

Использование СЗМ  
в биологических исследованиях

Александр Анкудинов

*ФТИ им. А. Ф. Иоффе*

## План лекции

1. Микроскопия как усилитель чувственных восприятий. Сканирующая зондовая микроскопия (СЗМ) отвечает за осязание.
2. В чем состоит основная сложность в СЗМ исследованиях живой клетки?
3. Ионный сканирующий микроскоп (ИСМ).
4. Применения ИСМ для изучения ионных каналов в живых клетках, в наномеханических исследованиях.
5. Изготовление для атомно-силового микроскопа (АСМ) специальных зондов с калиброванной геометрией кончика.
6. Визуализация и наномеханические АСМ эксперименты с живой клеткой.

# ЧУВСТВО

# ЗОНД

# МИКРОСКОП

**Зрение**

**Электромагнитное излучение**

**Оптический,  
Электронный**

**Слух**

*Звуковая волна в среде*

**Акустический,  
Ультразвуковой**

**Осязание**

*Силовое взаимодействие  
(механическое, электростатическое,  
магнитное, капиллярное)*

*Электрический ток  
(растекания или туннельный)*

**Профилограф,  
Сканирующий  
туннельный,  
Атомно-силовой**

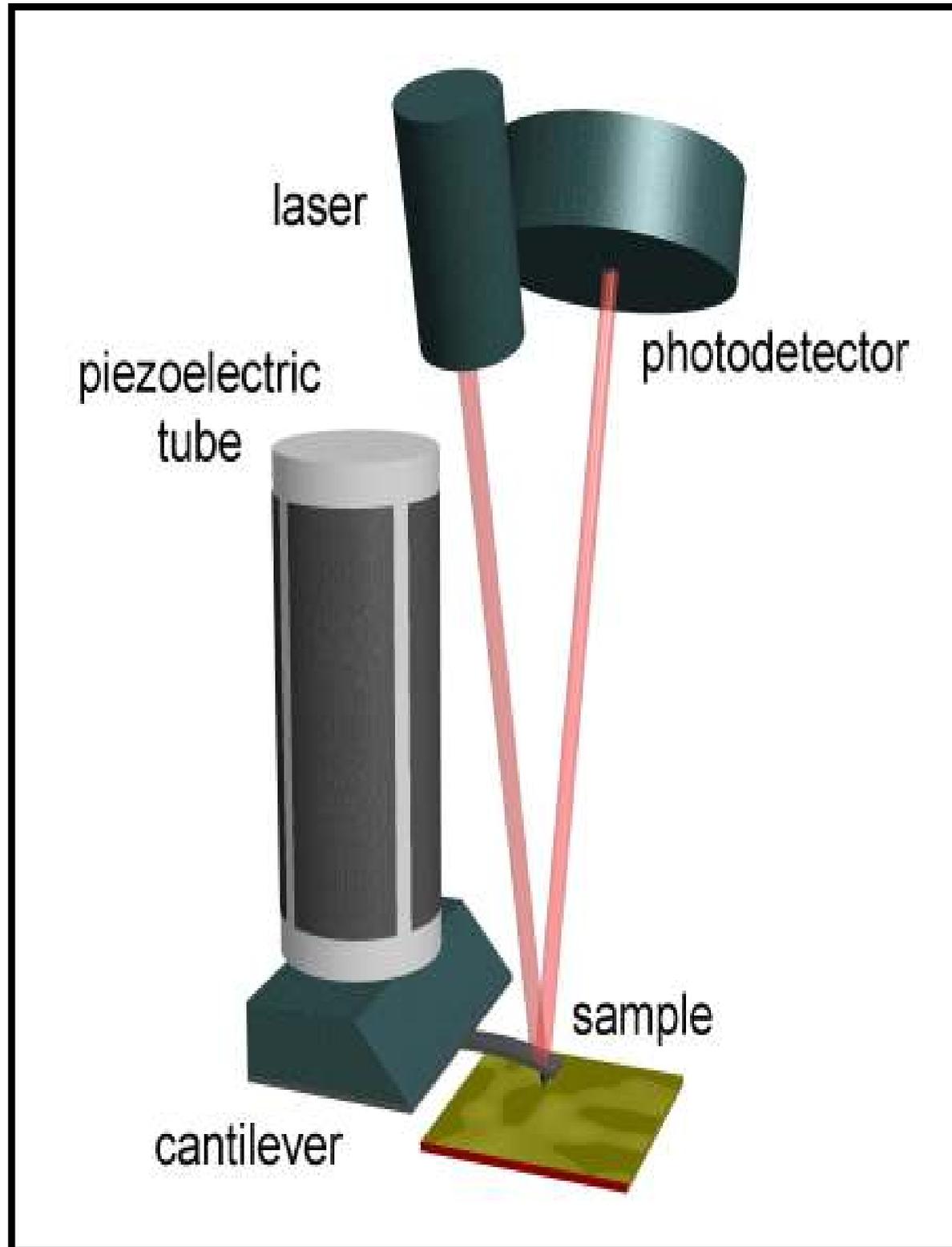
**Вкус  
Запах**

**Силовое химическое взаимодействие**

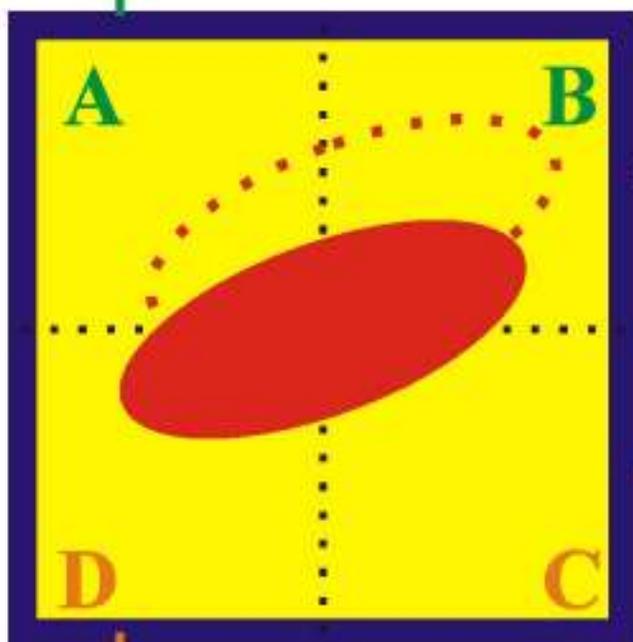
**Химических сил**

# Основные узлы атомно-силового микроскопа (АСМ).

- 1) Устройство точного позиционирования (сканер)
- 2) Устройство грубого позиционирования
- 3) Зонд
- 4) Детектор взаимодействия зонд-образец
- 5) Устройство регулирования (петля обратной связи)
- 6) Защита от вибраций



4-х секционный  
фотодетектор



П  
р  
е  
о  
б  
р  
а  
з  
о  
в  
а  
т  
е  
л  
ь

$(A+B+C+D)$

$(A+B)-(C+D)$

$(A+D)-(B+C)$

# Конструкция чипа с зондом атомно-силового микроскопа (кантилевер, микроконсоль, микробалка, cantilever).

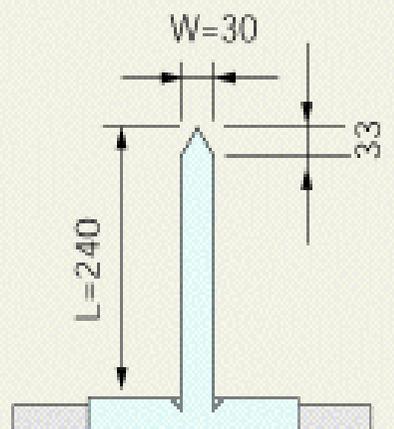
## OMCL-AC240TS series (type2)

Rectangular cantilevers with tetrahedral tips

*Tip location: Just on end of cantilever*

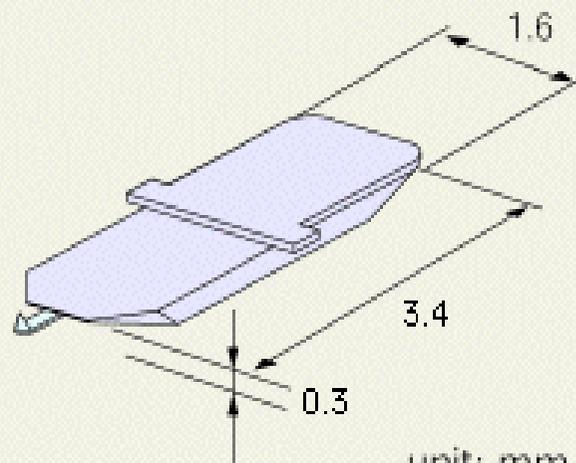
### **Chip size of silicon cantilever**

*One cantilever is extended from side edge of each chip*

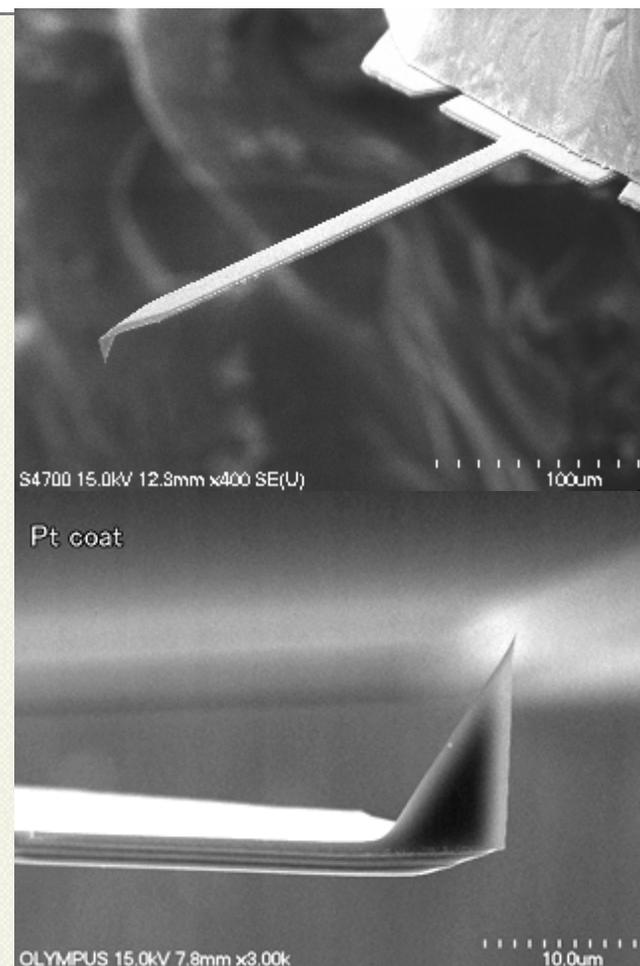


OMCL-AC240TS-

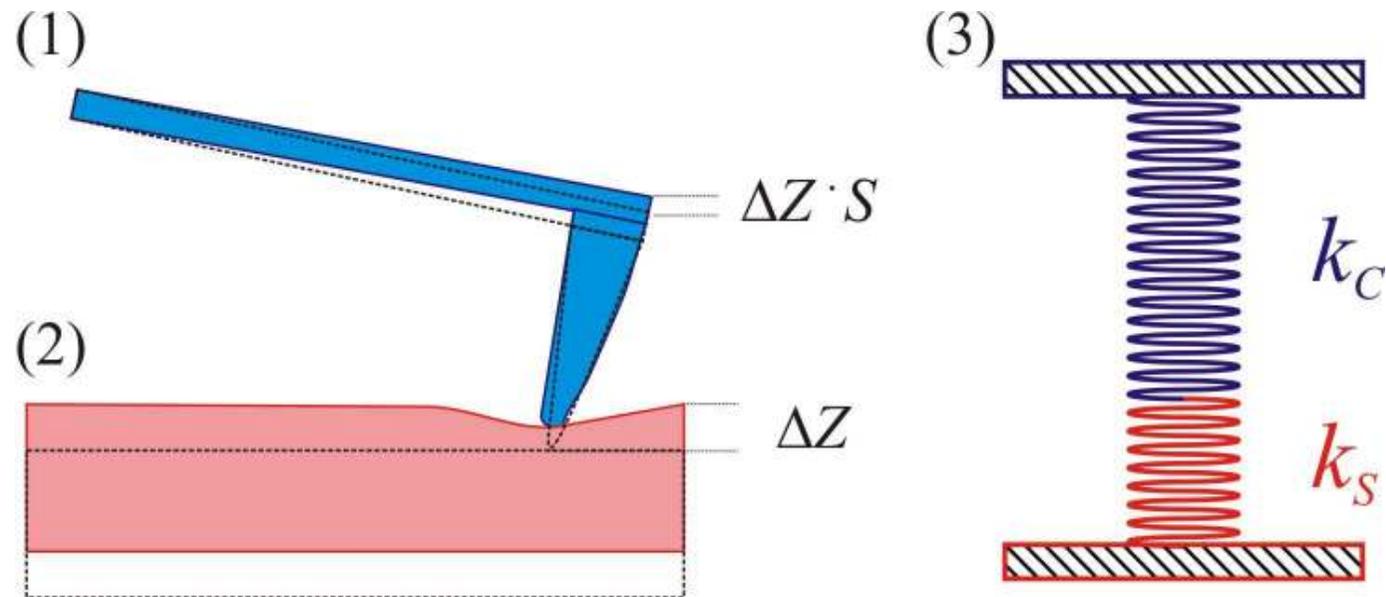
unit:  $\mu\text{m}$

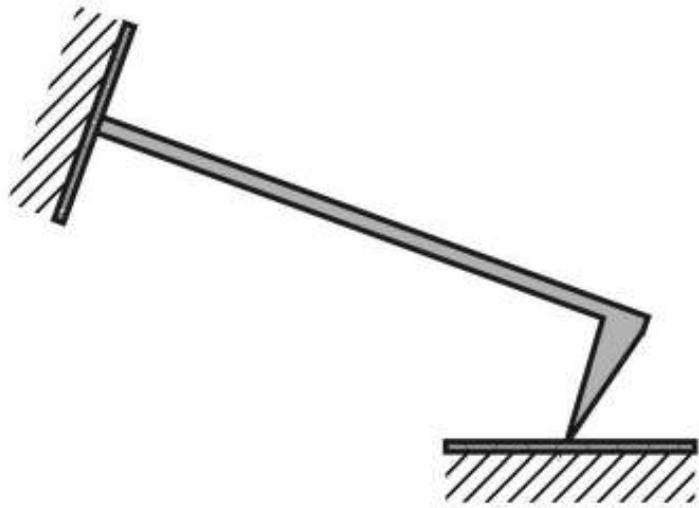


unit: mm

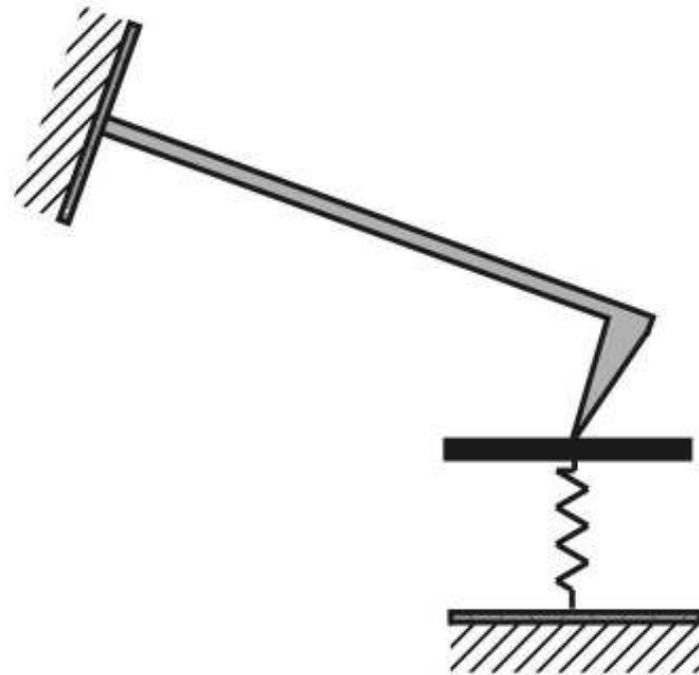


Механический контакт кантилевера (1) с образцом (2);  
соответствующая простейшая реологическая модель (3).





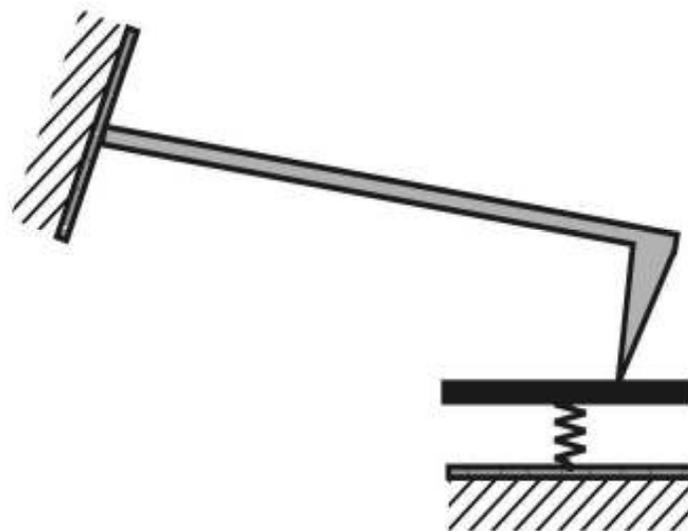
Твердый образец



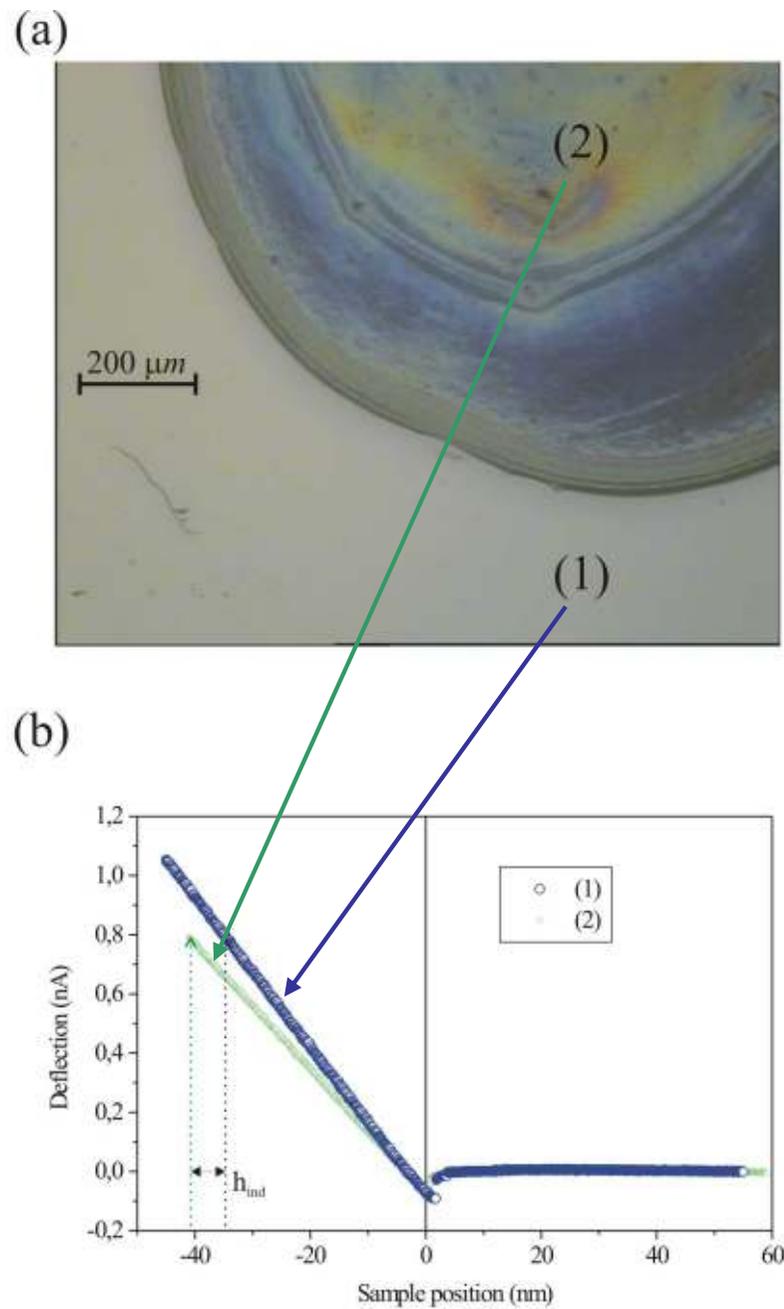
Мягкий образец



Твердый образец

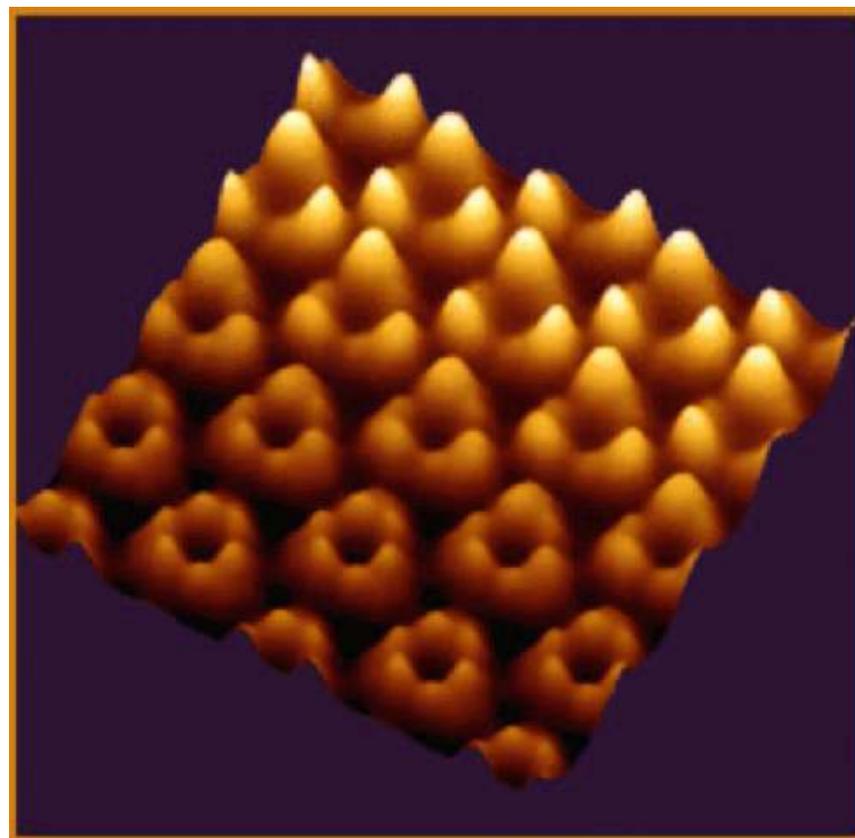
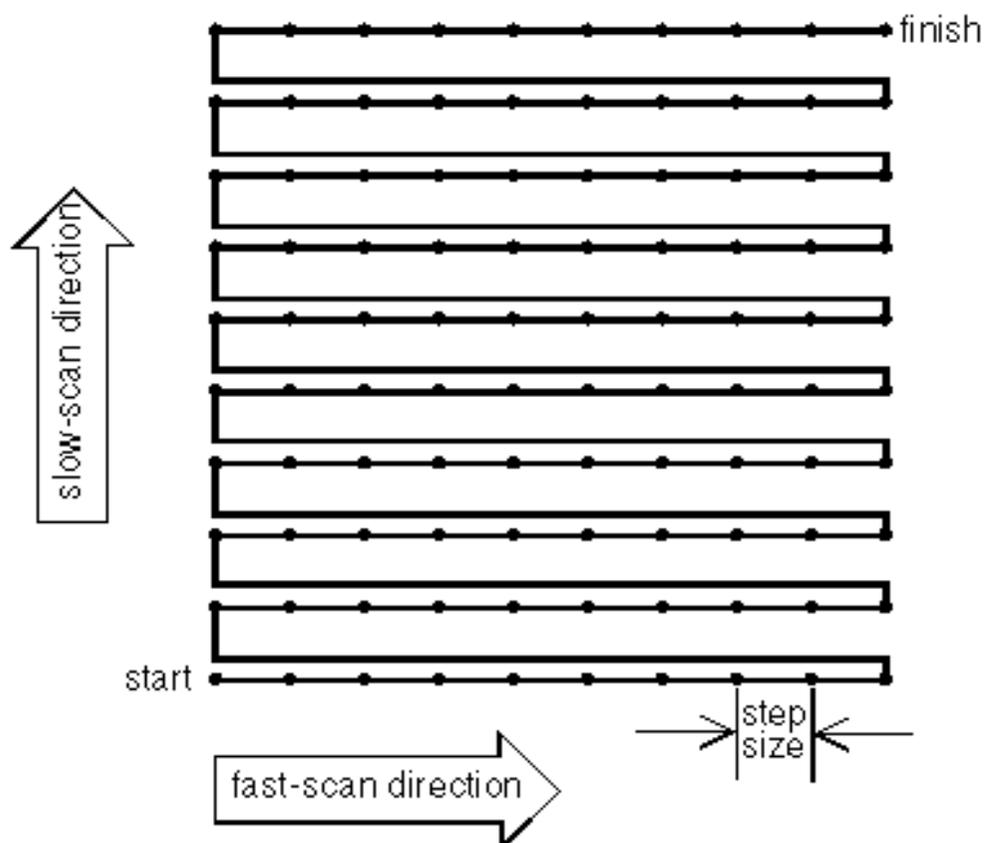


Мягкий образец



**РИС.** Фотография высохшей капли материала на основе лизоцимовых фибрилл, подвергнутых ковалентной сшивке под действием ультрафиолетового света (а). Кривые  $F(z)$ , зависимости отклонения (deflection) кантилевера от положения образца (sample position), которые использовались для оценки упругости материала. Цифры обозначают: твердую Si подложку (1), исследуемый материал (2).

