

Полученное решение можно использовать как для моделирования траектории латерального движения консоли кантилевера АСМ, так и для моделирования траекторий латерального движения сенсоров в зондовых микросистемах записи и считывания информации. С помощью выражений (11) легко также найти амплитудно-частотную и фазо-частотную характеристики кантилевера. Основным преимуществом предлагаемой модели (по сравнению с другими известными моделями) является то, что в ее рамках удастся получить точное аналитическое выражение для траектории. Уравнение (9) очень просто обобщается на двумерный случай путем введения двух эффективных масс, коэффициентов жесткости и постоянных затухания [8].

В заключение отметим, что при больших нагрузках кроме явления прилипания — скольжения в системе зонд — образец могут происходить деформация и изнашивание, химические реакции и

фазовые переходы. По этим причинам реальная картина взаимодействия зонда с поверхностью оказывается чрезвычайно сложной.

Список литературы

1. Быков В. А. Микромеханика для сканирующей зондовой микроскопии и нанотехнологии // Микросистемная техника. 2000. № 1. С. 21.
2. Бараш Ю. С. Силы Ван-дер-Ваальса. М.: Наука. 1988.
3. Моисеев Ю. Н., Мостепаненко В. М., Панов В. И. и др. Экспериментальное и теоретическое исследование сил и пространственного разрешения в атомно-силовом микроскопе // ЖТФ. 1990. Т. 60. № 1. С. 141—148.
4. Buttner H., Gerlach E. Van Der Waals-Interaction of ionic and covalent crystals // Chem. Phys. Lett. 1970. V. 5. N 2. P. 91.
5. Работнов Ю. Н. Механика деформируемого твердого тела. М.: Наука. 1988.
6. Gotsmann B., Anczykowski B., Seidel C., Fuchs H. Determination of tip-sample interaction forces from measured dynamic force spectroscopy curves // Appl. Surf. Sci. 1999. V. 140. P. 314—319.
7. Рехвишвили С. Ш. Особенности силовых взаимодействий в бесконтактном режиме атомно-силового микроскопа // Письма в ЖТФ. 2000. Т. 26. № 12. С. 46—50.
8. Дедков Г. В. Нанотрибология: экспериментальные факты и теоретические модели // УФН. 2000. Т. 170. № 6. С. 585—618.

УДК 621.385

К. Сааль^{1, 2}, В. Саммелсельг¹, А. Лыхмус¹, Е. Кууск³, С. Копанчук²,
Г. Райдару², Т. Ринкен³ и А. Ринкен²,
Институты ¹физики, ²органической и биоорганической химии,
³физической химии, Тартуский Университет

ИССЛЕДОВАНИЕ ИММОБИЛИЗАЦИИ ГЛЮКОЗООКСИДАЗЫ НА ПОВЕРХНОСТИ СЛЮДЫ АТОМНО-СИЛОВОЙ МИКРОСКОПИЕЙ И КИНЕТИЧЕСКИМИ МЕТОДАМИ*

Методами ферментативной кинетики и визуализацией с помощью атомно-силового микроскопии (АСМ) была исследована энзиматическая активность глюкозооксидазы (Е. С 1.1.3.4), иммобилизированной на поверхности слюды. Активность иммобилизованного энзима уменьшалась с уменьшением концентрации γ -аминопропилтриметоксисилана, который применяли на первом этапе активации слюды, в то время как результаты исследований на АСМ показали достаточно однородное наполнение поверхности энзимом.

Введение

Широко используемые ферментативные биосенсоры обычно состоят из различных кислородных сенсоров в сочетаниях с различными оксидоредуктазами,

которые поглощают молекулярный кислород при реакциях окисления разных компонентов. Оксидоредуктазы — это большой класс энзимов, в котором более чем 800 различных представителей [1], и одним из первых направлений их использования как биокатализаторов было применение в разработке биосенсоров [2]. Среди оксидоредуктаз глюкозо-

оксидаза (Е. С 1.1.3.4), которая селективно катализирует реакцию окисления глюкозы кислородом, благодаря своей стабильности и высокой воспроизводимости результатов является хорошим примером для разработки ферментативных биосенсоров. Для эффективного использования биосенсоров необходимо активный энзим биосенсора зафиксировать на нерастворимом носителе, что делает возможным его многократное применение. Однако пока еще очень мало информации о том, где и как связывается энзим с твердой поверхностью носителя. В данном исследовании глюкозооксидаза иммобилизовалась на поверхности слюды при использовании различных условий активации слюды и связывания фермента. Поверхности полученных препаратов визуализировали с помощью атомно-силового микроскопии (АСМ), данные анализировались и сопоставлялись с данными по активностям энзима, которые определяли кинетическими методами.

