

## ОБЗОРЫ

УДК 577.213.3:541

## ИЗМЕРЕНИЕ СИЛЫ РАСКРУЧИВАНИЯ ДВОЙНОЙ СПИРАЛИ ДНК

Н.Н. Курусъ<sup>1</sup>, Ф.Н. Дульцев<sup>1,2</sup><sup>1</sup>Институт физики полупроводников им. А.В. Ржанова СО РАН, Новосибирск, Россия

E-mail: fdultsev@isp.nsc.ru

<sup>2</sup>Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, Россия

Статья поступила 30 июня 2016 г.

Обзор посвящен методам измерения сил разрыва связей в комплексах сложных биологических молекул, а именно сил раскручивания двойной спирали ДНК, причем рассматриваются механические методы, не оказывающие электромагнитного воздействия на исследуемую систему, что особенно важно для биологических систем. Описаны два основных метода: атомно-силовая микроскопия и сканирование явлений отрыва — новый метод, также основанный на механическом воздействии, но имеющий гораздо более простое аппаратное исполнение. Дан сравнительный анализ возможностей обоих методов, показана их перспективность для исследования сил разрыва химических связей в биологических системах. Применение этих методов для изучения прочности химических связей сопряжено с преодолением многочисленных технических трудностей как при проведении самих измерений, так и при химическом модифицировании сопряженных поверхностей. Показана применимость этих методов не только для фундаментальных исследований прочности химических связей, определяющих стабильность и связанную с ней возможность функционирования трехмерных биомолекулярных комплексов, но и для создания биосенсоров на основе механического воздействия (кварцевые резонаторы), например, с возможностью проведения экспресс-анализа ДНК.

DOI: 10.15372/JSC20170213

**Ключевые слова:** межмолекулярные силы, кварцевый резонатор, олигонуклеотиды, комплементарность, атомно-силовая микроскопия.

Межмолекулярные силы, удерживающие вместе пары лиганд—рецептор, имеют ключевое значение для биологических процессов, например, они обеспечивают ответ сигнальной системы или иммунную реакцию. Связи, лежащие в основе этих процессов, не только играют важную роль в связывании, но также образуют стабильную естественную молекулярную структуру. Для поддержания биомолекул во время функционализации необходимо, чтобы их межмолекулярные силы стабилизировали объемную структуру в достаточной степени. Внутримолекулярная стабильность является обязательным условием для функционирования, поэтому должен быть существенный энергетический барьер, разделяющий естественное и денатурированное состояния. Насколько высоким должен быть этот барьер? Только измерения могут дать точный ответ. Для выполнения таких измерений необходимо использовать достаточно чувствительный и не вносящий искажений метод. Рассмотрим методы, применяемые для измерения силы разрыва в биокомплексах.

Один из таких методов — атомно-силовая микроскопия (АСМ). Функциональные блоки, соединенные с ДНК-олигомерами, связываются с комплементарной последовательностью, сцепленной с острием АСМ [1—3]. Измерения на АСМ дают прямые данные о механической ста-

бильности соединения антитело—антиген, об устойчивости антигена к отрыву от мембраны и к расправлению. Взаимодействия между молекулами или их фрагментами содержат ключ к системам рецептор—агент, что особенно важно в биологических системах, где водородные связи имеют большое значение. В биополимерах их энергия колеблется в диапазоне от 3 до 25 ккал/моль [4].

Вторым методом, также не вносящим искажения, является сканирование явлений отрыва — REVS. Этот метод использует кварцевый резонатор в сдвиговой моде. Также широкое применение в задачах измерения сил разрыва связей нашла методика, известная как оптические пинцеты, в основе которой лежит принцип оптического манипулирования мельчайшими диэлектрическими объектами. Рассмотрим эти методики и их применение в химии и биологии. Данные методы могут быть полезны для получения ответов на такие вопросы: являются ли два данных образца ДНК идентичными? Какие из представленных наборов ДНК соответствуют контрольной ДНК? Есть ли среди нескольких представленных ДНК совпадающие или, наоборот, несовпадающие? — и так далее. Практически лишь в исключительных случаях требуется выписывать генетическую информацию полностью. Попробуем поставить более простые, но зачастую очень важные вопросы. Иными словами, возможно ли сопоставление образцов ДНК на идентичность без трудоемкого восстановления полного генома и не менее трудоемкого последовательного сравнения с другим геномом? Или же для сравнения образцов ДНК на идентичность можно обойтись без расшифровки кода вообще? Как правило, в жизни ставится задача: являются ли геномы совпадающими или нет, а не какова их полная внутренняя информация. Такую информацию о совпадении можно получить, если измерить силу разрыва связи.

## МЕТОДЫ ИЗМЕРЕНИЯ СИЛЫ СВЯЗИ

### 1. Атомно-силовая микроскопия

Метод атомно-силовой микроскопии (АСМ) был предложен в 1986 г. как альтернатива сканирующей туннельной микроскопии, позволяющая проводить измерения на непроводящих поверхностях [5]. Благодаря высокому разрешению, порядка десятков ангстрем, и относительной простоте реализации метод получил широкое применение в исследовании структур различных типов. Позже АСМ легла в основу новой литографической технологии [6] и открыла возможности модификации поверхностей путем манипулирования отдельными наночастицами [7] и молекулами.

Простота подготовки исследуемого материала и возможность работы с объектами, находящимися в жидкой среде, делают АСМ одной из наиболее перспективных методик, применяемых в биологии. В сканирующем режиме АСМ позволяет получать изображения биологических объектов и структур, таких как нуклеиновые кислоты [8], белки [9], биологические комплексы [10] и т.д. Для определения эластичных свойств клеточных мембран часто применяют методику микронаноиндентирования, в ходе которой специально подобранным зондом АСМ надавливают на поверхность клетки и получают зависимость положения зонда от нагрузки [11]. Наноиндентирование также может быть использовано для определения механических свойств любых биологических объектов, например, хрящевой ткани организма [12]. Кроме того, АСМ может работать в режиме измерения силы. Этот режим зачастую и называют методом атомно-силовой спектроскопии. Именно этот режим будет подробнее рассмотрен в данном обзоре в контексте измерения сил разрыва химических и физических связей.

**1.1. Физические принципы и схема метода АСМ.** В основе метода атомно-силовой микроскопии лежит взаимодействие атомов вещества зонда с атомами исследуемой структуры, обусловленное возникновением сил Ван-дер-Ваальса. Характер такого взаимодействия зависит от расстояния между поверхностью и зондом и может быть описан с помощью модели Леннарда-Джонса (рис. 1):

$$U_{LD}(r) = U_0 \left( -2 \left( \frac{r_0}{r} \right)^6 + \left( \frac{r_0}{r} \right)^{12} \right), \quad (1)$$

где  $r_0$  — равновесное расстояние между атомами;  $U_0$  — значение энергии в минимуме.

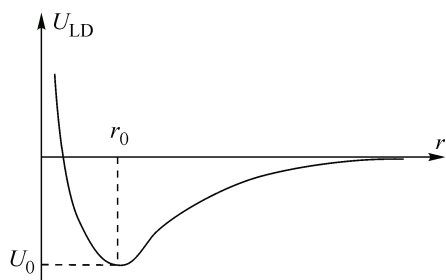


Рис. 1 (слева). Качественный вид потенциала Леннарда-Джонса

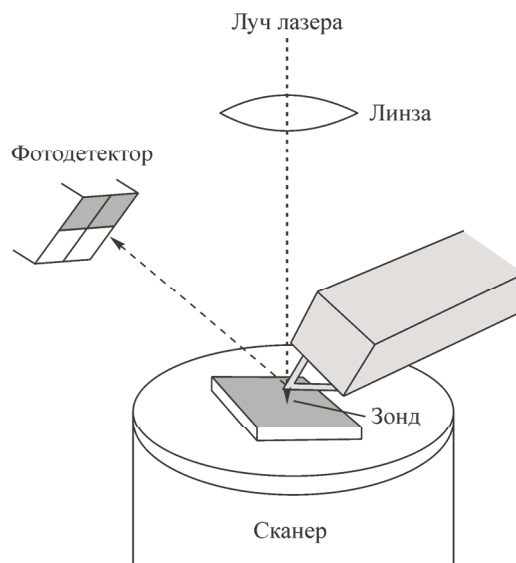


Рис. 2 (справа). Схематическое изображение АСМ [ 13 ]

Зонд, представляющий собой острую иглу, закреплен на конце упругой балки, называемой кантилевером. При сближении острия зонда с поверхностью образца возникает сила притяжения, вызывающая изгиб балки. Регистрируя величину изгиба с помощью специальной оптической системы, в простейшем случае состоящей из лазера, зеркала и фотодетектора, можно судить о величине силы, действующей на зонд, и получить информацию о рельефе поверхности исследуемой структуры (рис. 2). При дальнейшем приближении к поверхности на расстояние, меньшее среднего межатомного расстояния, зонд попадает в область действия сил отталкивания. Последующее сближение приводит к перекрытию электронных оболочек ближайших атомов и увеличению энергии их взаимодействия, вследствие чего возникают силы взаимного отталкивания. На расстоянии порядка длины химической связи силы притяжения и отталкивания компенсируют друг друга, а при дальнейшем сближении атомов начинает доминировать сила кулоновского отталкивания ядер. Радиус острия зонда обуславливает разрешение в плоскости  $x-y$ , которое обычно составляет несколько нанометров. Разрешение же в вертикальном направлении составляет десятки ангстрем и ограничено в основном тепловым шумом [ 13 ].

Сканирование при помощи атомно-силового микроскопа может осуществляться в трех режимах: контактном, бесконтактном и в режиме прерывистого контакта (полуконтактном). В первом случае зонд касается поверхности образца и в процессе сканирования очерчивает ее рельеф. При этом острие зонда воздействует на исследуемый объект с достаточно большой силой, порядка  $10^{-6}$  Н. Именно этот фактор ограничивает применение контактного режима АСМ в биологических задачах. Наиболее часто для исследования биологических объектов применяют полуконтактный режим АСМ, в котором возбуждаются вынужденные колебания кантилевера с амплитудой порядка 100 нм. В ходе сканирования зонд касается образца только в нижней точке амплитуды, воздействуя на него с силой порядка  $10^{-32}$  Н. При этом силы, действующие на зонд со стороны поверхности, приводят к изменению резонансных характеристик кантилевера. На основе этих изменений может быть построена картина рельефа поверхности. В бесконтактном режиме, в отличие от полуконтактного, зонд не воздействует механически на образец, и в нижней точке своих колебаний находится на расстоянии нескольких нанометров от его поверхности. Данный режим практически не используется для визуализации биологических объектов в связи с тем, что для получения изображения высокого качества необходимо подводить зонд очень близко к поверхности.

В режиме измерения силы зонд совершает циклические колебания с постоянной скоростью вдоль оси  $z$  относительно фиксированной точки в плоскости  $x-y$ . Результатом измерений для каждой интересующей точки является зависимость изгиба кантилевера от расстояния между зондом и подложкой. Сила, действующая на зонд со стороны подложки, может быть рассчитана в соответствии с законом Гука:

Рис. 3. Характерный вид силовой кривой, получаемой с помощью АСМ [ 14 ]

$$f = k \cdot d, \quad (2)$$

где  $k$  — коэффициент жесткости кантилевера;  $d$  — величина изгиба кантилевера.

Зависимость силы от расстояния между зондом и подложкой называется силовой кривой, типичный вид которой представлен на рис. 3.

В экспериментах по определению силы разрыва химических связей одна из молекул, образующих комплекс, ковалентно закрепляется на поверхности зонда с помощью полимерной молекулы (линкера), а другая — на поверхности подложки. Когда зонд находится на достаточно большом расстоянии от подложки, силы их взаимодействия малы, и изгиб кантилевера не наблюдается. Приближение зонда к поверхности с постоянной скоростью соответствует прямолинейному участку  $a-b$ . Практически достигнув поверхности (точка  $b$ ), зонд испытывает сильное притяжение, обусловленное действием капиллярных сил, и приходит в контакт с поверхностью образца (участок  $b-c$ ). Такая характерная особенность силовой кривой в англоязычной литературе встречается под названием "jump-to-contact" (JTC). В этот момент между комплементарными молекулами происходит процесс биораспознавания, и они образуют комплекс. При дальнейшем приближении зонда к поверхности образца изгиб кантилевера увеличивается вследствие возникновения сил взаимного электростатического отталкивания перекрывающихся молекулярных орбиталей. Этот процесс отражен на графике зависимости линейным участком ( $c-d$ ). При достижении некоторой критической силы взаимодействия, обычно не превышающей 1 нН, сближение прекращается, и зонд начинает с постоянной скоростью удаляться от подложки до достижения точки первоначального контакта. Участок  $d-f$ , соответствующий этому процессу, как правило, представляет собой прямую линию, параллельную участку  $c-d$ . Однако на данном участке иногда может наблюдаться гистерезис, связанный с пластической деформацией образца. На участке  $d-f$  на зонд действует большая сила притяжения, обусловленная его адгезией к подложке или химическими связями, возникшими в фазе контакта. В момент, когда сила упругости кантилевера превосходит силы притяжения, зонд резко подскакивает вверх, а на силовой кривой наблюдается резкий пик "jump-off-contact" (участок  $f-g$ ), высота которого соответствует силе разрыва связи между молекулами. Расстояние, на которое зонд удалился от поверхности, называется длиной разрыва химической связи.

Согласно теории Крамерса [ 15 ], в условиях термодинамического равновесия реакции между молекулами, протекающие в жидкой среде и приводящие к образованию и распаду комплексов, можно представить как преодоление потенциального барьера, расположенного вдоль координаты реакции. Единичный потенциальный барьер разделяет связанное и несвязанное состояния и располагается на некотором расстоянии  $x_\beta$  от начала координат (рис. 4). При этом скорость диссоциации молекулярного комплекса зависит от энергии активации (высоты потенциального барьера):

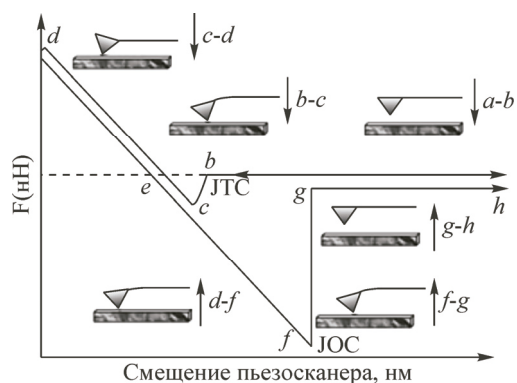
$$k_{\text{off}} = \gamma \exp\left(\frac{-\Delta E_a}{k_B T}\right), \quad (3)$$

где  $\gamma$  — не зависящий от температуры предэкспоненциальный фактор;  $\Delta E_a$  — энергия активации;  $k_B$  — постоянная Больцмана;  $T$  — температура.

