

На правах рукописи

ШАРИПОВ ТАЛГАТ ИШМУХАМЕДОВИЧ

**ИССЛЕДОВАНИЕ МЕТОДАМИ СЗМ ИММОБИЛИЗАЦИИ
МОЛЕКУЛ ДНК И ОЦЕНКА ИХ ПРОВОДИМОСТИ**

03.01.02 - Биофизика

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата физико-математических наук

Саратов - 2011

Работа выполнена на кафедре физической электроники и нанофизики физико-технического института ГОУ ВПО «Башкирский государственный университет»

Научный руководитель: доктор физико-математических наук,
профессор **Бахтизин Рауф Загидович**

Официальные оппоненты: доктор физико-математических наук,
профессор **Скрипаль Анатолий Владимирович**

доктор физико-математических наук,
профессор **Байбурин Вил Бариевич**

Ведущая организация: Московский государственный университет
им. М.В. Ломоносова (МГУ)

Защита диссертации состоится «15» марта 2011 г. в 15 час. 30 мин. на заседании диссертационного совета Д212.243.05 при Саратовском государственном университете им. Н.Г. Чернышевского (410012, г. Саратов, ул. Астраханская, 83).

С диссертацией можно ознакомиться в Зональной научной библиотеке им. В.А.Артисевич Саратовского государственного университета им. Н.Г. Чернышевского (г. Саратов, ул. Университетская д. 42)

Автореферат разослан «___» февраля 2011 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета
д.ф.-м.н., профессор



В.Л.Дербов

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность работы. Биосенсоры играют важную роль в развитии многих разделов биологии, химии, физике. Разновидностью биосенсоров являются ДНК-чипы – миниатюрные устройства для параллельного анализа специфических взаимодействий молекул ДНК. Они находят все более широкое применение в исследованиях в области молекулярной биологии, генетики и в ДНК-диагностике [Guschin et al., 1997; Мирзабеков и др., 2002]. В современных ДНК-чипах взаимодействие между ДНК-мишенью (исследуемой ДНК) и иммобилизованным ДНК-зондом обнаруживают по величине флуоресцентного сигнала, генерируемого соответствующей репортерной группой. Современные способы изготовления чипов позволяют наносить ДНК-зонды на поверхность подложки с субмикронной точностью, однако контроль качества нанесения оказывается недостаточным.

Разработка эффективных ДНК-чипов возможна с использованием методов атомно-силовой микроскопии (АСМ), являющейся одной из представительниц семейства сканирующей зондовой микроскопии (СЗМ) которая привлекает внимание биофизиков тем, что позволяет реализовать комплексный подход к изучению структурно-функциональных связей биологических объектов, сочетая высокое разрешение нанометрового порядка по нормали с неразрушающим характером исследования, обусловленным невысокой интенсивностью взаимодействия зонд-образец, и возможностью проведения исследований в различных средах, в том числе в жидкостях и газовых смесях. Применение методов АСМ позволяет непосредственно визуализировать результаты нанесения и иммобилизации ДНК-зондов на поверхности подложки и, тем самым, содействовать повышению плотности и однородности иммобилизованных олигонуклеотидов, а также наблюдать присутствие чужеродных объектов, образование агрегатов и др.

Вместе с тем, необходимо указать и на некоторые ограничения применимости методики АСМ: 1) при интерпретации результатов следует учитывать, что латеральное разрешение зависит от исследуемого образца, размера и формы иглы-зонда; 2) недостаточное понимание характера взаимодействия зонда с образцом и 3) существует необходимость разработки специфических методов приготовления образцов [Muller et al., 1997; Wagner, 1998; Hansma, 1996; Галлямов и Яминский, 1999].

АСМ как метод исследования требует химически подходящих и атомарно гладких подложек, для того чтобы различить топографию адсорбированных макромолекул, особенно одиночных молекул, от топографии подложки [el Kirat et al., 2005]. Количество подложек, отвечающих данным требованиям, ограничено. В настоящее время наиболее применима слюда; имеются работы, в которых иммобилизацию осуществляли на поверхности пирографита [Klinov et al., 2003]. Таким

образом, необходимым условием успешности исследований биомолекул методом АСМ является их иммобилизация на атомарно гладкой поверхности, что невозможно без разработки соответствующей методики приготовления образцов. Субмолекулярное разрешение исследуемых молекул может быть достигнуто только в том случае, если они стабильно прикреплены к поверхности подложки отдельно друг от друга.

Цель исследования: разработка методик приготовления образцов для исследования особенностей иммобилизации различных молекул ДНК на поверхности слюды и золота, а также изучение электропроводности олигонуклеотидов методами сканирующей зондовой микроскопии.

Были поставлены следующие задачи:

- разработать методики приготовления образцов для визуализации с высоким разрешением молекул ДНК различного происхождения с помощью атомно-силовой микроскопии;
- определить физические параметры агрегатов, образующихся при иммобилизации олигонуклеотидов на поверхности слюды;
- исследовать зависимость плотности одиночно иммобилизованных олигонуклеотидов от концентрации компонентов раствора-образца;
- провести экспериментальные исследования электрической проводимости олигонуклеотидов.

Положения, выносимые на защиту:

1. Наилучшими иммобилизующими свойствами для закрепления на поверхности слюды как длинных молекул ДНК, выделенных из бактериофага λ , так и коротких химически синтезированных молекул ДНК обладают катионы Mn^{2+} .
2. Зависимость площади поверхности иммобилизованного агрегата от количества 20-звенных молекул олигонуклеотидов в нем имеет линейный характер при количестве олигонуклеотидов в агрегате от 1 до 3 шт. Когда в агрегате содержится 4 или 5 олигонуклеотидов, площадь поверхности агрегата для таких двух случаев примерно одинакова.
3. Плотность одиночно иммобилизованных олигонуклеотидов резко возрастает при увеличении концентрации этих молекул в растворе от 0 до 2 нг/мкл. При дальнейшем увеличении концентрации от 2 до 10 нг/мкл наблюдается плавное уменьшение плотности одиночно иммобилизованных олигонуклеотидов с постепенным установлением определенной неизменной величины.
4. Увеличение концентрации катионов Mn^{2+} в иммобилизационном растворе от 25 до 50 мкМ приводит к возрастанию плотности одиночно иммобилизованных олигонуклеотидов. При

концентрации катионов в растворе свыше 50 мкМ происходит снижение плотности одиночно иммобилизованных олигонуклеотидов.

