователь следит за «движением зонда» по совпадению заданного сигнала (красная линия) и реально получающегося на микроскопе (зеленая линия).

В весовом макете реализовано три вида сигнала: «прямоугольный импульс», «синусоидальный сигнал», «пилообраз-

ное напряжение» с различной скважностью (периодом) и амплитудой, а также возможность пользователю самому задавать сигнал произвольной формы.

Для работы необходимо запустить программу ФемтоСкан Онлайн и подсоединиться к удаленному микроскопу с весовым макетом по известному адресу (nanoscopy.org, порт 25000) как пользователь, имеющий право управлять микроскопом (СЗМ/подсоединиться Мастером). После этого на правой половине появившегося окна «Параметры» выбрать вкладку «Модуляция Z». В этой вкладке выбрать форму сигнала «Импульс» и амплитуду подаваемого сигнала установить 1 нм, в отображаемых каналах выбрать сигналы «Высота» и «Отклонение», и затем запустить режим «Модуляция Z» (СЗМ/запуск/Модуляция Z).

В окне «Параметры» на левой половине выставить значения коэффициентов обратной связи «Инт. звено» и «Проп. звено» равными 1, скорость установить вблизи 1 Гц. Убедиться, что микроскоп достаточно точно повторяет заданный сигнал.

Коэффициенты звеньев цепи обратной связи могут быть подобраны эмпирически при помощи визуального контроля совпадения красной и зеленой кривой. Наиболее простой полупырический способ поиска значений коэффициентов описывается методом Зиглера-Никколяса [1]. Он включает в себе несколько этапов.

Алгоритм настройки обратной связи по методу Зиглера-Никколяса:

- Выставить минимальное значение интегрального звена
- Постепенно увеличивая значение пропорционального звена, перевести микроскоп в режим автоколебаний. Запомнить это значение P соответствующее началу области автоколебаний микроскопа.
- Выставить значение пропорционального звена равное $0,45P$
- Постепенно увеличивать значение интегрального звена до тех пор, пока микроскоп не будет максимально точ-

но обрабатывать заданный сигнал (совпадение красной и зеленой линий), но, не переводя микроскоп в режим автоколебаний.

Используя макет выполнить следующие упражнения:

- Получить данные для всех типов сигналов средней амплитуды (1-10 нм) при использовании только интегральной составляющей цепи обратной связи и только пропорциональной составляющей цепи обратной связи.
- Настроить эмпирически звенья обратной связи для всех типов сигналов для разных амплитуд (1-100 нм) и скоростей (0,4 – 7 Гц). Построить графики зависимости значений интегрального и пропорционального звена от амплитуды сигнала и скорости сканирования.
- Настроить звенья обратной связи по алгоритму Зиглера-Никкольса для всех типов сигналов для разных амплитуд (1-100 нм) и скоростей (0,4 – 7 Гц). Построить графики зависимости значений интегрального и пропорционального звена от амплитуды сигнала и скорости сканирования.

4. Получение и анализ трехмерных изображений высокоориентированного пиролитического графита

Графит является очень удобной подложкой для зондовой микроскопии. При скалывании на нем образуются атомно-гладкие поверхности достаточно больших размеров вплоть до нескольких микрон; он инертен и не изменяется при хранении на воздухе; относительно дешев, поскольку одного образца графита хватает на десятки и даже сотни измерений. Так что при исследовании объектов в СЗМ, часто выбирают в качестве подложки графит. Определяющим фактором при выборе подложки для исследований в пользу графита может также стать факт гидрофобности его поверхности.

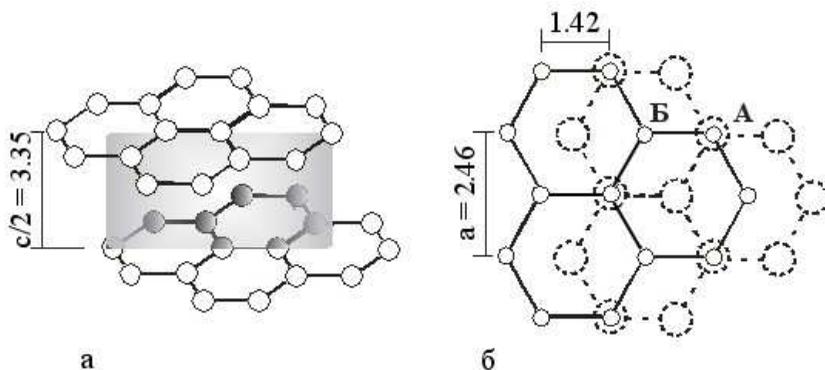


Рис. 4. Кристаллическая структура графита. Параметры решетки указаны в ангстремах.

Графит является аллотропной модификацией углерода (sp^2 -гибридизация). Он имеет слоистую структуру с гексагональной упаковкой атомов в слоях [2]. Слои не связаны между со-

бой химическими связями. На рис. 4 приведена кристаллическая структура графита.

