

УДК 577.2

В. С. Белозёров, И. В. Конышев, А. А. Бывалов

ОТРАБОТКА МЕТОДА ОЦЕНКИ СИЛ МЕЖМОЛЕКУЛЯРНОГО ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ НА МОДЕЛЬНОЙ СИСТЕМЕ «МИКРОСФЕРА-МИКРОСФЕРА» С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ОПТИЧЕСКОГО ПИНЦЕТА

В статье представлены результаты отработки использования метода оптической ловушки для оценки сил взаимодействия между двумя полистироловыми микросферами разного диаметра. Микросферы большего диаметра (3 мкм) были пассивно адгезированы к горизонтальной поверхности, микросфера меньшего диаметра (1 мкм), находящаяся в лазерном луче фиксированной мощности, выполняла роль статической фазы. Сближение микрообъектов осуществлялось за счёт прецизионного смещения пьезостолика по направлению к находящейся в луче микросфере. Основными результатами проведённых исследований является разработанный алгоритм реализации указанного метода, а также введение эмпирически обоснованного критерия физического контакта двух микросфер в фазе подведения. Метод предназначен для количественной оценки силы межмолекулярного взаимодействия в системах лиганд – рецептор, бактериофаг – рецептор, антиген – антитело и др.

Ключевые слова: оптический пинцет, микросферы, квадрантный фотодетектор.

В настоящее время для изучения свойств биологических объектов на микроуровне применяется несколько биофизических подходов. Наиболее часто в этих целях используются метод магнитной ловушки, атомно-силовая микроскопия (АСМ) и метод оптической ловушки [1].

Использование первого метода, применительно к изучению молекул, ограничено возможностью неспецифической адгезии захваченной микросферы к исследуемой поверхности или к поверхности другой микросферы.

Кантилевер атомно-силового микроскопа обладает достаточно большой жёсткостью ($10\text{-}10^5$ пН·нм⁻¹) для работы в широком диапазоне определяемых сил – $10\text{-}10^4$ пН. АСМ позволяет регистрировать значительное количество сил – $10\text{-}10^4$ пН. АСМ позволяет регистрировать значительное количество отрывов на относительно небольшой площади благодаря возможности автоматического сканирования. Несмотря на эти преимущества, АСМ не позволяет определять силы менее 10 пН.

Оптическая ловушка представляет собой плотно сфокусированный лазерный луч, с помощью которого возможно захватывать в сформированную оптическую ловушку свободно диффундирующие в жидкой среде объекты, размер которых варьирует от нескольких микрометров до нескольких десятков нанометров. Жёсткость ловушки находится в диапазоне $0,005\text{-}1$ пН·нм⁻¹, что позволяет определять силы взаимодействия до 0,1 пН [1]. Этим обусловлена возможность использования оптического пинцета в микробиологических [2, 3], биофизических [4–6] и молекулярно-биологических [7, 8] исследованиях. На рисунке 1 представлена типовая схема оптического пинцета.

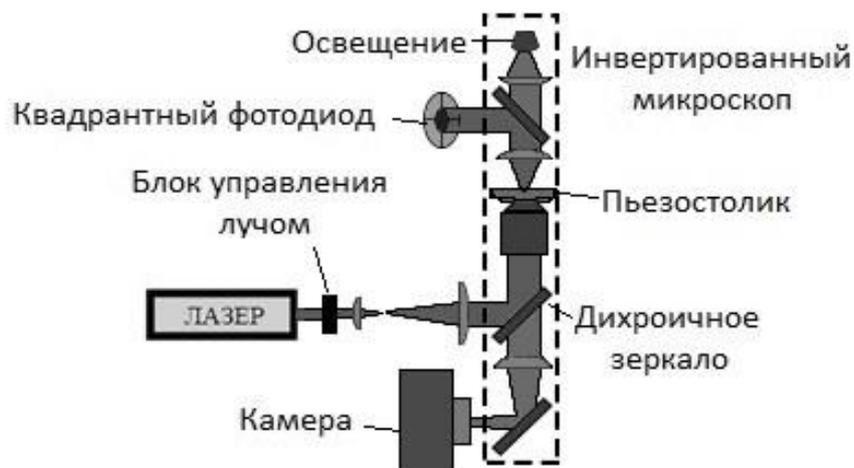


Рис. 1. Принципиальная схема устройства оптического пинцета на основе лазерной ловушки

Так как молекулы имеют слишком маленький размер для непосредственного захвата их в ловушку, обычно используют непрямую манипуляцию. Для

этого молекулы наносят на поверхность полистироловых микросфер, размер которых варьирует от 0,02 до 200 мкм.

