

О.П. ЛИМАНСЬКИЙ<sup>1</sup>, О.Ю. ЛИМАНСЬКА<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Інститут мікробіології та імунології АМН України, Харків,  
Arizona State University, Department  
of Microbiology, Tempe, AZ 85287-2701, USA,

<sup>2</sup> Інститут експериментальної і клінічної  
ветеринарної медицини УААН, Харків

## ВІЗУАЛІЗАЦІЯ ЦІАНОБАКТЕРІЙ У ВОДНОМУ РОЗЧИНІ ЗА ДОПОМОГОЮ АТОМНО-СИЛОВОЇ МІКРОСКОПІЇ



Продемонстровано методичні підходи для вивчення живих клітин безпосередньо у водних розчинах за допомогою атомно-силової мікроскопії (ACM). Зображення інтактних ціанобактерій *Synechocystis PCC 6803* у TES було отримано шляхом вібруючого варіанта (*tapping mode*) ACM. Як субстрат для ACM використовували аміномодифіковану слюду, яку було отримано модифікацією свіжосколотої слюди у парах 3-амінопропілтриетоксисилану. Із ACM-зображення було визначено середній розмір ціанобактерій. Лінійний розмір *Synechocystis PCC 6803* у буферному розчині складав приблизно 70 × 90 нм, а висота дорівнювала 20 нм. Обговорено можливі причини недостатньо високої роздільної здатності ACM зображення ціанобактерій у водному розчині, а також можливі шляхи досягнення молекулярно-роздільної здатності при вивченні структурних, функціональних та мікромеханічних властивостей живих клітин.

© О.П. ЛИМАНСЬКИЙ, О.Ю. ЛИМАНСЬКА, 2003

**Вступ.** Протягом останнього десятиріччя ACM стала одним з наймогутніших методів візуалізації біополімерів, вивчення фізико-хімічних властивостей клітин, тобто гідрофобності поверхні, її алгезивних та електричних властивостей, а також молекулярних взаємодій, що виникають на клітинній поверхні. Найбільш важливим є те, що ACM може бути застосована для дослідження інтактних біополімерів та клітин у водному розчині. За короткий час ACM перетворилася на могутній інструмент для біологічних та біомедичних досліджень, особливо в галузі клітинної біології. Візуалізацію клітин за допомогою ACM було з успіхом використано для вивчення ендотеліальних клітин нирки, живих фібробластів шкіри, динаміки взаємодії кілерних та ракових клітин [1, 2], субмембраних структур живих ракових клітин фібробластів та макрофагів [3].

Раніше за допомогою електронної та атомно-силової мікроскопії було досліджено трьохмірні кристали реакційного центру фотосистеми I *Synechococcus OP24* [4]. Реконструкція рельєфу поверхні з електронно-мікроскопічних фотографій висушених заморожених реплік зразків та топографічні ACM-зображення дозволили вивчити прецизійну організацію субодиниць поверхні фотосистеми I ціанобактерій.

Метою даної роботи була візуалізація та визначення лінійних розмірів інтактних ціанобактерій безпосередньо у їхньому фізіологічному середовищі. Для цього було використано вібруючий варіант атомно-силової мікроскопії, а також метод модифікації слюди (субстрату для ACM), який дозволяє отримувати зображення клітин у водних розчинах за різних іонних умов.

**Матеріали і методи.** В роботі використано одноклітинні ціанобактерії штаму *Synechocystis PCC 6803*. Вимірювання проводили у 50 мМ TES буфері за кімнатної температури. Зображення ціанобактерій отримували за допомогою атомно-силового мікроскопу Nanoscope III Multi System («Digital Instruments», США). Використовували D-сканер та стандартну скляну рідинну чашечку. ACM-зображення у водному розчині було записано у вібруючому варіанті ACM (*tapping mode*), тобто в режимі високочастотної модуляції зонду за частоти сканування 3–4 Гц та амплітуди (driving amplitude) 20–40 мВ, у форматі 512 × 512 пікселів. Мікроскоп був розташований на масивній підставці, яку підвішували на гумові пружини для розв'язки від низькочастотних коливань будівлі. ACM-зображення було отримано за

допомогою стандартних V-образних кантіліверів із нітриду кремнію з золотим напиленням довжиною 125 мкм та константою твердості 0,20–0,27 Н/м («Digital Instruments», США).