# Концепция сканирования



Оценим минимальную силу  
взаимодействия кантилевера  
с клеткой, при АСМ  
визуализации клетки:

$$F_{\min} > F_{kT}, F_{\eta}$$

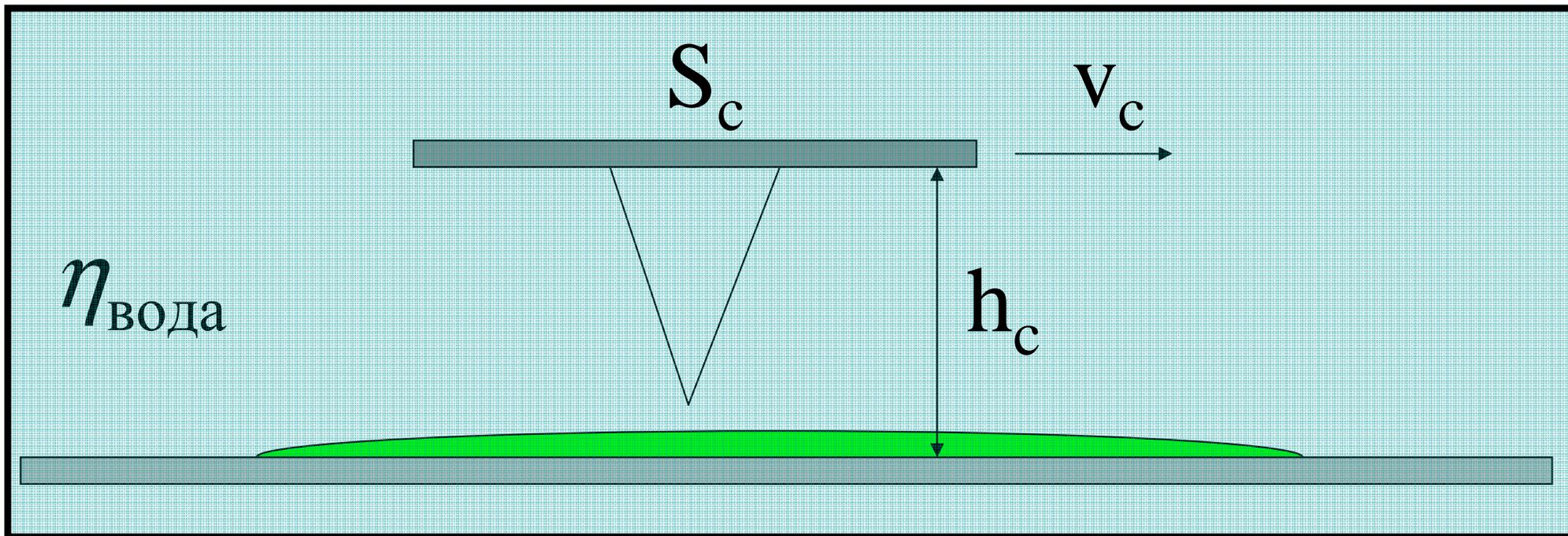
# Тепловые шумы

$$k_c \sigma^2 = k_B T, \quad F_{kT} \approx k_c \cdot \sigma = (k_c k_B T)^{1/2}$$

$$k_c = 0.1 \text{ Н} \cdot \text{м}^{-1}, \quad k_B T = 4 \cdot 10^{-21} \text{ Н} \cdot \text{м}$$

$$F_{kT} \approx 20 \text{ пикоНьютонов}$$

# Вязкое трение



$$F_{\eta} \approx \eta \cdot S_c \cdot v_c / h_c$$

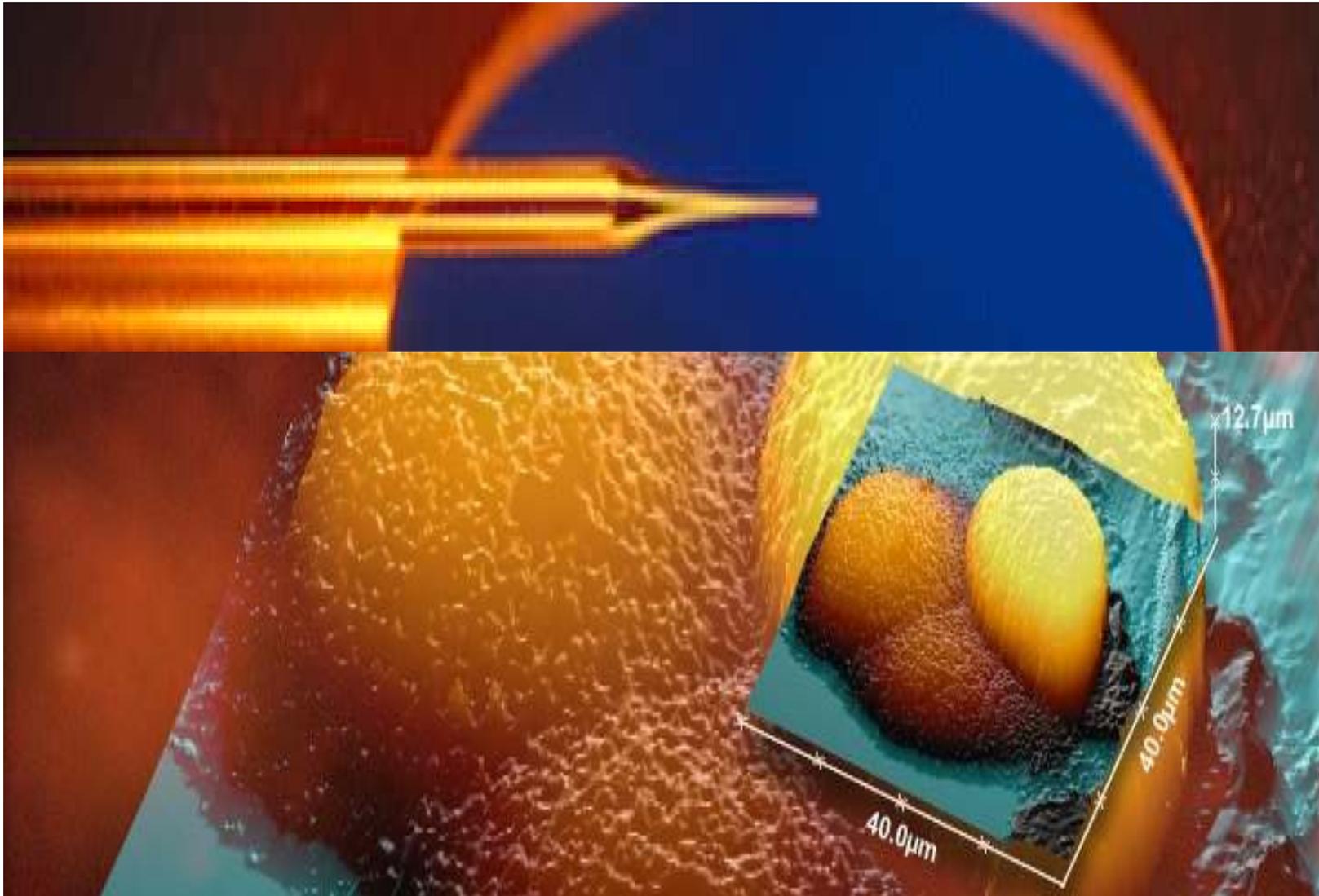
$$\eta \approx 10^{-3} \text{ Н} \cdot \text{с} \cdot \text{м}^{-2}; S_c \approx 10^{-8} \text{ м}^2; v_c \approx 5 \cdot 10^{-5} \text{ м} \cdot \text{с}^{-1}; h_c \approx 10^{-5} \text{ м}$$

$$F_{\eta} \approx 50 \text{ пикоНьютонов}$$

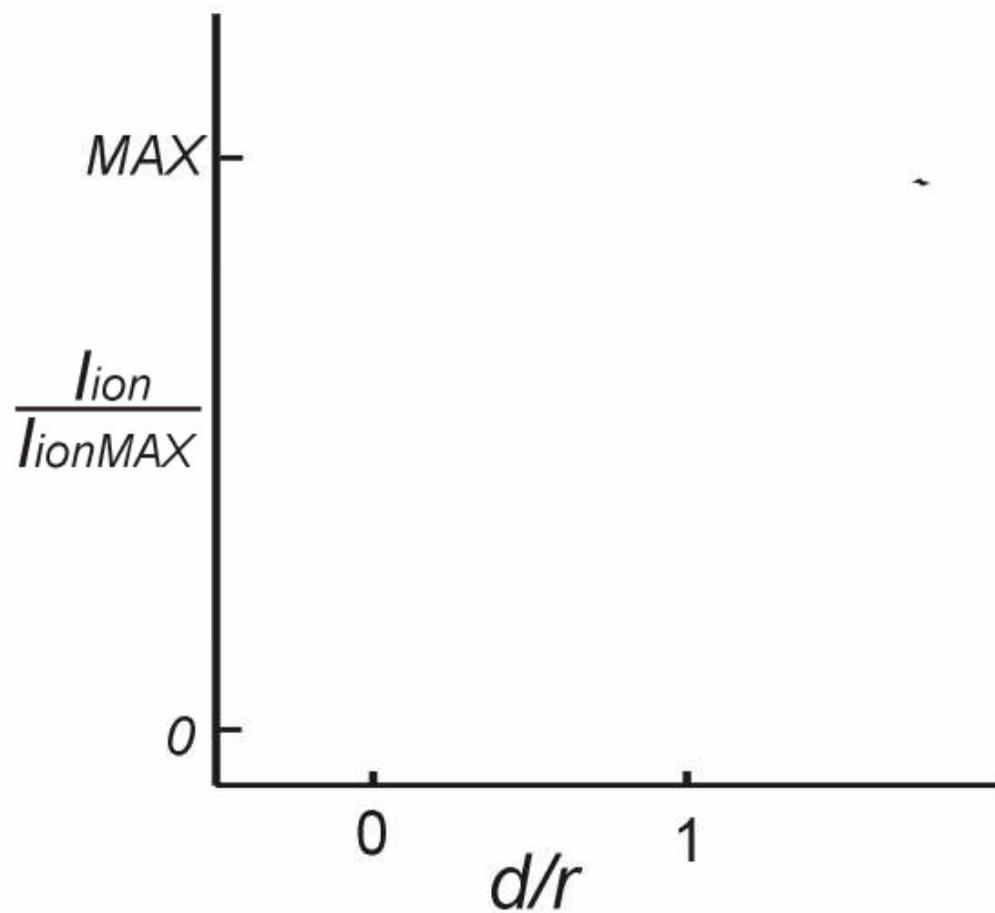
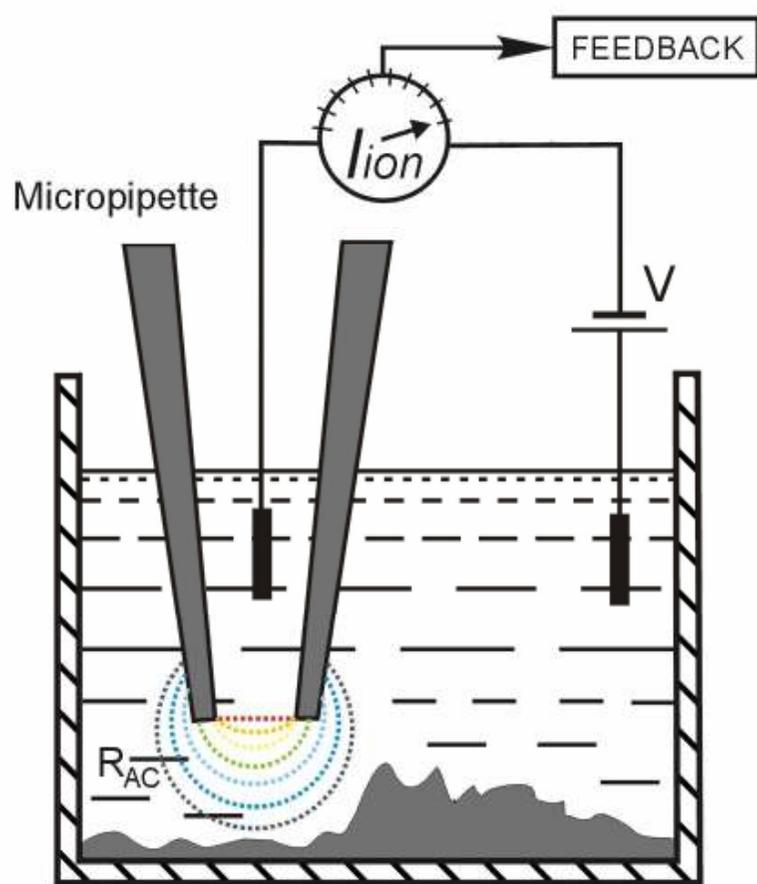
$$F_{\min} > 10^{-10} \text{H}$$

$$P \approx F_{\min} \cdot R^{-2} > 10^6 \text{H} \cdot \text{M}^{-2} = 10 \text{aTM.}$$

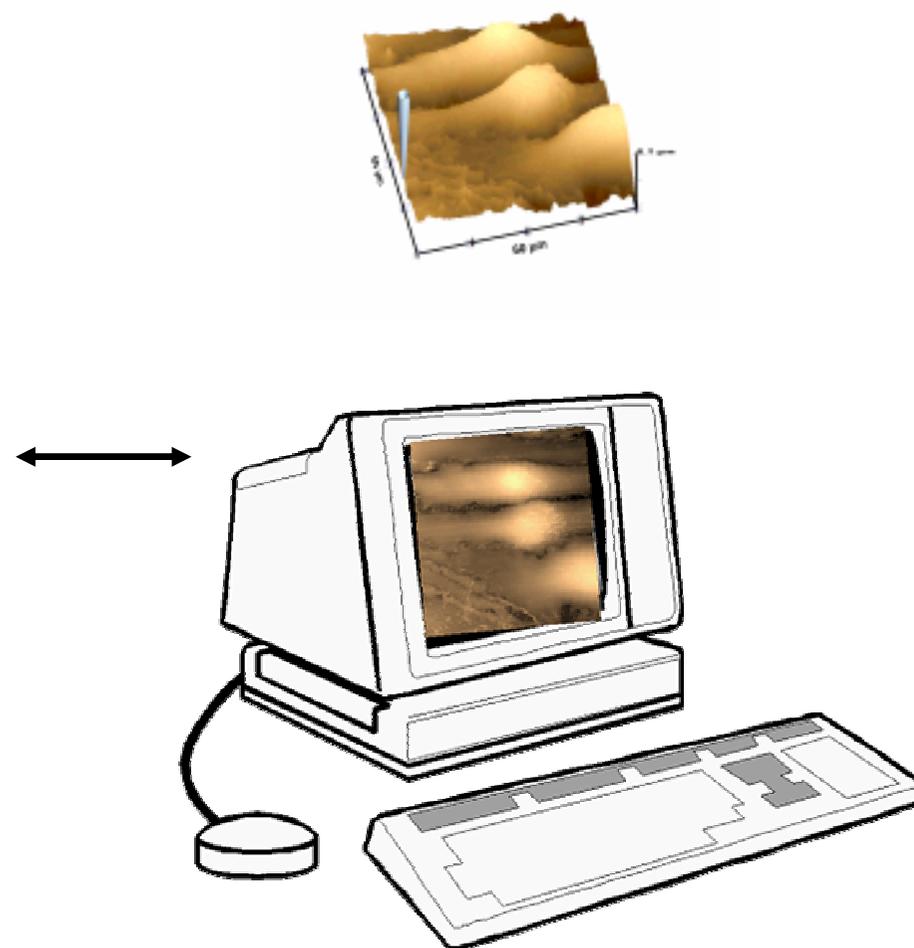
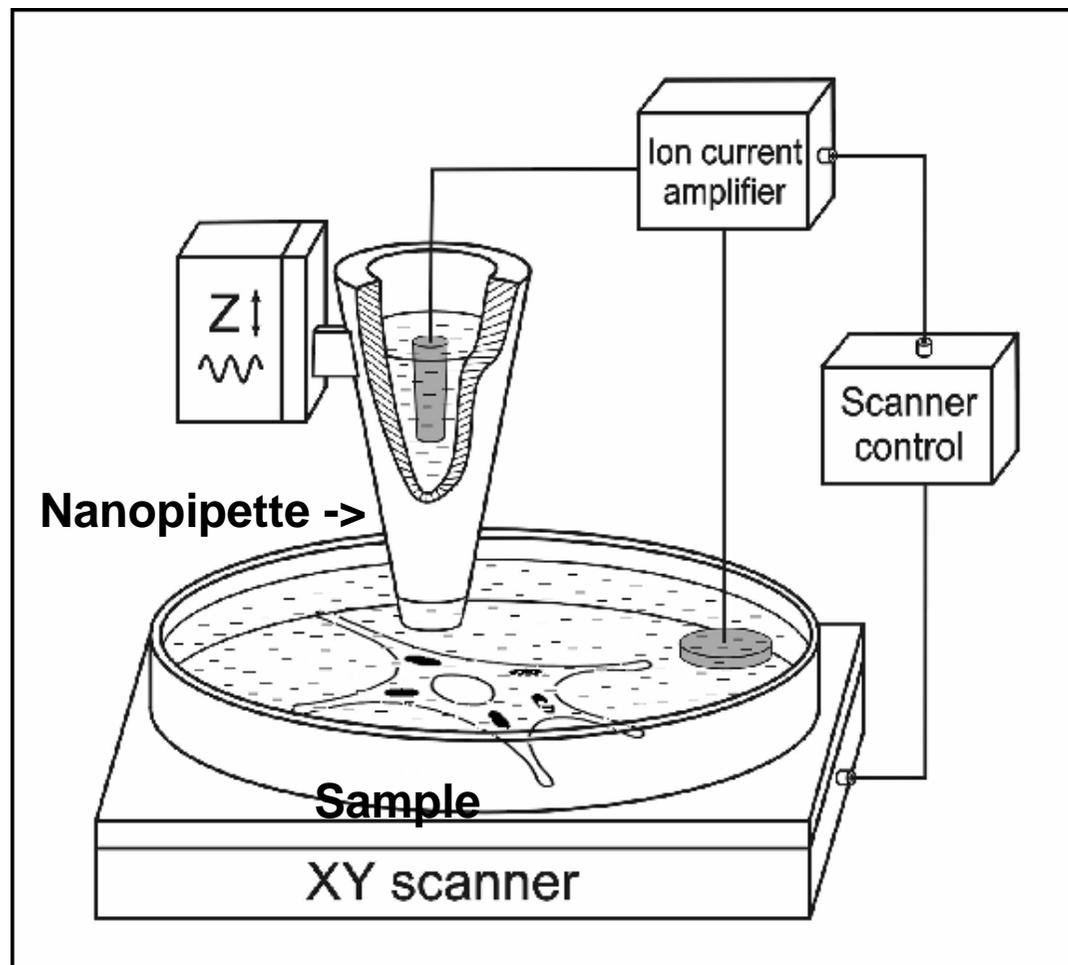
<http://www.ionscope.com/ionscope>