*Работа проведена при финансовой поддержке Эстонского Научного Фонда (гранты 4603 и 3871) и Эстонского фонда Инноваций (гранты 21 it и 18kt).

Методы

Иммобилизация энзима. Свежесколотые листочки слюды (мусковит) (са 1×1 см) силанизировались с помощью γ -аминопропилтриэтоксисилана (от 0,0001 % до 1 %) в 95 %-ном ацетоне по методике, описанной в [3]. Для активации силанизированную слюду промывали ацетоном и инкубировали в течение двух часов с 0,2 % 1,4-фенилендиизоцианатом в 10 %-ном растворе пиридин/диметилформамида. Поверхность промывалась метанолом, ацетоном, водой и натрий-фосфатным буфером, pH = 7,6. Для иммобилизации глюкозооксидазы ее добавляли (в концентрации от 50 нг/мл до 50 мг/мл) и оставляли инкубироваться на ночь в буферном растворе при 4 °С. Перед измерением на АСМ поверхность промывалась водой для устранения несвязавшихся веществ и солей.

Измерение энзиматической активности. Активность глюкозооксидазы (из Asp. Niger, Sigma Chemical Co.) измерялась электрохимически с помощью кислородного датчика типа Кларка, в натрий-ацетатном буфере (0,1 моль/л, pH = 5,6) при 25 °С и при постоянном перемешивании [4]. Активность иммобилизованного энзима определяли по динамике изменения силы тока датчика. Все статические и кинетические параметры вычислялись исходя из ранее предложенной модели интеграционного биосенсора [5] методом нелинейных корреляций.

Измерения на АСМ. Визуализация свежепросушенной поверхности слюды проводилась на АСМ (AutoProbe CP, Park SI) методом прерывистого контакта (ПК) на воздухе. При этом использовались кремниевые кантилеверы с коническими остриями от фирмы Ultralevers (Park SI). Скорость сканирования и расстояние между наконечником и поверхностью были оптимизированы так, чтобы поверхность образца не изменялась в процессе исследования и была хорошо отображена.

Результаты и обсуждение

Слюда была выбрана носителем энзимов по следующим причинам:

- она имеет идеальную поверхность для измерения на АСМ;
- есть возможность ковалентного связывания энзима;
- она очень перспективна при разработке биосенсоров.

Поверхность свежесколотой слюды была почти совершенно плоской и можно было провести четкую границу между обработанной и необработанной слюдой. После силанизации слюды 1 %-ным раствором γ -аминопропилтриметоксисилана поверхность приобретала волнистую однородность с максимальной шероховатостью 4–6 нм (рис. 1, а). Средняя квадратическая шероховатость обработанной поверхности составляла 0,6 нм, что относительно высоко, если сравнивать с шероховатостью необработанной слюды (0,02 нм). Активация силанизированной слюды 0,2 %-ным раствором 1,4-фенилендиизоцианата незначительно изменяла топографию поверхности (рис. 1, б), в то время как средняя квадратическая шероховатость увеличивалась до 0,8 нм. После иммобилизации глюкозооксидазы на активированную слюду на ее поверхности появились большие неровности диаметром от 100 до 400 нм и высотой 50 нм (рис. 2, см. третью сторону обложки). Это может означать, что во время иммобилизации энзимы образуют конгломераты значительных размеров, так как в естественных условиях

димерные молекулы глюкозооксидазы имеют размеры 5×8 нм [6]. Уменьшение концентрации силанизирующего агента до 0,1 % без каких-либо изменений в остальных этапах связывания привело к исчезновению больших конгломератов и показало большую однородность в насыщенности поверхности энзимом (рис. 3, а, см. третью сторону обложки).

