

7. ИССЛЕДОВАНИЕ ПОВЕРХНОСТИ ЭРИТРОЦИТОВ МЕТОДОМ АТОМНО-СИЛОВОЙ МИКРОСКОПИИ

А. И. Юсипович, Е. Ю. Паршина

Теоретическое введение

Атомно-силовая микроскопия (АСМ) — мощный современный метод, применяемый в исследовании клеток [1]. АСМ позволяет регистрировать поверхностный рельеф клетки в нанометровом диапазоне, исследуя макромолекулы и их комплексы на поверхности мембраны, особенности примембранного цитоскелета, а также механические свойства клеточной мембраны. В то же время существует ряд особенностей метода, специфических для исследований поверхности клеток, связанных как с правильной подготовкой образца, так и с интерпретацией полученных результатов. Так, для характеристики объекта исследования, помимо детального описания полученных изображений и оценки размеров характерных элементов рельефа, удобно использовать интегральный параметр, который позволяет характеризовать рельеф клеточной поверхности и особенности примембранного цитоскелета. Таким параметром, используемым для анализа АСМ-изображений поверхности клеток, служит шероховатость, показывающая отклонение рельефа поверхности от среднего значения.

Удобным объектом для исследований методом АСМ являются эритроциты млекопитающих. В ряде работ были получены АСМ-изображения эритроцитов различной формы в норме и при патологии, исследована локальная структура поверхности клетки. В настоящее время вызывает большой интерес исследование функциональных изменений рельефа эритроцита. Было показано, что изменение величины шероховатости обнаруживается при деформации эритроцита, старении и развитии диабета, действии локальных анестетиков, электропорации эритроцита, а также при наследственном сфероцитозе и обработке цитохалазином.

В исследованиях методом АСМ, как правило, используются фиксированные или высушенные клетки. Известно, что шероховатость эритроцитов служит характеристикой функционального состояния клеток, однако не зависит от типа фиксации клеток и

одинакова для фиксированных и высушенных в мазке клеток. Было показано, что видимые на АСМ-изображениях мелкие (размером около 50 нм) глобулярные структуры на поверхности мембран – это экспонированные на поверхность клетки домены трансмембранные и примембранные белков. Крупные волнообразные структуры (>150 нм), по-видимому, отражают мембранные колебания и зависят от состояния примембранного цитоскелета.

Основы метода АСМ

АСМ представляет собой разновидность сканирующей зондовой микроскопии (СЗМ). В сканирующих зондовых микроскопах топология поверхности и ее локальные свойства исследуются с помощью наноразмерных игл или зондов [3], которые, перемещаясь по выбранному участку исследуемой поверхности образца (сканирование), взаимодействуют с каждой точкой выбранного участка. С помощью специальной системы регистрации измеряется с точностью до долей нанометра взаимодействие зонда с каждой точкой исследуемой поверхности, а прецизионное перемещение зонда относительно поверхности обычно осуществляется с помощью пьезоэлементов. К разновидностям СЗМ относят: сканирующую туннельную микроскопию, оценивающую величину туннельного тока между зондом и образцом; АСМ, наиболее распространенную в биологии и измеряющую силы притяжения и отталкивания макромолекул; электрохимическую микроскопию, оценивающую величину тока, протекающего между зондом и точкой на поверхности; магнитно-силовую микроскопию, оценивающую величину магнитного взаимодействия между зондом и поверхностью; а также микроскопию ближнего поля, являющуюся комбинацией оптической и зондовой микроскопии, в которой использование оптического зонда позволяет достичь разрешения порядка нескольких десятков нанометров.

Первый сканирующий туннельный микроскоп (СТМ) был изобретен в 1981 г. Этот метод привлек к себе широкое внимание после визуализации атомарной структуры поверхности кремния, в 1986 г. за него была присуждена Нобелевская премия [3]. Наибольшее распространение получили методы сканирующей туннельной микроскопии (применение ограничено только проводящими поверхностями) и АСМ (подходит для биологических объектов).

АСМ позволяет получать изображения объектов размерами от десятых долей нанометров до десятков микрон. АСМ достаточно успешно используется для получения изображений и оценки свойств различных биологических объектов: кристаллов аминокислот, белков, клеточных мембран, молекул ДНК и других макромолекул, пленок из биополимеров, вирусов, различных клеток, тканей и т. д.

Зондом атомно-силового микроскопа служит *кантилевер* (от англ. cantilever — балка, консоль, кронштейн) [2]. Кантилевер — это микроскопическая балка с иглой на конце, изготовленная из кремния или нитрида кремния с помощью сложных физических методов. Длина балки обычно составляет 100–300 мкм, толщина 1–10 мкм, ширина 10–50 мкм. Одним концом балка закреплена на макроскопическом чипе, край которого виден на изображении (рис. 7.1а, в). Игла, расположенная на свободном конце кантилевера, имеет радиус кривизны 1–25 нм (в зависимости от типа кантилевера).

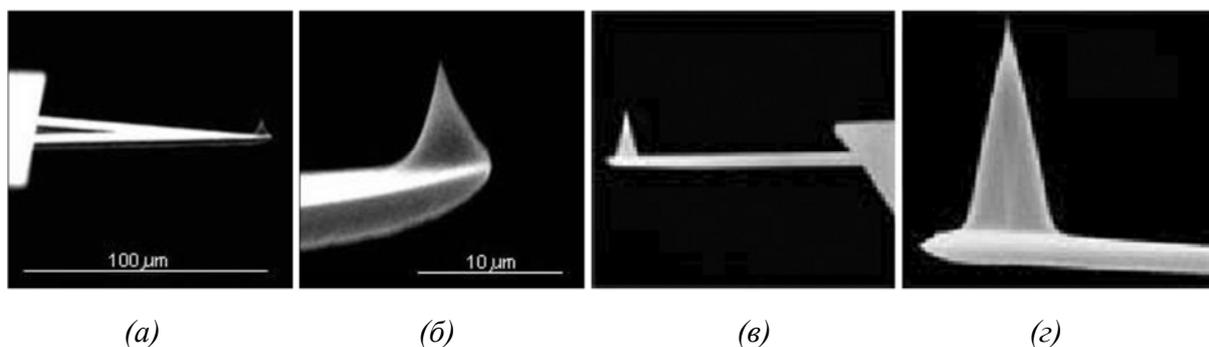


Рис. 7.1. Некоторые возможные типы зондовых датчиков, используемых в атомно-силовой микроскопии (АСМ): изображения кантилевера (а, в) и его острия (б, г), полученные на электронном микроскопе; зонд с треугольным кантилевером из нитрида кремния (а, б) и с кремниевым кантилевером в виде балки прямоугольного сечения (в, г) [2, 3].

Когда игла встречает на поверхности выступ, кантилевер отклоняется вверх, когда впадину — отклоняется вниз. Чтобы отслеживать малые отклонения кантилевера от положения равновесия, используется лазерно-оптическая система (рис. 7.2). На кантилевер направляют лазерный луч: он отражается от балки и после отражения попадает на детектор — фотодиод. Лазерно-оптическая система позволяет зарегистрировать смещения на уровне 1 \AA и даже менее. Для того чтобы улучшить

отражающие свойства кантилевера, его отражающую поверхность покрывают слоем металла, обычно золота или алюминия.

