

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«ВОРОНЕЖСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»



На правах рукописи

Беликов Евгений Александрович

**АТОМНОЕ И ЭЛЕКТРОННОЕ СТРОЕНИЕ БИОГИБРИДНЫХ
МАТЕРИАЛОВ НА ОСНОВЕ БАКТЕРИОФЕРРИТИНА DPS**

Специальность

1.3.8 Физика конденсированного состояния

Диссертация
на соискание ученой степени
кандидата физико-математических наук

Научный руководитель:
доктор физико-математических наук, доцент
Турищев С.Ю.

Воронеж 2025

ОГЛАВЛЕНИЕ

Список используемых сокращений.....	4
Введение.....	5
ГЛАВА 1. БИОГИБРИДНЫЕ МАТЕРИАЛЫ БАКТЕРИОФЕРРИТИНА DPS: ПОЛУЧЕНИЕ И СВОЙСТВА.....	15
1.1. Бионаногибридные материалы на основе белка Dps и их свойства	15
1.2. Биогибридные материалы на основе <i>Escherichia coli</i> и их свойства.	26
1.3. Области применения бионаногибридных объектов на основе ферритина Dps.....	31
1.4 Методы изучения ферритинов Dps и гибридных материалов на их основе.	36
1.5 Выводы к главе 1, постановка цели диссертации.	66
ГЛАВА 2. БИОГИБРИДНЫЕ МАТЕРИАЛЫ БАКТЕРИОФЕРРИТИНА DPS И МЕТОДЫ ИХ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	69
2.1 Создание клеточных конструкций для синтеза белка Dps	69
2.2 Выделение и очистка рекомбинантного белка Dps	70
2.3 Методы электронной микроскопии.....	72
2.4 Методы рентгеновской и фотоэлектронной спектроскопии	78
2.5 Метод фотоэмиссионной электронной микроскопии	81
2.6 Иные методы исследования	84
ГЛАВА 3. АТОМНОЕ И ЭЛЕКТРОННОЕ СТРОЕНИЕ БИОГИБРИДНЫХ МАТЕРИАЛОВ НА ОСНОВЕ МОЛЕКУЛ БЕЛКА БАКТЕРИОФЕРРИТИНА DPS.....	87
3.1 Формирование и морфология биогибридных материалов на основе молекул белка бактериоферритина Dps.....	87

3.2 Электронное строение и состав биогибридных материалов на основе молекул белка бактериоферритина Dps	95
3.3 Атомное строение поверхности биогибридных материалов на основе молекул белка бактериоферритина Dps	104
3.4. Выводы к главе 3	112
ГЛАВА 4. АТОМНОЕ И ЭЛЕКТРОННОЕ СТРОЕНИЕ БИОГИБРИДНЫХ МАТЕРИАЛОВ НА ОСНОВЕ КЛЕТОК КИШЕЧНОЙ ПАЛОЧКИ <i>ESCHERICHIA COLI</i>	
114	
4.1 Морфология клеток кишечной палочки <i>E.coli</i>	115
4.2 Особенности атомного строения массивов клеток кишечной палочки <i>E.coli</i> в состоянии суперпродукции.....	119
4.3 Исследования клеток кишечной палочки <i>E.coli</i> методом спектромикроскопии РЕЕМ.	126
4.4. Выводы к главе 4	132
ГЛАВА 5. ИНТЕГРАЦИЯ МОЛЕКУЛ БЕЛКА БАКТЕРИОФЕРРИТИНА DPS С РАЗВИТОЙ ПОВЕРХНОСТЬЮ МАССИВОВ НИТЕВИДНОГО КРЕМНИЯ.....	
133	
5.1 Морфология массивов нитевидного кремния при интеграции с молекулами белка бактериоферритина Dps	134
5.2 Особенности атомного строения структур, сформированных при интеграции массивов нитевидного кремния с молекулами белка бактериоферритина Dps.....	139
5.3 Выводы к главе 5	145
Заключение и выводы из работы	146
Список литературы	148

Список используемых сокращений

- Dps – DNA-binding protein from starved cells / ДНК – связывающий белок голодающих клеток
- E.coli* – *Escherichia Coli* / кишечная палочка
- Ftn – Ferritins / ферритины
- Apo – Apoferritin / Апоферритин – представляет собой белковую оболочку ферритина
- Vfr – Bacterioferritins / бактериоферритины
- ФОЦ – Ферроксидазные центры
- ТЕМ – Transmission Electron Microscopy / Просвечивающая электронная микроскопия
- SEM – Scanning Electron Microscopy / Сканирующая (растровая) электронная микроскопия
- CryoEM – Cryogenic Electron Microscopy / Электронная микроскопия в криогенных условиях
- DLS – Dynamic Light Scattering / Динамическое светорассеяние
- ДНК – Дезоксирибонуклеиновая кислота
- XPS – X-ray Photoelectron Spectroscopy / Рентгеновская фотоэлектронная спектроскопия
- XAFS – X-ray Absorption Fine Structure / Тонкая структура спектров поглощения рентгеновских лучей
- XANES – X-ray Absorption Near-Edge Spectroscopy / Спектроскопия вблизи тонкой структуры рентгеновского спектра поглощения
- EXAFS – Extended X-ray absorption fine structure / Протяженная тонкая структура спектров рентгеновского поглощения
- PEEM – PhotoEmission Electron Microscopy / Фотоэмиссионная электронная микроскопия
- ПЗС – прибор с зарядовой связью
- EDTA – Этилендиаминтетрауксусная кислота
- STEM – Scanning Transmission Electron Microscopy / Сканирующая просвечивающая электронная микроскопия
- UHV – Ultra High Vacuum / Сверхвысокий вакуум

Введение

Актуальность работы:

В настоящее время одним из ключевых научных направлений физики конденсированного состояния является развитие технологий и современная диагностика новых многофункциональных материалов [1]. Подобные материалы, обладая улучшенными, по сравнению с уже существующими объемными, массивными аналогами, характеристиками, могут рассматриваться в качестве основы различных технологий, например, для микро- и наноэлектроники будущего. Необходимо, чтобы синтезируемые структуры обладали заранее заданными характеристиками, тем самым обеспечивая требуемые электронные, оптические, магнитные и другие свойства [2]. Поскольку макроскопические физико-химические свойства зависят от строения материалов на микроскопическом уровне, то важной задачей является разработка современных технологий формирования гибридных функциональных наноматериалов, в том числе сочетающих биологический объект, например белковую молекулу и неорганическую наночастицу. Это обусловлено такими перспективными особенностями, как высокая эффективность и воспроизводимость в совокупности с незначительными экономическими затратами при внедрении в производство технологий гибридных наноматериалов по сравнению с традиционными физическими и химическими методами синтеза наноматериалов и их модификации.

Удачным примером такой природоподобной технологии формирования функциональных наноматериалов может служить использование белковых молекул ферритина, в первую очередь возможный синтез неорганических наночастиц с помощью молекул белка и получение таким образом биогридного материала. Ферритины – природные железопротеиды, сложные комплексные структуры, состоящие из белковой оболочки и неорганического (металл-оксидного) ядра, размером порядка 9-12 нм в зависимости от типа ферритина. Именно металл-оксидное ядро ферритинов

представляет ключевой интерес для нужд физики материалов, поскольку появляется потенциальная возможность эффективного и контролируемого формирования малых кластеров оксидов железа и металлического железа для дальнейшего использования на практике, например в наноэлектронике и спинтронике [3]. Наиболее интересным представителем суперсемейства ферритинов является ферритинподобный белок Dps (DNA-binding Protein from Starved cells – ДНК-связывающий белок голодающих клеток), так как он обладает уникальным набором свойств, а именно, большим сродством к железу, наименьшими размерами и способностью образовывать прочные комплексы с ДНК. Состав и структура ядра Dps находится в строгой зависимости от способа его выделения и очистки, условий хранения, а также способов дальнейшей модификации и использования.

При этом в настоящее время отсутствует точное знание об особенностях состава и строения неорганических наночастиц сверхмалого размера - ядер молекул белка Dps бактериального происхождения. Решение этой проблемы является важной научной задачей. Поскольку речь идет о нанобъектах, обладающих существенно развитой поверхностью, то перспективным представляется применение неразрушающих методов исследования, дающих информацию о морфологии, составе, структуре, состоянии поверхности в целом, специфике локального атомного окружения и электронно-энергетическом спектре. Все эти качества реализуются в методах крио-, просвечивающей и растровой электронной микроскопии, методах XANES (X-ray Absorption Near Edge Structure – спектроскопия ближней тонкой структуры края рентгеновского поглощения), XPS (X-ray Photoelectron Spectroscopy - рентгеновская фотоэлектронная спектроскопия) и PEEM (PhotoEmission Electron Microscopy – фотоэмиссионная электронная микроскопия) использованных в данной работе для изучения состава, макроструктуры, атомного и электронного строения биогибридных материалов на основе молекул белка бактериферритина Dps, и клеточной культуры бактерий кишечной палочки *Escherichia coli* (*E.coli*) – источника молекул белка

бактериоферритина Dps природного происхождения. Все вышесказанное обуславливает высокую **актуальность** данной работы, посвященной исследованию особенностей локального атомного и электронного строения, морфологии и структуры биогибридных материалов на основе молекул белка бактериоферритина Dps.

Цели и основные задачи работы

Целью работы является установление закономерностей атомного и электронного строения биогибридных материалов на основе наночастиц железа в молекулярных контейнерах белка бактериоферритина Dps, получаемых от бактериальных клеток кишечной палочки *E.coli* и возможности их интеграции с нитевидным кремнием.

Основными **задачами** работы являются:

1. Разработка методики синтеза и пробоподготовки биогибридных материалов, в том числе с неорганическими наночастицами оксидов железа, формируемых на основе молекулярных культур белка бактериоферритина Dps.
2. Установление размеров, особенностей морфологии и структуры биогибридных материалов на основе молекулярных культур белка бактериоферритина Dps.
3. Исследование атомного и электронного строения наночастиц железа в молекулярных контейнерах белка бактериоферритина Dps, получаемых от бактериальных клеток кишечной палочки *E.coli* методами рентгеновской и электронной спектроскопии и микроскопии, в том числе с использованием синхротронного излучения.
4. Установление возможности интеграции и особенностей формирования биогибридных наноструктур на основе белка бактериоферритина Dps с развитой поверхностью нитевидного кремния.

Объекты и методы исследования

Объектами исследования служили наноструктуры на основе молекулярных культур белка бактериоферритина Dps и биогибридные объекты на их основе.

Для исследования морфологии, состава, макроструктуры, атомного и электронного строения и физико-химического состояния указанных объектов, их трансформаций в наноструктурах гибридного материала использовались следующие методы: метод динамического светорассеяния, методы крио-, просвечивающей ТЕМ и растровой электронной микроскопии SEM, синхротронный метод спектроскопии ближней тонкой структуры края рентгеновского поглощения XANES, метод фотоэлектронной спектроскопии XPS, спектромикроскопический метод фотоэмиссионной электронной микроскопии РЕЕМ.

Научная новизна работы определяется тем, что впервые:

- Предложены универсальные подходы к пробоподготовке образцов биологического происхождения, которые включают осаждение массива наночастиц из рабочего раствора на очищенные и подготовленные подложки, массивы нитевидного кремния, применимые для сверхвысоковакуумных синхротронных исследований.

- Методами просвечивающей электронной микроскопии, в том числе в криогенных условиях установлены размеры биологических молекулярных контейнеров белка бактериоферритина Dps, неорганических наночастиц составляющих их железосодержащее ядро.

- Методами сканирующей (растровой) и фотоэмиссионной электронной микроскопии установлена возможность выделения молекулярной культуры белка бактериоферритина Dps клетками кишечной палочки *E.coli* в состоянии суперпродукции белка и совмещения молекулярной культуры белка бактериоферритина Dps с 3D-развитой поверхностью нитевидного кремния.

- Продемонстрирована принципиальная применимость сверхвысоковакуумных рентгеноэлектронных методов спектроскопии эмиссии (XPS) и поглощения (XANES), включая синхротронные, для эффективного анализа состава, структуры, атомного и электронного строения био- и гибридных материалов на основе молекул белка Dps и клеток *E.coli*.

- Выполнены анализ и моделирование тонкой структуры электронно-энергетического спектра свободных электронных состояний биогибридного материала, которые показали формирование наночастиц состоящих из атомов железа в различном зарядовом состоянии Fe^{3+} и Fe^{2+} и в различной координации.

- Исследовано атомное строение биогибридных материалов на основе молекул белка Dps и клеток *E.coli* методом фотоэлектронной спектроскопии в эффективной комбинации с ионным удалением нанослоев поверхности.

- Продемонстрирована применимость метода фотоэмиссионной электронной микроскопии (PEEM) для изучения биогибридных материалов с использованием производительных лабораторного и синхротронного источника электромагнитного излучения, получены химически селективные синхротронные данные об атомном и электронном строении поверхности отдельной клетки *E.coli* как источника биогибридного молекулярного материала.

Теоретическая значимость результатов работы состоит в получении и систематизации новых знаний в области физики конденсированного состояния новых функциональных материалов и наноструктур на основе неорганических наночастиц в природных биоконтейнерах в виде молекул белка бактериоферритина Dps клеток бактерий кишечной палочки *E.coli* и особенностях их фундаментальных свойств, в первую очередь морфологии, структуры, состава, локального атомного окружения и электронного спектра.

Практическая значимость результатов диссертации состоит в перспективах использования полученных знаний в области воспроизводимого формирования наночастиц унифицированных свойств, а именно заданного размера, состава, локального атомного и электронного строения, готовых к длительному хранению, трансформациям или управляемому, малозатратному и безвредному для окружающей среды использованию в микроэлектронике и спинтронике, медицине, адресной доставке для функционализации развитых поверхностей, и тд.

Основные научные положения, выносимые на защиту:

1. Молекулы белка бактериоферритина Dps с внешними размерами до 10 нм способны формировать неорганические наночастицы максимальным размером до 7 нм в своих внутренних пустотах, образуя биогибридный материал, и выстраивать квазиупорядоченный слой толщиной в одну молекулу.

2. Сложный композиционный состав неорганических наночастиц с минимальным размером до 1-2 нм биогибридного материала на основе молекулярной культуры белка ферритина Dps включает ионы железа в зарядовом состоянии Fe^{3+} и Fe^{2+} и различной координации с возможностью восстановления до Fe^0 при термической и ионной обработке.

3. Клетки бактерий кишечной палочки *E.coli* способны без разрушения, многократно, выступать источником молекул белка бактериоферритина Dps, в том числе содержащего ионы железа Fe^{2+} и Fe^{3+} .

4. Спектроскопическое и морфологическое обоснование эффективного заполнения пустот 3D-развитых массивов нитевидного кремния белковыми молекулами бактериоферритина Dps и очистки состава нанесенного белка от остаточной соли с целью функционализации развитой поверхности кремниевых нитей.

Степень надежности и достоверности результатов диссертации

основана на применении современных и многократно апробированных методов высокоточных исследований фундаментальных свойств материалов, реализованных с использованием современной на мировом уровне приборно-аппаратной базы, в том числе исследовательской инфраструктуры двух крупных научных установок класса «мегасайенс». Взаимодополняющий характер обоснованно примененных исследовательских подходов, использованных в работе, позволил подтвердить полученные результаты. Надежность результатов работы подтверждается систематической воспроизводимостью всех полученных данных исследований при многократной экспериментальной проверке. Достоверность научных

положений, выносимых на защиту, подтверждается независимыми экспертными оценками рецензентов научных журналов, входящих в перечень ВАК и индексируемых международными базами данных, в которых опубликованы статьи, содержащие основные результаты работы.

Личный вклад автора

Настоящая работа выполнена на кафедре общей физики и физического материаловедения ФГБОУ ВО «Воронежский государственный университет» и проводилась в соответствии с планом НИР университета: грант РФФИ № 19-72-20180 «Совместимость и трансформация функциональных неорганических наночастиц с культурами клеток в формируемых *in vitro* гибридных материалах по данным синхротронных исследований реконструкции атомного и электронного строения», 2019-2022 гг., грант в форме субсидии по теме «Распределенная инфраструктура высокоточных методов диагностики в ультрамягкой рентгеновской области синхротронного излучения для функциональных материалов и наноразмерных структур, включая био-нано-гибридные, для перспективных технологий и технических систем: от образовательных технологий через фундаментальные научные исследования к практическому применению» федеральной научно-технической программы развития синхротронных и нейтронных исследований и исследовательской инфраструктуры на период до 2030 года и дальнейшую перспективу, 2021-2024 гг. Задачи и цели исследования были поставлены под научным руководством заведующего кафедрой общей физики и физического материаловедения, доцента, д.ф.-м.н. Турищева С.Ю. Методы решения задач и постановка экспериментов определялись автором совместно с научным руководителем. Синтез и пробоподготовка образцов молекулярных культур белка ферритина Dps, клеток кишечной палочки *E.coli*, их изучение проводились автором совместно с профессором кафедры биофизики и биотехнологий, доктором биологических наук, доцентом Антиповым С.С. Образцы нитевидного кремния и эксперименты по их интеграции с белком, эксперименты методом спектромикроскопии РЕЕМ проводились совместно с

Ph.D. Сиваковым В.А (институт фотонных технологий, Йена, Германия). Данные исследований были получены автором совместно с научным руководителем, а также к.ф.-м.н. Париновой Е.В., к.ф.-м.н. Чувенковой О.А., к.ф.-м.н. Требунских С.Ю., Коюдой Д.А. а также с к.ф.-м.н. Куликовой Т.В., к.ф.-м.н. Синельниковым А.А., сотрудниками НИЦ "Курчатовский институт" к.ф.-м.н. Пичкуром Е.Б., к.ф.-м.н. Чумаковым Р.Г., к.ф.-м.н. Лебедевым А.М., сотрудниками ФИЦ республики Удмуртия к.ф.-м.н. Валеевым Р.Г., к.ф.-м.н. Бельтюковым А.Н., к.ф.-м.н. Чукавиным А.И. Обработка и анализ всех полученных экспериментальных и теоретических данных полностью проводилась лично автором или при его непосредственном и определяющем участии. Автором сформулированы основные выводы и научные положения, выносимые на защиту.

Апробация работы

Материалы научно-квалификационной работы докладывались и обсуждались на следующих конференциях: VIII, IX Всероссийской конференции с международным участием «Физико-химические процессы в конденсированных средах и на межфазных границах» ФАГРАН–2018 и ФАГРАН-2021 (Воронеж, 2018, 2021); Четвертом междисциплинарный научный форум с международным участием "Новые материалы и перспективные технологии" (Москва, 2018); XI конференции молодых ученых «КоМУ-2018» (Ижевск, 2018); XXIII Всероссийской конференции с международным участием «Рентгеновские и электронные спектры и химическая связь» (Воронеж, 2019); XX Зимней молодежной школы ПИЯФ по биофизике и молекулярной биологии 2019. (Рощино, 2019); XXVI Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых учёных "Ломоносов - 2019" (Москва, 2019); International Baltic School 2019 «4th Generation X-Ray Sources: Coherent optics and Techniques» (Калининград, 2019); Шестом междисциплинарном научном форуме с международным участием "Новые материалы и перспективные технологии" (Москва, 2020); XII конференции молодых ученых "КоМУ-2020" (Ижевск, 2020); 17th International

Conference on Nanosciences and Nanotechnologies (NN20) (Thessaloniki, Greece); (XIII Школе-конференции молодых ученых - "КоМУ-2021" (Ижевск, 2021); Всероссийской молодежной конференции "Высокоточная диагностика функциональных материалов: лабораторные и синхротронные исследования" (Воронеж, 2021); The European Materials Research Society 2021 spring meeting (E-MRS 2021 Spring Meeting) (Онлайн конференция, 2021); 18th International Conference on Nanosciences and Nanotechnologies (NN21) (Thessaloniki, Greece); II Всероссийской молодежной конференции "Высокоточная диагностика функциональных материалов: лабораторные и синхротронные исследования" (Воронеж, 2022); IV Всероссийской (XIX) молодежной научной школы - конференции "Молодёжь и наука на севере - 2022" (Сыктывкар, 2022); IX Международной конференции с элементами научной школы для молодежи «Функциональные наноматериалы и высокочистые вещества» (Суздаль, 2022); International workshop (IWSN 2022) "Synchrotron Radiation and Smart Nanomaterials" (Ростов-на-Дону, 2022); Всероссийском симпозиуме "Физико-химические характеристики и дизайн биомакромолекул" (Воронеж, 2023); "Курчатовский форум синхротронных и нейтронных исследований (Курчатов ФСНИ 2023)" (Москва, 2023); Международной конференции «Синхротронное излучение и лазеры на свободных электронах (СИ и ЛСЭ-2024)» ИЯФ СО РАН (Новосибирск, 2024); IV Всероссийской молодежной конференции "Высокоточная диагностика функциональных материалов: лабораторные и синхротронные исследования" (Воронеж, 2024).

Публикации

Основные результаты по теме диссертации изложены в 45 научных работах, в том числе 7 статьях в ведущих рецензируемых научных изданиях, рекомендованных ВАК для публикации результатов диссертационных работ (три из которых в журналах первого квартиля Web of Science) и 38 работ в сборниках трудов конференций.

Структура и объем научно-квалификационной работы

Научно-квалификационная работа состоит из введения, 5 глав и заключения, и списка литературы. Работа изложена на 163 страницах машинописного текста, содержит 72 рисунка. Список литературы, который содержит 144 наименования, включая статьи, содержащие результаты работы.

ГЛАВА 1. БИОГИБРИДНЫЕ МАТЕРИАЛЫ

БАКТЕРИОФЕРРИТИНА DPS: ПОЛУЧЕНИЕ И СВОЙСТВА

1.1. Бионаногибридные материалы на основе белка Dps и их свойства

Развитие науки и техники происходит очень быстро. Ученые все чаще прибегают к различным способам, которыми улучшают свои технологии. Технологические устройства становятся все меньше с каждым разом, а их функционал увеличивается. Но, в какой-то момент размер может дойти до критического значения, когда ученым нужно будет прибегнуть к новым способам формирования материалов и структур на их основе с целью дальнейшего улучшения производительности устройств. Именно это происходит в современном мире. Ученые ищут наиболее простые способы создания устройств с широким функционалом. И все чаще для этого им приходится обращаться к природе. Область электроники не исключение, в ней для улучшения функциональных характеристик используют гибридные материалы. Гибридными материалами называют материалы, состоящие из двух частей – органической, зачастую природной и неорганической, составляющих определенную структуру, не похожую на исходные составляющие, но наследующую как определенные свойства, так и функции первоначальных материалов.

Одним из ярких примеров таких материалов, являются композитные материалы, которые сформированы из основного вещества, распределенного определенным образом в объеме второго вещества, именуемого матрицей. Огромный научный интерес представляют материалы, сформированные одновременно из органической и неорганической частей. При соразмерности неорганических частиц гибридного материала с размерами молекул органической части (несколько нанометров) получается однородный композит или улучшенный, или абсолютно новый по своим свойствам материал. Это так называемый гибридный наноматериал. Знания о морфологии, строении, структуре и фазовом составе, а также особенностях

взаимодействия гибридных наночастиц с окружающей средой необходимы для понимания их фундаментальных свойств с целью их дальнейшего успешного использования [4, 5].

В роли неорганической составляющей данных материалов могут выступать наночастицы, нанотрубки, макромолекулы. Число блоков, из которых можно составить органическую составляющую очень большое, соответственно количество комбинаций органических и неорганических блоков практически безгранично. Из этого следует, что и количество новейших гибридных материалов практически не ограничено.

Одним из самых ярких примеров использования гибридного материала является медицина, поскольку такие материалы являются эффективным средством в адресной доставке лекарств [6].

В электронике крайне перспективным направлением является исследование гибридного наноматериала ферритина Dps. *Escherichia coli* Dps принадлежит к семейству бактериальных стресс-индуцированных белков для защиты ДНК от окислительного повреждения [3]. Он разделяет с *Listeria innocua* ferritin (мультимерный белок, который функционально ведёт себя как настоящий ферритин и выделен из грамположительных бактерий *Listeria innocua* (Листерия невинная)) несколько структурных особенностей, таких как четвертичная сборка и наличие необычного ферроксидазного центра (см. ниже). Действительно, недавно было признано, что он способен окисляться и образовывать неорганические соединения с железом. Поскольку ферритины наделены уникальной способностью направлять осаждение железа в сторону образования неорганического нанометрового ядра, были изучены структуры железа в полости Dps *E.Coli* [7,8].

Интерес к такому уникальному биогрибридному нанообъекту вызван основной функцией белков типа ферритин, а именно аккумуляция, хранение и дальнейшее использование железа в организме. Уникальность ферритина заключается еще и в его доступности для изучения, поскольку он содержится практически во всех известных типах живых организмов [7-12].

Структура ферритина представляется сложнейшим белковым комплексом с природной функцией накопления и применения накопленного железа, хранящегося во внутренней органической полости молекулы. В состав структуры ферритина входит белок апоферритин и атомы трехвалентного железа. В данном случае белковая оболочка, расположенная вокруг ферроксидазного центра ядра белкового комплекса ферритина и носит название апоферритина. В биологическом организме ферритин задействован в качестве «аккумулятора» железа, которое в дальнейшем распределяется для нужд организма. Основная функция этих белковых молекул также представляет большой интерес, поскольку понимание механизма накопления, хранения запаса железа в молекулах ферритина позволит эффективно применять эти объекты. В рамках механизма аккумуляирования железа во внутренней полости проходят процессы доокисления в органической части белковой структуры свободных атомов железа, поскольку они являются токсичными для всех живых существ. Поэтому оксиды железа (II), в том числе возможно токсичные для природных объектов, преобразуются в оксиды железа (III).

В природных организмах нахождение ферритина является различным. Например, у млекопитающих ферритин был обнаружен в цитоплазме клеток, а его количество напрямую зависит от общего количества железа в организме носителя. Важно понимать, что ферритины имеют различия и для разных семейств организмов. Говоря о ферритине в растениях, подразумевают фитоферритин, который располагается в хлоропластах. А в случае бактерий ситуация иная – они содержат два типа белка, в функции которых входит накопление железа: бактериоферритин, содержащий гем b и не содержащий гем [7, 13]. Под гемами понимаются комплексные соединения порфиринов с двухвалентным железом. Гемы выступают в роли небелковых частей белков — гемопroteинов (гемоглобинов, миоглобина, цитохромов и др.) [14].

Обобщая семейство ферритинов, стоит заметить, что, несмотря на различия в некоторых деталях, ферритины все же во многом схожи, особенно

это заметно по их строению. Все ферритины представляются сложным белковым комплексом, в состав которого входят 24 субъединицы, которые в свою очередь образуют плотную органическую оболочку. Именно внутри этой оболочки, имеющей сферическую форму, накапливается и формируется неорганическое ядро, имеющее сложный состав, состоящий из одной или нескольких наночастиц оксида железа, по различным данным гидратированного [14, 15, 16] (рис. 1.1). Оболочка молекулы ферритина имеет огромное количество пор, или же отверстий, диаметр которых составляет $\sim 3-4 \text{ \AA}$. Эти поры располагаются в местах соприкосновения субъединиц и служат своего рода специальными транспортными тоннелями для попадания железа во внутреннюю полость органической части молекулы. Некоторые бактерии, в том числе бактерия кишечной палочки *E.Coli*, имеют не только бактериоферритин, но и иной тип, включающий в себя двадцать четыре одинаковых субъединицы (19,4 кДа), но не содержащий гемов [14].

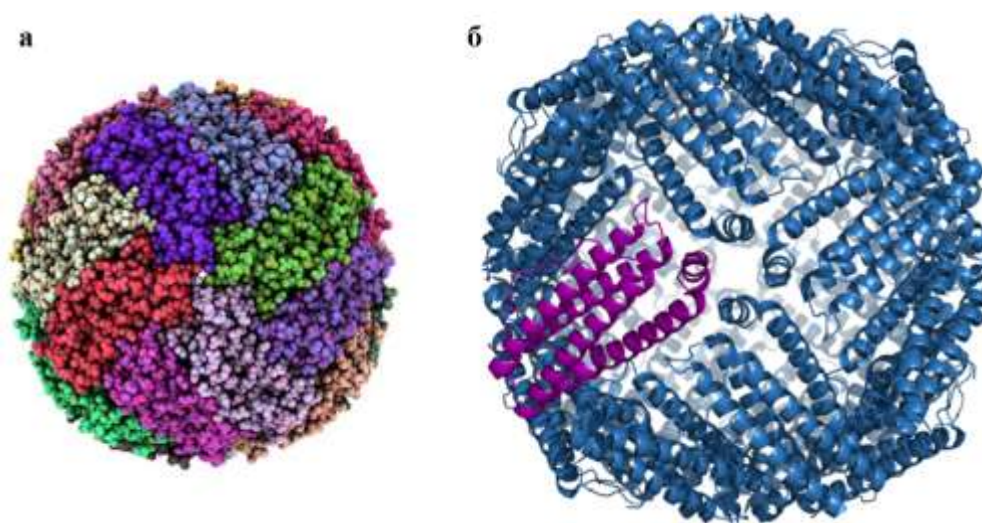


Рисунок 1.1 – а: молекулярная модель ферритина (на данном рисунке отчетливо видна сфера, образованная 24 белковыми субъединицами); б: структурная модель ферритина [3]

Как уже было отмечено ранее, ядро ферритина млекопитающих, в биофизике называемое минеральным, формируется внутри органической

оболочки и состоит из частиц оксида, попадающих извне. Кристаллическая структура этих частиц представляется структурой природного минерала ферригидрита — $9\text{Fe}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$. В свою очередь размер сформированного минерального ядра напрямую зависит от размеров внутренней полый области молекула ферритина и в среднем составляет 80 Å. Минеральное ядро одной молекулы ферритина обладает сложным составом и может содержать до 4500 атомов железа [3, 17, 18].

Говоря о семействе белков, можно выделить 3 больших типа ферритинов: классические ферритины (Ftn), бактериоферритины (Bfr) и белки Dps (рис. 1.2).

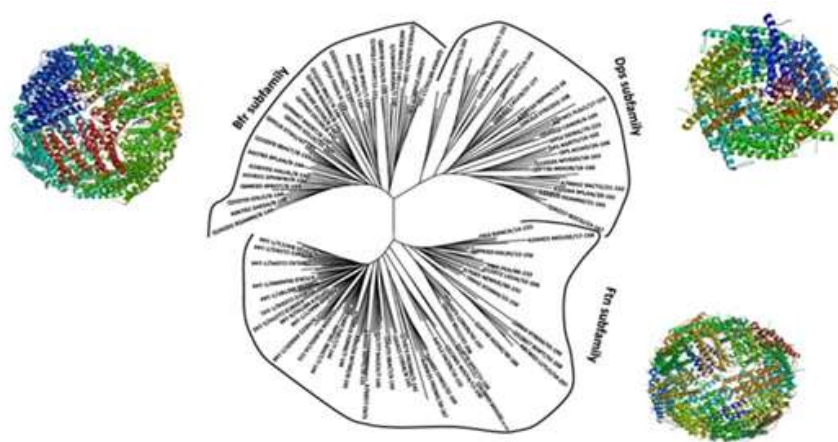


Рисунок 1.2 – Представители семейства ферритинов (в середине – каждая линия означает отдельное подсемейство белков) [19]

Белки семейства Dps - DNA-binding protein from starved cells (ДНК связанный белок, обеспечивающий клетку железом в условиях голодания) – являются еще одним семейством представительства ферритинов, однако имеют значительные отличия от двух других семейств – бактериоферритинов и ферритинов в классическом представлении, но, при этом, сохраняют основные структурные и функциональные свойства. Первым заметным отличием от других семейств является их меньший размер молекул - 95 Å, а не 120 Å (рис. 1.3). Связано это с тем, что в структуру белковой органической составляющей входят всего 12 идентичных субъединиц, а не 24, как у других

представителей семейств. А это в свою очередь означает, что и объем запасаемого железа во внутренней полости, а, следовательно, и размер неорганического ядра значительно меньше (~ 500 атомов у ферритина Dps, вместо ~ 4500 атомов у семейств Vfr и Ftn) [7, 13].

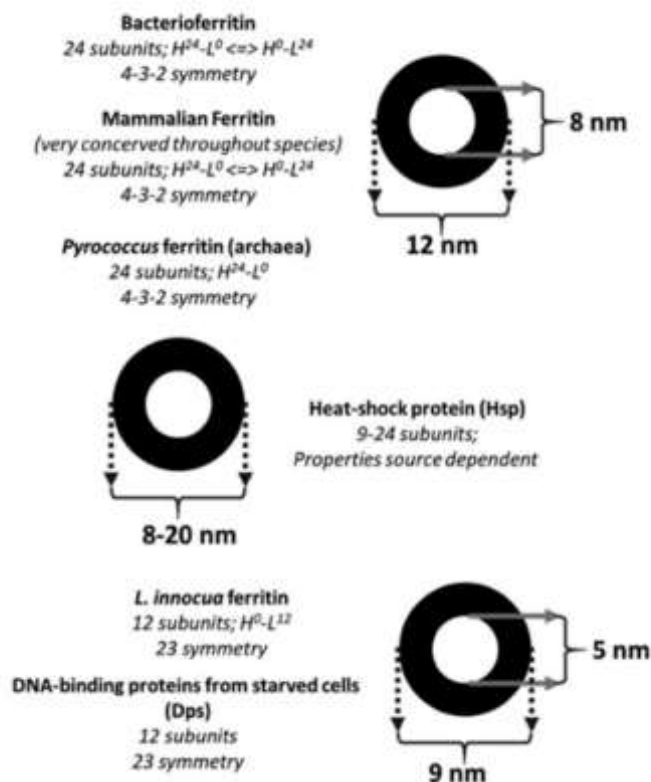


Рисунок 1.3 – Размерные отличия молекул в семействе ферритинов [20]

Молекула ферритина обладает симметрией, структурой и морфологией описанной в [11]. Отметим, что молекулы ферритина отличаются друг от друга в зависимости от происхождения. Например, отличиями обладают белки ферритина Dps и бактериоферритина Vfr. Так, отличия в форме, размерах и иные свойствах этих объектов, продиктованы, в том числе, отсутствием у субъединицы ферритина Dps отдельного элемента E-спирали, но при этом короткая спиральная область на длинной B-CB-C петле (BC-спираль) все же присутствует, что прослеживается на рисунке 1.4.

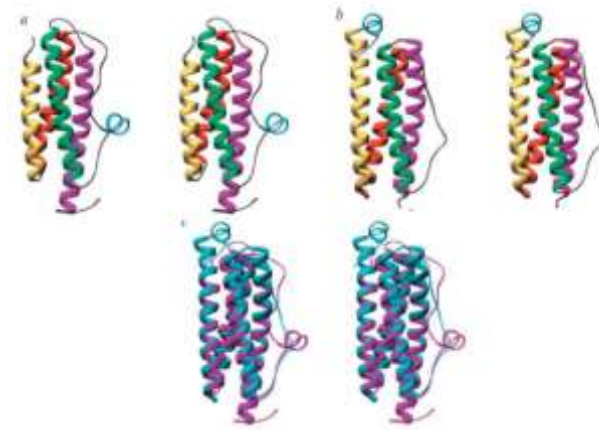


Рисунок 1.4 – Сравнение мономеров белков Dps и Vfr. а) Мономер Dps: N-конец расположен в нижней части рисунка, С-конец – в верхней; А-спираль окрашена пурпурным цветом, В-спираль - желтым, ВС-спираль – голубым, С-спираль – красным, D-спираль – зеленым. б) Мономер Vfr (ориентация цепи и окраска спиралей совпадает с таковыми для мономера Dps, за исключением Е-спирали, окрашенной в голубой цвет). в) результат наложения мономеров Dps и Vfr (пурпурным цветом обозначен мономер Dps, голубым - Vfr) [19]

Также, к еще одному отличию от других семейств ферритинов относят иное местоположение ферроксидазного сайта – у белков семейства Dps он отсутствует в центре 4-спирального пучка. Вместо этого, локализация ферроксидазных сайтов у белков семейства Dps происходит на поверхности между двумя солокализованными в пространстве субъединицами [14]. Аминокислотные остатки, принимавшие участие в формировании этих сайтов, остаются консервативными в рамках семейства Dps, однако имеют весомые отличия от таковых же в семействах Vfr и Ftn. Также стоит заметить, что помимо отличий в расположении ферроксидазных центров, отличными в молекулах белка являются и молекулы, которые используются для окисления ионов железа. У семейств Ftn и Vfr для в ходе этого процесса применяются молекулы O_2 , но у белков семейства Ftn для проведения процесса окисления применяются молекулы H_2O_2 .