Если фокус лазерного луча располагается точно в центре микросферы, то, благодаря симметрии системы, свет выходит с другой стороны неизменным. Если микросфера смещается в сторону от фокуса, то она отклоняет луч, проходящий через нее. Квадрантный фотодетектор (КвФД) позволяет оценить это отклонение количественно. Вследствие отклонения луча в сторону одна половина фотодиода собирает больше света, чем другая. Это приводит к изменению значений измеряемого напряжения, которое используется для определения положения частицы относительно центра лазерного луча.

Целью данной работы являлась отработка метода изучения сил межмолекулярных взаимодействий на модельной системе «микросфера - микросфера» с использованием оптического пинцета (JPK Nanotracker™ 1, Германия).

В работе использовались полистироловые микросферы (Polysciences, Inc., США) двух размеров: малые и большие диаметром 1 и 3 мкм, соответственно. В чашку «Fluorodish» (Токуо Воеке, Япония) добавляли 2,3 мл свежего фосфатного буферного раствора (ФБР), затем равномерно распределяли в растворе 1 мкл микросфер диаметром 3 мкм в концентрации 0,5% (вес/объем). Чашку инкубировали при температуре +4°C в течение 18–24 ч для полного осаждения и закрепления микросфер на дне. После инкубирования смывали слабо закрепившиеся сферы и добавляли 2,3 мл ФБР, распределяя в этом объеме 1 мкл микросфер диаметром 1 мкм в концентрации 0,5% (вес/объем). Чашку устанавливали на термостатируемый столик с постоянной температурой +37°C, при которой проводились все последующие измерения.

Для проверки неподвижности больших микросфер, прикрепившихся ко дну чашки, использовали оптическую ловушку; критерием неподвижности являлось отсутствие дрожания при прохождении луча через микросферу при мощности 1,3 кВт. Малую микросферу диаметром 1 мкм захватывали лазерным лучом при той же мощности и проводили калибровку системы с целью опреде-

ления коэффициентов чувствительности КвФД (около $30 \text{ мВ} \cdot \text{нм}^{-1}$) и жёсткости ловушки (около $0,283 \text{ пН} \cdot \text{нм}^{-1}$), необходимых для перевода вольтажного сигнала фотодетектора (мВ) в смещение (нм) и силу (пН). Определяли координаты дна чашки и изменяли положение объектива так, чтобы центр малой микросферы находился на высоте $1,5 \text{ мкм}$, то есть на половине высоты большой микросферы, и выравнивали их по оси ОУ для создания соосной конфигурации. На рисунке 2 показано расположение микросфер.

