

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ПЛЕНОК НА ОСНОВЕ АГАРОЗЫ В КАЧЕСТВЕ МОДЕЛЬНЫХ СТРУКТУР ДЛЯ ПОДГОТОВКИ АТОМНО-СИЛОВОГО МИКРОСКОПА К ИССЛЕДОВАНИЮ УПРУГО-МЕХАНИЧЕСКИХ СВОЙСТВ БАКТЕРИАЛЬНЫХ КЛЕТОК

С использованием атомно-силовой микроскопии в режиме силовой спектроскопии количественно охарактеризованы упругие свойства полимерных пленок на основе агарозы в зависимости от концентрации и относительной влажности формирования исследуемых образцов. Полученные результаты рассмотрены в контексте применения агарозных пленок в качестве тестового материала при подготовке атомно-силового микроскопа перед исследованием механических свойств бактериальных клеток

Ключевые слова: атомно-силовая микроскопия, полимерные пленки, агароза, механические свойства, бактериальные клетки.

С момента своего изобретения атомно-силовая микроскопия (АСМ) нашла широкое применение в самых различных областях науки, в том числе при исследовании живых систем. Ценность АСМ определяется получением изображения с чрезвычайно высоким (нанометровым) пространственным разрешением без использования характерной для иных методов многоэтапной процедуры пробоподготовки. Кроме того, уникальной особенностью АСМ является возможность контролируемого воздействия на исследуемый образец, что было положено в основу прецизионного измерения его локальных упруго-механических свойств. Сказанное объясняет высокую востребованность АСМ в режиме силовой спектроскопии при исследовании эукариотических [1] и прокариотических [2] клеток, в рамках которой информация о механических параметрах клеточной поверхности существенно дополняет визуальную картину и позволяет получить представление о функциональном состоянии исследуемых объектов [3].

Получение воспроизводимых данных об упруго-механических характеристиках исследуемых объектов до настоящего времени требует достаточно сложной и трудоемкой подготовки атомно-силового микроскопа, в том числе включающей настройку оптической системы детекции и получение точных данных о характеристиках используемого зонда (кантилевера). В этой ситуации актуальным является поиск альтернативных методов диагностики готовности АСМ к проведению подобных исследований, одним из которых представляется калибровка микроскопа с помощью различных полимерных пленок со стандартными номинальными значениями упругости [4].

В этой связи целью настоящей работы явилось исследование возможности использования пленок на основе агарозы для подготовки атомно-

силового микроскопа к исследованию механических свойств бактериальных клеток, а также определение условий для подобного использования.

Материалы и методы

В качестве исходного материала для создания полимерных пленок использовали химически чистую агарозу («Panreac», Испания), представляющую собой гетерополисахарид с ярко выраженным свойством гелеобразования. Для получения пленок готовили 2 %, 3 % и 4 % расплавы агарозы в дистиллированной воде, которые в объеме 20 мкл наносили на подложку из слюды, после чего высушивали в течение 12 часов при температуре +20-24°C и контролируемых значениях относительной влажности (о.в.) 50 %, 66 % и 86 %.

Полученные пленки сканировались на атомно-силовом микроскопе «SMM-2000» («ПРОТОН-МИЭТ», Россия) с использованием стандартных кантилеверов для контактной моды MSCT-AUNM («Park Scientific», США). Согласно паспортным данным производителя жесткость используемых кантилеверов равнялась 0,05 Н/м, а радиус кривизны 30 нм.

Исследование упруго-механических свойств образцов реализовывалось при продавливании объекта зондом, где представляемая графически зависимость изгиба кантилевера от движения сканера по вертикали обозначается как «кривая подвода» (рис.1Б). Алгоритм исследования включал в себя предварительное получение кривых подвода с объекта, упругость которого превышает константу упругости кантилевера (k_c), в качестве таковой выступала поверхность свежесколотой слюды. В этом случае предполагается, что движение сканера по оси Z (Dz) сопровождается пропорциональным отклонением кантилевера (Dd). В свою очередь в случае «мягкого» образца ($k_0 < k_c$)

отклонение кантилевера оказывается несимметричным движению сканера ($Dz > Dd$), поскольку поверхность объекта «продавливается» зондом. Зарегистрированные показатели в дальнейшем используются для вычисления глубины продавливания как $d = Dz - Dd$ с последующим расчетом модуля Юнга по модели Герца [5], описывающей контактную деформацию двух тел. При этом исходная формула (1) выражала зависимость между действующей на объект силой (F) и глубиной его продавливания (d)

$$F = \frac{4}{3} \cdot \frac{E}{1-\nu^2} \cdot \delta^{3/2} \cdot \sqrt{R} \quad (1)$$

где E – значение модуля Юнга, характеризующее упруго-механические свойства исследуемого объекта; R – радиус кривизны кантилевера, ν – соотношение Пуассона (для агарозы равно 0,5).