Слои в пространстве могут располагаться двумя способами, образуя гексагональную или ромбоэдрическую кристаллическую решетку. Последняя, энергетически менее выгодна и при высокой температуре $\sim 2000-3000^\circ\text{C}$ переходит в гексагональную; следствием чего является отсутствие ромбоэдрической формы в искусственно получаемом графите (пиролитическом графите).

При скалывании высокоориентированного пиролитического графита образуется множество ступеней, они появляются при разрыве графитовых плоскостей, ориентированных не по направлению скалывания.

Основным видом дефектов в графите являются дислокационные дефекты [3]. Различные виды дислокаций по-разному проявляются в рельефе поверхности. Так, винтовые дислокации видны на поверхности в АСМ в виде круговых ступенек, покрытых несколькими слоями графита. При прохождении дислокаций по базисной плоскости искривление слоёв приводит только к их локальному растяжению или сжатию. Наличие таких дислокаций обычно не приводит к изменению топографии поверхности. Однако сильное механическое воздействие зонда на поверхность графита вызывает движение дислокаций и дислокационных дефектов. Есть данные о том, что дефекты упаковки атомов на поверхности, образованные при повороте верхнего слоя менее чем на 0.5° относительно субстрата, под воздействием зонда могут превращаться в сетку дислокационных дефектов [4]. Более подробно с исследованиями поверхности графита в зондовой микроскопии можно познакомиться в литературе, например в обзоре [5].

5. Наблюдение вируса табачной мозаики

Успешное развитие разного рода технологий нередко шло по пути подражания природным объектам и процессам, что получило название биомимикрии. Среди известных примеров этого подхода к развитию технологий является создание самоочищающихся поверхностей (имитация поверхности лотоса), липучки (воспроизведение поверхности репейника), адгезивной ленты на основе межмолекулярного взаимодействия поверхностей, полученной имитацией поверхности лапы ящерицы-геккона, создание скоростных бесшумных поездов «зимородочьим» носом и т.д.

Разумеется, и в нанотехнологиях принцип биомимикрии имеет большой потенциал. Говоря об изучении и конструировании объектов, размеры которых лежат в нанометровом диапазоне, необходимо помнить, что одним из наиболее простых (с точки зрения строения) природных объектов такого рода являются вирусы. Данный раздел посвящен изучению вируса табачной мозаики (ВТМ) с помощью атомно-силовой микроскопии.

5.1 Что такое вирус? Цикл воспроизведения вирусных частиц.

Вирус (от лат. *virus* — яд) — микроскопическая частица, способная инфицировать клетки живых организмов. Вирусы являются облигатными паразитами — они не способны размножаться вне клетки. В настоящее время известны вирусы, размножающиеся в клетках растений, животных, грибов и бактерий (последних обычно называют бактериофагами). Вирусные частицы (вирионы) представляют собой белковую

капсулу — капсид, содержащую геном вируса, представленный одной или несколькими молекулами ДНК или РНК. Капсид построен из капсомеров — белковых комплексов, состоящих в свою очередь из протомеров. Нуклеиновая кислота в комплексе с белками обозначается термином нуклеокапсид. Некоторые вирусы имеют также внешнюю липидную оболочку. Размеры различных вирусов колеблются от 20 до 500 и более нанометров. Вирионы часто имеют правильную геометрическую форму (икосаэдр, цилиндр), встречается также и более сложные структуры (рис. 5-7).

Первый известный вирус, вирус табачной мозаики (ВТМ), был выделен русским исследователем Дмитрием Ивановским в 1882 и более подробно изучен голландским ученым Мартинусом Бейжеринком в 1898 году. В настоящее время описано более 5000 типов вирусов. Исследованием вирусных частиц занимается вирусология. Вирусы являются одной из самых распространённых форм существования органической материи на планете по численности: воды мирового океана содержат колоссальное количество бактериофагов (около 10¹¹ частиц на миллилитр воды).

Жизненный цикл вирусов различается от одного вида к другому, однако в нем выделяют шесть основных стадий:

1. Присоединение или адсорбция вирусной частицы к поверхности клетки-хозяина. Это процесс — строго специфичный, то есть вирус может присоединиться только к клетке-хозяину, к любым другим клеткам присоединиться ему не удастся. Например, вирус иммунодефицита человека присоединяется только к человеческим Т-клеткам.
2. За адсорбцией следует проникновение в клетку; вирусы проникают в клетку хозяина посредством эндоцитоза или слияния с мембраной. Некоторые вирусы впрыскивают генетический материал внутрь клетки, в то время как капсид остается снаружи.
3. Разделение вирусной частицы — это процесс, в результате которого вирусный капсид разрушается белками-

энзимами и происходит высвобождение вирусного генома (РНК или ДНК).