Предложенная Беллом [ 16 ] в 1978 г. модель клеточной адгезии описывает влияние приложенной силы на высоту потенциального барьера (рис. 5). Согласно данной модели, уменьшение высоты барьера прямо пропорционально величине приложенной силы:

$$\Delta E_a(f) = \Delta E_a(0) - f \cdot \chi_\beta, \quad (4)$$

где  $f$  — величина приложенной силы.



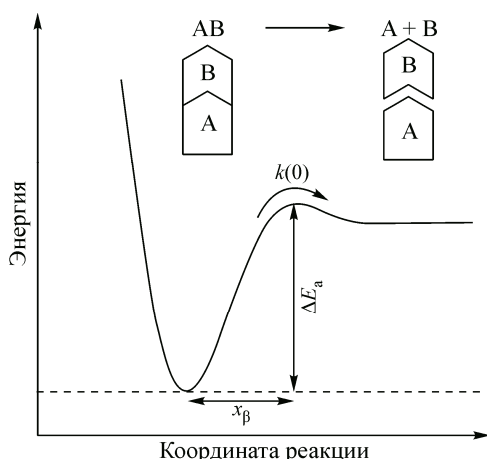


Рис. 4. Схематическое изображение энергетического профиля процесса распада комплекса

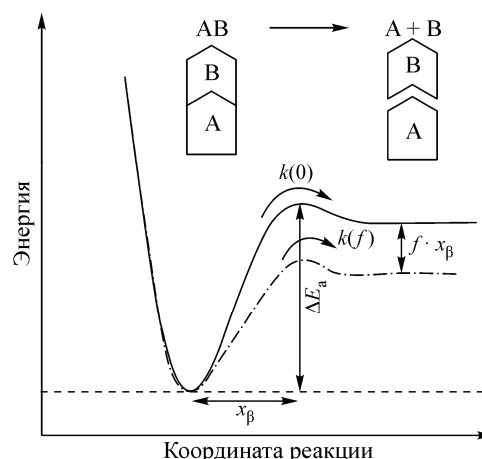


Рис. 5. Схематичное изображение уменьшения высоты потенциального барьера при приложении силы

При этом зависимость скорости диссоциации комплекса от приложенной силы носит экспоненциальный характер:

$$k_{\text{off}}(f) = k_{\text{off}}(0) \cdot \exp\left(\frac{f \cdot \chi_{\beta}}{k_B T}\right), \quad (5)$$

где  $k_{\text{off}}(0)$  — скорость диссоциации в отсутствие силы. Время жизни комплекса обратно скорости диссоциации:

$$\tau_{\text{off}}(f) = \frac{1}{k_{\text{off}}(f)}. \quad (6)$$

В случае, если прикладываемая сила линейно увеличивается во времени ( $f = r_t \cdot t$ ), величина силы разрыва связи будет зависеть от коэффициента  $r_t$ , называемого нагрузкой. В работе Эванса и Ритчи [17] установлено, что регистрируемая величина силы разрыва связи пропорциональна логарифму нагрузки. Наиболее вероятная сила разрыва связи при фиксированной нагрузке задается соотношением:

$$f^* = \frac{k_B T}{x_{\beta}} \ln\left(\frac{r_t \cdot x_{\beta}}{k_{\text{off}} \cdot k_B T}\right). \quad (7)$$

**1.2. Анализ силовых кривых.** Измерения проводят в нескольких точках поверхности, расположенных на определенном расстоянии относительно друг друга. В результате получают сотни силовых кривых, лишь некоторая часть которых несет полезную информацию о силе разрыва химической связи между молекулами. Внешний вид получаемых зависимостей, как правило, несколько отличается от зависимости, представленной на рис. 3. Поэтому важным этапом эксперимента по определению силы разрыва связи является тщательный анализ силовых кривых. На некоторых кривых могут отсутствовать силовые пики (рис. 6, а) или присутствовать пики, характерные для неспецифических взаимодействий (см. рис. 6, в). Отличие рис. 6, б от рис. 6, в состоит в изменении наклона силовой кривой в процессе отвода зонда, которое происходит вследствие уменьшения эффективного коэффициента жесткости. Это изменение указывает на то, что в начале процесса отвода зонда кантилевер находился в расслабленном состоянии, а при последующем отводе произошло растяжение исследуемой системы взаимодействующих молекул. На участке кривой (см. рис. 6, в), соответствующей отводу зонда, наклон сохраняется постоянным вплоть до отрыва зонда от поверхности, что свидетельствует об изгибе кантилевера. Такой вид силовой кривой соответствует случаю непосредственного контакта зонда с поверхностью, без участия молекул [18].

Неспецифические взаимодействия могут возникать вследствие неправильной пространственной ориентации молекул, иммобилизованных на зонде и подложке, что препятствует обра-



Рис. 6. Типичные силовые кривые: силовая кривая без взаимодействий (а); силовая кривая, соответствующая специфическому взаимодействию между молекулами (б); силовая кривая с неспецифическим взаимодействием [ 18 ] (в)

зованию комплекса в процессе подвода. Неправильная иммобилизация партнеров по связыванию может приводить к контактам между зондом и поверхностью с участием только одного сорта молекул, либо вообще без участия молекул. Определение специфических взаимодействий и выбор информативных силовых кривых является сложной и трудоемкой задачей. Иногда для установки критериев отбора кривых проводят эксперименты, заведомо приводящие к неспецифическим взаимодействиям. Для этого исследуют взаимодействие между зондом и поверхностью без иммобилизованных молекул или в присутствии лишь одного типа молекул, иммобилизованных на зонде или подложке. Другой вариант наблюдения неспецифических взаимодействий подразумевает подавление процесса биораспознавания партнеров по связыванию путем блокировки одного из них с помощью специального комплементарного агента [ 19 ]. Полученная информация о внешнем виде и амплитуде пиков неспецифических взаимодействий позволяет отличить их от специфических. В случае последовательного разрыва нескольких связей на силовой кривой наблюдается несколько пиков. Множественные явления разрыва могут возникать, если при подводе зонда к поверхности произошло образование сразу нескольких комплексов, что нежелательно при исследовании взаимодействий единичных молекул. Однако подобная картина не всегда является неблагоприятной и может наблюдаться, например, при последовательном разрыве связей между азотистыми основаниями в двухцепочечной молекуле ДНК [ 20 ].

Данные, полученные на основе пиков специфических взаимодействий, обычно представляют в виде гистограмм, отражающих частоту регистрации силы той или иной величины (рис. 7). Подобные графики чаще всего имеют асимметричный характер и один или несколько (при возникновении множественных явлений отрыва, рис. 8) выраженных максимумов. Аппроксимация гистограммы, например, функцией Гаусса, позволяет определить наиболее вероятную силу разрыва связи.

В экспериментах по определению силы разрыва связи методом АСМ измерения, как правило, проводят при различных скоростях отвода зонда от поверхности, сохраняя при этом скорость подвода постоянной. Величина нагрузки при фиксированной скорости может быть получена как произведение скорости и коэффициента жесткости кантилевера. Диапазон нагрузок, в котором обычно проводят силовые измерения, по порядку величин составляет от 1 до 100 нН/с.

На основе полученных данных строят зависимость силы разрыва связи от логарифма нагрузки. Типичный вид такой зависимости представлен на рис. 9. Однако известно, что на коэффициент жесткости кантилевера может оказывать влияние жесткость самих исследуемых молекул [ 23 ]. Вследствие того, что взаимодействия молекул порой имеют различный геометрический характер, нагрузки в экспериментах, проведенных при одной скорости, могут значительно отличаться. Поэтому реальную величину нагрузки получают из экспериментальной кривой как производную силы по времени на прямолинейном участке, предшествующем разрыву.

График, представленный на рис. 6, отражает зависимость, описываемую соотношением (7). Определив наклон прямой на экспериментальном графике и приравняв его к угловому коэффициенту  $(k_B T)/x_B$ , стоящему перед экспонентой, можно определить положение энергетического

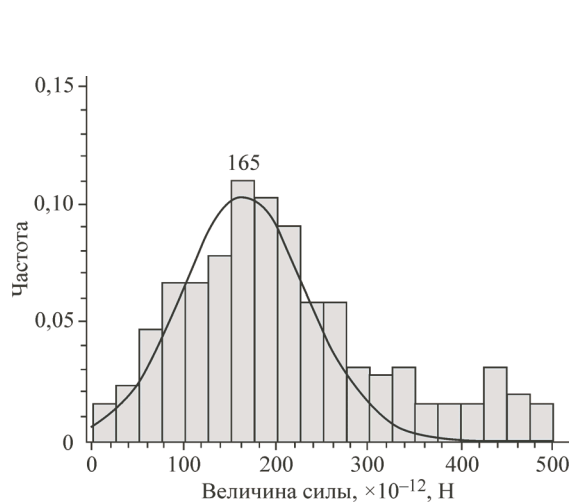


Рис. 7. Распределение сил разрыва химических связей в системе биотин—нейтравидин, аппроксимированное функцией Гаусса [ 21 ]

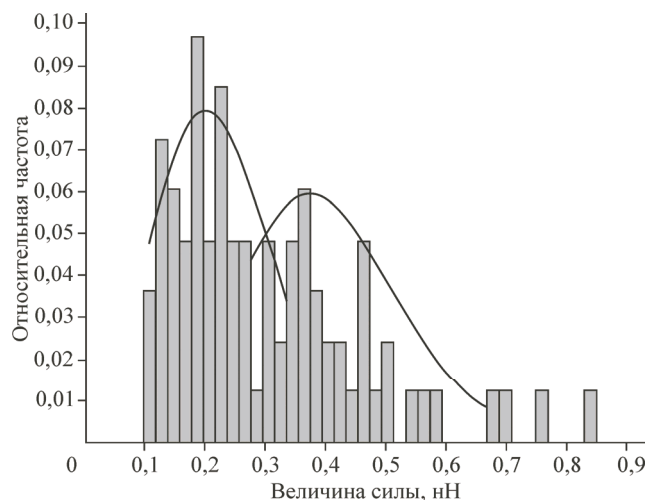
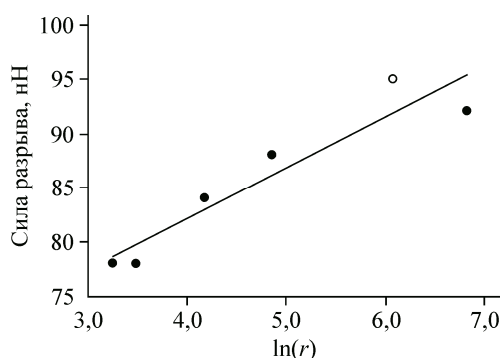


Рис. 8. Распределение сил отрыва молекул фибриногена от стеклянной подложки, аппроксимированное эмпирической функцией распределения [ 22 ]

барьера  $x_\beta$ . В соответствии с соотношением (7), при  $f^* = 0$  скорость диссоциации комплекса задается равенством  $k_{\text{off}} = \frac{r_\tau \cdot x_\beta}{k_B T}$  и также может быть определена на основе данной зависимости [ 25 ].

**1.3. Иммобилизация исследуемых молекул.** Как уже было сказано, для измерения сил разрыва связи между двумя молекулами, образующими комплекс, необходимо, чтобы одна из них была прочно закреплена на острие зонда, а другая — на поверхности подложки. Кроме того, связь молекулы с поверхностью должна превосходить по прочности исследуемые связи внутри комплекса. Поэтому большинство методик иммобилизации подразумевает ковалентное связывание молекул с участием силанольных [ 26 ] и тиольных [ 27—29 ] функциональных групп (рис. 10). В качестве материала подложек обычно используют слюду [ 30 ], кремний [ 31 ] и стекло [ 32—34 ]. Силанольные группы, присутствующие на поверхности этих веществ, способны образовывать ковалентные связи при взаимодействии с аминогруппами. По этому механизму происходит иммобилизация белков, пептидов и функционализированных аминогруппами нуклеиновых кислот. Методика иммобилизации с участием тиольных групп применяется в основном при функционализации подложек, покрытых тонким слоем золота [ 31, 35 ]. В этом случае закрепление обусловлено способностью серы к образованию ковалентных связей с золотом.

На поверхностях зондов из кремния или нитрида кремния также присутствуют силанольные группы, что позволяет использовать тот же метод для иммобилизации комплементарных молекул. Иногда используют зонды с тонким покрытием из золота, иммобилизация на которых



также возможна с участием тиольных групп.

Иммобилизацию необходимо осуществлять таким образом, чтобы молекулы сохраняли свою природную структуру и способность к взаимному распознаванию. Кроме того, как правило, молекулы связывают с поверхностью зонда и подложки не напрямую, а с помощью линкеров. Линкеры представляют собой полимерные цепочки длиной в несколько нанометров, имею-

Рис. 9. Зависимость силы разрыва связи от натурального логарифма нагрузки [ 24 ]

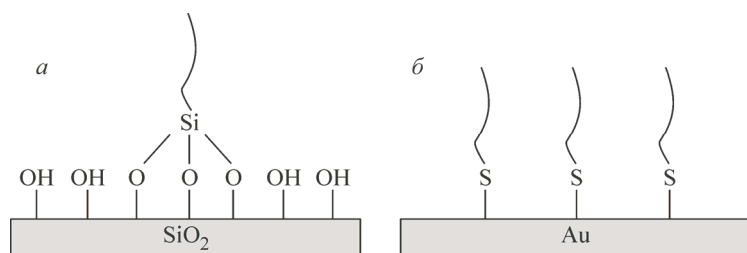


Рис. 10. Схематическое изображение ковалентного связывания с участием тиольных (а) и силанольных (б) функциональных групп

щие на обоих концах функциональные группы, предназначенные для связывания с поверхностью и исследуемой молекулой (рис. 11).