Аналогичная насыщенность поверхности также наблюдалась и после дополнительного уменьшения концентрации γ -аминопропилтриметоксисилана до 0,0001 % (рис. 3, а–г, см. третью сторону обложки). Однако уменьшение концентрации силанизирующего агента приводило и к уменьшению энзиматической активности иммобилизированной глюкозооксидазы (рис. 4). Это означает, что объем, заполняемый энзимом на обработанной поверхности слюды, непосредственно зависел от концентрации γ -аминопропилтриметоксисилана, используемого при первичной обработке поверхности, в то время как остальные параметры процесса связывания оставались неизменными. Если принять, что во время иммобилизации молекулы энзима в основном сохраняют свою естественную структуру (в двухмерном пространстве), а 1 см^2 поверхности слюды, силанизированной γ -аминопропилтриметоксисилоном, содержит 29 ± 7 пмоль глюкозооксидазы, что соответствует приблизительно 40 % максимально возможного мономолекулярного насыщения

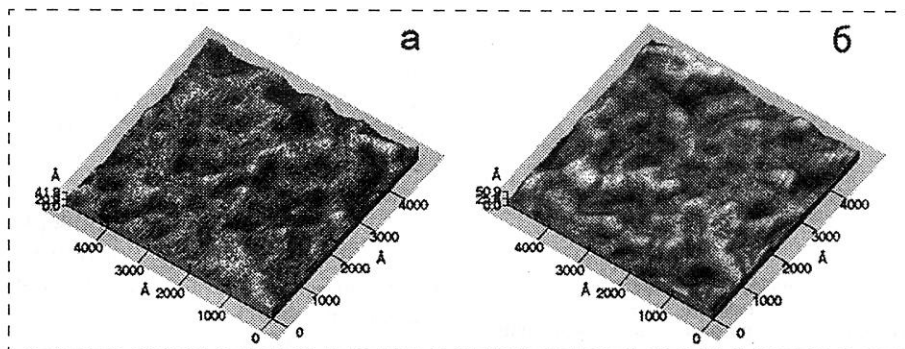


Рис. 1. Трехмерное изображение силанизированной (а) и активированной (б) поверхности слюды, ПК-АСМ, 500×500 нм

этой поверхности молекулами энзима, то согласно выявленной зависимости (рис. 4), насыщенность, видимо, не превышает 50 %-го уровня даже при очень высокой концентрации силанизирующего агента. Поэтому есть основания предполагать, что, по крайней мере, часть поверхности покрыта белком, не обладающим каталитической активностью.

Сравнение кинетических констант показало, что k_{cat} равна 4,0 мкмоль O_2 /мин (на 1 мкмоль растворенного фермента) и 0,36 мкмоль O_2 /мин (на 1 см² слюды) соответственно для растворенной и связанной с поверхностью слюды глюкозооксидазы. При кинетических анализах также обнаружилось, что насыщенный раствор глюкозооксидазы (Lot 76F-0188) содержал только 25 % активных молекул от всего количества энзима, т. е. специфическая активность фермента была 60 000 ед/г для данного образца.

Таким образом, беря в расчет реальную специфическую активность энзима, мы можем утверждать, что максимальная насыщенность поверхности, достигаемая при вариации концентрации γ -аминопропилтриметоксисилана, составляет 200 %. Это означает, что должны существовать дополнительные вертикальные структуры в энзимном слое, которые выстраиваются из всех этих молекул

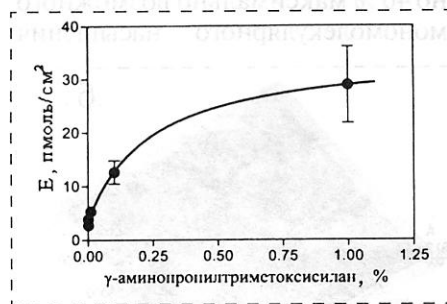


Рис. 4. Зависимость количества иммобилизованного активного энзима от концентрации γ -аминопропилтриметоксисилана. Активность иммобилизованной глюкозооксидазы определялась в 0,1-мольном ацетатном буфере (pH = 5,6) при 25 °C, концентрация глюкозы составляла 5 ммоль/л