Но наиболее значимым отличием от других семейств ферритинов является особенность белков семейства Dps, которая кроется в названии –

связь с ДНК, а именно способность белков Dps взаимодействовать с ней [9, 13]. Эта характерная особенность подчеркивает прямое природное назначение и выполняемую функцию белков этого семейства в организме клеток – обеспечение защиты клеток от вредоносных факторов различного характера, особенно это касается клеток ДНК. Обычно к факторам такого рода относят гидроксильные радикалы, образующиеся в качестве продукта реакции Фентона (рис. 1.5). Этот процесс происходит следующим образом: с увеличением концентрации H_2O_2 в присутствии внутриклеточных ионов Fe^{2+} растет уровень протекания этой реакции на значительном уровне. В этом случае молекулы белка Dps являются ограждающим и защитным средством, воздействуя на гидроксильные радикалы за счет перевода растворимого железа Fe^{2+} в насыщенное ферригидитное ядро во внутренней органической полости белка. Именно так подтверждается первичная и главная роль Dps в организме клеток, а именно защита макромолекул от ионов Fe^{2+} , и, посредством этого, накопление железа, точнее железосодержащих наночастиц.

(a) Окисление ионов железа Fe^{2+} в ходе реакции Фентона



(b) Окисление ионов железа Fe^{2+} в ферроксидазном центре

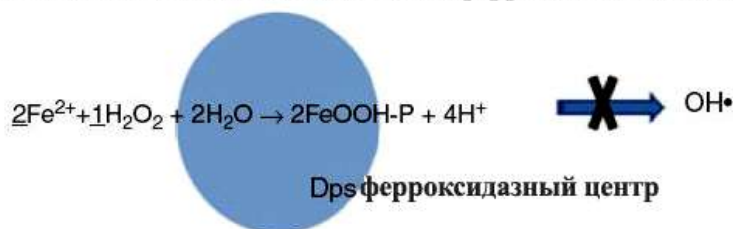


Рисунок 1.5 – Реакции окисления Fe^{2+} в клетках *E.coli*. (a) Окисление ионов железа Fe^{2+} в ходе реакции Фентона, приводящее к образованию гидроксил радикалов, вызывающие повреждение и гибель клетки. (b) Окисление ионов железа Fe^{2+} в каталитическом центре Dps [3]

В живых организмах железо присутствует и является частью большого количества жизненных процессов. В качестве примеров можно выделить дыхание, транспортировку кислорода и, один из серьезнейших процессов – биосинтез ДНК. Попадание железа в клетки в виде ионов Fe^{2+} происходит средствами особых транспортных систем, при этом впоследствии, все полученное клетками железо накапливается и хранится в полости специальных белков, которые и являются ферритинами. Железо хранится в полости молекул ферритина в виде нетоксичного оксида железа Fe_2O_3 (Fe^{3+}), сформированного внутри ферригидритного ядра, до момента использования конкретными ферментными системами в рамках различных процессов жизнедеятельности клетки. Именно молекулы белка Dps обеспечивают процесс аккумуляции железа в своей внутренней полости, и именно он обладает ферроксидазной активностью, которая является начальным шагом на пути перевода растворимого железа Fe^{2+} в насыщенное ферригидритное ядро во внутренней полости белка. Ферроксидазными центрами (ФОЦ) – называют участки белковой макромолекулы, в которых происходит окисление ионов железа Fe^{2+} до Fe^{3+} с помощью пероксида водорода (рис. 1.5), после чего окисленные ионы железа аккумулируются во внутренней полости Dps. Первоначально ФОЦ были выявлены у ферритинов, а затем и у бактериоферритинов [21 - 26]. В додекамере Dps ФОЦ расположены в области контакта трех мономеров на расстоянии примерно 2 нм от поверхности макромолекулы и имеют достаточно консервативную структуру. Транспортировка ионов железа к ФОЦ (во внутреннюю полость) происходит по специальным каналам двух типов свойства которых известны [27].

Таким образом, можно отметить, что первичной и основной задачей белка Dps является защита самих макромолекул от опасного воздействия ионов Fe^{2+} , посредством запасания железа. Данное обстоятельство косвенно подтверждается наличием других белковых семейств в клетке у бактерий *E.coli*, в именно присутствие ферритина А и бактериоферритин Vfr. В процессе логарифмического роста клеток ~50% от общего количества железа

содержится в ферритине А [15]. Было выявлено, что при окислении кислородом при $\text{pH} > 6$ «минерализация» ионов Fe^{2+} происходит достаточно легко. Ферритин, обладающий феррооксидазной каталитической активностью, значительно ускоряет окисление Fe^{2+} , образуя частицы гидратированного оксида железа внутри белковой оболочки. Механизм синтеза минерального ядра ферритина разделяется на несколько этапов, (рис 1.6). В процессе синтеза минерального ядра ферритина происходит превращение апоферритина в ферритин в цитоплазме клеток, путем захвата ионы Fe^{2+} и транспортируя их через белковую оболочку в центральную полость. В дальнейшем в этой полости происходит их доокисление на каталитических центрах, о которых было упомянуто ранее, и связывание с центрами зарождения кристаллитов. Небольшие кристаллиты ферригидрита затем растут при отложении дополнительного железа [16].

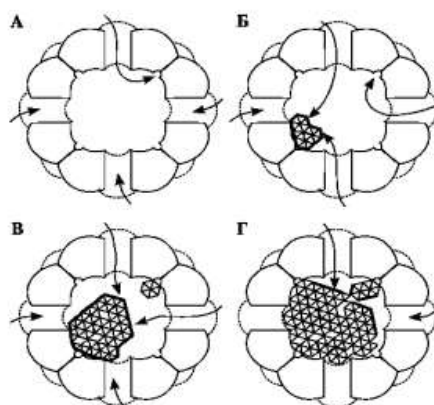


Рисунок 1.6 – Образование минерального ядра ферритина. А, Б, В, Г — этапы биосинтеза кристаллитов гидратированного оксида железа. Стрелками указаны пути прохождения ионов железа в полость ферритина [11]

Рост железного ядра внутри органической оболочки белка Dps представлен в нескольких этапах, (рис 1.7). Известно [28], что структурное устройство центра зарождения кристалла позволяет выдвинуть предположение, что роль в процессе образования кристаллитов ферригидрита могут также играть и электростатические поля.

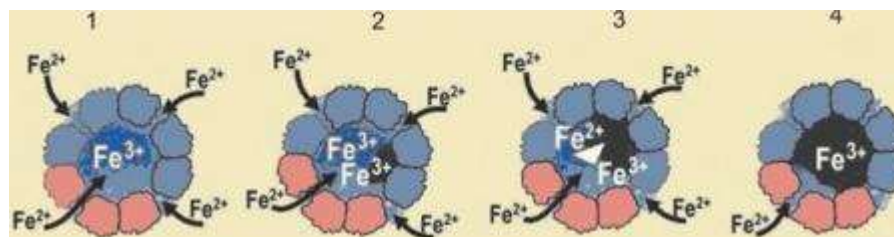


Рисунок 1.7 – Стадии формирования неорганического ядра [11]: 1 – окисление Fe^{2+} феррооксидазного центра H- субъединицы; 2 – образование ферригидратного ядра в центре полости молекулы ферритина; 3 – окисление Fe^{2+} на поверхности ферригидратного ядра ферритина; 4 – рост железного ядра ферритина

Таким образом, в результате катализируемого и регулируемого белком процесса окисления ионов двухвалентного железа внутри ферритина происходит образование частиц (возможно гидратированного) оксида железа. С другой стороны, говоря о ферритине, как о железо-запасующем белке в клетках, предполагаются процессы связывания железа в ферритине и предоставление его для различных нужд естественного происхождения, например клеточного метаболизма, или искусственного, например адресной доставки неорганических наночастиц заданного состава.

Стоит отметить, что помимо своих основных функций запасания, хранения и транспортировки ионов железа, ферритины также являются частью важных окислительно-восстановительных процессов, выполняя в них функцию биокатализаторов [28]. Также, обнаружено присутствие белка Dps в структуре наружной мембраны клеток [29, 30], что является важным фактом, для дальнейшего синтеза молекул белка Dps в значительных объемах без применения технологии синтеза с разрушением клеточной культуры *Escherichia coli*.

То есть, большой научный интерес представляет сама клеточная культура бактерии *Escherichia coli*, как источник таких уникальных биогибридных нанообъектов. Интерес состоит в возможности дальнейшего использования самих клеток *E.coli* в качестве источника значительного объема наночастиц

системы железо-кислород без физического воздействия непосредственно на саму клеточную культуру (с целью вынужденного выделения ферритинов). Данное предположение можно осуществить путем насыщения клетки, в том числе генно-модифицированной для выделения избыточного количества белка. Это позволит получить предположительно большой объем железосодержащих наночастиц, а в теории и имеющих в составе иные металлы, с заранее известными физико-химическими свойствами и геометрическими размерами по природной технологии.

1.2. Биогибридные материалы на основе *Escherichia coli* и их свойства.

Как было отмечено выше, интерес представляют не только молекулы белка Dps, но и непосредственно источник этих молекул – клеточная культура бактерий *Escherichia coli*. Использование клеток в качестве источника значительного количества молекул без применения методов физического разрушения клетки – является одной из основных перспективных целей, поскольку позволит контролировать количество производимых молекул и без смены их источника – бактерии (клетки).

Escherichia coli, она же – кишечная палочка – это вид грамотрицательных бактерий, имеющих палочковидную форму, которые широко распространены в нижней части кишечника теплокровных живых организмов. Внешний вид клеточной культуры представляет собой полиморфные прямые или же слегка изогнутые палочки, имеющие закругления на обоих концах клетки. На своей поверхности клетки *E.coli* имеют специальные образования-отростки, именуемые пиями или же фимбриями. Также на поверхности клеток располагаются перетрихально расположенные жгутики, благодаря которым клетки обладают высокой подвижностью. Размеры отдельно взятой клетки *E.coli* составляют: длина 2-6 мкм, ширина 0,4-0,6 мкм. Общий вид клетки представлен на микрофотографии просвечивающей электронной микроскопии на рисунке 1.8.

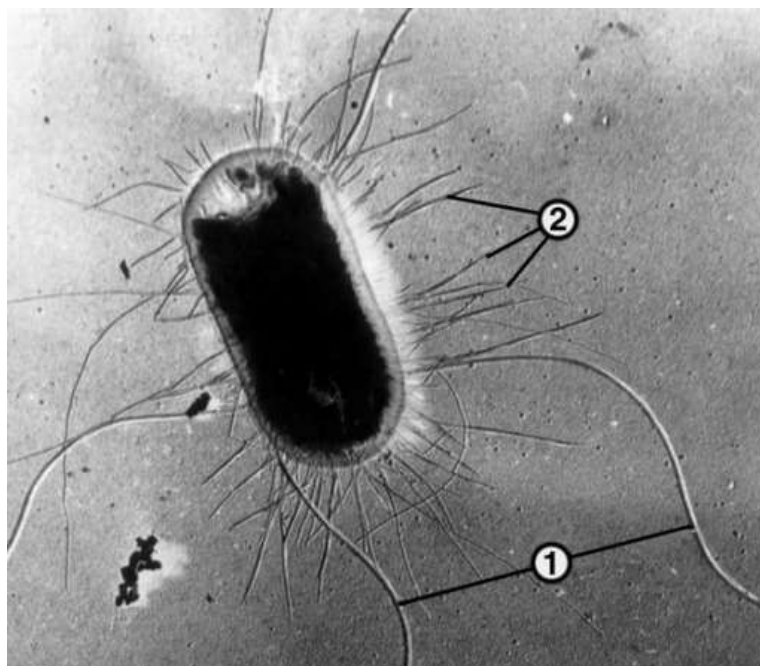


Рисунок 1.8 – Изображение ТЕМ клетки кишечной палочки:

1 – жгутики, 2 – пили

В природе существует огромное множество изученных различных штаммов бактерии кишечной палочки. В большинстве штаммы *E.coli*, известные науке, являются в массе безвредными, однако некоторые их виды могут стать причиной тяжелого пищевого отравления человека [31] и животных [32], как например серотип O157:H7. Под штаммом понимают совокупность особей внутри одного вида, в рамках которой представители обладают свойствами, отличными от свойств других особей. Зачастую отличия такого рода могут быть выявлены только при глубоком исследовании на молекулярном уровне, однако иметь эффект на такие важные аспекты, как физиология и жизненный цикл бактерии. Клеточная культура *E.coli* является одним из наиболее изученных прокариотических микроорганизмов, а также играет огромную роль в различных исследованиях и технологиях в области биотехнологии и микробиологии [33]. Наглядное представление об особенностях строения прокариотической клетки продемонстрировано на рисунке 1.9.

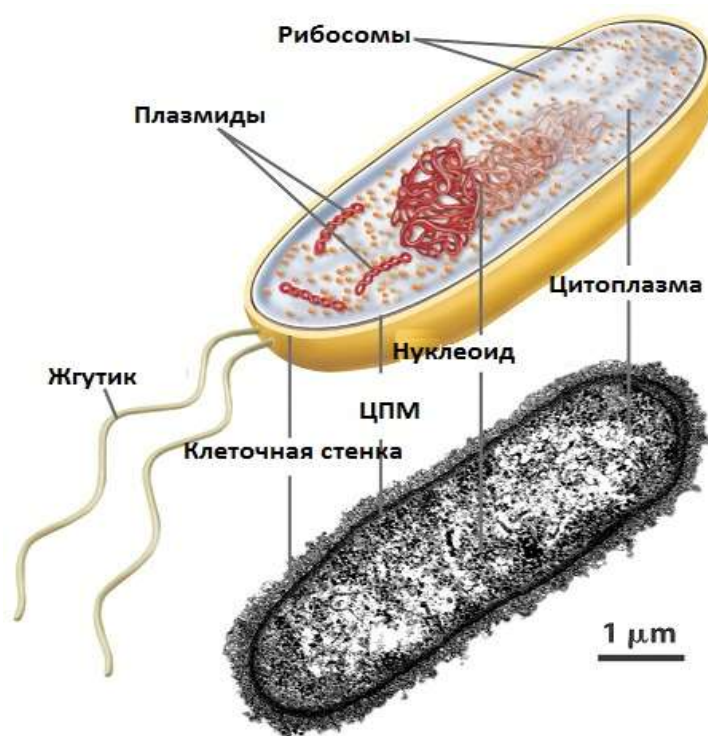


Рисунок 1.9 – Особенности организации прокариотической клетки *E.coli*

Традиционный способ выделения определенных молекул из клеточного материала предусматривает разрушение последних с последующим, тонким и длительным применением многочисленных биотехнологических и иных процедур, среди которых перечислим лишь несколько: разрушение бактериальной клеточной стенки, ультразвуковое воздействие, центрифугирование, хроматография, фильтрация, диализ. Однако, известна возможность модификации культуры клеток, способная привести к существенно повышенной выработке заданного типа молекул. При этом клетки переходят в стадию супепродукции белка. Например, при добавлении к клеточной суспензии кольцевых молекул плазмидной ДНК рGEM-dps (пДНК), содержащих полноразмерную копию гена dps [34].

То есть клетку, как своего рода источник выделения молекул белка, можно использовать многократно. Насыщая среду существования клеток и молекул источником ионов железа (как правило соль Мора – $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2$) в задаваемой биофизически фазе роста клеток, мы фактически имеем «связку»: функционирующий природный одноклеточный микроорганизм клетки

кишечной палочки – многократное производство белка – многократное производство бионаногибридного материала (природная белковая оболочка с неорганической наночастицей внутри фиксированного размера и состава).

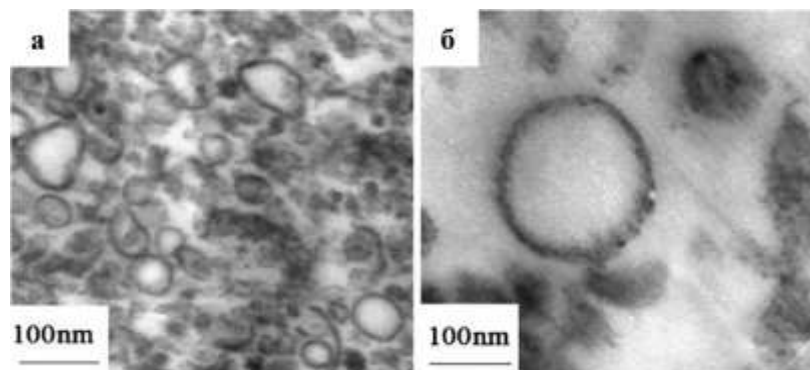


Рисунок 1.10 – TEM изображение везикул, выделившихся из клеток кишечной палочки *Escherichia coli*. (а - TEM изображение скопления везикул, б – TEM изображение отдельно взятой везикулы, с – формирование везикулы внутри клетки) [35]

Вопрос лишь в том, будут ли выводиться молекулы белка из внутренней части клетки во внешнюю среду? Однозначно этот процесс связан с преодолением клеточной мембраны. Введение клетки в состояние суперпродукции подразумевает стимулирование выделения избыточного количества белковых молекул Dps. Избыточность производимого количества молекул белка происходит в органическом скоплении, именуемым везикула [36]. Процесс, при котором у эукариот происходит активное выделение организмом клетки продуктов внутриклеточной жизнедеятельности во внеклеточное пространство с образованием таких структур как везикула называется экзоцитозом. Везикула является небольшой структурой, представляющей внутриклеточную органеллу. В ней содержатся «транспортные отсеки» для процессов запаса, хранения, а также перемещения важнейших питательных веществ, которые в свою очередь защищены мембраной. Внешний вид, а именно форма, а также размер везикул,

выделившихся из клеточной культуры *E. coli* представлен на рисунке 1.10 [35]. Ограничение внутреннего содержания везикулы мембраной от цитоплазмы является схожим с тем, как непосредственно цитоплазматическая мембрана отгораживает организм самой клетки от внешней среды, которая в свою очередь может быть агрессивной и пагубной для клетки. В ходе этапов формирования и дальнейшей транспортировки экзоцитозной везикулы, вещества, находящиеся в ней, ограничены от цитоплазмы клетки, поэтому они могут быть отличными от цитоплазматических. Везикулы обладают интересной особенностью, а именно способностью прикрепляться к внешней мембране клетки и выпускать содержимое изнутри во внутриклеточное пространство.

В рамках данной работы везикулы также представляют интерес поскольку именно с их помощью, находясь в состоянии суперпродукции, клетка *Escherichia coli* может производить выделение больших объемов белковых молекул Dps. Также известно, что молекулы белка Dps могут находиться в том числе в приповерхностной области мембраны клетки, в том числе в самих везикулах. Данное обстоятельство позволяет с уверенностью отметить важность изучения поверхности клеточной культуры *Escherichia coli* в состоянии суперпродукции белка. Таким образом можно заключить, что клетки кишечной палочки можно рассматривать как источник молекул белков Dps. Как одноразовый источник *E. coli* можно рассматривать в случае применения последовательности процедур по выделению белка из внутриклеточной части при внешнем разрушении бактерии. Однако известны специфические условия роста, при которых клетки могут внешне-стимулированно и чрезвычайно избыточно производить молекулы Dps - так называемые условия суперпродукции [37]. Более того, везикулы могут рассматриваться как механизм отделения белка, производимого клеткой сверх нормы. В таком случае клетка будет производить белок многократно.

1.3. Области применения бионаногибридных объектов на основе ферритина Dps.

В предыдущих разделах приведена информация о молекулах ферритина, которые могут иметь различное происхождение и свойства. В целом ферритин представляет собой сложный комплекс белка, играющего значительную роль агрегатора железа у живых организмов (внутриклеточно). В структуру ферритина входит сама молекула белка, апоферритин, и до нескольких тысяч атомов железа, состояния которых в молекуле могут быть весьма различными [см. например 11].

С развитием науки и техники все больше технологий по разработке различных устройств и медицинских структур применяют природоподобный алгоритм создания объектов. Не является исключением и применение такого интересного с практической и научной точки зрения объекта, как молекулярная культура белка Dps. Белки ферритина являются предметом интенсивных исследований для различных применений в бионанотехнологиях, поскольку они обладают многочисленными преимуществами [38]. Во-первых, ферритины имеют высокосимметричную структуру с замечательной химической и термической стабильностью. Во-вторых, восстановление такого объекта возможно путем контролируемой повторной сборки. В-третьих, в ферритиновую полость можно загружать и накапливать там (депонировать, минерализовать, и иные термины в биологии) различные типы металлов [38]. В-четвертых, внутреннюю и внешнюю поверхность биообъекта легко модифицировать путем добавления пептидов или белковых меток с использованием рекомбинантных генетических методов. Наконец, ферритины обладают высокой биосовместимостью и меньшей иммуногенностью по сравнению с любыми другими белковыми клетками. То есть, неорганические наночастицы являются безвредными для «контейнера» природного происхождения. Существует множество работ по внедрению такого рода объектов в самые различные области науки и техники.

На рисунке 1.11 представлены наиболее перспективные направления применения ферритинов.

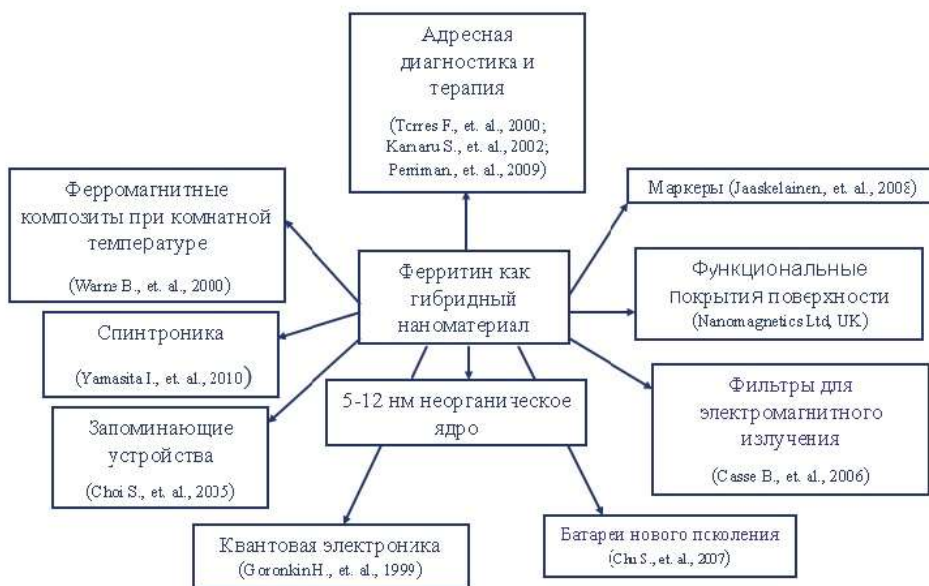


Рисунок 1.11 – Области применения молекул ферритинов [3]

Особое внимание из общего множества областей применения таких структур привлекает микроэлектроника. Причиной растущего интереса к ферритинам в этой области является возможность реализации собственных магнитных свойств наночастиц содержащих атомы железа, например легко восстановленных из металл-оксидного состава. В самом деле, существование собственного магнитного момента наночастиц малого размера имеет потенциал управляемого, скоростного и энергетически экономного переключения активного элемента наноэлектронных, а именно спинтронных структур в их практических приложениях.

То есть, как правило именно ядро, формирующееся во внутренней полости, является предметом исследований. Состав и структура ядра является достаточно сложным, как правило неизвестным для реального бионаногибридного объекта. По своим свойствам железосодержащее ядро молекулы ферритина является антиферромагнетиком, однако при насыщении белка оксидами других металлов, его магнитные свойства можно контролировать. Данное уникальная особенность молекул белка ферритина

Dps уже сегодня открывает перспективы для создания различных наноустройств в микроэлектронике с заданными технологическими параметрами, благодаря применению этих биогибридных объектов при формировании активных полупроводниковых структур. В качестве примеров устройств можно назвать ячейки памяти супервысокой плотностью записи информации, фильтров для электромагнитных излучений терагерцового диапазона и многослойных нанобатарей. При внедрении такого подхода ядро ферритина может быть использовано в качестве управляемого «дозатора» наночастиц различного химического состава. Проведенные исследования уже позволяют говорить о том, что количество веществ, которые могут быть задействованы в процессе формирования биоминерального ядра увеличивается по мере проводимых исследований. Сейчас уже можно утверждать о том, что оксиды таких веществ, как железа, хрома, кобальта и индия могут быть успешно применены для создания наночастиц заданных свойств [39]. Более того, известны работы, где в качестве материала формирования ядра молекулы были использованы: гидроксид никеля, сплавы CdSe [40] и ZnSe [41], а также сульфиды кадмия, цинка, железа и серебра [40].

Наночастицы соединений этих металлов, полученных в ходе использования данного подхода, в перспективе могут быть использованы для создания различных наноустройств, примером которых могут быть транзисторы с плавающим затвором. Технология создания таких транзисторов была впервые продемонстрирована в 2006 году, а в дальнейшем претерпевала различные усовершенствования [42, 43]. На рисунке 1.12 можно увидеть краткую схему создания устройств такого типа. Флэш-память, полученная с применением этой технологии, отличается высокой плотностью записи информации (около 450 Гбит/см²), а также низкой потребляемой мощностью.

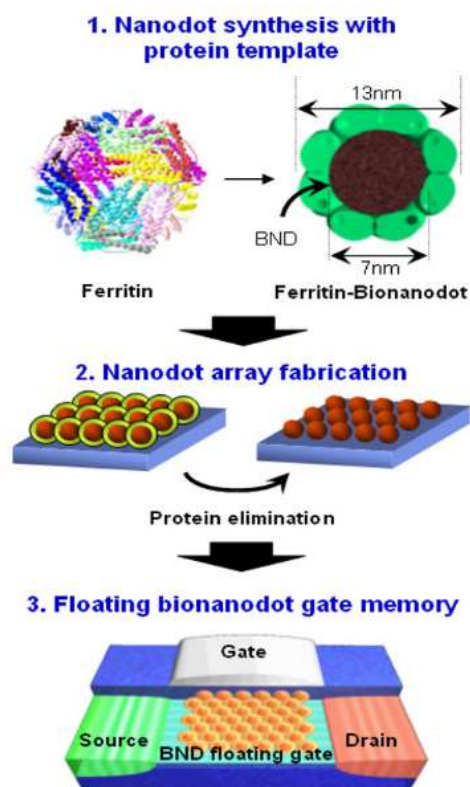


Рисунок 1.12 – Схема, изображающая процесс изготовления флеш-памяти на основе плавающего затвора, содержащего биоминерализованные частички [44]

Но использование апоферритинов при создании таких наноустройств имеет и свои недостатки, поскольку непредсказуемый и слабо контролируемый характер распределения молекул белка по поверхности подложки может стать причиной нежелательных флуктуаций. В свою очередь такие флуктуации повлекут за собой искажение информации и скажутся на значительном снижении срока хранения информации на создаваемых флэш-накопителях.

Перспективным решением таких проблем может стать замена классических ферритинов (апоферритинов) на молекулы бактериоферритина Dps. Как было упомянуто ранее, белки Dps обладают уникальной особенностью – прочной связью с ДНК. Благодаря этому, возможность полной иммобилизации молекул на специальных олигонуклеотидных матрицах, определяя тем самым геометрию создаваемых наночастиц, станет реальной. Помимо контроля геометрии наночастиц, еще одним значимым достоинством

Dps является меньший размер молекул, в сравнении с другими семействами ферритинов, что в свою очередь играет решающую роль в процессе миниатюризации финального изделия. Сравнительные размеры молекул белка Dps и бактериоферритина Bfr представлены на рисунке 1.13.

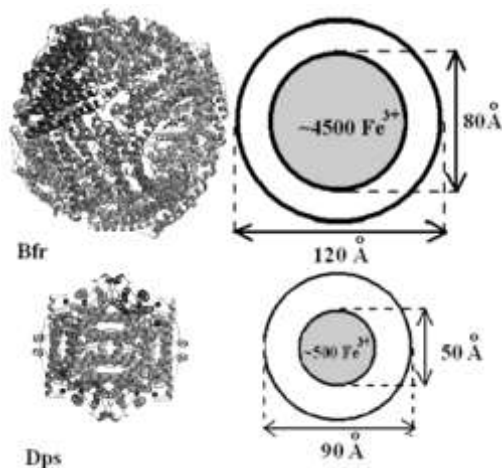


Рисунок 1.13 – Трехмерные структуры ферритинов Bfr и Dps *E.coli* (коды RCSB PDB – 1Bfr и 1Dps, соответственно), а также масштабное сопоставление размеров их молекул и ферригидритных ядер [45]

В рамках различных работ медицинского характера было установлено, что ферритин является эффективным средством в адресной доставке лекарств. Было обнаружено, что лекарственные препараты, которые имеют естественную склонность связывать металлы, такие как цисплатин, карбоплатин, десферриоксамин В и дауномицин, могут быть легко заключены в ферритиновую оболочку [6, 46]. Впервые об инкапсуляции цисплатином было сообщено в 2007 году [47], и эта же группа также изучала детали клеточной интернализации, а также различные применения наночастиц, содержащих лекарственные препараты, в лечении опухолей [48].

Таким образом, природные объекты в виде молекул Dps и клеток *E.coli* способны формировать гибридные наноструктуры сочетающие природную (органическую) компоненту в сочетании с неорганической наночастицей. Изучение и дальнейшее понимание механизма формирования таких гибридных наноструктур открывает большие перспективы в решении широкого круга

задач от нанoeлектроники и спинтроники до медицины [28], поскольку данный механизм является простым, экономичным и высокоэффективным способом в формировании наночастиц системы железо-кислород. Важным замечанием является и то, что при исследовании стоит уделять внимание не только («минерализованному») железосодержащему ядру молекулы, но и природным молекулярной и клеточной культуре, поскольку их симбиоз может открыть гораздо более широкий спектр возможностей применения и улучшения уже известных технологий. Поэтому представляет большой научный и практический интерес изучение фундаментальных свойств: морфологии, состава, структуры, атомного и электронного строения гибридных микро- и наноструктур на основе клеток *E.coli* и молекул Dps соответственно. Для этого необходимо применять, или устанавливать возможность применения ряда современных аналитических методов. Рассмотрим ряд этих методов, которые использовались при выполнении диссертационной работы.

1.4 Методы изучения ферритинов Dps и гибридных материалов на их основе.

1.4.1 Метод динамического светорассеяния

Для эффективного использования гибридных наноструктур на основе молекул белка Dps необходимо исследовать размерные характеристики. Удобным средством для решения такой задачи является метод динамического светорассеяния (ДРС), в рамках которого возможно определить коэффициент диффузии дисперсных частиц в жидкости, произведя анализ характерного времени флуктуаций интенсивности рассеянного света. Определив значение коэффициента диффузии, можно рассчитать радиус наночастиц в растворе.

Когда световой луч падает на частицы, происходит взаимодействие электромагнитной волны с неоднородной средой и свет рассеивается. Основное предположение теории ДРС заключается в том, что рассеянный свет

имеет ту же частоту, что и возбуждающий луч света. Однако, для стороннего наблюдателя возникает оптический эффект Доплера по отношению к движению частиц, а интенсивность рассеянного света не постоянна и флуктуирует около среднего значения $\langle I \rangle$.

Пример флуктуаций интенсивности рассеянного света в соответствии с тепловым движением рассеянных частиц представлен на рисунке 1.14, где левый график демонстрирует медленные флуктуации, характерные для частиц большого размера, в то время как справа наблюдаются более быстрые флуктуации, свойственные для частиц маленького размера [49].

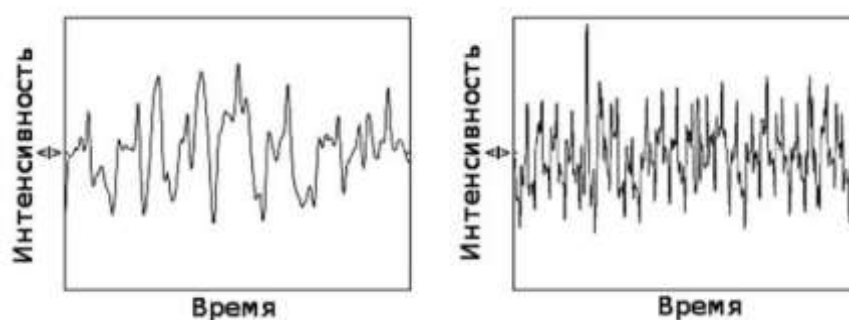


Рисунок 1.14 – Флуктуации интенсивности рассеянного света в соответствии с тепловым движением рассеянных частиц [49]

При попадании в среду с молекулами луч на своем пути встречает огромное число частиц, находящихся в растворе, которые движутся во всех направлениях, при этом с разными скоростями. В ходе данного процесса происходит формирования непрерывного спектра вероятности частотных сдвигов $S(\omega)$, который имеет центром частоту возбуждающего луча ω_0 . На рисунке 1.15 показан график распределения спектральной плоскости вероятности частотных сдвигов в рассеянном свете с Броуновским движением частиц в суспензии [49].

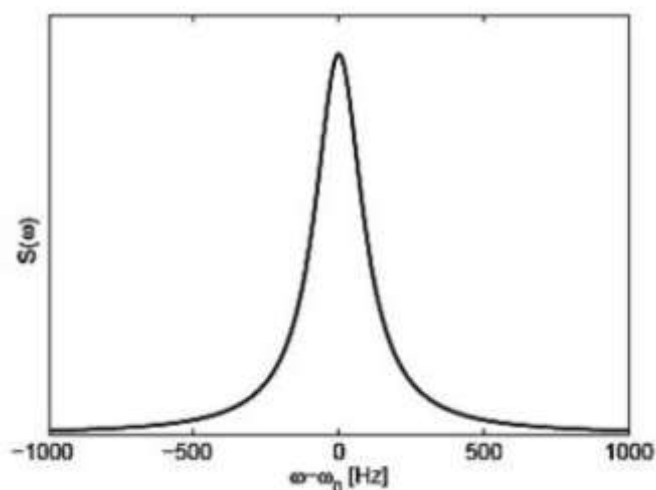


Рисунок 1.15 – График распределения спектральной плоскости вероятности частотных сдвигов в рассеянном свете [50]

Данный метод позволяет не только определить размерные характеристики частиц в растворе, но также и помочь с решением задачи определения вязкости жидкости. Обладая данными о размере частиц, можно использовать измеренное характерное время для расчета коэффициента вязкости жидкости [49].

Анализ полученных данных для рассмотренного случая рассеяния света монодисперсными частицами является известной задачей. В случае интерпретации экспериментальных данных для полидисперсных образцов – задача сложнее. Для реально достижимой точности измерений могут быть получены только два-три параметра полидисперсного распределения: средний размер частиц, ширина распределения и асимметрия распределения [50] при условии однородности исследуемой взвеси. В противном случае устанавливаемые размеры наночастиц будут ложными и определять имеющиеся в растворе флуктуации плотности, а не истинный размер наночастиц.

1.4.2 Просвечивающая электронная микроскопия

Просвечивающая электронная микроскопия ТЕМ (Transmission Electron Microscopy) является отличным аналитическим инструментом для

исследования различных микро- и наноразмерных объектов, размер которых составляет единицы нанометров. Данный метод эффективно применяется для характеристики структуры материала, как в объеме, так и в приповерхностных областях [51, 52]. С его помощью возможно осуществлять изучение морфологических и структурных объектов самого широкого спектра, начиная от различных нанопорошков, тонких пленок и заканчивая различного рода органических объектов при использовании специальных методик пробоподготовки. Последний фактор является немаловажным для данной работы.

Метод ТЕМ позволяет решать следующие задачи:

- * характеристика структуры образца в объеме и поверхностной области;
- * определение типа и параметров кристаллической решетки матрицы и фаз;
- * определение качественного фазового состава образца, с помощью установки специального детектора;
- * изучение строения границ зерен;
- * изучение влияния на структуру различных воздействий в процессе исследования;
- * определение ориентационных соотношений между элементами структуры образца.

Среди основных режимов работы просвечивающего электронного микроскопа выделяют:

- * светлое поле;
- * темное поле;
- * дифракционный контраст;
- * спектроскопия энергетических потерь электронов (при наличии соответствующего модуля);
- * элементное картирование с помощью рентгеновского энергодисперсионного спектрометра (также при наличии модуля).

Одним из важнейших факторов для применения этого метода является толщина исследуемого образца, поскольку значения ускоряющего напряжения электронов находятся в диапазоне 100-300 кВ, соответственно толщина образца не должна превышать 100-300 нм. Однако, для получения наиболее лучшего качества изображения следует производить утонение образцов до 10 – 50 нм [53].

Формирование электронного пучка в ТЕМ происходит в ускорительной колонне 1, состоящей из электронной пушки, секций ускорительной трубки и системы отклонения (рис. 1.16). Далее устанавливается система конденсорных линз 2, с помощью которой получают электронный пучок с минимальным углом расхождением. Комплекс, состоящий из электронной колонны и системы конденсорных линз, позволяет получать электронные пучки различного диаметра. Под конденсорами расположена объективная линза, а сам объект устанавливается непосредственно в зазор полюсного держателя, так, что находится в предполье объективной линзы. Важным замечанием здесь является то, что толщина образца должна быть небольшой (образцы иногда называют ультратонкими), потому что при формировании изображения электроны проходят непосредственно через сам образец, а значит его толщина должна быть много меньше длины свободного пробега электронов в материале. Пройдя через конденсорные линзы, электроны попадают в объективную линзу 4, роль которой является ключевой в формировании изображения. На ней устанавливают корректор астигматизма, он же стигматор. Далее происходит формирование первичного и промежуточного изображения. Процесс формирования изображения происходит следующим образом: электронный пучок, который был сформирован осветительной системой падает на объект и рассеивается, а рассеянная волна преобразуется объективной линзой в изображение, которое потом увеличивается за счет промежуточных линз и проецируется проекционной линзой на экран наблюдения или на экран монитора. Стоит отметить, что на микроскопы возможна установка специального детектора, который позволяет производить фазовый анализ образца [51].