5. Исследование электрической проводимости 20-звенных олигонуклеотидов с помощью сканирующей туннельной спектроскопии показало, что их вольтамперная характеристика нелинейна.

Научная новизна работы и практическое значение. Описанные в литературе методики иммобилизации нуклеиновых кислот оптимизированы применительно к молекулам олигонуклеотидов, имеющих относительно малый размер и, как следствие, меньшую способность к физи- и хемосорбции на поверхности. Подобраны условия среды, при которых наблюдается наименьшая агрегация олигонуклеотидов. Впервые получены АСМ-изображения олигонуклеотидов разной длины, образующих комплексные агрегаты при связывании с двухвалентными катионами. Произведена оценка качественных и количественных параметров иммобилизации олигонуклеотидов на поверхности слюды. Расчет этих параметров имеет ключевое значение для разработки эффективных ДНК-чипов.

Определено удельное сопротивление олигонуклеотидов длиной 20 звеньев, которое оказалось равным 3.25 Ом·см. Изучение степени электропроводности биомолекул чрезвычайно важно и может внести вклад в развитие амперометрических биосенсоров.

Изучение биомолекул является одним из направлений нанотехнологий, часто называемым нанобиотехнологиями, является передним краем развития науки и имеет большие перспективы практического применения в нанoeлектронике (нанопровода, молекулярные транзисторы), в медицине (адресная доставка лекарственных средств, ДНК-чипы для генетического анализа, биосенсоры) и др.

Полученные результаты исследования особенностей иммобилизации молекул ДНК используются в учебном процессе кафедры физической электроники и нанofизики Башкирского государственного университета.

Достоверность результатов обеспечена использованием апробированных методов измерений, соответствием экспериментального оборудования целям и задачам исследований. Результаты исследований апробированы на всероссийских и международных научных конференциях, семинарах, симпозиумах.

Апробация работы. Основные результаты исследования были доложены на V (XXXVII) Международной научно-практической конференции «Образование, наука, инновации – вклад молодых исследователей» (Кемерово, 2010), Международных школах-конференциях для студентов, аспирантов и молодых ученых по математике, физике и

химии «Фундаментальная математика и ее приложения в естествознании» (Уфа, октябрь 2009, 2010 гг.), Всероссийской школе-семинаре для студентов, аспирантов и молодых ученых «Нанобиотехнологии: проблемы и перспективы» (Белгород, декабрь 2008 г.), Ежегодных Всероссийских научных школах-семинарах «Методы компьютерной диагностики в биологии и медицине» (Саратов, 2007, 2008, 2010 гг.), I и II открытой школе-конференции стран СНГ «Ультрамелкозернистые и наноструктурные материалы» (Уфа, 2008, 2010 гг.), II и IV Международных конференциях «Современные достижения бионаноскопии» (Москва, июнь 2008, 2010 гг.), Школе молодых ученых «СОВРЕМЕННЫЕ НАНОТЕХНОЛОГИИ» (Екатеринбург, март 2008 г.), Четырнадцатой Всероссийской Научной Конференции Студентов-Физиков и молодых ученых (Уфа, март 2008 г.), Всероссийской школе-конференции для студентов, аспирантов и молодых ученых «Фундаментальная математика и ее приложения в естествознании» (Уфа, октябрь 2007 г.), Первой Всероссийской Школе-семинаре «Современные достижения бионаноскопии» (Москва, июнь 2007 г.), Санкт-Петербургской Международной конференции по нанобиотехнологиям (Санкт-Петербург, ноябрь 2006 г.), Второй всероссийской конференции молодых ученых «Физика и химия высокоэнергетических систем» (Томск, май 2006 г.), на Школе-семинаре «КоМУ-2005»-«Нанотехнологии и наноматериалы» (Ижевск, декабрь 2005 г.), V, VI и VIII региональных школах-конференциях студентов, аспирантов и молодых ученых по математике и физике (Уфа, октябрь 2005, 2006 и 2008 гг.).

Личный вклад автора заключается в разработке методики проведения микроскопических исследований биообъектов, подборе режимов работы сканирующего зондового микроскопа, получении АСМ-, СТМ-изображений различных по природе и длине молекул ДНК, вольт-амперных характеристик олигонуклеотидов. Все химические аспекты проекта: подбор химических реагентов, модифицирующих катионов и т. д., а также анализ полученных результатов и их интерпретация проводились совместно с коллегами из института биохимии и генетики УНЦ РАН и химического факультета БашГУ. При проведении исследований по диссертационной работе была использована поисковая система и патентная база БашГУ по нанотехнологиям.

Публикации. По результатам исследований, выполненных при работе над диссертацией, опубликовано 23 печатные работы, в том числе 1 статья в журнале из списка изданий, рекомендованных ВАК РФ, 2 статьи в российских журналах, 7 публикаций в сборниках трудов всероссийских и международных конференций, тезисы 13 докладов.

Структура и объем диссертации. Общий объем диссертационной работы составляет 111 страниц машинописного текста, состоит из списка

сокращений, введения, четырех глав материала, заключения. Список литературы содержит 110 наименований.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во введении обоснована актуальность выполненной диссертационной работы, сформулированы цель и основные задачи исследования, выносимые на защиту, показана научная новизна и практическая значимость полученных результатов.

В первой главе приведен критический анализ имеющихся в отечественной и зарубежной литературе экспериментальных исследований последних десятилетий по изучению визуализации молекул ДНК. Дано описание строения, свойств, применения молекул ДНК. Рассмотрены наиболее общие стратегии иммобилизации биомолекул. Представлены основные понятия биочиповой технологии. Приведен подробный обзор представленных в литературе экспериментальных данных по исследованию проводимости молекул ДНК.

Вторая глава посвящена выбору материалов и описанию методов приготовления образцов для изучения особенностей иммобилизации молекул ДНК разных видов с помощью АСМ и исследования проводимости олигонуклеотидов с помощью сканирующей туннельной спектроскопии.

Рассматриваются основные виды подложек для исследования биомолекул методами СЗМ, а также способы их модификации.

В третьей главе описывается визуализация различных по длине и природе молекул ДНК.