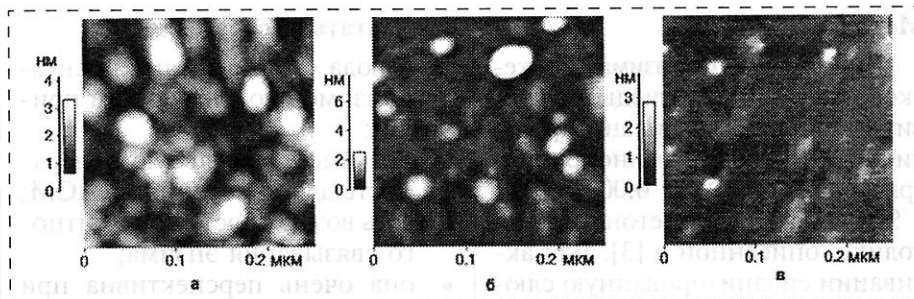


Рис. 5. Молекулы глюкозооксидазы на поверхности слюды, ПК-АСМ, 250 × 250 нм. Свежесколотая слюда обрабатывалась в течение 1 мин с 0,0001 %-ным γ -аминопропилтриметоксисилоном в 95 %-ном ацетоне, затем 2 ч с 0,2 %-ным 1,4-фенилдиизоционатом в 10 %-ном растворе пиридин/диметилформамида и потом инкубировалась 24 ч с глюкозооксидазой в концентрациях 0,5 мг/мл (а), 5 мкг/мл (б) и 50 нг/мл (в) в натрий-фосфатном буфере (pH = 7,6)

белка. Одним из объяснений может послужить то, что конгломераты белков, показанные на рис. 2 (см. третью сторону обложки), содержат дополнительное количество энзима, но поверхность этих структур не достаточно велика для получения всей необходимой дополнительной активности. Вместе с тем уменьшение концентрации силанизирующего агента уменьшает количество активного энзима и при концентрациях, меньших 0,1 %, тогда как при этих условиях не наблюдались видимые изменения в насыщенности поверхности энзимом. Таким образом, можно предположить, что существуют дополнительные вертикальные структуры, образуемые γ -аминопропилтриметоксисилоном и используемые для иммобилизации энзима, но которые невозможно выявить методами атомно-силовой микроскопии (АСМ).

Уменьшение концентрации γ -аминопропилтриметоксисилана до 0,0001 % при первичной обработке поверхности слюды уменьшает энзиматическую активность на поверхности до уровня, который ниже измеряемого кинетическими методами предела, однако, как показано на рис. 3, з (см. третью сторону обложки), поверхность по-прежнему полностью заполнена белковой массой, которая не может быть индивидуально охарактеризована. При одновременном уменьшении количества γ -аминопропилтриметоксисила-

на и концентрации глюкозооксидазы в процессе ее иммобилизации уменьшилась также и насыщенность поверхности молекулами, что сделало возможным достижение молекулярного разрешения для энзима (рис. 5). Однако размерность обнаруженных субстанций, 10 × 10 нм и 3 нм в высоту (рис. 5, в), несколько отличается от той, которая ожидалась бы для чистой глюкозооксидазы [6]. Следует отметить, что измерения проводились на воздухе, а при этих условиях конформация энзима могла сильно измениться. Увеличение поперечных размеров молекул также могло быть вызвано достижением предела разрешения для АСМ, который зависит от реальных размеров острий. Предполагая, что иммобилизованные молекулы энзима представляют собой сферы диаметром $d_s = 5$ нм, и беря в расчет то, что предполагаемый диаметр кончика острия для АСМ $d_k = 8,7$ нм, диаметр молекул энзима можно выразить как $d_{э\text{набл}} = (d_s^2 + d_k^2)^{1/2} = 10$ нм [7]. Такая же переоценка размеров молекул энзима проводилась и в других более ранних исследованиях [8]. Улучшить положение можно, только уменьшив размеры острий для АСМ.

Несмотря на проблемы с определением поперечных (боковых) размеров молекулы энзима отчетливо наблюдались на поверхности. Это означает, что про-

стые методы, используемые для иммобилизации энзимов, позволяют (при подборе оптимальных концентраций и условий) визуализировать белки методом АСМ. Силанизационно-изотиоцианатная фиксация белка на поверхности слюды значительно быстрее и дешевле, чем применяемый метод абсорбции на поверхность золота [8] и, следовательно, может быть предложена для более широкого использования при визу-

лизации белков методом АСМ. Это открывает новые перспективы для изучения процессов на поверхности твердых материалов с участием биомакромолекул.