# Принцип действия Ионного Сканирующего Микроскопа

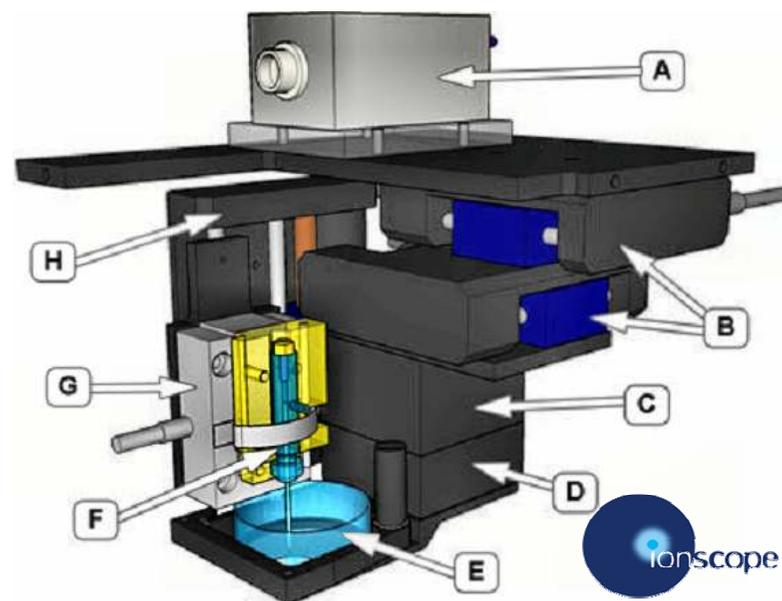


# Ионный сканирующий микроскоп

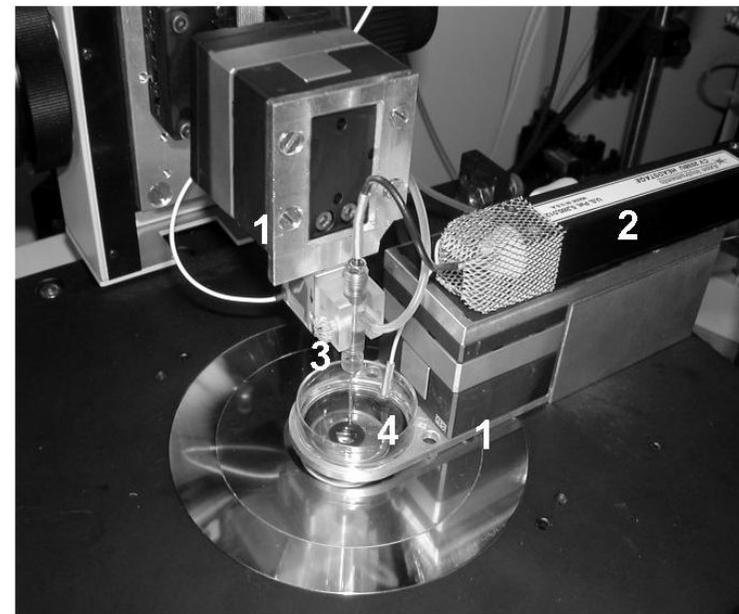
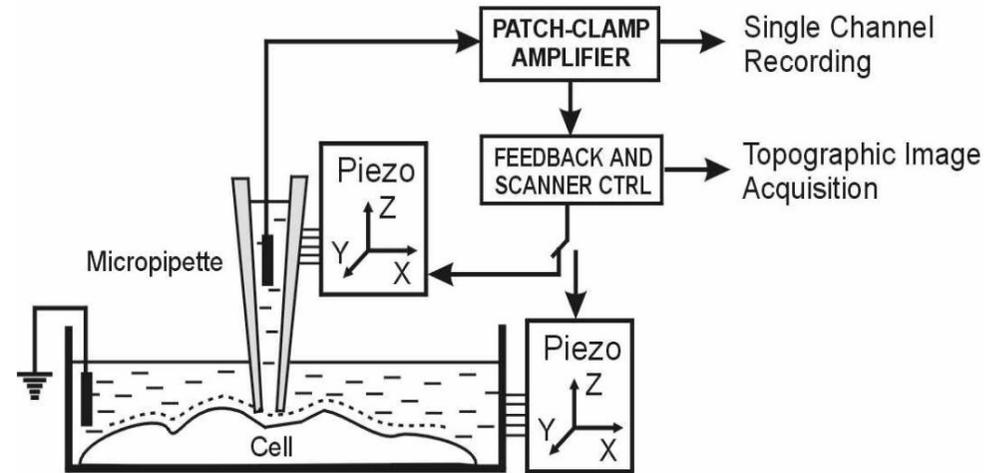
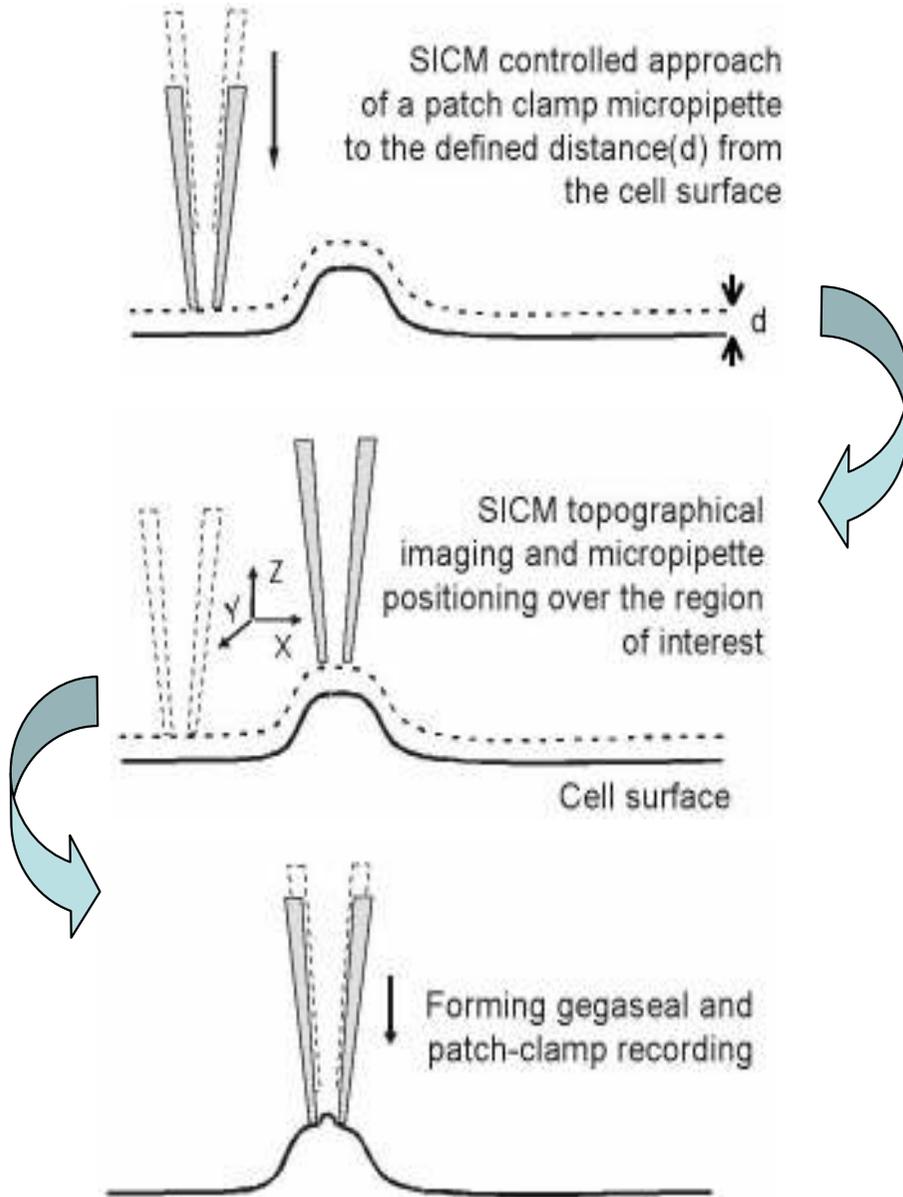


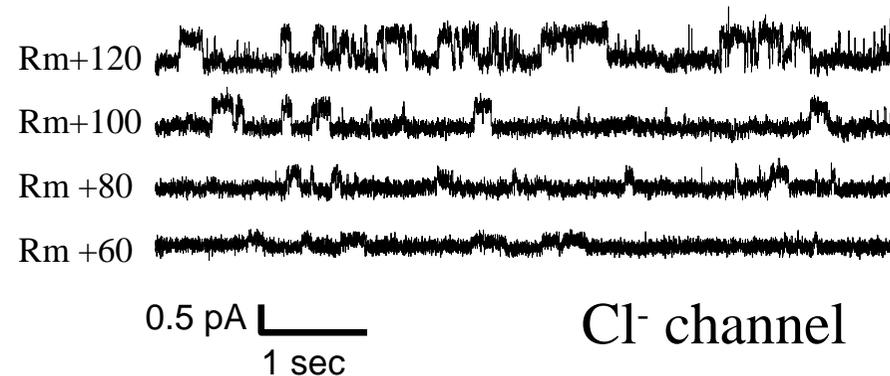
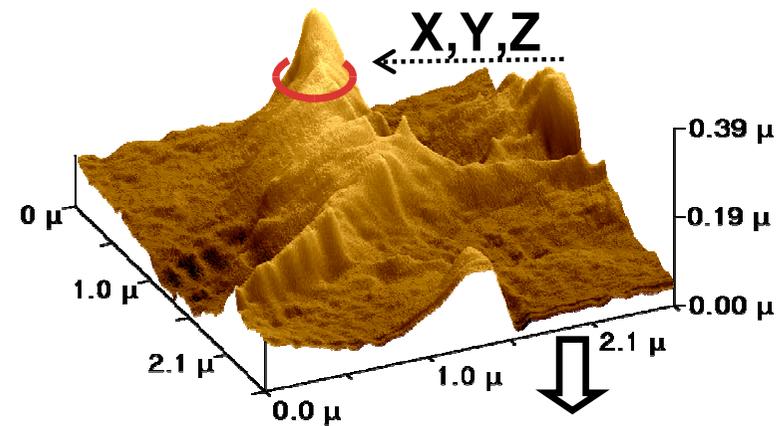
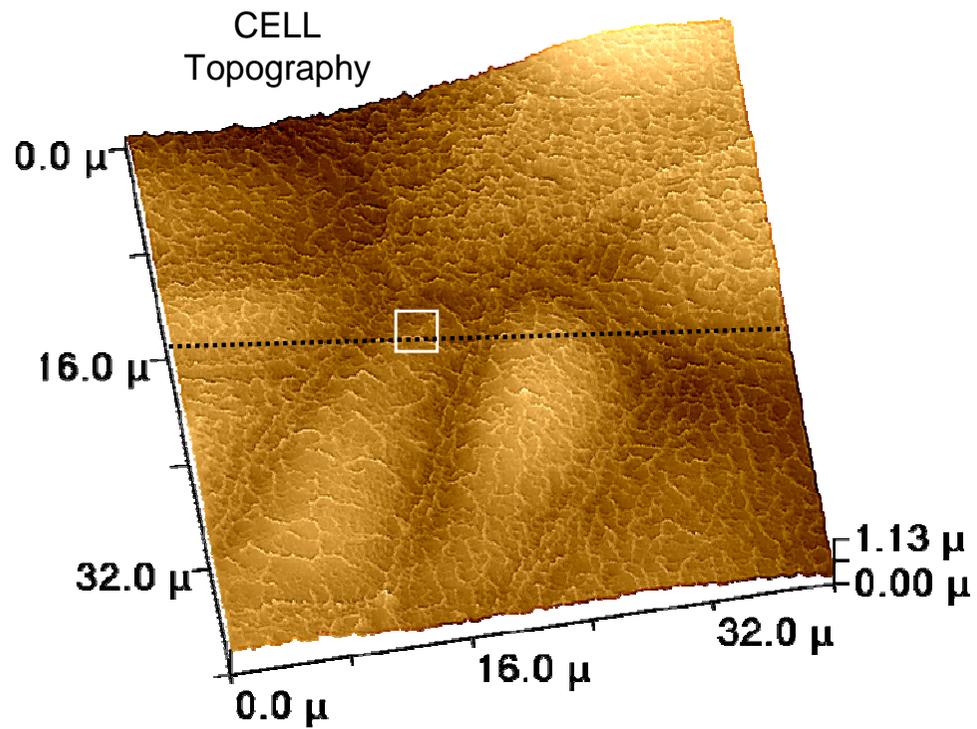
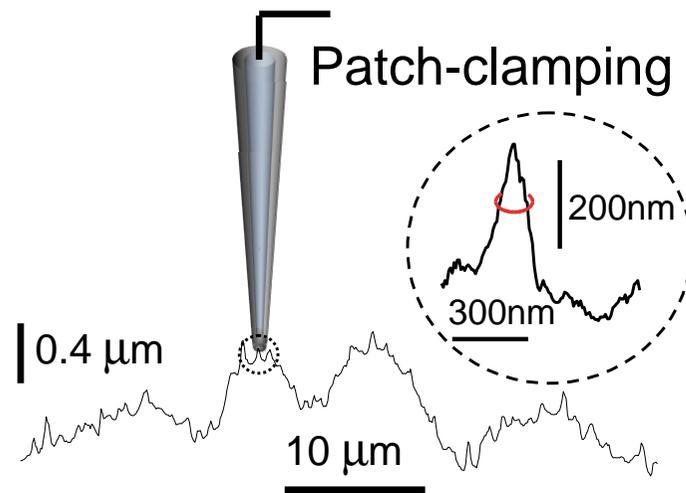
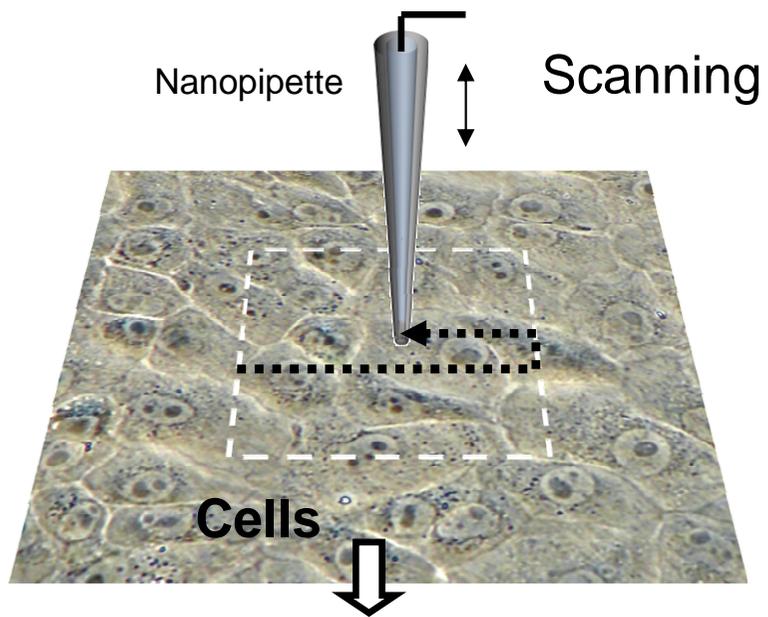
Computer