4. Репликация вирусной мРНК, синтез вирусного белка по мРНК, и репликация вирусного генома.
5. Сборка и созревание новых вирусных частиц.
6. Выход вирусных частиц из клетки-хозяина посредством лизиса – процесса, уничтожающего клетку за счет повреждения клеточной мембраны. В некоторых случаях дочерние вирусы отпочковываются от плазматической мембраны, не вызывая её разрыва. Таким образом, клетка может продолжать жить и продуцировать вирус.

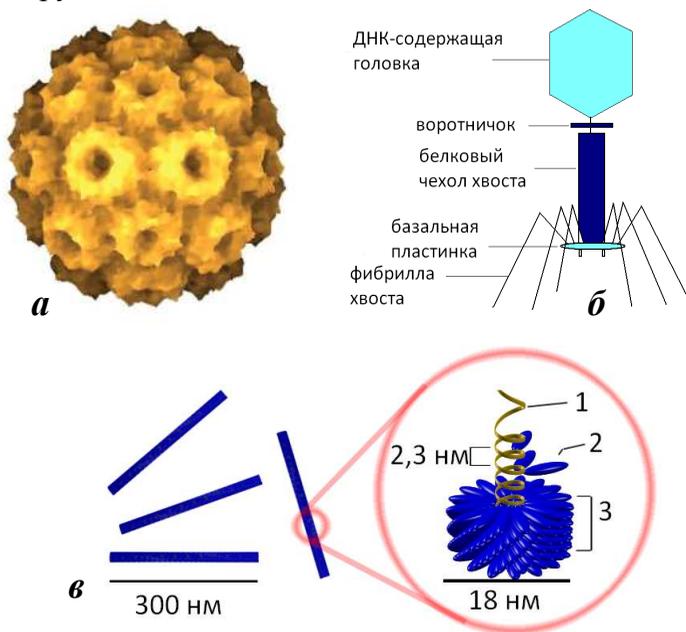


Рис. 5. (а) Икосаэдрическая структура вируса хлоротической крапчатости вигны, полученная методами рентгеновской дифракции. (Shepherd et al., Nucleic Acids Res, 2006, 34, D386), (б) структура бактериофага, (в) структура вируса табачной мозаики (1 – РНК, 2 – капсомер, 3 – капсид) (Y_tambe, Wikipedia).

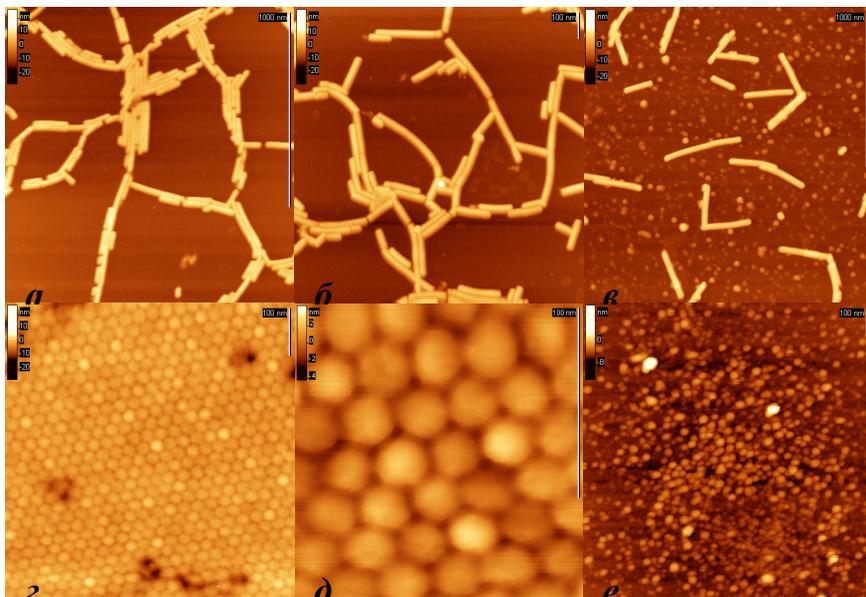


Рис. 6. АСМ-изображения (а) – семивалентного вируса мятлика (PSLV), (б) – вируса штриховатой мозаики ячменя (BSMV), (в) – вируса табачной мозаики (TMV), (г) и (д) – вируса мозаики костра (BMV), (е) – вируса мозаики люцерны (AMV), Размер масштабного отрезка составляет 1 мкм для (а), (в) и (д) и 100 нм для (б), (г) и (е) (Из Dubrovin et al. *Nanomedicine: NBM*, 3, 2007, 128).

Не все вирусы вызывают острые заболевания, многие вирусы репродуцируются без причинения видимого вреда инфицированному организму (так называемые латентные формы заболеваний). Вирусные инфекции у животных и человека обычно вызывают иммунный ответ, который может полностью уничтожить вирус в организме. Такой иммунный ответ может быть также продуцирован вакцинацией, дающей длительный иммунитет к вирусной инфекции. Антибиотики не оказывают влияния на вирусы, однако для лечения некоторых вирусных заболеваний были разработаны специальные противовирусные препараты.