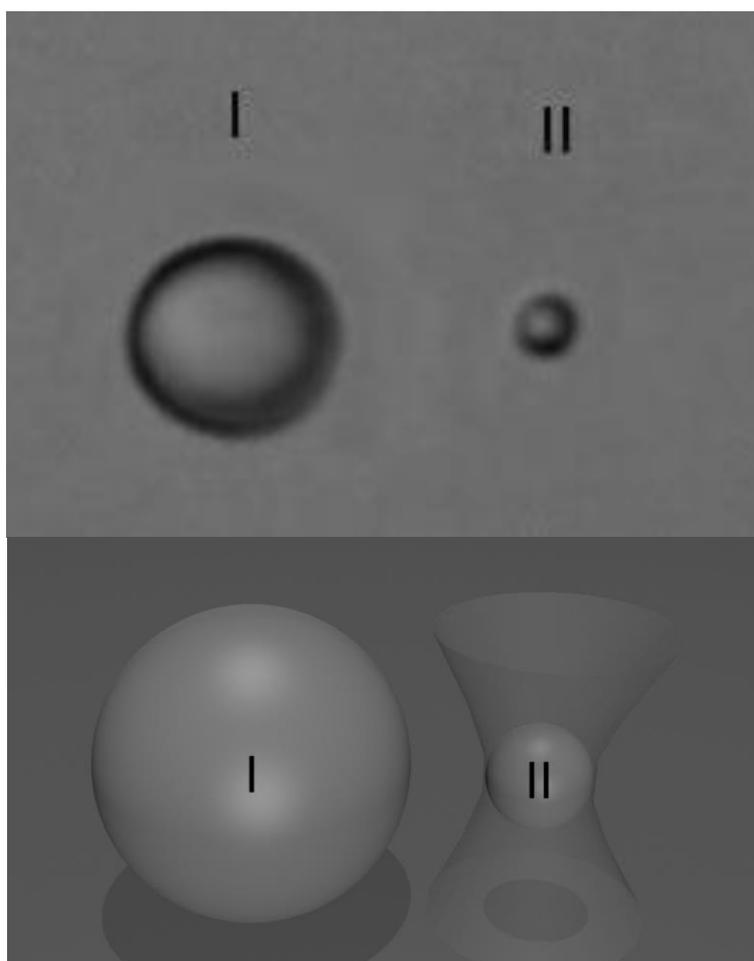


Рис. 2. Большая микросфера диаметром 3 мкм (I) закреплена на дне чашки, а малая диаметром 1 мкм (II) захвачена в ловушку

Важным этапом отработки метода оценки сил взаимодействия с использованием двух микросфер является установление момента их контакта. Если продолжить движение пьезостолика после того, как большая микросфера кос-

нётся малой, то малая микросфера будет скользить по поверхности большой, что может привести к получению некорректных результатов.

Большую микросферу при помощи пьезостолика подводили к захваченной в ловушку микросфере в ручном режиме до начала изменения сигнала фотодетектора, регистрируя пройденное столиком расстояние. Далее возвращали пьезостолик в начальное положение и повторяли процедуру подведения и отведения в автоматическом режиме с постоянной скоростью 100 нм/с, каждый раз программно увеличивая пройденное столиком расстояние на 50 нм до момента контакта микросфер. В результате был получен набор хронограмм, представленный на рисунке 3.