Исследование фрагментов нативной ДНК

АСМ-исследования проводились в полуконтактном режиме на приборе «Solver P47» (ЗАО «NT-MDT», г. Зеленоград, Россия) на воздухе с использованием отечественных Si кантилеверов (ЗАО «NT-MDT»). В качестве подложек использовались поверхности свежего скола слюды, модифицированные благодаря обработке катионами металлов. При приготовлении всех растворов использовалась бидистиллированная деионизованная вода milli-Q. Исследуемыми образцами служили фрагменты двуцепочечной нативной ДНК и молекулы ДНК бактериофага λ .

С целью получения АСМ-изображений молекул ДНК высокого разрешения на слюде был опробован ряд методик иммобилизации молекул [Hansma et al., 1996; Muller et al., 1997], в ходе которых варьировались концентрация образцов и условия среды. В первую очередь была изучена эффективность использования ионов двухвалентных металлов для закрепления молекул ДНК на поверхности. В качестве связующих выступали катионы Mn^{2+} , Ni^{2+} , Mg^{2+} . Обнаружено, что наилучшими иммобилизующими свойствами обладает Mn^{2+} , дающий хорошо воспроизводимые результаты.

Образцы были приготовлены по разработанной нами методике: свежесколотую слюду выдерживали в течение 40 мин в 10 мМ растворе $MnSO_4$, а затем подвергали сушке на воздухе и наносили на нее иммобилизационный раствор, содержащий 10 мМ $MnSO_4$ и 10 нг/мкл ДНК (фрагменты двуцепочечной молекулы с «липкими» (т. е. отжигающимися друг на друге) концами длиной 250 п.о.). Раствор выдерживали на слюде в течение 10 мин, после чего дважды промывали водой по 100 мкл и вновь сушили. Для дополнительного осушения образец помещали в эксикатор с P_2O_5 .

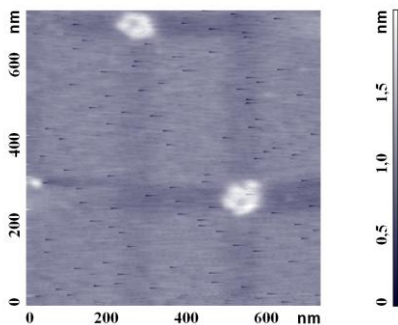


Рис. 1. АСМ-изображение фрагментов ДНК с «липкими» концами, иммобилизованных на слюде, модифицированной катионами Mn^{2+} , полученное в полуконтактном режиме.

На полученном изображении (рис. 1) наблюдаются кольцевые структуры. «Загрузка» поверхности (т.е. плотность иммобилизованных молекул) оказывается достаточной для наблюдения отдельных молекул. Поскольку образцы представляют собой фрагменты ДНК с «липкими» концами, то вполне объяснимым является образование этих кольцевых структур.

Исследование молекул ДНК бактериофага λ

В этом случае на поверхность подложки наносилась капля иммобилизационного раствора, содержащего 2,5 мМ $MnSO_4$ и 1 нг/мкл молекул λ -ДНК, представляющих собой длинные (ок. 48000 п.о.) последовательности нуклеотидов, затем высушивалась при комнатной температуре в течение 1 часа. Подложка не промывалась водой. На полученном изображении (рис. 2) отчетливо наблюдаются нитевидные объекты и сетевидная структура, являющаяся результатом объединения отдельных нитей-молекул ДНК.

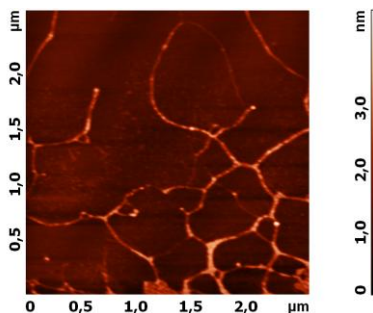


Рис. 2. АСМ-изображение молекул λ -ДНК, иммобилизованных на слюде, модифицированной катионами Mn^{2+} , полученное в полуконтактном режиме.

В результате удалось надежно закрепить молекулы ДНК на поверхности подложки. Проведение подобных АСМ-исследований дает вклад в понимание различных механизмов процесса осаждения молекул ДНК на слюдяную поверхность и взаимодействия с ней. Полученные результаты могут быть применены в нанобиотехнологиях (при создании биосенсоров, ДНК-чипов), в нанoeлектронике (при создании нанопроводов и т.д.).

Исследование влияния буферного компонента раствора на характер иммобилизации олигонуклеотидов

С целью снижения степени агрегации было исследовано влияние концентрации связующего катиона. Было предположено, что при соотношении количества катиона и фосфатных групп 1:1 степень агрегации наименьшая при условии сохранения достаточно высокой иммобилизующей способности соли металла. Данное предположение подтверждено экспериментально. Кроме того, согласно описанным в литературе методикам в раствор ДНК как правило добавляется буферный солевой компонент, также способствующий дезагрегации. Нами было исследовано влияние НЕРЕС-КОН-буфера на эффективность иммобилизации олигонуклеотидов.

В данной части работы исследовались 2 образца, приготовленные разными способами. В первом случае образец был приготовлен следующим образом: на поверхность свежего скола слюды наносили 5 мкл иммобилизационного раствора, содержащего 60 мкМ $MnCl_2$ и 2 нг/мкл олигонуклеотидов (93-нуклеотидные одноцепочечные молекулы ДНК). Раствор выдерживали на слюде в течение 1-2 мин., после чего остатки капли удаляли фильтровальной бумагой Filtrak и затем подвергали сушке в эксикаторе при комнатной температуре в течение 17 часов, чтобы окончательно избавиться от влаги.

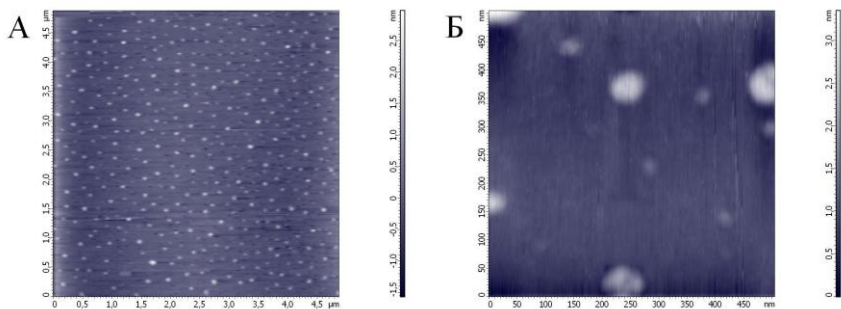


Рис. 3. АСМ-изображение олигонуклеотидов, иммобилизованных на слюде, модифицированной катионами Mn^{2+} (А) и его увеличенный фрагмент (Б).