5.2. Роль вирусов в биологии и их использование человеком

Вирусы имеют генетические связи с представителями флоры и фауны Земли. Согласно последним исследованиям, геном человека более чем на 30 % состоит из информации, кодируемой вирус-подобными элементами. С помощью вирусов может происходить так называемый горизонтальный перенос генов, то есть передача генетической информации не от отца к сыну и так далее, а между двумя неродственными (или даже относящимися к разным видам) особями. Благодаря этому свойству вирусы вносят существенный вклад в биологическую эволюцию планеты.

Вирусы используют в молекулярной и клеточной биологии, так как с их участием можно создавать простые системы для изучения функций клеток. Например, использование вирусов помогло в понимании основных механизмов молекулярной генетики и иммунологии. Вирусы широко используют как переносчики генов в генной инженерии и в частности при создании генетически модифицированных организмов (например, вирус мозаики цветной капусты). Лечение инфекционных болезней с помощью бактериофагов – фаговая терапия – сильно развивается в последнее время, поскольку является альтернативой антибиотикам, имеющим побочные эффекты и низкую эффективность за счет приспособляемости бактерий к ним.

Вирусы являются многообещающим объектом для развития нанотехнологий (впрочем, применения, описанные выше, можно также отнести к этому виду технологий). С точки зрения науки о материалах вирусы являются органическими наночастицами, которые умеют проникать через стенки клеток-хозяев. Размеры и форма вирусов, а также количество и природа функциональных групп на их поверхности точно определены, благодаря чему вирусы можно использовать как шаблоны для организации материала на наномасштабе. Например, частицы вируса мозаики вигны (CPMV) использовались для

усиления сигнала биосенсора, основанного на ДНК-матрице. В этой работе вирусными частицами разделяли флуоресцентные красители для того чтобы препятствовать возникновению нефлуоресцентных димеров, которые действуют как тушители [6]. Другим примером является применение СРМV в качестве наномакета для молекулярной электроники [7]. Палочковидные вирусы, покрытые металлическими наночастицами или проводящими полимерами, например, таким как полианилин, используют для создания нанопроводов и новых проводящих материалов.

5.3. Строение и состав вируса табачной мозаики (ВТМ)

Вирус табачной мозаики (ВТМ) – классический объект вирусологии, выделение которого в конце 19 века положило начало развитию этой науки. ВТМ – это РНК-содержащий вирус, вызывающий мозаичную болезнь табака (проявляется как пятнистость листьев). Вирус представляет собой палочки диаметром 18 нм и длиной 300 нм (рис. 5.1 в, 5.2 в), состоящие из белка и РНК [8]. Молекула РНК длиной в 6390 нуклеотидных оснований находится в виде спирали, характеризующейся длиной витка 2,3 нм, а оболочка сформирована из 2130 белковых субъединиц. Белок оболочки самоорганизуется в палочковидную спиральную структуру (16,3 мономерного белка на один поворот спирали) вокруг РНК, которая расположена в цилиндрическом кольце радиусом около 6 нм и недоступна к воздействию клеточных энзимов, ее разрушающих. Электронные микрофотографии показывают наличие в вирионах внутреннего канала диаметром около 4 нм. ВТМ является термостабильным вирусом: он может выдерживать температуры до 50⁰С в течение 30 минут. Современная вирусология обязана этому вирусу не только своим рождением, но и основным концепциям, складывающимся на протяжении всего 20 века и до настоящего времени, поэтому его дальнейшее изучение, особенно с помощью новых методов, актуально и по сей день.

5.4. Для чего необходима атомно-силовая микроскопия вирусных частиц?

При АСМ-исследовании вирусов в режимах получения топографии поверхности (таких как контактный или прерывистого контакта) можно изучать следующие аспекты: морфологию частиц, особенности адсорбции вирусных частиц на поверхность (кинетику адсорбции, степень адгезии, взаимную ориентацию частиц на поверхности [9-11]), зависимость адсорбции от вида поверхности (например, при модификации подложки различными химическими соединениями [10]), процессы кристаллизации вирусных частиц на поверхности [12], механическую прочность вирионов, а также отдельных белковых субъединиц [13], локализацию генома внутри вирионов [14], а также процессы, такие как одевание-раздевание вирусных частиц [15], высвобождение РНК (ДНК) из частиц [9], взаимодействие с клеткой-хозяином и т.п. Примеры АСМ-изображений 6 типов вирусов приведены на рис. 5.2 и 5.3. На рис. 5.3 б показано АСМ-изображение, на котором видна адсорбция бактериофагов на поверхность клетки *Escherichia coli*. АСМ позволяет также манипулировать отдельными вирусными частицами с помощью кантилевера и создавать наперед заданную архитектуру на наномасштабе. Кроме того, в режимах АСМ-спектроскопии (снятие силовых кривых, т.е. зависимости силы, действующей со стороны кантилевера на образец, от вертикального положения пьезосканера), появляются дополнительные возможности количественно изучать силу взаимодействия вириона с подложкой, РНК (ДНК) с белковой оболочкой, белковых субъединиц между собой и т.д.