Частоту осциляції кантіліверу було настроено на його резонансну частоту у рідині (26–28 кГц). Резонансну частоту вимірювали за допомогою вбудованої опції Nanoscope III tune-up mode у буферному розчині. Після початкового інжектування у рідинну чашечку 50 мМ TES буфера за допомогою двох шприців вводили розчин ціанобактерій у 50 мМ TES буфери і проводили сканування.

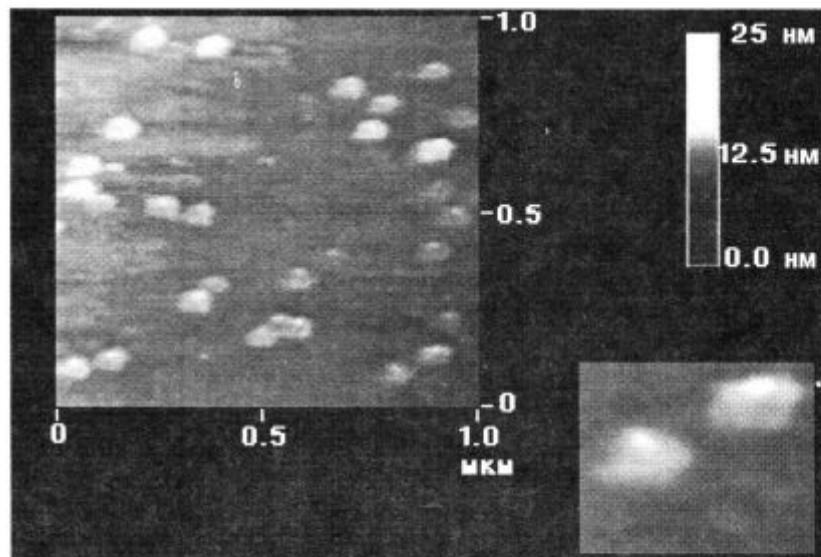
Як субстрат для АСМ використовували аміномодифіковану слюду [5]. Коротко, процедуру модифікації свіжосколотої слюди проводили у парах 3-амінопропілтриетоксисилану (АПТЕС) від фірм «Aldrich» та «United Chemical Technologies Inc.» (США). АПТЕС очищали за допомогою вакуумної перегонки у парах аргону. Свіжосколоту слюду витримували 1 год в атмосфері АПТЕС у скляному ексикаторі за кімнатної температури. Модифіковану слюду зберігали в ексикаторі в атмосфері аргону. Для виготовлення буферних розчинів використовували ультрачисту воду з питомим опором ~ 17 мОм · см («Modu Pure Plus, Continental Water System Corp.», США).

**Результати дослідження та їх обговорення.** В даній роботі за допомогою атомно-силової мікроскопії нами було проаналізовано ціанобактерії *Synechocystis PCC 6803* у TES буфери. Візуалізація за допомогою АСМ не потребує складної

процедури підготовки зразка подібно забарвленню або виготовленню репліки (відтіненню). Використання цієї техніки дозволило отримати зображення інтактних ціанобактерій.

На рис. 1 наведено типове АСМ-зображення *Synechocystis PCC 6803* у TES буфери, з якого можна оцінити лінійні розміри клітин. Поряд із АСМ-зображенням наведено шкалу градацій сірого, що дозволяє визначити висоту ціанобактерій, адсорбованих на поверхні амінослюди. Світліші ділянки на АСМ-зображеннях відповідають більш високим структурам. Нами було отримано також трьохмірне зображення ціанобактерій (рис. 2, а). Для реконструкції двомірного АСМ-зображення використовували програмне забезпечення WSxM Scanning Probe Microscopy Software фірми «Nanotec Electronica», Іспанія (<http://www.nanotec.es>). Було визначено, що середній розмір ціанобактерій у буферному розчині складає приблизно 70 × 90 нм, а їх висота дорівнює ~ 20 нм. Для точної оцінки морфологічних параметрів клітин було побудовано графік розрізу (cross section) зображення двох клітин по висоті. На рис. 2, б наведено відповідний профіль, який показує зміну висоти Z ціанобактерій від координат у площині XY.