Список литературы

1. Enzyme nomenclature database. www.expasy.ch/enzyme/.
2. May S. W. Current Opinion in Biotechnology. 1999. N 10. P. 370.
3. Guo Z., Guilfoyle R. A., Thile A. J., Wang R., Smith L. M. Nucleic Acids Res. 1994. N 22. P. 5456.

4. Rinken T., Rinken A., Järvi J., Tenno T. Biosensors & Bioelectronics. 1998. N 13. P. 801.
5. Rinken T., Tenno T. Biosensors & Bioelectronics. 2000. N 16. P. 153.
6. Rando D., Kohring G. W., Giffhorn F. Applied Microbiology and Biotechnology. 1997. N 48. P. 34.
7. Heinrich K. F. J. Electron beam X-ray microanalysis. Van Nostrand Reinhold Co., New York, London, Toronto, Melbourne. 1981. P. 427.
8. Losic D., Gooding J. J., Shapter J., Erokin P., Short K. 11th Australian Electrochemistry Conference. University of Western Sydney, Parramatta, Australia, Dec. 10–14th, 2000.

УДК 621.385.83

Г. В. Дедков, д-р физ.-мат. наук,
А. А. Кясов, канд. физ.-мат. наук,
Кабардино-Балкарский государственный
университет, г. Нальчик

ФЛУКТУАЦИОННО- ЭЛЕКТРОМАГНИТНЫЕ ЛАТЕРАЛЬНЫЕ СИЛЫ НА НАНОЗОНДАХ, ДВИЖУЩИХСЯ ВБЛИЗИ ПОВЕРХНОСТИ*

Вычисляются латеральные силы взаимодействия нанозонда сканирующего зондирующего микроскопа с поверхностью, обусловленные флуктуационно-электромагнитным механизмом. Впервые рассматриваются эффекты возбуждения плазмонов (с учетом пространственной дисперсии) и локальный диэлектрический отклик поверхности в приближении Друде. Численные расчеты выполнены для контактов кремниевого и алюминиевого зонда с поверхностью золота.

Введение

Исследование механизмов взаимодействия между поверхностью твердого тела и движущимися частицами (нанозондами) имеет большое значение для нанотрибологии и сканирующей зондирующей микроскопии (СЗМ) [1, 2]. В последнее время ведется большая работа по детализации процессов энергообмена между движущимися нанозондами и поверхностями, имеющих непосредственное отношение к физике трения.

Несмотря на то, что обсуждение микроскопических механизмов трения имеет достаточно длин-

ную историю [3], даже сейчас, более тридцати лет спустя, соответствующие вопросы являются предметом интенсивной теоретической дискуссии (см. [1, 2] и соответствующие ссылки).

Количественное измерение диссипативных (и консервативных) сил взаимодействия нанозондов с образцами стало принципиально возможным с развитием техники СЗМ, с одной стороны, и кварцевых кристаллических резонаторов — с другой [4].

Целью данной статьи является теоретический расчет латеральных флуктуационно-электромагнитных сил, которые действуют на нанозонд параболической формы, совершающий колебательное движение параллельно поверхности (в модуляционном режиме СЗМ). Мы получаем теоретические формулы для этих сил, соответствующие различным участкам электромагнитных спектров поглощения контактирующих тел. В частности, впервые рассматриваются процессы резонансного возбуждения поверхностных плазмонов.

Теория

Общая нерелятивистская теория флуктуационно-электромагнитных сил между движущимися нейтральными атомами (нанозондами) и плоскими атомарно-гладкими поверхностями была развита в наших работах [5, 6] в рамках локального приближения для диэлектрического отклика поверхности. В недавних работах [7, 8] было показано, что основные результаты этой теории легко обобщаются с учетом эффектов пространственной дисперсии. Для получения соответствующих формул необходимо заменить (локальную) функцию диэлектрического отклика поверхности на формулу

$$\Delta_s(\omega, \mathbf{q}) = \frac{\pi - qI_0}{\pi + qI_0}, \quad (1)$$

*Работа выполнена при частичной поддержке фонда ISSEP (2001).