# Ионный сканирующий микроскоп



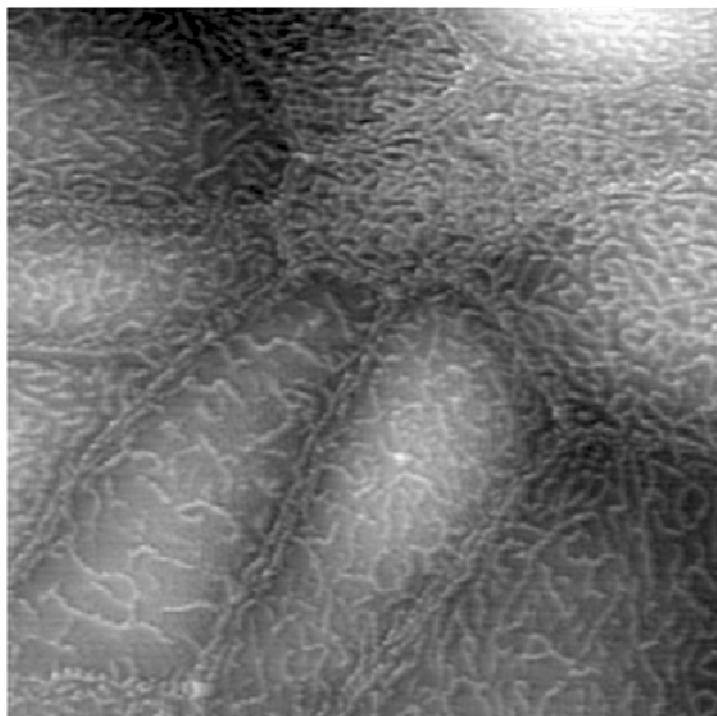
# “Smart” Patch-clamp





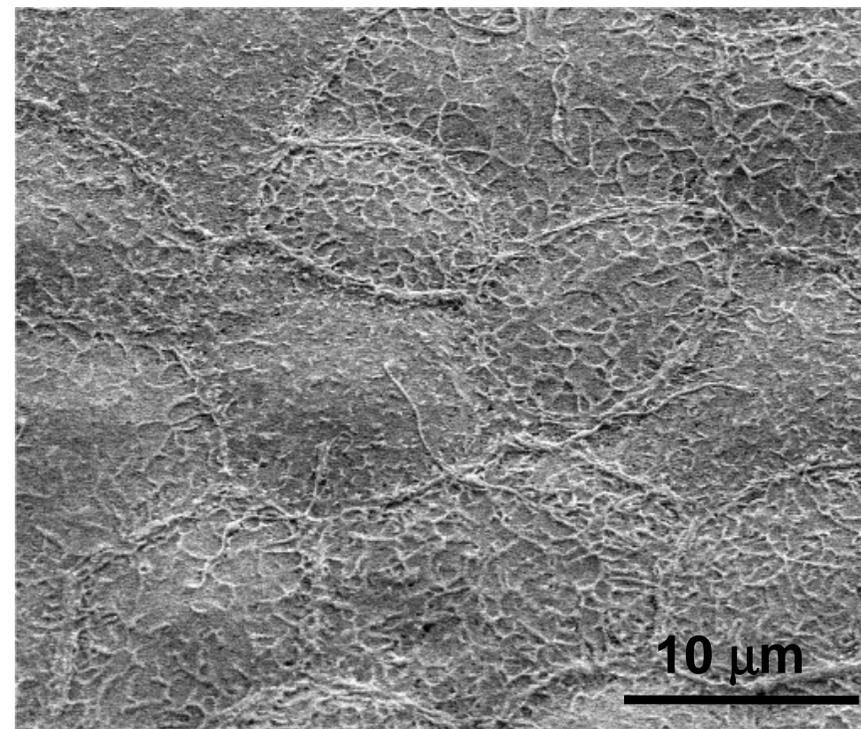
# Почечный эпителий клетки А6

ИСМ



40.0 x 40.0  $\mu$

СЭМ

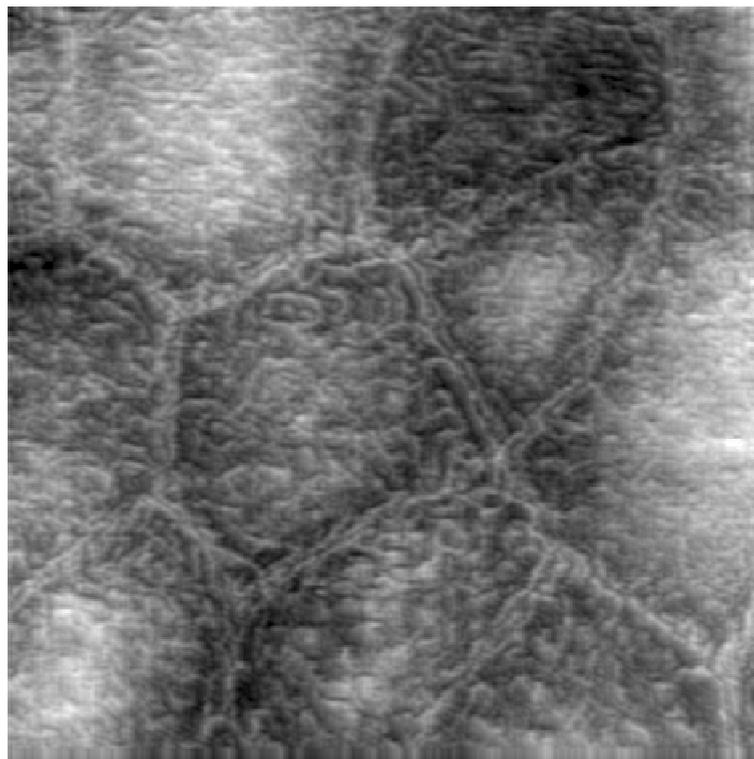


10  $\mu$ m

4.45  $\mu$

0.00  $\mu$

# А6 клетки



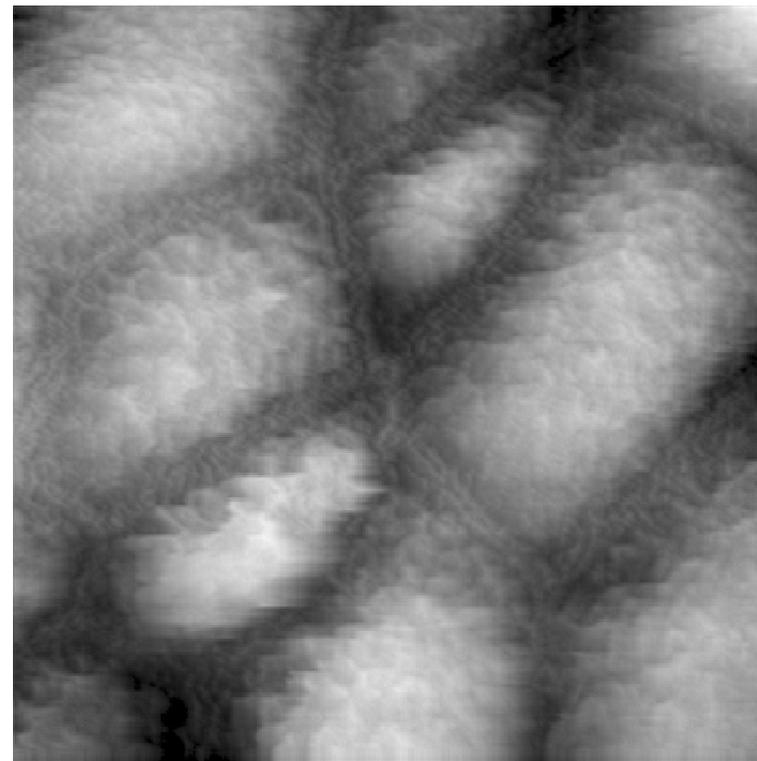
28.5 x 28.5  $\mu$

**Control**

1.82  $\mu$



0.00  $\mu$



28.5 x 28.5  $\mu$

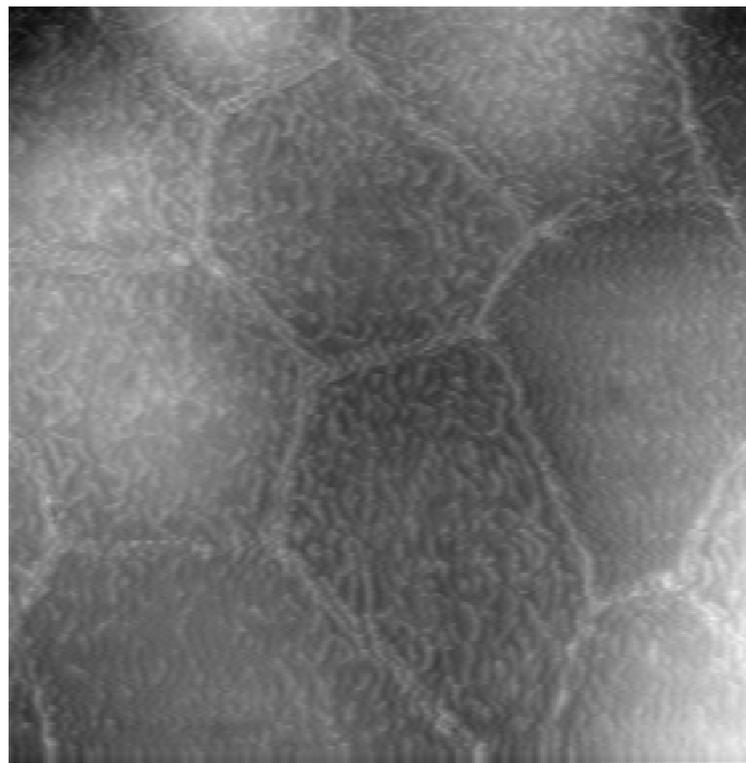
**Hypotonic**

5.95  $\mu$



0.00  $\mu$

# А6 клетки



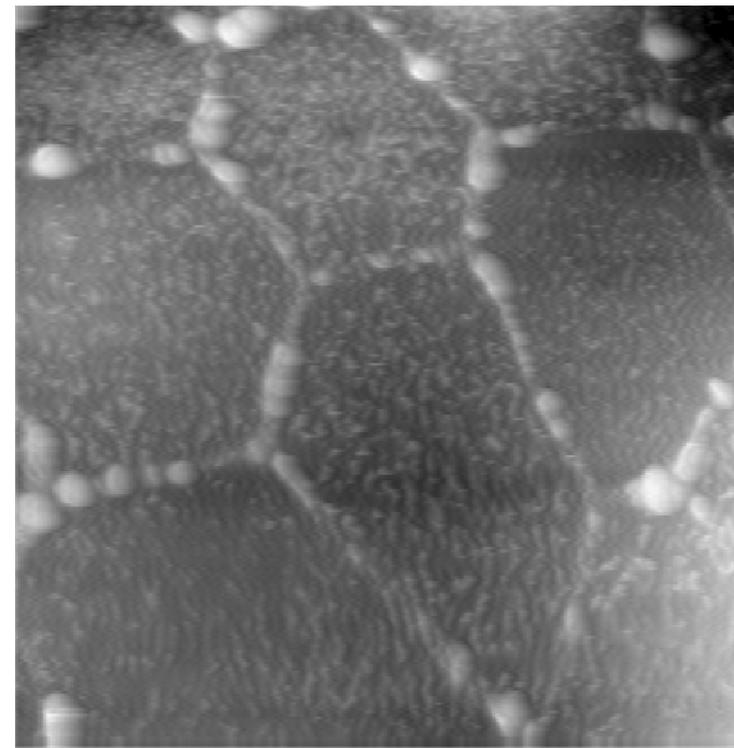
40.0 x 40.0  $\mu$

**Control**

3.80  $\mu$



0.00  $\mu$



40.0 x 40.0  $\mu$

**Hypertonic**

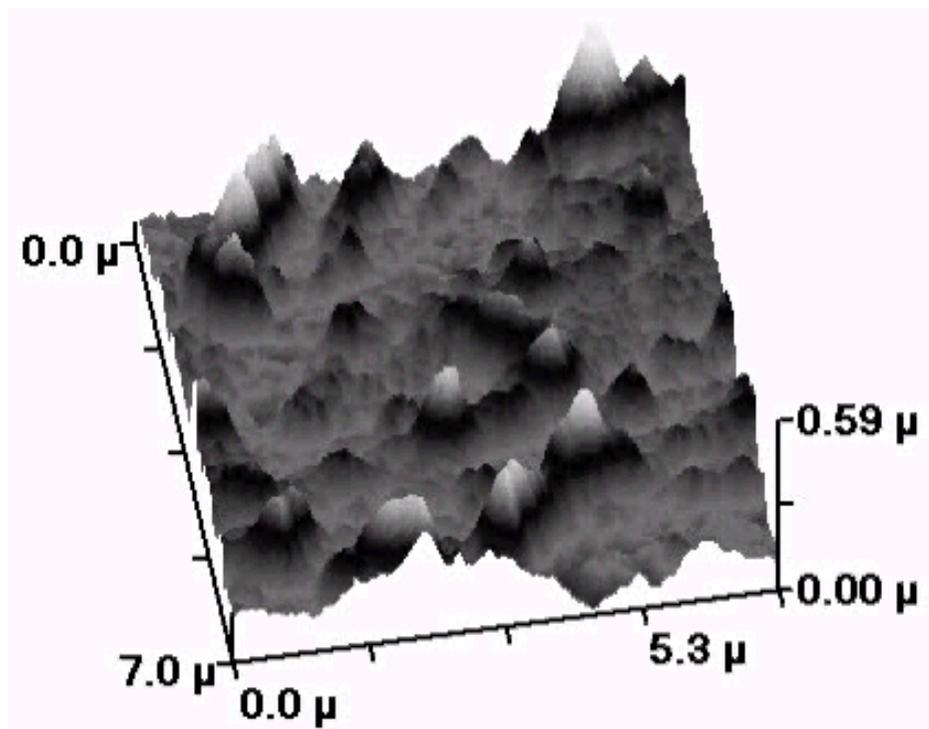
3.73  $\mu$



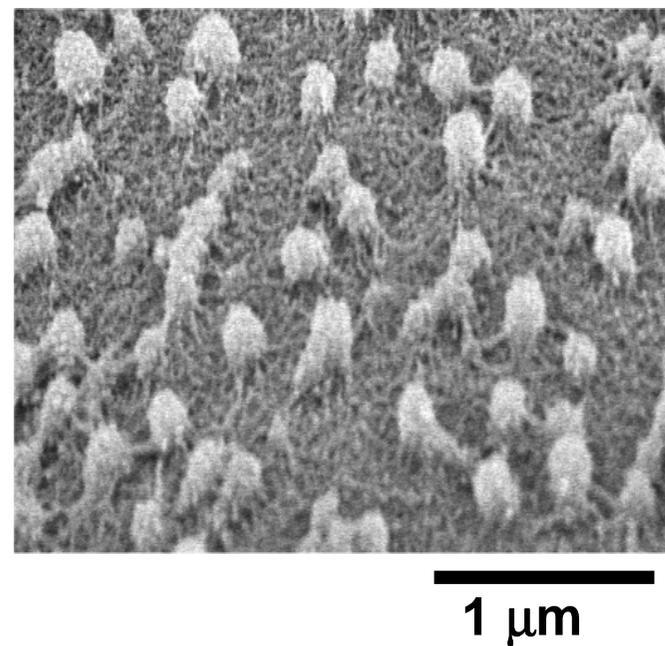
0.00  $\mu$

# ИСМ и СЭМ микроворсинок клетки

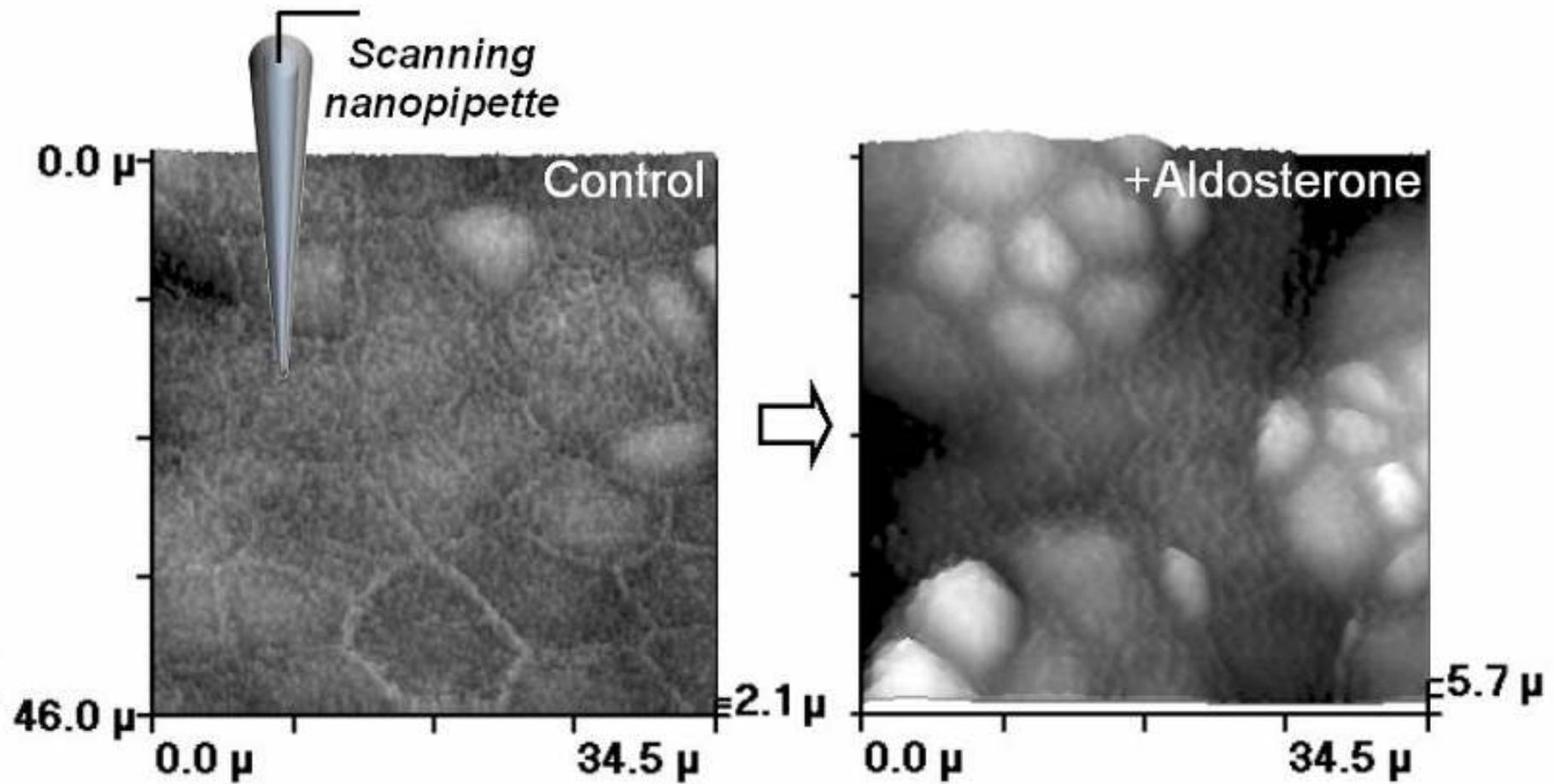
ИСМ



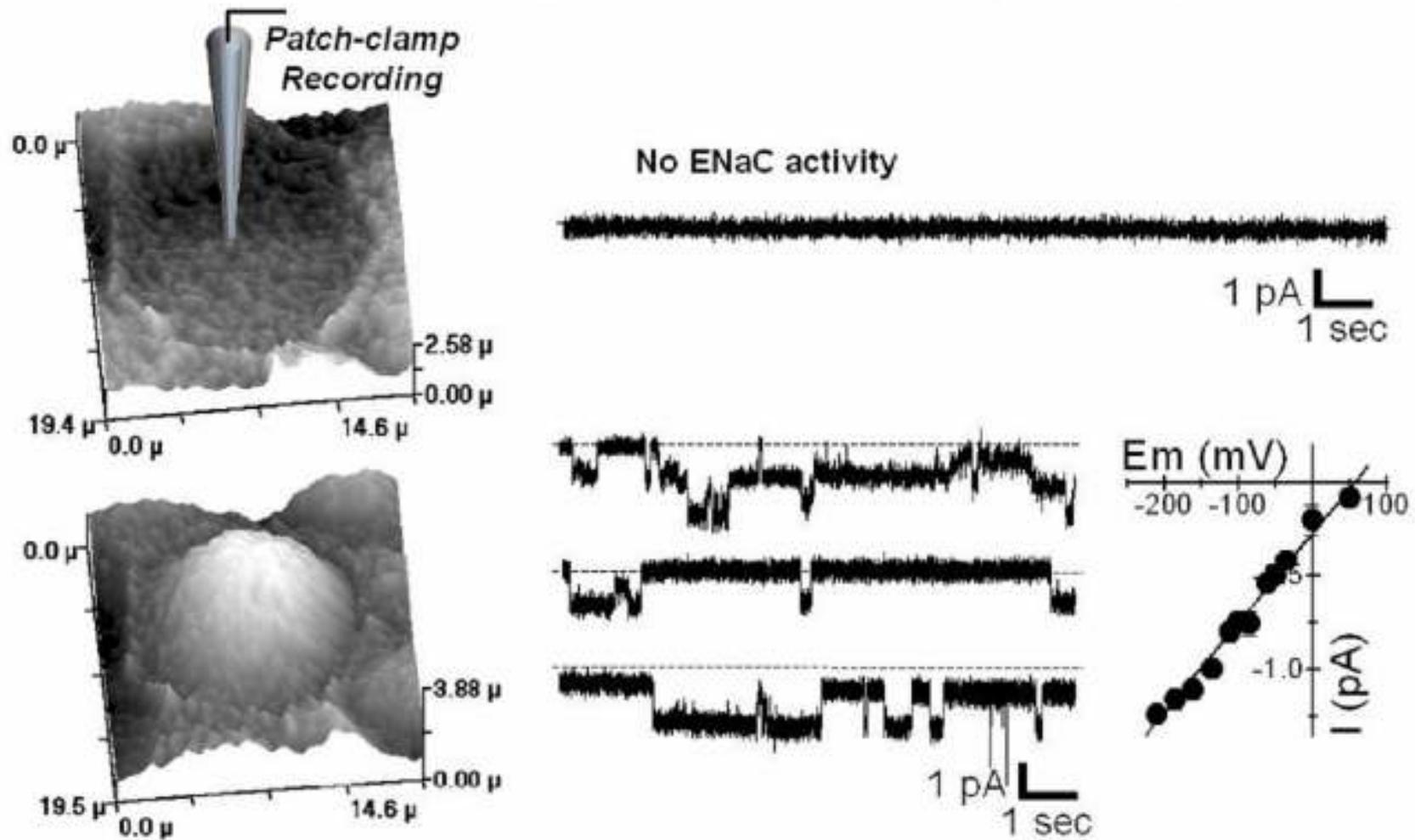
СЭМ



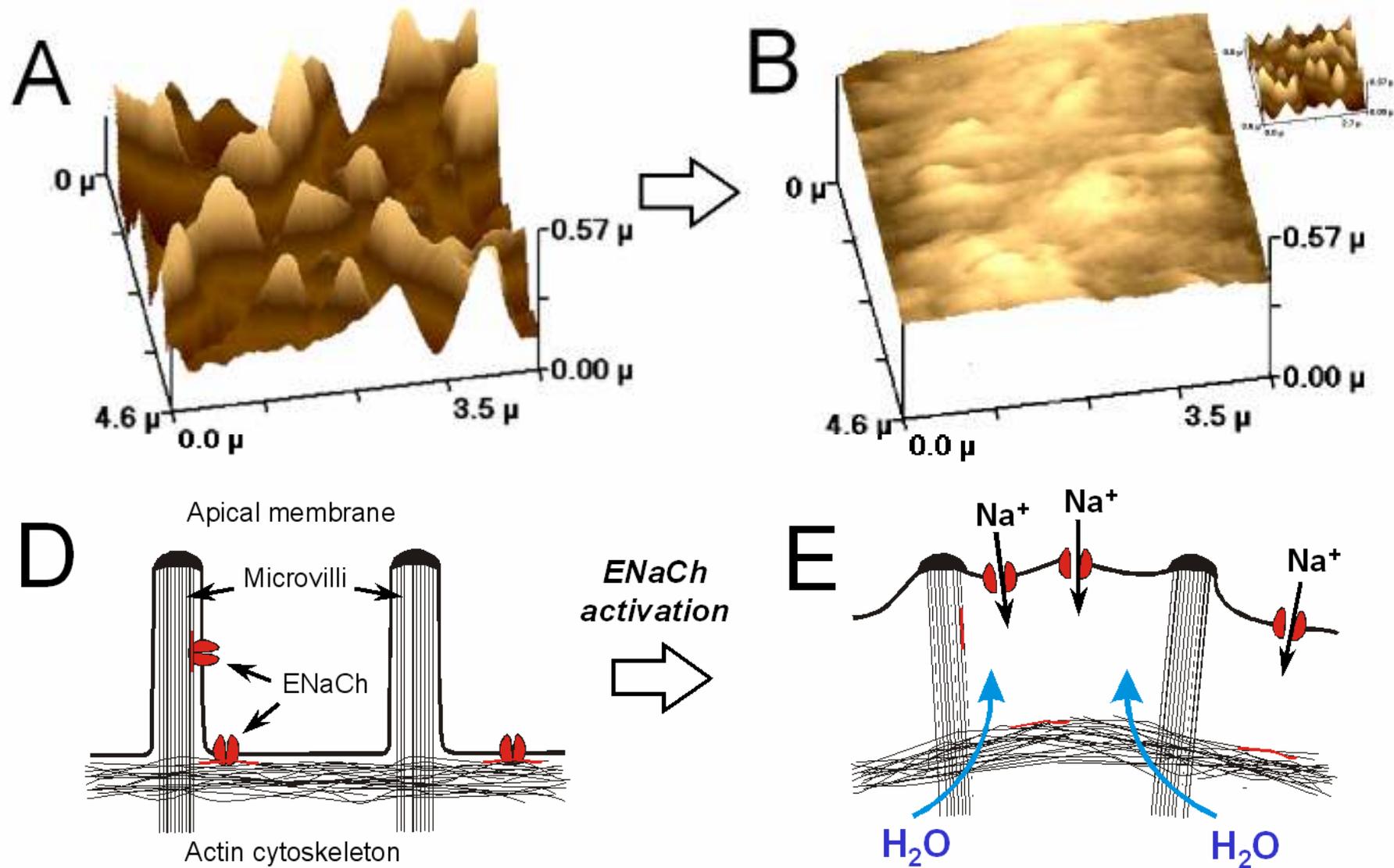
# Действие альдостерона & Na<sup>+</sup> каналы



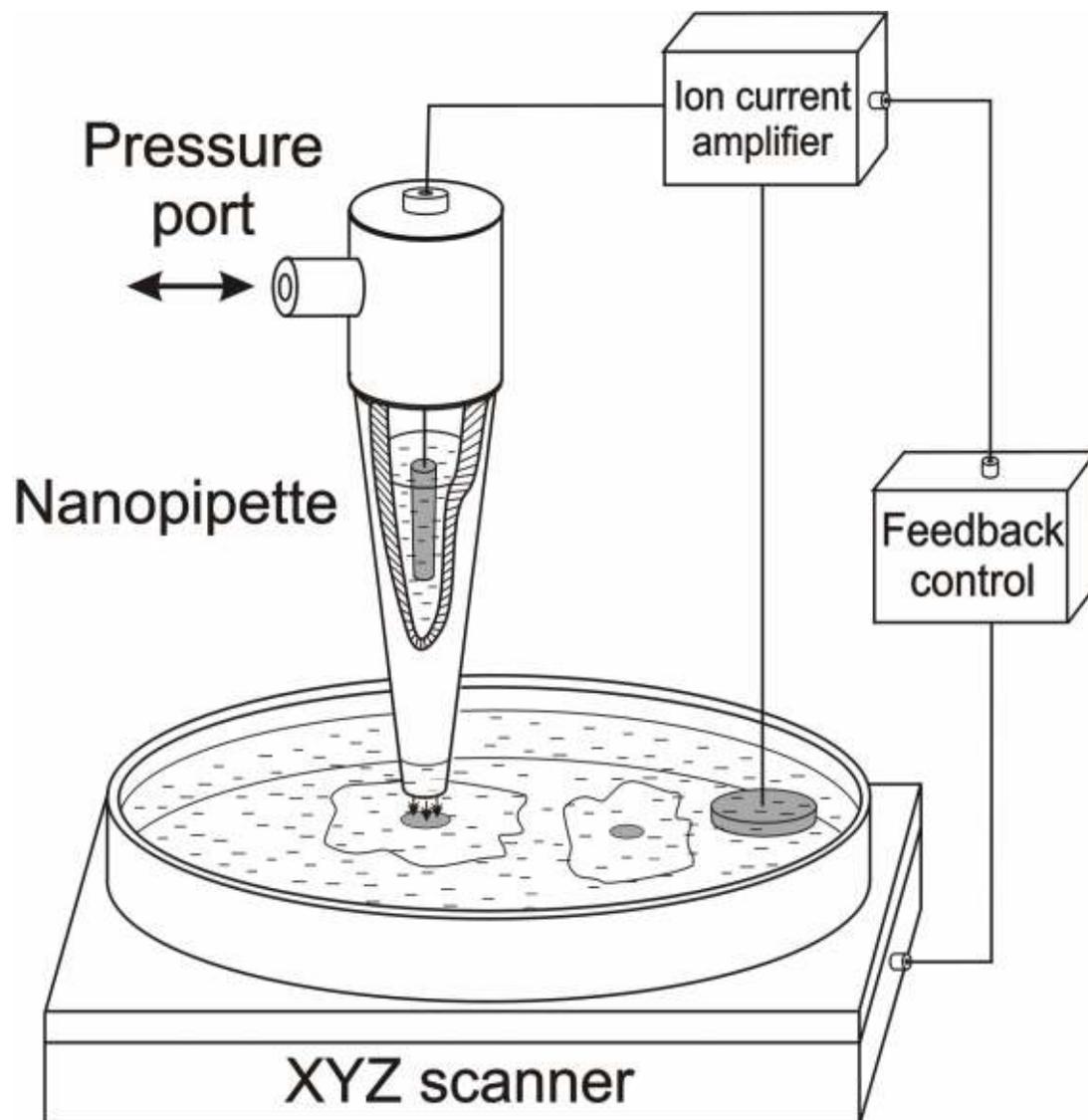
# Действие альдостерона & Na<sup>+</sup> каналы