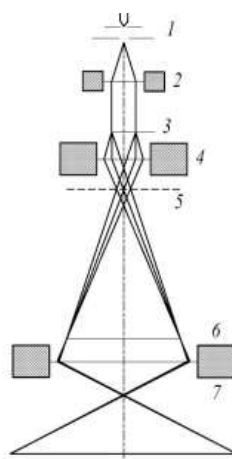


Рисунок 1.16 – Схематичное изображение просвечивающего электронного микроскопа: 1 – катод, 2 – двухступенчатая электромагнитная линза (конденсор), 3 – исследуемый объект, 4 – объективная линза, 5 – первичное изображение, 6 – промежуточное изображение, 7 – проекционная линза [51]

Известны работы, где метод ТЕМ применялся в качестве контрольного для изучения клеток *E.coli* (рис. 1.8 и 1.10). В работе ТЕМ использовался для изучения размеров и формы [54] после воздействия H_2O_2 на клетки *E.coli* O157:H7 (рис 1.17 а). В работе [55] методом ТЕМ исследовались клетки *E.coli* ATCC25922, а именно повышение проницаемости мембран клеток за счет воздействия нового пептида LL-1, (рис.1.17 б).

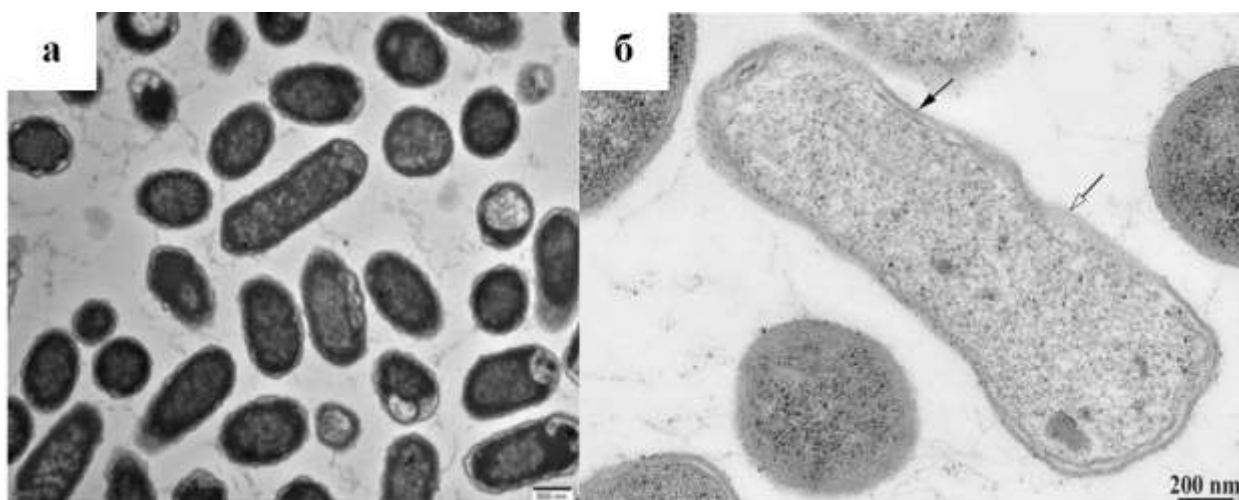


Рис. 1.17 – ТЕМ изображение: а) клеток *E.coli* O157:H7 [54]; б) клеток *E.coli* ATCC25922 [55]

Методом ТЕМ также исследовались и молекулы ферритинов. В работе [56] методом ТЕМ изучались молекулы нативного ферритина. На изображении 1.18 (а) представлен нативный ферритин селезенки лошади, а именно неорганические наночастицы содержащие атомы железа [56].

Также, одним из видов просвечивающей электронной микроскопии является криоэлектронная микроскопия (Cryo-EM). Данный вид микроскопии позволяет, например, визуализировать трехмерную структуру биологических макромолекул. Примером таких молекул являются различные белки, нуклеиновые кислоты. Криоэлектронная микроскопия дает возможность производить исследования и получать изображения образцов биологического происхождения в почти нативном, естественном состоянии, за счет практически мгновенного перевода в условия низких температур. Однако, как правило при необходимости окрашивания или фиксации, что производится для улучшения качества изображений, путем придания им большей контрастности (четкости). Принцип работы и формирования изображения в данном методе являются идентичными методу ТЕМ. Различия здесь состоят лишь в пробоподготовке, поскольку при исследовании биологических объектов в Cryo-EM применяется метод тонкой пленки, в рамках которого исследуемая проба подвергается практически мгновенной заморозке в жидком этане [57]. Отметим, что при использовании контрастных агентов возможны и нарушения в их структуре, что может привести к менее четкому изображению. В работе [58] методом cryo-EM изучались молекулы рекомбинантного гетерополимерного ферритина человека (рис. 1.18, б). На изображении отчетливо видна оболочка молекул и небольшие накопления атомов железа во внутренних полостях отдельно взятых молекул.

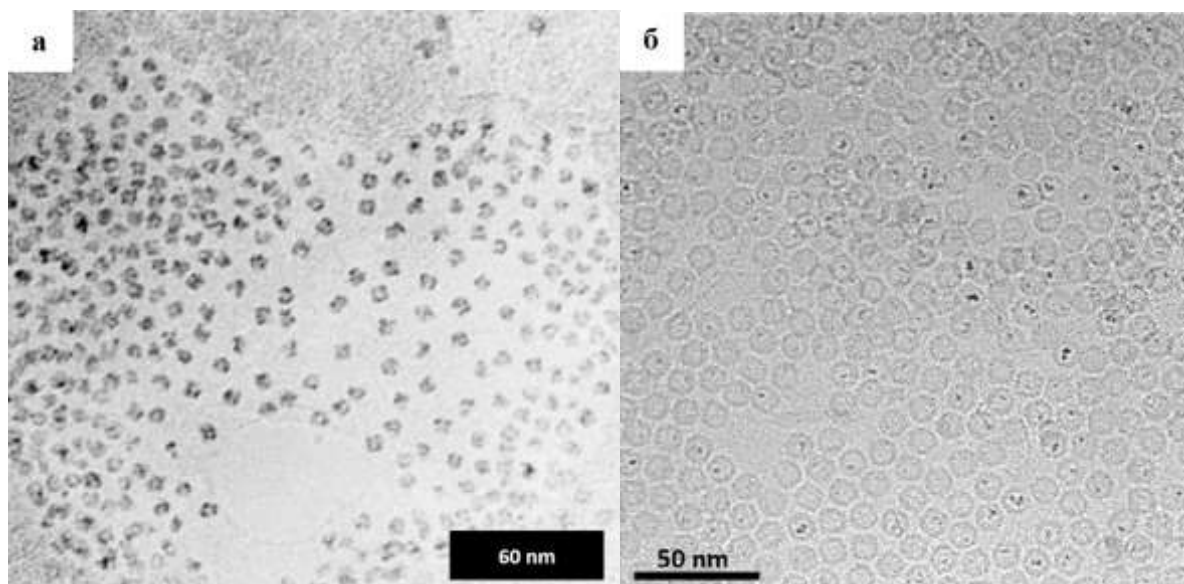


Рис. 1.18 – Изображения: а) ТЕМ изображение молекул нативного ферритина селезенки лошади [56]; б) Cryo-EM изображение молекул рекомбинантного гетерополимерного ферритина человека [58]

Таким образом, просвечивающая электронная микроскопия и криоэлектронная микроскопия могут быть использованы для установления морфологических, макроструктурных и размерных особенностей молекулярной культуры белка Dps что важно для эффективного практического применения данных структур.

1.4.3 Сканирующая электронная микроскопия

Одной из важнейших характеристик исследуемых образцов являются их морфологические особенности. Наиболее удобным методом для получения такой информации является метод сканирующей электронной микроскопии SEM, поскольку позволяет получить не только визуальное представление об образцах, их форме и размерах, но также выступить и в качестве контрольного метода измерений в случае проведения многоэтапного эксперимента с применением различных методов для получения наиболее ясного представления об изменениях, происходящих в образце. В том числе, данный метод подходит и для изучения свойств поверхности различного рода

биогибридных объектов, представителями которых являются молекулы белка Dps, а также их источник – клеточная культура *E.coli*. Данный метод является одним из более информативных, поскольку позволяет получить непосредственную визуализацию исследуемых образцов в реальном времени проводимого многоэтапного эксперимента, поэтому применение его в данной работе вполне обосновано.

Принципиальная схема устройства сканирующего электронного микроскопа представлена на рисунке 1.19. Устройство микроскопа включает в себя источник электронов, оптическую систему для фокусировки электронов и сканирования (электронную колонну), камеру с образцом и детекторы для регистрации сигнала, а также систему откачки, необходимую для создания необходимого вакуума в микроскопе. Важным условием, которое также входит и в принцип работы данного микроскопа – наличие вакуума в колонне, электронной пушке и камере микроскопа [59].



Рисунок 1.19 – Принципиальная схема устройства сканирующего электронного микроскопа

В качестве зонда в данном микроскопе выступает сфокусированный пучок электронов, который взаимодействует с исследуемым образцом, образуя не только прошедшее рассеянное излучение, но и иные виды излучения, которые считаются наиболее информативными: вторичные электроны, отраженные электроны, характеристическое рентгеновское

излучение [60]. Регистрация этих излучений происходит специальными детекторами, находящимися в камере микроскопа.

В основе принципиального функционирования микроскопа лежит использование некоторых эффектов, которые происходят при взаимодействии и облучении поверхности объекта сфокусированным пучком электронов. В результате взаимодействия электронов с образцом или веществом происходит процессы генерации различных сигналов, как показано на рисунке 1.20. Как было отмечено ранее, основными и наиболее информативными являются: поток отраженных электронов, дающий информацию об особенностях морфологии и составе образца; поток вторичных электронов, несущих информацию о рельефной составляющей поверхности; поток Оже-электронов, поглощенных и прошедших через образец электронов. Также среди детектируемых сигналов выделяют: рентгеновское излучение, позволяющее определить элементный состав образца при анализе получаемого спектра, катодную люминесцентное излучение. В процессе формирования изображения исследуемой поверхности образца участвуют вторичные, отраженные и поглощенные электроны. Оставшиеся излучения служат источниками дополнительной информации [61, 62].

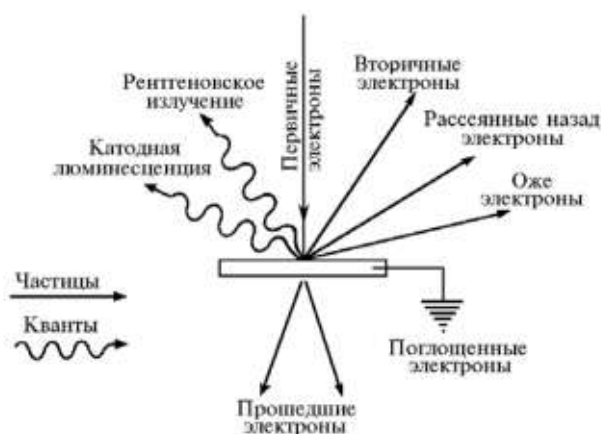


Рисунок 1.20 – Схема образования вторичных сигналов при взаимодействии электронного пучка с мишенью (образцом)

Процесс формирования изображения является простым и описывается следующим образом: поток электронов, сформированный осветителем, фокусируется на поверхности образца с помощью блока электронных линз, образуя пятно – электронный зонд. Затем формируется растр в ходе движения электронного зонда по поверхности, а в результате происходящего взаимодействия электронного пучка с поверхностью образца образуется излучение, которое в дальнейшем при помощи детекторов преобразуется в электрический сигнал. Этот сигнал поступает на управляющий катод электронно-лучевой трубки. Отклонение луча, испускаемого электронно-лучевой трубкой, происходит синхронно с движением электронного зонда по поверхности образца, что позволяет наблюдать на экране увеличенное изображение поверхности исследуемого объекта [60, 63].

При рассмотрении данного метода всегда стоит учитывать и важнейшую характеристику – разрешающую способность. В случае данного метода, среди факторов, влияющих на данную характеристику, можно выделить следующие: 1 - площадь сечения или диаметр зонда, 2 - контраст, создаваемым образцом и детекторная система, 3 - областью генерации сигнала в образце. Диаметр зонда является по своей природе конструктивной особенностью конкретного микроскопа и зависит от особенностей его устройства, качества составляющих компонентов, и прежде всего – его электронной оптики. Говоря о современных сканирующих электронных микроскопах, их качество и устройство находится на высочайшем уровне, что в свою очередь позволяет достичь таких значений диаметра зонда, как 5 – 10 нм. Контраст также вносит значительный вклад в разрешающую способность микроскопа. Формирование контраста в SEM определяется разностью детектируемых сигналов от соседних участков образца, чем она больше, тем выше контраст изображения. В свою очередь, контраст как характеристика зависит от следующих факторов: топографии поверхности, химического состава объекта, поверхностных локальных магнитных и электрических полей, кристаллографической ориентации элементов структуры [61, 62].

Данный метод является эффективным и для анализа различных биологических объектов, в том числе клеточной культуры *Escherichia coli* (рис. 1.21). Известны работы [64, 65] в которых метод SEM успешно применялся для визуализации и контроля проводимых исследований клеток *E.coli* различных штаммов. Как пример, в работе [65] SEM использовался, как контрольный для изучения ультразвуковых воздействий на массивы клеток *E.coli* O157:H7 (рис. 1.21 б). В работе [64] SEM применялся как контрольный для изучения воздействий H_2O_2 на клетки *E.coli* K-12, (рис.1.21 а).

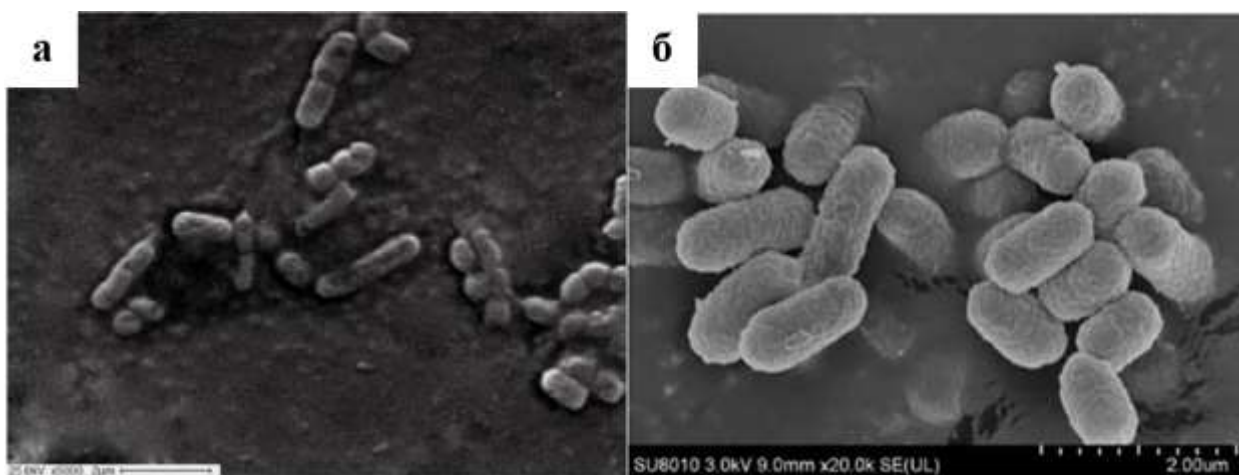


Рисунок 1.21 – SEM изображение: а) клеток *Escherichia coli* K-12[64]; б) клеток *Escherichia coli* O157:H7 [65]

Отметим, что принцип действия данного микроскопа является очень простым, вкратце: электроны, испускаемые катодом, фокусируются магнитными линзами в пучок, диаметром ~ 10 нм. В отличие от TEM, в SEM ускоряющее напряжение составляет десятки кВ, а именно в диапазоне от 1 до 50 кВ. Увеличение микроскопа может регулироваться за счет изменения силы тока в электромагнитных линзах.

1.4.4 Рентгеновская фотоэлектронная спектроскопия

Метод фотоэлектронной спектроскопии является достаточно известным и широко применяемым методом для изучения физико-химического состояния поверхности и элементного состава различного рода объектов и

представляет собой комплекс подходов по изучению зарядового состояния атомов вещества, основанный на измерении энергетических спектров электронов, вылетающих в результате фотоионизации атомов в составе молекул или твердых тел.

Под физическими основами метода рентгеновской фотоэлектронной спектроскопии, в международной литературе XPS – X-ray Photoelectron Spectroscopy понимается перевод связанного электрона из валентной зоны или основного (глубокого) уровня в свободное состояние с помощью возбуждающих моноэнергетических фотонов электромагнитного излучения рентгеновского диапазона [66]. Отметим, что значения энергий связи электронов в атомах твердого тела так же являются широко известными и различными для всех химических элементов в составе различных соединений [67]. Данные факты позволяют успешно проводить измерения и определять химический состав поверхности изучаемого образца.

Уравнение энергетического баланса при поглощении рентгеновских фотонов с энергией $h\nu$:

$$h\nu = E_{\text{св}} + E_{\text{кин}} + A_{\text{вых}}, [68] \quad (1.1)$$

где $h\nu$ – энергия падающих на поверхность образца фотонов; $E_{\text{кин}}$ – кинетическая энергия электрона, вылетающего из образца; $E_{\text{св}}$ – энергия связи электрона внутри атома; $A_{\text{вых}}$ – работа выхода.

Энергия связи, она же энергия ионизации, является важнейшей и неотъемлемой характеристикой химической связи непосредственно в самом соединении. Обладая информацией о значении энергии $h\nu$, а также кинетической энергии электрона $E_{\text{кин}}$, возможно произвести расчет и получить значение энергии связи $E_{\text{св}}$. Известно, что каждому химическому элементу соответствует свой определенный специфический набор значений энергии связи $E_{\text{св}}$ для внутренних электронов, а зная эти данные можно получить информацию об составе изучаемого образца [68, 69]. Однако стоит помнить, что при изучении твердых тел значения энергии связи берутся по отношению

к уровню Ферми. В ходе термодинамического равновесия происходит выравнивание уровней Ферми образца и спектрометра, что позволяет определить энергию связи по отношению к общему уровню Ферми. Процесс рентгеновской фотоионизации схематически представлен на рисунке 1.22.

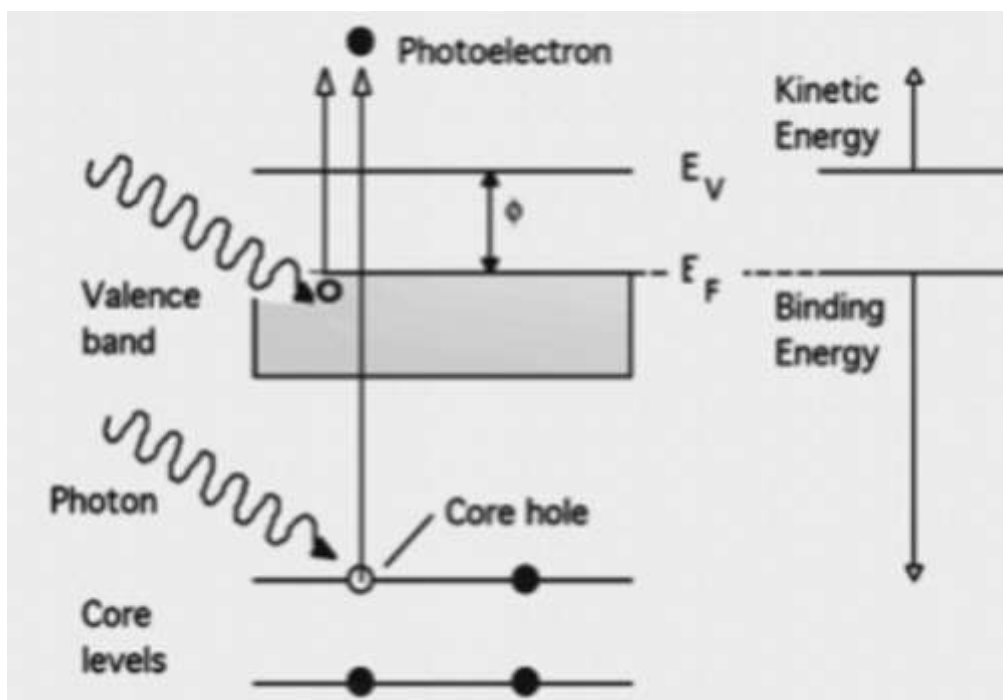


Рисунок 1.22 – Схематическое представление процесса рентгеновской фотоионизации [70]

В качестве итога можно выделить удобство метода рентгеновской фотоэлектронной спектроскопии, как метода поверхностного анализа, позволяющего определять элементный состав и химические связи поверхности материала. Появление отдельных пиков фотоэлектронного спектра обусловлено электронами с различными энергиями связи [68]. Использование этого явления для проведения анализа физико-химического состояния облучаемой поверхности также называется электронной спектроскопией для химического анализа. В рамках проведения такого анализа на лабораторных электронных спектрометрах, рентгеновский пучок возбуждается путем облучения электронами низких энергий анода из алюминия или магния (рис. 1.23). В этом случае значения энергий вторичных

электронов от образца, которые возбуждаются с помощью рентгеновского характеристического Mg K α - или Al K α - излучения анодов рентгеновских трубок, являются низкими, а глубина проникновения вторичных электронов в исследуемое вещество составляет менее 3-5 нм. Это обстоятельство позволяет произвести анализ химического состава тонкого приповерхностного слоя, глубина которого составляет всего несколько атомных слоев. Для исследования профилей распределения примесей по глубине осуществляется ионное распыление (травление) поверхностных слоев образца. Разрешение по площади (в плоскости) является очень низким, по причине того, что диаметр первичного рентгеновского пучка составляет $\sim 1-2$ мм [70] или менее. Если же в роли источника рентгеновского излучения используется синхротронное излучение, то разрешение пиков спектров может составить менее $\sim 0,1$ эВ. В силу того, что различные типы химической связи часто обуславливают сдвиги энергии связи на большие величины, то эти сдвиги можно детектировать в целях идентификации характера связи через наблюдение «впрямую» зарядовых состояний возбуждаемых сортов атомов из которых «составлен» изучаемый материал.

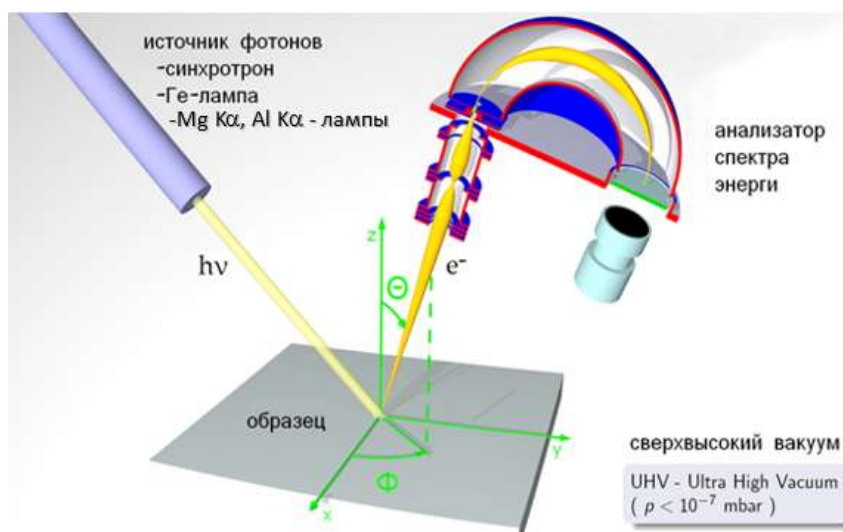


Рисунок 1.23 – Общая схема получения XPS -данных

Таким образом отметим:

- Метод рентгеновской фотоэлектронной спектроскопии является удобным инструментом для изучения поверхностных слоев различных материалов, в том числе материалов, обладающих развитой поверхностью. К таким материалам можно отнести и различные биологические образцы, которыми и являются молекулы Dps, клеточная культура *Escherichia coli*, биогибридные объекты на их основе.

- Применение метода рентгеновской фотоэлектронной спектроскопии для изучения клеточной культуры *Escherichia coli* позволит получить информацию о поверхностных свойствах клеток, атомном строении и физико-химическом состоянии клеточной мембраны с большой точностью. Полученные результаты дадут перспективы для получения новых гибридных наноструктур, ярким примером которых являются молекулы белка Dps.

Следует также отметить, что возможности метода значительно расширяются в случае использования ионного травления – профилирования с применением ионного пучка. Данный подход позволяет провести исследование более глубоких слоев материала, поскольку с применением профилирования удаляется часть слоев материала с поверхности. Данный подход хоть и является разрушающим, но в то же время позволяет получить более широкий набор экспериментальных данных.

Метод XPS успешно применяется для исследования атомного строения различных материалов, в том числе перспективных новых материалов и наноструктур, к которым относятся и биологические объекты, получаемые из кишечной палочки [71, 72]. Как правило возможности метода XPS используются авторами для регистрации сигнала легких атомов, составляющих биологическую часть биогибридных структур. В работе [71] метод XPS применен в современной установке, позволяющей изучать био-объекты при давлениях близких к атмосферному, что использовалось для изучения кишечной палочки *E.coli* K-12. На рис. 1.24 приведены спектры 1s состояний кислорода при различных давлениях, показавшие в целом динамику

изменения состояния поверхности изученных бактерий при вариации остаточного давления в аналитической камере.

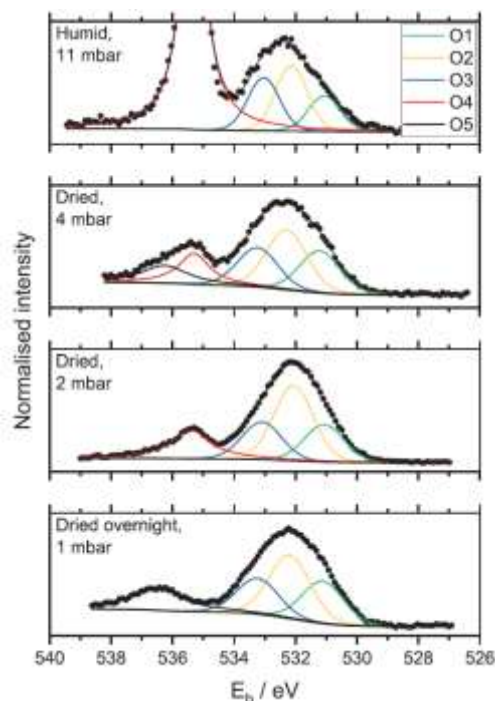


Рис. 1.24 – XPS спектры кислорода бактерий кишечной палочки K-12 при различных режимах регистрации и давлениях, близких к атмосферному [71]

Заметны изменения в состоянии кислорода (рис. 1.24), а также изученных в работе состояний углерода и азота. Тем не менее можно отметить, что условия сверхвысокого вакуума позволяют получить более стабильные результаты [72]. В данной работе изучались биогибридные структуры с неорганическими каталитическими комплексами на основе меди и титана с клетками *E.coli*. Помимо данных атомов биологической «части», углерода C1s и кислорода O1s, авторы [72] рассматривают и состояния 2p титана и меди (рис. 1.25), идентифицируя атомное строение изучаемых объектов и его специфику.

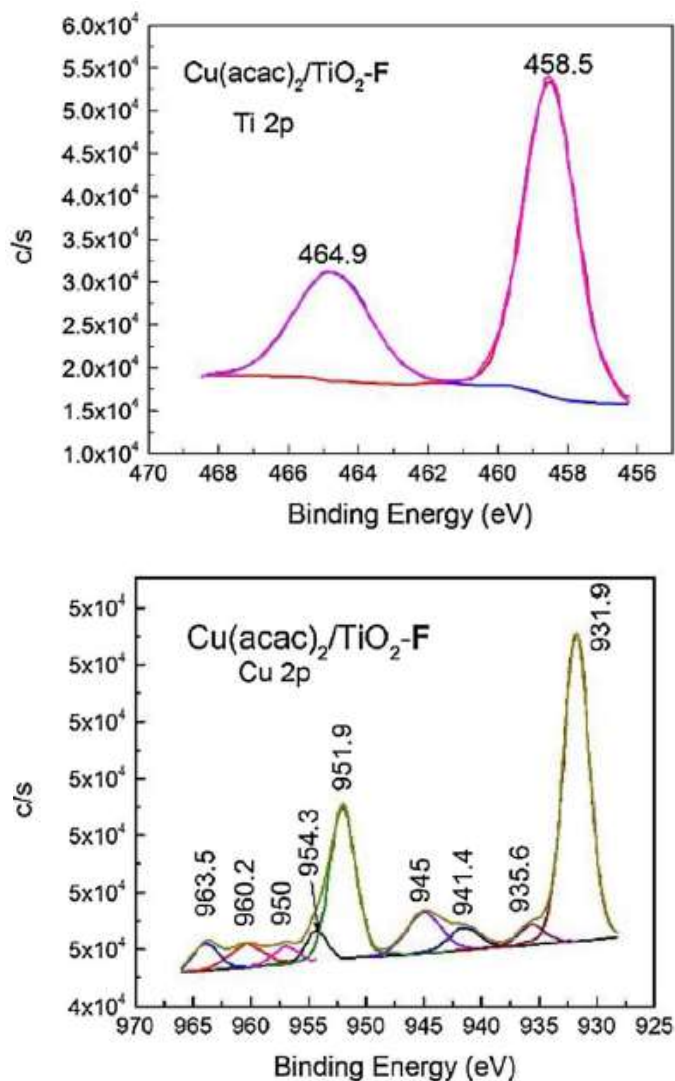


Рис. 1.25 – XPS атомов титана и меди (2p состояния) для биогибридных материалов на основе *E.coli* и неорганическими каталитическими комплексами на основе меди и титана [72]

В то же время и состояния атомов железа в биогибридных материалах могут быть изучены методом XPS. В работе [73] для грамположительных и грамотрицательных бактерий (*Bacillus subtilis* и *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas fluorescens* и *Escherichia coli*), подвергнутых обработке частицами (nZVI), содержащими атомы железа в различном состоянии, успешно применен метод XPS (рис. 1.26).

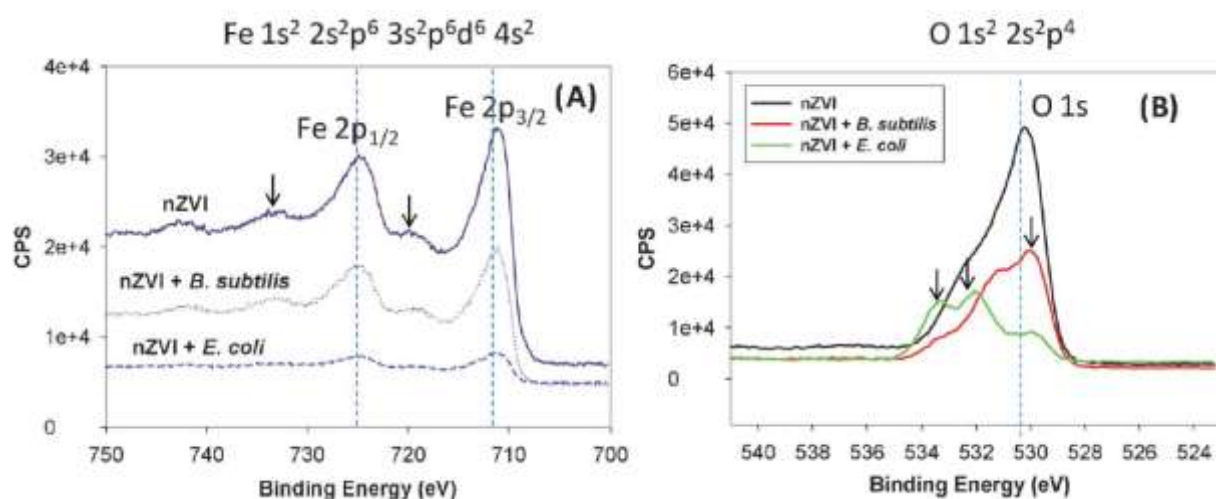


Рис.1.26 – XPS спектры железа (А) и кислорода (В) для поверхности частиц nZVI содержащими атомы железа до и после взаимодействия с бактериями *Bacillus subtilis* и *E.coli* [73]

Показано, что при взаимодействии с бактериями на поверхности подготовленных образцов присутствуют оксиды железа Fe₃O₄ и Fe₂O₃ [73].

В завершении отметим, что для биогибридных материалов на основе молекул бактериоферритина Dps с наночастицами на основе атомов железа исследования методом фотоэлектронной спектроскопии с целью установления атомного строения неорганических наночастиц биогибридных материалов нам не известны, в то же время указанный метод позволяет получить важную информацию об атомном строении таких объектов.

1.4.5 Теоретические основы синхротронной рентгеновской спектроскопии XANES

Для изучения атомной локальной структуры идеальных кристаллов зачастую используют традиционные методы структурного анализа, ввиду их высокой информативности. Однако данные методы обладают значительным недостатком. Этим недостатком является практическая невозможность исследования атомной структуры дефектов в кристаллах или же атомной структуры лишь частично упорядоченных систем, знание свойств которых является достаточно значимой и важной информацией. Для решения задач

такого рода был разработан уникальный, принципиально новый метод анализа ближнего порядка в окружении атомов данного сорта. Этот метод получил название XAFS-спектроскопии (X-ray Absorption Fine Structure – тонкая структура спектров поглощения рентгеновских лучей), а в основу данного метода легло изучение тонкой структуры, наблюдаемой в рентгеновских спектрах поглощения твердых тел или молекул [74]. Данный метод, а именно XAFS содержит информацию о нескольких участках спектра вблизи края поглощения, а именно: XANES (X-ray Absorption Near Edge Spectroscopy – ближняя (околопороговая) тонкая структура края рентгеновского спектра поглощения), в интервале от 0 до 50 эВ вблизи края поглощения, и EXAFS (extended X-ray absorption near edge structure — протяженная тонкая структура рентгеновского спектра поглощения), простирающуюся на сотни эВ выше края поглощения [75].

Описание распределения плотности незанятых электронных состояний в зоне проводимости содержится в рентгеновских спектрах поглощения [76], а именно в спектрах XANES. В настоящей работе сведения о распределении состояний в зоне проводимости получены на основе спектральной зависимости квантового выхода (КВ) внешнего фотоэффекта рентгеновских лучей $\chi(\lambda)$, так как $\chi(\lambda)$ пропорционален коэффициенту поглощения $\mu(\lambda)$, во всяком случае, вблизи краев поглощения [77, 78]. Далее в работе будет применяться обозначение XANES при упоминании спектров квантового выхода рентгеновского фотоэффекта в области края поглощения, поскольку оно принято в международной литературе и практике.

Спектр поглощения вблизи края содержит информацию о плотности состояний в зоне проводимости [77]:

$$\mu(E) \sim \sum_k |M_{kc}|^2 \delta(E - E_k) \quad (1.2)$$

где $M_{kc} = \int \psi_k^* H' \psi_c d\tau$ - матричный элемент вероятности перехода электрона с основного уровня с волновой функцией ψ_i и собственным

значением E_i в зону проводимости с волновой функцией ψ_c и собственным значением E_c [77].

Можно сделать вывод о пропорциональности $\chi(\lambda)$ величине $\mu(\lambda)$, что следует из последующих соображений. Поскольку интенсивность, которая поглощается в каждом микрообъеме фотокатода и приводит к появлению подвижных электронов в этом микрообъеме, то энергию процесса выхода электрона из микрообъема фотокатода, обозначаемую E_{LVV} можно выразить следующим образом:

$$E_{LVV} = E_L - E_{V1} - E_{V2}, \quad (1.3)$$

где E_L – энергия основного L-уровня, E_{V1} – энергия перехода электрона из валентной полосы на вакансию L-уровня, E_{V2} – энергия выброса электрона из валентной полосы.

Допустим, что E – это энергия, которая приходится в среднем на один подвижный электрон. Тогда в случае, когда толщина слоя фотокатода будет dx , то на глубине x возникает $dn = dE/E$ подвижных электронов, где dE – поглощаемая в этом слое энергия. В случае падения рентгеновского пучка под неким углом θ на поверхность фотокатода, что изображено на рисунке 1.27, в слое dx каждую секунду будет возникать

$$dn = \frac{J_0[1-R(\theta)]}{E} \exp\left[-\frac{\mu}{\sin \theta} x\right] \frac{\mu}{\sin \theta} dx \quad (1.4)$$

электронов, где J_0 – интенсивность падающего пучка, μ – линейный коэффициент ослабления пучка в веществе фотокатода, $R(\theta)$ – коэффициент отражения от внешней границы фотокатода, который при самых маленьких значениях угла θ становится отличным от нуля и стремится к единице при дальнейшем уменьшении θ что характерно для полного внутреннего отражения [78].