Таким образом, процесс распознавания молекул происходит на некотором расстоянии от поверхности, в отличие от неспецифических взаимодействий. Кроме того, пластическая деформация линкера при отводе зонда отражается в изменении наклона силовой кривой, что является в данном случае характерным признаком специфических взаимодействий. Таким образом, использование линкера при иммобилизации упрощает процесс сортировки кривых и исключения неспецифических пиков из рассмотрения. Наличие гибкого линкера также позволяет молекуле свободно поворачиваться и менять пространственную ориентацию, что увеличивает вероятность связывания между партнерами.

В качестве линкера могут быть использованы цепочки таких полимеров, как полиакриловая кислота, карбоксиметилдекстран [36] или карбоксиметиламиллоза [37]. Однако чаще в задачах иммобилизации биомолекул на поверхности зонда АСМ используют полиэтиленгликоль (ПЭГ), так как он является химически инертным и обеспечивает высокую ориентационную свободу биомолекул [38].

Не всегда в качестве линкеров выбирают линейные цепочки полимеров. Для иммобилизации на зондах АСМ молекул, содержащих аминогруппы, было предложено использовать дендримеры [40]. Дендример представляет собой шаровидную молекулу, содержащую на своей поверхности большое число альдегидных групп (рис. 12). На примере глутатион-*s*-трансферазы и антител к ней было показано, что благодаря большому размеру (7,5 нм) дендример выполняет функцию спейсера между зондом и молекулой, что приводит к значительному уменьшению числа неспецифических взаимодействий. Кроме того, размер и конфигурация дендримера обеспечивают разнообразную ориентацию антител, что увеличивает вероятность их связывания с антигеном на поверхности.

Как было сказано выше, для измерения сил разрыва связей на уровне единичных молекул необходимо обеспечить низкую поверхностную плотность иммобилизованных партнеров по связыванию. В некоторых случаях этого можно достичь путем уменьшения концентрации молекул в растворе. Однако иногда функционализация может происходить неоднородно, а также на результатах измерений могут негативным образом отражаться произвольные взаимодействия молекул с поверхностью. Одним из способов решения этой проблемы является использование самособирающихся монослоев, содержащих линкеры двух сортов: с функциональными группами, способными к связыванию с исследуемыми биомолекулами, и с устойчивыми к связыванию функциональными группами, например, монослой, содержащий тиолы с NHS-груп-

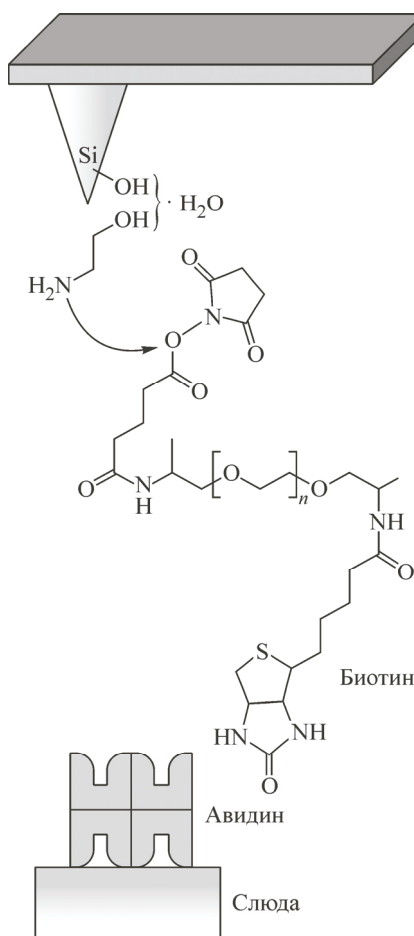


Рис. 11. Схема иммобилизации биотина на зонде АСМ с помощью ПЭГ-линкера с NHS-функциональной группой [39]



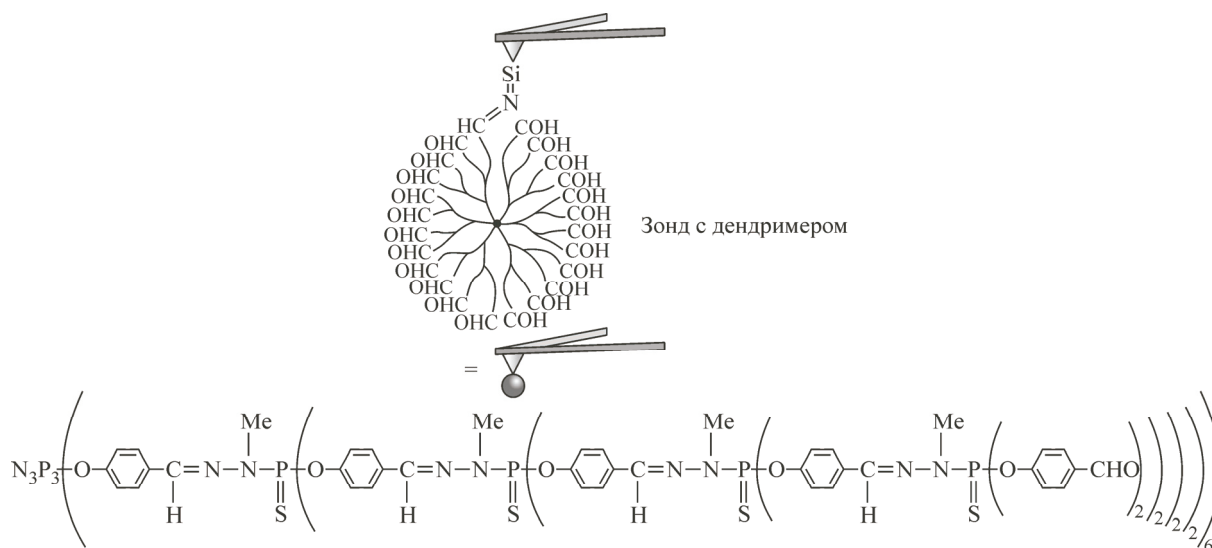


Рис. 12. Схематическое изображение зонда, функционализированного дендримером, содержащим 96 аминогрупп, и структурная формула дендримера [ 40 ]

пами и тиолы с олигоэтиленгликолем (ОЭГ), устойчивым к связыванию с белками [ 41, 42 ]. Таким образом, иммобилизованные молекулы оказываются изолированными среди молекул ОЭГ, что в значительной степени уменьшает их взаимодействие с поверхностью, а также препятствует неспецифическим взаимодействиям между поверхностью и зондом. Другим способом уменьшения плотности иммобилизации молекул является использование линкеров специальной формы. Для функционализации зонда был предложен подход, основанный на использовании линкера в форме треноги, который ковалентно связывается с поверхностью в трех точках, а также имеет и функциональную группу для связывания молекулы белка [ 21 ] (рис. 13). Механическая прочность линкера и его форма обеспечивают отсутствие неспецифических взаимодействий.

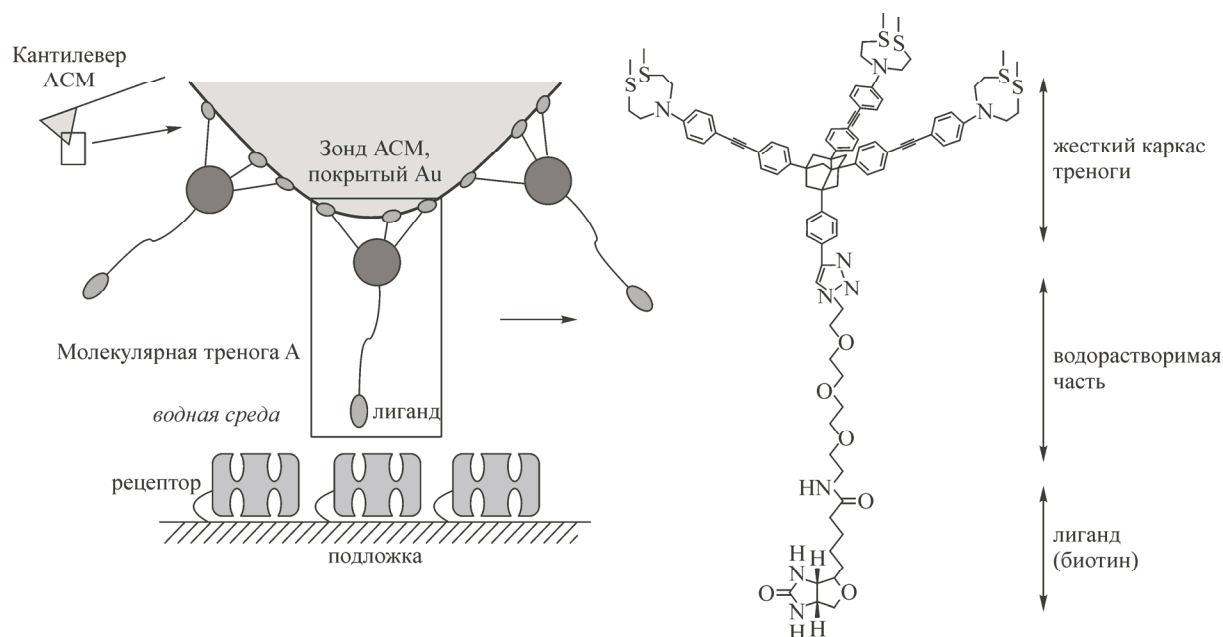


Рис. 13. Схематическое изображение зонда, функционализированного жестким линкером в форме треноги, и структурная формула линкера [ 21 ]

Не всегда требуется иммобилизация партнеров по связыванию на поверхностях подложки и зонда с помощью двух линкеров. В работе [43] предложен вариант иммобилизации пептидов путем крепления их на определенном расстоянии друг от друга внутри самого линкера. Молекулы образуют пептидный димер, и участок линкера, находящийся между местами их крепления, сворачивается в петлю. В результате нагрузки системы при отводе зонда связи внутри димера разрываются, а при последующем подводе пептиды снова образуют комплекс.

Для проверки качества иммобилизации обычно используют метод рентгеновской фотоэлектронной спектроскопии (РФЭС) [44], позволяющий оценить химический состав поверхности и саму атомно-силовую микроскопию [45, 46] для визуализации иммобилизованных молекул.

**1.4. Применение АСМ в режиме измерения силы.** Атомно-силовая микроскопия является эффективной методикой, применяемой в исследованиях процессов взаимодействий лиганд—рецептор, механических свойств биомолекул и прочности связей, возникающих между молекулами при образовании комплекса.

Одним из актуальных направлений последних лет является исследование с помощью АСМ процессов адгезии бактерий, так как этот процесс является основным механизмом инфицирования организма. Адгезия зависит от заряда поверхности, от времени пребывания бактерии на ней и от поверхностной энергии самой бактерии. Бактерии на поверхности подвергаются механическим воздействиям различной природы, но в случае прочного связывания происходит образование биопленки, состоящей из самих бактерий, белков, полисахаридов и внеклеточной ДНК. Авторы одной из работ [47] исследовали влияние внеклеточной ДНК на адгезию бактерии *Streptococcus mutans* к поверхностям различного типа. Показано, что внеклеточная ДНК увеличивает бактериальную адгезию, однако в большей степени по отношению к гидрофобным нежели к гидрофильным поверхностям. Другая работа [48] посвящена исследованию роли адгезина P1, а также каждого из его фрагментов в отдельности, в адгезии *Streptococcus mutans* к слюнному агглютинину. Измерения на молекулярном уровне совмещали с измерениями на клеточном уровне, когда на поверхности зонда иммобилизовалась целая бактерия. Сравнение результатов этих экспериментов показало, что силы разрыва связей между единичными молекулами адгезина и идентичного агглютинину гликопротеина 340 на порядок меньше, нежели силы разрыва в случае взаимодействия целой бактерии с поверхностью, содержащей гликопротеин 340. Столь существенная разница в силах связи может быть объяснена латеральными взаимодействиями комплексов адгезин—гликопротеин, усиливающими связывание бактерии с поверхностью. В адгезии грамотрицательных бактерий принимают участие белковые цилиндрические структуры различных типов, называемые пиллями. Исследование [49] адгезии пилей IV типа *Pseudomonas aeruginosa* показало, что данный тип бактерий способен прочно связываться с гидрофобными поверхностями. Силовые кривые, полученные при нагрузке единичных пилей, имеют особенности, свидетельствующие о происходящих в них конформационных изменениях. Вследствие таких механических особенностей пили IV типа способны выдерживать воздействие силы до 250 пН, чем и объясняется высокая патогенность *Pseudomonas aeruginosa*.

Исследованию механических свойств белков и белковых структур посвящено большое количество работ. Конфигурация белка в значительной степени влияет на его функции. Было экспериментально показано, что воздействие внешней силы на молекулу белка приводит к изменению его активности [50]. В задачах, связанных с исследованиями белков и ферментов, АСМ часто используют в комбинации с другими методами. Силовое воздействие зонда АСМ приводит к конформационным изменениям в молекулах, которые могут быть зарегистрированы с помощью таких методик, как флуоресцентная микроскопия полного внутреннего отражения (TIRF) [51, 52] или флуоресцентный резонансный перенос энергии (FRET) [53]. Исследование взаимодействий белков с поверхностью представляет большой интерес при разработке биосенсоров и биосовместимых материалов. Так, например, в работе [22] методом АСМ измеряли силы отрыва единичных молекул фибриногена от поверхности стекла.

Широкий круг работ посвящен исследованию механических свойств молекул нуклеиновых кислот. Силы специфических взаимодействий в двухцепочечной ДНК играют важную роль

в процессах хранения и восстановления генетической информации. Кроме того, эти силы определяют эластичные свойства двойной спирали ДНК, что имеет критическое значение в процессах ее взаимодействий с белками, упаковки внутри клеточного ядра и процессах деления клеток. В работе [ 54 ] исследовали эластичные свойства ДНК с помощью методики АСМ. Наблюдалось, что процессу разрыва цепочек предшествует структурное изменение молекулы, в результате которого ее длина увеличивается почти в два раза. Изменение структуры заключается в трансформации В-формы ДНК в S-форму (от англ. "stretched" — растянутый) и отражается на силовой кривой в виде пологого участка (плато). Наличие похожих плато наблюдалось при изучении профилей растяжения одноцепочечных нуклеиновых кислот (гомополидеоксинуклеотидов ДНК) [ 55 ]. Результаты данного исследования проливают свет на характер внутрицепочечных межнуклеотидных взаимодействий, которые вносят вклад в стабильность молекулы ДНК. Показано, что при растяжении *dA* цепочки наблюдаются особенности, связанные с конформационными изменениями, возникающими вследствие разрыва связей между соседними молекулами аденина. В то же время на профилях растяжения *dT* цепочек подобные особенности не наблюдаются, и растяжение происходит по энтропийному типу. Авторы другой работы [ 56 ] показали, что прочность внутрицепочечных взаимодействий зависит от последовательности нуклеотидов. Они также исследовали влияние на регистрируемую величину силы разрыва таких параметров, как концентрация ионов натрия в буферном растворе, время контакта зонда с поверхностью и длина цепочек. Концентрация ионов натрия играет важную роль в формировании двойной спирали, так как без них невозможно образование водородных связей между комплементарными олигонуклеотидами. В работе установлено, что в экспериментах по регистрации сил разрыва связей оптимальной является концентрация NaCl, равная 100 мМ/л. Также показано, что для формирования устойчивого дуплекса необходима выдержка зонда в состоянии контакта с поверхностью в течение нескольких секунд.