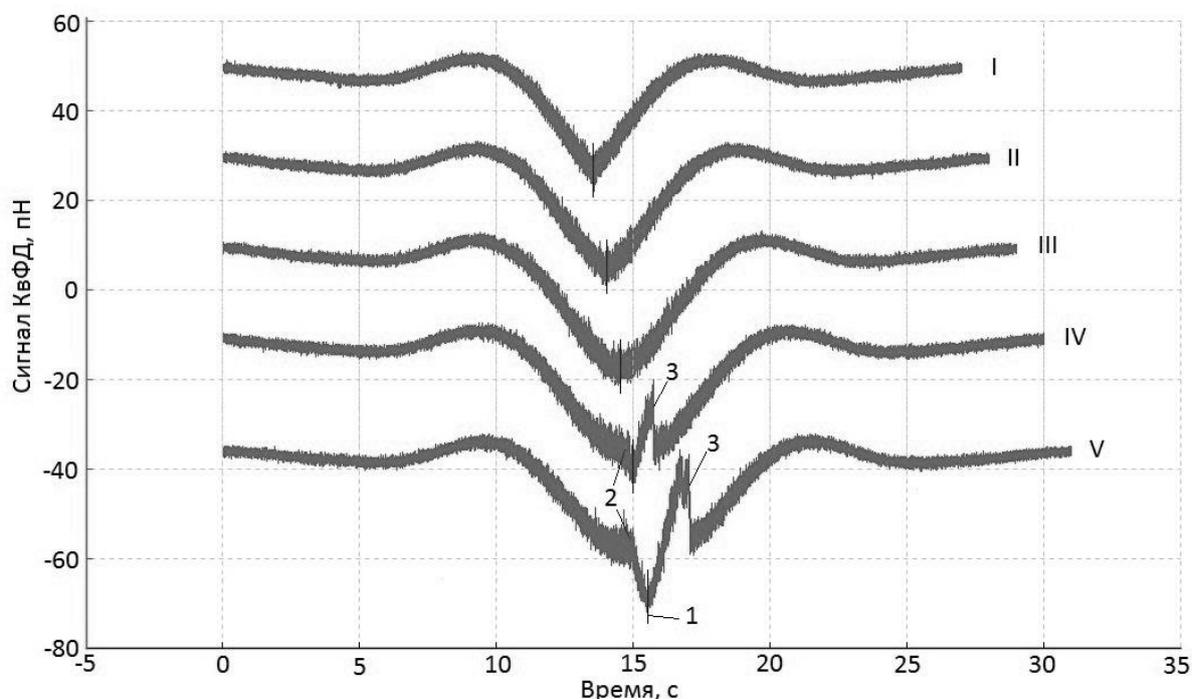


Рис. 3. Хронограммы подведения и отведения пьезостолика с большой микросферой (комментарии в тексте)

Вертикальная линия (1) показывает момент отведения пьезостолика с большой микросферой от удерживаемой лазерным лучом малой микросферы. Хронограммы I, II и III демонстрируют влияние большой микросферы на характер сигнала КвФД в условиях отсутствия физического контакта микросфер. Контакт двух микросфер на скорости 100 нм/с – это удар, который проявляется

на графиках в виде резкого изменения сигнала после точки 2 на хронограммах IV и V. После остановки пьезостолика (1) он немедленно отводился (интервал между точками 1 и 3 и далее). Точка (3) – это момент отрыва одной микроферы от другой, индицируемого резким падением сигнала. Анализ представленных хронограмм позволяет предположить, что моментом контакта микрофер является точка 2.

На рисунке 4 показан участок хронограммы V из рисунка 3 – с 16 по 17,4 сек. При отведении большой микроферы после прохождения дополнительных 50 нм от момента контакта (рисунок 4) наблюдается появление дополнительных неспецифических изменений сигнала на фотодетекторе.