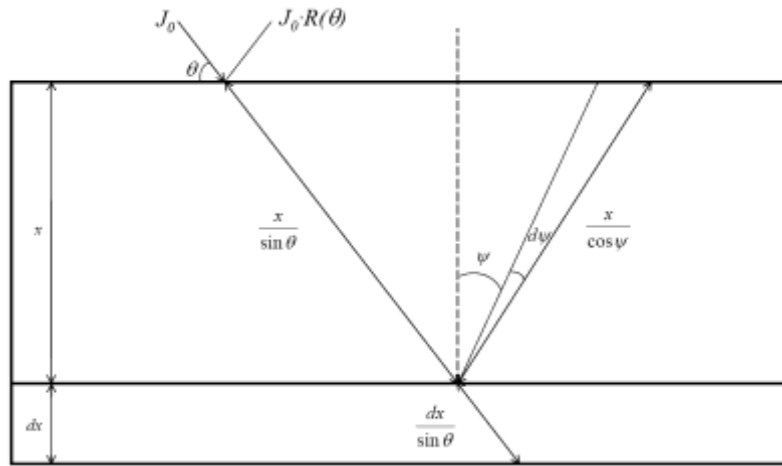


Рисунок 1.27 – Схема падения луча на поверхность фотокатода [78]

В то же время те электроны, которые возникают в слое dx , будут более или менее равномерно распределены по углам, следовательно, говоря о части электронов, которые будут вылетать из слоя в направлениях, составляющих с нормалью к границе фотокатода углы от ψ до $\psi + d\psi$, будет равна:

$$d^2n = \frac{J_0[1 - R(\theta)]}{E} \exp\left[-\frac{\mu}{\sin \theta} x\right] \frac{\mu}{\sin \theta} \sin \psi d\psi dx \quad (1.5)$$

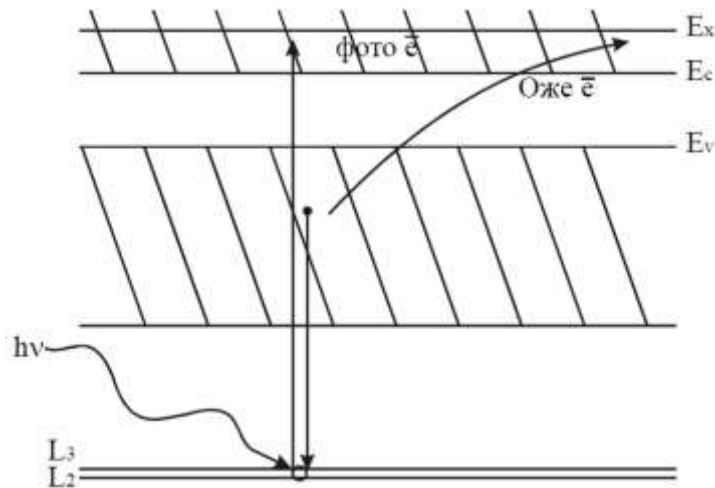


Рисунок 1.28 – Схематическое изображение процессов, приводящих к появлению квантового выхода. Схема приводится относительно дублетного основного $L_{2,3}$ уровня (2p электронные состояния)

Если считать, что энергия подвижных электронов значительно больше работы выхода, то для определения величины эмиссии нужно умножить выражение для d^2n на $\exp\left(-\frac{\alpha}{\cos\theta}x\right)$, где α - линейный коэффициент ослабления электронного потока, и проинтегрировать по ψ от 0 до $\pi/2$ и по x от 0 до ∞ . Получаем, что если обозначить число ежесекундно вылетающих электронов как n_B :

$$n_B = \frac{J_0[1-R(\theta)]}{2E} \left[1 - \frac{1}{\mu/\alpha \sin\theta}\right] \ln\left(1 + \frac{\mu}{\alpha \sin\theta}\right) \quad (1.6)$$

В силу того, что $J_0 = N_0 \frac{hc}{x}$, где N_0 - соответствует числу ежесекундно влетающих квантов, в то время как квантовый выход $\chi = \frac{n_B}{N_0}$, то, следовательно, получаем, что квантовый выход будет соответствовать отношению числа ежесекундно вылетающих электронов к числу ежесекундно падающих квантов [78].

В следствие чего для χ получаем:

$$\chi = \frac{[1-R(\theta)]hc}{2E\lambda} \left[1 - \frac{1}{\mu/\alpha \sin\theta}\right] \ln\left(1 + \frac{\mu}{\alpha \sin\theta}\right) \quad (1.7)$$

Далее применим известные литературные данные для $\alpha=10^6 \text{ см}^{-1}$ и $\mu=10^4 \text{ см}^{-1}$, что позволит формулу (2) значительно упростить. А разложив $\ln\left(1 + \frac{\mu}{\alpha \sin\theta}\right)$ в ряд и учтя только первое приближение, получим следующее:

$$\chi = \frac{[1-R(\theta)]hc}{4E\lambda} \frac{\mu}{\sin\theta} \quad (1.8)$$

Получив финальное соотношение, мы приходим к двум достаточно существенным результатам. В первом случае следует, что квантовый выход различен для различных углов и для не очень малых углов, пока не развилось явление полного внутреннего отражения ($R(\theta)=0$), угловая зависимость

квантового выхода определяется как $\cos\theta$. Во-вторых, если α и E считать независимым от λ , то спектральный ход квантового выхода задаётся изменением величины $\mu(\lambda)$ вдоль спектра [78]. Для θ порядка $15^\circ - 20^\circ$ с достаточной точностью можно считать, что $\chi \sim \mu$. С длинноволновой стороны от края поглощения квантовый выход определяется выходом фотоэлектронов, а коротковолновой – выходом оже-электронов.

Делая вывод после вышеизложенного, можно сказать, что исследовать фотоэлектрический спектр также важно, поскольку в данном случае он несет такую же информацию, как и спектр поглощения. Подход к изучению спектров поглощения в таком ключе существенно освобождает экспериментатора от различных методических трудностей, а именно – подготовки образца в виде тончайшего слоя, поскольку фотокатод может быть массивным и обладать не совсем совершенной рабочей поверхностью. Однако более значимым достоинством этого подхода является то, что при выборе данной методики состав и структура изучаемого вещества сохраняется. При изучении спектров XANES, в то же время, необходимо варьировать энергии налетающих квантов электромагнитного излучения с целью формирования спектра поглощения вблизи края, и без потерь в интенсивности. С этой целью, по крайней мере в ультрамягкой и мягкой области рентгеновского излучения, использование тормозного излучения (в отличие от характеристического) рентгеновских трубок неэффективно в силу малой интенсивности, и лишь использование излучения соответствующих энергий синхротронных источников позволит зарегистрировать тонкую структуру спектров XANES.

В существующей литературе применение методов спектроскопии поглощения, а особенно сверхвысоковакуумного метода XANES в ультрамягкой части рентгеновского (синхротронного) излучения известно лишь в отдельных случаях. Отчасти это связано со сложностью подготавливаемого эксперимента, условиями сверхвысокого вакуума и иными, а также ограниченным количеством синхротронных источников излучения, на которых подобные эксперименты возможно провести. Однако

приведем работу [79] в которой изучены данные спектроскопии поглощения в области К-края железа (энергии ~ 7100 эВ) для бактерий *E.coli* и *P.shermanii*, содержащих атомы железа (рис. 1.29).

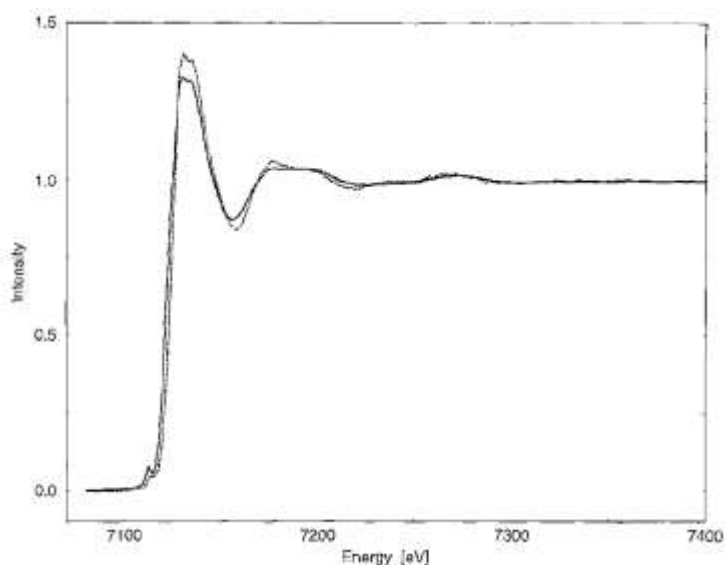


Рис. 1.29 – Нормализованный сигнал рентгеновского поглощения для бактерий *E.coli* и *P.shermanii* содержащих атомы железа [79]

Авторы [79] изучают структуру лигандов, содержащих атомы железа в использованных для экспериментов бактериях и их активных центрах, отмечая, однако, недостаточность в разрешении зарегистрированных спектральных данных для однозначной интерпретации вклада каждого из компонентов изученной структуры активных центров, содержащих атомы железа.

В работе [80] методом XANES изучены рентгеноспектральные характеристики взаимодействия ионов серебра с тремя видами бактерий, включая *E.coli* (рис. 1.30).

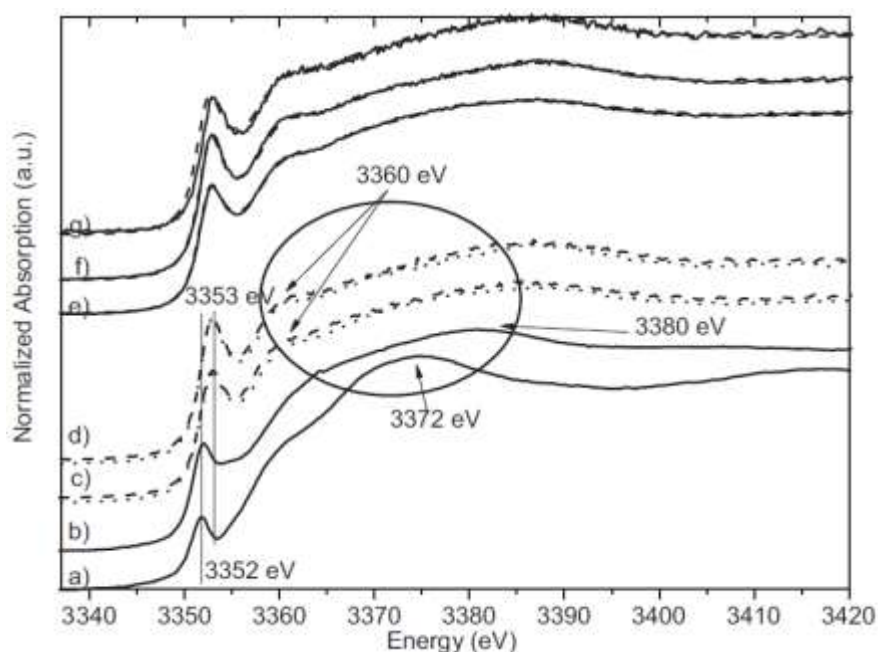


Рисунок 1.30 – XANES L_3 серебра для различных серебро-содержащих соединений и структур: а – раствор ацетата серебра, б - раствор нитрата серебра, с – *E.coli* обработанные нитратом (точки) и ацетатом (черточки) серебра, d – *S.aureus* обработанные нитратом (точки) и ацетатом (черточки) серебра, e,f,g результаты моделирования данных [80]

Показана, с применением метода XANES, вновь в жесткой области рентгеновского (синхротронного) излучения ~ 3300 эВ, по характерной тонкой структуре спектров поглощения и ее моделированию, антибактериальная активность и основы механизмов ее проявления в изученных биогибридных структурах [80].

Приведенные выше работы иллюстрируют информативные возможности метода XANES для биогибридных объектов, однако, на настоящий момент опубликованных результатов исследований, содержащих данные XANES для биогибридных материалов на основе молекул бактериоферритина Dps с наночастицами на основе атомов железа не известно. В том числе в ультрамягкой области рентгеновского (синхротронного) излучения для исследований особенностей электронного спектра поверхности указанных биогибридных материалов.

1.4.6 Фотоэмиссионная электронная микроскопия

Известно, что применение различных методов исследования материалов, как правило, тесно связано с применением микроскопических подходов, однако эти исследования разнообразны и зачастую проводятся независимо друг от друга, что в свою очередь приносит немало трудностей в работу. Отметить стоит и тот факт, что в ходе рентгеноэлектронных экспериментов, регистрация самих спектров происходит с незначительных по размерам площадей, максимальный размер которых может составить сотни микрометров, несмотря на чувствительность к локальному атомному окружению [81]. Истинное микроскопическое изучение образца, с точки зрения получения информации о морфологии малых объектов в рамках исследования и данных об их физико-химическом состоянии, атомной и электронной структуре в определенной точке, малом участке площади поверхности, реализуется спектроскопическими методами [82, 83]. К такого рода методам относят фотоэмиссионную электронную микроскопию (РЕЕМ — PhotoEmission Electron Microscopy). Хотя этот метод является достаточным новым, известны примеры, когда применение метода РЕЕМ позволило получить лучшие данные, была показана эффективность данного метода для комплексного изучения морфологических особенностей поверхности, специфики атомного и электронного строения, состава и иных особенностей различных объектов микронных, субмикронных и нанометровых размеров в ходе проведения одного, единого эксперимента [83-86].

В основе принципа действия лежит регистрация изображений, получаемых с помощью фокусировки пучка вылетающих фотоэлектронов, формируемых в процессе поглощения квантов возбуждающего рентгеновского излучения участком малых размеров поверхности образца, например, в процессе сканирования по энергии налетающих квантов [87]. Но важным замечанием, а также и достоинством данного метода, является то, что в отличие от сканирующей электронной микроскопии в методе РЕЕМ изображения области поверхности получают в режиме реального времени [88]

и в заданном энергетическом диапазоне, что обеспечивает химическую селективность.

Получение изображения высокого разрешения может происходить при использовании фотонов ультрафиолетового диапазона, как возбуждающего излучения (UV-PEEM). При таком подходе возможно получать изображения исследуемого образца с пространственным разрешением до 10 нм [89]. При использовании синхротронного излучения, когда возможно варьировать энергию квантов излучения (длину волны) без потерь в его высокой интенсивности, в методе PEEM возможно дополнительно изучить состав (X-PEEM) [89], давая при этом возможность работать в различных режимах регистрации данных (фотоэлектронные спектры, спектры рентгеновского поглощения), при этом все же оставаясь микроскопическим методом [90, 91]. Получение удовлетворительного сигнала с высоким пространственным разрешением представляется возможным благодаря высокой яркости используемого синхротронного излучения [48]. На рисунке 1.31 представлена принципиальная схема одного из фотоэмиссионных электронных микроскопов на синхротроне BESSY II в Берлине.



Рисунок 1.31 – Конструкция микроскопа PEEM и его основные элементы

Ускорение излученных атомами изучаемого образца электронов до кинетической энергии около 20 кэВ происходит в направлении микроскопа под воздействием сильного электрического поля между образцом и первым электродом электронной оптической системы (линзами объектива), а затем происходит их последовательное прохождение через промежуточные и проекционные линзы. Итогом является формирование увеличенного изображения на детекторе (шеvronная мультисканальная пластина и люминесцентный экран), преобразующем электроны в видимое излучение, которое затем фиксируется ПЗС-матрицей. Также, используя отражатели, электронный пучок можно направить на один из детекторов спина [92].

Формирование контраста различными механизмами происходит в зависимости от самого исследуемого образца и непосредственно энергии падающего излучения. Пространственное варьирование микроскопической работы выхода приводит к появлению контраста работы выхода. Несмотря на слабость контраста в случае облучения рентгеновским излучением, его роль является достаточно большой. Другой вид контраста, морфологический, является результатом наличия неоднородностей поверхности образца. Имеющиеся различные неровности на изучаемой площади поверхности приводят к варьированию локального потенциала на плоскости, который в свою очередь влияет на траекторию испускаемых электронов. Данный вид контраста является вполне различимым – обычно царапины и другие детали четко видны на изображении. Существуют и другие дополнительные контрастные механизмы, которые могут быть получены с помощью использования источников синхротронного излучения благодаря сильной зависимости сечения рентгеновского поглощения от энергии возбуждения. К примеру, сильный элементный контраст проявляется в случае, когда энергия фотонов близка к краю поглощения рассматриваемого элемента. Области поверхности, содержащие соответствующий элемент, при данной энергии будут излучать больше фотоэлектронов и, соответственно, будут выглядеть

более яркими на РЕЕМ изображении, возможно изучение и магнитных характеристик [92].

Излучение рентгеновского диапазона (X-РЕЕМ) позволяет исследовать образец посредством получения спектров XANES путем регистрации полного потока фотоэлектронов от образца, как функции от энергии падающих фотонов. С помощью данной методики, возможно достичь пространственного разрешения до 20 нм [93]. В реальных условиях, фиксирование изображений образца происходят для каждого значения налетающих фотонов, для того чтобы в последствии произвести запись в единый стек данных. Спектры XANES могут быть получены с помощью обработки записанной серии изображений, как непосредственно во время, так и после проведения эксперимента. Причем это возможно сделать на любом компьютере, обладающем соответствующем программным обеспечением [94]. Важным замечанием является и тот факт, что такого рода спектры можно получить от каждого пикселя РЕЕМ изображения, но с уменьшением размеров области экстрагирования спектра существенным образом растет вклад шума из-за недостаточно сильного сигнала от образца.

Было доказано экспериментальным путем, что метод РЕЕМ может эффективно применяться к широкому спектру различных материалов. Важными ограничениями является совместимость этих материалов с сверхвысоким вакуумом, высокими напряжениями и интенсивностями возбуждающих излучений. В качестве примера образцов, над которыми были проведены такие исследования можно отметить: магнитные запоминающие устройства [95], трибологические поверхности [93], живые клетки (что является особенно важным в наших исследованиях) и отдельные виды тканей [96, 97]. Область применения метода РЕЕМ продолжает интенсивный рост несмотря на его новизну [98, 99].

Совокупность уникальных характеристик синхротронного излучения, включающих высокую яркость и интенсивность, непрерывность спектра (без потерь в интенсивности) и т.д., даже пространственную когерентность,

обусловила его широкомасштабное применение в множестве научных, технических и технологических областей. Это химические исследования, биологические науки, генетика, физика конденсированного состояния, структурная кристаллография, геологические исследования, экологический мониторинг, материаловедение, разработки в области нанотехнологии, медицинская диагностика и различные технические науки [100]. Применение метода РЕЕМ является подтверждением этому.

На настоящий момент не известны работы, показывающие применение точечного и химически селективного метода РЕЕМ для изучения атомного и электронного строения отдельной клетки *E.coli* как источника биогибридных материалов на основе молекул бактериоферритина Dps содержащих наночастицы на основе атомов железа.

1.5 Выводы к главе 1, постановка цели диссертации.

На основе вышеизложенного представляется возможным заключить следующее. Биогибридные материалы на основе бактериоферритина Dps представляют собой новые, актуальные и перспективные объекты для разнообразных применений в широком наборе современных областей науки, техники и технологий. Способность такого класса объектов аккумулировать неорганические наночастицы с управляемыми формами и составом внутри белковых молекул природного происхождения может обеспечить универсальность в их практическом использовании для задач микроэлектроники, биомедицины и иных практических областей применения, предусматривающих использование наночастиц. В том числе при управляемой и восполняемой генерации бионаногибридных структур, их адресной доставки в рамках реализуемых технологий, например, с целью функционализации наночастицами заданных участков поверхностей.

В самом деле, молекулы белка ферритина Dps имеют фиксированный и задаваемый самой природой размер, доступный объем внутренней полый части, способный сформировать наночастицу системы железо-кислород. То

есть, в результате формирования бионаногибридной структуры возможно получить отдельную наночастицу задаваемого размера и состава, «упакованную» в органический контейнер белковой молекулы. Это может позволить получать ансамбли бионаногибридных структур, готовых к использованию на практике и исключающих агломерацию, возможную деградацию при хранении или доставке, существенные отклонения в размерах и составе, продуктивным и экономичным способом, задаваемым набором природных функций идентичных молекул белка ферритина Dps. В то же время возможные биологические формы существования клетки кишечной палочки *E.coli*, а именно в условиях суперпродукции белка ферритина Dps, фактически могут позволить использовать эти клетки как эффективные и многоразовые источники генерации бионаногибридных структур «молекула белка – неорганическая наночастица».

Широко применяемые известные способы выделения молекул белка ферритина Dps из источников млекопитающего происхождения могут рассматриваться как менее эффективные по сравнению с малоизученными на сегодня подходами к использованию одноклеточных бактерий кишечной палочки *E.coli*, как источника белковых молекул ферритина Dps и бионаногибридных структур на их основе. Более того, особенности состава, морфологии, физико-химического состояния биогибридных материалов на основе бактериоферритина Dps остаются до конца невыясненными и изучены сегодня лишь фрагментарно.

Современные, как правило, неразрушающие методы рентгеновской и электронной микроскопии и спектроскопии, в том числе использующие синхротронное излучение высокой интенсивности являются уникальным комплексом инструментов для высокоточных исследований биогибридных материалов на основе бактериоферритина Dps, на уровне молекулярных и клеточных объектов. Обоснованное сочетание методов просвечивающей и растровой электронной микроскопии совместно с рентгеновской и электронной спектроскопией высокого разрешения позволяет получить взаимодополняющий

набор новой информации о физико-химическом состоянии, составе, особенностях атомного и электронного строения, формируемых на основе бактериоферритина Dps биогибридных материалов. Важной особенностью рентгеноэлектронных спектроскопических методов исследования XANES и XPS является высокая чувствительность к специфике локального окружения атомов заданного сорта, из которых составлена развитая поверхность и доступные границы раздела наноматериалов и структур на их основе. Знания об этих фундаментальных свойствах формируют стратегию эффективного применения, определяют масштаб и возможности использования биогибридных материалов на основе бактериоферритина Dps для практики.

Наконец, отметим, что биоматериалами, рассмотренными в работе, являются молекулярные культуры белка бактериоферритина Dps (ферритинподобные молекулы белка) или бактериальные клетки кишечной палочки *E.coli*, как источник таких молекул. В то же время к биогибридным материалам в работе возможно отнести молекулы белка Dps, с неорганическими наночастицами оксидов железа во внутренней полости или клетки *E.coli* в стадии избыточного выделения молекул Dps и в условиях их насыщения оксидами железа.

Таким образом, выполненный анализ литературных данных свидетельствует об актуальности поставленной в диссертации цели: установление закономерностей атомного и электронного строения биогибридных материалов на основе наночастиц железа в молекулярных контейнерах белка бактериоферритина Dps, получаемых от бактериальных клеток кишечной палочки *E.coli* и возможности их интеграции с нитевидным кремнием.

ГЛАВА 2. БИОГИБРИДНЫЕ МАТЕРИАЛЫ БАКТЕРИОФЕРРИТИНА DPS И МЕТОДЫ ИХ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 Создание клеточных конструкций для синтеза белка Dps

Предварительно выращенные клетки *E.coli* BL21*(DE3) до оптической плотности 0,4 ($\lambda=600$ нм), отмывали буферным раствором, содержащим 0.1М Tris-HCl (pH 8.0) от остатков питательной среды и подвергали воздействию CaCl₂, согласно методике, описанной в [34] для формирования перфораций в клеточной мембране. Затем к клеточной суспензии добавляли предварительно подготовленный водный раствор кольцевых молекул плазмидной ДНК pGEM-dps (пДНК), содержащих полноразмерную копию гена Dps. Исходя из насыщающей концентрации пДНК при трансформации равной 10 мкг/мл, к клеткам добавляли по 0,5 мкл их раствора, с последующей 30-минутной инкубацией на льду, затем подвергали тепловому воздействию при 42 °С в течение 2 минут. Затем пробирки помещали в ледяную баню на 2 минуты, после чего клетки переносили в 750 мкл SOC-раствора, содержащего триптон (20 г/л), дрожжевой экстракт (5,5 г/л), NaCl (10 мМ), KCl (2,5 мМ), MnCl₂/MgSO₄ (10 мМ), глюкозу (20 мМ) и инкубировали 1 час, при 37 °С в термостате при постоянном перемешивании при 180 об/мин. После этого суспензию клеток центрифугировали, а полученный осадок объемом примерно 50 мкл высевали на чашки Петри с LB-агаром (pH 7.4), содержащим триптон (10 г/л), дрожжевой экстракт (5 г/л), NaCl (10 г/л), бакто-агар (15 г/л) и ампициллин (20 мкг/мл). Рост полученных клеток осуществляли при 37 °С в присутствии ампициллина (20 мкг/мл) на протяжении 16 часов в присутствии 0.02 мМ IPTG. Наличие рекомбинантного белка Dps оценивали с помощью электрофореза в 12.5% денатурирующем полиакриламидном геле (ПААГ) по модифицированному методу Дэвиса. Далее клетки осаждали центрифугированием при 10 000 об/мин., отмывали два раза от среды холодным буфером, содержащим 0.1М Tris-HCl (pH 8.0) и использовали для исследований или замораживали.

2.2 Выделение и очистка рекомбинантного белка Dps

Для выделения и очистки белка биомассу размораживали на ледяной бане, добавляя 3 мл охлажденного лизирующего буфера, содержащего 50 мМ Tris-HCl (pH 8.0), 1 мМ EDTA, 0.1 М NaCl. Для разрушения бактериальной клеточной стенки и ингибирования собственных протеаз биомассу обрабатывали лизоцимом (4×10^{-3} мг/мл) в присутствии 4 мкМ PMSF (фенилметилсульфонил фторида) на ледяной бане в течение 20 мин. Далее суспензию клеток подвергали воздействию ультразвука на дезинтеграторе УРСК-7Н-18 в течение 1 минуты суммарно с интервалами 15 секунд. Разрушенные компоненты клеток удаляли центрифугированием при 12000 об/мин. в течение 10 мин. при +4°C. Полученный белковый наносили на ионообменную колонку ДЕАЕ-Сефадекс-А25 (medium) (Sigma-Aldrich, USA), предварительно уравновешенную элюирующим буфером, содержащим 50 мМ NaCl, 10 мМ Tris-HCl (pH 8.0), 10^{-4} М этилендиаминтетрауксусной кислоты (EDTA); 10^{-4} М дитиотреитол (ДТТ), и разделяли на хроматографической системе ActaStart (GE, США) в градиенте концентраций NaCl в диапазоне 50-700 мМ, при скорости элюции 20 мл/ч. Объем собираемых фракций составлял 2.0 мл, а присутствие в них белка определяли с помощью электрофореза в 12.5% денатурирующем ПААГ по модифицированному методу Дэвиса. Полученный белок концентрировали на колонках Vivaspin 20 (Sartorius, Германия) с порами, пропускающими белки массой менее 10 кДа согласно инструкции производителя. Полученный препарат белка диализовали против буфера, содержащего 50 мМ NaCl, 50 мМ Tris-HCl (pH 8.0); 10^{-4} М EDTA для снижения солевой нагрузки раствора. Чистота полученного препарата составляла более 95%.

Отметим, что основой всех изученных в работе материалов, вне зависимости от способа их формирования являются молекулы белка бактериоферритина Dps, иначе известного [3] как ферритинподобный Dps. Эти молекулы белка могут формироваться их источником – клетками кишечной палочки (одноклеточными бактериями) *E.coli*. Молекулы ферритинподобного белка Dps (далее, для упрощения, мы можем их называть молекулами

ферритина Dps, молекулами белка Dps) могут, при определенных условиях содержать наночастицы на основе атомов железа и его оксидов [11, 3].

Формирование нитевидного кремния осуществлялось посредством металл-ассистированного жидкофазного химического травления [101, 102]. В процессе подготовки кристаллические кремниевые подложки обоих типов проводимости (р-тип с удельной проводимостью $\sim 1\text{--}5 \text{ }\Omega/\text{см}$ и n-тип с удельной проводимостью $< 0.02 \text{ }\Omega/\text{см}$) подвергались обработке 2%-ным раствором HF в течение 10 секунд. Далее производилось нанесение (осаждение) наночастиц серебра на поверхность образцов путем их иммерсии в смесь AgNO_3 (0.01 M) и HF (5 M) с различной длительностью: 15 или 30 секунд для р-типа, 30 или 45 секунд для n-типа подложек. Последующий этап включал травление в растворе, содержащем 30% H_2O_2 и HF (5 M), продолжительностью 1 или 3 минуты. Таким образом, исходные подготовленные массивы нитевидного кремния мы обозначим как р-тип 15/1 и р-тип 30/3, n-тип 30/3 и n-тип 45/1 соответственно. Финальная стадия обработки состояла из удаления серебряных наночастиц посредством промывания в водном растворе HNO_3 (65%) на протяжении 10 минут. Полученные структуры подвергались естественной сушке при комнатной температуре в лабораторных условиях.

В связи с невозможностью исследования исходных образцов на основе молекулярных или клеточных культур в водном растворе (исходном, или нативном состоянии) в условиях сверхвысокого вакуума аналитических камер лабораторных и синхротронных спектрометров или микроскопов, применялась методика осаждения анализируемого материала из водного раствора на подготовленные подложки с известными характеристиками. Данный способ в дальнейшем мы будем называть наслаиванием: контролируемое нанесение капель изучаемого раствора с биогибридными материалами, специализированным дозатором до микролитра в отдельной капле.

В качестве таких подложек использовались пластины кристаллического кремния с естественным слоем оксида SiO_2 , фольги титана и молибдена также покрытые естественными оксидами. Физико-химические свойства

поверхностей используемых подложек хорошо известны и контролировались использованным в случае того или иного исследования методом. Контролю в первую очередь подвергалось возможное взаимодействие между подложками и биогибридными материалами.

Подготовленные образцы анализировались методами, краткая информация об использовании которых приведена ниже.

2.3 Методы электронной микроскопии

В данной работе для получения информации о формировании изученных объектов, особенностях их морфологии и макроструктуры были применены методы электронной микроскопии, а именно растровой (сканирующей) и просвечивающей электронной микроскопии. Методами электронной микроскопии изучались форма и размеры всех объектов исследования работы, которые мы называем биогибридными. К ним относятся материалы на основе молекулярной культуры белка Dps и клеточной культуры бактерий кишечной палочки *Escherichia coli* (далее *E.coli*).

2.3.1 Метод просвечивающей электронной микроскопии

При проведении процесса пробоподготовки для метода просвечивающей электронной микроскопии – ПЭМ, или обозначение в международной литературе TEM – Transmission Electron Microscopy – исследуемые образцы наносились на комплекс, представляющий собой конструкцию из углеродной реплики и медной сетки. Общая толщина образца не превышала 100 нм из-за физических ограничений метода. После наслоения на данный «конвертик» образцы подвергались сушке в вакуумной камере микроскопа. Исследования по изучению структурных, морфологических и размерных особенностях молекул белка Dps проводились на просвечивающем электронном микроскопе Carl Zeiss Libra 120 (Германия). В вакуумной системе серии LIBRA устанавливается специальное устройство – «вакуумный буфер», при помощи

которого блокируются потенциальные источники вибропомех на время проведения эксперимента при высоких увеличениях. Выделим основные характеристики микроскопа [103]:

- 120 кВ ускоряющее напряжение;
- Вольфрамовый катод или катод из гексаборида лантана LaB₆;
- Уникальная система освещения по Кёлеру — обеспечивает строго параллельное освещение по всему полю образца;
- Полностью сухая вакуумная система;
- Высокоточный гониометрический столик с наклоном $\pm 75^\circ$;
- Пространственное разрешение: точка-точка – не хуже 0,34 нм;
- Информационный предел не хуже 0,20 нм.
- Диапазон увеличений: ТЕМ: 8х–630 000х.

Режимы при которых изучались объекты: режим светлого поля с ускоряющим напряжением 120 кВ и током катода 3.540 А с использованием вольфрамового катода в диапазоне увеличений 50000х–125000х.

Работа на микроскопе осуществляется в системе Microsoft Windows и специальным программным обеспечением WinTEM, позволяющим регулировать и отслеживать основные характеристики микроскопа, регистрировать данные для их последующего использования. Непосредственная контролирующая деятельность во время проведения исследований ведется с помощью компьютерных мыши и клавиатуры, а также специализированных джойстиков и специальной манипуляционной выносной панели. Эксперимент производился в Центре коллективного пользования научным оборудованием Воронежского государственного университета.

2.3.2 Метод высокоразрешающей просвечивающей электронной микроскопии в криогенных условиях

Для получения информации об объектах природного происхождения в их исходном, или же нативном состоянии необходимо применять методы, позволяющие исключить энергетический обмен между частями изучаемой

системы. В таком случае удобным станет метод высокоразрешающей просвечивающей электронной микроскопии в криогенных условиях, также называемый криоэлектронной микроскопией, поскольку в условиях температуры жидкого этана энергетический обмен между частями исследуемого образца исключен, так как биообъект практически мгновенно «замораживается». Далее в работе будет использовано международное обозначение метода криоэлектронной микроскопии, а именно – Cryo-electron Microscopy или же cryo-EM. В работе использовался микроскоп TITAN KRIOS 60-300 (FEI, США).

Принцип работы и формирования изображения метода cryo-EM идентичен обыкновенному TEM. Различия состоят лишь в пробоподготовке, которая имела множество этапов. Первым этапом было получение образцов белка с необходимой концентрацией для исследования (см. выше). Далее была произведена подготовка сосуда, содержащего азот при $t = -195,75$ °C и доведение наполнения азотом до отсутствия активного кипения и испарения. Третьим этапом выступило погружение в жидкий азот отдельного сосуда и медленное наполнение его метаном с целью сжижения (жидкий метан нужен для стабилизации пробы при ее мгновенном переводе в криосостояние) и последующая гидрофилизация поддерживающих сеток в тлеющем разряде. На последующем этапе была произведена фиксация углеродной сетки (сетки-носителя) в условиях, приближающихся к 100% влажности, в специальной камере для пробоподготовок. Такие условия необходимы для исключения деградации белковых молекул в растворе при их наслаивании на рабочую сетку.

После производилось непосредственно нанесение рабочей пробы молекулярной культуры белка на сетку в стабилизированных условиях и мгновенное погружение этой сетки с пленкой раствора в сосуд с жидким этаном. Финальными этапами в данной пробоподготовке были запрессовка подготовленной пробы в специализированный картридж без изъятия из криогенных условий (операция выполняется механически), и перевод

подготовленной пробы в рабочую камеру микроскопа без нарушения криогенных условий при помощи специальной кассеты, имеющей ячейки для картриджей. Стоит отметить, что большая часть из приведенных операций производится автоматизировано.

Приведем основные характеристики сверхвысокоразрешающего просвечивающего криоэлектронного микроскопа FEI TITAN KRIOS 60-300.

- Диапазон энергий электронов 60-300 кВ
- Разрешение: 0.75 Ангстрем
- Криообработка образцов в жидком этане
- Автоматизированная загрузка и анализ до 12 образцов за одно исследование [104].
- в проведенных экспериментах максимальное увеличение составило до 70000х.

Измерения производились в Национальном исследовательском центре "Курчатовский институт".

2.3.3 Метод растровой (сканирующей) электронной микроскопии

Метод сканирующей (растровой) электронной микроскопии (Scanning Electron Microscopy, SEM) использовался для анализа морфологии поверхности изученных объектов, а также для определения и контроля элементного состава.

В процессе экспериментов были задействованы два электронных микроскопа: Carl Zeiss ULTRA 55 (Германия) и Thermo Fisher Scientific Quattro-S (США). Конструктивные особенности растрового микроскопа в целом состоят из следующих элементов. Электронно-оптическая колонна растровых электронных микроскопов сконструирована по классической, хорошо апробированной схеме (рис. 2.1). В качестве источника электронов используется катод, изготовленный из вольфрама или гексаборида лантана. В зависимости от исследовательских задач, оператор имеет возможность

выбрать оптимальный тип источника электронов и при необходимости оперативно заменить вольфрамовый катод на гексаборид-лантана или наоборот. Конденсорная линза микроскопов данной серии обеспечивает возможность плавной регулировки тока пучка без изменения фокусного положения изучаемого объекта.



Рисунок 2.1 – Электронно-оптическая колонна растрового электронного микроскопа

Дефлекторы рассчитаны на значительные углы отклонения электронного пучка, что обеспечивает удобство при работе с крупногабаритными образцами, типичными для центральных заводских лабораторий. Диафрагма объективной линзы характеризуется легкостью замены и центрирования непосредственно оператором, что существенно сокращает временные и финансовые затраты на сервисное обслуживание оборудования. Суперконическая линза микроскопов, имеющая малый угол раствора (60°), позволяет осуществлять наклон столика с образцами на значительные углы при сохранении небольшого рабочего отрезка, что обеспечивает возможность получения информации для образцов больших размеров, не размещаемых на стандартном наклонном держателе.

Особенности микроскопа Carl Zeiss ULTRA 55:

- возможность получения изображений со сверхвысоким разрешением при низких ускоряющих напряжениях [105];

Разрешение:

- 1.0 nm при 15 kV
- 1.7 nm при 1 kV
- 4.0 nm при 0.1kV
- катод с вольфрамовой нитью накала
- конденсорная линза с переменным фокусным расстоянием
- возможность получения изображения во вторичных, обратнорассеянных электронах
- энергодисперсионная приставка [105].