На полученных АСМ-изображениях (рис. 3) наблюдаются как отдельные молекулы олигонуклеотидов размерами около 25-30 нм, так и объединения нескольких молекул – агрегаты различных размеров (около 50-70 нм). Как видно из рис. 3А, распределение адсорбированных олигонуклеотидов относительно равномерно на большой площади сканирования.

Во втором случае на поверхность слюды наносили такой же объем иммобилизационного раствора, содержащий такие же олигонуклеотиды в концентрации 2 нг/мкл, 60 мкМ $MnCl_2$ и 10 мМ буферный раствор НЕРЕС-КОН. Раствор выдерживали на слюде около 5 мин., после чего каплю удаляли фильтровальной бумагой Filtrak и затем подвергали сушке в эксикаторе при комнатной температуре в течение 17 часов, чтобы окончательно избавиться от влаги.

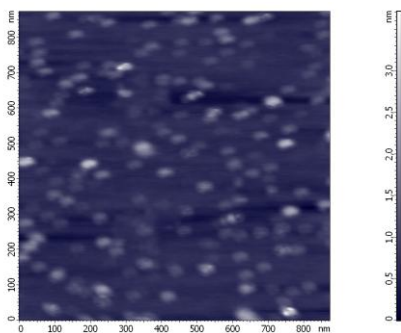


Рис. 4. АСМ-изображение олигонуклеотидов, иммобилизованных на слюде, модифицированной катионами Mn^{2+} и НЕРЕС-КОН буфером.

На полученном АСМ-изображении (рис. 4) наблюдаются плотно расположенные, преимущественно одиночные объекты эллипсоидной формы – олигонуклеотиды.

При сравнении АСМ-изображений на рис. 3 и 4 видно, что в первом случае (без наличия НЕРЕС-КОН) агрегация молекул происходит в большей степени, чем во втором (в присутствии НЕРЕС-КОН). Следовательно, можно предположить, что связь олигонуклеотид-НЕРЕС-слюда сильнее, чем связь олигонуклеотид-олигонуклеотид и, в результате, плотность *одиночных* олигонуклеотидов на единицу площади во втором случае оказывается больше. Однако, в первом случае АСМ-изображения получаются отчетливее и с гораздо меньшей шероховатостью участков поверхности между иммобилизованными объектами.

Четвертая глава посвящена оценке количественных параметров иммобилизации олигонуклеотидов на поверхности слюды, а также изучению электропроводности олигонуклеотидов малых размеров.

Воспроизводимость результатов, статистический анализ одиночных олигонуклеотидов

Нами были использованы АСМ Solver P47 и зондовая нанолаборатория Ntegra-Prima для исследования олигонуклеотидов, иммобилизованных отдельно друг от друга или объединенных в агрегаты. Вначале была проверена воспроизводимость получаемых АСМ-изображений, то есть был проведен их статистический анализ. Были приготовлены 10 образцов по одной методике: иммобилизационный раствор, содержащий 2 нг/мл ДНК (ОДН длиной 93 нт) и $MnCl_2$ (концентрация 50 мкМ) прогревали при 80°C в течение 2 мин для денатурации возможных двуцепочечных структур и затем наносили на поверхность свежего скола слюды. Раствор выдерживали на слюде 4 мин, после чего подложку промывали водой (10×10 мкл). Для каждого образца получали по 10 АСМ-изображений. На полученных АСМ-изображениях наблюдались отдельные объекты различного размера, которые, вероятно, представляют собой как одиночные молекулы ОДН, так и их агрегаты. Были найдены высоты предполагаемых одиночных ОДН, а также вычислены средние арифметические значения высот. Согласно полученным данным, средняя высота объектов на поверхности слюды оказалась равной 0.58 ± 0.12 нм.

В качестве дополнительного критерия оценки воспроизводимости была взята плотность расположения одиночных ОДН. Найдено, что плотность равна 13 ± 2 шт/мкм², то есть воспроизводимость получаемых АСМ-изображений удовлетворительна и такой критерий может быть рекомендован для оценки воспроизводимости получаемых АСМ-изображений биомолекул.

Изучение агрегатов и построение градуировочной кривой

При иммобилизации молекул ОДН из раствора они располагаются на поверхности либо в одиночном состоянии, либо образуют агрегаты. Для оценки количества молекул в агрегате было сделано предположение, что площадь поверхности агрегата S_a должна зависеть от количества молекул в нем (от массы молекул) n . По одной и той же методике приготавливали образцы разных по длине ОДН и визуализировали с помощью АСМ. Далее находили предположительно одиночные ОДН и вычисляли их поверхностную площадь следующим образом. На АСМ-изображении одиночные ОДН – объекты круглой формы – моделировали правильными конусами высотой h , радиусом основания R и образующей L . Площадь боковой поверхности такого конуса $S_b = \pi RL = \pi R \sqrt{(h^2 + R^2)}$. Тогда, зная h и R , можно вычислить S_b . На АСМ-изображении высоту и радиус объектов квазикруглой формы можно вычислить, построив их профили, которые легко получаются с помощью встроенного пакета программ обработки изображений Image Analysis. Вычислив таким образом площади поверхностей конусов, моделирующих одиночные молекулы ОДН разной длины, на АСМ-изображениях, была построена градуировочная кривая (рис. 5), по которой можно определять массу агрегата, а соответственно, и количество молекул в нем.