АСМ можно без сомнения отнести к методу, извлекающему уникальную информацию об исследуемом образце. Чрезвычайно важно то, что в АСМ исследовать вирусные частицы можно без дополнительного контрастирования атомами тяжелых металлов (как, например, для электронной микроскопии). Можно получать трехмерную топографию с высоким разрешением (типичное разрешение для мягких объектов: до-

ли нанометров для латерального и доли ангстрем для вертикального направлений), изучать живые объекты на поверхности, как в воздушных, так и в водных средах. Эта информация, получаемая с помощью АСМ, востребована как для фундаментальной науки, так и для развития нанотехнологий.

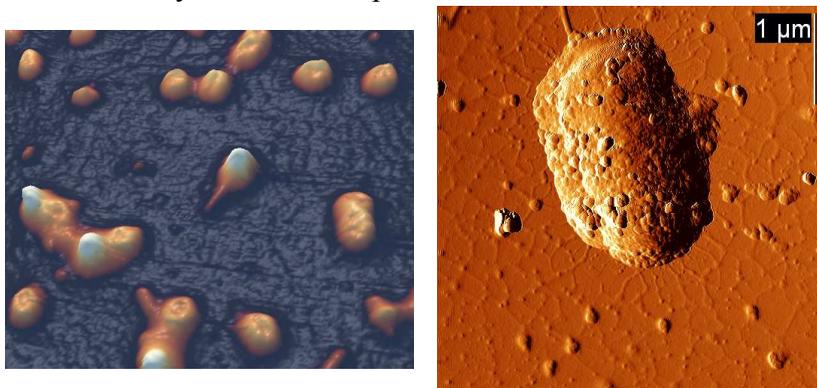


Рис. 7. АСМ-изображения (а) – бактериофага к *Escherichia coli* (трехмерное изображение, размер кадра приблизительно $1 \times 1 \times 0,06 \text{ мкм}^3$, (б) – клетки *Escherichia coli*, инкубированной с бактериофагом в течение 30 минут при 37°C (Из Dubrovin et al. *Langmuir*, 24, 2008, 13068).

ВТМ неоднократно исследовали с помощью метода атомно-силовой микроскопии [9,10,16-18]. В частности, была отмечена более высокая адсорбционная способность вирусных частиц на поверхности высокоориентированного пиролитического графита (ВОПГ) по сравнению с поверхностью слюды [9], что объяснялось гидрофобными взаимодействиями частиц с подложкой. В этой работе после обработки вирионов ВТМ диметилсульфоксидом (ДМСО) или мочевиной наблюдали “раздевание” вирусной частицы и выход из нее молекулы РНК. Более подробное изучение адсорбции частиц ВТМ на поверхностях, модифицированных различными химическими соединениями, показало высокую чувствительность процесса адсорбции к природе модификатора [10], например, модификация слюды цетилтриметиламмонием бромистым (ЦТАБ), повысила адгезию ВТМ на слюду более чем в 10 раз. Следует отметить, что при изучении ВТМ на таких подложках, как

слюда или графит, мы имеем дело с физической адсорбцией вирионов на эти поверхности, т.е. адсорбцией прежде всего за счет ван-дер-ваальсовых взаимодействий (и гидрофобных для поверхности графита).

Цель данного раздела лабораторной работы – рассказать об основных методиках, применяемых при получении АСМ-изображений вирусных частиц, а также о методах обработки экспериментальных данных, позволяющих извлекать из полученных изображений максимальное количество полезной информации.

5.5. Приготовление образцов ВТМ для АСМ

Ниже описана типичная процедура приготовления образца ВТМ для исследования с помощью АСМ, взятая из [10].

Перед нанесением на подложки для АСМ аликвоту раствора вируса центрифугировали при 13000 об/мин на центрифуге Эппендорф 5415 С, разводили фосфатным буфером (5 мМ фосфат натрия, рН 7.3, 150 мМ NaCl) до концентрации 1.3 мг/мл (для слюды) или до 0.325 мг/мл (для графита). 5 мкл образца наносили на свежий скол слюды или ВОПГ и выдерживали во влажной камере в течение 30 мин на слюде или 15 мин – на графите. Сорбированные образцы вируса промывали тридистиллированной водой (2-3 раза) и высушивали в вакуум-эксикаторе.