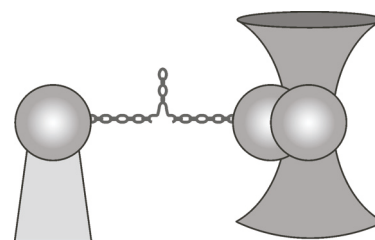
Особый интерес с точки зрения понимания таких фундаментальных процессов, как транскрипция и репликация, представляет измерение сил разрыва водородных связей, возникающих между комплементарными цепочками двухспиральной молекулы ДНК [ 56 ]. При приложении силы вдоль оси спирали разрыв связей происходит в сдвиговом режиме (shearing mode), а при приложении силы перпендикулярно оси происходит последовательный разрыв связей между нуклеотидами (unzipping mode) [ 57 ]. Величины сил при последовательном разрыве связей между нуклеотидами зависят от их последовательности. Для различных последовательностей длиной 10 пар оснований силы разрыва варьируются в диапазоне от 10 пН до 20 пН [ 58 ].

Наличие несоответствий в нуклеотидных последовательностях двух цепочек приводит к уменьшению силы разрыва водородных связей в двойной спирали. Недавние исследования гибридизации, возникающей между комплементарными последовательностями ДНК и ПНК (пептидно-нуклеиновой кислоты), показали, что внедрение одного несоответствия в последовательность из шести нуклеотидов препятствует образованию комплекса.

Интересные результаты были получены в исследовании сил разрыва водородных связей в ДНК, дестабилизируемой УФ излучением [ 59 ]. Одна из цепочек была модифицирована молекулой азобензола, ковалентно присоединенной к сахар-фосфатному скелету. Находящаяся в *транс*-форме молекула азобензола стабилизирует молекулу ДНК за счет образования  $\pi$ -связей. При воздействии УФ излучением с длиной волны 350 нм азобензол переходит в *цис*-форму, которая дестабилизирует молекулу ДНК и способствует ее расщеплению. Такое изменение является обратимым, и при освещении синим светом *цис*-азобензол снова переходит в *транс*-азобензол. Сила разрыва связей зависит от положения азобензола внутри цепочки. Находясь в проксимальном положении, *цис*-азобензол уменьшает силу разрыва гораздо сильнее, чем в случае дистального положения. Это связано с тем, что при облучении происходит дестабилизация очень короткого участка спирали.

Благодаря возможности совмещения в рамках одного эксперимента силовых измерений со сканированием поверхности, АСМ является незаменимой методикой в изучении двуслойных липидных мембран. Данный подход позволяет исследовать как процессы формирования мембран, так и их механические свойства, например, модуль Юнга [ 60 ]. В одной из работ методом

Рис. 14. Схема эксперимента по раскручиванию шпильчатой структуры молекулы РНК с помощью оптического пинцета [ 63 ]



АСМ изучали влияние осмотического давления и процентного состава липосом (липидов) на процессы взаимодействий везикул с поверхностью, на величины сил разрыва везикул, а также на процессы формирования липидной мембраны [ 36 ].

## 2. Оптические пинцеты

**2.1. Принцип действия.** Впервые эффект, лежащий в основе метода оптического пинцета, был продемонстрирован в 1970 г. Артуром Ашкином [ 61, 62 ]. Как известно, поток электромагнитного излучения, например, лазерный пучок, оказывает давление на объекты, с которыми взаимодействует. Если пучок сфокусирован линзой с большой числовой апертурой, то в области его сужения возникает неоднородное электромагнитное поле. Небольшая диэлектрическая частица, находящаяся в поле, испытывает действие так называемой градиентной силы, направленной к оси пучка, и оказывается захваченной в оптическую "ловушку". Для наблюдения эффекта оптического захвата частица должна обладать достаточной прозрачностью на длине волны излучения лазера и показателем преломления, большим, чем показатель преломления окружающей среды. В противном случае она будет выталкиваться из ловушки. Меняя фокусировку лазерного пучка, можно изменять положение захваченной частицы в пространстве. Благодаря возможности фиксации и управления небольшими объектами описанный выше подход получил название "оптический пинцет" (рис. 14).

При небольших отклонениях от центра ловушки частица испытывает действие возвращающей силы, модуль которой зависит от расстояния, на которое частица сместилась

$$f = k \cdot x, \quad (8)$$

где  $f$  — модуль действующей на частицу возвращающей силы;  $k$  — коэффициент жесткости ловушки;  $x$  — отклонение частицы от центра ловушки.

Если для данной оптической системы эта зависимость известна, то, фиксируя отклонение частицы от центра ловушки, можно измерить величину внешней силы, вызвавшей это отклонение [ 64 ]. Таким образом, открываются возможности для проведения силовых измерений с помощью оптических пинцетов.

Коэффициент жесткости ловушки определяется крутизной градиента электромагнитного поля в зоне захвата, мощностью лазера и поляризуемостью частицы. Коэффициент жесткости ловушек обычно на 3—4 порядка меньше коэффициента жесткости кантилеверов, используемых в силовых измерениях АСМ. Вследствие этого оптические пинцеты обеспечивают разрешение до 0,1 пН, в то время как АСМ — до единиц пиконьютонов.

Диэлектрические частицы, как правило, имеют размеры от десятков нанометров до нескольких микрометров. Наиболее часто в задачах исследования механических свойств биомолекул используют частицы из полистирола или кварца, иммобилизуя на них исследуемые молекулы по аналогии с зондом АСМ. Кроме того, методика лазерных пинцетов позволяет работать непосредственно с биологическими объектами, например, с отдельными клетками [ 65 ] или даже органеллами внутри клеток [ 66 ].

Стандартная конфигурация оптического пинцета представлена на рис. 15. Как правило, при работе с биологическими объектами используют лазеры, излучающие в ближнем ИК диапазоне длин волн, что позволяет минимизировать неблагоприятное воздействие на объект исследования [ 67 ]. Кроме того, большинство материалов слабо поглощают волны данного диапазона.

Пучок лазера попадает на объектив с большой числовой апертурой и фокусируется, в результате чего на выходе объектива формируется перетяжка, представляющая собой "ловушку" для диэлектрических частиц. Как правило, для этих целей применяют иммерсионные объективы. В области фокусировки пучка располагается жидкостная ячейка с исследуемым образцом,

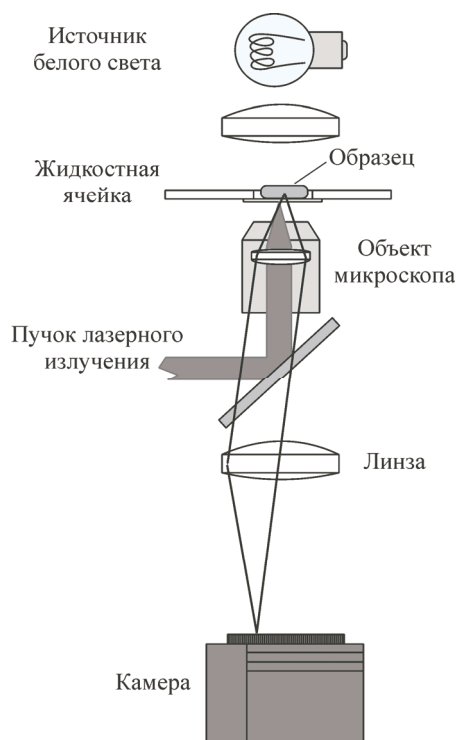


Рис. 15. Устройство простого оптического пинцета [ 68 ]

закрепленная на манипуляторе, позволяющем осуществлять перемещения ячейки в трех направлениях. Положение манипулятора с большой точностью контролируется при помощи пьезоэлемента. Свет от источника, пройдя через конденсорную линзу, попадает на образец, а затем собирается линзой и направляется на объектив цифровой камеры. Данная оптическая система позволяет осуществлять наблюдение за частицами, захваченными в ловушку.

Методика измерения сил разрыва связей с помощью оптических пинцетов заключается в следующем. Внутри жидкостной ячейки на встроенной пипетке с помощью потока воздуха фиксируется микрочастица с иммобилизованной на ней молекулой. Жидкостная ячейка (рис. 16) представляет собой две стеклянные пластинки, соединенные друг с другом таким образом, что между ними сформирована небольшая полость. В полость, заполненную жидкостью, помещается некоторое количество микрочастиц с иммобилизованными на них аффинными молекулами. Одна из таких частиц попадает в оптическую "ловушку" и прочно в ней фиксируется, после чего ячейку с помощью манипулятора начинают перемещать относительно неподвижной "ловушки". Перемещение происходит до тех пор, пока частицы, зафиксированные в ловушке и на конце микропипетки, не придут в контакт. В момент контакта между аффинными молекулами происходит процесс биораспознавания и образование комплекса. Затем ячейку с определенной скоростью перемещают в обратном направлении и получают силовую кривую, отражающую процесс разрыва связей между молекулами (рис. 17).

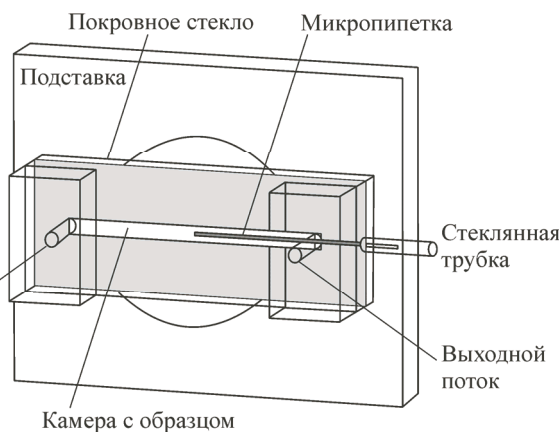
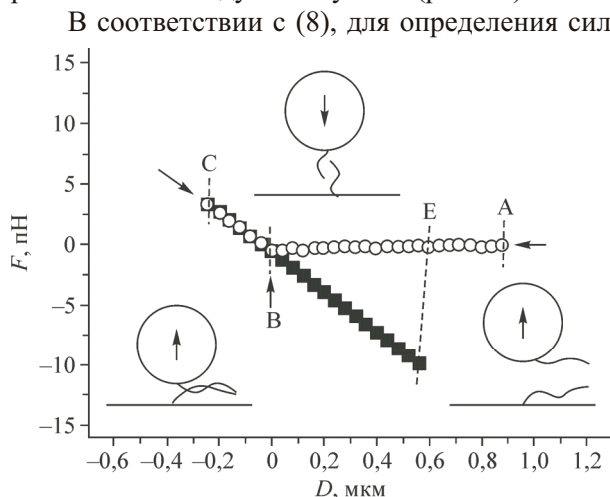


Рис. 16. Жидкостная ячейка [ 70 ]

В соответствии с (8), для определения силы требуется точное измерение смещения захваченной частицы. Существует два основных подхода к фиксации смещений. Первый из них заключается в использовании видеокamеры, позволяющей определять перемещения частиц с точностью до 10 нм, которая зачастую оказывается недостаточной для решения определенного круга задач. Однако были опубликованы данные о системе видеонаблюдения, обеспечивающей разрешение до 1 нм [ 69 ]. Другой подход заключается в примене-

Рис. 17. Силовая кривая, полученная методом оптического пинцета [ 71 ]

нии дополнительного четырехсекционного фотодетектора, фиксирующего поток излучения, рассеянного на частице. Смещение частицы внутри ловушки приводит к изменению направления рассеянного на ней света. В результате изменяется величина сигнала, получаемого с каждого сектора, что позволяет с большой точностью измерить смещение частицы.

Методика оптических пинцетов не лишена ряда существенных недостатков. Интенсивность излучения лазера в области ловушки иногда настолько высока, что способна вызвать локальное нагревание захваченных объектов. Излучение лазера, работающего на длине волны 1064 нм, приводит к разогреву образца, находящегося в водной среде, на  $0,8^\circ$  на каждые 100 мВт его мощности [ 72 ]. Локальный нагрев приводит к возникновению процессов конвективного теплопереноса в жидкой среде, что уменьшает точность измерений. Подобные процессы также неблагоприятно сказываются на химико-биологических свойствах исследуемых объектов. Другим существенным недостатком оптических пинцетов является возможность захвата в ловушку сразу нескольких частиц, что приводит к ошибкам измерений. Кроме того, результатом интерференционных явлений, характерных практически для всякой оптической системы, зачастую является возникновение так называемых мнимых ловушек (ghost traps) и ложных сигналов.

**2.2. Применения оптических пинцетов в измерениях сил разрыва связей.** Области применения оптических пинцетов в задачах измерения сил разрыва связей, по сути, не отличаются от областей применения методики АСМ в режиме измерения силы. Как и АСМ, данный подход позволяет изучать прочность взаимодействий между одиночными молекулами, исследовать механические свойства белков и нуклеиновых кислот и т.д. Выбор того или иного метода измерения зависит от особенностей исследуемой системы и совместимости его с другими исследовательскими методиками, применяемыми в конкретной задаче.

Оптические пинцеты успешно применяются в изучении процессов взаимодействий лиганд—рецептор. В работе [ 73 ] исследовали роль эндоцитоза в активации трансмембранного рецептора, а также его влияние на прочность связей, образуемых при взаимодействии клеток. Установлено, что вопреки сделанным ранее предположениям такие явления, как эндоцитоз и рециркуляция, не оказывают влияния на прочность связей. Т. Stangner с соавторами [ 74 ] исследовали процессы взаимодействий между моноклональными антителами (НРТ-101) и таупептидами, фосфорилированными различным образом. Благодаря высокой чувствительности методики оптических пинцетов удалось установить, что моноклональные антитела способны связываться со всеми вариантами таупептидов, чего не удавалось ранее обнаружить методом ИФА. В данной работе оптические пинцеты применили также для определения аффинности таких взаимодействий. Зачастую измерения осуществляют на экспериментальной установке не с одной, а двумя оптическими ловушками, на которых происходит захват обеих взаимодействующих молекул. Подобная конфигурация применялась в исследовании аффинности ингибитора тирозинкиназы PD153035 к молекулам ДНК [ 75 ]. PD153035 является одним из перспективных средств для таргетной терапии и, как было экспериментально установлено, основным механизмом его связывания с молекулами ДНК является интеркаляция. Однако обнаружено, что при рН, близких к физиологическим, способность связывания крайне низка.