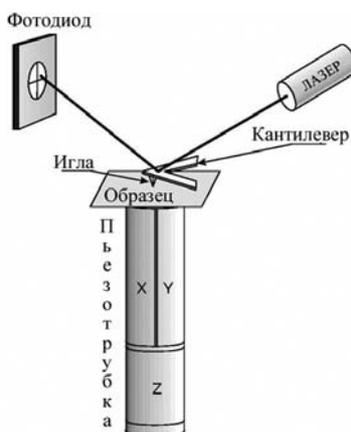


Рис. 7.2. Схема АСМ, образец закреплен на пьезотрубке [2]

Как и в других СЗМ, для относительного перемещения кантилевера и образца в методе АСМ используются пьезосканеры. Пьезосканер представляет собой трубку из пьезоактивного материала, на поверхность которой нанесены электроды. При приложении напряжения к электродам наблюдается деформация трубки, что приводит к перемещению образца относительно кантилевера. Посредством перемещение вдоль осей X и Y — осуществляется процесс сканирования. Схема устройства, в котором образец перемещается относительно кантилевера, показана на рис. 7.2. Возможен и другой вариант, когда на пьезотрубке размещен держатель кантилевера. В современных микроскопах, как правило, используются два сканера: может перемещаться и кантилевер, и образец.

Важным звеном в формировании АСМ-изображения служит система обратной связи. Она позволяет перемещать кантилевер над образцом таким образом, чтобы его отклонение было постоянным. Если на пути кантилевера встречается выступ образца, то кантилевер отклоняется вверх, что приводит к изменению положения пятна лазера на фотодиоде и на пьезотрубку подается сигнал, вызывающий увеличение расстояния между кантилевером и образцом. Обратное происходит при появлении на пути движения

кантилевера впадины образца. Регистрируемое АСМ-изображение представляет собой запись перемещений пьезосканера по оси Z, откалиброванной в единицах длины.

Режимы работы АСМ

Отклонение кантилевера пропорционально величине взаимодействия атомов (силы Ван-дер-Ваальса) зонда и образца, а также воздействию электричества, магнитного поля, трения и т. д. На малых расстояниях (порядка 1 \AA) между острием зонда и атомами образца возникают силы отталкивания, на больших — силы притяжения.

Существует несколько групп методик проведения измерений с помощью АСМ: контактные, полуконтактные (с прерывистым контактом) и бесконтактные (рис. 7.3).

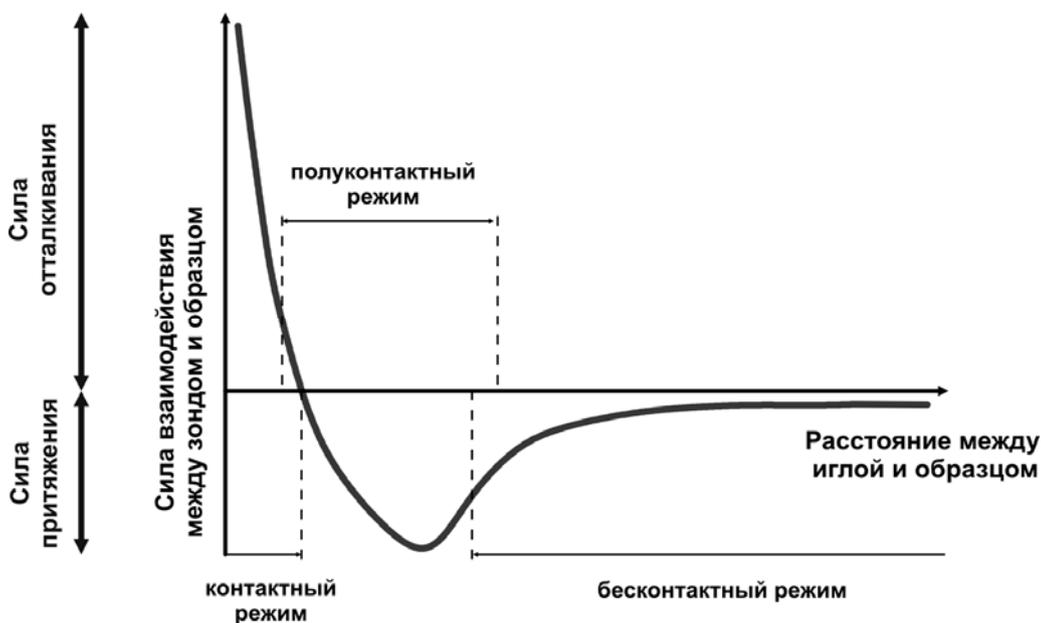


Рис. 7.3. Типичная зависимость силы взаимодействия от расстояния между острием зонда и поверхностью образца. На рисунке указаны участки кривой, относящиеся к различным режимам работы атомно-силового микроскопа.

Контактный режим АСМ. При контактном режиме работы микроскопа определяющей является сила отталкивания между образцом и острием зонда, а отклонения кантилевера отражают рельеф поверхности. В контактном режиме зонд непосредственно взаимодействует с поверхностью образца (рис. 7.4) и сканирует поверхность образца, находясь в непосредственном контакте с ней. При этом в зависимости от рельефа поверхности меняется изгиб кантилевера. Оператором задается некоторый изгиб кантилевера, который отвечает определенному значению сигнала с фотодетектора (DFL setpoint). Система обратной связи в каждой точки поверхности (x, y) образца поддерживает постоянное значение этого изгиба с помощью вертикального (по оси z) движения сканера (см. рис. 7.4). Тем самым сила взаимодействия между зондом и образцом всегда остается постоянной и равной $-kx$, где k — коэффициент жесткости кантилевера, а x — изгиб кантилевера. Обычно сила взаимодействия зонда с образцом составляет от нескольких наноньютонов до нескольких десятков наноньютонов.