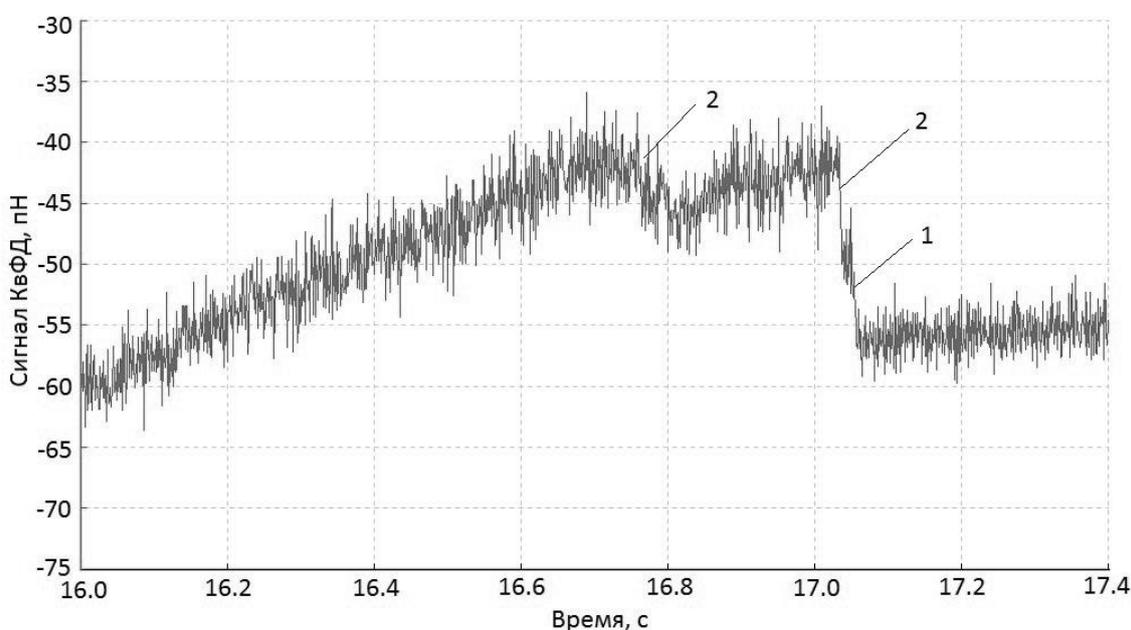


Рис. 4. Развернутая хронограмма отведения большой микроферы (рисунок 3, участок хронограммы V с 16 по 17,4 с)

Последний скачок сигнала (1) соответствует конечному разрыву связей между парой микрофер, так как последующее изменение сигнала при отведении симметрично таковому при подведении. Резкие изменения сигнала (2 на рисунке 4) не являются отрывами, а, предположительно, отражают процесс скольжения или перекатывания одной микроферы по поверхности другой. При этом, по-видимому, образуются дополнительные связи между другими парами

молекул, покрывающих поверхность микросфер, что приводит к регистрации такого рода изменений хронограммы.

В результате проведенных исследований была отработана процедура оценки сил межмолекулярных взаимодействий методом оптического пинцета с использованием модельной системы «микросфера-микросфера». Данный метод может быть использован в фундаментальных исследованиях в области клеточной, молекулярной биологии, а также в микробиологии при исследовании адгезивных свойств поверхностных структур патогенов.

Список литературы

1. *Neuman K. C., Nagy A.* Single-molecule force spectroscopy: optical tweezers, magnetic tweezers and atomic force microscopy // *Nat. Methods.* – 2008. – V. 5(6). – P. 491–505.
2. *Neuman K. C., Chadd E. H., Liou G. F., Bergman K., Block S. M.* Characterization of photodamage to escherichia coli in optical traps // *Biophys J.* – 1999. – V. 77. – P. 2856–2863.
3. *Sacconi L., Tolic-Norrelykke I. M., Stringari C., Antolini R., Pavone F. S.* Optical micromanipulations inside yeast cells // *Appl Optics.* – 2005. – V. 44. – P. 2001–2007.
4. *Li C., Liu Y. P., Liu K. K., Lai A. C. K.* Correlations between the experimental and numerical investigations on the mechanical properties of erythrocyte by laser stretching // *IEEE Trans. Nanobiosci.* – 2008. – V. 7. – P. 80–90.
5. *Friese M. E. J., Truscott A., Rubinsztein-Dunlop H., Heckenberg N. R.* Three-dimensional imaging with optical tweezers // *Appl. Opt.* – 1999. – V. 38. – P. 6597–6603.
6. *Tischer C., Altmann S., Fisinger S., Horber J. K. H., Stelzer E. H. K., Florin E. L.* Three-dimensional thermal noise imaging // *Appl. Phys. Lett.* – 2001. – V. 79. – P. 3878–3880.
7. *Svoboda K., Schmidt C. F., Schnapp B., Block S. M.* Direct observation of kinesin stepping by optical trapping interferometry // *Nature.* – 1993. – V. 365. – P. 721–727.
8. *Molloy J. E., Burns J. E., Kendrick-Jones J., Tregear R. T., White D. C.* Movement and force produced by a single myosin head // *Nature.* – 1995. – V. 378. – P. 209–212.

БЕЛОЗЁРОВ Владислав Сергеевич – магистрант, Вятский государственный университет. 610000, г. Киров, ул. Московская, 36.

E-mail: vladiss111@mail.ru

КОНЫШЕВ Илья Владимирович – аспирант, инженер НОЦ по направлению нанотехнологии, Вятский государственный университет. 610000, г. Киров, ул. Московская, 36.

E-mail: konyshevil@yandex.ru

БЫВАЛОВ Андрей Анатольевич – доктор медицинских наук, профессор кафедры биотехнологии, Вятский государственный университет. 610000, г. Киров, ул. Московская, 36.

E-mail: marina.anatolevna.93@mail.ru