Измерения проводились при следующих условиях: в диапазоне увеличений 5000x-20000x в режиме высокого и низкого вакуума, режиме регистрации низкоэнергетичных вторичных электронов и режиме регистрации вторичных электронов.

Эксперимент производился в Институте фотонных технологий, г. Йена, Германия.

Особенности микроскопа Thermo Fisher Scientific Quattro-S [106]:

- ускоряющее напряжение - 0.2–30 кВ;
- разрешающая способность - до 0.8 нм;
- увеличение - 6–1000000 крат;
- вакуумные условия сверхнизкий (до 4000 Па), низкий (10–130 Па), высокий (до $6 \cdot 10^{-4}$ Па) вакуум
- детектируемые элементы приставкой микроанализа - от Бора.

Измерения проводились при следующих условиях: в диапазоне увеличений 5000x-20000x в режиме высокого и низкого вакуума, режиме регистрации вторичных электронов.

Эксперимент производился в Удмуртском федеральном исследовательском центре УрО РАН, г. Ижевск.

2.4 Методы рентгеновской и фотоэлектронной спектроскопии

Исследования для определения физико-химического состояния, особенностей атомного и электронного строения изученных в работе материалов на основе клеточных культур *Escherichia coli* и молекул белка Dps осуществлялись с применением методов рентгеновской фотоэлектронной спектроскопии XPS и спектроскопии ближней тонкой структуры края рентгеновского поглощения XANES. Экспериментальные измерения проводились на двух специализированных источниках синхротронного излучения третьего поколения BESSY II Гельмгольц Центра Берлин (Helmholtz-Zentrum Berlin) и второго поколения Курчатов НИЦ Курчатовский институт. Синхротрон BESSY II работал в режиме top-up обеспечивая ток в накопительном кольце на постоянном уровне до 300 мА в режиме 24/7. Синхротрон Курчатов работал в режиме падения тока (decay) в диапазоне тока в кольце 120-20 мА. Использовались следующие каналы вывода синхротронного излучения BESSY II: российско-германский дипольный канал RGBL, ондуляторный канал UE56-2 PGM-2 [107]. На синхротроне Курчатов использовался канал НАНОФЭС [108]. Каналы были оснащены специализированными спектрометрами конечных станций, оснащенных полусферическими анализаторами энергий электронов Specs Phoibos 150 (RGBL) или Specs Phoibos 250 (НАНОФЭС), а также возможностью детектирования спектров XANES в режиме полного выхода электронов путем детектирования тока с образца (компенсационного тока).

Также использовался спектрометр модуля ЭСХА канала НАНОФЭС оснащенный лабораторным монохроматическим источником излучения с анодом Al (излучение Al K α с энергией квантов 1486,61 эВ), полусферическим анализатором энергий электронов Specs Phoibos 150 и источником фокусированного ионного травления для удаления верхних нанослоев изучаемого объекта.

Все спектрометры были оснащены загрузочными, подготовительными и экспериментальными сверхвысоковакуумными камерами, давление в которых поддерживалось на уровне 10^{-9} – 10^{-10} Торр.

В качестве примера приведем схематически конфигурацию канала RGL на рисунке 2.2 с описанием основных компонентов в последовательности от дипольного магнита к исследуемому образцу:

M1 — тороидальное зеркало с ультратонким платиновым покрытием, оснащенное системой водяного охлаждения. Данный элемент обеспечивает горизонтальную фокусировку источника на выходную щель и коллимацию пучка излучения.

M2 — плоское зеркало с платиновым покрытием. Характеризуется вертикальным отклонением в диапазоне $2\theta = 167^\circ-177^\circ$.

G — блок, включающий плоскую дифракционную решётку с вертикальным отклонением в диапазоне $2\theta = 167^\circ-177^\circ$. Решётка имеет золотое покрытие. Технические характеристики предусматривают возможность использования двух типов решёток с плотностью 400 и 1200 штрихов/мм.

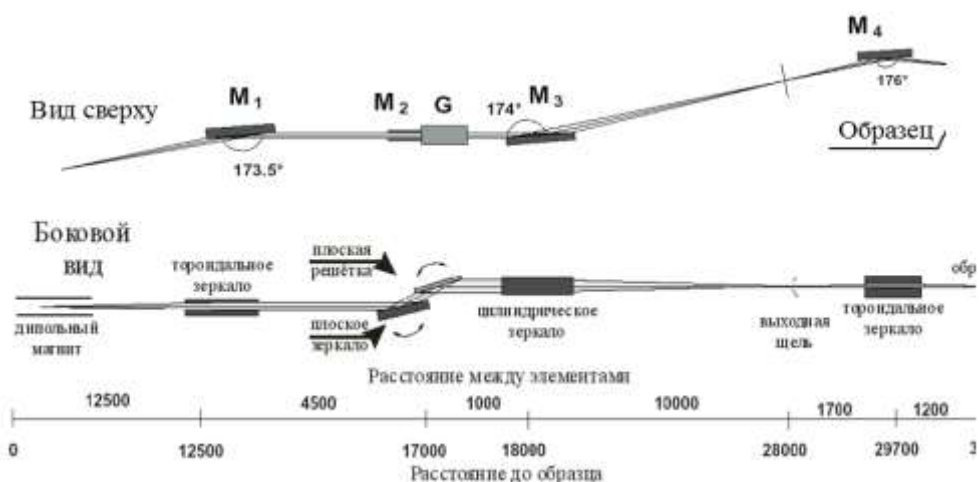


Рисунок 2.2 – Оптическая схема Российско-германского канала синхротрона BESSY II [109]

Плоское зеркало M2 совместно с плоской решеткой G формируют монохроматор коллимированного света с плоской решёткой, обеспечивающий возможность регулировки отклоняющего угла. Компонент M3 представляет собой цилиндрическое зеркало с платиновым покрытием, осуществляющее

вертикальную фокусировку на выходную щель. Диаметр выходной щели может варьироваться в диапазоне 0-2000 мкм. Элемент М4 на схеме соответствует тороидальному зеркалу с платиновым покрытием, выполняющему критически важную функцию фокусировки изображения выходной щели непосредственно на исследуемом образце.

При проведении экспериментальных исследований на канале RGBL синхротрона BESSY II использовалась измерительная станция HighRes, основные элементы которой приведены на рисунке 2.3.

Ондуляторный канал использовался для измерений спектромикроскопическим методом РЕЕМ (см. следующий раздел).

Применение синхротронного излучения в наших исследованиях обусловлено его исключительно высокой интенсивностью. Экспериментальные измерения проводились при следующих параметрах: поток фотонов 10^{10} – 10^{11} фот/сек, ток накопителя от 250 мА в режимах decau или до 300 мА в top-up. Аппаратурное уширение экспериментальных установок составляло $\sim 0,1$ эВ, что обеспечивало высокую точность измерений.



Рисунок 2.3 – I – подготовительная камера; II – отсекающие вакуумные затворы; III – «карусель» для передачи образцов между камерами; IV – подготовительная камера; V – экспериментальная камера

Информативная глубина анализа поверхностных слоев определялась условиями регистрации данных XPS. При проведении измерений

использовались энергии возбуждения 800 и 900 эВ при работе с синхротронным излучением, а также Al K α (1486.61 эВ) при использовании рентгеновской трубки с монохроматором. Соответствующие глубины анализа составляли примерно 2-3 нм [110] в зависимости от материала.

Для нормализации и калибровки экспериментальных данных применялся стандартный методологический подход, основанный на независимой регистрации сигнала от чистой золотой фольги (Au 4f состояния, «внешняя» калибровка), что обусловлено присутствием атомов углерода в исследуемой биологической культуре. Для некоторых образцов, включая эталонные соединения железа, его оксидов и других материалов, калибровка осуществлялась по C1s линии углеводородных загрязнений («внутренняя» калибровка). При анализе и интерпретации особенностей Fe 2p XPS спектров использовались как опубликованные результаты, так и авторитетные базы данных, из которых были отобраны актуальные и наиболее точные (монохроматические) спектральные характеристики: справочник Handbook of X-ray Photoelectron Spectroscopy (Perkin Elmer) [110], XPS International Data [67], база данных NIST XPS [111], а также публикации в издании Surface Science Spectra [112].

2.5 Метод фотоэмиссионной электронной микроскопии

В дополнении к традиционным методам электронной микроскопии и рентгеноэлектронной спектроскопии в настоящем исследовании применялся метод фотоэмиссионной микроскопии (PhotoEmission Electron Microscopy, PEEM). Основной идеей использования этого метода является получение «прямой» рентгеноспектральной и микроскопической химически-селективной информации, а именно данных XANES или XPS, в зависимости от конфигурации прибора. Среди основных производителей фотоэмиссионных микроскопов выделяются SPECS, Scienta-Omicron и ELMITEC [113-115].

В рамках проведенных экспериментов использовался микроскоп FOCUS IS-PEEM Российско-Германской лаборатории Гельмгольц центра Берлин, внешний вид которого приведен на рисунке 2.4. Схематическое изображение оптической системы прибора иллюстрировано дано на рисунке 2.5. Экспериментальные исследования осуществлялись с применением лабораторного источника – ртутной лампы с энергией возбуждения ~ 5 эВ и синхротронного излучения BESSY II ондуляторного канала UE52_SGM. Данные метода PEEM регистрировались при комнатной температуре, с полем зрения 50-100 μm .



Рисунок 2.4 – Микроскоп The FOCUS IS-PEEM фирмы Omicron

Оптическая система микроскопа FOCUS PEEM характеризуется комплексной структурой, включающей три группы линз, обеспечивающих проекцию эмитированных образцом электронов на формирователь изображения. Данный комплекс включает: объективные линзы, трансферные линзы (опциональный компонент) и две проекционные линзы (рис. 2.5). Объективные линзы, содержащие электростатический катод, обеспечивают предварительное увеличение и фокусировку изображения поверхности образца с последующей проекцией на контрастную диафрагму,

локализованную в задней фокальной плоскости проекционных линз. За контрастной диафрагмой располагается отражатель, служащий для повышения разрешения. Опционально устанавливаемые трансферные линзы обеспечивают параллелизацию электронного пучка, который впоследствии проходит через второй модуль стигматор/отражатель, размещенный перед первой плоскостью изображения. Для оптимизации контраста и разрешения используется ирисовая диафрагма, расположенная за первой плоскостью изображения.

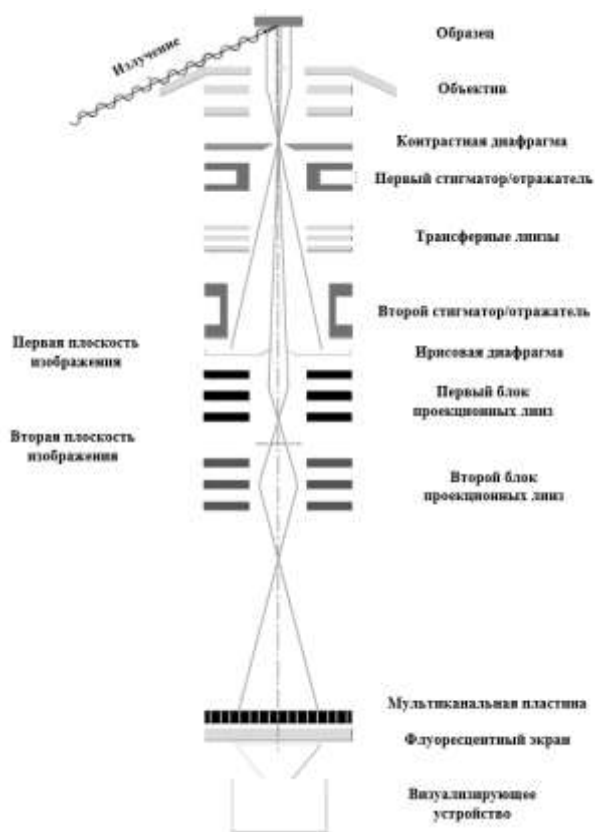


Рисунок 2.5 – Принципиальная схема электронной оптической системы IS-PEEM

После прохождения ирисовой диафрагмы изображение подвергается увеличению и фокусировке посредством двух проекционных линз на мультиканальную пластину, значительно усиливающую интенсивность потока фотоэлектронов, что обеспечивает визуализацию на флуоресцентном экране [113].

Метод РЕЕМ можно использовать, регистрируя изображение при наборе электронов, покидающих поверхность образца в результате различных процессов и направленных в колонну микроскопа приложенным между образцом и поверхностью высоким напряжением, до 12 кВ. К таким процессам можно отнести фотоэмиссию, когда фотоэлектроны, возбуждаемые синхротронным излучением, покидают поверхность образца. В этом случае необходимо сканирование по кинетическим энергиям таких электронов при помощи анализатора и уже последующего набора изображений. Таким образом, регистрация изображения в этом случае будет подразумевать варьирование кинетических энергий вылетающих электронов. Возможна и другая ситуация, когда сканирование при регистрации РЕЕМ данных, фактически изображений, происходит по энергиям квантов синхротронного излучения, которые возбуждают спектр ближней тонкой структуры края рентгеновского поглощения XANES. Тогда полный выход электронов (фото-, Оже, вторичных) при заданной энергии кванта синхротронного излучения регистрируется в колонне микроскопа. Именно такой подход использовался в нашей работе. А именно, регистрировались изображения при заданной энергии квантов синхротронного излучения, а сканирование производилось при помощи монохроматора в каждой точке с соответствующим шагом сканирования. Впоследствии накопленные изображения анализировались при помощи специального программного обеспечения с целью навигации по поверхности образца для выбора нужной точки исследований или для получения изображения высокого качества или экстракции спектров XANES от всего поля зрения или его отдельных, микроскопических частей, размером до одного пикселя изображения.

2.6 Иные методы исследования

2.6.1 Метод динамического светорассеяния

Метод динамического светорассеяния был применен для определения размеров молекулы Dps с использованием устройства Zetasizer Nano (Malvern

Instruments, Великобритания). Данный прибор эффективно определяет диаметр молекул в диапазоне от 0.3 нм до 10 мкм с чувствительностью к концентрации белка 0.1 мг/мл. Измерения проводились с помощью гелий-неонового лазера с длиной волны 633 нм и максимальной мощностью 4 мВт. Образец, идентичный использованному для скоростной седиментации, был помещен в кювету объемом 0,5 мл. Было выполнено три независимых измерения распределения зависимости объема частиц в растворе от их размера. Анализ полученных данных осуществлялся с помощью программного обеспечения Malvern [116]. Измерительный диапазон прибора охватывает частицы размером от нанометрового до масштаба в ~ 6 мкм, что обусловило его альтернативное название "наносайзер" [117]. Методика получения экспериментальных данных включает следующие этапы. Исследуемый раствор, помещенный в кювету, устанавливается в измерительный отсек прибора. Лазерное излучение, проходя через образец, подвергается рассеянию на присутствующих в растворе молекулах или иных дисперсных частицах. Детектирование рассеянного излучения осуществляется системой регистрации фотонов, передающей сигнал в коррелятор. В корреляторе происходит аккумуляция корреляционной функции флуктуаций интенсивности рассеянного света. По истечении заданного временного интервала измерения, корреляционная функция транслируется в ЭВМ в форме линейно преобразованной автокорреляционной функции. Характеристики данной функции, включая нулевой уровень базовой линии и параметры затухания, соответствуют исходной автокорреляционной функции. Вычисление размеров частиц производится специализированным программным обеспечением на основе анализа полученной корреляционной функции [118].

2.6.2 Программный пакет IMAGE J

Для проведения процедур статического анализа, а именно оценки распределения по размеру неорганических ядер белка Dps нами была

использована программа Image J. Данное программное обеспечение является бесплатным и имеет широкий спектр функций, который можно подстроить под самые различные запросы в области анализа и обработки изображений [119]. В функции программы заложено выполнение специальных задач:

- Расчет площади плоских фигур нерегулярной формы.
- Определение значения пикселей в выделенной области изображения.
- Создание гистограммы распределения и графики профиля.
- Масштабирование, вращение и переворот изображения.
- Уменьшение шума с помощью медианной фильтрации.
- Оценка углов и расстояний.
- Обнаружение края.

Программа часто используется для подсчета размеров колоний и площадей биопленок в микробиологии. В качестве еще одной уникальной возможности ImageJ можно выделить способность приблизить или уменьшить изображение до 32 раз. При этом сохраняется возможность проводить все операции по его обработке и анализу [119].

ГЛАВА 3. АТОМНОЕ И ЭЛЕКТРОННОЕ СТРОЕНИЕ БИОГИБРИДНЫХ МАТЕРИАЛОВ НА ОСНОВЕ МОЛЕКУЛ БЕЛКА БАКТЕРИОФЕРРИТИНА DPS

3.1 Формирование и морфология биогибридных материалов на основе молекул белка бактериоферритина Dps

3.1.1 Данные метода динамического светорассеяния о размере исходных молекул белка

Перед проведением исследований методами рентгеновской и электронной спектроскопии и микроскопии раствор, содержащий образцы, был проанализирован с применением метода динамического светорассеяния (DLS). Данный метод использовался как для оценки размера полученных молекул, так и для подтверждения сохранности формы белковых молекул в растворе после определенного времени хранения (рис. 3.1).

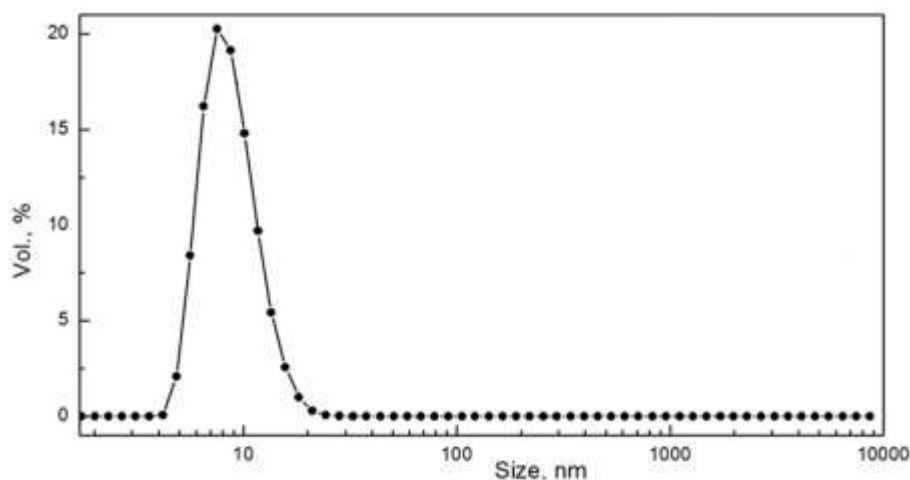


Рисунок 3.1 – Распределение размеров частиц, присутствующих в растворе нативного белка Dps при комнатной температуре, полученное методом динамического светорассеяния

Согласно данным, представленным на рисунке 3.1 распределение по размерам весьма узкое, характеризуется четко выраженным и однозначно наблюдаемым пиком, что свидетельствует об отсутствии заметных нарушений формы белковых молекул. Анализ полуширины пика показывает, что

преимущественный диаметр молекул находится в интервале 7-9 нм [120-121]. Важно отметить, что полученные данные о размерах соответствуют молекулярной культуре в ее естественной среде нахождения (хранения). Результаты хорошо согласуются с данными, приведенными в работе [3], подтверждая корректность проведенных оценок результатов измерений.

Отсутствие в распределении пиков, характерных для рассеяния света на частицах иных размеров, является важным свидетельством того, что конформация (единство размеров и формы) молекул и гибридного наноматериала, синтезируемого в данной работе, не нарушена. Иными словами, данные динамического светорассеяния убедительно демонстрируют, что в рабочих растворах присутствуют белковые молекулы со строго ограниченной вариацией размеров. Эти результаты обеспечивают важную предварительную характеристику исследуемых образцов перед их более детальным анализом методами электронной микроскопии, подтверждая качество и однородность полученного материала.

3.1.2 Данные просвечивающей электронной микроскопии

Поскольку метод динамического светорассеяния предоставляет информацию исключительно о размерах белковых молекул, выступающих в качестве «матрицы» или «контейнера» для агрегированных неорганических наночастиц, особую значимость приобретает применение просвечивающей электронной микроскопии (ТЕМ) для непосредственного изучения размеров неорганических ядер, формирующихся во внутренних полостях белковых молекул в процессе синтеза. Очевидно, что размеры внутренних полостей и синтезируемых в них неорганических наночастиц не могут превышать размеров самих белковых молекул. Современные возможности ТЕМ обеспечивают эффективное определение наночастиц соответствующих размеров.

В рамках настоящего исследования все образцы гибридного молекулярного наноматериала были подвергнуты анализу методом ТЕМ. Учитывая

сверхвысоковакуумную основу данного метода, подготовка образцов осуществлялась посредством одно- или многократного наслаивания частиц из исследуемого раствора на тонкую углеродную пленку (толщиной менее 100 нм) с последующей дегидратацией в вакуумной камере микроскопа.

Следует отметить, что не для всех изученных образцов удалось получить изображения, содержащие наночастицы. Предположительно, это обусловлено неравномерным распределением неорганических наночастиц во внутренних полостях белковых молекул в исходном растворе.

Следовательно, при наслаивании незначительного объема рабочего раствора не всегда присутствуют молекулы, содержащие накопленные (депонированные) неорганические включения. На рисунке 3.2 представлены светлопольные ТЕМ-изображения участков двух образцов, демонстрирующих эффективное распределение неорганических наночастиц, визуализируемых в виде темных точек.

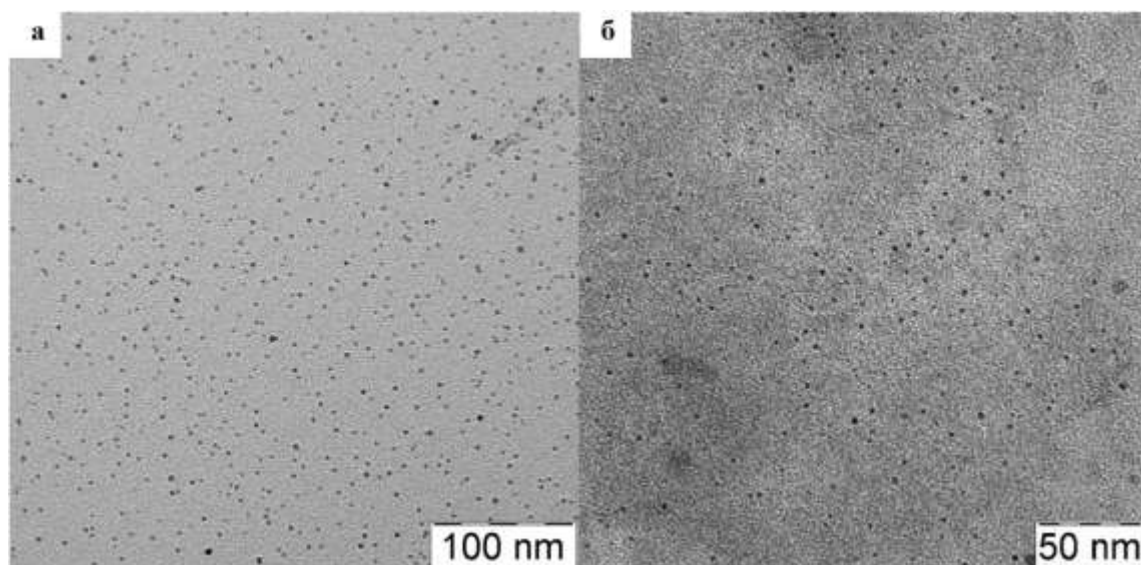


Рисунок 3.2 – Изображения образца с концентрацией белка $\sim 1,2$ мг/мл:
а) после добавления соли Мора в количестве 1мМ; б) после добавления соли Мора в количестве 0,25 мМ [122], полученные методами ТЕМ при различных увеличениях

Отметим, что в ходе проведения экспериментов были получены многочисленные изображения образцов белка Dps. В качестве иллюстративного

примера представлены микрофотографии образца с концентрацией белка $\sim 1,2$ мг/мл при различных количествах добавленной соли Мора (0.25 и 1 мМ). На рисунке 3.2 отчетливо видны темные точки, распределенные по поверхности углеродной подложки. Как правило можно идентифицировать их сферическую морфологию. Данные объекты представляют собой неорганические ядра, сформированные внутри органической оболочки молекул белка Dps. Темный контраст наночастиц обусловлен большим атомным номером железа ($Z=26$) и его соединений по сравнению с легкими элементами органической белковой оболочки – кислородом ($Z=8$), углеродом ($Z=6$) и водородом ($Z=1$).

Анализ полученных изображений позволяет сделать следующие заключения. Преобладающая морфология наблюдаемых на ТЕМ-изображениях частиц (рис. 3.2) характеризуется как квазисферическая или сферическая. Размер частиц варьируется, и может составлять от ~ 7 нм (рис. 3.2 а) до преимущественно $\sim 1-3$ нм (рис. 3.2 б, 3.3), в том числе коррелируя с данными [121]. Существенно, что агрегация ядер не наблюдается, что подтверждается представленными изображениями [122]. Важно отметить, что визуализируемые частицы присутствовали на значительной площади поверхности образца и были воспроизводимо обнаружены в различных подготовленных пробах.

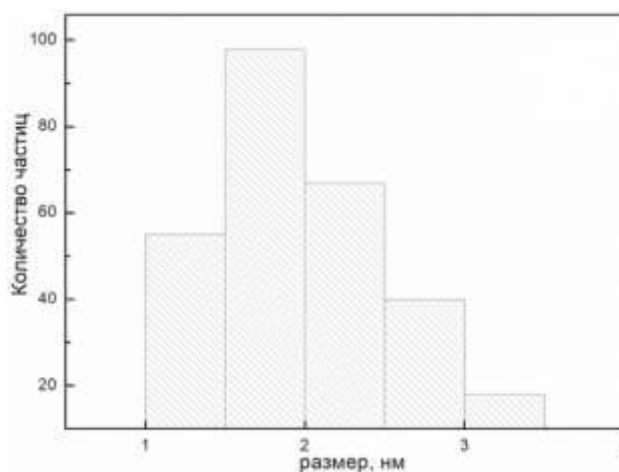


Рисунок 3.3 – Распределение частиц по размерам, полученное с использованием ПО ImageJ от образца данные ТЕМ для которого приведены на рисунке 3.2 справа [122]

В рамках исследования были предприняты попытки получения микродифракционных данных от областей, изученных методом ТЕМ. Все эксперименты выявили лишь слабые признаки кристаллизации остаточных солей, содержащихся в растворах образцов. Ни на одной дифракционной картине не были зарегистрированы рефлексы или кольца, характерные для соединений железа. С одной стороны, это может свидетельствовать о недостаточном количестве неорганических наночастиц для эффективной дифракции электронов. Однако, как демонстрируют данные ТЕМ (рис. 3.2 и 3.3) несмотря на отмеченную фрагментарность, в образцах присутствуют области с значительной концентрацией наночастиц размерами 2-5 нм.

3.1.3 Данные, полученные методом высокоразрешающей просвечивающей электронной микроскопии в криогенных условиях

При традиционной просвечивающей электронной микроскопии (ТЕМ) высокий или сверхвысокий вакуум в колонне микроскопа является необходимым условием для получения качественных изображений с большим увеличением. Однако такие условия и их достижения для образцом биологического происхождения, в том числе биогибридных, могут приводить к изменениям в исследуемом образце: агрегации неорганических наночастиц, их перераспределению, изменениям формы и структуры. Эти трансформации обусловлены деформацией органического носителя наночастиц в процессе вакуумирования при помещении в объем микроскопа.

Для изучения гибридных наноматериалов в условиях, приближенных к естественной среде (буферный водный солевой раствор), эффективнее применять метод криогенной электронной микроскопии (cryo-EM). Этот подход, несмотря на значительную трудоемкость проведения эксперимента, позволяет исследовать материал после практически мгновенной заморозки, сохраняя исходную форму молекул предположительно без значительных трансформаций. Быстрое охлаждение обеспечивает мгновенное прекращение физико-химического обмена между молекулами и средой, а также

энергетического обмена между молекулами, их структурными единицами и неорганическими ядрами.

Рисунок 3.4 демонстрирует изображения, полученные методом сгуо-ЕМ для молекулярной белковой культуры бактериоферритина Dps. На изображении А отчетливо видны ячейки углеродной сетки с диаметром, варьирующимся от ~50 до 2000 нм. При большем увеличении (изображение б) можно более детально рассмотреть объекты, сформировавшиеся в самой ячейке, а также остаточные объекты на стенках ячейки, предположительно кристаллы льда.

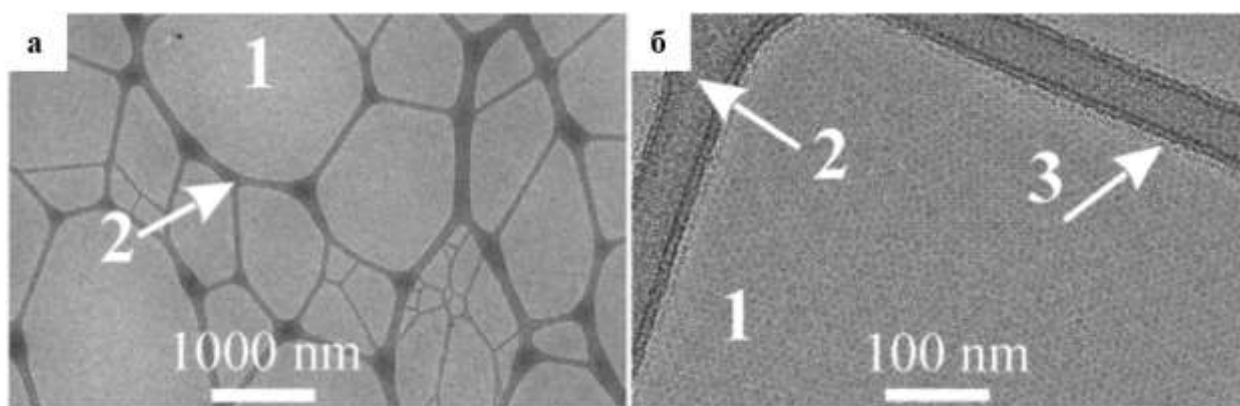


Рисунок 3.4 – Изображения, полученные методом сгуо-ЕМ. а: используемая углеродная сетка, с материалом пробы, сосредоточенным в ее ячейках (1 - ячейка углеродной сетки с молекулами белка, 2 – стенки ячеек сетки) б: используемая углеродная сетка, с материалом пробы, сосредоточенным в ее ячейках с большим увеличением (отдельно взятая ячейка и стенки углеродной сетки, 3 – остаточные кристаллы льда) [123]

Анализ этих изображений позволяет сделать следующие выводы:

– Вблизи стенок углеродной сетки формируются остаточные следы льда, образующий переходный сверхтонкий слой между стенкой сетки и распределенными в ячейке молекулами.

– В центральной части ячейки можно наблюдать отдельные молекулы.

– На изображениях с большим увеличением (рис. 3.4) можно детальнее рассмотреть взаимное расположение молекул и их размер.

Уже по данным рисунка 3.4 очевидно, что молекулы расположены дискретно, без видимого перекрытия, что позволяет предположить формирование одномерного слоя молекул в исследуемом образце, то есть толщиной в одну молекулу. То есть получено достоверное изображение молекул белка Dps в условиях, близких к природным, минимизируя искажения, вызванные пробоподготовкой [123]. Отметим, что этот результат получен по нашим данным впервые для белковых молекул бактериоферритина Dps, и также практически впервые при условиях формирования cryo-EM пробы без присутствия контрастирующих агентов, как правило, ураниловых солей, зачастую искажающих изображения изучаемых объектов природного происхождения, особенно в нанометровом масштабе.

Рисунок 3.5 представляет изображение белка Dps в ячейке углеродной сетки с максимально доступным экспериментальным увеличением. Анализ данного изображения позволяет выявить ряд важных особенностей формирования молекулярной структуры белка при криогенной заморозке.

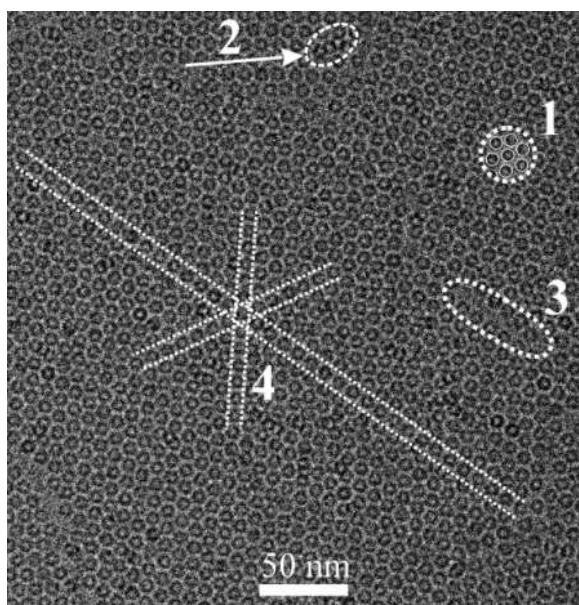


Рисунок 3.5 – Изображение cryo-EM белка Dps в ячейке углеродной сетки. 1 – гексагональная сверхструктурная "единица" с одной молекулой в центре; 2 – деформация части образца в результате взаимного расслаивания частиц; 3 – разрыв чередования «линий» молекул слоя; 4 – вытянутые цепочки выстроенных молекул [123]

Доминирующим структурным элементом являются гексагональные блоки (обозначены цифрой "1" на рис. 3.5), состоящие из центральной молекулы белка, окруженной шестью другими молекулами. Все молекулы имеют размеры внешних стенок ~ 10 нм и внутренних ~ 7 нм. Эти структурные единицы, гексагональные блоки из 7 молекул, хорошо различимы на изображении, их общий диаметр не превышает 30 нм. Такое взаимное расположение молекул преобладает по всему полученному изображению и подтверждается данными из других исследованных ячеек.

Четкость границ отдельных молекул и отсутствие их взаимного перекрытия свидетельствует о формировании мономолекулярного слоя в ячейках углеродной сетки, макроструктура которого сохраняется при криозаморозке. Молекулы в этом слое находятся в плотноупакованном состоянии с характерным взаимным расположением. Упорядоченность в расположении молекул может наблюдаться в пределах субмикронных и микронных расстояний, что видно по цепочкам молекул (обозначены цифрой "4").

Таким образом, наблюдается формирование мономолекулярного, квазиупорядоченного слоя, в одной плоскости, из белковых молекул бактериоферритина Dps. В этом слое выделяется повторяющаяся гексагональная макроструктурная единица с одной молекулой в центре, окруженной шестью такими же белковыми молекулами, общим диаметром около 30 нм.

В структуре также присутствуют отклонения от упорядоченного расположения молекул, обозначенные на рисунке 3.5 цифрами "2" и "3":

– Структура "2" представляет собой области, где частицы расслаиваются друг относительно друга.

– Область "3" демонстрирует разрыв слоя и нарушение упорядоченного чередования молекул.

Отметим, что полученные данные о размерах молекул бактериоферритина Dps находятся в хорошем согласии с результатами метода DLS (см. выше).

Как отмечалось ранее при анализе результатов ТЕМ, неорганические частицы в растворе пробы присутствуют фрагментарно. Из-за сложности эксперимента сгуо-ЕМ на данный момент не удалось изучить фрагменты пробы, содержащие неорганические наночастицы, однако планируется получить такие данные в будущих исследованиях.

3.2 Электронное строение и состав биогибридных материалов на основе молекул белка бактериоферритина Dps

Для получения информации о составе и электронном строении биогибридных материалов на основе бактериоферритина Dps был применен метод XANES. На рисунке 3.6 приведен XANES Fe $L_{2,3}$ спектр гибридного объекта на основе молекул белка бактериоферритина Dps после нормализации и обработки. Обозначены энергии характерных спектральных особенностей L_3 края железа.