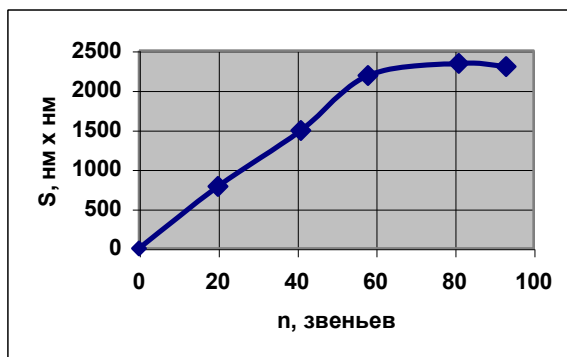
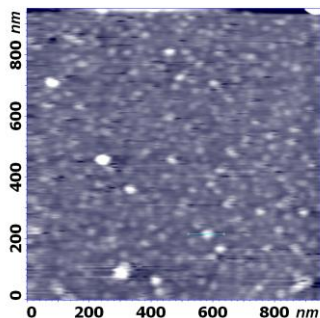


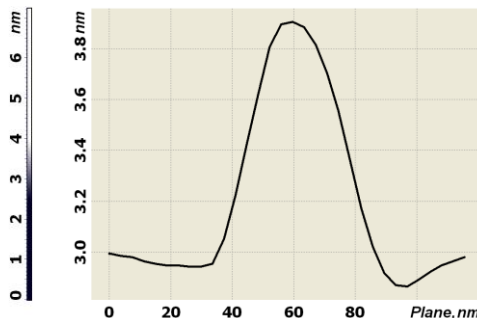
Рис. 5. Градуировочная кривая для определения количества молекул ОДН в агрегате.

На рисунке 6 приведены примеры определения количества молекул в агрегате.

h, нм	R, нм	S, нм ²
0.9	25	1963.771

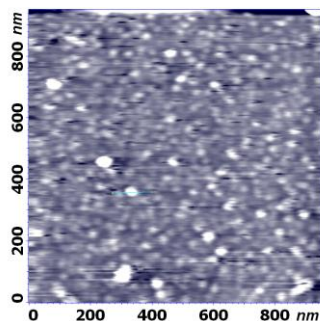


а

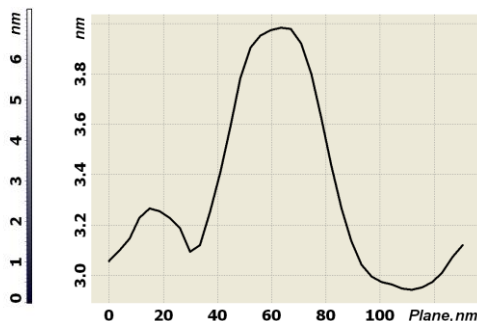


б

h, нм	R, нм	S, нм ²
1	27	2290.629



в



г

Рис. 6. АСМ-изображения ОДН и соответствующие профили сечений.

На рисунках ба,в приведены АСМ-изображения поверхности слюды с иммобилизованными ОДН (длиной 20 нт), а на рис. бб,г – соответствующие профили; здесь же приведены размеры и боковая площадь объектов. Зная площадь, по градуировочной кривой определяем размер агрегата. Для объекта 1 (рис. бб) она округленно равняется 60 нт, то есть данный агрегат

состоит из трех молекул ОДН длиной 20 нт. Для сравнения на рис. 6в приведено то же самое АСМ-изображение, но линия уже проведена по другому объекту, профиль которой показан на рис. 6г. Для данного объекта (номер 2) находим, что он состоит из четырех 20-звенных ОДН.

Исследование зависимости плотности иммобилизованных одиночных олигонуклеотидов от концентрации компонентов раствора-образца

С целью нахождения зависимости плотности одиночных ОДН от концентрации связующего катиона были проведены две серии экспериментов. Сначала была изучена зависимость плотности одиночных молекул ОДН ρ от их концентрации в иммобилизационном растворе при неизменном соотношении количества фосфатных групп ОДН и катионов Mn^{2+} 1:1. Исследуемыми объектами служили ОДН длиной 20 нт.

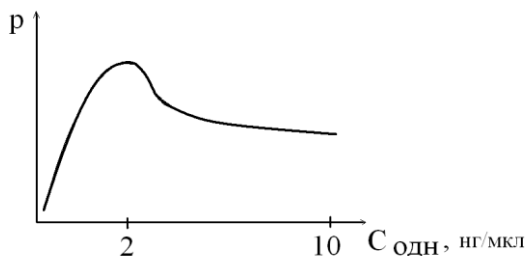


Рис. 7. Зависимость плотности одиночных молекул ОДН ρ от их концентрации в иммобилизационном растворе.

Обнаружено, что при увеличении концентрации молекул ОДН $C_{\text{ОДН}}$ от 0 до 2 нг/мкл происходит резкое возрастание ρ . При концентрации ОДН, равной 2 нг/мкл, плотность одиночных молекул оказывается максимальной. Далее при увеличении концентрации от 2 до 10 нг/мкл наблюдается плавный спад кривой с постепенным установлением определенной неизменной величины плотности одиночно иммобилизованных молекул. Вероятно, возрастающий характер кривой объясняется тем, что при малых концентрациях молекулы ОДН не агрегируются и иммобилизуются отдельно друг от друга. Постепенное увеличение концентрации ОДН приводит к увеличению плотности одиночных молекул и агрегатов. При концентрации ОДН более 2 нг/мкл процесс агрегации начинает преобладать над процессом одиночной иммобилизации.

Была также изучена зависимость плотности одиночных молекул ОДН ρ от концентрации катионов Mn^{2+} в иммобилизационном растворе $C_{Mn^{2+}}$, которая может быть описана функцией $\rho=f(C_{\text{ОДН}}/C_{Mn^{2+}})$.

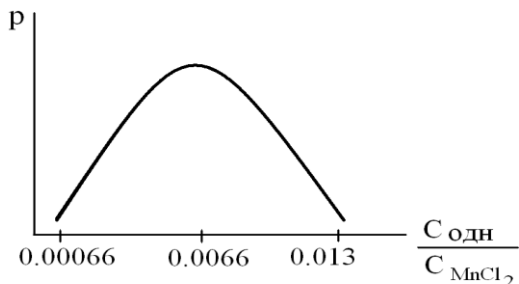


Рис. 8. Зависимость плотности одиночных молекул ОДН, иммобилизованных на поверхности слюды, от концентрации катионов Mn^{2+} .