6. Экспериментальная часть

6.1. АСМ-исследование графита

Для начала работы на микроскопе необходимо запустить программу ФемтоСкан Онлайн и подсоединиться к удаленному

микроскопу по адресу nanoscopy.org, порт 25001 как пользователь, имеющий право управлять микроскопом (СЗМ/подсоединиться Мастером). В качестве образца в микроскопе будет установлен свежесколотый графит. После того, как микроскоп перешел в управление с данного компьютера, необходимо отвести кантилевер от поверхности образца на 50-100 мкм (СЗМ/переместить образец). Поменять точку сканирования (переместить зонд в другое место на поверхности). После чего установить смещение силы, то есть принять текущее положение кантилевера над поверхностью, соответствующее отсутствию контакта, за ноль силы (СЗМ/запуск/установить смещение). После этого на левой половине окна «Параметры» выставить значение силы 10 нН, соответствующее средней силе воздействия на поверхность, обеспечивающей стабильную работу в контактном режиме. Выставить значения звеньев обратной связи равными 1. Запустить сближение зонда с поверхностью (СЗМ/запуск/подвод). После окончания процесса подвода установить максимально возможный размер области сканирования в левой половине окна «Параметры» на вкладке «Поверхность» поля «Ширина» и «Высота». Запустить сканирование поверхности (СЗМ/запуск/Z(X,Y)). Получить изображение поверхности. Обработать полученное изображение и представить его в виде, котором на поверхности явно видны графитовые ступени.

В ходе работы на микроскопе необходимо выполнить следующие упражнения:

- Подберите значения коэффициентов звеньев обратной связи двумя способами: эмпирически и по алгоритму Зиглера-Никкольса. Получите по одному изображению одного и того же участка поверхности при обоих способах настройки цепи обратной связи и сравните полученные результаты. Выберите звенья наилучшим образом описывающие поверхность (по минимуму сигнала отклонения, например). Запишите оба варианта в отчет.

- Получите изображения поверхности графита максимального размера. На полученном кадре найдите дефекты поверхности различных типов. Оценить плотность дефектов (см. упражнение 6.2).
- Выберите небольшой участок поверхности (до 1 мкм) содержащий графитовую ступень, ориентированную по возможности перпендикулярно быстрой (горизонтальной) оси сканирования. Запустите сканирование поверхности (СЗМ/запуск/Z(X,Y)) и на правой стороне окна «Параметры» на вкладке «Поверхность» поставьте галочку в поле «Отключить вертикальную развертку». При этом микроскоп будет последовательно сканировать одну и ту же строку на поверхности содержащую графитовую ступень. Снимите кадр, это изображение понадобится Вам для определения температурного дрейфа микроскопа (упражнение 6.3).

6.2. Статистическая обработка изображений графита

На больших изображениях посчитайте среднее число ступеней, приходящихся на единицу площади. Постройте график зависимости среднего числа ступеней от площади, сканируемой поверхности.

С помощью функции обработки изображений «Найти ступеньки» определите среднюю шероховатость ступеней графита. Постройте график зависимости шероховатости ступеней от площади сканируемого участка поверхности.

6.3. Определение температурного дрейфа микроскопа

Для выполнения этого упражнения используйте изображение, полученное при отключенной вертикальной развертке. При отсутствии дрейфа ступень будет прорисовываться строго вертикально, в случае дрейфа ступень будет прорисовываться

под углом к вертикальной оси. По отклонению ступени от вертикали определите величину дрейфа микроскопа с учетом скорости сканирования и размера кадра.

6.2. Получить АСМ-изображение образца ВТМ, придать ему контрастность и построить трехмерное изображение

Запустите программу FemtoScan Online и подключитесь к удаленному микроскопу, выбрав команду «Подсоединиться как клиент». При подсоединении в поле «Пользователь» укажите свои имя и фамилию в точности, как в практикантской или зачетной книжке, а также адрес микроскопа и номер порта (эти значения, как правило, стоят по умолчанию). В этом режиме Вы можете наблюдать за процессом работы микроскопа и за всеми параметрами, также доступна опция «Чат» со всеми пользователями, подключенными в этот момент к микроскопу. Поскольку управлять микроскопом может только один оператор в текущий момент времени, то дождитесь сообщения преподавателя о возможности Вашего подключения к микроскопу «как мастер» (команда “Подсоединиться как мастер»). После того, как это произошло, вызвав вкладку «Панель управления», настройте параметры сканирования, например, размер кадра 10 мкм, частота сканирования – 2 Гц, значения цепей обратной связи согласно предыдущему разделу. Выберите 2 режима записи данных: «Высота» (“Height”) и «Отклонение» (“Deflection”) в случае работы в контактном режиме или «Высота» (“Height”) и «Фаза» (“Phase”) в случае работы в режиме прерывистого контакта (режим также отображается в панели управления). После этого Вы можете начать сканирование, выбрав команду «Z(x,y) scan». Чтобы полученное Вами изображение появилось в отдельном окне после окончания сканирования, проверьте, что в верхней части окна программы нажата кнопка «открыть в отдельном окне». После этого Вы можете сохранить результат Вашего сканирования на локальный диск, выбрав команду «Сохранить как...»