Спроби отримати АСМ-зображення ціанобактерій з більшою роздільнюю здатністю виявилися невдалими через погрішення зображення з часом. Ми пояснююмо це, по-перше, уширенням зонду кантіліверу через взаємодію з молекулами, які асоційовані з інтактними ціанобактеріями,



**Рис. 1.** Зображення ціанобактерій *Synechocystis PCC 6803* у 50 мМ TES буфери на аміномодифікованій слюді, отримане за допомогою атомно-силового мікроскопа у режимі висоти. Розмір кадра — 2 × 2 мкм. На вставці наведено збільшене АСМ зображення ціанобактерій. Параметри сканування: сила (set-point) — 0,354 В, частота сканування — 3 Гц. Розмір кадра вставки — 200 × 200 нм

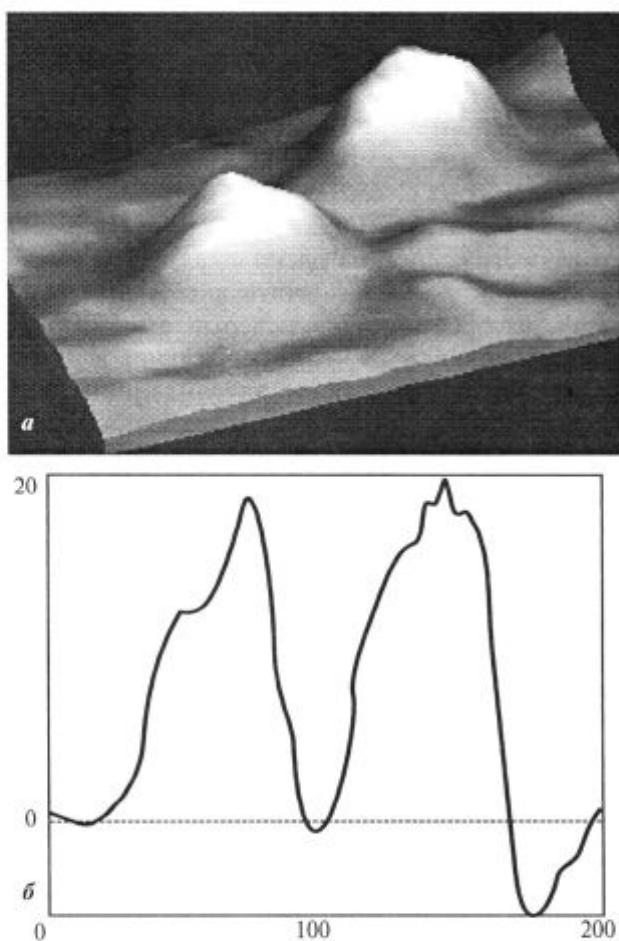


Рис. 2. Реконструйоване трьохмірне зображення (а) ціанобактерій *Synechocystis PCC 6803* у 50 мМ TES буфері, отримане за допомогою програмного забезпечення WSXM Scanning Probe Microscopy Software фірми Nanotecs Electronica, Іспанія (розмір зображення — 200 × 200 нм) та графік вимірювання висоти та лінійних розмірів клітин (б). Розріз (cross section) лінійного зображення двох ціанобактерій по висоті, який показує висоти клітин та їх горизонтальні розміри. По горизонталі — X, нм; по вертикалі — Z, нм

що включають клітинний дебріс, продукти метаболізму та секреції клітин. Процес уширення зонду полягає в тому, що скануючий АСМ зонд може бути вкритий слоями молекул. Цей неконтрольований процес викликає погіршення АСМ-зображення з часом. По-друге, м'якість клітин, що проявляється у деформації клітинної поверхні під впливом скануючого зонду, також ускладнює можливість отримання АСМ-зображення живих клітин з високою роздільною здатністю. Разом з тим відомо, що ціанобактерії є міцнішими від інших клітин. Наприклад, ціано-

бактерії залишаються живими навіть після перебування під пресом з тиском 615 кг/см<sup>2</sup> [6]. Іншим фактором є процес окислення поверхні аміномодифікованої слюди у водному розчині, що призводить до утворення агрегатів на поверхні субстрату та до можливої контамінації зонду.