Результаты и их обсуждение

На первом этапе исследования пленок агарозы с использованием АСМ были получены серии изображений их поверхности (рис. 1А), а также краевого участка (рис. 1Б). При этом показано, что независимо от концентрации агарозы, поверхности сформированных пленок визуализировались как однородные по структуре гранулярные образования со значениями шероховатости не более 7 нм. Одновременно полученные данные о профиле поверхности (см. под рисунком 1Б) краевого участка агарозной пленки позволили оценить толщину сформированных образцов величиной около 1 мкм, что в заданных условиях эксперимента полностью исключало влияние свойств подложки на последующее измерение их упруго-механических свойств. В свою очередь кривые подвода, полученные с поверхности подобных пленок по сравнению с поверхностью слюды (рис. 1В) свидетельствовали о значимом различии регистрируемых величин Dd .

Основанный на обработке подобных силовых кривых расчет модуля Юнга свидетельствовал о зависимости данного параметра от концентрации агарозы в пленке, а также значений относительной влажности при которой осуществлялось ее формирование (рис 2).

Увеличение концентрации агарозы сопровождалось пропорциональным увеличением значений модуля Юнга, предположительно объясняемым увеличением числа поперечных сшивок в структуре формируемого геля, что увеличивает его сопротивление при продавливании зондом микроскопа. Так экспериментально зарегистрированные значения упругости 2% пленки агарозы составили $2,31 \pm 0,44$ МПа, в то время как увеличение ее концентрации до 3% и 4% вело росту значений модуля Юнга до $4,66 \pm 1,14$ МПа и $6,46 \pm 1,61$ МПа соответственно.

Изменение относительной влажности среды, при которой происходило формирование пленок агарозы, также оказывало существенное влияние на их итоговые упруго-механические свойства (рис. 2Б). При этом исследование пленок на основе 2% агарозы свидетельствовало о том, что увеличение значений о.в. вело к прогрессирующему снижению регистрируемых значений модуля Юнга в результате гидратации гелевой матрицы. В частности, возрастание относительной влажности среды с 50 % до 66 % вело к снижению жесткости агарозной пленки с $2,31 \pm 0,44$ МПа до $1,74 \pm 0,24$ МПа, а дальнейшее увеличение о.в. снижало модуль Юнга до минимального значения $0,81 \pm 0,10$ МПа.

Таким образом, полученные результаты демонстрируют адекватность использования пленок на основе агарозы при подготовке АСМ к исследованию упруго-механических свойств бактериальных клеток. Первым аргументом в пользу этого является достижение пропорциональности упругих свойств полимерных пленок в зависимости от выбранной концентрации ага-

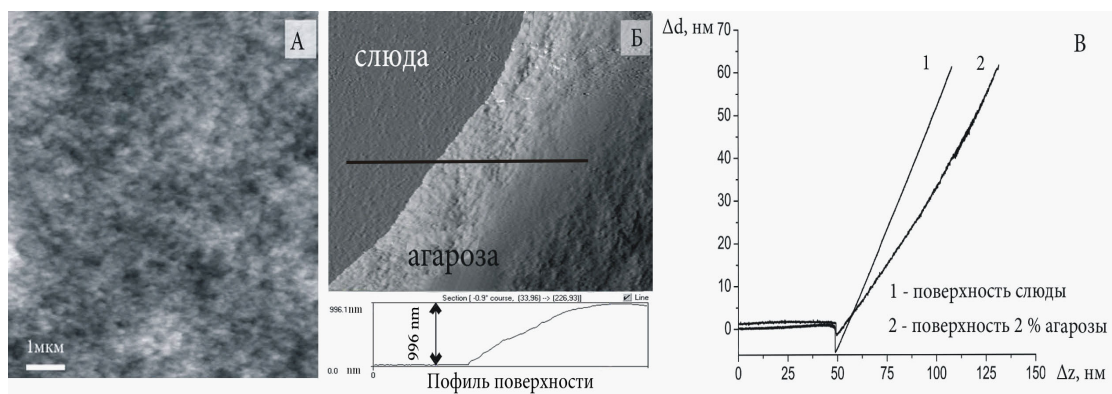


Рисунок 1. АСМ-изображение поверхности пленки 2 % агарозы (А), ее краевого участка с профилем поверхности (Б), а также кривые подвода (В), характеризующие упруго-механические свойства исследуемых поверхностей