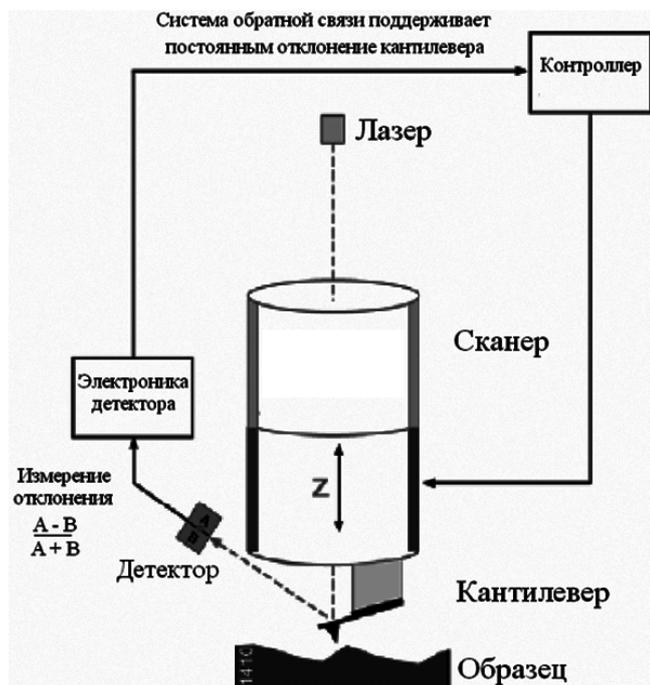


Рис. 7.4. Система обратной связи, поддерживающая постоянное отклонение кантилевера в контактном режиме атомно-силового микроскопа [2]

Если бы обратная связь работала идеально, без задержки, то в процессе сканирования кантилевер не совершал бы отклонений, и сила взаимодействия между зондом и образцом была бы строго постоянна. В реальных экспериментах отклонение кантилевера изменяется при регистрации изменений рельефа. Если в каждой точке записывать не только положение пьезотрубки, но и отклонение кантилевера, то мы получим пару изображений (Sens Height и DFL). Второе изображение отражает перепады рельефа и позволяет выявить мелкие детали, которые могут быть не видны на карте высот.

Контактный режим АСМ обладает рядом преимуществ перед другими режимами. Он позволяет сканировать поверхность с высокой скоростью, что важно, например, при изучении протекания некоторых процессов в реальном времени. Кроме того, образцы со значительными вертикальными изменениями топографии проще всего сканировать именно в контактном режиме. Только в контактном режиме можно достичь атомарного разрешения исследуемой поверхности.

Однако этот режим имеет и существенные недостатки: постоянный контакт зонда с поверхностью при их относительном движении приводит к возникновению сил трения. На взаимодействие зонда с образцом влияют капиллярные силы от абсорбированного на образце слоя жидкости. Сильное взаимодействие зонда с образцом может привести к повреждению образца, поэтому биологические образцы обычно снимаются с помощью кантилеверов с малыми коэффициентами жесткости и с относительно невысокими линейными скоростями сканирования.

Полуконтактный режим АСМ. При полуконтактном режиме взаимодействие зонда с поверхностью образца непостоянно и только в течение короткого периода зонд «ощущает» отталкивающие его силы. В кантилевере можно возбудить механические колебания на его резонансной частоте. Для этого в держателе кантилевера устанавливают пластину пьезокерамики, на которую подают переменное напряжение. Она создает колебания, которые через чип передаются на зонд, и по амплитуде колебаний луча на фотодиоде можно судить о колебаниях кантилевера. Когда кантилевер подводится к образцу, из-за взаимодействия с поверхностью амплитуда его колебаний уменьшается. Затем сканирование осуществляется так, чтобы амплитуда колебаний оставалась постоянной (Mag setpoint). Принцип действия обратной связи остается тем же, что и при сканировании в контактном режиме, но в данном случае поддерживается постоянным не

отклонение кантилевера, а амплитуда его колебаний (рис. 7.5). В данном случае тонкие перепады рельефа будут отражать изображение Mag , в то время как собственной рельеф (как и в случае контактного режима) — Sens Height. Обычно резонансная частота кантилевера для полуконтактного режима сканирования составляет 100–300 кГц. Воздействие кантилевера на образец при этом существенно ниже, чем при контактном режиме, и объект исследования повреждается в меньшей степени.

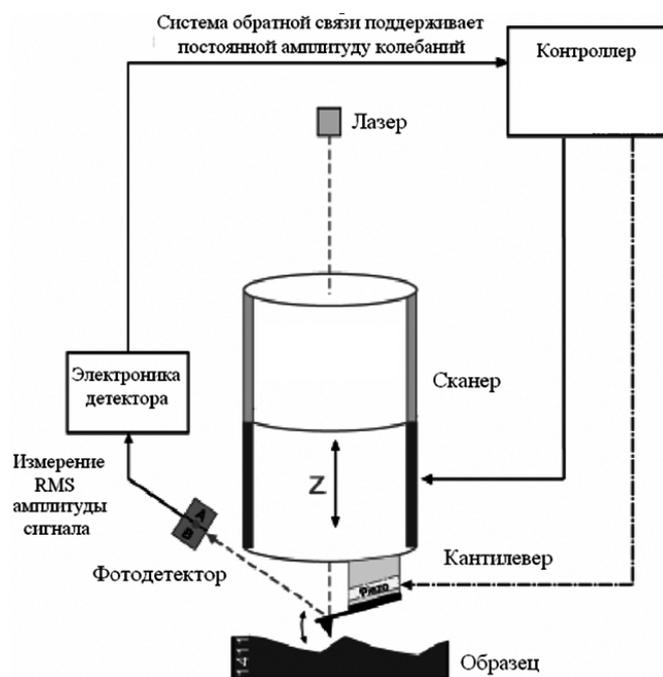


Рис. 7.5. Система обратной связи, поддерживающая постоянную амплитуду колебаний кантилевера в режиме прерывистого контакта атомно-силового микроскопа [2]

В настоящее время для работы с биологическими объектами используют различные разновидности полуконтактных методов или контактные методы, в которых используют специальные гибкие кантилеверы. Обычные кантилеверы имеют довольно высокий коэффициент жесткости, порядка 20–100 Н/м, поэтому крайне редко используются для изучения биологических объектов. Треугольные кантилеверы из нитрида кремния, наоборот, обладают довольно малыми коэффициентами жесткости (0,06–0,58 Н/м) и чаще всего используются для изучения биологических объектов, как в контактном, так и в полуконтактном режиме, а также в режиме прерывистого контакта. При использовании

таких методов по сравнению с обычными контактными методами, давление кантилевера на поверхность образца существенно меньше или отсутствует, что позволяет успешно работать с биологическим объектом.

Экспериментальная часть

Цель работы

Исследование поверхностного рельефа эритроцитов млекопитающих с помощью метода АСМ. В ходе работы предполагается изучение теоретических основ метода АСМ, приобретение некоторых практических навыков работы на атомно-силовом микроскопе, а также изучение основных подходов к обработке и анализу изображений, полученных методом АСМ, предварительная обработка полученных изображений и вычисление параметров шероховатости, характеризующих структуру белков поверхности и цитоскелет эритроцитов.

Порядок выполнения работы

1. *Приготовление образцов.* Измерения осуществляются на фиксированных образцах эритроцитов, полученных из крови крыс. Для получения препарата фиксированных эритроцитов фиксацию осуществляют согласно модифицированной методике, без фиксации образца в 1%-й четырехокиси осмия и последующего обезвоживания. Используемая методика фиксации позволяет получать устойчивые морфологические формы эритроцитов. Кровь разводят в 200 раз в физиологическом растворе, затем проводят фиксацию клеток глутаровым альдегидом (Sigma, США) (конечная концентрация 0,5%). Полученную суспензию инкубируют в течение 1 часа при комнатной температуре, после чего удаляют глутаровый альдегид четырехкратным центрифугированием в бидистиллированной воде в течение 5 мин при 1000 g. Промытые фиксированные эритроциты наносят на предметные стекла в один слой и высушивают в течение 24 ч при комнатной температуре.