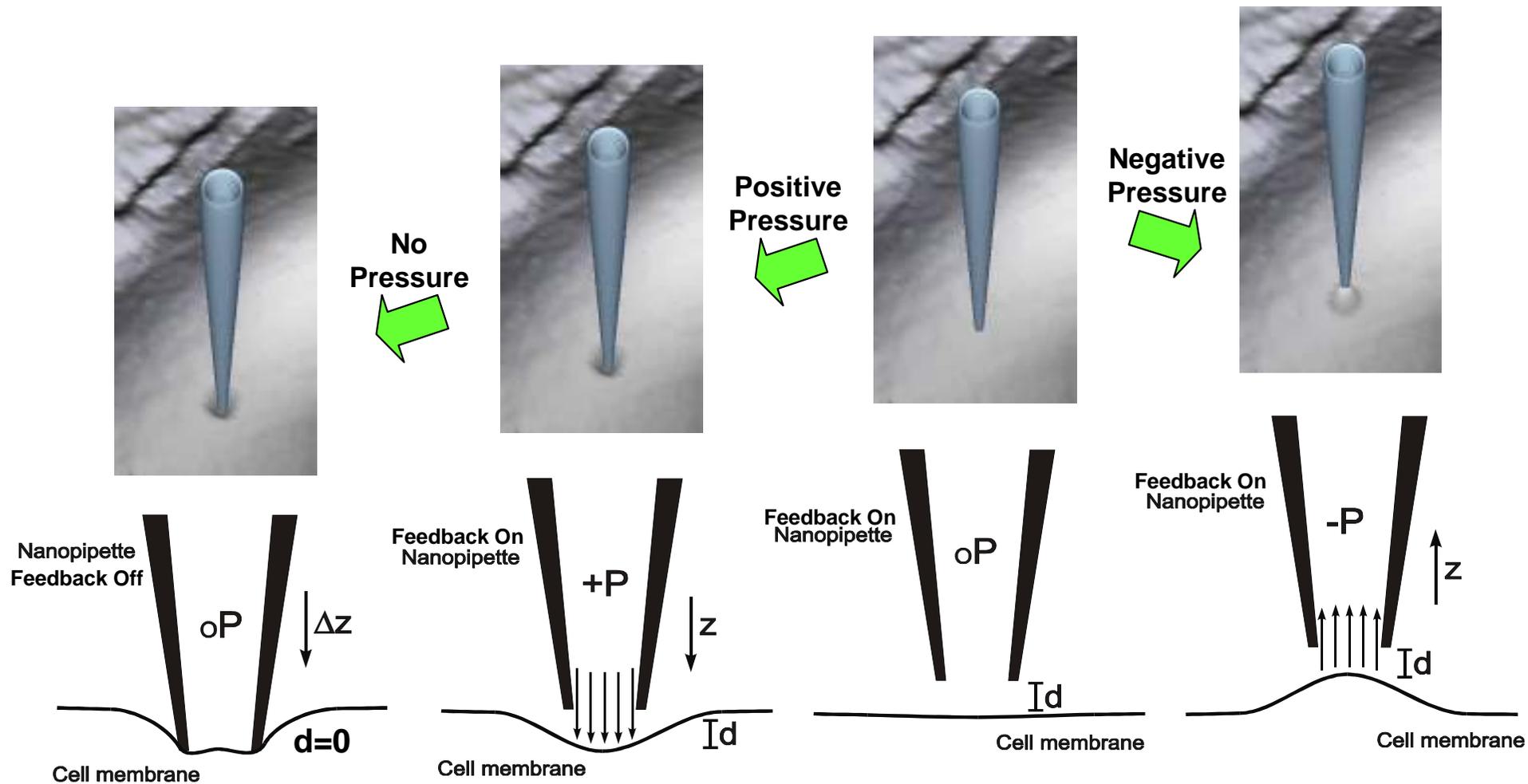
# Возможный механизм действия альдостерона



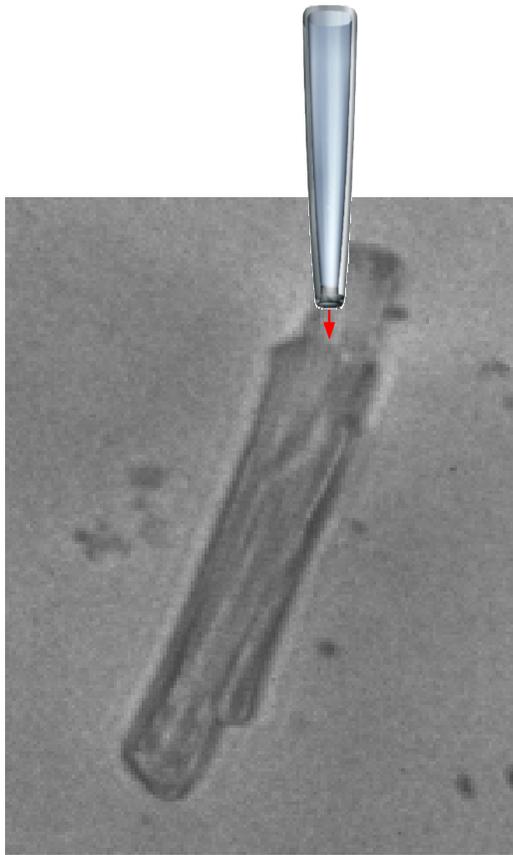
# Наномеханика клетки с помощью ИСМ



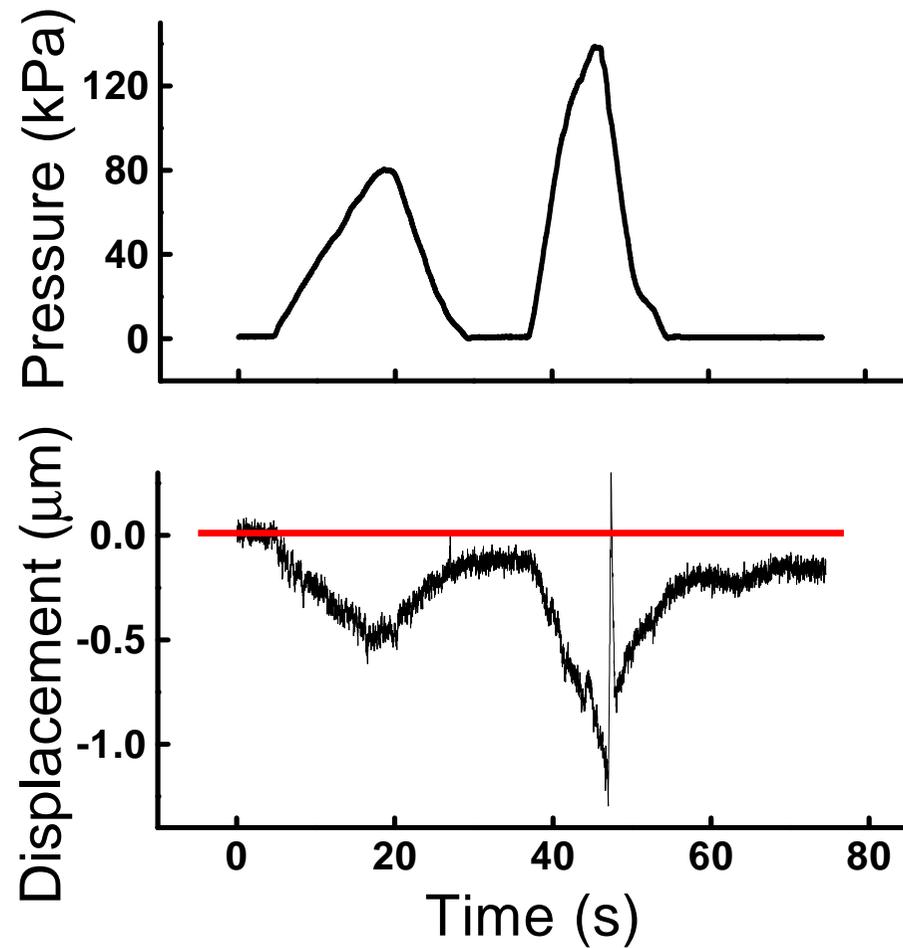
# Наномеханика клетки с помощью ИСМ



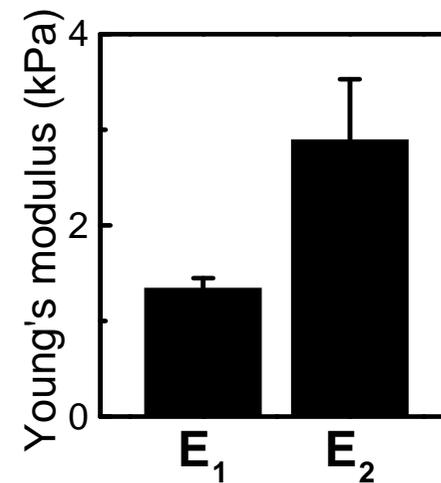
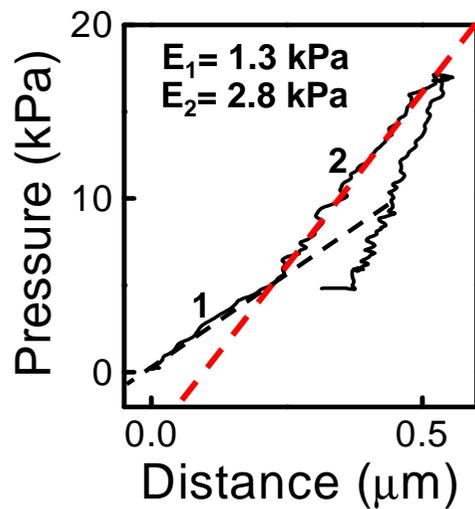
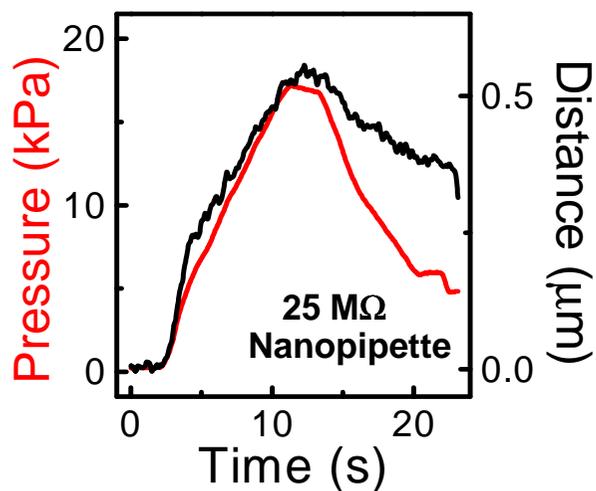
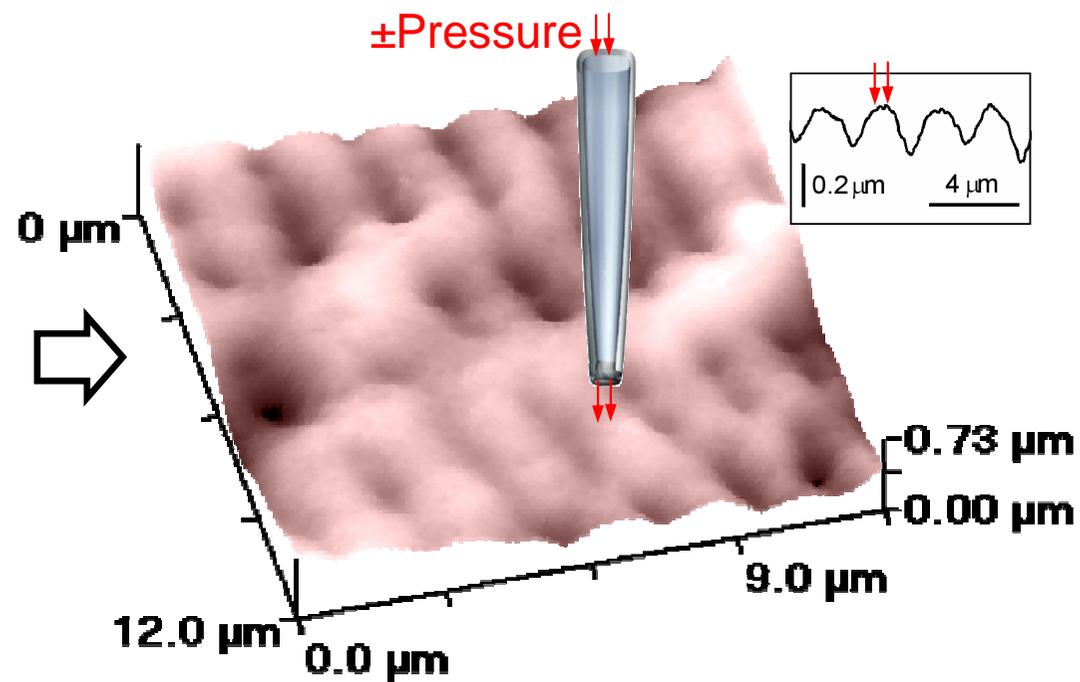
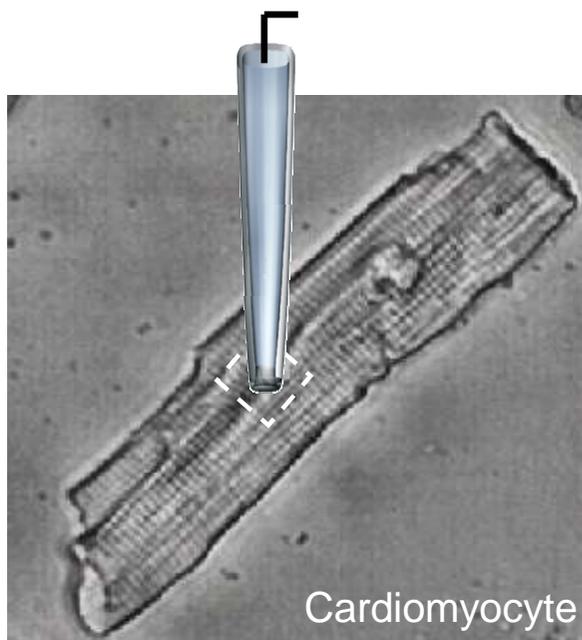
# Механическая стимуляция кардиомиоцита



real time=3.5 min  
30 frames/sec



# Измерения модуля упругости кардиомиоцитов



# Functional localization of single active ion channels on the surface of a living cell

Yuri E. Korchev\*#, Yuri A. Negulyaev†, Christopher R.W. Edwards\*, Igor Vodyanoy‡§ and Max J. Lab§

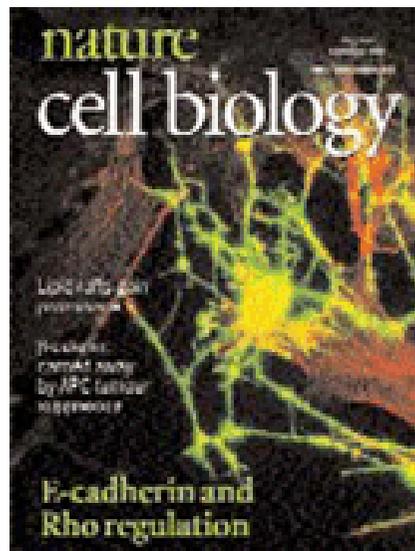
\*Division of Medicine, Imperial College School of Medicine, MRC Clinical Sciences Centre, Hammersmith Campus, Du Cane Road, London W12 0NN, UK

†Institute of Cytology, Russian Academy of Sciences, Tichoretsky 4, St Petersburg, Russia

‡Office of Naval Research International Field Office, 223 Old Marylebone Road, London NW1 5TH, UK

§National Heart and Lung Institute, Imperial College School of Medicine, Charing Cross Campus, St Dunstan's Road, London W6 8RP, UK

#e-mail: y.korchev@ic.ac.uk

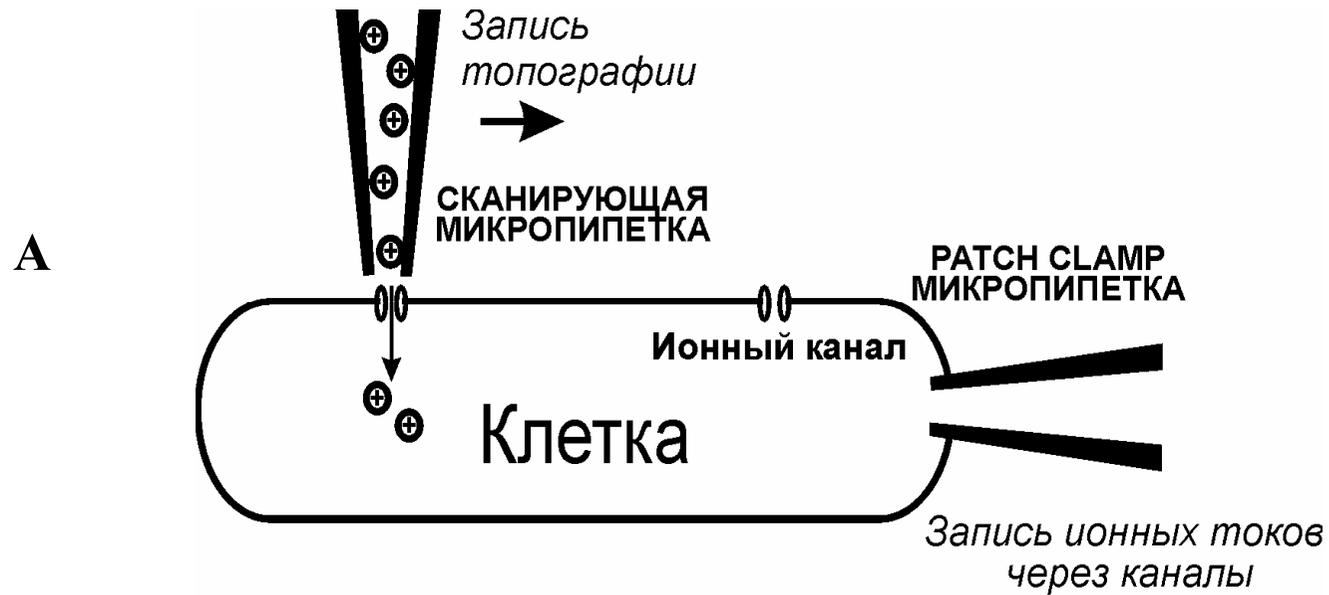


## HIGHLIGHTS

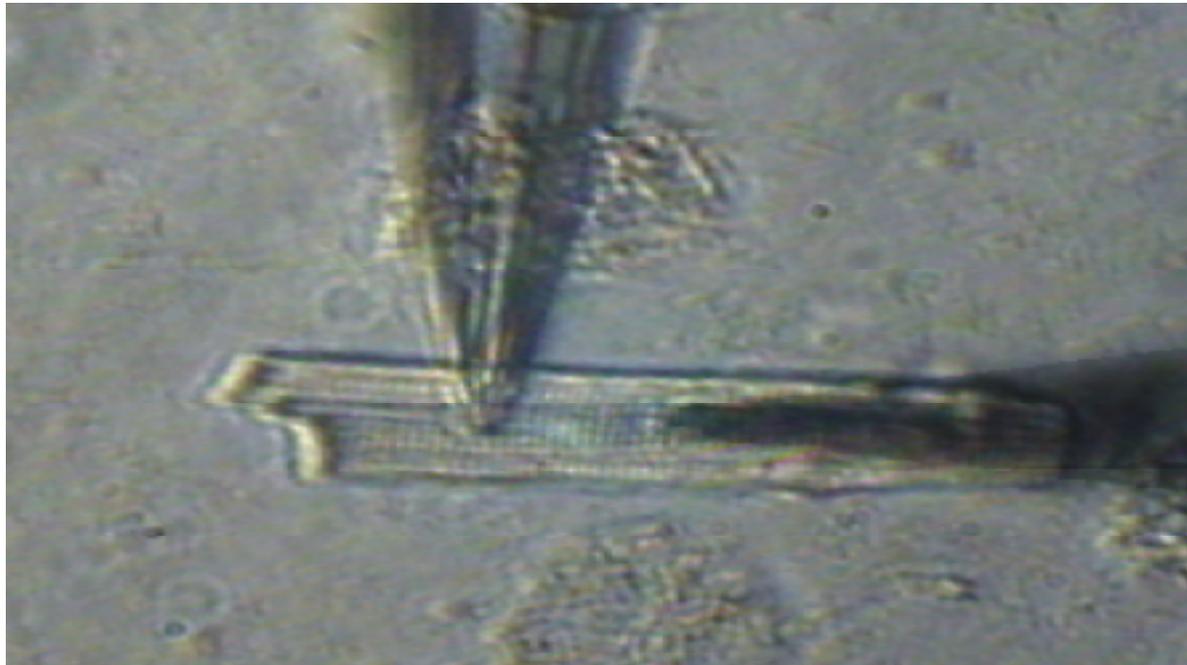
### ION CHANNELS

O Channel,  
where art thou?