Методика оптических пинцетов успешно используется в задачах исследования бактериальной адгезии. Работа М. Castelain et al. [ 76 ] посвящена изучению биомеханических свойств пилей F1C, регулирующих адгезию кишечной палочки (*Escherichia coli*). Методом оптических пинцетов также исследовали механические свойства пилей CFA/I, являющихся фактором колонизации кишечной палочки [ 77 ] и фимбрий CS2, относящихся к группе факторов колонизации CFA/II [ 78 ]. Пили подобных типов обладают спиральной структурой, и их наличие является характерным для грамотрицательных бактерий. Воздействие внешней силы, обусловленной влиянием различных факторов среды обитания, приводит к раскручиванию спирали. Возникновением подобных структурных изменений и обуславливается прочная связь бактерий с инфицированным организмом. Пили грамположительных бактерий имеют иную структуру и представляют собой линейную цепочку, состоящую из сотен звеньев основного белка (пилина) и одного или двух звеньев адгезионных пилинов. Механические свойства подобных пилей на

сегодняшний день слабо изучены. В работе [ 79 ] методами оптических пинцетов и просвечивающей электронной микроскопии изучали морфологические и биомеханические свойства линейных пилей молочнокислой бактерии *Lactococcus lactis*.

В развитии некоторых трансмиссивных заболеваний участвуют одноядерные примитивные особи, мерозоиты. А.Ж. Стик с соавторами [ 80 ] использовали оптические пинцеты для изучения прочности связывания с эритроцитами мерозоитов *Plasmodium falciparum*, возбудителя малярии. В работе изучали влияние таких ингибиторов, как гепарин и цитохалазин D, а также фермента химотрипсина на процесс связывания.

Некоторые бактерии, например, *Deinococcus radiodurans*, проявляют устойчивость к УФ и ионизирующему излучению за счет быстро протекающих процессов репарации их ДНК. Для изучения процессов формирования филаментов нуклеопротеидов RecA, участвующих в процессе репарации ДНК, а также их механических свойств авторы работы [ 81 ] применили методу оптических пинцетов, совмещенную с микрофлюидикой.

### 3. Измерение силы с помощью кварцевого резонатора

Предложенный метод [ 82 ], основанный на применении кварцевых резонаторов, имеет более простое аппаратное исполнение, но тем не менее позволяет получить достоверные данные о силе разрыва связи. Так же как и метод атомно-силовой микроскопии, сканирование явлений отрыва не использует электромагнитного излучения. Этот метод регистрирует возбуждение колебаний, вызванное разрывом связей между частицей и подложкой. В отличие от обычных способов применения кварцевого резонатора (например, в качестве микровесов или резонансного сенсора в биохимии), в этом методе кварцевый резонатор не только используется как сенсор, но и играет активную роль по отношению к прикрепленным к его поверхности частицам.

Воздействие управляющего напряжения на кварцевый кристалл приводит к сдвиговым колебаниям его поверхности, на которой иммобилизованы специфические рецепторы, связанные с интересующими молекулами. Разные значения напряжения вызывают колебания разной амплитуды, при увеличении амплитуды колебаний происходит отрыв прикрепленного объекта от поверхности кварцевого резонатора. При этом разрыв связей разной специфичности происходит при разных напряжениях, неспецифические взаимодействия разрываются при более низких значениях напряжения, чем специфические. Таким образом, меняя значение напряжения, можно избавиться от неспецифического связывания и детектировать специфические взаимодействия. Метод позволяет исследовать силу связи в широком диапазоне — от весьма слабых неспецифических до водородных связей и сильных ковалентных взаимодействий.

Пьезоэлектрические свойства кварцевого резонатора позволяют использовать его как микрофон и детектировать возбуждение колебаний подложки, вызванных разрывом связи. Эти колебания конвертируются в электрический сигнал. Сигнал указывает не только на присутствие аналита (детектируемых частиц), но и на их количество, а также на их сродство к рецептору, прикрепленному к поверхности. Процесс сканирования требует минимальной пробоподготовки, может осуществляться в разных средах (в вакууме, на воздухе, в жидкости), занимает лишь несколько минут. Метод применим для измерения силы связи, поскольку частицы на поверхности резонатора, связанные с детектируемым аналитом, образуют схему усилителя.

Главное преимущество данного метода заключается в том, что измерение идет не для отдельно взятой молекулы, а на всем ансамбле молекул, в результате получается усредненный результат за одно измерение. В настоящее время применяется три типа схемы измерения силы отрыва с использованием кварцевого резонатора. Первоначально применялась схема, показанная на рис. 18 [ 82 ]. В этой схеме с генератора подавалось напряжение на кварцевый резонатор с частотой, равной резонансной частоте QCM. При увеличении амплитуды колебаний поверхности QCM создаются условия для отрыва закрепленной частицы от поверхности, и в момент отрыва появляется акустический сигнал, который фиксируется с помощью селективного усилителя. Нужно заметить, что при обычно используемых в этом методе степенях заполнения поверхности наночастицами (около 1 %) изменение частоты  $dF/F$  гораздо ниже, чем дает фон температурных неоднородностей материала, поэтому наличие объектов на поверхности по

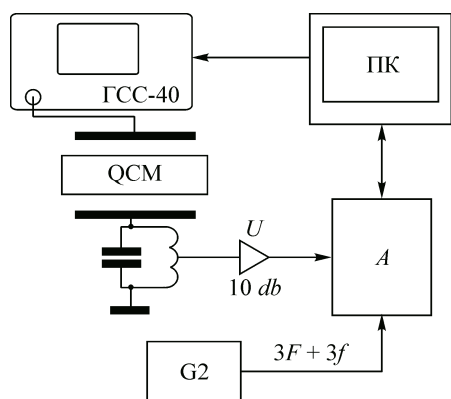


Рис. 18. Схема установки для исследования явления отрыва [ 82 ]

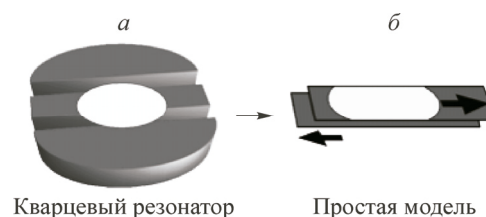


Рис. 19. Модель кварцевого резонатора в виде двух тонких полосок [ 83 ]

сдвигу частоты зафиксировать уже нельзя. Но момент отрыва может быть зафиксирован в виде акустического шума. Чтобы метод стал рабочим инструментом химика, биолога или врача, необходимо математическое описание физики колебаний в резонаторах. Ни один из существующих в настоящее время методов не описывает взаимодействие частицы малой массы с поверхностью кварцевого резонатора. Поэтому авторы [ 83 ] разработали собственную полуэмпирическую модель, основанную не на вычислении из первых принципов всевозможных поправок к колебаниям нагруженной кварцевой пластины, а на введении сложновычисляемых величин из эксперимента. Этот подход сводит сложную трехмерную задачу к одномерной и позволяет проследить влияние распределенной и локализованной весовой нагрузки на частотный отклик реального резонатора. В этой модели кварцевый резонатор представлен в виде двух тонких полосок, движущихся встречным образом, как схематично представлено на рис. 19.

Какова физическая картина возникновения сигнала отрыва? Присутствие объектов на поверхности резонатора приводит к незначительному искажению формы колебаний мембраны в виде характерной "воронки". Принципиален сам факт искажения формы колебаний, потому что, как только объект покинет поверхность, форма колебаний вернется в состояние основной моды. В резонаторной пластинке возникнет переходный процесс с высшими гармониками, который и представляет собой сигнал отрыва.

На рис. 20 показана рассчитанная по модели разность колебаний нагруженной и свободной поверхности для двух положений точечного объекта  $m$ . Нижней точке характерной "воронки"

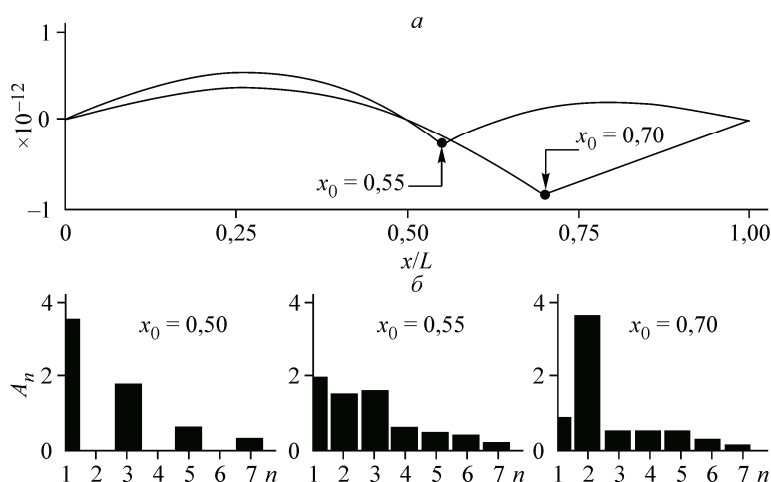


Рис. 20. Схема возникновения сигнала (а); рассчитанные сигналы на разных гармониках в зависимости от положения объекта на кварце (б) [ 83 ]



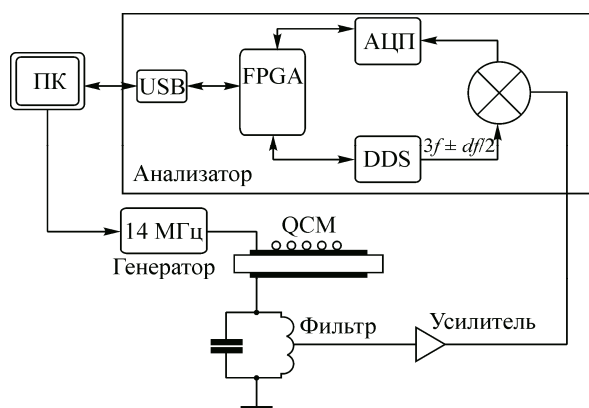


Рис. 21. Схема установки с использованием анализатора (ПК — персональный компьютер, QCM — резонатор, вырезанный из круглой кварцевой пластины размером  $1,5 \times 8$  мм [ 83 ])

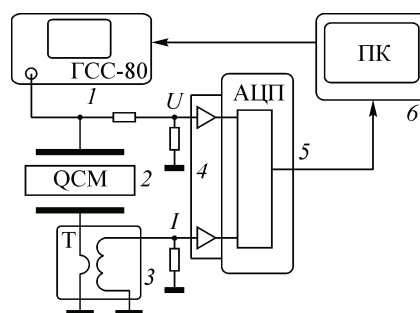


Рис. 22. Экспериментальная схема измерений амплитудно-частотных характеристик [ 84 ]

соответствует положение объекта. Разложив эту разность колебаний по собственным гармоникам резонатора, авторы получили спектр сигнала отрыва, показанный на рис. 20, б. Если объект находится точно в центре резонатора длины  $L$ , то вторая и все четные гармоники отсутствуют вовсе. Согласно расчетам по этой модели, при смещении объекта от центра наблюдается рост второй гармоники, и для положения  $x/L = 0,55$  величины сигналов второй и третьей гармоник сравниваются. При дальнейшем увеличении отклонения до  $x/L = 0,7$  сигнал отрыва состоит преимущественно из второй гармоники. Все три случая отражены на рис. 20, б.

При размещении объектов в центральной части резонатора измерения лучше всего проводить на третьей гармонике. Для выделения гармоники использовался фильтр на частоту  $(3F+f)$ . Недостатком данной схемы является то, что необходимо очень точно настраиваться на резонансную и  $(3F+f)$  частоты. Применение второй схемы (рис. 21) позволяет проводить измерения шумового сигнала не на фиксированной частоте, а в интервале частот вблизи  $(3F+f)$ , что позволяет упростить настройку и повысить точность метода.

На рис. 21 показана схема проведения эксперимента. Гармоническое напряжение  $U_0$  плавно изменяемой амплитуды (от 0 до 10 В за время 30—120 с) с частотой кварцевого резонатора ( $F = 14$  МГц) подается от генератора. При увеличении амплитуды напряжения увеличивается амплитуда сдвиговых колебаний поверхности кварцевого резонатора и происходит отрыв прикрепленного объекта от поверхности, при этом образуется акустический сигнал, который фиксируют тем же самым кварцем. Сигнал, который появляется при разрыве связи, снимается с фильтра, настроенного на третью гармонику в узкой полосе  $\pm 5$  кГц, и через дополнительный усилитель поступает на вход устройства, выполняющего функции анализатора, соединенного по USB-порту с ПК. В [ 83 ] использовали резонатор в виде полоски шириной 1,5 мм, вырезанной из обычного резонатора с диаметром диска 8 мм, с ориентацией полоски вдоль смещений сдвиговой моды. Согласно представлениям [ 83 ], боковые области кварцевого резонатора являются балластными, и это было подтверждено экспериментально. По сравнению с круглой пластиной резонатор в форме полоски лучше справляется с ролью чувствительного микрофона и дает сигнал отрыва с более четкими, ярко выраженными фронтами. Все измерения проводятся в жидкости, кювета-ячейка сделана таким образом, что одна сторона — воздух, вторая — жидкость. Ячейка термостатирована при 30 °С.