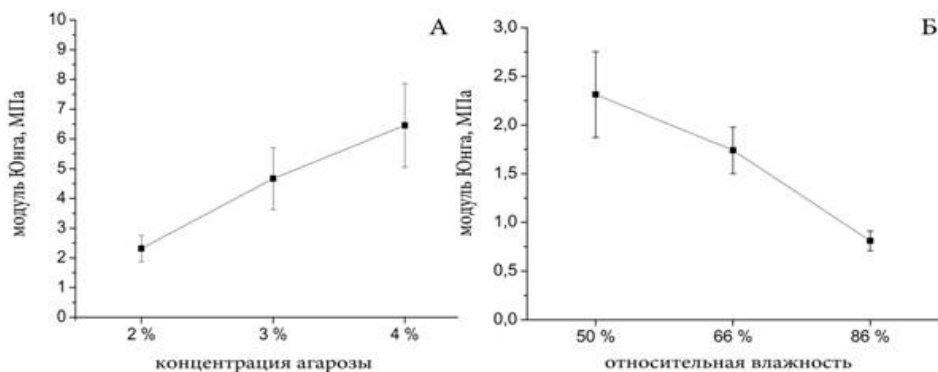


Рисунок 2. Упруго-механические свойства полимерных пленок с различными концентрациями агарозы (при о.в. 50 %; А) и относительной влажности ее формирования (на примере 2 % агарозы; Б)

розы, по своим количественным параметрам находящимся в характерном для микроорганизмов диапазоне значений [6]. Вторым важным обстоятельством представляется зависимость упруго-механических параметров используемых полимерных пленок от относительной влажности среды, аналогичная таковой, ранее продемон-

стрированной и для бактерий [7]. Сказанное определяет перспективу применения агарозных пленок в качестве тестового материала при подготовке атомно-силового микроскопа к исследованию упруго-механических свойств бактериальных клеток с соблюдением названных условий для подобного использования.

1.01.2011

Список литературы:

1. Allison D. P., Mortensen N. P., Sullivan C. J. Atomic force microscopy of biological samples // WIREs Nanomedicine and Nanobiotechnology. – 2010. – V.2. – P. 618-634.
2. Gaboriaud F., Dufrene Y.F. Atomic force microscopy of microbial cells: application to nanomechanical properties, surface forces and molecular recognition forces // Colloids and Surfaces B: Biointerfaces. – 2007. – №. 54.-P. 10–19.
3. Cerf A., Cau J., Vieu C. Nanomechanical properties of dead or alive single-patterned bacteria // Langmuir. – 2009. – V.25. – №.10. – P. 5731-5736.
4. Passeri D., Bettucci A., Biagioni A. Quantitative measurement of indentation hardness and modulus of compliant materials by atomic force microscopy // Review of scientific instruments. – 2008. – №.79. – P. 1-3.
5. Hertz H. Uber die Berührung Fester Elastischer Korper (On the Contact of Elastic Solids) // J. Reine Angew. – 1881. – № 92. – S. 156-171.
6. Vadillo-Rodríguez V., Dutcher J.R. Viscoelasticity of the bacterial cell envelope // Soft Matter. – 2011. – V. 7. – P. 4101 – 4110.
7. Nikiyan H.N., Vasilchenko A.S., Deryabin D.G. Humidity-dependent bacterial cells functional morphometry investigations using atomic force microscope // Int. J. Microbiol. – 2010. – doi:10.1155/2010/704170.

Сведения об авторах:

Васильченко Алексей Сергеевич, ведущий программист кафедры биохимической физики
Оренбургского государственного университета, e-mail: avasilchenko@gmail.com

Никиян Айк Николаевич, доцент кафедры биохимической физики
Оренбургского государственного университета, кандидат физико-математических наук,
e-mail: nikiyan@yahoo.com

Дерябин Дмитрий Геннадьевич, заведующий кафедрой микробиологии
Оренбургского государственного университета, доктор медицинских наук, профессор,
e-mail: dgderyabin@yandex.ru
460018, г. Оренбург, пр-т Победы, 13

UDC 53.082.17:53.089.68:681.723.25

Vasilchenko A.S., Nikiyan H.N., Deryabin D.G.

THE USE OF AGAROSE FILMS AS MODEL STRUCTURES FOR ATOMIC FORCE MICROSCOPE PREPARATION FOR FURTHER STUDY OF THE ELASTIC PROPERTIES OF BACTERIAL CELLS

Elastic properties of agarose films depending on the concentration and relative humidity of the samples environment were quantitatively characterized using atomic force microscopy in force spectroscopy mode. The results are discussed in the context of agarose films use as a test reference material to prepare an atomic force microscope for the further study of the mechanical properties of bacterial cells.

Key words: atomic force microscopy, polymer films, agarose, mechanical properties, bacterial cells