При увеличении концентрации катионов Mn^{2+} в иммобилизационном растворе от 25 до 50 мкМ (при величине $C_{ОДН}/C_{MnCl_2}$ от 0,013 до 0,0066) наблюдается возрастание плотности одиночных молекул ОДН, что, возможно, объясняется увеличением количества мест связывания между отрицательно заряженными молекулами ОДН и поверхностью слюды. При концентрации катионов Mn^{2+} свыше 50 мкМ (при величине $C_{ОДН}/C_{MnCl_2}$ меньше 0,0066) процесс агрегации ОДН в растворе усиливается настолько, что плотность одиночных молекул ОДН, иммобилизующихся на поверхности, значительно уменьшается.

Результаты исследования могут внести вклад в понимание механизмов физической адсорбции молекул ДНК и их фрагментов разной длины на поверхности слюды и использоваться при дизайне ДНК-чипов.

Измерение электрической проводимости олигонуклеотидов

Молекула ДНК считается перспективным кандидатом для молекулярной электроники благодаря высокому соотношению длина/диаметр, возможности синтеза и ее свойствам, обусловленным двунитевой структурой, которые говорят о возможности самосборки. ДНК была изучена во многих аспектах, включая электронный транспорт, АСМ- и СТМ-исследования, однако результаты измерений транспорта заряда в ДНК различных научных групп не согласуются между собой.

Объектами исследования служили 20-звенные олигонуклеотиды и 5-тиол-модифицированные олигонуклеотиды. В качестве первоначального материала подложки использовалась пластина кремния Si (111), легированная фосфором с удельным сопротивлением 1,6 Ом·см (номинальная концентрация носителей тока $\sim 8 \cdot 10^{17} \text{ см}^{-3}$). После обезжиривания в толуоле кремниевые подложки промывались в ультразвуковой ванне с ацетоном, а затем деионизованной водой. Следующим шагом очистки подложек являлось термообработка. Отжиг

осуществляли в сушильном шкафу. Далее происходил процесс термического напыления золота на кремниевую подложку на установке ВУП-4.

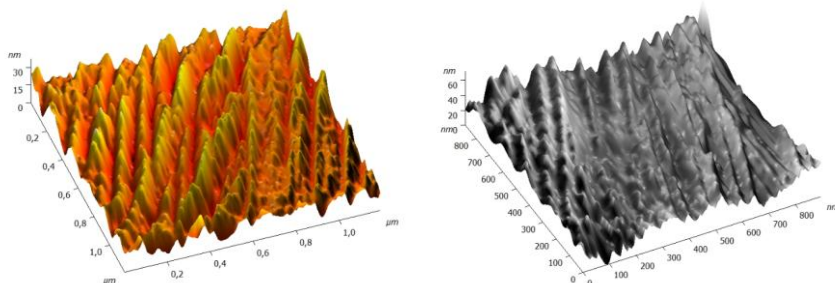


Рис. 9. а) АСМ-изображение кремниевой подложки. Заметно, что структура кремния состоит из борозд, расположенных, примерно, на одинаковом расстоянии друг от друга. Средняя шероховатость составляет 34 нм.; б) АСМ-изображение пленки золота. АСМ-контроль показал, что золото напылилось достаточно ровно, повторив структуру кремния. Средняя шероховатость поверхности уменьшилась до 17 нм.

Следующим этапом эксперимента является модификация поверхности золота для связывания с исследуемыми олигонуклеотидами. Химическая модификация включала создание ковалентной связи химически поляризуемых групп тиолов с чистой поверхностью металла. Адсорбция ДНК осуществлялась за счет кулоновского взаимодействия молекулы с плотно упакованной мономолекулярной пленкой тиола, ориентированной положительными функциональными группами к молекуле ДНК.

Модифицированные 5-тиол олигонуклеотиды были растворены в воде. Затем 5 μl этого раствора было нанесено (каплей 3мм) на золотую подложку, которая затем была помещена в чашку Петри с увлажненной атмосферой, созданной при помощи кюветы с водой. Она была выдержана 16 часов при температуре 50 $^{\circ}\text{C}$. Потом подложка дважды промывалась в воде и в растворе 2-меркаптоэтанола. Данный раствор был использован для увеличения доступности иммобилизируемых образцов к комплементарным последовательностям. Тиольные группы быстро смещали более слабые контакты между ДНК нуклеотидами и подложкой. Затем подложка помещалась обратно в чашку Петри и 2 часа хранилась при температуре 40 $^{\circ}\text{C}$, после чего подложка промывалась в воде.

Олигонуклеотиды в концентрации 1 μM были выдержаны в течение 10 минут в растворе для гибридизации при 80 $^{\circ}\text{C}$. Сразу после этого 5 μl данного раствора было нанесено на подложку, которая затем выдерживалась в течение 1 часа в атмосфере воздуха с температурой 40 $^{\circ}\text{C}$, после чего промывалась в буфере для промывки, и затем - в чистой воде. В заключение приготовленные подложки сушились при комнатных условиях.

АСМ-исследования показали, что на поверхности исследуемого образца наблюдаются новые объекты овальной формы (Рис. 10а), которые и являются молекулами ДНК. Их расположение на подложке достаточно разряжено. Чтобы измерить вольтамперные характеристики, необходимо получить СТМ-изображение для идентификации молекул ДНК на поверхности подложки. Известно, что на СТМ-изображении молекулы ДНК представляются темными овальными объектами, поскольку они имеют меньшую электрическую проводимость по сравнению с золотом.

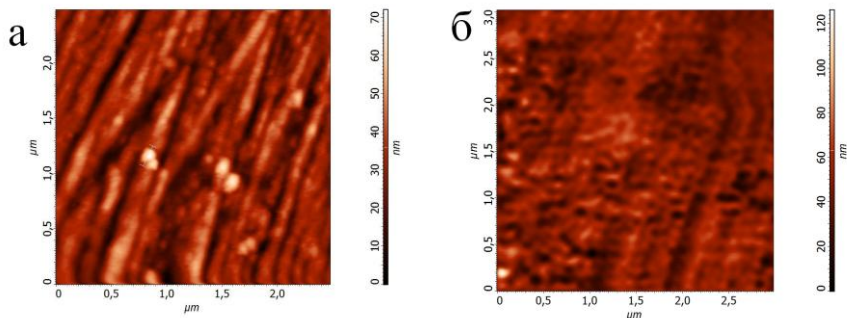


Рис. 10. АСМ-изображение (а) и СТМ-изображение (б) молекул ДНК на поверхности золота.