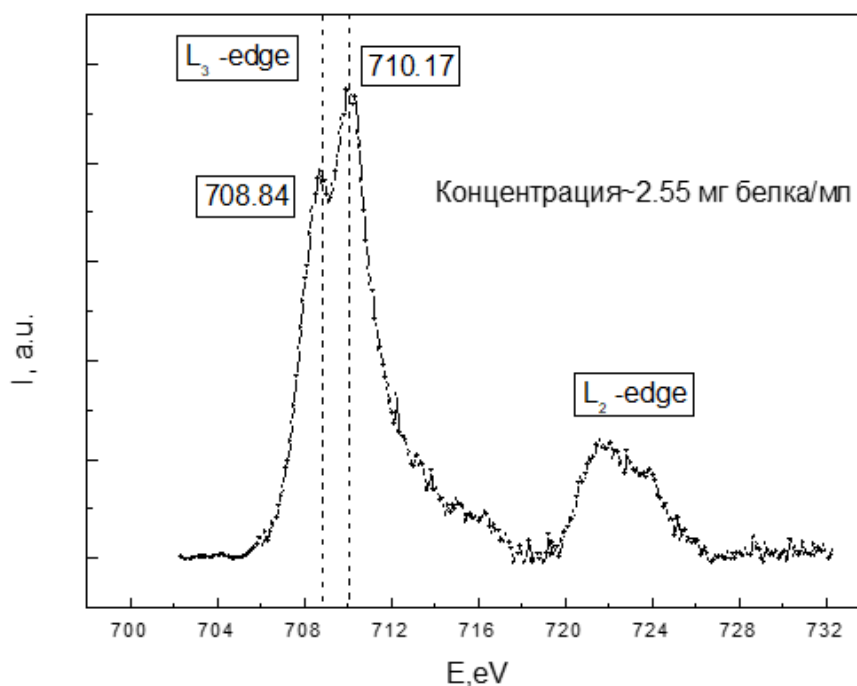


Рисунок 3.6 – XANES Fe $L_{2,3}$ спектр гибридного объекта бактериоферритина Dps

Отметим, что данный спектр был получен для той же молекулярной культуры, результаты исследований которой методом ТЕМ приведены в разделе 3.1.2. Отличие состояло лишь в концентрации белка, которая была увеличена до 2.55 мг/мл, так как малое количество вещества не гарантировало получение адекватного по интенсивности сигнала спектра XANES несмотря на использование высокоинтенсивного синхротронного излучения. Таким образом, успешный для анализа спектр был получен с образца с концентрацией белка ~2.55 мг/мл. Образцы с более низкой концентрацией (~1.2 или 0.8 мг/мл) показали избыточный уровень шума, не позволивший провести корректные нормализацию и анализ синхротронных данных.

Полученный спектр содержит некоторые шумы, вероятно из-за недостаточного количества вещества на подложке, однако данные оказались пригодными для дальнейшего анализа. Это исследование подтвердило эффективность метода XANES в области ультрамягкого рентгеновского излучения для изучения таких гибридных наноматериалов, как молекулы белка Dps, а также продемонстрировало адекватность выбранного метода пробоподготовки.

Для анализа полученного XANES Fe $L_{2,3}$ спектра молекулярной культуры белка Dps после насыщения внутренних полостей молекул неорганическими наночастицами из растворенной в культуральной жидкости соли Мора (см. Главу 2) необходимо сопоставление с эталонными данными, приведенными на рисунке 3.7.

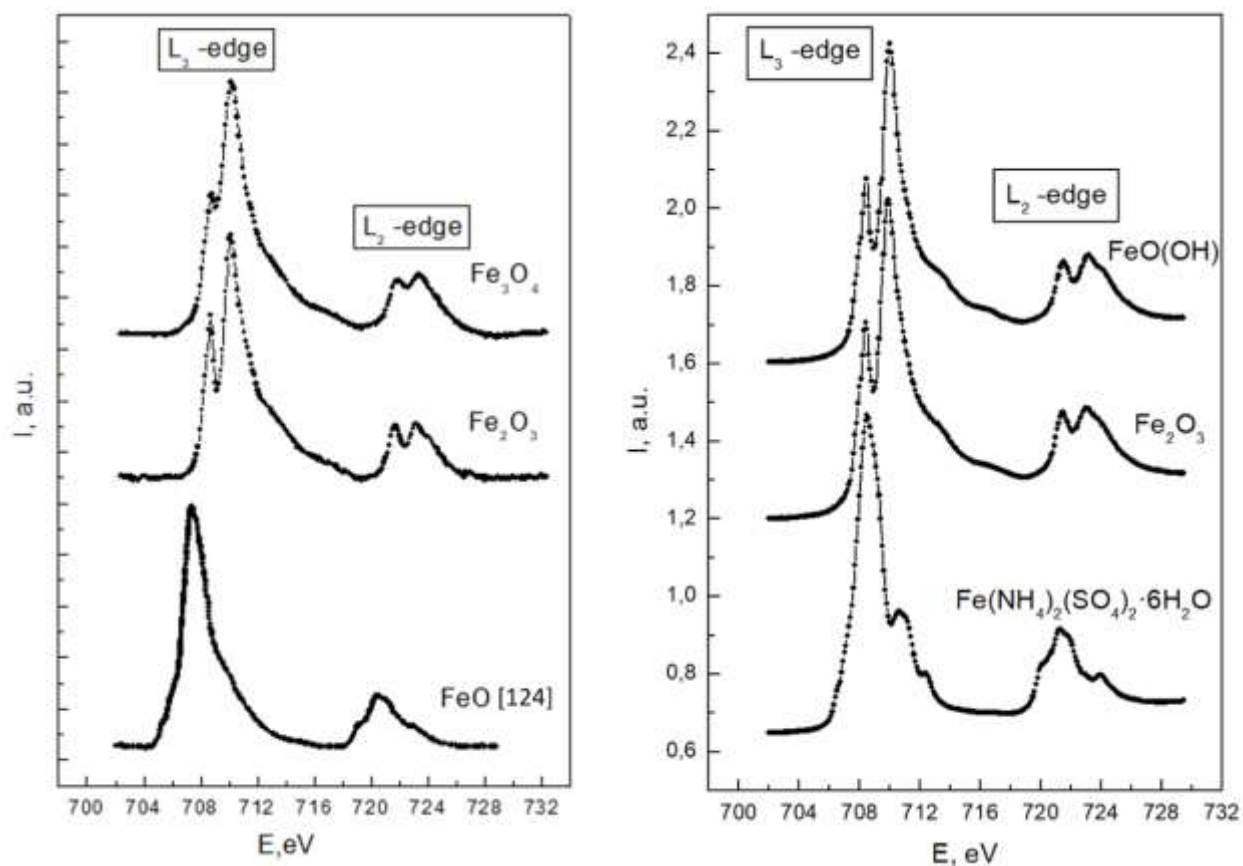


Рисунок 3.7 – XANES Fe L_{2,3} спектры эталонов

К таким данным относятся экспериментально полученные нами спектры от известных соединений системы железо-кислород, коммерчески доступные образцы которых были приобретены в Alfa Aesar, а также XANES Fe L_{2,3} спектры оксидов железа известные из литературных источников [124-127]. Спектры оксидов Fe₂O₃ и Fe₃O₄, гидроксида FeO(OH) и соли Мора Fe(NH₄)₂(SO₄)₂·6H₂O были зарегистрированы нами в тех же экспериментальных условиях что и для биогибридного материала на синхротронах BESSY II (станция RGLB) и Курчатов (Станция НАНОФЭС), а сопоставление с литературными данными показало хорошее согласие полученных результатов. Данные эксперимента для порошка FeO оказались практически идентичными с Fe₂O₃ в результате доокисления, по крайней мере поверхности нестабильного в лабораторных условиях FeO, поэтому XANES Fe L_{2,3} этого оксида был взят из [124]. Отметим, что распределение тонкой структуры и энергетическое положение основных спектральных особенностей

XANES Fe $L_{2,3}$ спектров (рисунок 3.7) являются отличительной характеристикой каждого из эталонных соединений. На рисунках 3.8 – 3.10 приведем сопоставление XANES Fe $L_{2,3}$ спектра гибридного объекта бактериоферритина Dps с рядом синхротронных данных, полученных нами в тех же условиях эксперимента для эталонных соединений.

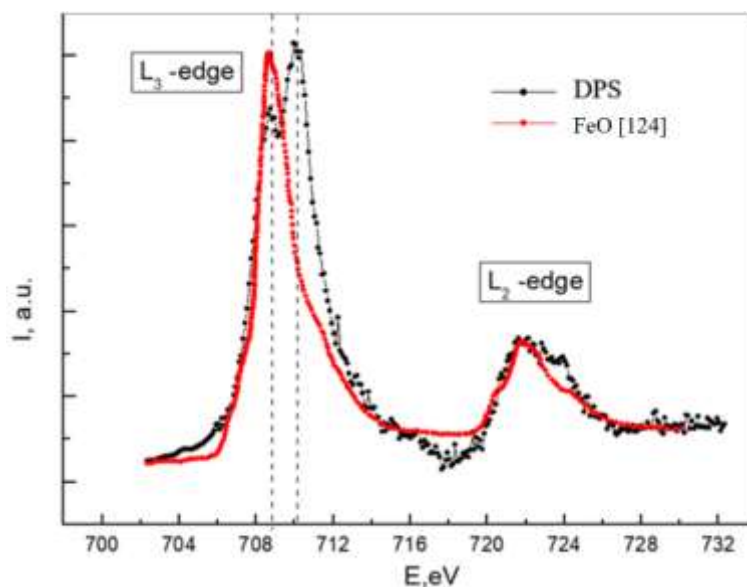


Рисунок 3.8 – Сопоставление спектров бактериоферритина Dps и FeO [124]

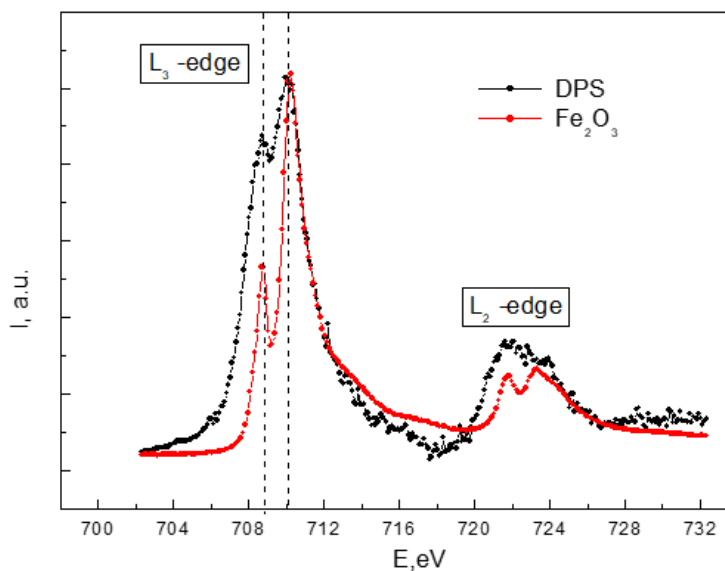


Рисунок 3.9 – Сопоставление спектров бактериоферритина Dps и Fe₂O₃

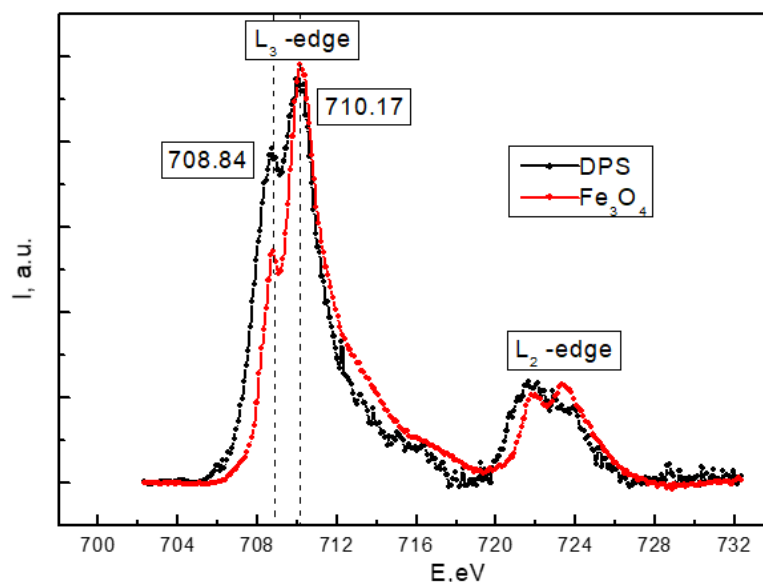


Рисунок 3.10 – Сопоставление спектров бактериоферритина Dps и Fe_3O_4

Наибольшее сходство обнаружено со спектром Fe_3O_4 (рис. 3.10). Сопоставление с другими эталонами (рис. 3.8 и 3.9) показало большие различия. Более детальный анализ выявил существенные различия в тонкой структуре спектров биогибридного материала на основе молекулярной культуры бактериоферритина Dps и Fe_3O_4 . При энергии 708.8 эВ наблюдается более интенсивный пик в спектре бактериоферритина Dps, тогда как на 710.17 эВ характерный основной максимум эталонного спектра Fe_3O_4 практически совпадает с соответствующим пиком спектра бактериоферритина Dps. Это указывает на более сложный состав неорганического ядра бактериоферритина Dps и предполагает, что его XANES спектр формируется комбинацией различных оксидов железа.

Для более точной оценки состава было решено провести математическое моделирование по методике, описанной в работе [128]. Хотя изначально эта методика разрабатывалась для ультрамягких рентгеновских эмиссионных спектров, она применима и к спектрам XANES, во всяком случае тогда, когда наблюдается линейность спектрального фона до края поглощения и после зарегистрированной ближней тонкой структуры. Применимость этого подхода к моделированию спектров подтверждена ранее в работе [120].

В процессе моделирования были протестированы четыре комбинации спектров оксидов железа: 1) FeO, Fe₂O₃, Fe₃O₄; 2) FeO, Fe₂O₃; 3) Fe₂O₃, Fe₃O₄; 4) FeO, Fe₃O₄. Целью было определить модель, то есть комбинацию спектров и их вкладов, наиболее точно воспроизводящую экспериментальный спектр бактериоферритина Dps, что позволило бы провести полуколичественный анализ экспериментальных данных [128].

Наконец, отметим, что тонкая структура спектров XANES Fe L_{2,3} гидроксида FeO(OH) (рис. 3.7) выражена и крайне близка к образцу эталона Fe₂O₃, что является следствием того, что и тот и другой образец являлись материалами с трехвалентным железом в кристаллических α-фазах, а значит тонкая структура выражена с близкими по энергетическим положениям пиками. С другой стороны, соль Мора Fe(NH₄)₂(SO₄)₂·6H₂O, являясь источником атомов железа в зарядовом состоянии 2+ для биогибридного материала имеет существенно иное распределение относительных интенсивностей тонкой структуры спектра, а именно максимум (Fe²⁺) при энергии ~ 708.8 является основным. Поэтому XANES Fe L_{2,3} данные в комбинациях не рассматривались.

1. Комбинация FeO, Fe₂O₃, Fe₃O₄.

На рисунке 3.11 представлен результат моделирования заданной комбинации.

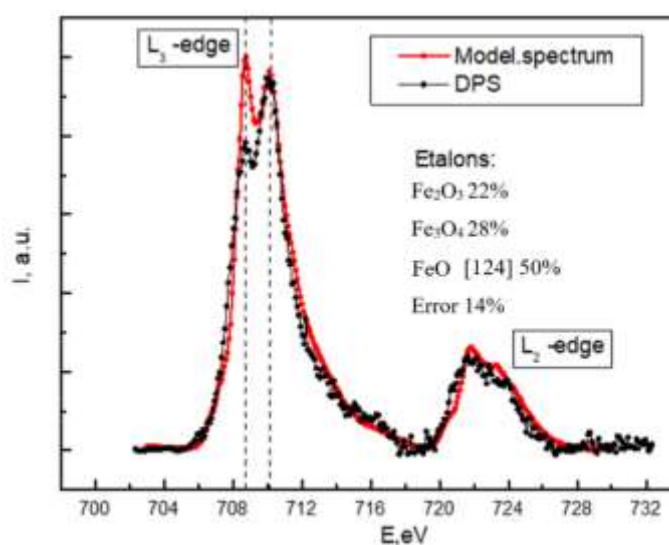


Рисунок 3.11 – Моделирование с использованием эталонов: FeO, Fe₂O₃, Fe₃O₄.

Черным - экспериментальный спектр, красным - модельный спектр

На рисунке 3.11 представлен результат моделирования комбинации Fe_2O_3 , Fe_3O_4 и FeO . При сопоставлении модельного спектра и экспериментального спектра бактериоферритина Dps заметны сходства в области L_2 края поглощения, однако существенные различия области L_3 края поглощения, а именно первого пика позволяют сделать вывод об ином составе неорганического ядра.

2. Комбинация FeO , Fe_2O_3 .

На рисунке 3.12 представлен результат моделирования заданной комбинации.

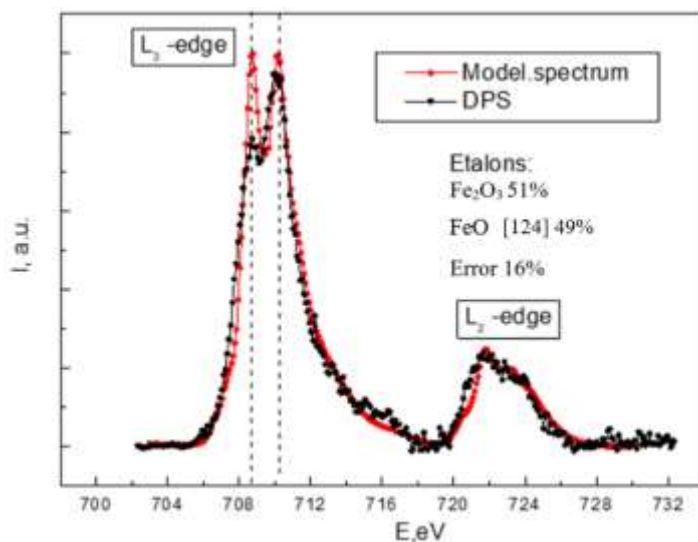


Рисунок 3.12 – Моделирование с использованием эталонов: FeO , Fe_2O_3 (черным - экспериментальный спектр, красным - модельный спектр)

На рисунке 3.12 представлен результат моделирования комбинации Fe_2O_3 , и FeO . При анализе спектров наблюдается схожая картина, что и у комбинации Fe_2O_3 , Fe_3O_4 и FeO , в которой заметны сходства области L_2 края поглощения и заметные различия в области L_3 края поглощения первого пика, у модельного он более интенсивный, что также свидетельствует об ином соотношении вклада оксидов железа в формирование неорганического ядра молекул бактериоферритина Dps.

3. Комбинация Fe_2O_3 , Fe_3O_4 .

На рисунке 3.13 представлен результат моделирования для заданной комбинации.

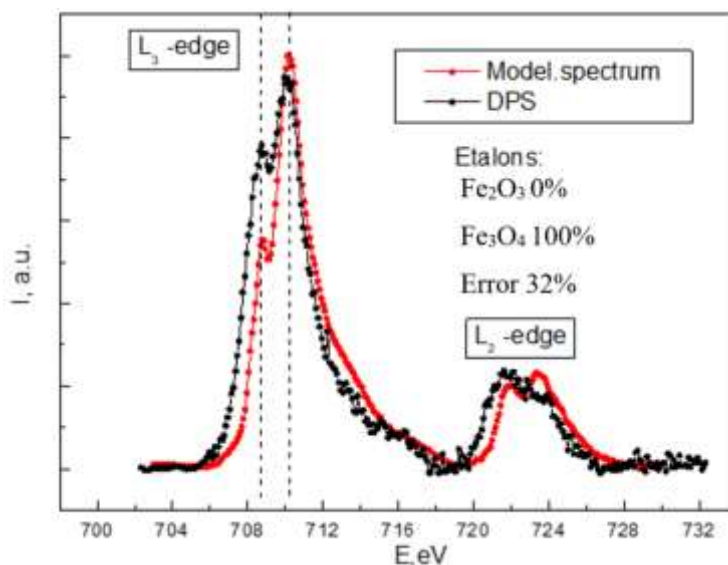


Рисунок 3.13 – Моделирование с использованием эталонов: Fe_2O_3 , Fe_3O_4 (черным - экспериментальный спектр, красным - модельный спектр)

В случае комбинации Fe_2O_3 , Fe_3O_4 ситуация иная – здесь спектр модельный спектр значительно отличается, как в области L_2 края поглощения, так и в области L_3 края поглощения модельный спектр имеет значительные отличия, нежели в предыдущих двух комбинациях, что также говорит о неверном процентном соотношении вклада оксидов железа в формирование неорганического ядра бактериоферритина Dps.

Таким образом при анализе результатов моделирования установлено, что комбинации 1-3 демонстрируют значительные отклонения от экспериментального спектра бактериоферритина Dps в области тонкой структуры края $L_{2,3}$ железа. Эти существенные различия в ключевой области спектра свидетельствуют о том, что данные комбинации оксидов железа не могут корректно описать состав неорганического ядра, исследуемого биогибридного материала.

4. Комбинация FeO, Fe₃O₄.

На рисунке 3.14 представлен результат моделирования комбинации FeO, Fe₃O₄ [120]. Заметно существенно лучшее соответствие результатов моделирования экспериментальному спектру бактериоферритина Dps: модельный спектр демонстрирует высокую степень сходства по энергетическому положению и распределению относительных интенсивностей особенностей тонкой структуры с экспериментальным спектром белка.

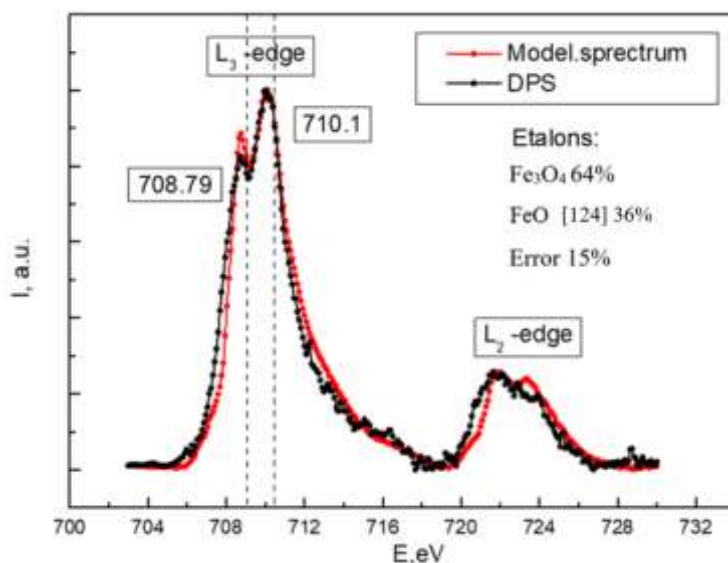


Рисунок 3.14 – Моделирование с использованием эталонов: FeO, Fe₃O₄ (черным - экспериментальный спектр, красным - модельный спектр) [120]

Особенно точное совпадение наблюдается в области основного спектрального пика при энергии 710.1 эВ. К тому же общая погрешность (отклонение) результата моделирования для этой комбинации оказалась минимальной среди всех рассмотренных вариантов. Некоторые расхождения между модельным и экспериментальным спектрами в области L₂ края поглощения объясняются существенно меньшей относительной интенсивностью этого края и, соответственно, большим вкладом шумов, что приводит к неоднозначности в локализации основных спектральных особенностей. Таким образом, проведенное сопоставление данных XANES и последующее моделирование позволяет отметить, что экспериментальный

спектр бактериоферритина Dps наиболее точно описывается комбинацией XANES Fe L_{2,3} спектров оксидов железа Fe₃O₄ (64%) и FeO (36%). Этот результат показывает, что при использованном методе пробоподготовки неорганическое ядро биогибридного материала на основе молекул бактериоферритина Dps преимущественно состоит из оксида с зарядовым состоянием атомов железа Fe³⁺, хотя вклад Fe²⁺ в состав исследованного образца также довольно значителен.

3.3 Атомное строение поверхности биогибридных материалов на основе молекул белка бактериоферритина Dps

Данные об атомном строении состоянии поверхности биогибридных материалов на основе молекул белка Dps были получены методом рентгеновской фотоэлектронной спектроскопии XPS. Эти данные независимо дополняют и расширяют данные синхротронных исследований XANES предыдущего раздела. XPS данные были получены на модуле ЭСХА станции НАНОФЭС синхротрона Курчатов НИЦ Курчатовский институт. Станция оснащена полусферическим анализатором энергии электронов Specs Phoibos 150, монохроматическим источником излучения Al K α от рентгеновской трубкой с анодом из алюминия и энергией 1486.1 эВ и фокусированным источником ионной обработки поверхности аргоном.

В ходе проведения исследований физико-химического состояния поверхности молекулярных бионаногибридных материалов на основе бактериоферритина Dps были получены данные для эталонных образцов системы железо-кислород. Эталонными образцами, данные о которых были получены, являлись: фольга железа с естественным оксидом на ее поверхности (Fe foil), фольга железа с механически удаленным оксидом непосредственно перед помещением в вакуумную камеру спектрометра (Fe foil refresh), порошок α - Fe₂O₃, порошок Fe₃O₄. Кроме того, в качестве эталонных образцов были задействованы два образца соли Мора: порошок и наслоенный водный

раствор в том же режиме что и биогибридные образцы. Напомним, что соль Мора – это сульфат аммония-железа (II), представляющий собой неорганическое соединение, двойная сернокислая соль железа и аммония с формулой $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2$. Также, был использован и водный раствор соли Мора, с концентрацией 20 мкл соли, на 10000 мкл воды. Для анализа полученных спектров использовалась линия $\text{Fe } 2p_{3/2}$, поскольку она является наиболее интенсивной и информативной в сравнении с $\text{Fe } 2p_{1/2}$. Спин-орбитальное расщепление линии $\text{Fe } 2p$ составляет 13.3 эВ [109].

При анализе полученных спектров, представленных на рисунке 3.15, было обнаружено, что на эталонном образце фольги, оксидный слой которого был удален в вакууме (*Fe foil refresh*) наблюдается интенсивный пик от металлического железа Fe^0 при энергии связи 706.7 эВ и, сопоставимый по интенсивности пик, с энергией связи 710.5 эВ, относящийся к оксиду Fe_3O_4 . При рассмотрении образца фольги с естественным оксидом на поверхности (*Fe foil*), также был обнаружен пик от металлического железа при энергии связи 706.7 эВ, однако менее интенсивного в сравнении с пиком, характерным для оксида Fe_2O_3 с энергией связи 710.8 эВ. Данное наблюдение в различиях энергии связи оксидных пиков свидетельствует о том, что при механическом удалении оксида Fe_2O_3 с поверхности фольги непосредственно перед помещением в сверхвысоковакуумную камеру спектрометра проявляются оксиды, имеющие иную стехиометрию, в результате доокисления и (или) находящиеся в глубоких слоях пленки естественного оксида. Этот факт может говорить о процессе окисления металлической фольги через образование оксида Fe_3O_4 . В пользу этого факта говорит то, что при анализе данных, полученных от эталонного образца Fe_2O_3 был обнаружен пик при энергии связи 719 эВ, который в свою очередь является сателлитом для пика $\text{Fe } 2p_{3/2}$ в Fe_2O_3 . В то время как при рассмотрении спектра с поверхности железной фольги с удаленным оксидом, такой сателлит не наблюдается, что подтверждает наличие на ее поверхности оксида Fe_3O_4 [129].

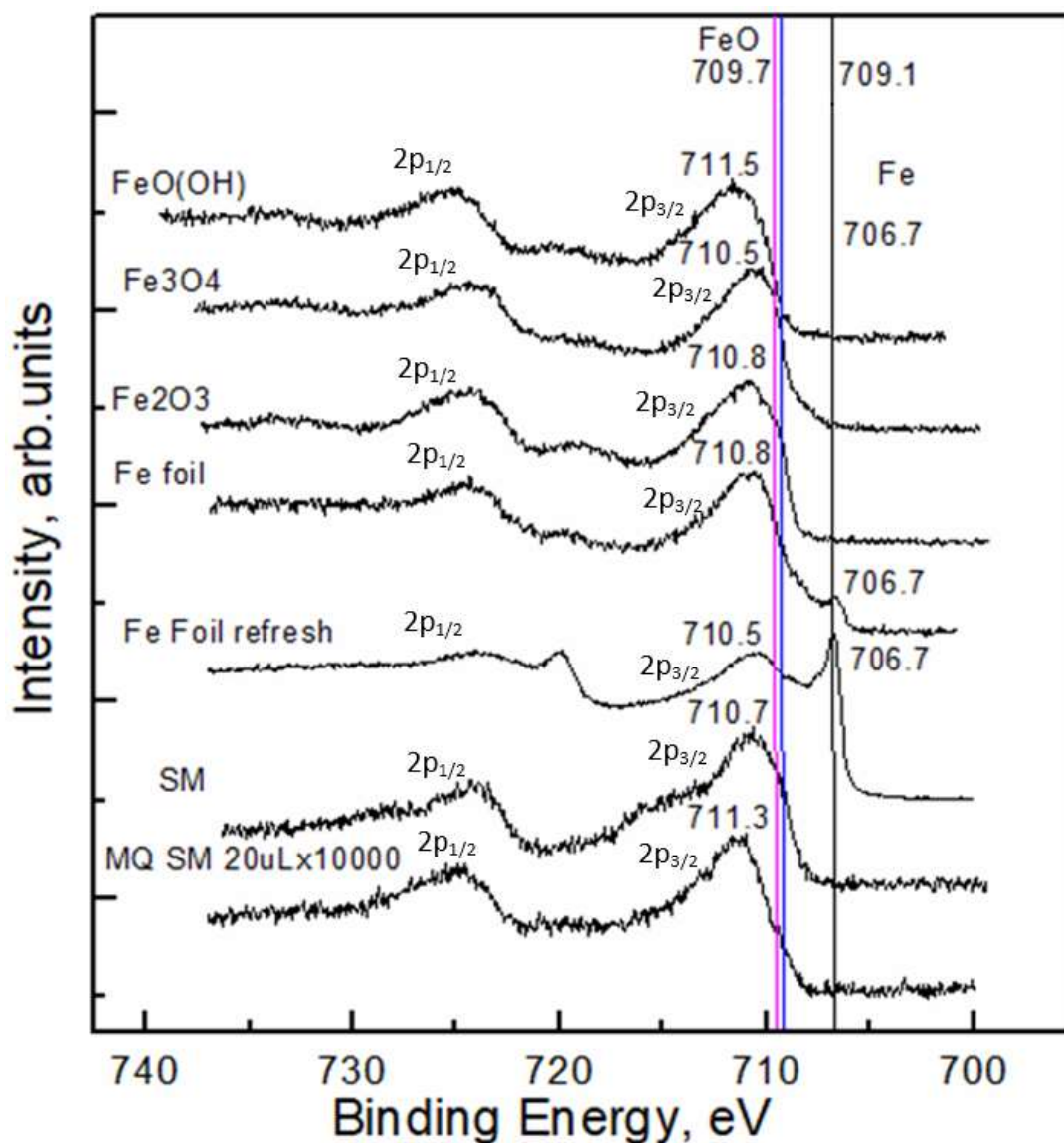


Рисунок 3.15 – XPS Fe 2p эталонных образцов: FeO(OH), Fe₃O₄, Fe₂O₃, Fe foil, Fe foil refresh, а также соли Мора в кристаллической форме (SM) и в виде осажденного водного раствора на фольге из титана (MQ SM)

В том же самое время на спектрах эталонного образца необработанной фольги, образца Fe₃O₄ и FeO(OH) в большей или же меньшей степени достаточно явно наблюдается спутник в этой же области энергии связи, что вполне может говорить о присутствии оксида Fe₂O₃, то есть атомов железа в зарядовом состоянии Fe³⁺ на поверхности этих образцов.

Как уже было отмечено выше, в данном исследовании была использована соль Мора в сухом, кристаллическом виде (SM) и виде осажденного и высушенного раствора (после разбавления соответствующей концентрации,

осаждении и сушки, MQ SM). Спектры XPS, полученные от этих образцов, имеют определенные отличия: в случае спектра с образца кристаллов соли Мора наблюдается пик, соответствующий Fe_2O_3 (зарядовому состоянию $3+$), что, по видимому, является результатом регистрации данных от поверхности кристалликов соли Мора, где в пределах глубины анализа XPS детектируется сигнал от атомов железа доокисленного естественным образом до Fe^{3+} . При энергии связи 710.7 эВ, однако в то же время был обнаружен и достаточно широкий пик, при энергии ~ 715 эВ, который не имеет явных соответствий с известными значениями энергий связи соединений железа [67] и вполне может оказаться сателлитом. Говоря о спектре образца с осажденным и высушенным раствором соли Мора в очищенной воде марки MilliQ, заметно присутствие характерного пика, однако основное значение энергии связи в этом случае 711.3 эВ, что ближе к $\text{FeO}(\text{OH})$, и также обнаружено изменение спада интенсивности при энергии 709.6 эВ, что в свою очередь, соответствует литературным данным для FeO [67] (зарядовое состояние $2+$). Известно, что для соли Мора в растворах ион Fe^{2+} даже слабыми окислителями легко окисляется до Fe^{3+} .

В качестве исследуемых образцов биогибридных материалов были исследованы следующие, представленные на рисунке 3.16: бактериоферритин Dps после наслаивания на подложку (initial), бактериоферритин Dps после ионного травления при 1 кВ и 1 мкА в течение 30 минут в камере спектрометра (initial+ion sputtering), бактериоферритин Dps после отжига ex-situ в водороде при 400°C (anneal H_2 400C) и образец бактериоферритина Dps после отжига в сверхвысоком вакууме в камере спектрометра в течение 30 минут при температуре 400°C (UHV anneal 400C). Целью термической обработки являлось установление возможности восстановления зарядового состояния атомов железа вплоть до Fe^0 что важно для техники и технологий различных функциональных структур. Скорость удаления слоев поверхности при таком режиме обработки ионами аргона оценена нами для соединений железа как $\sim 1-2$ А/мин. Очевидно, для оболочки органических контейнеров биогибридного материала – молекул белка эта скорость значительно выше, до ~ 30 нм/мин [110].

При рассмотрении полученных данных от экспериментальных образцов были обнаружены следующие особенности. В случае анализа спектра образца бактериоферритина Dps после наслаивания на подложку (initial) было выявлено, что на поверхности молекул наблюдаются три наиболее выраженных состояния при энергиях ~ 707.3 эВ, ~ 710.0 эВ и ~ 715.2 эВ, характерных для металлического железа, Fe_2O_3 и сателлита, соответственно. В случае образца, подвергнутого ионному травлению (initial+ion sputtering) (рис. 3.16), интенсивность пика, характерного для металлического железа, значительно вырастает, в связи с чем можно сделать вывод, что процесс ионного травления длительностью в 30 минут привел к частичному удалению слоя, глубина которого составила до ~ 180 нм с поверхности образцов.

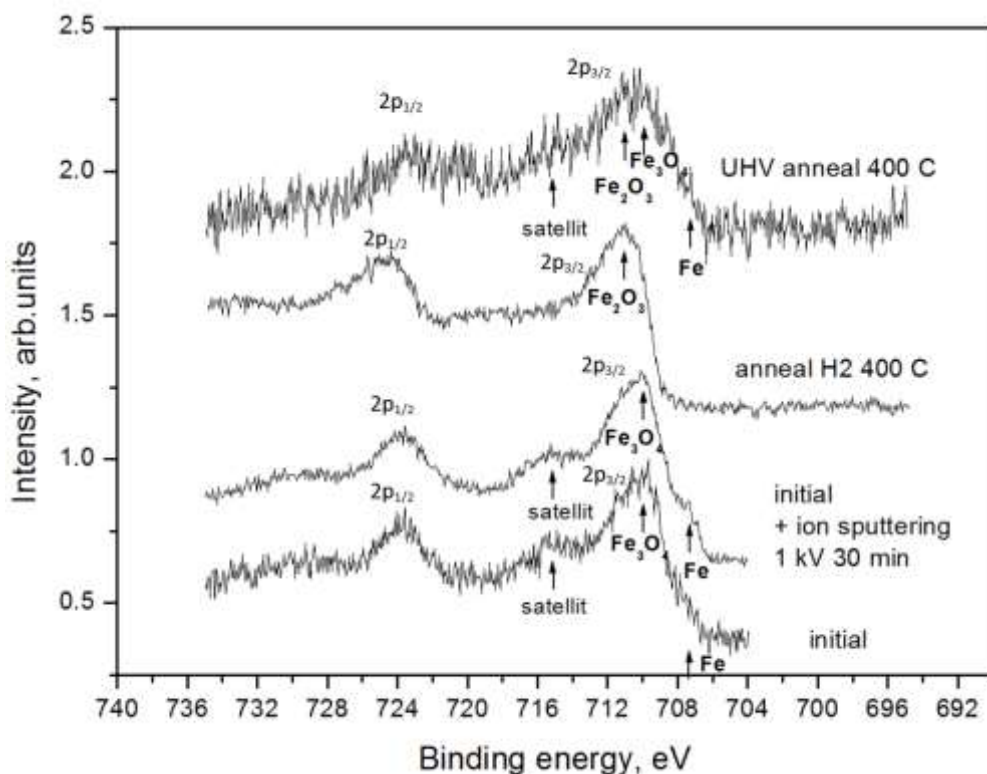


Рисунок 3.16 – XPS Fe 2p бактериоферритина Dps после наслаивания (initial), после ионного травления (initial+sputtering), после отжига в водороде (H_2 anneal) и после отжига в сверхвысоком вакууме UHV отожженных образцов (UHV anneal)

Также на образцах после отжига присутствует пик с энергии связи 711.01 эВ, характерный для Fe_2O_3 , и отсутствуют признаки металлического железа, что объясняется тем, что после проведенного отжига *ex-situ* образцов в среде водорода H_2 при 400°C в течение 1 часа, последующая доставка образцов до спектрометра заняла до 24 часов, а также ускорением процесса окисления железа, содержащегося в исследуемом образце непосредственно сразу после обработки и доставки к спектрометру.