2. *Проведение измерений методом АСМ.* Изображение клеток получают при помощи атомно-силового микроскопа, входящего в состав комплекса NTEGRA SPECTRA — сканирующей головки Солвер ПРО-М (НТ-МДТ, Россия). Сканирование производят в полуконтактном режиме с использованием кантилеверов NSG 10-A, с характерной жесткостью 11,8 Н/м и радиусом кривизны зонда 10 нм. Сканирование проводят в области 20×20 мкм или 1×1 мкм (256×256 точек) (сканирование столиком, или образцом) при частоте сканирования 0,5–1 Гц. Изображения регистрируют при помощи программного обеспечения Nova (НТ-МДТ, Россия). Измерения проводят в присутствии и под контролем преподавателя. При проведении измерений необходимо выполнить следующие операции.

1) Поместить объект на предметный столик, произвести настройку сканирующей головки АСМ, резонансной частоты кантилевера (для полуконтактного режима). Определить значение SetPoint, подвести кантилевер к образцу и выбрать объект для исследования. Все манипуляции проводятся с участием преподавателя.

2) Выбрать участок для сканирования и зарегистрировать в полуконтактном режиме изображение одной или нескольких клеток. Размер участка — около 10–20 мкм, частота сканирования 0,5–1 Гц. Регистрируемые параметры — SensHeight, Mag.

3) На поверхности клетки выбрать наиболее плоский участок и зарегистрировать изображение размером 1×1 мкм, позволяющее получить более детальную информацию о поверхности мембраны эритроцита. Повторить измерения на той же клетке 2–3 раза. Повторить измерения для 2–3 разных клеток.

4) Рассмотреть полученные изображения и выявить типичные артефакты измерения методом АСМ.

5) Произвести обработку полученных изображений в программе NOVA (НТ-МДТ, Россия).

3. *Обработка результатов.* Обработка АСМ изображений производится при помощи любой программы для обработки изображений, совместимых с файлами формата *.mdt программы Nova (НТ-МДТ, Россия), в котором записываются исходные изображения. Рекомендуется использовать программы Image Analysis (НТ-МДТ, Россия) версии 3.5 и выше или SPIP (Image Metrology, Дания).

При обработке полученных изображений следует применять следующий алгоритм:

- а) устранить артефакты изображения, обусловленные некорректным взаимодействием иглы кантилевера и сканируемого объекта;
- б) выровнять изображение (вычитание фона);
- в) разделение исходного изображения на два – одного содержащего объекты больше 150 нм и второго содержащего объекты размером менее 150 нм (выполняется, например, с использованием Фурье фильтров);
- г) оценка величины шероховатости (используя параметр средняя шероховатость, S_a) для обоих изображений.

В **Приложении** приведен пример выполнения обработки АСМ изображения участка поверхности эритроцита с использованием программы Image Analysis 3.5 (НТ-МДТ, Россия).

4. *Содержание отчета к задаче.* В отчете к задаче, помимо краткой теоретической части, должны быть представлены: АСМ изображение эритроцита, исходное необработанное изображение участка эритроцита размером 1x1 мкм, изображение этого участка с удаленными артефактами сканирования и вычтенным фоном, а также два варианта этого изображения с удаленными артефактами сканирования и вычтенным фоном, содержащие содержащего объекты только больше 150 нм и только меньше 150 нм. Для последних двух изображений также должны быть указаны величины средней шероховатости. По результатам проделанной работы должны быть сделаны выводы.

Вопросы

1. В чем заключаются основные принципы метода АСМ?
2. Каковы особенности применения метода АСМ в биологии?
3. Отличия контактных и бесконтактных методов измерения в АСМ?
4. Какие параметры клеток можно измерить методом АСМ?
5. Каков физический смысл параметра шероховатости и как он рассчитывается?

Литература

1. Atomic force microscopy comes of age / L. W. Francis [et al.]. — Biol. Cell. — 2009. — Vol. 102. — P. 133–143.
2. Колесов, Д. В. Кантилеверы для сканирующей зондовой микроскопии / Д. В. Колесов, И. В. Яминский // Нано- и микросистемная техника. — 2007. — № 11 (86). — с. 5–11.
3. Миронов, В. Л. Основы сканирующей зондовой микроскопии: учебное пособие для студентов старших курсов высших учебных заведений / В. Л. Миронов. — Нижний Новгород: Институт физики микроструктур РАН, 2004.
4. Нанобиотехнологии: практикум / А. М. Абатурова [и др.]; под ред. А. Б. Рубина. — М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2012. — Задачи 1.6, 2.1, 3.3.
5. Сайт компании ЗАО «Нанотехнология МДТ» [Электронный ресурс]. — М.: NT-MDT, 1998 – . — Режим доступа: www.ntmdt.ru, свободный. — Загл. с экрана.

Приложение. Обработка АСМ изображения участка поверхности эритроцита с использованием программы Image Analysis 3.5

Обработка АСМ изображений производится при помощи программы Image Analysis версии 3,5 (НТ-МДТ, Россия).

Для того чтобы выбрать изображение для обработки используйте команду меню File-Open (в нашем случае roughness_hyper_20110228.mdt).

Окно программы Image Analysis разделено на три части (размер которых можно менять): в левой находятся все изображения из данного файла, в центральной — выбранное при помощи курсора изображение, в нашем случае 7.SensHeight (рис. 7.6).