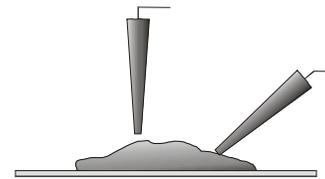
# Поиск функционально активных ионных каналов на поверхностной мембране клетки



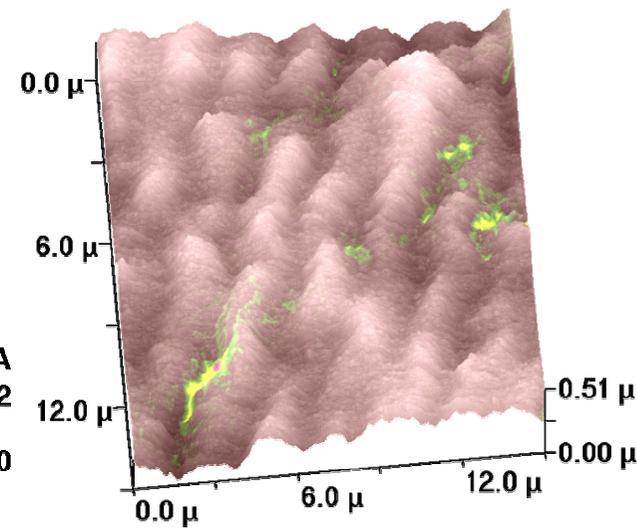
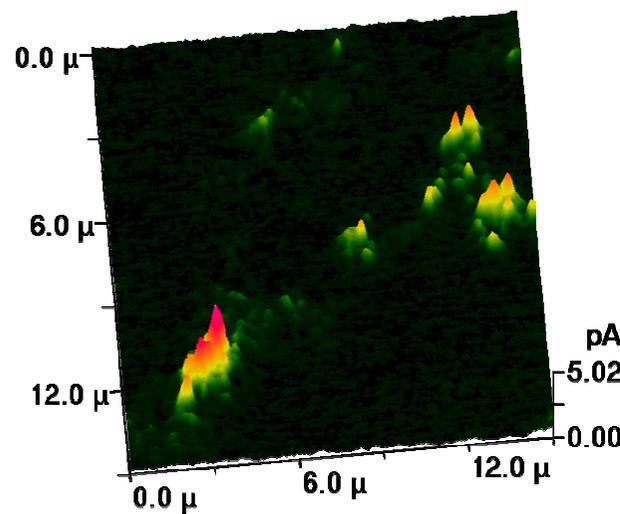
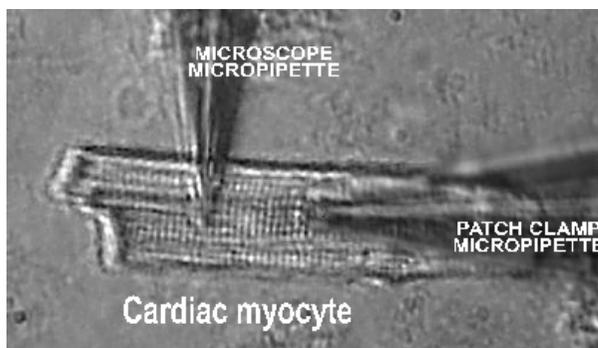
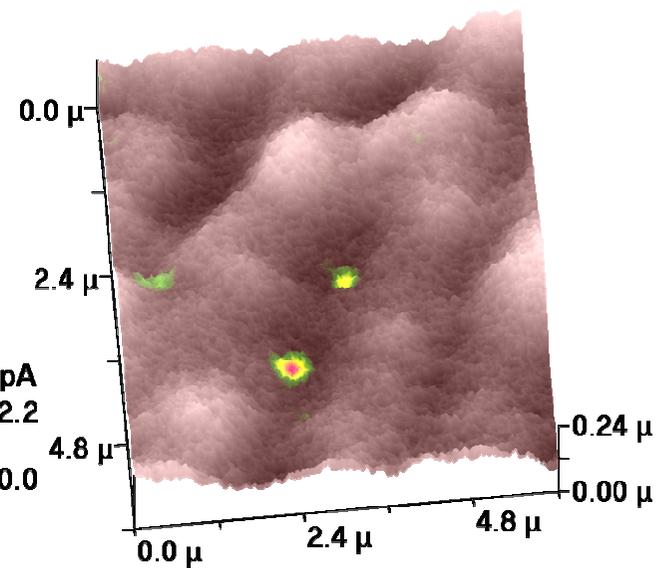
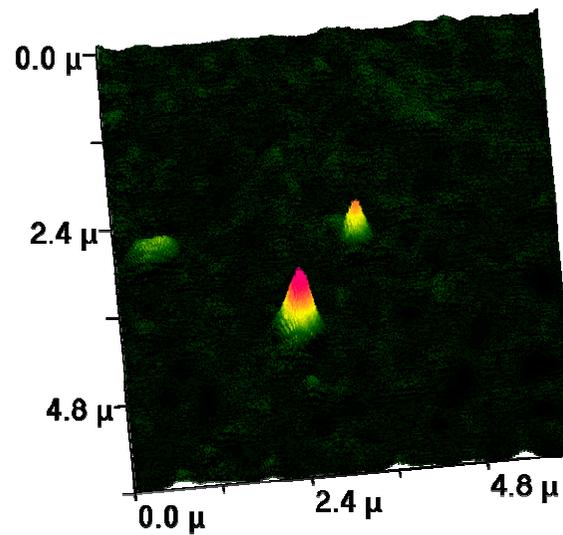
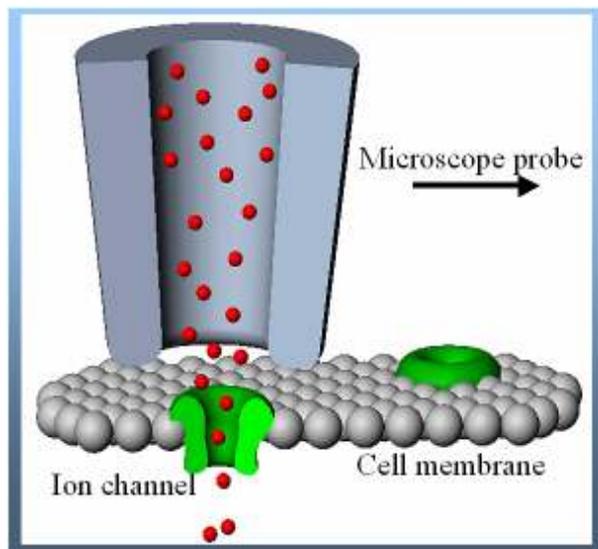
**Б**

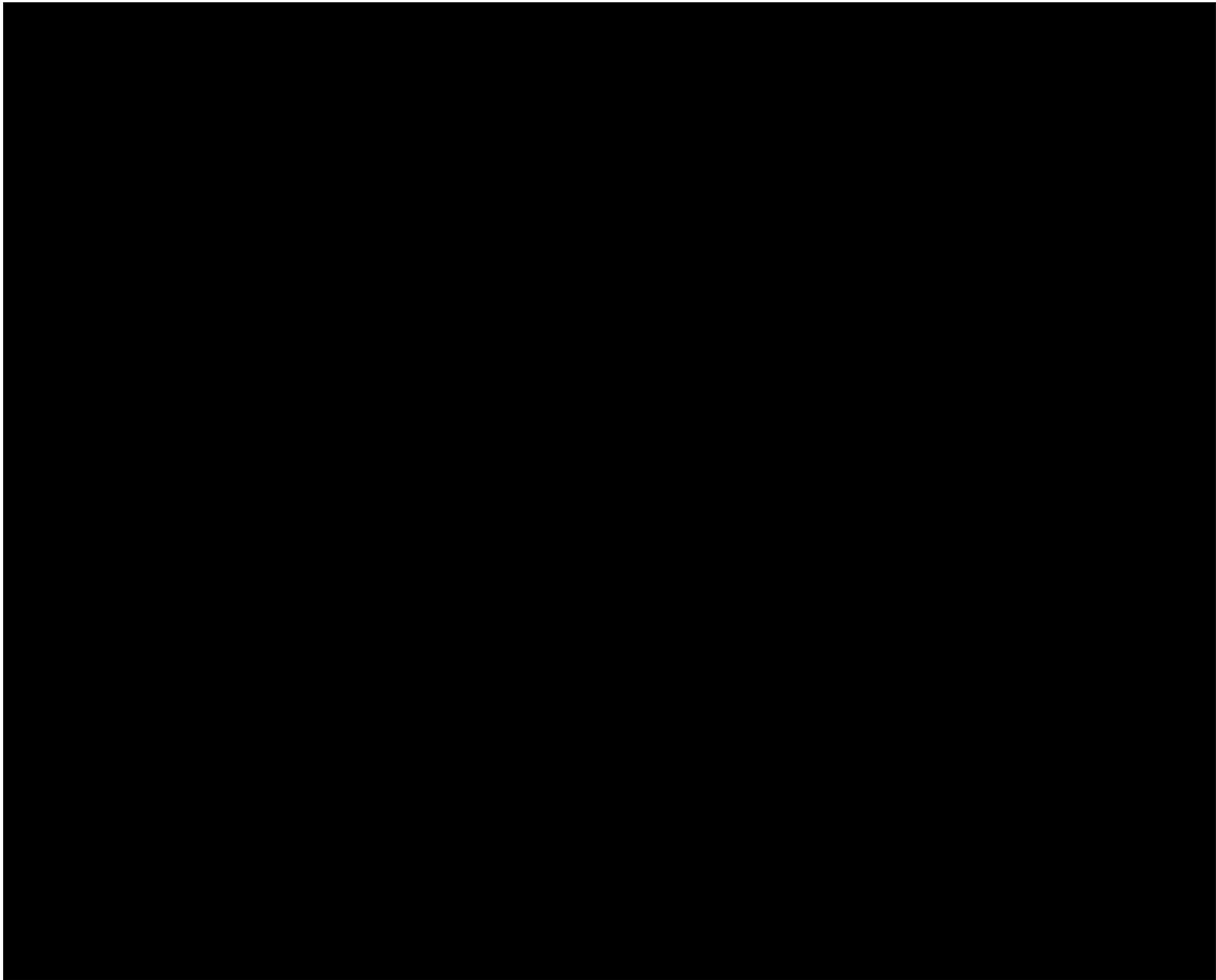


# Functional Localization of $K_{ATP}$ Channels

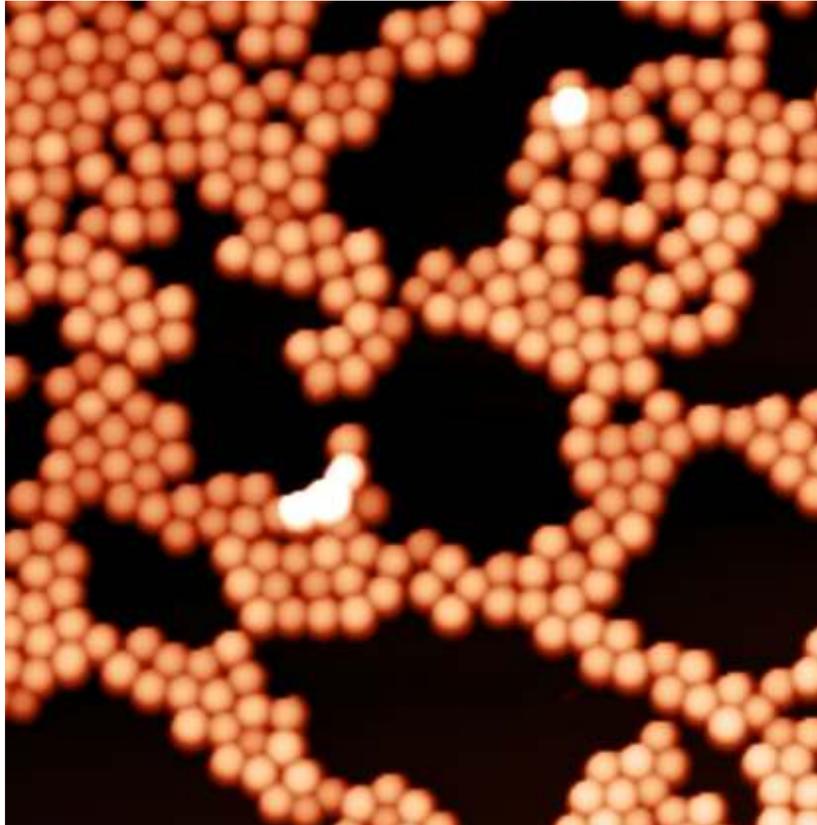


Functional cell Imaging  
*Nature Cell Biol.* (2000) 2: 616-619

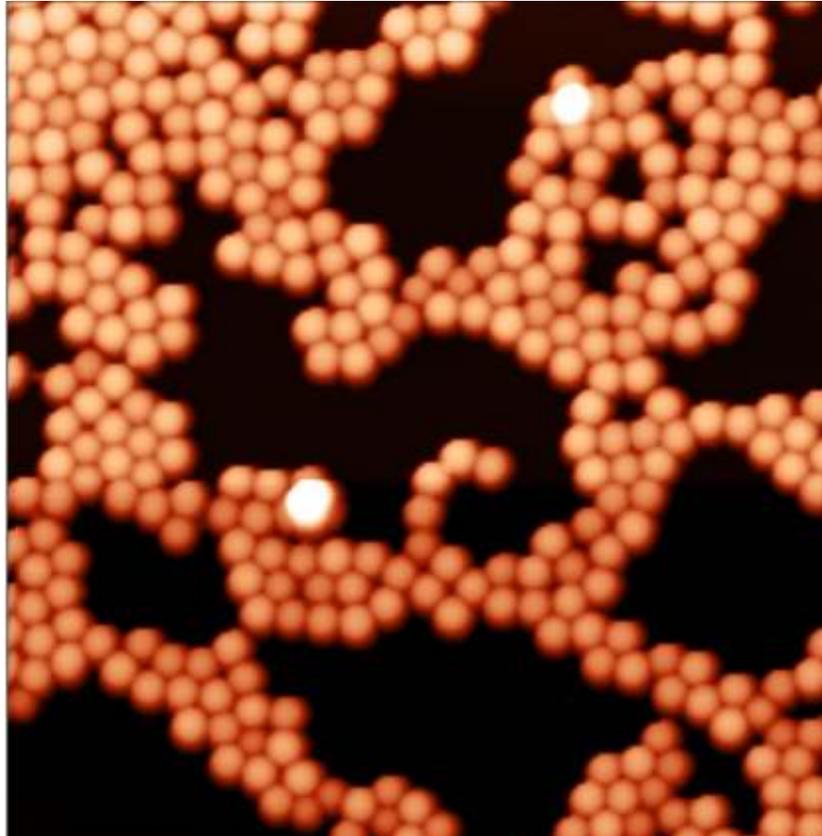




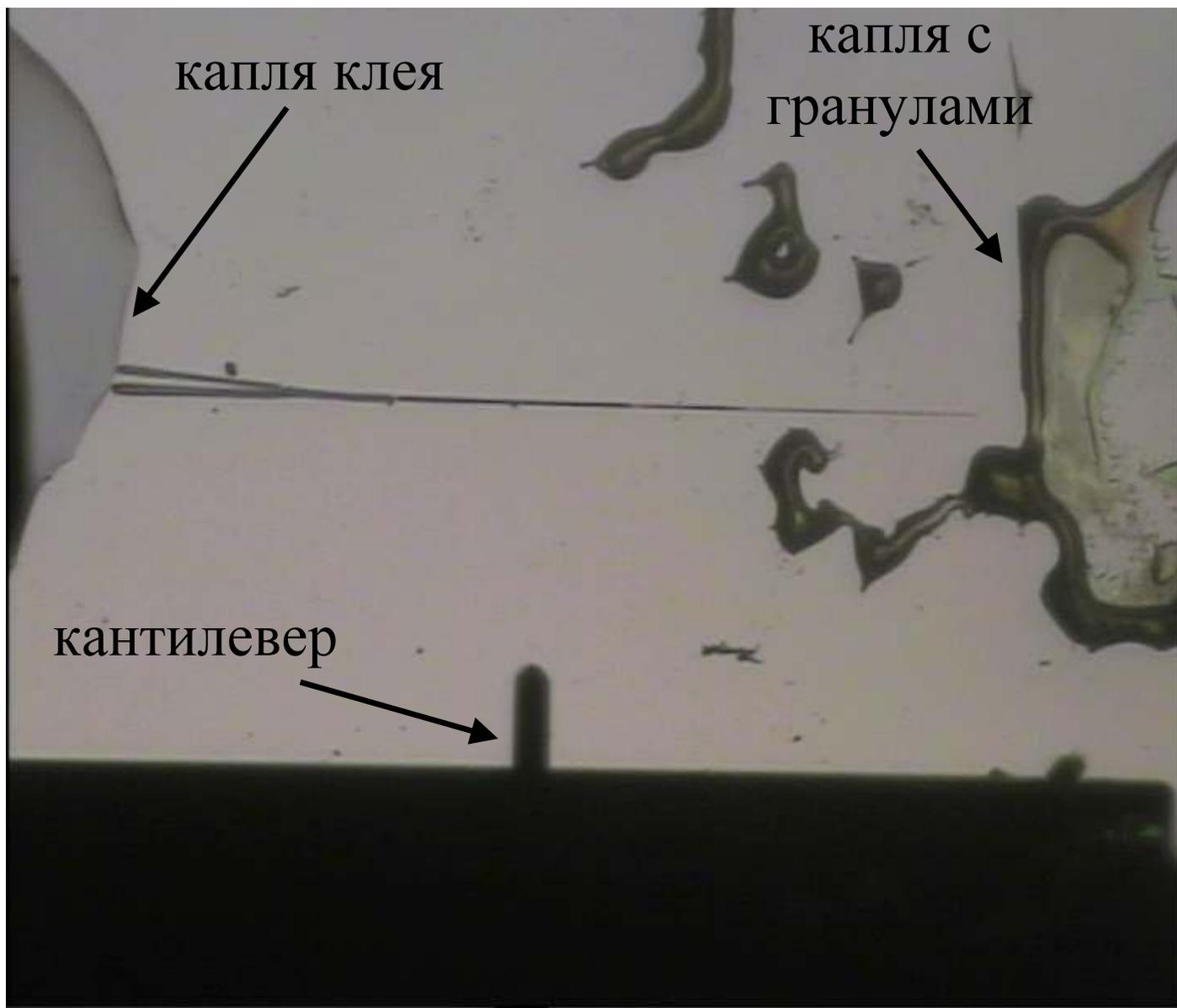
*Техника изготовления зондов с  
калиброванным радиусом кончика.*



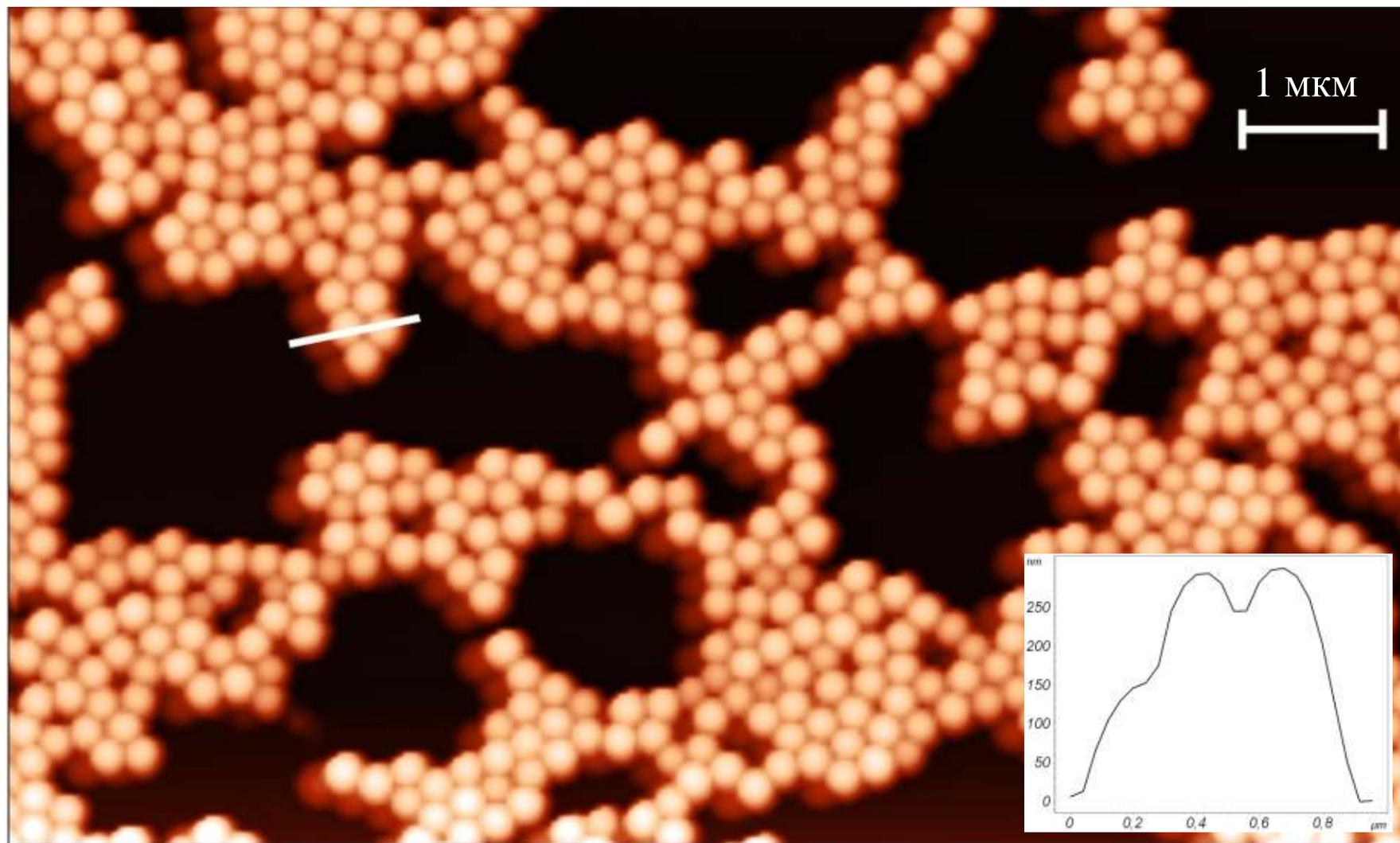
*Рис. Позиционирование гранул на поверхности подложки с помощью АСМ зонда. АСМ топография одного и того же участка поверхности с гранулами: до манипуляции.*