Следующий способ фиксирования сигнала отрыва имеет простую схему измерения (рис. 22). На кварцевый резонатор подается частотно-модулированный (ЧМ) сигнал, частота увеличивается линейно. Диапазон сканирования частоты  $df$  выбирается так, чтобы проходить положение резонанса. Обычно для кварца 14—15 МГц эта величина составляет  $df = 20$ —30 кГц. С каждым шагом увеличиваем амплитуду переменного напряжения, подаваемого на

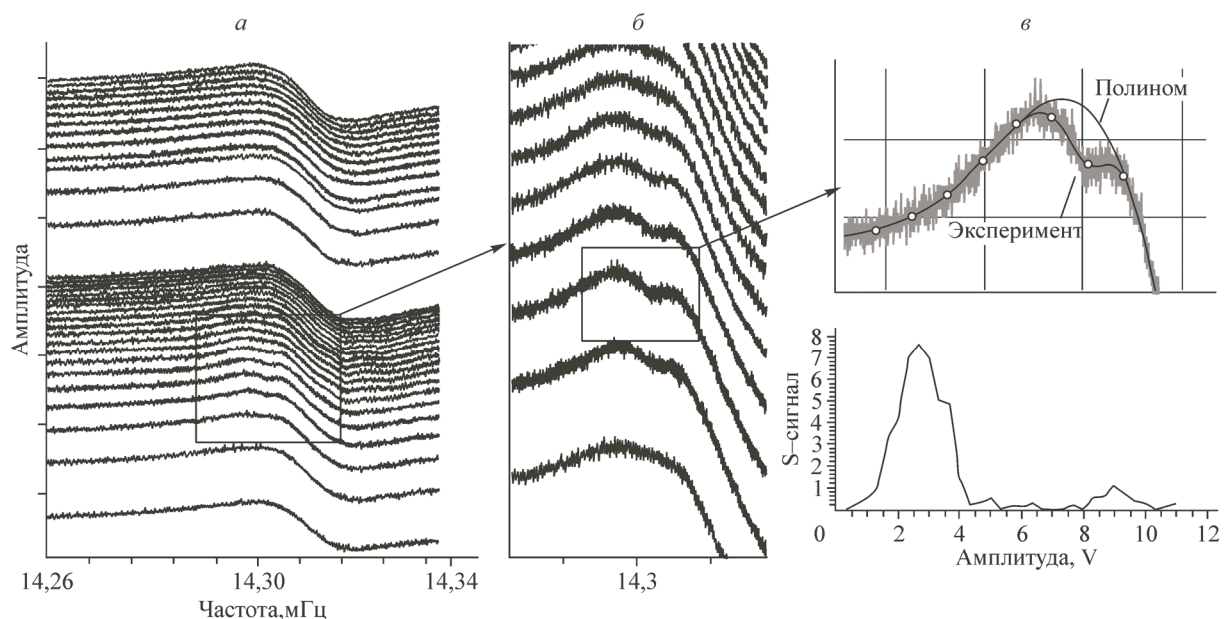


Рис. 23. Схема объясняет происхождение  $S$ -сигнала: описание амплитудно-частотной зависимости для различных значений напряжения, прикладываемого к QCM (*a*). Поэтапно увеличивающееся напряжение снизу вверх, от 0 до 10 В. По оси  $x$  изменение частоты вблизи резонансной частоты QCM. Искажения, сопровождающиеся отделением (отрывом) частицы, проявляются на определенной величине напряжения (эта область отмечена на рис. *a* и показана более детально на рис. *б*).  $S$ -сигнал — это сумма абсолютных значений интегралов или площадь между экспериментальной кривой и полиномом, огибающим его (см. верхний рис. *в*). Получается набор значений. На нижнем рис. *д* зависимость  $S$ -сигнала от амплитуды напряжения, прикладываемого к QCM. Можно видеть, что отрыв происходит на напряжении 2—4 В; точное положение максимума определяется приравниванием к нулю производной аналитической параболы  $y = ax^2 + bx + c$ , которая проведена по точкам около максимума. Приведены данные для раскручивания двойной спирали олигонуклеотидов ON1/ON2 (см. ниже) (поверхностная концентрация ON1  $\times 10^{11}$  молекул/мм<sup>2</sup>) [ 84 ]

кварцевый резонатор. С помощью АЦП записывается ток ( $I$ ), проходящий через кварцевый резонатор, и напряжение ( $U$ ). Для увеличения динамического диапазона и детектирования сигнала используется логарифмический усилитель. Для измерения тока используется трансформатор тока (Т). Управление генератором и сбор данных проводятся компьютером (ПК) в среде CVI-LabWindows. В момент отрыва на амплитудно-частотной зависимости появляются искажения.

**3.1. Обработка данных.** Если привязать объект нанометрового размера к поверхности QCM (АТ-срез) (колебания сдвига по толщине) и подавать переменное напряжение различной частоты вблизи резонанса ( $\pm 40$  кГц в нашем случае), поверхность QCM будет колебаться в сдвиговой моде с амплитудой, зависящей от значения прикладываемого напряжения. Амплитудно-частотная зависимость будет выглядеть как показано на рис. 23, *a*. Эта зависимость описывается эквивалентной схемой нагруженного QCM. С увеличением амплитуды поверхности QCM частица, прикрепленная к поверхности, отделяется, и в этот момент появляются искажения на амплитудно-частотной зависимости (см. рис. 23, *б*). Величина искажения зависит от числа оторванных объектов, их массы и силы связывания объекта с поверхностью. Сила разрыва определяется из значения прикладываемого напряжения.

Величина искажения называется  $S$ -сигналом, который получают с помощью математической обработки амплитудно-частотных кривых. Этот сигнал регистрируется на различных значениях напряжения (см. рис. 23, *в*). Этот метод был описан более детально в [ 84 ].

Эта методика была применена для определения силы раскручивания спирали ДНК. Для этого было необходимо рассмотреть силы, действующие на тело, прикрепленное к движущейся поверхности в жидкости. Между поверхностью твердого тела и всякой вязкой жидкостью все-

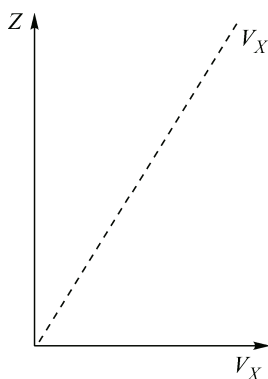


Рис. 24. Зависимость скорости жидкости относительно подложки от расстояния (ось  $Z$ )

гда существуют силы молекулярного сцепления, приводящие к тому, что прилегающий к твердой стенке слой жидкости (так называемый  $\delta$ -слой) полностью задерживается, как бы прилипая к ней. Соответственно этому, граничное условие к уравнениям движения вязкой жидкости состоит в требовании обращения в нуль скорости жидкости на неподвижных твердых поверхностях. Для того чтобы описать движение тела в жидкости, необходимо знать его скорость. Величину скорости можно оценить из амплитуды колебаний кварца.

При частоте кварцевого резонатора  $f = 14$  МГц и напряжении 8,0 В амплитуда сдвиговых гармонических осцилляций достигает  $x_0 \sim 0,4$  мкм [85]. Максимальная скорость  $u_0 = -\Omega \cdot x_0 \cdot \sin(\Omega t) \sim 35$  м/с.

**3.2. Сила сопротивления движению в жидкости.** Несмотря на то, что закрепленный объект неподвижно "вморожен" в  $\delta$ -слой, внутри самого  $\delta$ -слоя из-за градиента скоростей есть слабые течения. Разница скоростей от подложки QCM до верхнего конца ( $d = 2 + 12 = 14$  нм) олигонуклеотида равна  $\Delta V \sim u_0 \cdot (1 - e^{-d/\delta}) \sim u_0 d/\delta \sim 35 \cdot 14/150 = 3,3$  м/с. Для оценки силы сопротивления можно заменить неоднородный поток однородным со скоростью 1,6 м/с, равной средней скорости обтекания на полувысоте объекта. Новое число Рейнольдса при обтекании даже меньше единицы:  $Re = \rho u d/\eta \sim 1 \cdot 160 \cdot 12 \cdot 10^{-7}/0,01 = 0,12$ , что позволяет воспользоваться известной формулой Стокса [86] для силы сопротивления сферы потоку вязкой жидкости:  $F_{\text{res}} = 6\pi(d/2)\eta(\Delta V/2) = 6\pi(10 \cdot 10^{-7}) \cdot 0,01 \cdot 300 = 560$  пН. Как было показано в работе [87], сила сопротивления при обтекании на порядок превосходит инерционные силы  $F_{\text{inert}}$ , поэтому сила сопротивления зависит от расстояния от подложки, и при  $\delta \gg L$  (длина молекулы) зависимость скорости от расстояния до подложки можно считать линейной, как показано на рис. 24.

**3.3. Подготовка образцов. Модификация поверхности.** Для измерения силы с помощью кварцевого резонатора необходимо применять кварцевые пластинки АТ-среза. Обычно используют пластинки диаметром 8,25 мм, плоско-выпуклые (кривизна 0,2 диоптрии), работающие на резонансной частоте 14,3 МГц (Morion Inc., Санкт-Петербург, Россия), либо пластинку-полоску, вырезанную из такого кварца. Модификация поверхности была выполнена с использованием двух различных методик:

(i) Карбоксильные группы (COOH) были связаны с золотым электродом (на поверхности QCM) через тиольные группы. Для этой цели были использованы тиолы: 1-декантиол  $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_8\text{CH}_2\text{SH}$  (тиол 1) (Sigma-Aldrich) и меркаптододекановая кислота  $\text{HSCH}_2(\text{CH}_2)_9 \times \text{CH}_2\text{COOH}$  (тиол 2) (Sigma-Aldrich). После закрепления на поверхности эти соединения содержат концевые группы  $\text{CH}_3$  и COOH соответственно. Соотношение концентраций тиола (1) и тиола (2) было выбрано, принимая во внимание размер молекул ДНК: 2 нм (ширина) и 10—12 нм (длина). Чтобы исключить взаимодействие закрепленных на поверхности молекул ДНК друг с другом, необходимо фиксировать их на расстоянии не менее чем 10 нм друг от друга (до 20 нм в наших экспериментах). Так, было выбрано соотношение тиола (1) к тиолу (2) 10000/1—40000/1. Полученная поверхность содержала группы  $\text{CH}_3$  и очень небольшую концентрацию групп COOH (рис. 25). Концентрация групп COOH должна быть ниже, чтобы обеспечить степень покрытия поверхности молекулами ДНК менее 1%. После того как был осажден монослой тиолов, олигомер с аминогруппой был прикреплен к карбоксильной группе с помощью стандартной процедуры EDC/NHS.

(ii) Вторая методика химической модификации (полученная поверхность показана схематично на рис. 26) аналогична той, что описана в работах с АСМ [5, 88—90]. Для модификации была использована аналогичная процедура: диоксид кремния осаждался на QCM при температуре 200 °С. Затем поверхность обрабатывали в  $\text{K}_2\text{CrO}_4$  для получения большей концентрации ОН-групп на поверхности. Далее образец помещали в атмосферу аминопропилтриэтоксисилана

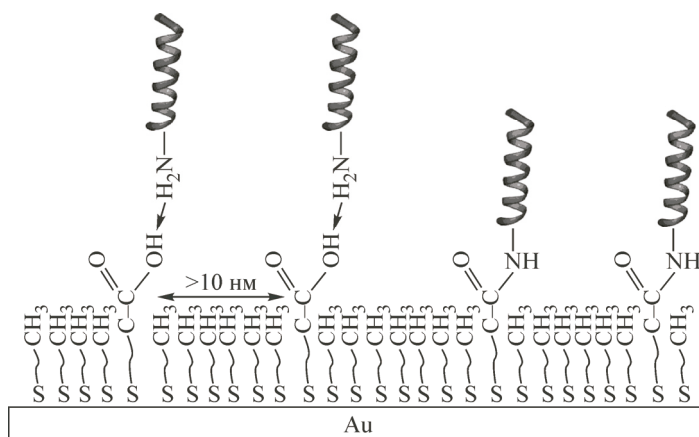


Рис. 25. Поверхность с прикрепленными к ней ON1 (5'-NH<sub>2</sub>-TCAGGCAGTACCACAAGGCC-3') [ 91 ]

и инкубировали в течение 12 ч при комнатной температуре, после чего выдерживали в течение 2 ч при температуре 80 °С. Для активации поверхность обрабатывали раствором цианурхлорида в ацетонитриле (концентрация 4 мг/мл) в течение 2 ч, перемешивая при комнатной температуре, промывали ацетонитрилом (5 раз по 1 мл) и затем раствором SBB буфера. Для иммобилизации олигонуклеотидов на активированную поверхность наносили раствор биомолекул в SBB буфере или в 0,15 М NaCl (концентрация олигонуклеотидов 10<sup>-5</sup> М) и выдерживали при комнатной температуре в течение 12 ч. После этого промывали поверхность буферным раствором, содержащим 0,02 М Трис/НСl рН 7,5, 0,1 М NaCl, 0,002 М MgCl<sub>2</sub>, 0,05 % Твин-20.

В отличие от первой методики модификации поверхности, где узлами прикрепления ДНК являются карбоксильные группы, здесь активна вся поверхность, и необходимая концентрация ДНК достигается добавлением необходимого количества олигомера с концевыми аминогруппами.