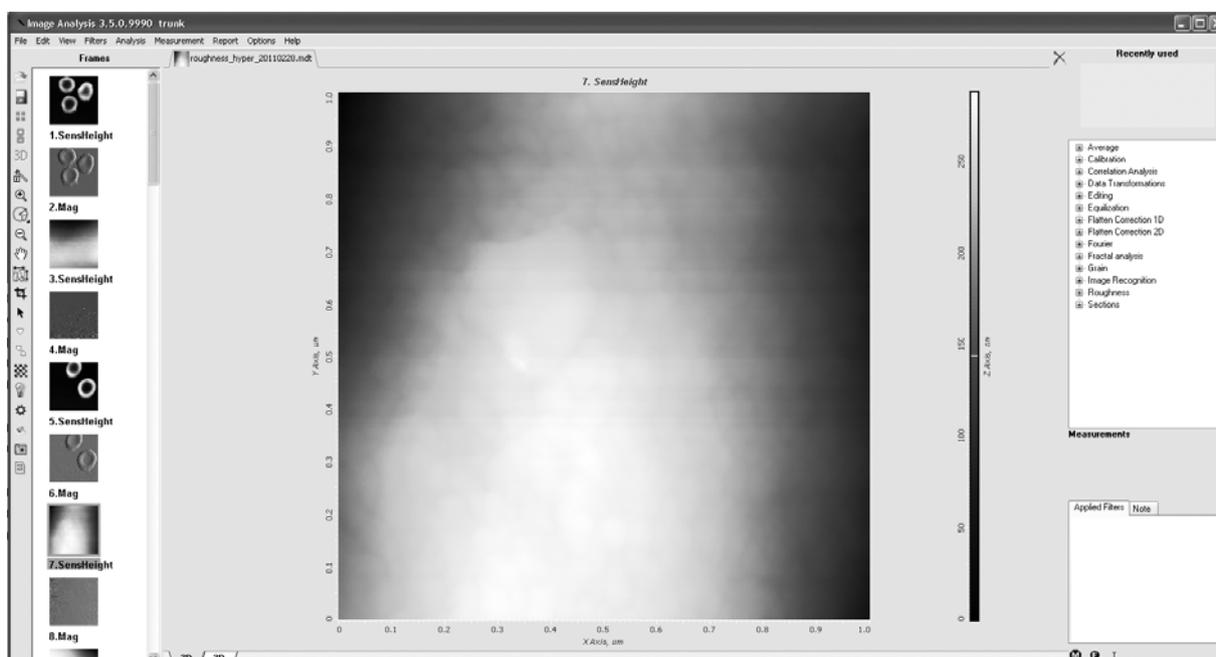


Рис. 7.6. Выбор изображения для обработки

Для обработки изображения используется набор команд из раздела меню Analysis в центральной части окна или аналогичный набор команд из правой части окна (рис. 7.6).

Также с использованием этих команд возможно определение числовых значений в точке, увеличение и уменьшение изображения, получение профилей изображения, изменение цветовой схемы, построение трехмерной шкалы и другие функции (не требуются для настоящей выполнения задачи).

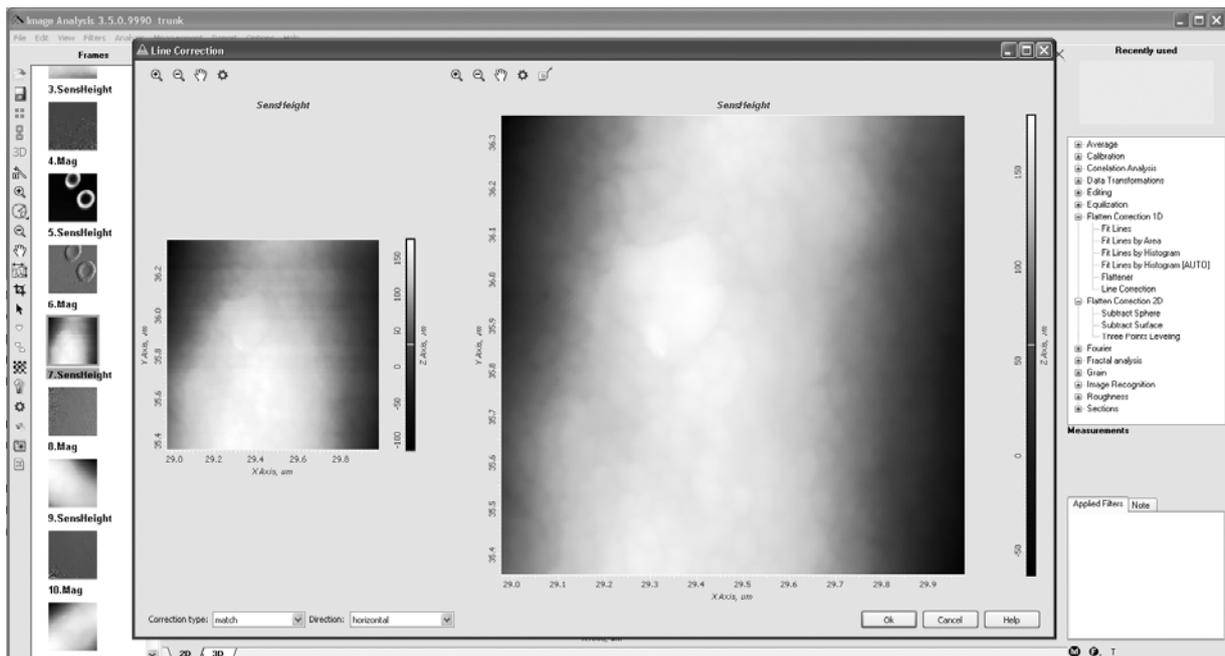
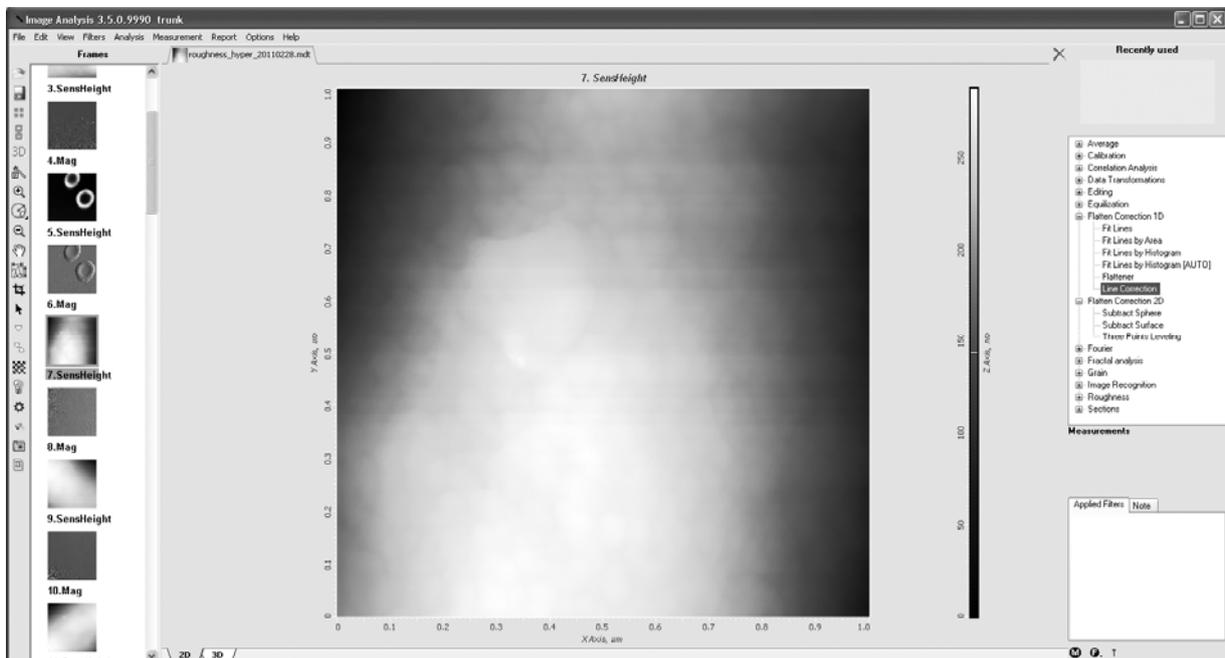


Рис. 7.7. Устранение артефактов изображения, обусловленных некорректным взаимодействием иглы кантилевера и сканируемого объекта

Для устранения дефектов изображения, обусловленные некорректным взаимодействием иглы кантилевера и сканируемого объекта. необходимо в правой части

нового окна необходимо выбрать опцию: Flatten Correction 1D и затем Line Correction (рис. 7.7а), а затем быстро нажать на нее 2 раза. В новом открывшемся окне необходимо установить опции Correction type и Direction как *match* и *horizontal*, соответственно, затем нажать кнопку ОК (рис. 7.7б).