СТМ-исследование поверхности золота с иммобилизованными молекулами ДНК проводилось в режиме постоянного туннельного тока. На СТМ-изображении (Рис. 10б) наблюдаются темные области малого диаметра - молекулы ДНК. Их латеральные размеры сходятся с размерами ДНК на АСМ-изображениях.

После получения ряда СТМ-изображений и идентификации молекул ДНК на них мы приступили к снятию вольтамперных характеристик (ВАХ), которые представляли собой зависимости силы туннельного тока через молекулы ДНК от величины приложенного напряжения между подложкой и острием СТМ (Рис. 11). Вольтамперные характеристики снимались в темных точках, где предположительно и располагаются молекулы ДНК. Интервал измерений напряжения U между подложкой образца ДНК и острием СТМ составлял от -1.5 В до 1.5 В.

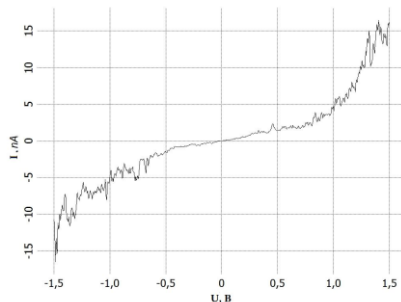


Рис. 11. Вольт-амперные характеристики молекул ДНК.

Кривая ВАХ имеет симметричный вид относительно нулевых значений как тока, так и напряжения. Вид кривой зависимости тока от напряжения нелинейный. Особенно заметно нелинейный характер ВАХ проявляется при напряжениях больше 1 В. Интересно отметить, что на участках ВАХ с выраженным проявлением нелинейности (U больше $1В$) заметен рост мощности или дисперсии флуктуаций σ^2 мгновенных значений туннельного тока.

Полученная ВАХ оказалась подобна ВАХ типичного полупроводника; с ее помощью определялось сопротивление молекулы ($R = 0.05 \cdot 10^9 \text{ Ом}$). Если представить молекулу ДНК в виде нанопровода, то ее удельное сопротивление с учетом диаметра молекулы ($d = 2 \text{ нм}$), площади ($S = \pi d^2 = 6.28 \text{ нм}^2$) и длины молекулы ($L = 10 \text{ нм}$) можно представить как:

$$\rho = SR/L = 6.28 \cdot 10^{-18} \cdot 0.05 \cdot 10^9 / 10 \cdot 10^{-9} = 0.0325 \text{ Ом} \cdot \text{м} = 3.25 \text{ Ом} \cdot \text{см}.$$

В **заключении** сформулированы основные результаты и выводы, полученные в ходе выполнения диссертационной работы.

Основные выводы и результаты:

1. Разработаны методики приготовления образцов для визуализации с высоким разрешением молекул ДНК различного происхождения с помощью атомно-силовой микроскопии. Наилучшими иммобилизующими свойствами для закрепления на поверхности слюды как длинных молекул ДНК, выделенных из бактериофага λ , так и коротких химически синтезированных молекул ДНК, обладают катионы Mn^{2+} .
2. Разработан метод определения количества молекул олигонуклеотидов в иммобилизованном агрегате. Установлено, что зависимость площади поверхности иммобилизованного агрегата от количества 20-звенных молекул олигонуклеотидов в нем имеет линейный характер при количестве олигонуклеотидов в агрегате от 1 до 3 шт. При количестве

олигонуклеотидов в агрегате 4-5 шт. площадь поверхности агрегата примерно одинакова.

3. Установлена зависимость плотности одиночно иммобилизованных ОДН на слюде от их концентрации в иммобилизационном растворе. Плотность одиночно иммобилизованных олигонуклеотидов резко возрастает при увеличении концентрации этих молекул в растворе от 0 до 2 нг/мкл. При дальнейшем увеличении концентрации от 2 до 10 нг/мкл наблюдается плавное уменьшение плотности одиночно иммобилизованных олигонуклеотидов с постепенным установлением определенной неизменной величины.
4. Установлена зависимость плотности одиночно иммобилизованных ОДН от концентрации катионов Mn^{2+} в иммобилизационном растворе. Обнаружено, что увеличение концентрации катионов Mn^{2+} в растворе от 25 до 50 мкМ приводит к возрастанию плотности одиночно иммобилизованных ОДН. При концентрации катионов в растворе свыше 50 мкМ происходит снижение плотности одиночно иммобилизованных олигонуклеотидов.

Достижение наиболее высокой плотности одиночно иммобилизованных ОДН имеет решающее значение для разработки эффективных ДНК-чипов.

5. Разработана методика измерения электропроводности молекул ДНК с помощью сканирующей туннельной спектроскопии и определено удельное сопротивление олигонуклеотидов, которое оказалось равным 3.25 Ом·см. Определение степени электропроводности чрезвычайно важно и может внести вклад в развитие амперометрических биосенсоров.

Список основных опубликованных работ по теме диссертации

* – публикации в изданиях, рекомендуемых перечнем ВАК РФ

1. *Т.И. Шарипов, Р.Ф. Талипов, Р.Р. Гарафутдинов, Р.З. Бахтизин. Оценка количественных параметров иммобилизации олигонуклеотидов на поверхности слюды. // Вестник Башкирского университета. 2010. Том 15. №4. Сс. 860-864.
2. Т.И. Шарипов, Р.Р. Гарафутдинов, Р.З. Бахтизин. Особенности АСМ-исследования молекул ДНК на слюде. // Вестник Башкирского университета. 2007. Том 12. №3. Сс. 18-19.
3. Шарипов Т.И., Гарафутдинов Р.Р., Талипов Р.Ф., Бахтизин Р.З. Особенности приготовления образцов при изучении иммобилизации молекул олигонуклеотидов на слюде с помощью атомно-силовой микроскопии. // Перспективные материалы, Специальный выпуск (7), июнь, 2009, сс. 368-371.