и указав путь. После завершения сканирования Вам необходимо отключиться от микроскопа, отжав кнопку “Подсоединиться как мастер».

Для обработки полученного изображения Вам скорее всего понадобятся следующие функции обработки изображений: «Подстройка шкалы» («Adjust scale”), «Вычитание поверхностей среднего наклона» (“Fitting”). Для настройки контрастности Вы должны, нажав правой кнопкой мыши по шкале высот, выбрать опцию «фиксированная шкала» (“Fixed scale”), после чего на шкале появятся две вертикальные пунктирные линии, обозначающие верхнюю и нижнюю границу палитры обрабатываемого изображения. Двигая эти линии, необходимо добиться контрастности изображения. Для построения трехмерного изображения воспользуйтесь командой контекстного меню «Построить трехмерное изображение» (“Build 3D view”) (оно строится из изображения, записанного по каналу «Высота»). Более подробно об этих и других функциях обработки изображений написано в руководстве пользователя программы на сайте <http://www.nanoscopy.net/manual/ru/index.html>.

В результате выполнения этого упражнения, Вы должны представить полученное и обработанное Вами АСМ-изображение ВТМ, а также трехмерное изображение. Используя комбинации клавиш Ctrl+C и Ctrl+V, вставьте эти изображения в «.doc»-файл отчета, назвав его Вашими именем и фамилией. Обязательно сохраните исходные файлы (они тоже могут потребоваться для отчета).

6.3. Построить гистограмму распределения по длинам вирусных частиц

Используя команду “Distance” контекстного меню, проведите измерение длин вирусных частиц на полученном Вами изображении и постройте гистограмму распределения по длинам. При этих измерениях удобно помечать измеренные частицы маркерами, используя команду контекстного меню “Marks”. Найдите наиболее вероятное значение длины и оцените дис-

персию получившегося распределения. Оцените погрешность Ваших измерений. Вставьте все эти данные в файл отчета.

6.4. Построить гистограмму распределения по высотам вирусов. Оценить величину деформации вирусной частицы кантилевером

Используя команду контекстного меню «Сечение» («Section»), измерьте высоты всех вирусных частиц, после чего постройте гистограмму распределения высот. При выполнении данного упражнения необходимо помнить, что сечения должны строиться по направлению сканирования, т.е. горизонтально, иначе возможно искажение результатов по причине часто присутствующих сбоев положений некоторых строк относительно остальных. Для измерения высоты вируса необходимо выбирать точку на вирусной частице, имеющую максимальную высоту. Из полученной гистограммы найдите наиболее вероятное значение высоты и оцените дисперсию получившегося распределения. Оцените величину деформации вирусной частицы кантилевером (диаметр частицы ВТМ в растворе – 18 нм). Оцените погрешность Ваших измерений. Вставьте все эти данные в файл отчета.

6.5. Оценить уширение кантилевером частицы ВТМ, построить профиль кантилевера, используя встроенную функцию «Non-distorting tip»

В связи с конечным размером зонда атомно-силового микроскопа возникает так называемый эффект уширения, выражающийся в том, что латеральные размеры объектов на АСМ-изображении превышают истинные размеры. Для оценки уширения объекта, имеющего в сечении радиус R_1 кантилевером радиусом R_2 используют следующую формулу, вытекающую из простых геометрических соображений:

$$2d = 2\sqrt{R_1^2 + 2R_1R_2},$$

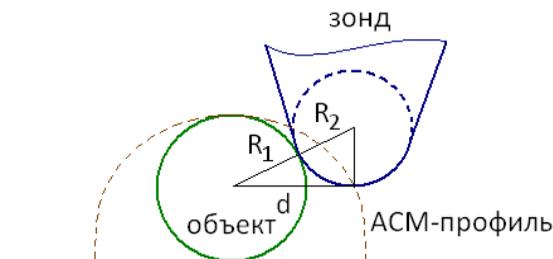


Рис. 8. Схема возникновения уширения объекта кантилевером (зондом) атомно-силового микроскопа.

где $2d$ – ширина объекта на полувысоте, измеренная по АСМ-профилю (рис. 5.4). Измерив ширину вирусной частицы на полувысоте (используйте для этого функцию «Сечение»), оцените по этой формуле радиус кантилевера, зная диаметр частицы ВТМ (18 нм).

Кроме того, в программе Фетоскан предусмотрены алгоритмы, позволяющие восстановить форму иглы по АСМ-изображению. Ознакомьтесь с этими алгоритмами, описанными в руководстве пользователя. Используя команду контекстного меню «Non-distorting tip» (находится в группе морфологических фильтров), постройте трехмерное изображение зонда. Занесите полученные результаты (значение R_2 и трехмерное изображение зонда) в файл отчета.