Анализируя спектр образца, представляющего бактериоферритин Dps после отжига в сверхвысоком вакууме в камере спектрометра в течение 30 минут при температуре 400°C (UHV anneal 400 C) был обнаружен пик с энергией связи 711.0 эВ, характерный для Fe_2O_3 и наблюдаемый в образце после процедуры отжига в водороде, помимо уже наблюдавшихся пиков с энергией связи 707.2 эВ, 709.9 эВ и 715.1 эВ, характерных для металлического железа Fe^0 , Fe_3O_4 и сателлитному пику соответственно.

Полученные данные говорят о том, что процедура вакуумного отжига, а также отжига в водороде приводят к последующему изменению состава по отношению к исходному биогибриднему материалу, что может использоваться для контролируемого управления физико-химическим состоянием поверхности исходного объекта.

На рисунке 3.17 показаны четыре состояния образца:

- После отжига *ex-situ* в атмосфере водорода при температуре 200°C вне спектрометра (anneal H_2 200 C);
- После отжига *ex-situ* в атмосфере водорода при температуре 400°C вне спектрометра (anneal H_2 400 C);
- Состояние исходного биогибридного материала после ионной обработки (1 кВ, 1 мкА, длительность 30 минут) в камере спектрометра;
- Исходное состояние после нанесения на подложку.

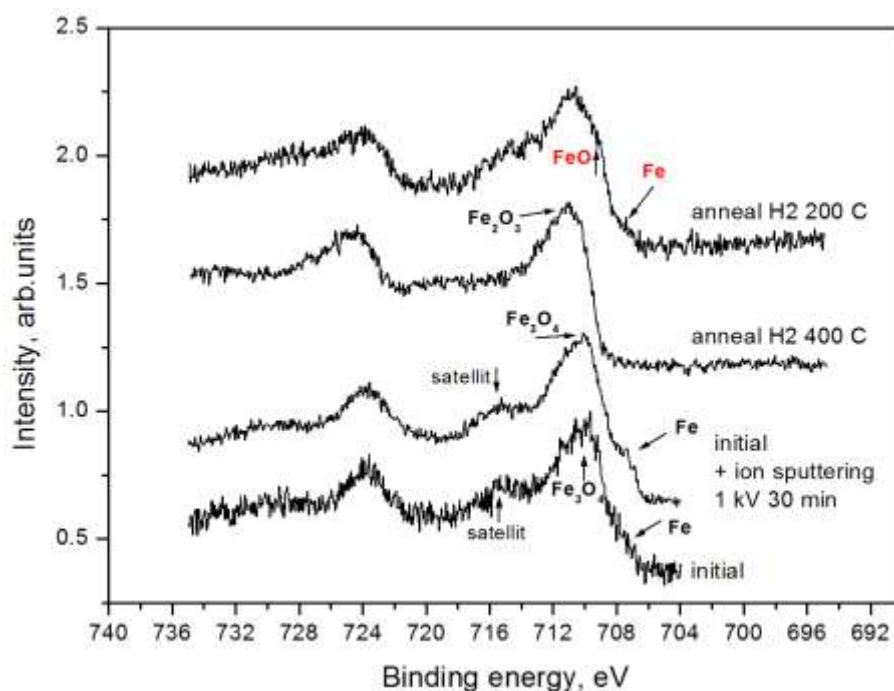


Рисунок 3.17 – XPS Fe 2p бактериоферритина Dps после наслаивания (initial), после ионного травления (initial+sputtering), после отжига в водороде при 400° C (anneal H₂ 400 C) и после отжига в водороде при 200° C (anneal H₂ 200 C)

Изучение результатов образца, отожженном ex-situ в водородной среде при температуре 200°С в течение часа, показывает заметные отличия от образца, нагретого при 400°С (оба образца доставлялись к измерительному прибору одинаковым способом). Анализ XPS данных образца выявил комплексный состав железосодержащих соединений [122]. Наряду с основным пиком Fe₂O₃, локализованным при энергии связи 711.0 эВ, в спектре отчетливо проявляется сигнал, соответствующий металлическому железу (707.2 эВ). Дополнительно зарегистрировано характерное спектральное плечо при 709.3 эВ, которое идентифицируется как проявление фазы монооксида железа FeO. Принимая во внимание идентичность условий термической обработки и транспортировки образцов к измерительному оборудованию, можно сделать вывод о определяющей роли температурного фактора в процессах фазообразования бактериоферритина Dps. Экспериментальные данные указывают на то, что термическая обработка при 200°С не обеспечивает необходимых энергетических условий для завершения процесса окисления железа до состояния Fe₂O₃ в

исследуемых биогибридных материалах. Присутствие различных железосодержащих фаз является индикатором незавершенных окислительных процессов в молекулах, хотя данный температурный режим в водородной среде оказывается достаточным для инициации изменений состава по отношению к нативному бактериоферритину Dps.

Рисунок 3.18 демонстрирует XPS данные для обработки: исходное состояние после нанесения на подложку (initial), состояние после ионного травления в спектрометре при 1 кВ, 1 мкА, в течение 30 минут (initial+ion sputtering) [122], результат после отжига ex-situ в водородной атмосфере при 400°C (anneal H₂ 400 C), а также последующего ионного травления отожженных образцов при идентичных параметрах травления (1 кВ, 1 мкА) в течение двух временных интервалов - 30 минут и 1 час (H₂ anneal 400 C + 0.5 hour sputter и H₂ anneal 400 C + 1 hour sputter соответственно).

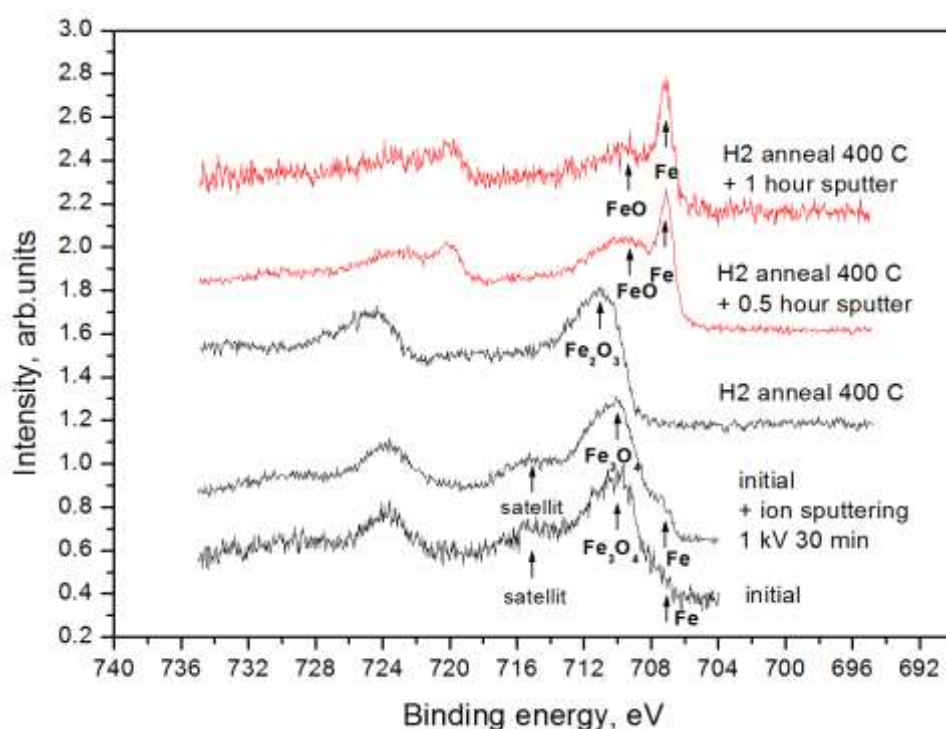


Рисунок 3.18 – XPS Fe 2p биогибридного молекулярного материала после нанесения (initial), после ионного травления (initial+sputtering), после отжига в водороде (H₂ anneal) и после ионного травления отожженных образцов (H₂ anneal+sputter)

Для образца, подвергнутого отжигу *ex-situ* в водородной атмосфере при 400°C и получасовому ионному травлению, отмечается присутствие двух пиков: характерного для металлического Fe с энергией связи 707.1 эВ и монооксида железа (FeO) с энергией связи при 709.3 эВ, причем сигнал от чистого металла был более выраженным. Двукратное увеличение продолжительности ионного травления сохранило качественную картину особенностей спектра, но привело к уменьшению интенсивности пика оксида, в то время как пик металлического железа остался неизменным. Эти результаты показывают, что процесс ионного травления образцов биогибридного материала на основе молекул бактериоферритина Dps, предварительно отожженных в водороде, существенно меняет фазовый состав по сравнению с исходным материалом, и с образцами после отжига в водороде. Показало, что в процессе переноса образцов, отожженных в водороде, в камеру спектрометра происходит полное окисление железа. Последующее применение ионного травления удаляет оксидный слой, что подтверждает наличие структуры типа "ядро-оболочка" и выявляет внутреннюю неокисленную составляющую небольших кластеров, состоящих из атомов железа.

Обобщение полученных результатов демонстрирует, что все использованные методы модификации приводят к изменениям состава исходных биогибридных материалов на основе молекул белка Dps. При этом наиболее существенные изменения были достигнуты при комбинированном воздействии: сначала отжиг в атмосфере водорода при температуре 400°C (*ex-situ*), а затем ионное травление обработанных образцов.

3.4. Выводы к главе 3

Таким образом, комплексные исследования морфологии, атомного и электронного строения, состава и физико-химического состояния молекул белка Dps и биогибридного материала на его основе показали следующее.

1. Отработаны подходы к синтезу и пробоподготовке биогибридных материалов на основе молекулярной культуры белка Dps бактерий кишечной палочки *E.coli*, в том числе для синхротронного рентгеноэлектронного эксперимента.

2. Впервые экспериментально, методом криоэлектронной микроскопии высокого разрешения без применения контрастирования обнаружено, что в нативном (исходном) состоянии природный контейнер неорганических наночастиц представляет собой молекулу белка Dps с внешними размерами до 10 нм и размерами внутренней полости до 7 нм.

3. Неорганические наночастицы внутри полых частей молекул, с размерами не превышающими ее внутренней диаметр, не агрегируют.

4. В нативном (исходном) состоянии молекулы белка Dps способны формировать квазиупорядоченные слои толщиной в одну молекулу.

5. Показано, что ионы атомов железа в различном зарядовом состоянии Fe^{2+} и Fe^{3+} формируют композиционный состав неорганических наночастиц биогибридных материалов. При этом показана возможность восстановления ионов железа до металлического состояния при термической обработке в водороде или (и) ионной бомбардировке.

ГЛАВА 4. АТОМНОЕ И ЭЛЕКТРОННОЕ СТРОЕНИЕ БИОГИБРИДНЫХ МАТЕРИАЛОВ НА ОСНОВЕ КЛЕТОК КИШЕЧНОЙ ПАЛОЧКИ *ESCHERICHIA COLI*

Как было отмечено в разделе 1.2 источником молекулярной культуры, на основе которой представляется возможным сформировать биогибридные материалы, являются клетки кишечной палочки *E.coli*. В этом же разделе говорится о том, что традиционным способом выделения молекулярной культуры белка бактериоферритина Dps является разрушение одноклеточных бактерий кишечной палочки и через достаточно сложный набор технологических подходов выделение молекулярной культуры (раздел 2.1). Таким образом, клетка *E.coli* является однократным источником молекул белка бактериоферритина Dps. Тем не менее (раздел 1.2) существует возможность модификации клеток кишечной палочки таким образом, что этот источник может быть использован многократно для получения молекулярных культур на основе белка Dps. В этом случае клеточная культура модифицируется для перехода в состояние суперпродукции белка (раздел 2.1). Более того, не исключено, что клеточная культура, модифицированная до суперпродукции белка Dps может насыщаться источником неорганических наночастиц (а именно солью Мора) как и внутренние полости молекул белка.

Очевидно, молекулы белка, даже в режиме суперпродукции, будут формироваться внутри клетки. Однако не исключена возможность выхода белковых молекул бактериоферритина Dps для клеток находящихся в стадии суперпродукции через клеточную мембрану во внеклеточное пространство. То есть если традиционно клетка кишечной палочки является однократным источником молекулярной культуры и биогибридного материала на его основе, то в состоянии суперпродукции клетка *E.coli*, не разрушаясь, может быть использована многократно. Таким образом, интерес представляет изучение клеточной культуры кишечной палочки *E.coli*, находящейся в состоянии суперпродукции молекул белка бактериоферритина Dps при

добавлении соли Мора в среду существования клеток (культуральный раствор) и установление наличия атомов железа внутри клетки, на клеточной мембране и во внеклеточном пространстве. По имеющимся у нас данным такие исследования ранее не проводились. Изучению этого вопроса посвящена настоящая глава.

4.1 Морфология клеток кишечной палочки *E.coli*.

С учетом известных размеров одноклеточных бактерий кишечной палочки *E.coli* наиболее применимым способом для изучения их размеров и морфологии в наших экспериментах является метод сканирующей (растровой) электронной микроскопии SEM. Детали применения этого метода приведены в главе 2. Использование данного метода предусматривает помещение объекта исследования в условия вакуума (вакуумирование) или в низковакуумном режиме для изучения подобного рода объектов. С другой стороны, известно, что клеточная мембрана кишечной палочки, как и сама клетка, представляет собой достаточно устойчивый объект, в том числе и при вакуумировании.

На рисунке 4.1 представлено изображение SEM исходной культуры кишечной палочки, сформированной в условиях, описанных в разделе 2.1. Микрофотография SEM позволяет оценить размеры одной клетки порядка 3 мкм в длину и около 1 мкм в ширину. Все клетки имеют приблизительно эллиптическую форму, ровные и неизменившиеся в результате вакуумирования границы. Режим подготовки проб, указанный в разделе 2.1 позволил сформировать такой образец, при котором поверхность несущей подложки покрыта слоем в одну клетку. Практически полностью отсутствуют заметные повреждения в форме клеток кишечной палочки в результате вакуумирования, в том числе и при сравнении с известными литературными данными [130-132].

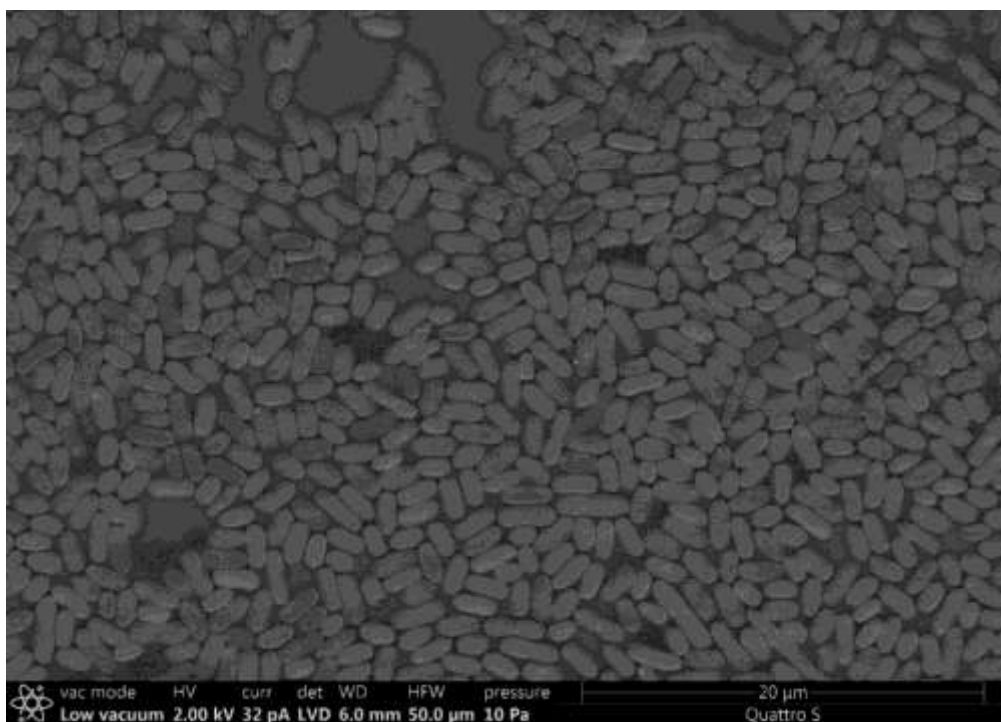


Рисунок 4.1 – Изображение SEM исходной культуры клеток *E.coli*

Клеточная культура, модифицированная в режим суперпродукции белка и после насыщения культуральной жидкости солью Мора, также была изучена методом SEM. Набор изображений приведен на рисунке 4.2. Заметно, что перевод клеточной культуры в состояние суперпродукции не дал заметного изменения в размерах и форме одноклеточных бактерий *E.coli*. Для формирования пробы, изученной методом SEM, использовался тот же режим насаивания, что и для исходной пробы.

Таким же образом удалось получить распределение клеток на поверхности кремниевых или молибденовых подложек толщиной в одну клетку практически полностью покрывающих эти подложки либо имеющих относительно фрагментарную компоновку. Также отметим, что клетки, сформированные в режиме суперпродукции по данным SEM, не претерпевают изменений в форме и размерах в результате вакуумирования. В середине изображения на рисунке 4.2 (г) находится морфологически выделяющаяся область, приблизительно треугольной формы, отличающаяся от покрытия клеточной культуры или от непокрытых клетками участков подложки.

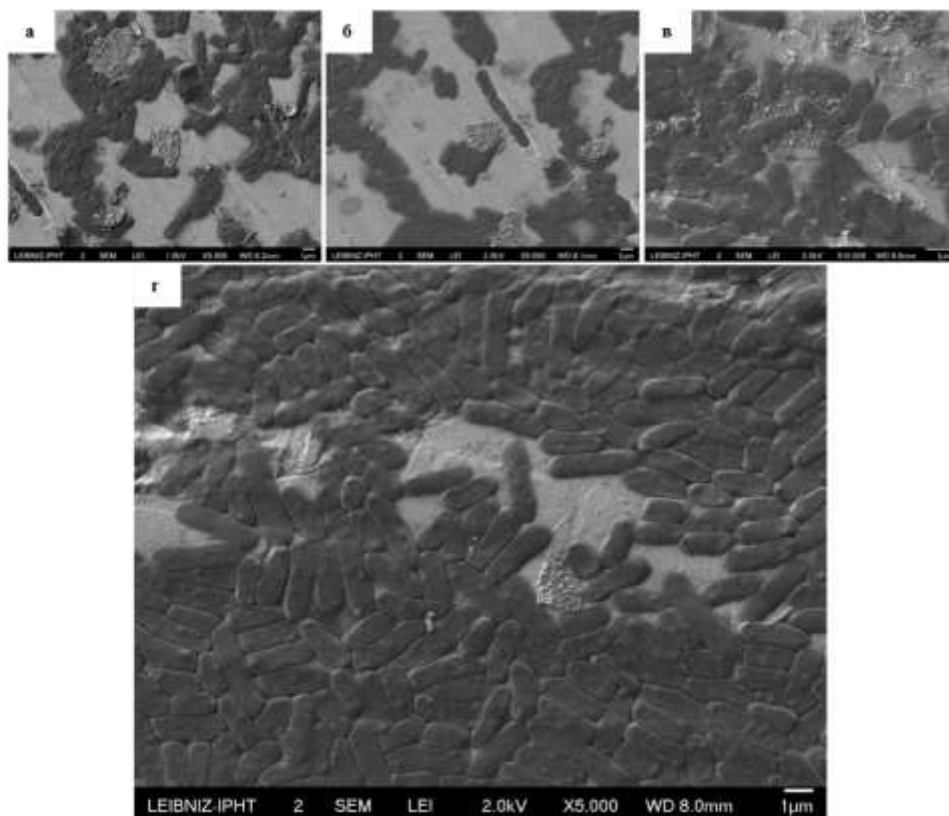


Рисунок 4.2 – Изображения SEM клеток *E.coli* в состоянии суперпродукции (а, б, в – даны в уменьшенном масштабе)

Учитывая то, что это область фактически происходит из одной (расположенной слева) или нескольких (расположенных вокруг) клеток, представляется возможным предположить, что в данном случае мы видим результат выхода молекул избыточного белка бактериоферритина Dps. Вставки на рисунке 4.2 (а, б, в) демонстрируют тот факт, что сделанное наблюдение не является единичными. Таким образом, представляется возможным предположить, что клетки, которые модифицированы в состояние суперпродукции, то есть в состоянии избыточного производства белковых молекул бактериоферритина Dps, при вакуумировании, либо до помещения в вакуумные условия, могут освобождаться через клеточную мембрану от избыточного количества производимого белка.

Эти же образцы «модифицированных» клеток (рис. 4.1) были исследованы методом энергодисперсионного микроанализа (рис. 4.3). На рисунке 4.3 (а) приведено изображение, полученное в режиме SEM, участка

для которого составлена (рис 4.3 б) микроскопическая карта совместного распределения элементов, найденных в изученном материале, а именно железа и азота.

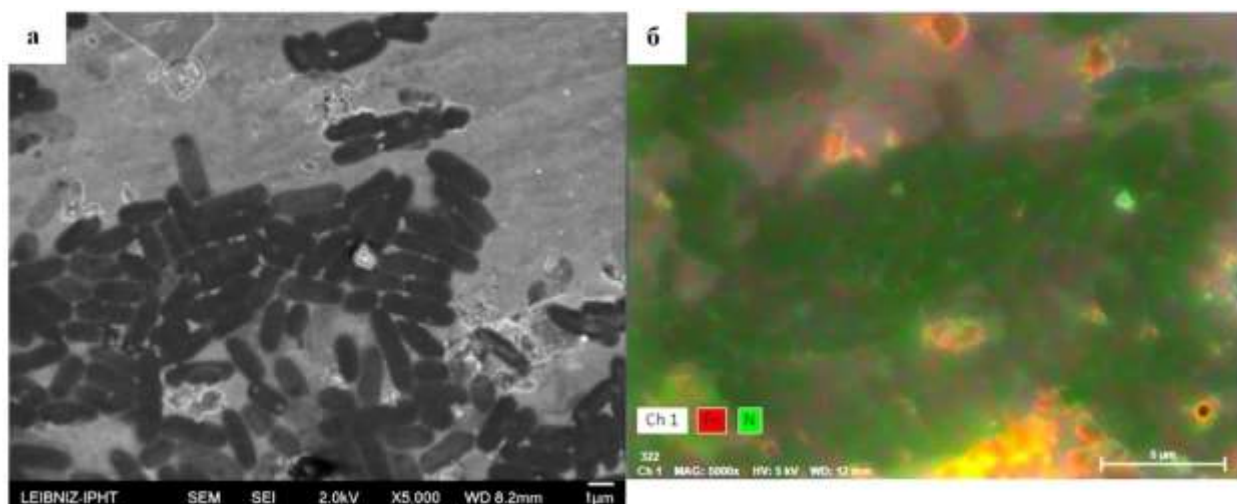


Рисунок 4.3 – Изображения SEM (а) и Микроанализа в виде картирования (б) совместного распределения атомов азота и железа массива клеток *E.coli* в состоянии суперпродукции

Заметно, что наиболее интенсивный сигнал от атомов железа находится в областях (справа), для которых на изображении SEM (слева) выявлены дополнительные морфологические особенности, предположительно являющиеся результатом суперпродукции молекул белка. С другой стороны, в области сосредоточения клеток также присутствует сигнал от атомов железа определенного уровня.

На рисунке 4.4 приводится энергодисперсионный спектр участка поверхности приведенного на рисунке 4.3. Помимо пиков очевидного происхождения (сигнала от соответствующих атомов) подложки (молибден), клеточной и(или) белковой культуры (углерод, кислород, азот и др), четко просматривается сигнал от атомов железа. Возможно отметить, что очевидно этот сигнал не является сигналом от продуктов растворения соли Мора, так как присутствует фрагментарно лишь там, где заметны морфологические выбросы из близлежащих к ним клеток (рисунок 4.3), в то время как открытые области подложек практически не содержат соответствующего сигнала.

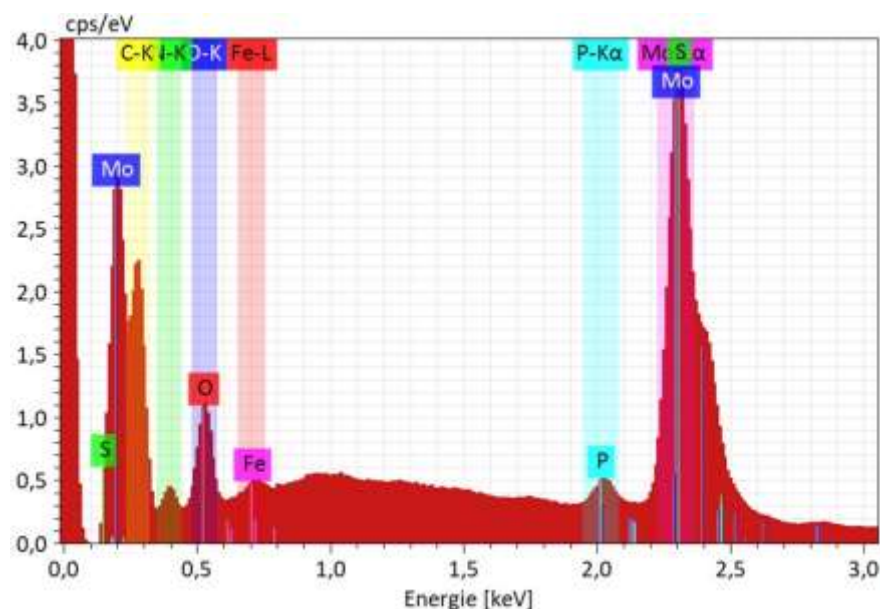


Рисунок 4.4 – Энергодисперсионный спектр участка поверхности приведенного на рисунке 4.3

Таким образом, результаты исследования методом SEM массива клеток *E.coli* в состоянии суперпродукции показывают, что некоторое количество избыточного белка, которое вероятно накапливается внутри клеток, попадает на поверхность мембраны, во внеклеточное пространство и содержит атомы железа.

4.2 Особенности атомного строения массивов клеток кишечной палочки *E.coli* в состоянии суперпродукции.

Для исследования физико-химического состояния массивов клеток кишечной палочки методом фотоэлектронной спектроскопии XPS были подготовлены пробы, идентичные представленным в предыдущем разделе. Основываясь на опыте применения ионного травления для биогибридных объектов рассмотренных в Главе 3, в исследовании клеточных материалов мы провели ионное травление их поверхности для выяснения физико-химического состояния внутренней части сформированных объектов (внутренней части клеток). Было изучено несколько идентичных образцов для которых отметим, забегая вперед, были получены идентичные результаты.

Ионное травление проводилось ступенчато. Первый этап травления проводился в течение двух часов пучком ионов аргона с энергией 1 кВ. Далее от обработанной ионным пучком поверхности регистрировались XPS данные. Второй этап ионного травления производился без изменения в положении держателя с образцов, при энергии 1 кВ на протяжении 150 минут и дополнительно при энергии ионов 3 кВ в течении 15 минут.

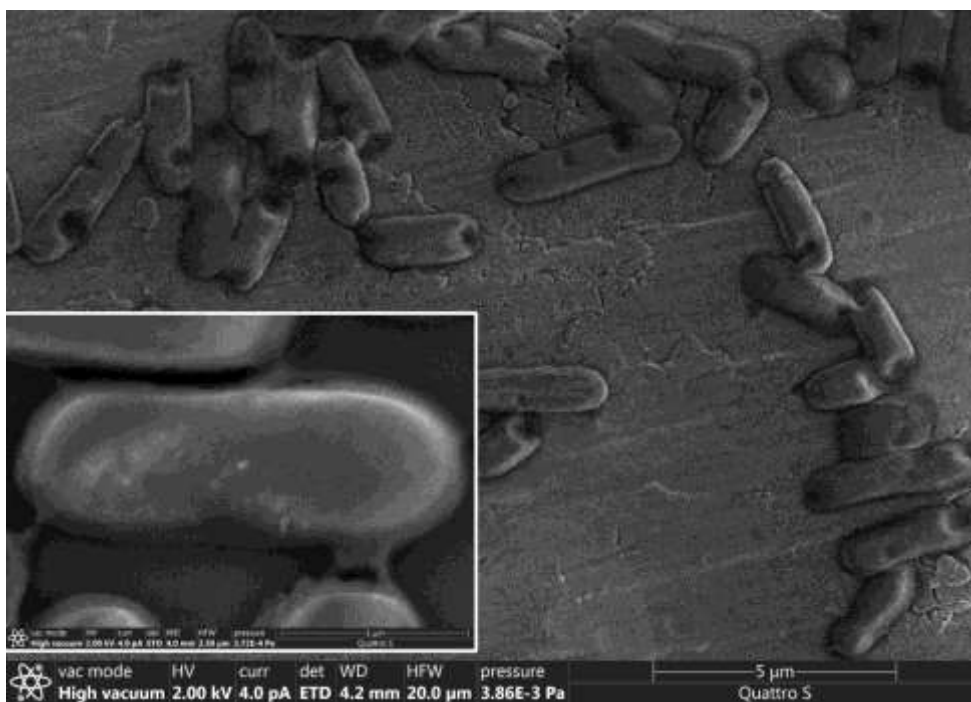


Рисунок 4.5 – Изображение SEM исходного массива клеток *E.coli* в состоянии суперпродукции белка Dps

Оценка толщины (от поверхности) той части клетки, которая была удалена в результате ионного травления, была произведена качественно, в силу сложного состава и еще более сложной макро- и микроструктуры такого объекта живой природы как бактерии кишечной палочки. Для первого этапа травления - это оценка составила около 300 нм, второй этап травления, по нашей оценке, удалил ещё около 500 нм. Данные SEM для исходного массива клеток, полученные перед выполнением фотоэлектронных экспериментов представлены на рисунке 4.5. А на рисунке 4.6 показан результат обработки ионным пучком массива клеток кишечной палочки после первого этапа.

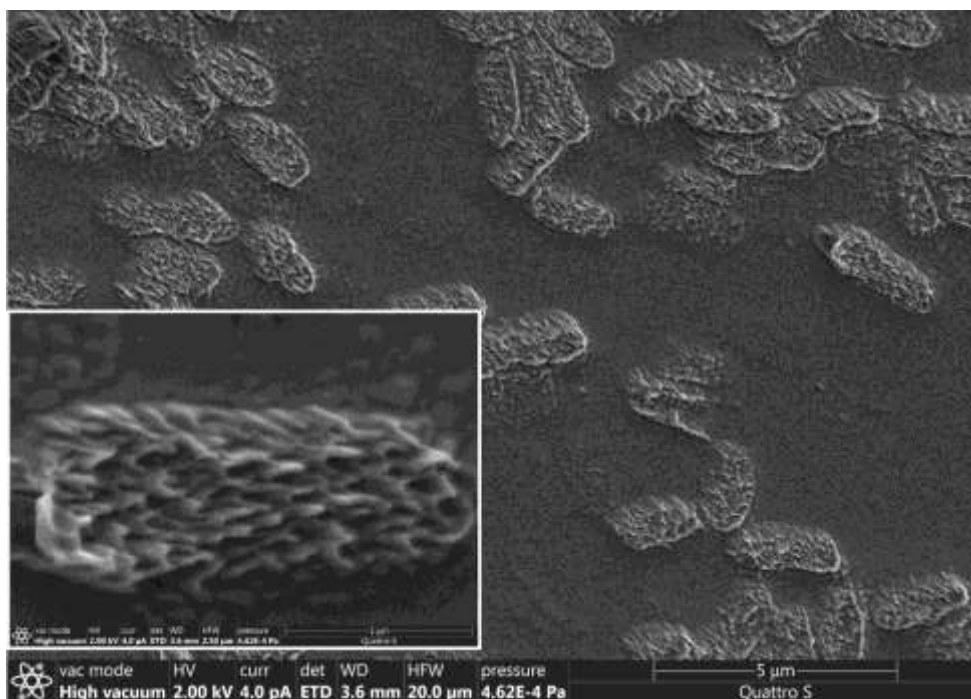


Рисунок 4.6 – Изображение SEM массива *E.coli* в состоянии суперпродукции белка Dps после удаления ~ 300 нм верхних частей клеток ионным пучком

Направление ионов на вставке рисунка 4.6 справа налево. Данные SEM подтвердили, в целом, оценки на качественном уровне толщин удаленных частей клеток. Удаление верхней части клеток ионным пучком позволило не только заглянуть внутрь мембраны *E.coli*, но и провести оценку физико-химического состояния внутренней части клеток в состоянии суперпродукции после взаимодействия с солью Мора.

На рисунке 4.7 приведены обзорные спектры трех образцов с клеточной культурой, отличия лишь в проведенном травлении. Образец, обозначенный как Cells on Si, является исходным образцом, не подвергавшимся ионному травлению, и был сформирован на подложке кремния, альтернативно к молибдену, для которого результат воспроизвелся. Во всех исследуемых образцах наблюдаются линии кислорода O 1s с энергией ~ 530 эВ, углерода C 1s ~ 285 эВ, а также линия Оже-перехода O KLL расположенная при энергии ~ 1кэВ. В исходном образце также наблюдается линия Na 1s при энергии 1072 эВ, являющаяся сигналом от остаточных фрагментов солей, присутствующих в культуральной жидкости и отсутствующая в образцах после ионного

травления. Это может быть связано с нахождением ее в поверхностных слоях образцов, которые удаляются при их ионном травлении, а во внутренней части клетки их нет. Кроме того, в исходном образце наблюдается линия азота N 1s с энергией ~ 400 эВ. Она также наблюдается в образце после первого этапа травления, и отсутствует после второго этапа, вероятно в силу своей исходно малой интенсивности. Что говорит также о том, что наблюдение линии азота является сигналом от атомов в составе клетки.

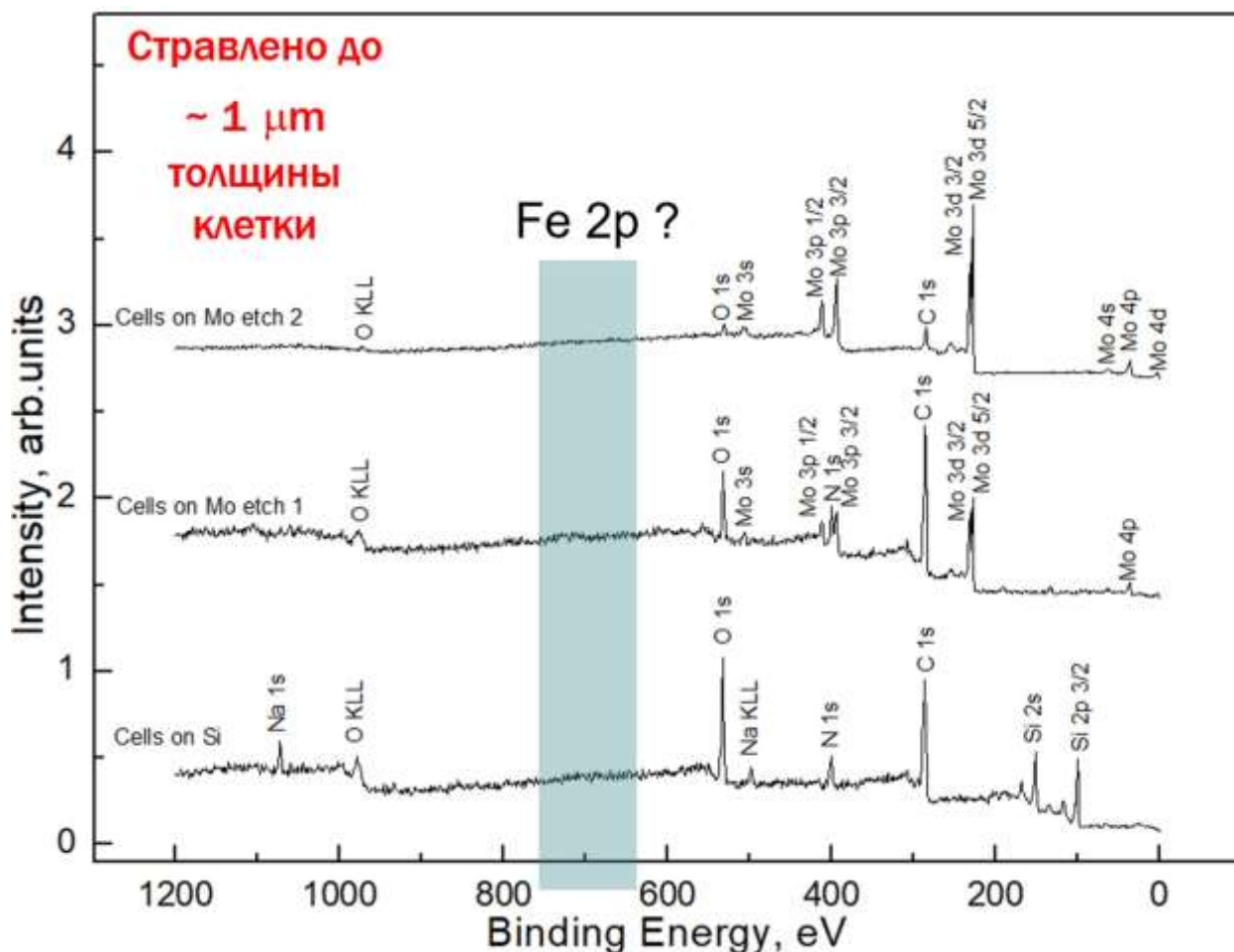


Рисунок 4.7 – Обзорные XPS спектры образцов клеточной культуры

Следует отметить, что в процессе травления образцов уменьшается также интенсивность линий кислорода и углерода, а также происходит перераспределение их интенсивностей, что говорит о наблюдении результата стравливания верхней части клетки. Линии подложек молибдена и кремния ожидаемо детектируются «на своих местах».