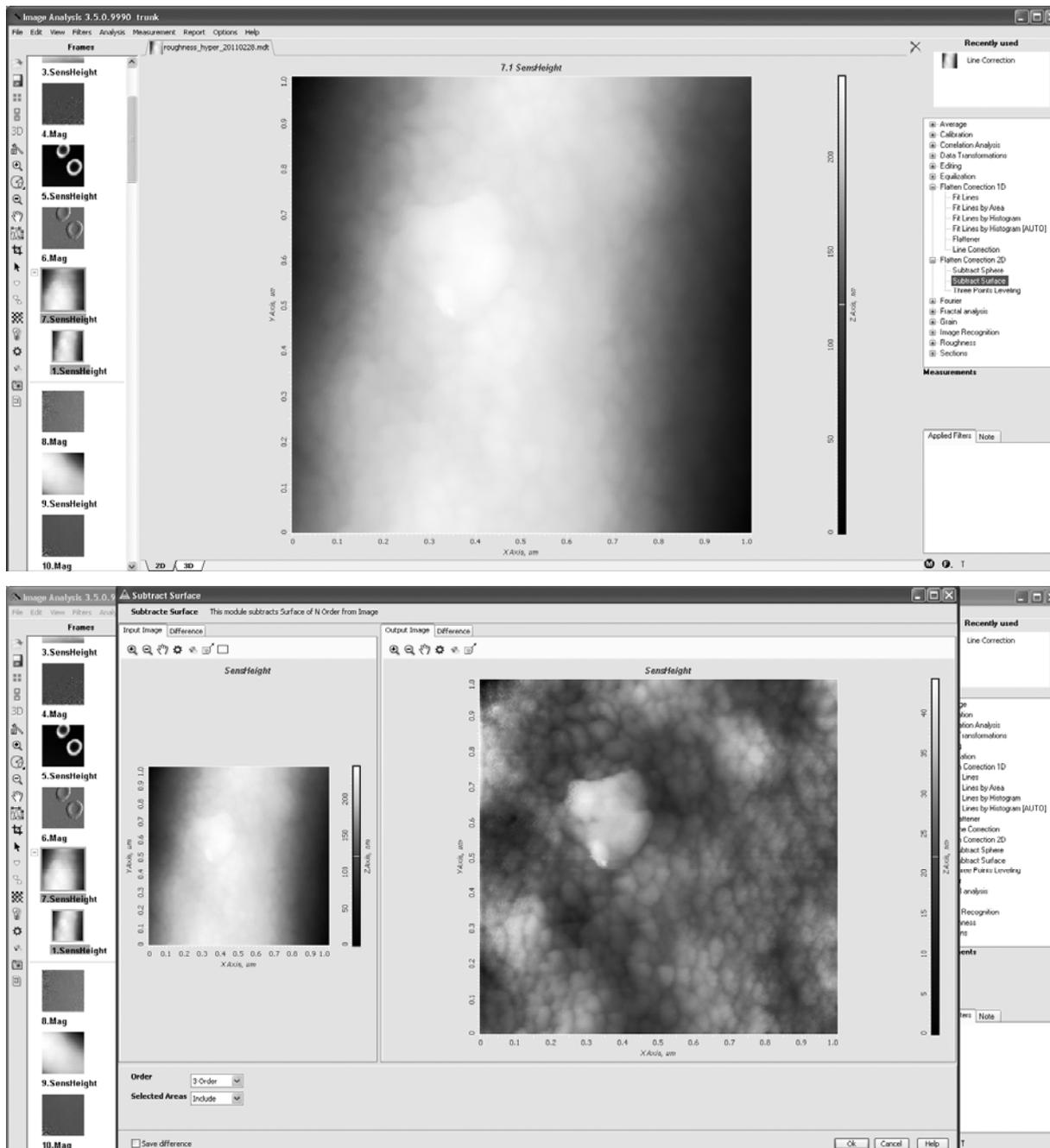


Рис. 7.8. Вычитание фона

Обратите внимание! Результат обработке представлен как новое изображение (subframe 1. SensHeight). Это сделано для сохранения исходных изображений. В дальнейшем обработка должна осуществляться с новым изображением, что осуществляется программой по умолчанию.

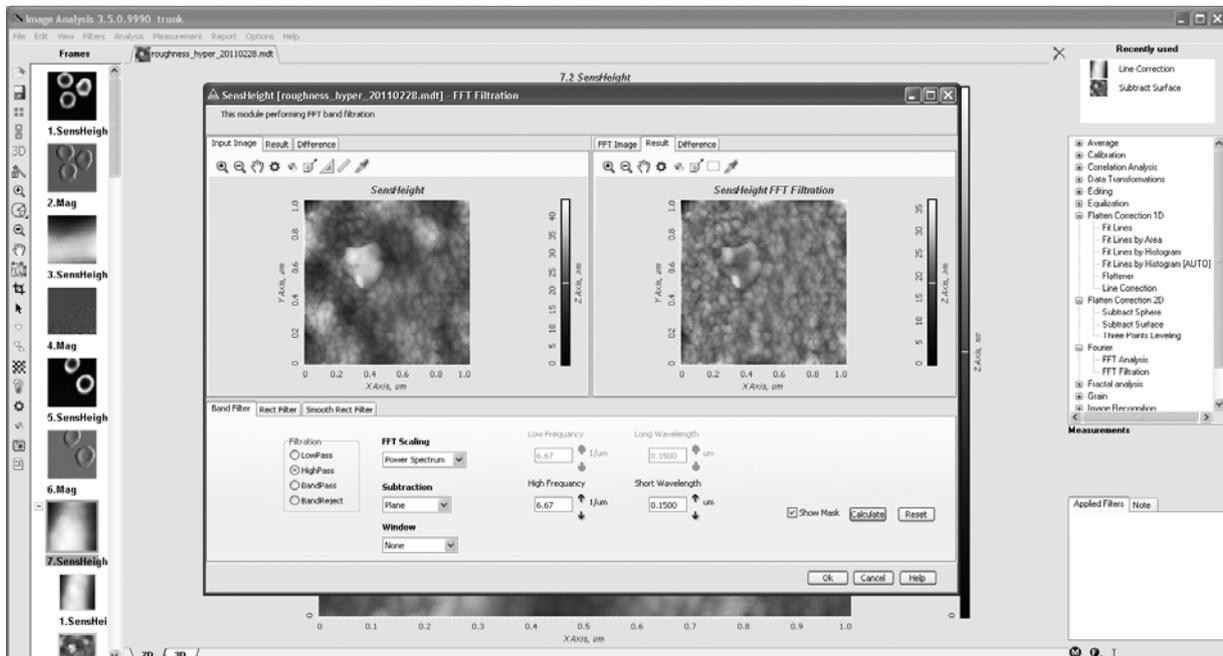
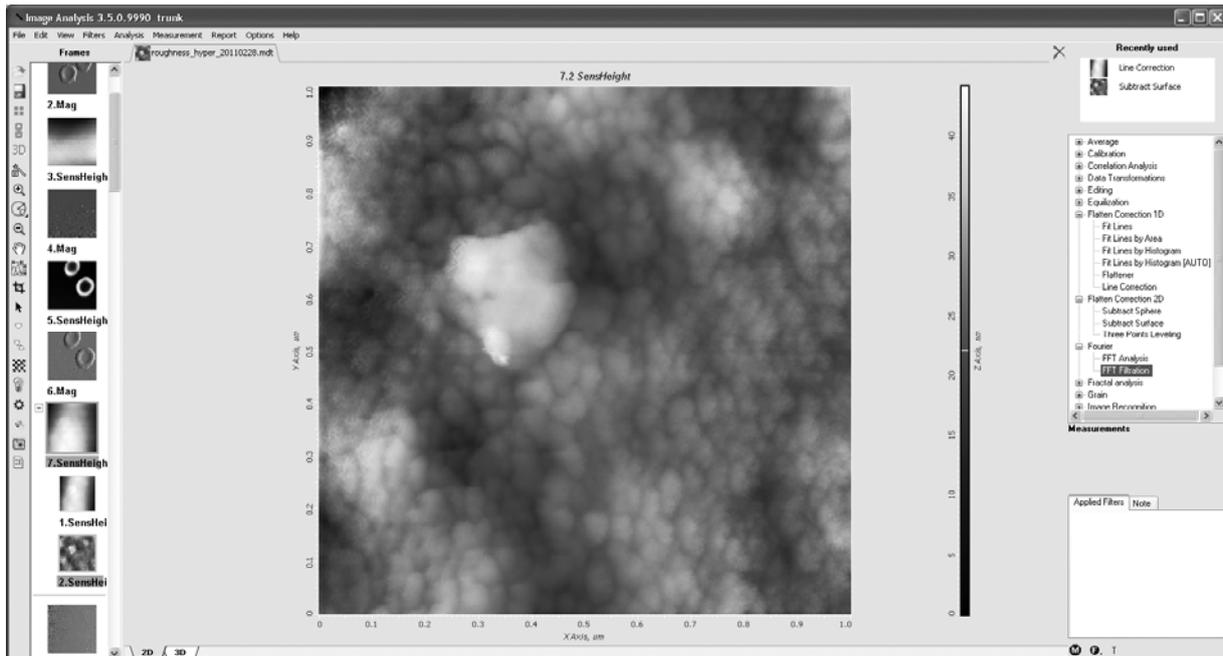