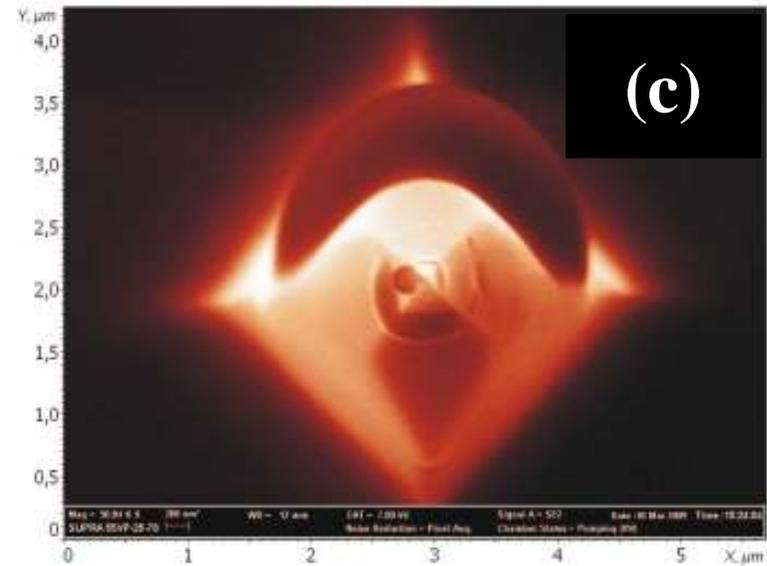
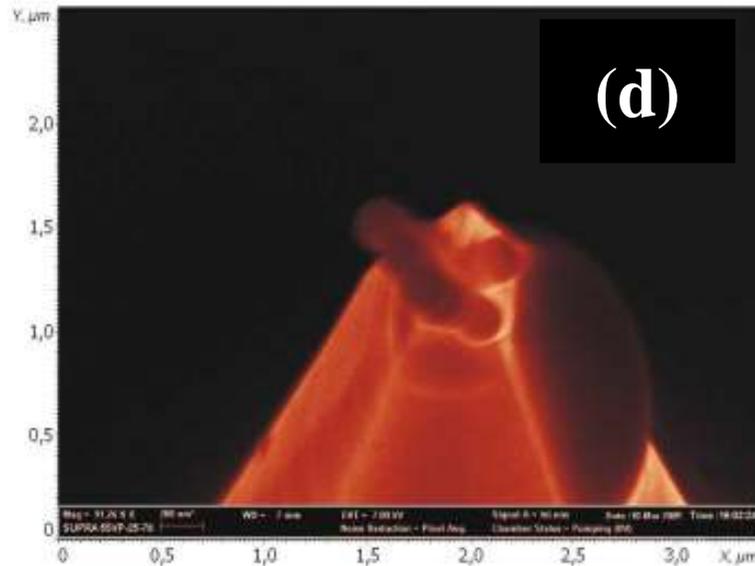
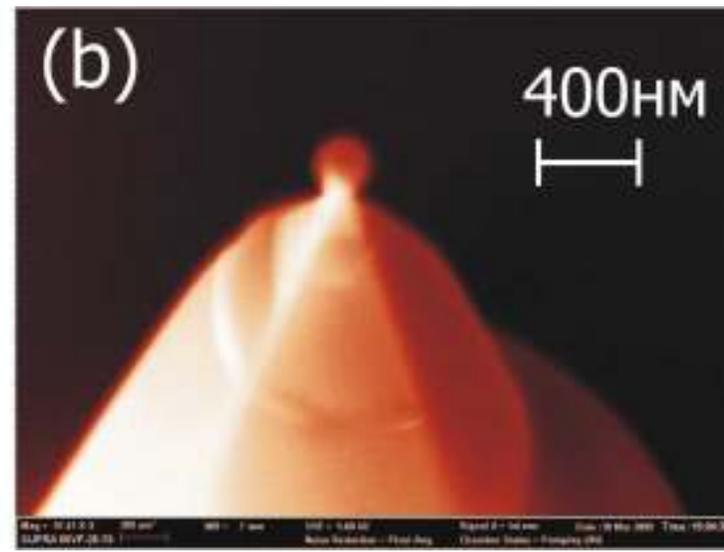
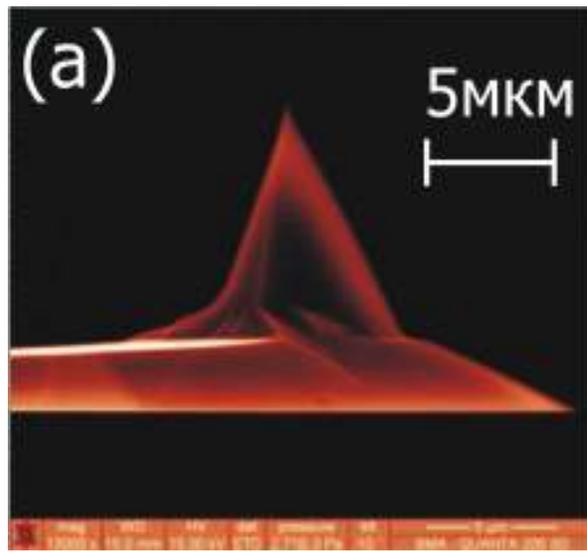
*Рис. Позиционирование гранул на поверхности подложки с помощью АСМ зонда. АСМ топография одного и того же участка поверхности с гранулами: после манипуляции.*



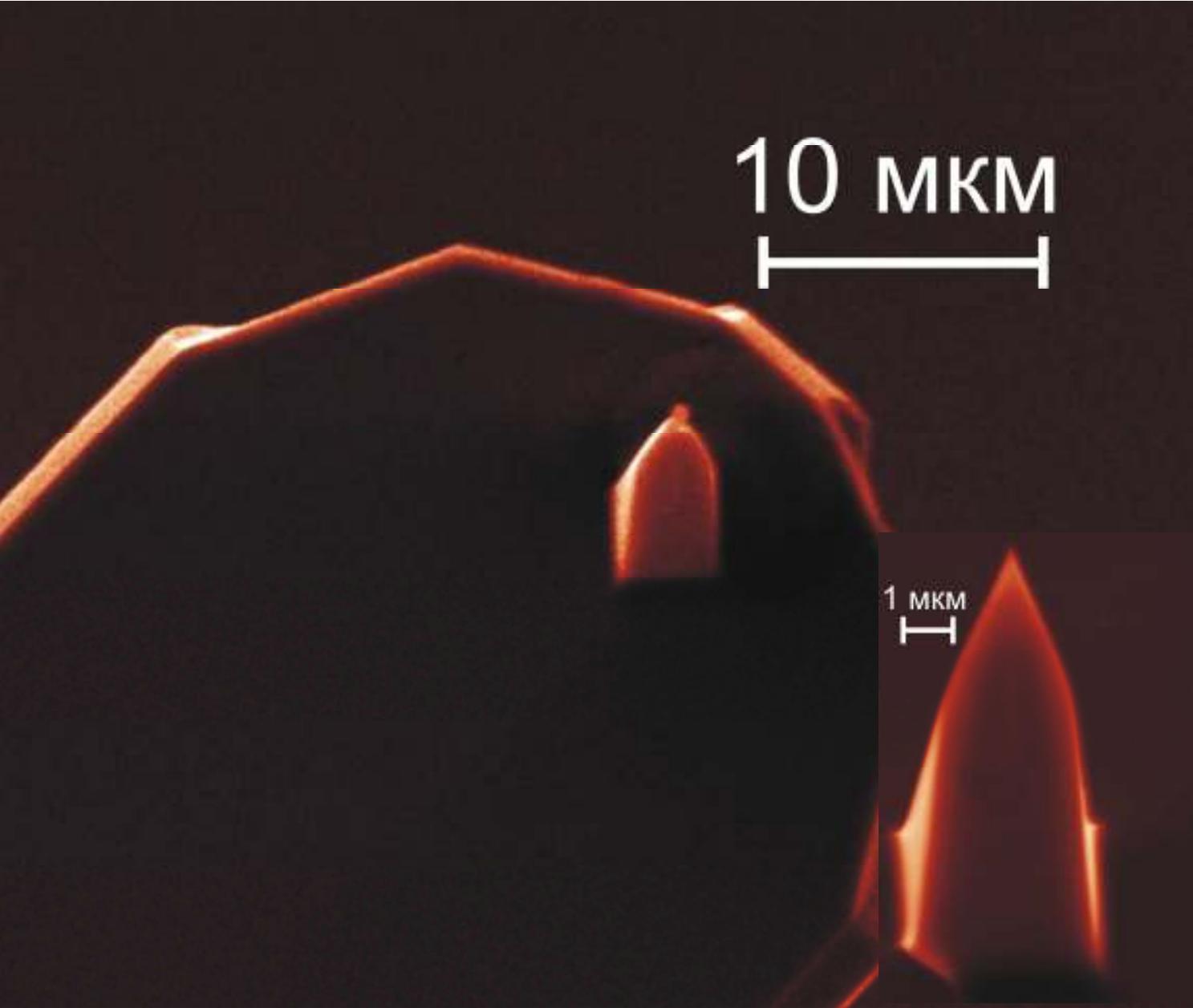
*Рис. «Рабочее место» для производства нанокolloидных зондов*

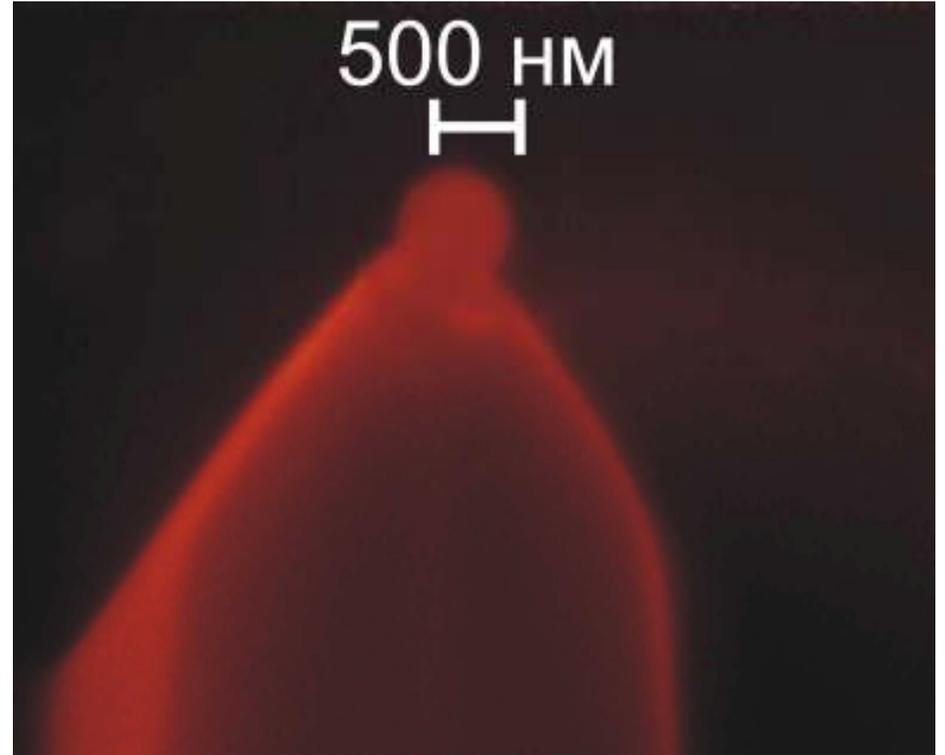
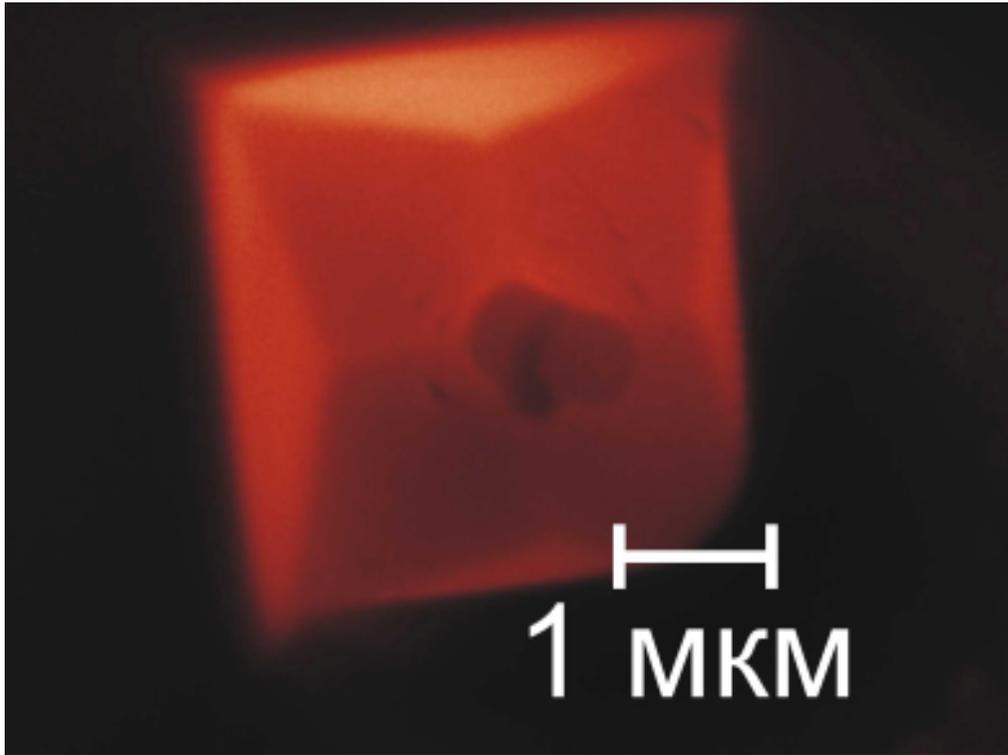


*Рис. АСМ топография, полученная зондом с прикрепленной гранулой. На вставке приведен профиль высоты вдоль указанной линии.*



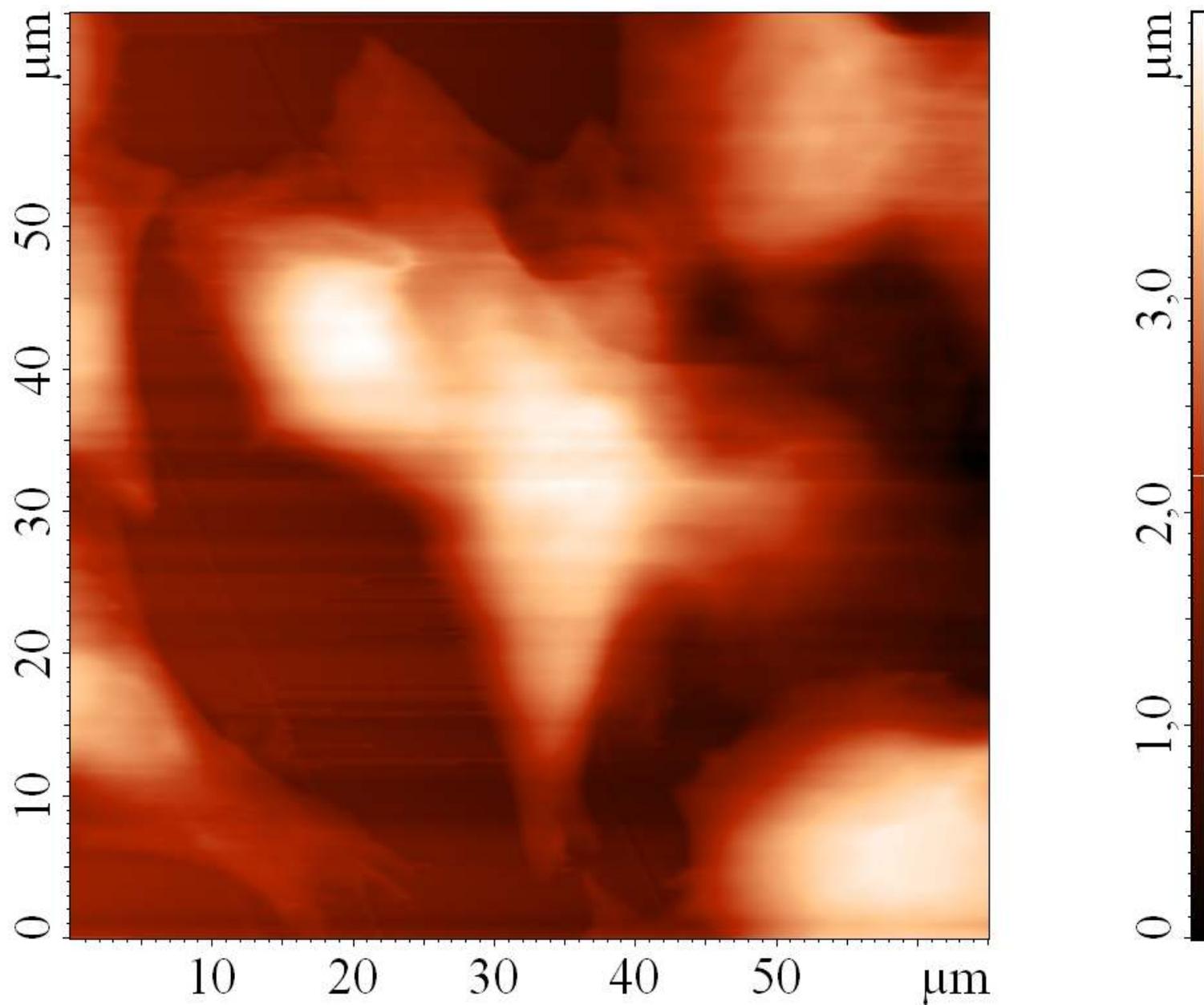
СЭМ фотографии кончиков АСМ зондов: (а) стандартный зонд; (b) и (c) зонд с одиночной гранулой; зонд с ансамблем гранул.



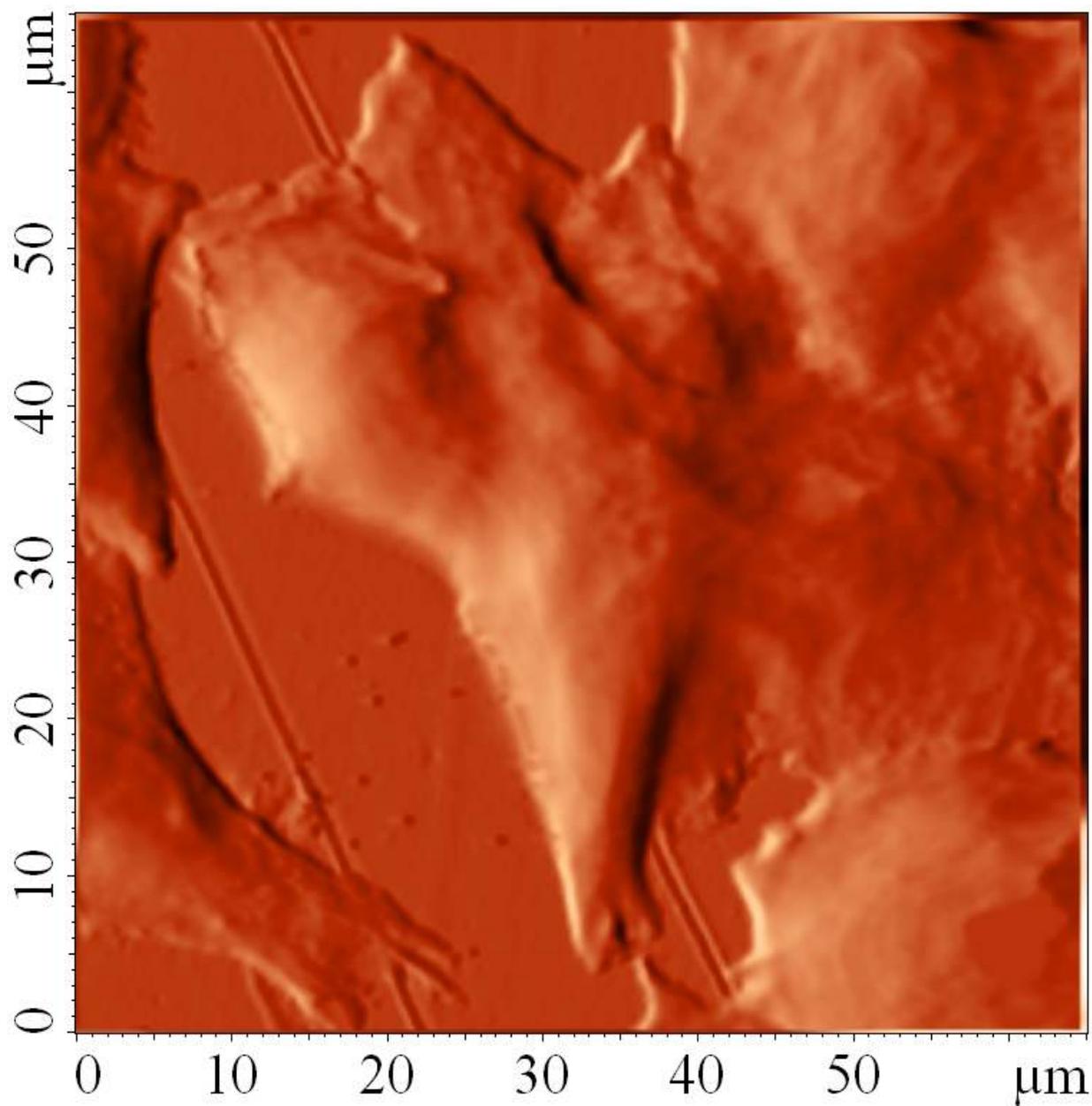


Исследование с помощью зондов с калиброванным радиусом кривизны кончика ( $R=325\pm 7$  нм) морфологии и механических свойств живых клеток L41 и A549

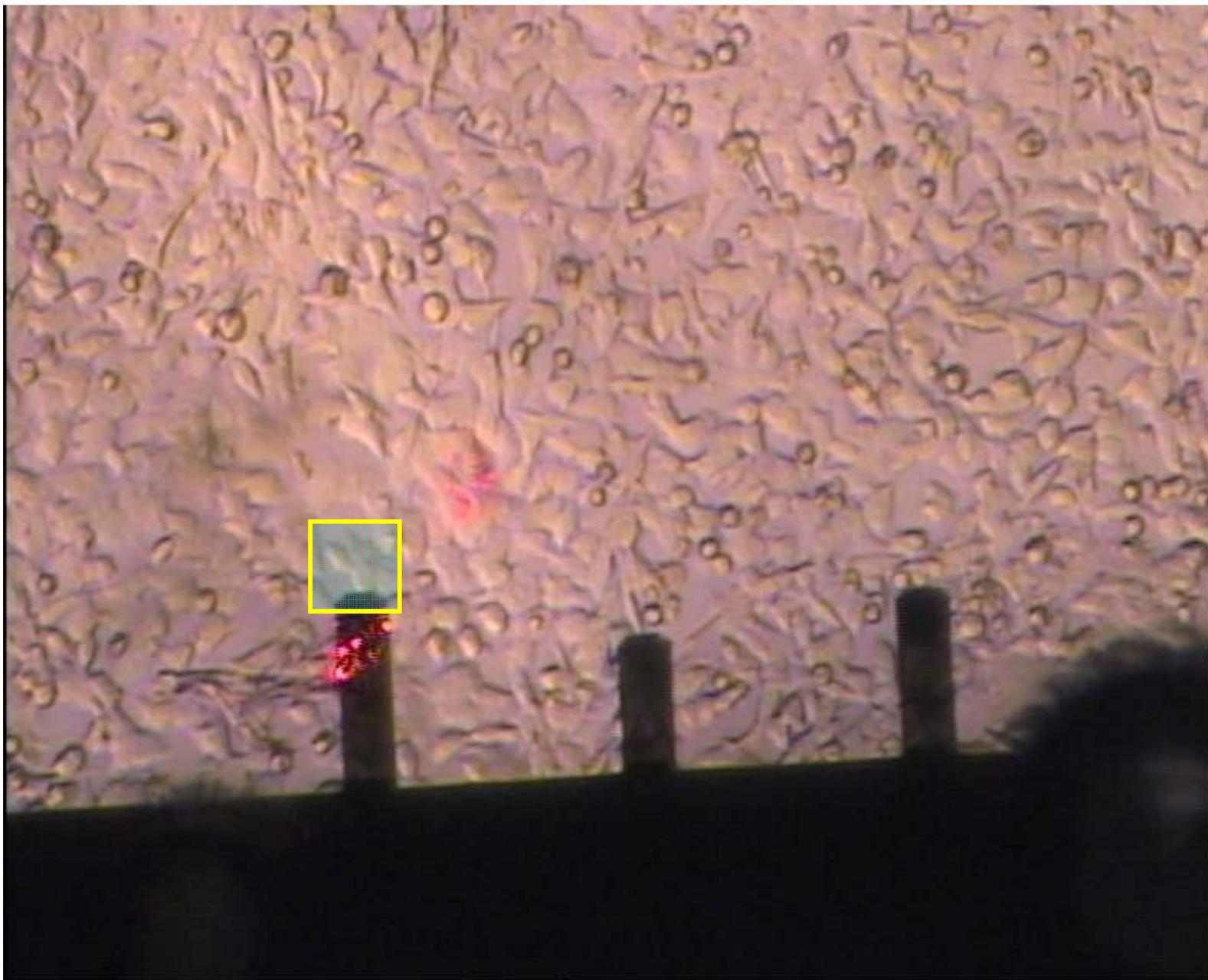
# Лимфобластоидная линия L41 (контроль)