Таким чином, на прикладі ціанобактерій показано, що клітини, які культивуються, після перенесення на плоский субстрат є зручним об'єктом для АСМ досліджень безпосередньо у водному розчині. При цьому збільшення сили взаємодії (або константи зв'язування) клітина — субстрат було здійснено за допомогою аміномодифікації свіжоскошотої слюди. Оскільки резонансна частота кантиліверу у рідині є відносно низькою (приблизно 28 кГц), механізм утворення контрасту зображення у вібруючому варіанті АСМ ускладнюється та є недостатньо зрозумілим. Незважаючи на це, більшість майбутніх мікроскопічних досліджень поверхні клітин, на нашу думку, буде здійснено саме цим способом візуалізації біооб'єктів. Незважаючи на наявність багатьох складнощів у АСМ візуалізації живих клітин, потенціал АСМ застосувань для вивчення інтактних клітин є надзвичайно великим, а візуалізація з високою роздільною здатністю неосяжної кількості живих клітин є питанням часу. З подальшим розвитком наукового обладнання та методики модифікації субстрату атомно-силова мікроскопія, можливо, стане незамінним методом для вивчення структурних, функціональних, мікромеханічних властивостей живих клітин на молекулярному рівні та буде сприяти кращому розумінню співвідношення структура — функція для біологічних об'єктів.

Автор висловлює вдячність д-ру Вавіліну Д. (Arizona State University) за люб'язно наданий зразок культури ціанобактерій. Роботу підтримано грантом GM54991 від Національного інституту здоров'я (NIH, США).

**SUMMARY.** Methodical approaches for studying of living cells in aqueous solutions by atomic force microscopy (AFM) are demonstrated. Images of intact cyanobacteria *Synechocystis PCC 6803* in TES buffer were captured in tapping mode using aminomodified mica as AFM substrate. Modification of freshly cleaved mica has been done in 3-aminopropyltriethoxysilane vapours. The average size of cyanobacteria was determined from AFM images. The linear size of *Synechocystis PCC 6803* in TES buffer was equal to 70 × 90 nm and their height was about 20 nm. Possible causes of insufficiently

high resolution of the cyanobacteria AFM images in aqueous solutions and possible ways for gaining molecular resolution in studies of structural, functional and micromechanical properties of living cells are discussed.

**РЕЗЮМЕ.** Продемонстрированы методические подходы к изучению живых клеток непосредственно в водных растворах с помощью атомно-силовой микроскопии (ACM). Изображения интактных цианобактерий *Synechocystis PCC 6803* в TES буфере были получены посредством выбирирующего варианта (tapping mode) ACM. В качестве субстрата для ACM использовали аминомодифицированную слюду, которая была получена модификацией свежесколотой слюды в парах 3-амино-пропилтриэтоксисилана. Из ACM-изображения был определен средний размер цианобактерий. Линейный размер *Synechocystis PCC 6803* в буферном растворе составлял приблизительно 70 × 90 нм, а высота равнялась 20 нм. Обсуждены возможные причины недостаточно высокой разрешающей способности ACM изображения цианобактерий в водном растворе, а также возможные пути достижения молекулярного разрешения при изучении структурных, функциональных и микромеханических свойств живых клеток.

#### СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Braet F., Vermijlen D., Bossuyt V., De Zanger R., Wisse E. Early detection of cytotoxic cells and colon carcinoma cells as probed with the atomic force microscope // Ultramicroscopy. — 2001. — **89**. — P. 265–273.
2. Braet F., De Zanger R., Seynaeve C., Baekeland M., Wisse E. A comparative atomic force microscopy on living skin fibroblasts and liver cells // J. Electron Microscopy. — 2001. — **50**, № 4. — P. 283–290.
3. Braet F., Seynaeve C., De Zanger R., Wisse E. Imaging surface and submembranous structures with the atomic force microscope: a study on living cancer cells, fibroblasts and macrophages // J. Microscopy. — 1998. — **190**, № 3. — P. 328–338.
4. Fotiadis D., Muller D.J., Tsotsis G. et al. Surface analysis of the photosystem I complex by electron and atomic force microscopy // J. Mol. Biol. — 1998. — **283**, № 1. — P. 83–94.
5. Lyubchenko Y., Jacobs B., Lindsay S. Atomic force microscopy of reovirus dsRNA: a routine technique for length measurement // Nucl. Acids Res. — 1992. — **20**, № 15. — P. 3983–3986.
6. Андреюк Е.И., Коптєва Ж.П., Заніна В.В. Цианобактерії. — Київ : Наук. думка, 1990. — 198 с.

Надійшла 10.06.02