Рис. 7.9. Использование Фурье фильтра

Для оценки шероховатости необходимо вычесть фон. Для этого в правой части окна необходимо выбрать опцию: Flatten Correction 2D и затем Subtract Surface (рис. 7.8а) , а затем быстро нажать на нее 2 раза. В новом открывшемся окне необходимо установить опцию Order как 3 *Order* и затем нажать кнопку ОК (рис. 7.8б). Полученный результат появится в окне рядом с исходным изображением.

Для разделение исходного изображения на два – одного содержащего объекты больше 150 нм и второго содержащего объекты размером менее 150 нм необходимо провести Фурье-фильтрацию изображений, с помощью которой можно исключить из изображения ненужные объекты. Для этого необходимо в левой части окна перейти к изображению с удаленными артефактами сканирования и вычтенным фоном (в нашем случае subframe 2. SensHeight), выбрать в правой части окна опцию Fourier, затем, в открывшемся подменю, выбрать опцию FFT Filtration (рис. 7.9а) и быстро нажать на нее 2 раза. Новое открывшееся окно разделено на три части: левую, правую и нижнюю (рис. 7.9б). Вам необходимо выбрать в левой части окна пункт Input Image (исходное изображение), в правой Result (результат обработки), а в нижней установить следующие опции обработки: Filtration (тип фильтрации) – *Highpass*; High Frequency – $6.67 \text{ 1/}\mu\text{m}$ и Short Wavelength – $0.1500 \mu\text{m}$ (указываем максимальный размеры объектов, которые не будут удаляться при фильтрации, в нашем случае это 150 нм). Затем нажать кнопку Calculate и ОК. Далее, выбрать в левой части окна результат фильтрации - изображение содержащее только маленькие объекты (в нашем случае subframe 7.4 SensHeight FFT Filtration). Результат вычитания фильтрованного изображения из исходного содержит только частицы крупного размера, в программе Image Analysis данная процедура производится автоматически (в нашем случае subframe 7.5 SensHeight Difference).

Для оценки величины шероховатости используется параметр Average Roughness (средняя шероховатость), S_a , представляющий собой среднее арифметическое абсолютных значений отклонений высоты, z , от поверхности:

$$S_a = \frac{1}{MN} \sum_{k=0}^{M-1} \sum_{l=0}^{N-1} |z(x_k, y_l)|$$

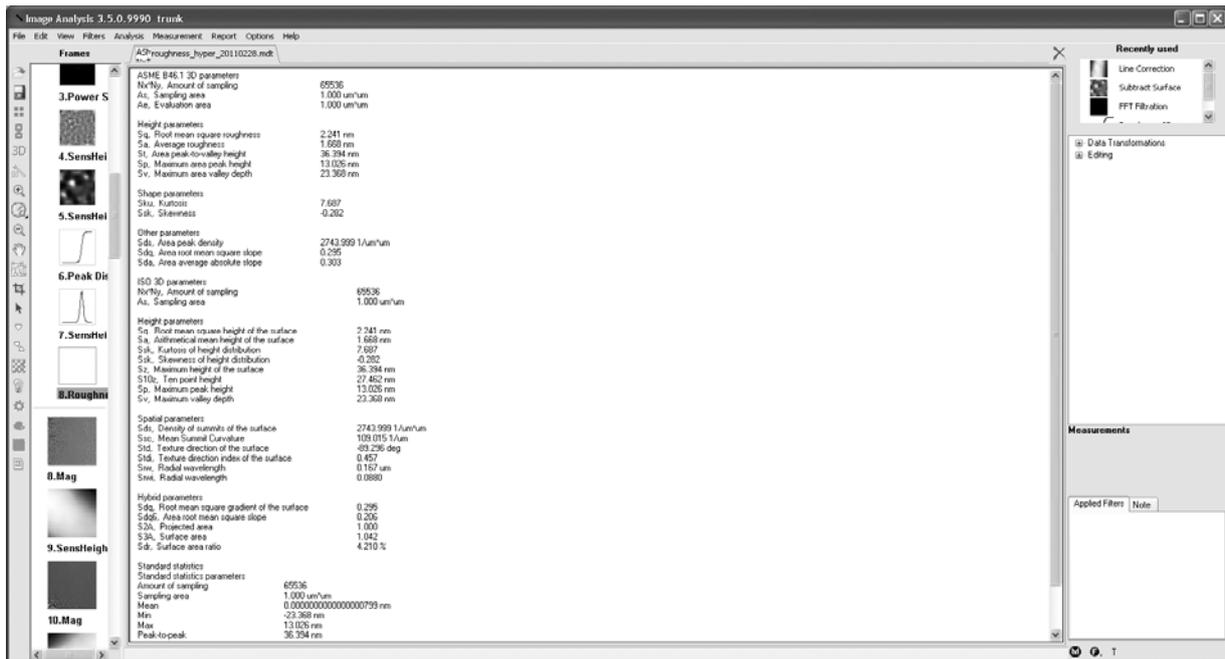
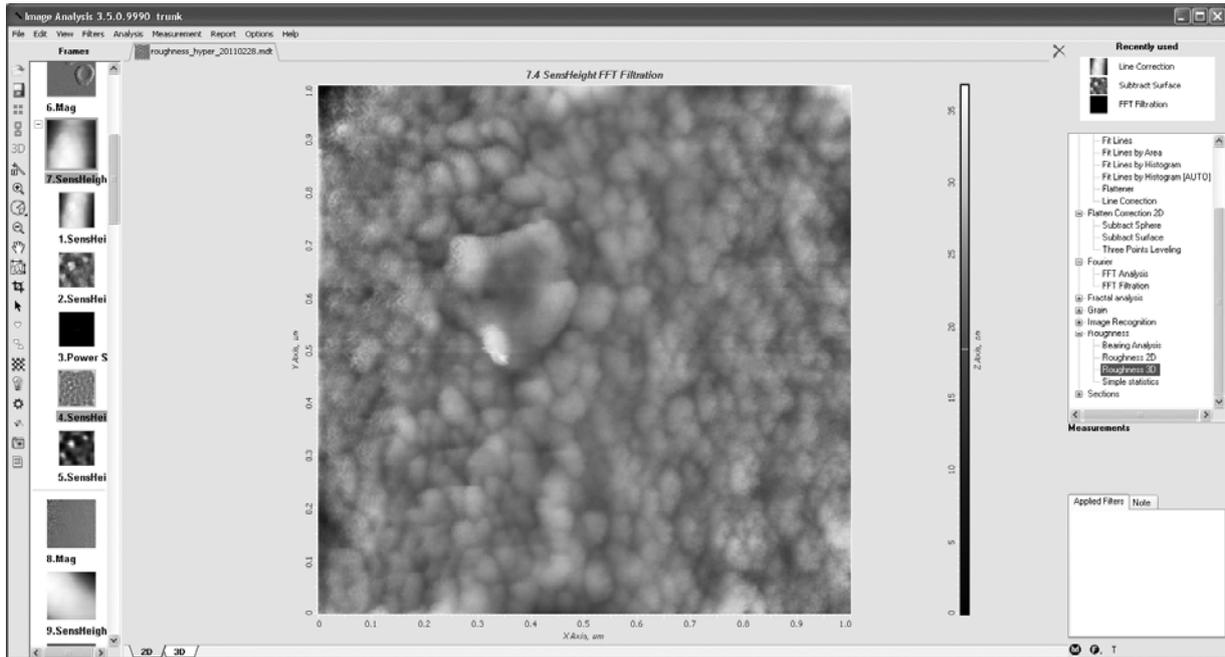


Рис. 7.10. Оценка шероховатости

Чтобы оценить эту величину необходимо выбрать в левой части окна интересующее нас изображение (в нашем случае это subframe 7.4 SensHeight FFT Filtration), затем в правой части окна выбрать опцию Roughness, затем, в открывшемся подменю, выбрать опцию Roughness 3D (рис. 7.10а) и быстро нажать на нее 2 раза. В

новом открывшемся окне не изменять дополнительные опции обработки изображения и нажать кнопку ОК. В новом открывшемся окне (в нашем случае subframe 8. Roughness 3D) появятся рассчитанные параметры шероховатости (рис. 7.10б) В задаче оценивается только параметр средняя шероховатость, S_a , величину которого необходимо сохранить и использовать при составлении отчета к задаче.

Аналогично рассчитывается шероховатость и для другого изображения (в нашем случае subframe 7.5 SensHeight Difference).

Чтобы сохранить изображение необходимо выбрать необходимое нам изображение в левой части окна программы при помощи левой кнопки мыши, затем в меню File основного окна программы выбрать пункт Export, а затем формат экспортируемого файла, содержащего выбранное изображение (рис. 7.11). Рекомендуем использовать .bmp формат. При нажатии на соответствующую опцию появится стандартное окно сохранения файла где можно выбрать место сохранения, название и расширение сохраняемого файла.

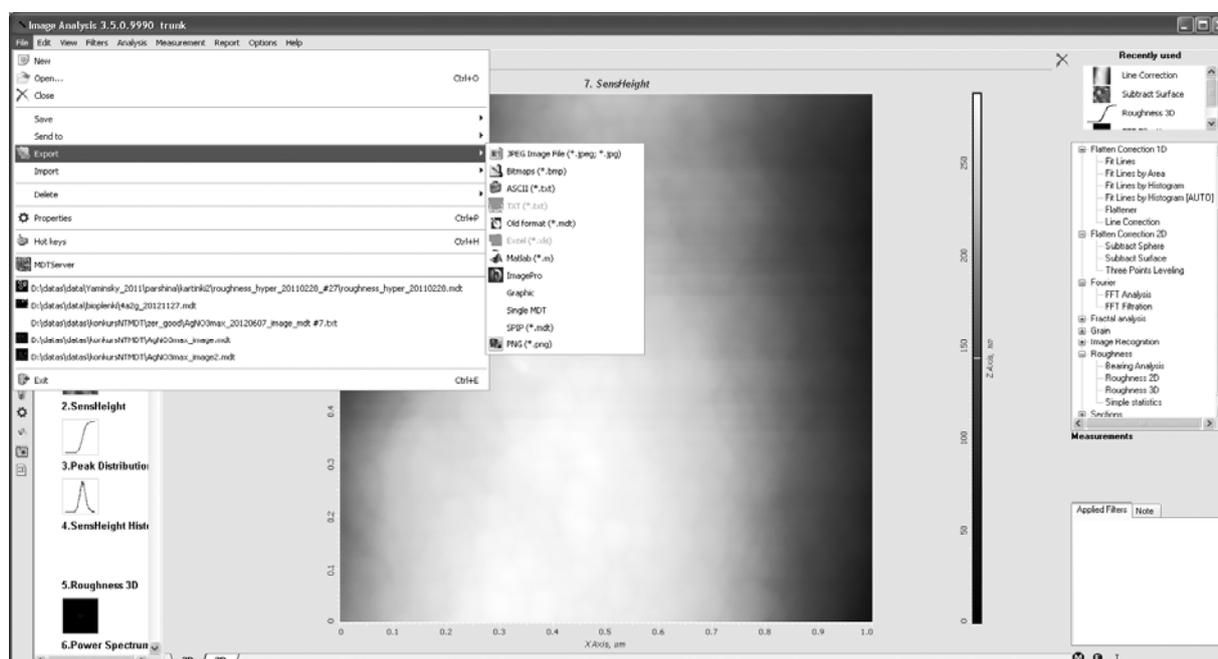


Рис. 7.11. Сохранение выбранного изображения