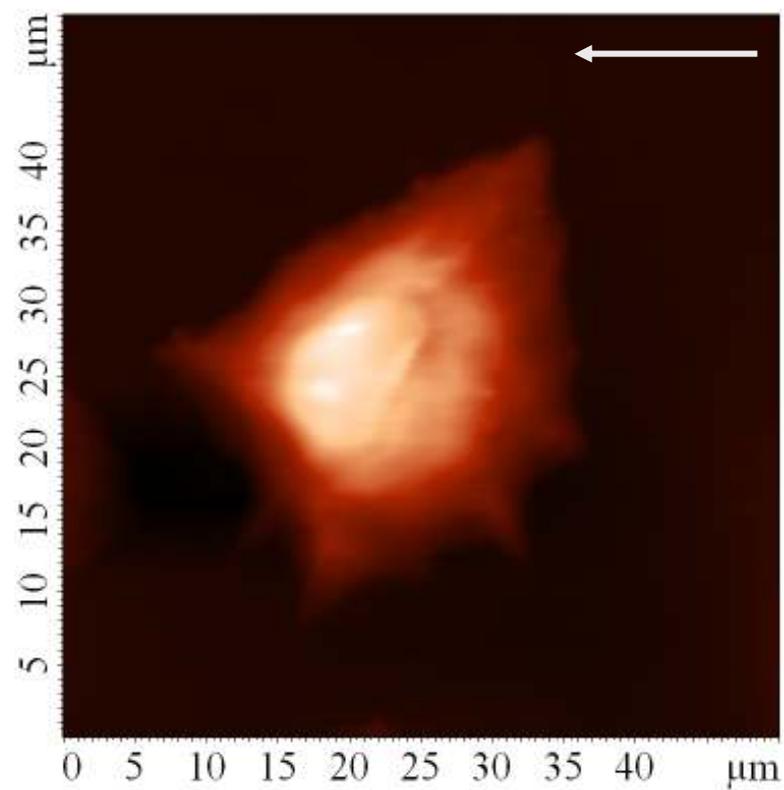
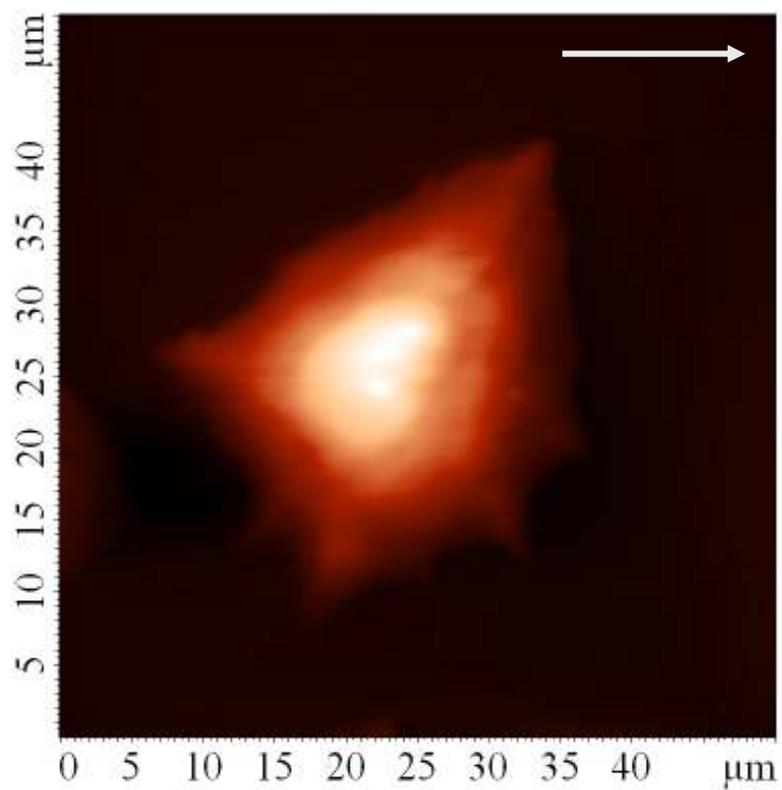
# Лимфобластоидная линия L41(контроль)



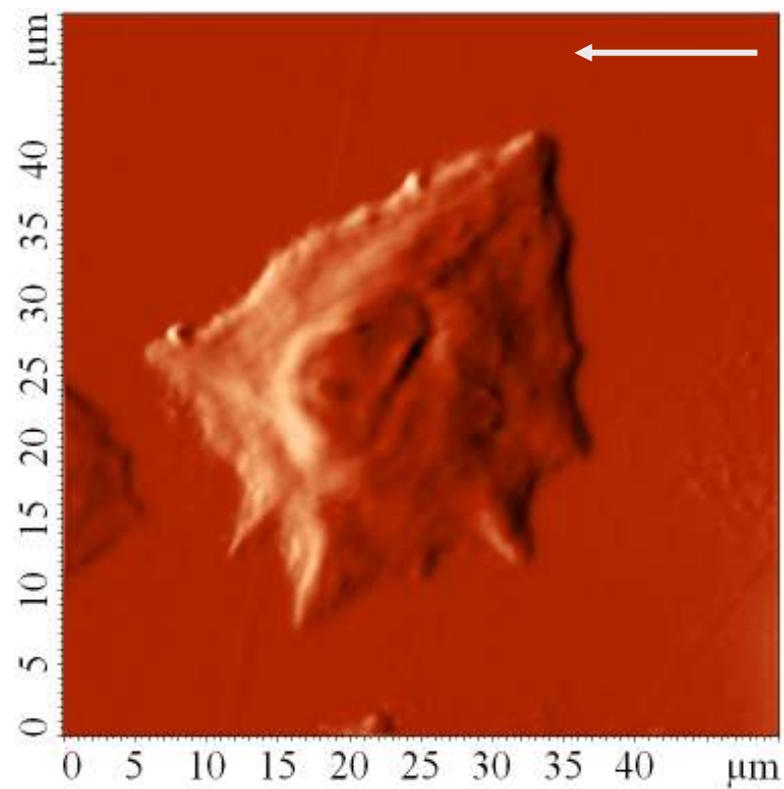
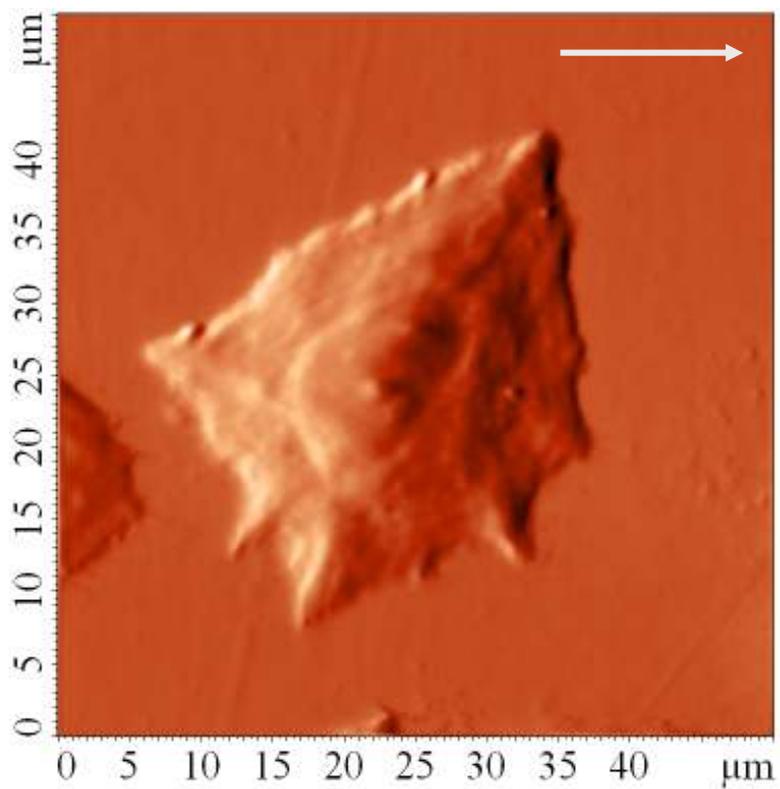
Оптическая фотография, область АСМ сканирования выделена квадратом



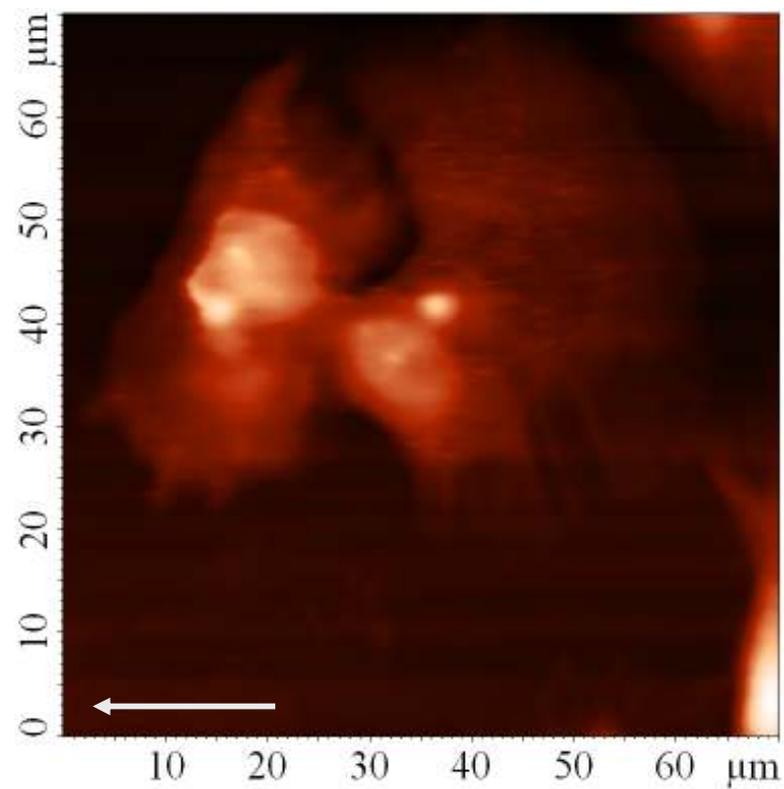
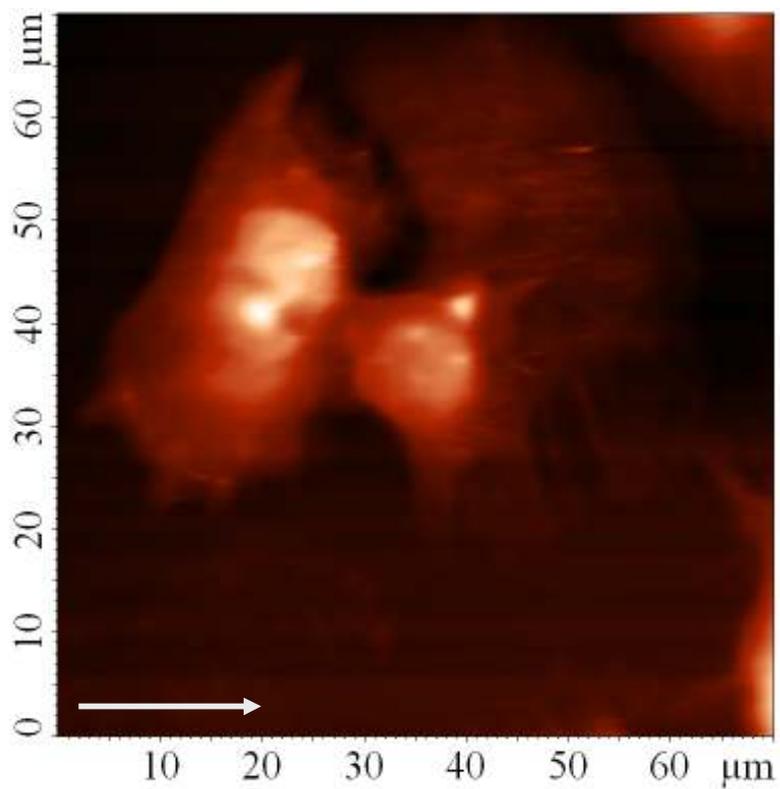
## Лимфобластоидная линия L41(+C60, 25 $\mu$ g/ml)



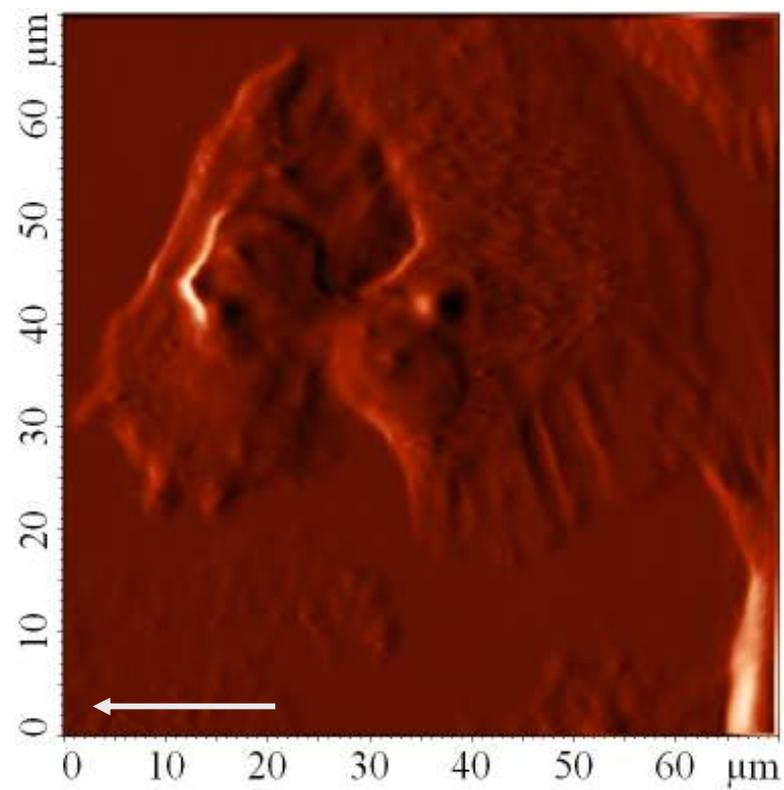
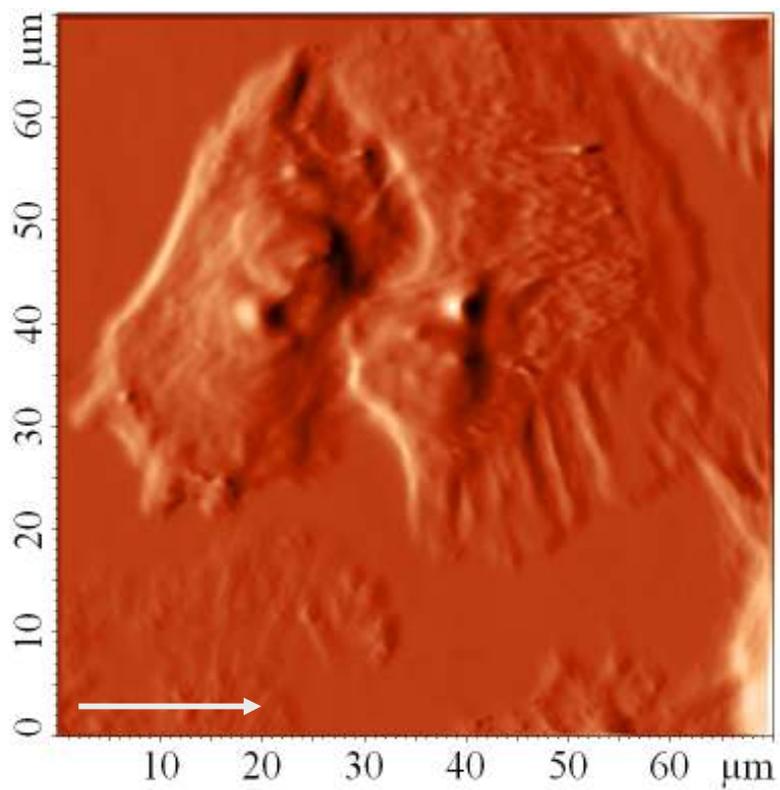
# Лимфобластоидная линия L41(+C60, 25 $\mu$ g/ml)



# Эпителиоидная карцинома легкого А549

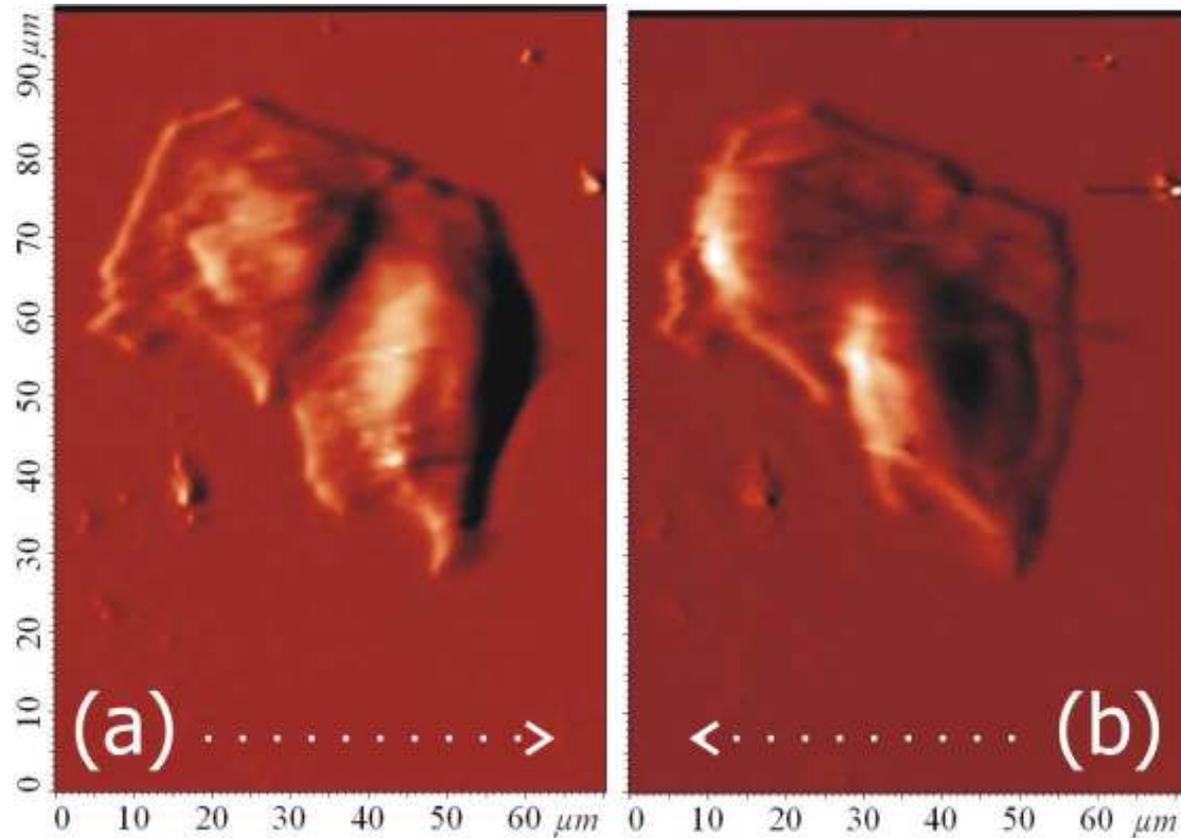


## Эпителиоидная карцинома легкого А549



Исследование с помощью зондов с калиброванным радиусом кривизны кончика ( $R=125\pm 3$  нм) морфологии и механических свойств живых клеток HeLa

## HeLa



АСМ исследование живых клеток HeLa. Использовался модифицированный зонд CSG10 (0.2 Н/М) с 250 нм гранулой. Параметры: жидкостная ячейка, резонансная частота 12.47 кГц,  $Q = 40$ ,  $M = 60$  нм  $M_0 = 90$  нм ( $\langle F \rangle = 0.12$  нН). Изображения получены одновременно, стрелки указывают направления сканирования.

## Сводная таблица результатов АСМ диагностики

Образец	Зонд, гранула	Модуль Юнга
HeLa	CSG10, 250nm	110 кПа
L41	CSC12, 650nm	13 кПа
A549	CSC12, 650nm	2.5 кПа

## **БЛАГОДАРНОСТИ:**

**И.А. Няпшаеву, ФТИ им. А.Ф. Иоффе РАН,  
Энергетический вклад в АСМ эксперименты.**

**Ю.А. Негуляеву, Институт цитологии РАН,  
Консультации и материалы по ИСМ.**

**С.Ф. Каплан, В.Г. Голубеву, ФТИ им. А.Ф. Иоффе РАН  
Калиброванные SiO<sub>2</sub> бусинки субмикронного диаметра.**

**М.Ю. Еропкину, НИИ гриппа РАМН,  
Живые клетки.**