Для тиольной модификации поверхности отделение несвязанного олигомера от поверхности происходит при 8 В. Для второй методики сигнал отрыва не наблюдали, так как он нахо-

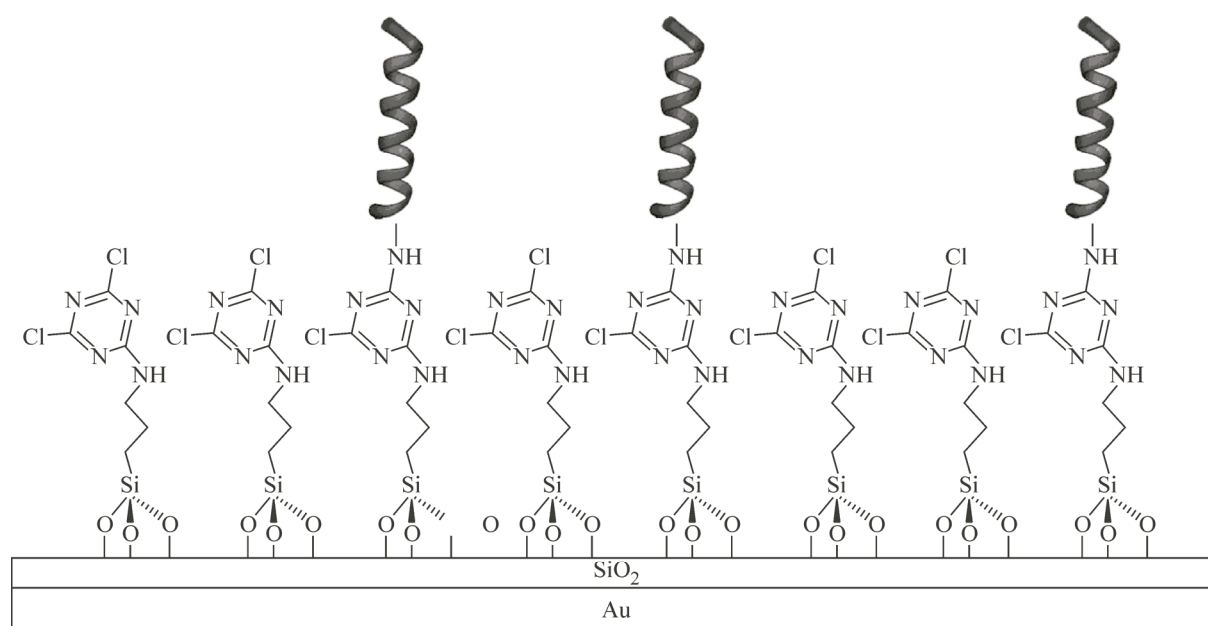


Рис. 26. Схема приготовления поверхности с использованием второй методики модификации поверхности [ 91 ]

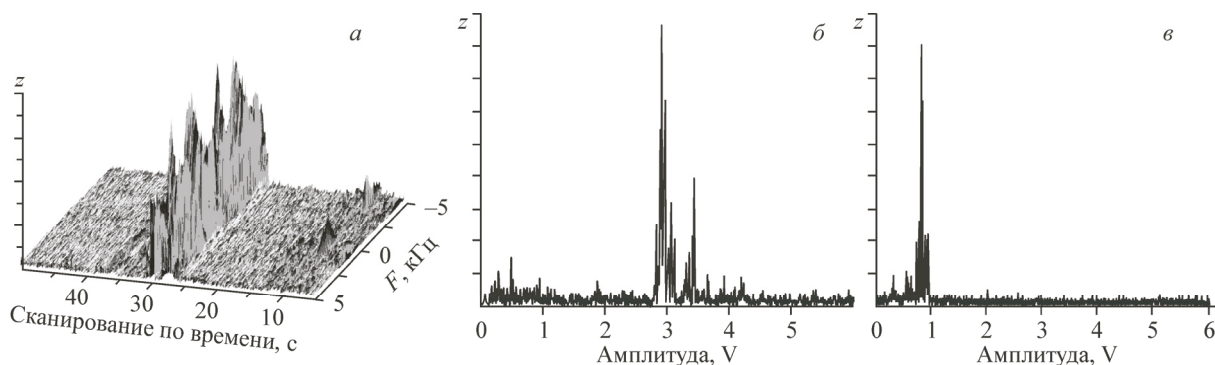


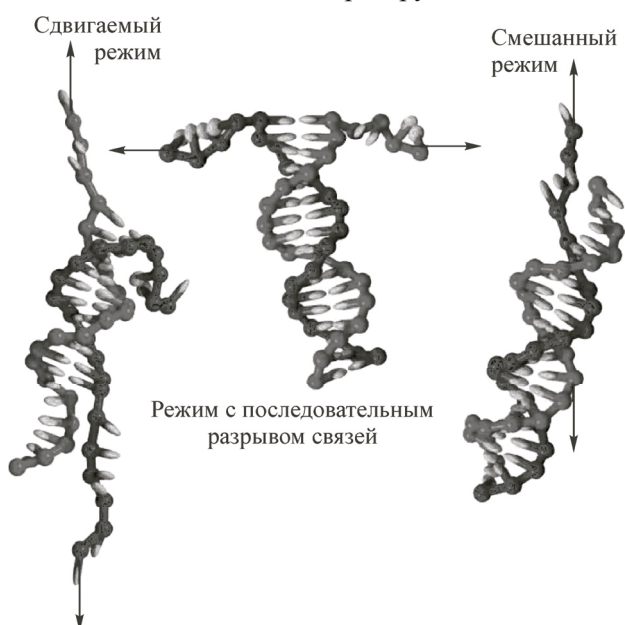
Рис. 27. 3D сигнал, полученный с анализатора спектра (схема 2) при наличии комплементарной пары. Сканирование проводится по частоте  $\pm 5$  кГц, с каждым шагом плавно увеличивается амплитуда напряжения (0—6 В), подаваемого на кварц (ось Сканирование по времени); зависимость сигнала от амплитуды при добавлении комплементарной пары (а), сигнал после преобразования в 2D (б); аналогичный 2D-сигнал для некомплементарной пары (в). Z — акустический сигнал, усл. ед. [ 92 ]

дится выше 10 В (более сильная связь молекулы ДНК с поверхностью). Поскольку сигнал, при котором происходит раскручивание двойной спирали, находится в диапазоне 3—4 В, обе методики подходят для модифицирования поверхности. Однако в случае тиольной модификации самой слабой связью, определяющей фиксацию ДНК на поверхности, является связь золото—сера. На раскручивание спирали ДНК идет меньше энергии, поэтому лучше использовать тиольную модификацию, так как она обеспечивает контролируемое количество и более упорядоченное расположение молекул ДНК на поверхности, что исключает их взаимное влияние (расстояние между молекулами больше, чем их длина). Таким образом, может быть получен более четкий сигнал.

В работе [ 92 ] показан метод определения силы раскручивания спирали с использованием схемы 2. Данная методика позволяет получить 3D картинку сигнала отрыва (рис. 27).

**3.4. Применение кварцевого резонатора для раскручивания ДНК.** Рассмотрим применение разных методов к раскручиванию двойной спирали ДНК для ответа на вопрос о том, какова сила раскручивания ДНК.

В качестве объекта исследования были выбраны два полностью комплементарных олигонуклеотида. В работе [ 93 ] показано, каким способом можно произвести раскрутку и каковы ожидаемые значения сил раскручивания. Молекула ds-ДНК может разрываться несколькими



способами (рис. 28). Если сила приложена к противоположным концам цепочек параллельно сахар-фосфатному скелету, то разрыв будет происходить в сдвиговом режиме. Если сила приложена перпендикулярно сахар-фосфатному скелету, то будет осуществляться режим с последовательным разрывом связей между азотистыми основаниями. Кроме того, может быть реализован и смешанный режим разрыва.

В работе [ 94 ], в которой впервые применили к ДНК метод, позволяющий исследовать одиночную молекулу — оптический пинцет, авторами было показано, что при

Рис. 28. Реализация определенного режима разрыва определяется способом иммобилизации цепочек [ 93 ]

силе около 65 пН ds-ДНК удлиняется примерно в 1,7 раза по сравнению с нормальной длиной В-формы ds-ДНК. Переход очень согласованный, ширина  $F \rightarrow x$  плато составляет всего лишь несколько пиконьютонов. При превышающей силе наблюдается довольно большое плато по  $x$ , профиль соответствует переходу длины ds-ДНК к длине ss-ДНК, поэтому было высказано предположение, что происходит переход из ds-ДНК в ss-ДНК [94, 95]. Однако в дальнейшем это предположение было опровергнуто на основании того, что 65 пН недостаточно для раскручивания спирали [96]. Но в работе [97] было показано, как экспериментальные кривые растяжения ds-ДНК и ss-ДНК могут быть использованы для получения силы разрыва в зависимости от вкладов свободной энергии перехода между состояниями молекулы "helix" и "coil". Сравнивая свободную энергию дестабилизации под действием силы с изменением свободной энергии плавления ДНК без приложенной силы, авторы сделали вывод, что плавление В-ДНК должно произойти при силе от 60 до 80 пН.

Экспериментально показано, что величина силы зависит от типа последовательности и может меняться от 65 до 300 пН. Так, плавление поли-(dG-dC) ДНК сдвинуто к 300 пН, а поли-(dA-dT) плавится при силе 35 пН.

Зависимость силы разрыва от геометрии также рассматривали в работе [1]. Было рассмотрено два случая геометрии перехода ds-ДНК в ss-ДНК: в одном случае разъединение проходило аналогично расстегиванию замка-молнии. Было показано, что таким образом можно определить непосредственно энергии АТ и GC пар оснований. В [61, 97, 98] было показано, что сила при zip-геометрии двойной спирали ДНК не зависит от типа двойной спирали. Тем не менее сила зависит от АТ и GT последовательностей. В АТ паре оснований стабилизация обеспечивается только через две водородных связи, в то время как в GC паре оснований — с помощью трех водородных связей. По этой причине для АТ-богатых последовательностей раскрытие происходит при усилении 10 пН, в то время как GC-богатые последовательности открываются только при силе около 25 пН. Для последовательностей со смешанными АТ и GC раскрытие происходит при промежуточном значении силы. Так, для типичной последовательности ДНК из 30 пар оснований длина плато составляет около 27 нм и находится в хорошем согласии с ожидаемой длиной — около 30 нм. Сила раскрытия ДНК составляет около 20 пН.

Геометрия сдвига в этом случае следующая: двойная спираль растягивается параллельно молекуле, и сила действует одновременно на всех парах оснований двойной спирали. Сила разрыва зависит от скорости нагружения и длины последовательности [100].

Реализовать тот или иной режим можно, иммобилизовав взаимодействующие цепочки определенным образом. Наибольшие силы наблюдаются при сдвиговом режиме.

Теперь рассмотрим как происходит раскручивание спирали на кварцевом резонаторе и оценим силы. Как было сказано выше, при движении поверхности возникает довольно сильный градиент скоростей в  $\delta$ -слое. В этом случае большую роль играет гидродинамика молекулы, т.е. направление движения жидкости и геометрия тела: считаем молекулу вытянутым эллипсоидом. Оценим скорость потока жидкости, в котором находится вытянутая молекула размером олигонуклеотида (11 нм), раскручивание наблюдается при напряжении 3 В (в этом случае скорость поверхности кварца  $u_0 = 12$  м/с [87])  $u \sim u_0(1 - e^{-d/\delta}) \sim u_0 \cdot d/\delta \sim 12 \times 11/150 = 0,88$  м/с. Если оценить разность скоростей верхнего и нижнего слоя, то она составляет ~6%. Для оценки силы, действующей на нанобъект, возьмем скорость на полувысоте и вычислим силу по формуле Стокса, поскольку мы имеем дело с ламинарными потоками:  $F_C = 6\pi R\eta u$ , что составляет около 30—40 пН. Это значение полностью подтверждает, что в случае кварцевого резонатора раскручивание идет по механизму, аналогичному расстегиванию замка-молнии. Методика имеет преимущество в том, что не использует электромагнитное излучение, сила разрыва связи определяется механическим способом — аналогично АСМ, но в отличие от АСМ в данной методике измерение проводят не на одной молекуле, а на всех молекулах, закрепленных на поверхности, и получается усредненный результат по всему ансамблю молекул на поверхности. Второе преимущество заключается в том, что не требуется осуществлять поиск объекта на поверхности.

Работа выполнена при поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации в рамках федеральной целевой программы "Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2014—2020 годы", Соглашение № 14.607.21.0125 от 27.10.2015 г., уникальный идентификатор прикладных научных исследований и экспериментальных разработок RFMEFI60715X0125.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kufer S.K., Puchner E.M., Gump H., Liedl T., Gaub H.E. // *Science*. – 2008. – **319**. – P. 594 – 596.
2. Strunz T., Oroszlan K., Schafer R., Guntherodt H.-J. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* – 1999. – **96**. – P. 11277 – 11282.
3. Kienberger F., Kada G., Mueller H., Hinterdorfer P. // *J. Mol. Biol.* – 2005. – **34**. – P. 597 – 606.
4. Grabowski S.J. // *Annu. Rep. Prog. Chem. C*. – 2006. – **102**. – P. 131 – 165.
5. Binnig G., Quate C.F., Gerber C. // *Phys. Rev. Lett.* – 1986. – **56**. – P. 930 – 933.
6. Minne S.C., Flueckiger P., Soh H.T., Quate C.F. // *J. Vacuum Sci. & Techn. B*. – 1995. – **13**, N 3. – P. 1380 – 1385.
7. Junno T., Deppert K., Montelius L., Samuelson L. // *Appl. Phys. Lett.* – 1995. – **66**, N 26. – P. 3627 – 3629.
8. Lyubchenko Y.L., Shlyakhtenko L.S. // *Proc. Natl. Acad. Sci.* – 1997. – **94**, N 2. – P. 496 – 501.
9. Lee Y.C., Kim H.J., Kim K.S., Choi S., Kim S.W., Park H.K., Eun Y.G. // *Microscopy Res. Techn.* – 2015. – **78**, N 7. – P. 569 – 576.
10. Leitner M., Mitchell N., Kastner M., Schlapak R., Gruber H.J., Hinterdorfer P. // *ACS Nano*. – 2011. – **5**, N 9. – P. 7048 – 7054.
11. Rettler E., Hoepfener S., Sigusch B.W., Schubert U.S. // *J. Mater. Chem. B*. – 2013. – **1**, N 22. – P. 2789 – 2806.
12. Li Q., Doyran B., Gamer L.W., Lu X.L., Qin L., Ortiz C., Grodzinsky A.J., Rosen V., Han L. // *J. Biomechanics*. – 2015. – **48**, N 8. – P. 1364 – 1370.
13. Butt H.J., Cappella B., Kappl M. // *Surface Sci. Rep.* – 2005. – **59**, N 1. – P. 1 – 152.
14. Leite F.L., Bueno C.C., Da Róz A.L., Ziemath E.C., Oliveira O.N. // *Intern. J. Mol. Sci.* – 2012. – **13**, N 10. – P. 12773 – 12856.
15. Kramers H.A. // *Physica*. – 1940. – **7**, N 4. – P. 284 – 304.
16. Bell G.I. // *Science*. – 1978. – **200**, N 4342. – P. 618 – 627.
17. Evans E., Ritchie K. // *Biophys. J.* – 1997. – **72**, N 4. – P. 1541.
18. Willemsen O.H., Snel M.M., Van Der Werf K.O., De Grooth B.G., Greve J., Hinterdorfer P., Gruber H.J., Schindler H., Yvette van Kooyk, Figdor C.G. // *Biophys. J.* – 1998. – **75**, N 5. – P. 2220 – 2228.
19. Allen S., Davies J., Dawkes A.C., Davies M.C., Edwards J.C., Parker M.C., Roberts C.J., Sefton J., Tendler S.J.B., Williams P.M. // *FEBS Lett.* – 1996. – **390**, N 2. – P. 161 – 164.
20. Lee G.U., Chrisey L.A., Colton R.J. // *Science*. – 1994. – **266**, N 5186. – P. 771 – 773.
21. Drew M.E., Chworos A., Oroudjev E., Hansma H., Yamakoshi Y.A. // *Langmuir*. – 2009. – **26**, N 10. – P. 7117 – 7125.
22. Tsapikouni T.S., Missirlis Y.F. // *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. – 2010. – **75**, N 1. – P. 252 – 259.
23. Benedetti F. *Statistical Study of the Unfolding of Multimodular Proteins and their Energy Landscape by Atomic Force Microscopy*: dis. École Polytechnique Fédérale De Lausanne, 2012.
24. Han S.W., Mieda S., Nakamura C., Kihara T., Nakamura N., Miyake J. // *J. Mol. Recognit.* – 2011. – **24**, N 1. – P. 17 – 22.
25. Schwesinger F., Ros R., Strunz T., Anselmetti D., Güntherodt H.J., Honegger A., Jermutus L., Tiefenauer L., Plückthun A. // *Proc. Natl. Acad. Sci.* – 2000. – **97**, N 18. – P. 9972 – 9977.
26. Flounders A.W., Brandon D.L., Bates A.H. // *Appl. Biochem. Biotechnol.* – 1995. – **50**, N 3. – P. 265 – 284.
27. Hoypierres J., Dulong V., Rihouey C., Alexandre S., Picton L., Thébault P. // *Langmuir*. – 2014. – **31**, N 1. – P. 254 – 261.
28. Cho J., Levy N., Kirakosian A., Comstock M.J., Lauterwasser F., Fréchet J.M., Crommie M.F. // *J. Chem. Phys.* – 2009. – **131**, N 3. – P. 034707.
29. Cavalleri O., Natale C., Stroppolo M.E., Relini A., Cosulich E., Thea S., Novi M., Gliozzi A. // *Phys. Chem. Chem. Phys.* – 2000. – **2**, N 20. – P. 4630 – 4635.
30. Klein D.C., Stroh C.M., van Es Jensenius H.M., Kamruzzahan A.S.M., Stamouli A., Gruber H.J., Oosterkamp T.H., Hinterdorfer P. // *ChemPhysChem*. – 2003. – **4**, N 12. – P. 1367 – 1371.
31. Blass J., Albrecht M., Bozna B.L., Wenz G., Bennewitz R. // *Nanoscale*. – 2015. – **7**, N 17. – P. 7674 – 7681.
32. Phang I.Y., Aldred N., Ling X.Y., Huskens J., Clare A.S., Vancso G.J. // *J. Royal Society Interface*. – 2009. – rsif20090127.