7. Контрольные задания и вопросы

1. Какое явление используется в процессе настройки звеньев цепи обратной связи по методу Зиглера-Никколса?

2. Какая форма сигнала, задаваемая при настройке весового макета, наиболее близка к рельефу реально встречающемуся на поверхности графита?
3. Какая особенность кристаллической структуры графита широко используется в зондовой микроскопии?
4. Какого типа дефекты можно наблюдать на поверхности графита в АСМ?
5. Расскажите о строении и составе вируса табачной мозаики, приведите существующие и возможные примеры технологического использования вирусных частиц.
6. Какие задачи может решать атомно-силовая микроскопия вирусов? В чем основные преимущества и недостатки АСМ?
7. Какова причина уширения АСМ-профиля исследуемых объектов, откуда возникает формула (*)?
8. В чем суть работы алгоритма функции «Non-distorting tip», используемого в данной работе для оценки радиуса зонда?

8. Литература

1. Ziegler J.G., Nichols N.B, Optimum settings for automatic controllers // Trans. ASME, pp. 759-768, 1942.
2. Chung D. D. L., Review Graphite // Journal of materials science, vol. 37, pp. 1475, 2002.
3. Амелинкс С.А. Методы прямого наблюдения дислокаций. Москва, Мир, 1968.
4. Ouseph P.J. Transformation of a graphite superlattice into triangular dislocations. Phys. Rev. B, vol. 53, 1996, pp. 9610-9613.

5. Soto C.M., Blum A.S., Vora G.J., et al. Fluorescent signal amplification of carbocyanine dyes using engineered viral nanoparticles. *J. Am. Chem. Soc.*, 128, 2006, 5184-5189.
6. Blum A.S., Soto C.M., Wilson C.D., et al. An Engineered Virus as a Scaffold for Three-Dimensional Self-Assembly on the Nanoscale. *Small*, 7, 2005, 702-706.
7. The Universal Virus Database. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/Ictv/>
8. Drygin Yu.F., Bordunova O.A., Gallyamov M.O., Yaminsky I.V. Atomic Force Microscopy Examination of TMV and Virion RNA. *FEBS Lett.* 425, 1998, 217-221.
9. Е.В. Дубровин, М.Н. Кирикова, В.К. Новиков, Ю.Ф. Дрыгин, И.В. Яминский. Изучение особенностей адгезии вируса табачной мозаики методом атомно-силовой микроскопии. *Коллоидный журнал.* 66, 2004, 750-755.
10. Е.А. Образцова, Н.О. Калинина, М.Е. Тальянский, Р. Габренайте-Верховская, К. Макинен, И.В. Яминский. Атомно-силовая микроскопия А-вируса картофеля, *Коллоидный журнал.* 70, 2008, 199-201.
11. Malkin A.J., Kuznetsov Yu.G., Lucas R.W., and McPherson A. Surface Processes in the Crystallization of Turnip Yellow Mosaic Virus Visualized by Atomic Force Microscopy. *J. Struct. Biol.* 127, 1999, 35-43.
12. W.H. Roos, I.L. Ivanovska, A.Evilevitch and G.J.L. Wuite. Viral capsids: Mechanical characteristics, genome packaging and delivery mechanisms. *Cell. Mol. Life Sci.* 64, 2007, 1484 - 1497.
13. Matsko N., Klinov D., Manykin A., Demin V., Klimenko S. Atomic force microscopy analysis of bacteriophages ϕ KZ and T4. *J. Electron Microsc.* 50, 2001, 417-422.
14. Kiselyova O.I., Yaminsky I.V., Karpova O.V., Rodionova N.P., Kozlovsky S.V., Arkhipenko M.V., and Atabekov J.G. AFM study of Potato Virus X Disassembly Induced by Movement Protein. *J. Mol. Biol.* 332, 2003, 321-325.
15. Falvo M.R., Washburn S., Superfine R., Finch M., Brooks F.P. Jr., Chi V., Taylor R.M. Manipulation of Individual

- Viruses: Friction and Mechanical Properties. *Biophys. J.* 72, 1997, 1396-1403.
16. Britt D.W., Buijs J., Hlady V. Tobacco mosaic virus adsorption on self-assembled and Langmuir–Blodgett monolayers studied by TIRF and SFM. *Thin Solid Films.* 327-329, 1998, 824-828.
 17. Maeda H. An Atomic Force Microscopy Study for the Assembly Structures of Tobacco Mosaic Virus and Their Size Evaluation. *Langmuir.* 13, 1997, 4150-4161.
 18. Руководство пользователя пакета программного обеспечения для управления сканирующим зондовым микроскопом и обработки изображений
 19. ФемтоСкан Онлайн
<http://www.nanoscopy.net/en/femtoscan-d.php>
 20. <http://ru.wikipedia.org>