4. Т.И. Шарипов, С.С. Гоц, Р.З. Бахтизин. Исследование проводимости молекул ДНК. // Сборник тезисов четвертой международной конференции "Современные достижения бионаноскопии". 15–18 июня 2010 года, Москва, физический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова - с. 84.
5. Шарипов Т.И., Бахтизин Р.З. Исследование одиночных олигонуклеотидов и агрегатов на их основе. // Образование, наука, инновации – вклад молодых исследователей: материалы V (XXXVII) Международной научно-практической конференции / Кемеровский госуниверситет. – Кемерово: ООО «ИНТ», 2010. – Вып. 11. – Т. 2. – сс. 651-654.
6. Шарипов Т.И., Талипов Р.Ф., Гарафутдинов Р.Р., Бахтизин Р.З. Изучение процессов агрегации олигонуклеотидов на поверхности слюды. // «Фундаментальная математика и ее приложения в естествознании»: Сборник тезисов Международной школы-конференции для студентов, аспирантов и молодых ученых по математике, физике и химии / отв. ред. Р.М. Вахитов. – Уфа: РИЦ БашГУ, 2009. – с. 122.
7. Т.И. Шарипов. АСМ-исследование материалов, основанных на ДНК. // Физика и химия высокоэнергетических систем: Сборник материалов II Всероссийской конференции молодых ученых (4-6 мая 2006 г., г. Томск). – Томск: Томский государственный университет, 2006. – сс. 139-140.
8. Т.И. Шарипов. АСМ-исследование молекул ДНК на слюде. // Студент и наука: Материалы студенческих научных конференций. – Уфа: РИО БашГУ, 2005. – сс. 17-18.
9. Шарипов Т.И. Методики приготовления образцов для исследования олигонуклеотидов с помощью атомно-силовой микроскопии. // Всероссийская школа-конференция для студентов, аспирантов и молодых ученых «Фундаментальная математика и ее приложения в естествознании»: Сборник трудов. Том III. Физика. – Уфа: РИЦ БашГУ, 2008. – сс. 330-333.
10. Т.И. Шарипов, Р.З. Бахтизин. Исследование одиночных олигонуклеотидов и агрегатов на их основе. // Методы компьютерной диагностики в биологии и медицине–2010: Материалы ежегодной Всероссийской научной школы-семинара / Под ред. проф. Д.А. Усанова. – Саратов: Изд-во Саратов. ун-та, 2010. – сс. 55 - 59.
11. Шарипов Т.И., Гарафутдинов Р.Р. Методики приготовления образцов для исследования адсорбции олигонуклеотидов на слюду с помощью атомно-силовой микроскопии. // Методы компьютерной диагностики в биологии и медицине–2008: Материалы ежегодной Всероссийской

- научной школы-семинара // Под ред. проф. Д.А. Усанова. – Саратов: Изд-во Саратов. ун-та, 2008. – сс. 139 - 141.
12. Т.И. Шарипов, Р.З. Бахтизин, Р.Р. Гарафутдинов. Исследование процесса иммобилизации молекул ДНК на слюде с помощью атомно-силовой микроскопии. // Методы компьютерной диагностики в биологии и медицине–2007: Материалы ежегодной Всероссийской научной школы-семинара – Саратов: Изд-во Саратов. ун-та, 2007. – сс. 127 - 129.
 13. T.I.Sharipov, R.Z.Bakhtizin, R.R.Garafutdinov, A.V.Chemeris. Immobilization of DNA molecules on the mica surface studied by atomic force microscopy. // International workshop on nanobiotechnologies: Abstracts of international workshop, 27-29 November 2006. SPb.: Publishing House of Politechnical University, 2006. – p. 102.
 14. Шарипов Т.И., Гарафутдинов Р.Р., Бахтизин Р.З. Исследование процесса иммобилизации молекул ДНК на слюде с помощью атомно-силовой микроскопии. // Сборник тезисов Всероссийской школы-семинара для студентов, аспирантов и молодых ученых «Нанобиотехнологии: проблемы и перспективы». – Белгород: ИПЦ "ПОЛИТЕРРА", 2008. – сс. 174 – 177.
 15. Шарипов Т.И., Гарафутдинов Р.Р., Бахтизин Р.З. Модификация поверхности твердотельных подложек для осаждения на них модифицированных олигонуклеотидов. // VIII Региональная школа-конференция для студентов, аспирантов и молодых ученых по математике, физике и химии: Тезисы докладов. - Уфа: РИЦ БашГУ, 2008. – с. 15.
 16. Т.И. Шарипов, Р.Р. Гарафутдинов, Р.Ф. Талипов, Р.З. Бахтизин. Особенности приготовления образцов при изучении иммобилизации молекул олигонуклеотидов на слюде с помощью атомно-силовой микроскопии. // Ультрамелкозернистые и наноструктурные материалы – 2008: тезисы докладов Открытой школы-конференции стран СНГ (Уфа, 4-9 августа 2008). - Уфа, Башкирский государственный университет, 2008, с. 302.
 17. Шарипов Т.И., Гарафутдинов Р.Р., Талипов Р.Ф., Бахтизин Р.З. Особенности приготовления образцов при исследовании олигонуклеотидов методами атомно-силовой микроскопии. // Сборник тезисов, материалы Четырнадцатой Всероссийской научной конференции студентов–физиков и молодых учёных (ВНКСФ-14, Уфа): материалы конференции, тезисы докладов: В 1 т.Т.1 – Екатеринбург – Уфа: издательство АСФ России, 2008. – сс. 417-418.
 18. Т.И. Шарипов, Р.З. Бахтизин, Р.Р. Гарафутдинов. Исследование процесса иммобилизации молекул ДНК на слюде с помощью атомно-силовой микроскопии. // Современные достижения бионаноскопии:

- Сборник тезисов Первой Всероссийской Школы-семинара 11-17 июня 2007 г. – Москва: Московский государственный университет, 2007. – сс. 61-62.
19. Т.И. Шарипов, Р.Р. Гарафутдинов, Р.З. Бахтизин. Особенности приготовления образцов при изучении иммобилизации молекул олигонуклеотидов на слюде с помощью атомно-силовой микроскопии. // Современные достижения бионаноскопии: Сборник тезисов второй международной конференции 17-19 июня 2008 г. – Москва: Московский государственный университет, 2008 – с. 55.
 20. Т.И. Шарипов. АСМ исследование молекул ДНК на слюде. // Сборник тезисов докладов. Школа-семинар КоМУ-2005 “НАНОТЕХНОЛОГИИ И НАНОМАТЕРИАЛЫ”. – Ижевск: ФТИ УрО РАН & УдГУ, 2005. – с. 65.