33. Han X., Qin M., Pan H., Cao Y., Wang W. // *Langmuir*. – 2012. – **28**, N 26. – P. 10020 – 10025.
34. Bizzarri A.R., Cannistraro S. // *Nanotechn.* – 2014. – **25**, N 33. – P. 335102.
35. Wang X., Shindel M.M., Wang S.W., Ragan R. // *Langmuir*. – 2012. – **28**, N 19. – P. 7417 – 7427.
36. Vermette P., Gengenbach T., Divisekera U., Kambouris P.A., Griesser H.J., Meagher L. // *J. Colloid and Interface Sci.* – 2003. – **259**, N 1. – P. 13 – 26.
37. Kühner F., Costa L.T., Bisch P.M., Thalhammer S., Heckl W.M., Gaub H.E. // *Biophys. J.* – 2004. – **87**, N 4. – P. 2683 – 2690.
38. Pollheimer P.D., Winklehner P., Hölzl M., Lackner B., Schörkl D.M., Hinterdorfer P., Gruber H.J. // *Bioconjugate Chem.* – 2006. – **17**, N 6. – P. 1473 – 1481.
39. Riener C.K., Stroh C.M., Ebner A., Klampfl C., Gall A.A., Romanin C., Lyubchenko Y.L., Hinterdorfer P., Gruber H.J. // *Analyt. Chim. Acta.* – 2003. – **479**, N 1. – P. 59 – 75.
40. Jauvert E., Dague E., Séverac M., Ressler L., Caminade A.M., Majoral J.P., Trévisiol E. // *Sensors and Actuators B: Chemical.* – 2012. – **168**. – P. 436 – 441.
41. Yadavalli V.K., Forbes J.G., Wang K. // *Langmuir*. – 2006. – **22**, N 16. – P. 6969 – 6976.
42. Zhang X., Yadavalli V.K. // *Analyt. Chim. Acta.* – 2009. – **649**, N 1. – P. 1 – 7.
43. Krasnoslobodtsev A.V., Zhang Y., Viazovkina E., Gall A., Bertagni C., Lyubchenko Y.L. // *Biophys. J.* – 2015. – **108**, N 9. – P. 2333 – 2339.
44. Shlyakhtenko L.S., Gall A.A., Weimer J.J., Hawn D.D., Lyubchenko Y.L. // *Biophys. J.* – 1999. – **77**, N 1. – P. 568 – 576.
45. Saal K., Sammelselg V., Löhmus A., Kuusk E., Raidaru G., Rinke T., Rinke A. // *Biomol. Engineer.* – 2002. – **19**, N 2. – P. 195 – 199.
46. Casero E., Darder M., Diaz D.J., Pariente F., Martin-Gago J.A., Abruna H., Lorenzo E. // *Langmuir*. – 2003. – **19**, N 15. – P. 6230 – 6235.
47. Das T., Sharma P.K., Krom B.P., van der Mei H.C., Busscher H.J. // *Langmuir*. – 2011. – **27**, N 16. – P. 10113 – 10118.
48. Sullan R.M.A., Li J.K., Crowley P.J., Brady L.J., Dufrêne Y.F. // *ACS Nano*. – 2015. – **9**, N 2. – P. 1448 – 1460.
49. Beaussart A., Baker A.E., Kuchma S.L., El-Kirat-Chatel S., O'Toole G.A., Dufrêne Y.F. // *ACS nano*. – 2014. – **8**, N 10. – P. 10723 – 10733.
50. Wiita A.P., Ainavarapu S.R.K., Huang H.H., Fernandez J.M. // *Proc. Natl. Acad. Sci.* – 2006. – **103**, N 19. – P. 7222 – 7227.
51. Gumpp H., Puchner E.M., Zimmermann J.L., Gerland U., Gaub H.E., Blank K. // *Nano Lett.* – 2009. – **9**, N 9. – P. 3290 – 3295.
52. Christenson W., Yermolenko I., Plochberger B., Camacho-Alanis F., Ros A., Ugarova T.P., Ros R. // *Ultramicroscopy*. – 2014. – **136**. – P. 211 – 215.
53. He Y., Lu M., Cao J., Lu H.P. // *ACS nano*. – 2012. – **6**, N 2. – P. 1221 – 1229.
54. Noy A., Vezenov D.V., Kayyem J.F., Maade T.J., Lieber C.M. // *Chem. & Biology*. – 1997. – **4**, N 7. – P. 519 – 527.
55. Ke C., Humeniuk M., Hanna S., Marszalek P.E. // *Phys. Rev. Lett.* – 2007. – **99**, N 1. – P. 018302.
56. Zhang T.B., Zhang C.L., Dong Z.L., Guan Y.F. // *Sci. Rep.* – 2015. – **5**. – P. 9143.
57. Santosh M., Maiti P.K. // *J. Phys.: Condens. Matt.* – 2008. – **21**, N 3. – P. 034113.
58. Krautbauer R., Rief M., Gaub H.E. // *Nano Lett.* – 2003. – **3**, N 4. – P. 493 – 496.
59. Sengupta E., Yan Y., Wang X., Munechika K., Ginger D.S. // *ACS Nano*. – 2014. – **8**, N 3. – P. 2625 – 2631.
60. Wang X., Sanderson R.N., Ragan R. // *J. Phys. Chem. C*. – 2014. – **118**, N 50. – P. 29301 – 29309.
61. Ashkin A. // *Phys. Rev. Lett.* – 1970. – **24**, N 4. – P. 156
62. Ashkin A. // *Phys. Rev. Lett.* – 1970. – **25**, N 19. – P. 1321.
63. Moffitt J.R., Chemla Y.R., Smith S.B., Bustamante C. // *Biochem.* – 2008. – **77**, N 1. – P. 205.
64. Ghislain L.P., Webb W.W. // *Opt. Lett.* – 1993. – **18**, N 19. – P. 1678 – 1680.
65. Zhang H., Liu K.K. // *J. Royal Soc. Interface*. – 2008. – **5**, N 24. – P. 671 – 690.
66. Sacconi L., Tolić-Nørrelykke I.M., Stringari C., Antolini R., Pavone F.S. // *Appl. Optics*. – 2005. – **44**, N 11. – P. 2001 – 2007.
67. Neuman K.C., Chadd E.H., Liou G.F., Bergman K., Block S.M. // *Biophys. J.* – 1999. – **77**, N 5. – P. 2856 – 2863.
68. Molloy J.E., Padgett M.J. // *Contemporary Phys.* – 2002. – **43**, N 4. – P. 241 – 258.
69. Otto O., Gornall J.L., Stober G., Czerwinski F., Seidel R., Keyser U.F. // *J. Opt.* – 2011. – **13**, N 4. – P. 044011.
70. Sischka A., Eckel R., Toensing K., Ros R., Anselmetti D. // *Rev. Sci. Instrum.* – 2003. – **74**, N 11. – P. 4827 – 4831.



71. Heo S., Kim K., Cho Y.H. // *ChemPhysChem*. – 2014. – **15**, N 8. – P. 1573 – 1576.
72. Peterman E.J., Gittes F., Schmidt C.F. // *Biophys. J.* – 2003. – **84**, N 2. – P. 1308 – 1316.
73. Shergill B., Meloty-Kapella L., Musse A.A., Weinmaster G., Botvinick E. // *Developmental Cell*. – 2012. – **22**, N 6. – P. 1313 – 1320.
74. Stangner T., Wagner C., Singer D., Angioletti-Uberti S., Gutsche C., Dzubiella J., Hoffmann R., Kremer F. // *ACS Nano*. – 2013. – **7**, N 12. – P. 11388 – 11396.
75. Cheng C.M., Lee Y.J., Wang W.T., Hsu C.T., Tsai J.S., Wu C.M., Ou K.L., Yang T.S. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2011. – **404**, N 1. – P. 297 – 301.
76. Castelain M., Ehlers S., Klinth J., Lindberg S., Andersson M., Uhlin B.E., Axner O. // *Europ. Biophys. J.* – 2011. – **40**, N 3. – P. 305 – 316.
77. Andersson M., Björnham O., Svantesson M., Badahdah A., Uhlin B.E., Bullitt E. // *J. Mol. Biol.* – 2012. – **415**, N 5. – P. 918 – 928.
78. Mortezaei N., Singh B., Zakrisson J., Bullitt E., Andersson M. // *Biophys. J.* – 2015. – **109**, N 1. – P. 49 – 56.
79. Castelain M., Duviau M.P., Canette A., Schmitz P., Loubière P., Coccagn-Bousquet M., Mercier-Bonin M. // *PloS One*. – 2016. – **11**, N 3. – P. e0152053
80. Crick A.J., Theron M., Tiffert T., Lew V.L., Cicuta P., Rayner J.C. // *Biophys. J.* – 2014. – **107**, N 4. – P. 846 – 853.
81. Pobegalov G., Cherevatenko G., Alekseev A., Sabantsev A., Kovaleva O., Vedyaykin A., Morozova N., Baitin D., Khodorkovskii M. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2015. – **466**, N 3. – P. 426 – 430.
82. Dultsev F.N., Ostanin V.P., Klenerman D. // *Langmuir*. – 2000. – **16**. – P. 5036 – 5040.
83. Dultsev F.N., Kolosovsky E.A. // *Sens. Actuat. B.* – 2009. – **143**. – P. 17 – 24.
84. Dultsev F.N., Kolosovsky E.A., Mik I.A. // *Langmuir*. – 2012. – **28**. – P. 13793 – 13797.
85. Borovsky B., Mason B.L., Krim J. // *J. Appl. Phys.* – 2000. – **88**, N 7. – P. 4017 – 4021.
86. Ландау Л.Д., Лифшиц Е.М. Теоретическая физика. Т. 7. Теория упругости. Изд. 4. – М.: Наука, 1987.
87. Dultsev F.N., Kolosovsky E.A. // *Sens. Actuat. B. Chem.* – 2014. – **202**. – P. 454 – 460.
88. Eigler D., Schweizer E. // *Nature*. – 1990. – **344**. – P. 524.
89. Sugimoto Y., Abe M., Hirayama S., Oyabu N., Custance O., Morita S. // *Nat. Mater.* – 2005. – **4**, N 2. – P. 156 – 159.
90. Thundat T., Zheng X., Chen G., Warmack R. // *Surf. Sci. Lett.* – 1993. – **294**. – P. L939 – 43.
91. Dultsev F.N., Kolosovsky E.A., Mik I.A., Lomzov A.A., Pyshnyi D.V. // *Langmuir*. – 2014. – **30**. – P. 3795 – 3801.
92. Dultsev F.N., Kolosovsky E.A., Cooper M.A., Lomzov A.A., Pyshnyi D.V. // *Sens. Biosensing Res.* – 2015. – **4**. – P. 11 – 15.
93. Mosayebi M., Louis A.A., Doye J.P., Ouldrige T.E. // *ACS Nano*. – 2015. – **9**, N 12. – P. 11993 – 12003.
94. Smith S.B., Cui Y., Bustamante C. // *Science*. – 1996. – **271**. – P. 796 – 799.
95. Marko J.F., Siggia E.D. // *Macromol.* – 1995. – **28**. – P. 8759 – 8770.
96. Clausen-Schaumann H., Rief M., Tolksdorf C., Gaub H.E. // *Biophys. J.* – 2000. – **78**. – P. 1997 – 2007.
97. Rouzina I., Bloomfield V.A. // *Biophys. J.* – 2001. – **890**. – P. 882 – 893.
98. Essevaz-Roulet B., Bockelmann U., Heslot F. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 1997. – **94**. – P. 11935 – 11949.
99. Rief M., Clausen-Schaumann H., Gaub H.E. // *Nat. Struct. Biol.* – 1999. – **6**. – P. 346 – 349.
100. Morfill J., Kuhner F., Blank K., Lugmaier R.A., Sedlmair J., Gaub H.E. // *Biophys. J.* – 2007. – **93**, N 7. – P. 2400 – 2409.