Отсутствие линий железа (ожидаемые Оже-переход LMM железа и остовные Fe 2p линии расположены при энергиях 800 и 700 эВ соответственно) на обзорных спектрах образцов говорит о небольшом количестве железа в исследуемых образцах и, соответственно, очень малой интенсивности соответствующих линий по сравнению с наблюдаемыми элементами, так, что зарегистрировать их на обзорных спектрах не представилось возможным.

Нами было замечено, что, даже несмотря на различные временные промежутки, которые были выбраны для ионного травления поверхности образца, - существенных различий между спектрами обнаружено не было. Поэтому можно сделать вывод о том, что, если в клеточной культуре находится железо, то в примерно одинаковых малых концентрациях, во внеклеточном пространстве, на поверхности (мембрана клетки) и в объеме. Это следует из того, что по известным данным о размерах отдельно взятой клетки *E.coli* высота ее составляет ~ 1 мкм. По полученным ранее данным SEM, мы установили, что толщина нанесенного слоя из клеточной культуры на подложку имеет преимущественную толщину в 1 клетку, в то время как при травлении нами было снято ~0.5 мкм, т.е. «половина» клетки.

В отличие от образцов клеточных массивов линии железа четко детектируются для эталонов, что было использовано нами в дальнейшем. Рассматривая далее наиболее интенсивную линию, по сечению фотоионизации Fe 2p линии, мы вновь приведем данные эталонов с их обозначением, в сравнении с сигналом от атомов железа в клетках, который нам удалось зарегистрировать путем значительного увеличения количества накоплений, до полутора сотен (против нескольких десятков для эталонов). Отметим, что для контроля возможного радиационного поражения массива клеток *E.coli* на подложке SEM данные снимались и после XPS и иных рентгеноэлектронных измерений (см. следующий раздел), показав устойчивость изучаемых объектов.

На рисунке 4.8 представлены экспериментальные спектры XPS эталонных образцов системы железо-кислород и исследуемых образцов. Описание XPS данных эталонных образцов приведено в разделе 2.3.

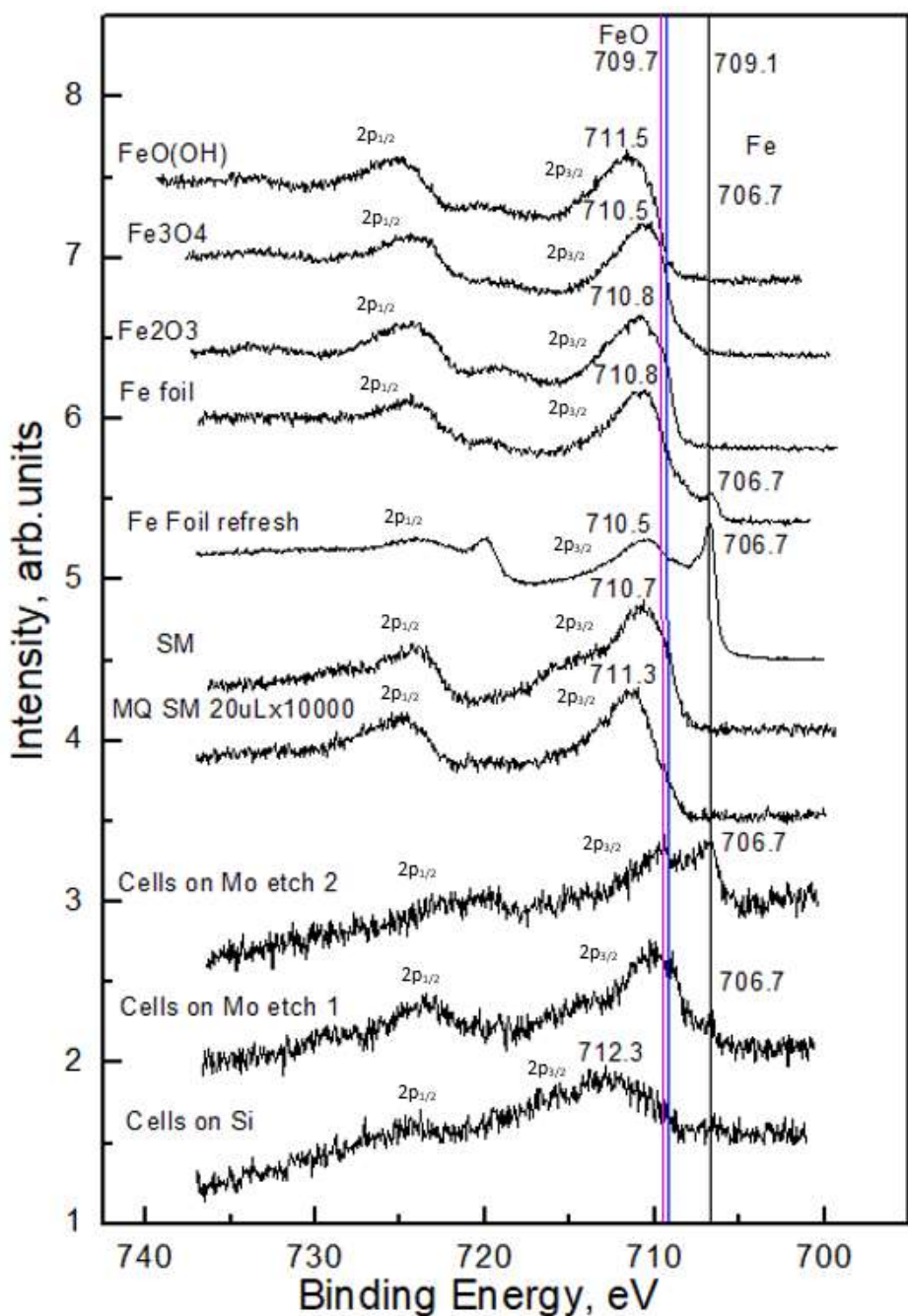


Рисунок 4.8 - XPS экспериментальных проб с высоким накоплением (три нижних спектра) в сопоставлении с XPS эталонов

Анализ данных XPS исходных клеточных массивов показал достаточно широкий основной пик, что может говорить о наличии на поверхности исследуемого образца нескольких состояний оксида железа, таких как

монооксид железа с энергией связи 709.1-709.7 эВ, Fe₂O₃ и Fe₃O₄ с энергиями связи 710.8 и 710.5 эВ, соответственно. Кроме того, при энергии 712.6 эВ наблюдаются состояния, по энергии связи сопоставимые с соединением FeSO₄, происхождение которых может быть связано с остатками соли Мора в питательной среде клеток. Травление ионами Ar первого этапа с удалением ~ 300 нм верхней части клеток, приводит к заметному перераспределению особенностей Fe 2p спектра. Появляется достаточно заметный пик при энергии 706,7 эВ, соответствующий Fe⁰ и возрастает максимум с энергией связи ~ 709.7 эВ, что может говорить о наличии атомов железа в зарядовом состоянии 2+ [67, 108, 109, 111]. После второго этапа травления (удалено ~ 800 нм), интенсивность пика Fe при энергии 706.7 эВ выросла и сравнялась с оксидным пиком, в котором стала преобладать энергия связи характерная для FeO среди оксидов Fe₂O₃ и Fe₃O₄. Эти данные находятся в хорошем соответствии с результатами воздействия ионов аргона на биогибридный материал молекул белка бактериферритина, представленный в разделе 3.3, где была показана возможность восстановления зарядового состояния атомов железа до Fe⁰ при воздействии ионного травления.

Таким образом, можно заключить, что в исходном образце исследуемых клеток наблюдаются оксиды железа FeO, Fe₂O₃, и Fe₃O₄, а также предположительно компоненты, содержащиеся в соли Мора. Ионное травление, приведшее к удалению ~ 300 нм верхней части клеток приводит к удалению компонент соли Мора, что, по-видимому, говорит об их нахождении на поверхности клеток, а не в объеме. Профилирование также приводит к повышению интенсивности оксидных компонент и частичному восстановлению металлического Fe. Дальнейшее удаление еще ~ 500 нм приводит к значительному понижению вкладов Fe²⁺ и Fe³⁺ оксидных компонент. При этом вклад Fe⁰ становится преобладающим. То есть на поверхности «исходных» клеток в состоянии суперпродукции, в несколько нанометров клеточной мембраны, отсутствуют атомы железа в заметном количестве в состоянии Fe⁰, а наблюдаются оксиды разной степени окисления

зарядового состояния Fe^{2+} и Fe^{3+} . В объеме клеток наблюдаются как оксиды, так и Fe с зарядовыми состояниями Fe^{2+} , Fe^{3+} и Fe^0 , соответственно. В глубине клетки в состоянии суперпродукции белка Dps, в ее объемной части, Fe^{2+} в FeO и Fe^0 могут стать преобладающими, что может говорить об окислении частиц железа от Fe до Fe_2O_3 (Fe_3O_4) через FeO. Наконец отметим, что существенно малый вклад железосодержащих компонент в изучаемую биогибридную структуру белков Dps клеток *E.coli* на качественном уровне может подтверждать их наличие во внеклеточном пространстве, на поверхности, и внутри клеток.

4.3 Исследования клеток кишечной палочки *E.coli* методом спектромикроскопии РЕЕМ.

Результаты исследований массивов клеток кишечной палочки, представленные выше, показали необходимость получения данных от отдельно взятых клеток. В случае получения, такие результаты могли бы уточнить специфику функционирования клетки *E.coli* в режиме суперпродукции молекул белка бактериоферритина Dps, в том числе специфики его выделения. Как было показано в главах 1 и 2 метод спектромикроскопии РЕЕМ позволяет получить информацию о морфологии изучаемого объекта малого размера, в том числе химически селективно, а также же рентгеноэлектронные данные от малого участка поля зрения.

В ходе проведенных исследований были впервые методом РЕЕМ получены результаты, для клеточной культуры *E.coli* BL21*(DE3) в комбинации с применением XPS и SEM как контрольных методов. Исследования методом сканирующей электронной микроскопии были применены в качестве контрольного метода состояния морфологической стабильности мембраны клеток после использования рентгеновского излучения примененных методов XPS и РЕЕМ. Измерения XPS проводились аналогично представленным в разделе 3.3. Получение изображений методом РЕЕМ производилось при излучении лабораторного источника - ртутной лампы ~5 эВ и синхротронного излучения. Контрольный XPS обзорный спектр (рис. 4.9),

полученный после регистрации РЕЕМ данных подтвердил отсутствие поверхностных загрязнений, не наблюдалось и изменения в интенсивности всех фотоэлектронных линий, характерных массиву клеток *E.coli*.

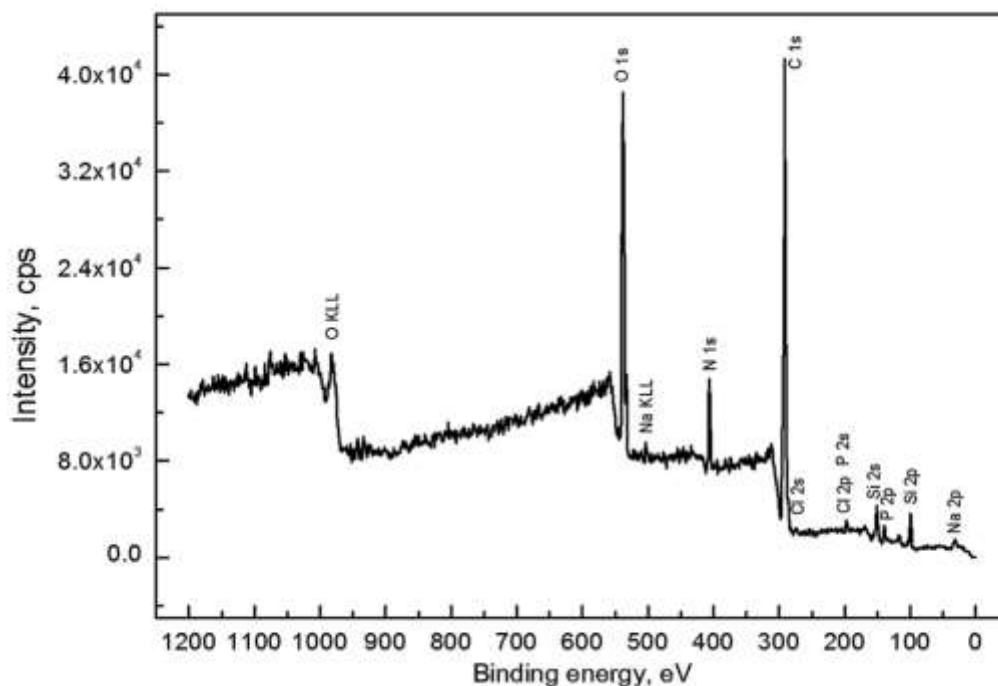


Рисунок 4.9 – Обзорный XPS спектр образца клеточной культуры *E.coli* после экспериментов РЕЕМ

Изображения, полученные методом РЕЕМ, приведены на рисунке 4.10 и продемонстрировали эффективность применения данного метода для получения и визуализации информации от объектов биологической природы. Более того, четко различимые отдельные бактерии на изображениях независимо подтвердили данные, полученные при использовании метода SEM. Данные этих двух методов хорошо согласуются между собой. Исследования SEM также проводились после применения метода XPS (рентгеновское излучение) и метода РЕЕМ (излучение ртутной лампы, синхротронное излучение) для контроля возможного радиационного поражения. Результат показан на рисунке 4.11.

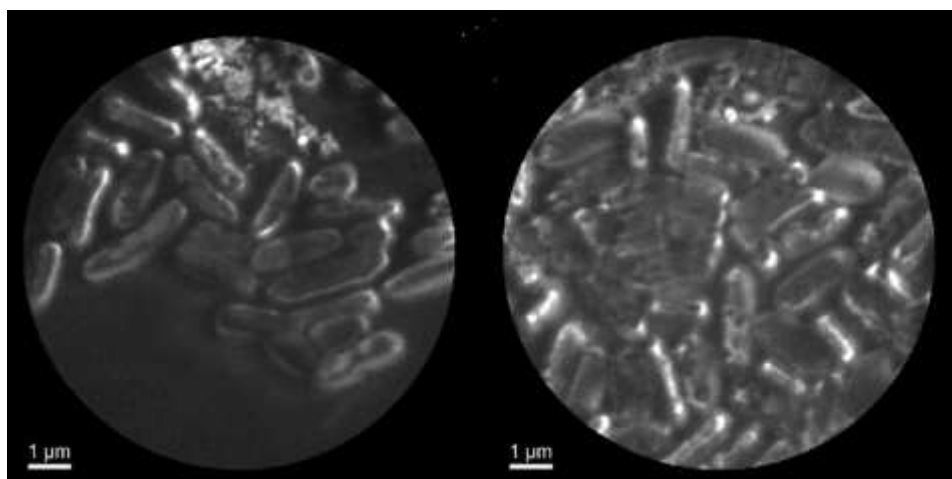


Рисунок 4.10 – РЕЕМ изображение клеток *E.coli* [133]



Рисунок 4.11 – РЕЕМ изображение массива клеток *E.coli* после длительного воздействия: излучения рентгеновской трубки (Al Ka, 1486.1 эВ), затем ртутной лампы (~ 5 эВ) совместно с высоким, до 12 кВ напряжением столика с образцом

Показаны лишь частичные незначительные повреждения мембраны отдельно взятых клеток, что показало удивительную стабильность и устойчивость клеточной мембраны *E.coli* BL21*(DE3) и ее фрагментов, самих клеток в целом [133]. Повреждения легко различимы, они являются темными частями на изображениях SEM и РЕЕМ. Эти результаты продемонстрировали нам дальнейшую перспективу и возможность эффективного изучения объектов природного происхождения, в нашем случае клеток *E.coli*, в том числе в состоянии суперпродукции белка Dps, химически селективным спектромикроскопическим методом РЕЕМ с использованием синхротронного излучения.

Эти исследования были проведены нами, также впервые, методом РЕЕМ в режиме регистрации сигнала XANES края Fe L_{2,3} для получения рентгеноэлектронных данных от микроскопического участка поверхности отдельных клеток, элементов внеклеточного пространства массивов *E.coli* в состоянии суперпродукции белка бактериоферритина Dps. При этом более четкие изображения (формируемые за счет различия в работе выхода электронов) при возбуждении ртутной лампой использовались для микроскопической навигации и достоверного выбора участка анализируемой поверхности, с последующей регистрацией данных XANES от выбранных участков. Дело в том, что мы предполагали возможное радиационное поражение изучаемых биообъектов излучением ондуляторного канала (см. Главу 2) при работе в режиме top-up постоянно поддерживаемого тока в кольце накопителя 250 мА и потоке фотонов до 10¹². Поэтому при переходе от использования ртутной лампы лабораторного источника возбуждения сигнала РЕЕМ к возбуждению синхротронным излучением был выбран специальный режим работы накопителя low-α, который дает менее интенсивный фотонный поток при токе накопителя ~ 20 мА.

На рисунке 4.12 представлены микроскопические данные о морфологии участка образца с массивом клеток, а также рентгеноспектральная информация, полученная от выбранных участков микроскопических изображений, зарегистрированная вблизи тонкой структуры Fe L_{2,3} края. Малое количество атомов железа и, соответственно низкая интенсивность сигнала при использовании ртутной лампы, в качестве источника возбуждения микроскопического изображения для навигации, а также низкая интенсивность синхротронного излучения, позволили получить достаточно размытые (нерезкие) изображения с полем зрения 10 мкм. Тем не менее, на «навигационной части» изображения (рис. 4.12, слева) отчетливо видны контуры отдельных клеток и участков внеклеточного пространства.

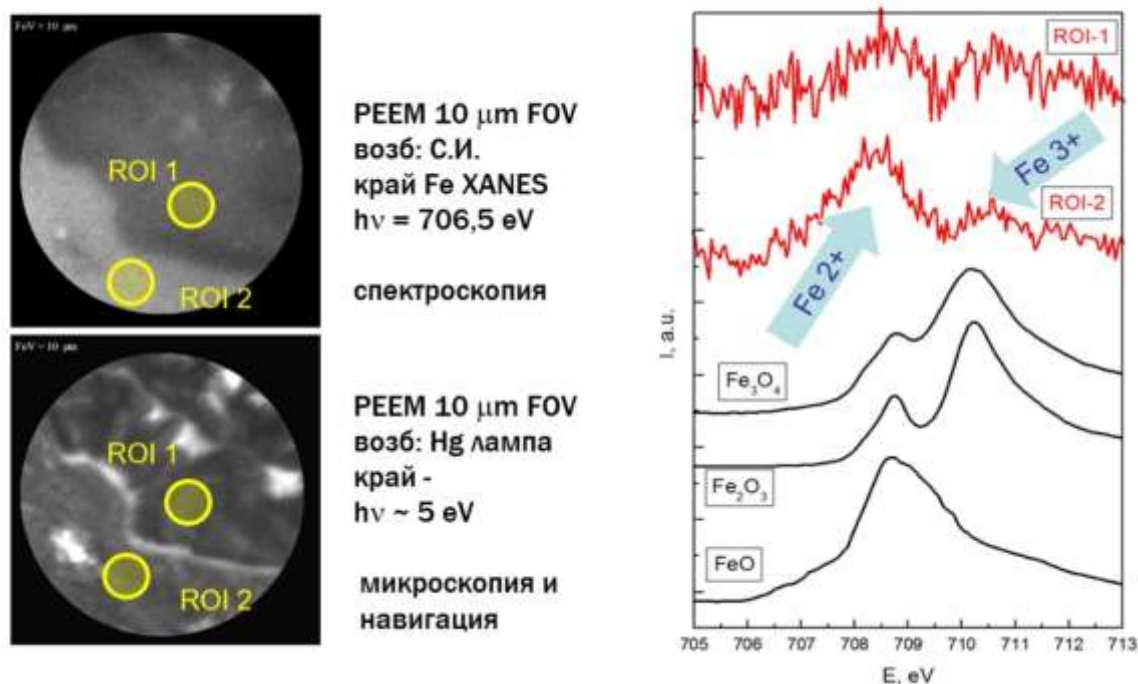


Рисунок 4.12 – Слева: PEEM микроскопические изображения участка поверхности массива клеток *E.coli* в состоянии суперпродукции в режимах навигации (ртутная лампа) и спектроскопии (синхротронной излучение). Справа: XANES Fe $L_{2,3}$ спектры от характерных участков изображения ROI-1 и ROI-2 совместно со спектрами эталонов

В области отдельных клеток был выбран участок, ROI-1 (region of interest), соответствующий поверхности мембраны отдельной клетки. В то же время участок внеклеточного пространства, вблизи клеток, куда предположительно мог попасть белок, в результате суперпродукции и выделения клетками, назван ROI-2. Сигнал XANES от этих участков представлен на рисунке 4.12 справа. Для удобства представлены данные эталонов от ряда оксидов железа с зарядовым состоянием атомов Fe $^{2+}$ и Fe $^{3+}$.

Интенсивность сигнала от микроскопического участка внеклеточного пространства выше и позволяет надежно различить характерные пики спектров XANES Fe $L_{2,3}$ соответствующие зарядовым состояниям атомов железа 2^{+} и 3^{+} . Этот результат находится в хорошем согласии, на качественном уровне, с данными фотоэлектронной спектроскопии, представленными в предыдущем разделе, по изучению физико-химического состояния поверхности массива

клеток. Кроме того, этот результат подтверждает присутствие вблизи (и вне) массива клеток сигнала от атомов железа, предположительно относящихся к выброшенным во внеклеточное пространство молекулам белка бактериоферритина Dps, который производится клетками в избыточном количестве в состоянии суперпродукции (см. данные SEM, раздел 4.1), то есть это сигнал биогибридного материала.

В то же время, даже для участка поверхности мембраны одиночной клетки (участок ROI-1), представляется возможным выделить те же две характерные спектральные особенности, но со значительно меньшей интенсивностью и, как следствие, высоким шумом фонового сигнала. Это наблюдение подтверждает наличие сигнала атомов железа в зарядовом состоянии $2+$ и $3+$, находящихся в верхних слоях мембраны клеток (в состоянии суперпродукции белка), а значит в крайне малых количествах.



Рисунок 4.13 – Экзоцитоз как предположительный механизм выделения биогибридного материала без разрушения клетки в состоянии суперпродукции молекул белка бактериоферритина Dps

Сделанные наблюдения позволяют предположить известный механизм экзоцитоза (см. раздел 1.2) как возможный путь переноса (рис. 4.13) молекул белка и(или) биогибридного материала на его основе, из внутренней части клетки (цитоплазмы) к мембране, с последующим выбросом во внеклеточное

пространство, при достижении избыточного количества молекул внутри клетки. Образующиеся элементы клетки *E.coli* (в состоянии суперпродукции белка) называемые везикулами, фактически служат переносчиками массивов молекул или, предположительно, биогибридного материала на их основе, из внутриклеточного пространства через мембрану во внеклеточное пространство, как это схематически показано на рисунке 4.13.

4.4. Выводы к главе 4

1. Впервые показана возможность выполнения экспериментов высокого разрешения химически селективным методом фотоэмиссионной электронной спектроскопии РЕЕМ для природных биогибридных материалов на основе клеточных культур бактерий кишечной палочки с использованием высокопроизводительных лабораторных и синхротронных источников излучения. Получены синхротронные рентгеноспектральные данные поверхности (мембраны) одиночной клетки.

2. Вакуумирование биогибридных материалов, длительное воздействие высокоинтенсивного электромагнитного излучения, в том числе синхротронного, до 10^{12} фот./сек и до 10 часов, высокое напряжение до 12 кВ в области сосредоточения клеточного материала, не оказывают существенного влияния на морфологию бактерий, и как результат, на особенности физико-химического состояния изученных объектов.

3. Установлено, что в состав биогибридного материала на основе клетки кишечной палочки, как источника молекул белка Dps, включены ионы железа в различном зарядовом состоянии Fe^{3+} и Fe^{2+} , а живая клетка способна выступать, в качестве источника биогибридного материала без разрушения.

ГЛАВА 5. ИНТЕГРАЦИЯ МОЛЕКУЛ БЕЛКА БАКТЕРИОФЕРРИТИНА Dps С РАЗВИТОЙ ПОВЕРХНОСТЬЮ МАССИВОВ НИТЕВИДНОГО КРЕМНИЯ

Среди современных материалов особое место занимают массивы нитевидного кремния (Si-NW), методология получения которых достигла высокого уровня технологической зрелости [134]. Научное сообщество проявляет устойчивый интерес к данным материалам и структурам на их основе, что обусловлено их уникальными свойствами, в том числе физико-химическими характеристиками чрезвычайно развитой поверхности, доступной для функционализации. В частности, материал демонстрирует способность к фотолюминесценции в видимом спектральном диапазоне при нормальных условиях [135], а также обнаруживает перспективные свойства в процессах водородной генерации [136]. Особую значимость представляет тот факт, что технологический процесс получения Si-NW отличается экономической эффективностью и высокой степенью воспроизводимости результатов. При этом формируемые структуры характеризуются чрезвычайно развитой поверхностью [137], что создает благоприятные условия для их модификации посредством взаимодействия, совмещения или интеграции с функциональными материалами различной природы, включая наноразмерные материалы и структуры, биологические объекты естественного происхождения и биогибридные материалы.

В то же время, как показано в предыдущих разделах работы, клетки белка бактериоферритина Dps являются универсальным «несущим» материалом, своего рода бионаноконтейнером, способным эффективно формировать неорганические наночастицы существенно малых размеров на основе железа и его оксидов идентичного размера, формы и состава, в целом образуя биогибридный материал. Более того, с учетом существования в жидкофазной среде, стабильной длительное время, молекулы белка способны также длительно хранить и переносить, адресно и без изменений в свойствах,

биогибридный материал и, собственно, неорганические наночастицы в его составе. Например, до необходимой поверхности, которую нужно и возможно функционализировать. Невыясненным является вопрос о реализации такой возможности для культур молекул белка бактериоферритина Dps изученных в данной работе и удобном для рассмотрения нитевидном кремнии, в качестве обладателя «модельной» трехмерной развитой поверхности. Исследованиям особенностей морфологии и физико-химического состояния результатов совмещения развитой поверхности нитевидного кремния с молекулярным белком бактериоферритина Dps методами рентгеновской и электронной микроскопии и спектроскопии посвящена данная глава.

5.1 Морфология массивов нитевидного кремния при интеграции с молекулами белка бактериоферритина Dps

В рамках подобных подходов к утилизации доступной поверхности Si-NW с заданной и контролируемой морфологией, критическое значение приобретает установление принципиальной совместимости с материалами-модификаторами. Как уже было отмечено выше, одним из примеров совмещения, в том числе для проверки возможности адресной доставки бионаноконтейнеров к развитой полупроводниковой поверхности, является комбинирование биогибридного материала молекул белка Dps с массивом Si-NW. Для изучения результатов такого взаимодействия необходимой и удобной комбинацией экспериментальных методов было выбрано сочетание SEM и XPS. Далее приведем результаты исследований морфологии поверхностей, а также сколов (торцевых частей) массивов нитевидного кремния до и после наслаивания молекул белка, выполненного аналогично случаям плоских «обычных» поверхностей подложек (см. Главу 2), методом электронной микроскопии SEM. Изучение сколов необходимо для установления возможности локализации молекулярной культуры белка бактериоферритина Dps в глубине пустот массива кремниевых нитей. Поверхности нитевидных массивов кремния, на которых в верхних частях и в глубине, вплоть до подложки, ожидалась локализация белка,

формировались с учетом ожидания гидрофильных свойств [134-137], предсказываемых для воды, а не для буферного раствора, насыщенного молекулами белка. Поэтому наиболее простым способом проверки возможной локализации белка в массивах нитей «впрямую» было применение SEM после наплавления и сушки, в условиях аналогичных использованию обычных подложек с плоской поверхностью.

Морфология исходной поверхности нитевидного кремния (Si-NW) представлена на рисунке 5.1 как иллюстрация объекта, предполагаемого для совмещения и локализации молекулярной культуры белка Dps. В макроструктуре идентифицированы поры (пустоты V1 - V6, рис. 5.1), сформировавшиеся в процессе травления, с максимальными размерами до ~ 700 нм латерально. Параллельно наблюдаются поры меньшего размера, с характерными размерами менее 100 нм [138]. Характерной особенностью полученной структуры является наличие четко выраженных краев массивов нитей кремния. При этом морфология поверхностей Si-NW характеризуется присутствием особенностей с размерами менее 50 нм (шероховатостью), формирование которых обусловлено локальными процессами травления, протекающими независимо от действия наночастиц серебра [135, 139].

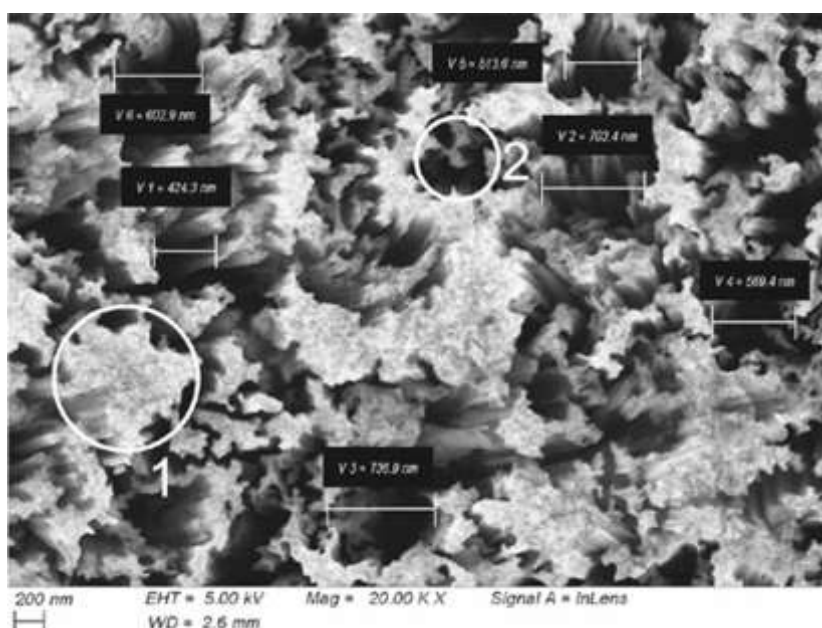


Рисунок 5.1 – Морфология поверхности исходного массива нитевидного кремния. Показаны характерные размеры пустот (пор) [138]

Морфологические исследования исходного массива нитевидного кремния не выявили наличия выраженных переходных слоев. Для количественной оценки в латеральной проекции были выделены две характерные области: область типа 1, включающая поверхность массивов нитей и визуально доступные боковые стенки пор, и область типа 2, соответствующая, собственно, самим порам. Количественный анализ показал (Image J, см. Главу 2), что соотношение площадей данных областей составляет 48% и 52% соответственно [138].

Данные о морфологии структур на основе массивов Si-NW, полученных путем совмещения с молекулами белка бактериоферритина Dps после высушивания в лабораторных условиях, представлены на рисунке 5.2. Как сказано в Главе 2 мы использовали два типа подложек разного типа и степени легирования, что в итоге дало разную морфологию, в том числе, оценочно, шероховатость [134-137] (рис. 5.2, части 1, 2, 11 и 12). Это было сделано для избежания возможного проявления свойств отталкивания буферного раствора содержащего молекулы белка, так как гидрофильные и гидрофобные свойства хорошо известны для нитевидного кремния только по отношению к воде.

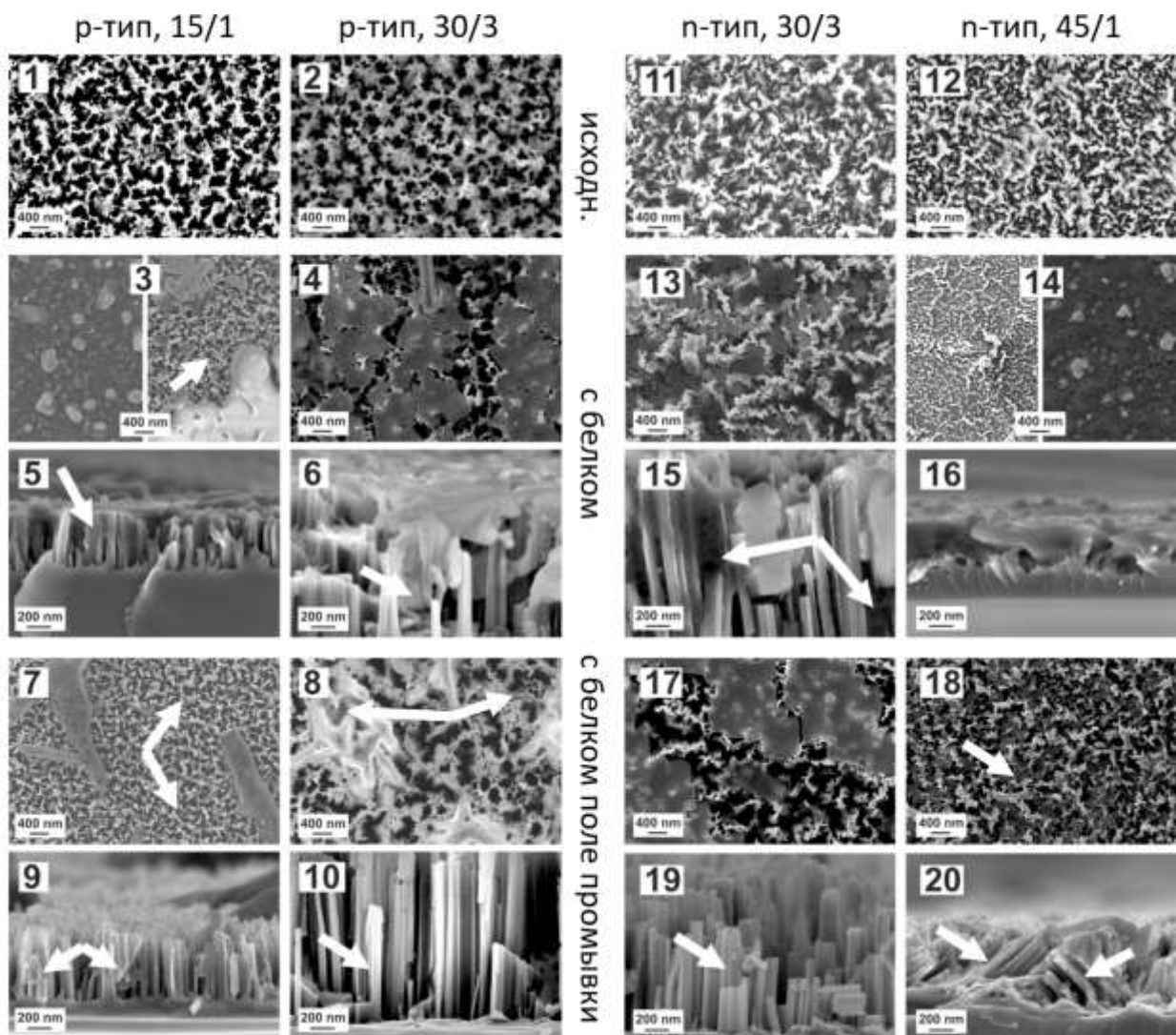


Рисунок 5.2 – Изображения SEM результатов совмещения молекул белка бактериоферритина Dps с поверхностью нитевидного кремния. Приведены данные для различной морфологии исходных массивов (соответственно части 1,2 и 11, 12), на каждом типе двух подложек разного типа и уровня легирования, сформированных при двух различных условиях травления (детали см. в Главе 2). Части 3, 4 и 13, 14 – поверхности; 5, 6 и 15, 16 - сколы структур после наложения белка и высушивания. Части 7, 8 и 17, 18 – поверхности; 9, 10 и 19, 20 - сколы структур после наложения белка с промывкой и высушивания [140]

Части рисунка 5.2 3, 4, 13 и 14 показывают морфологию поверхности структур после нанесения и высушивания белка. Изображения сколов тех же образцов даны на рисунке 5.2 в частях 5, 6 и 15, 16. Стрелками на указанных

рисунках показаны те области изображений, которые содержат остаточные (локализованные) элементы белка, которые удалось детектировать после высушивания и помещения в вакуум камеры микроскопов. Отметим, что белковый материал, заполняющий поры, имеет более однородную структуру по сравнению с поверхностью кремниевых нитей и располагается именно в доступных для заполнения пустотах. См., например, область, отмеченную стрелкой в части 5 рисунка 5.2, которая демонстрирует полное заполнение поры белковым материалом [140]. Таким образом, методом SEM установлена возможность локализации молекулярной культуры белка бактериферритина Dps в развитой поверхности нитевидного кремния в верхних частях массива (части 3, 4, 13 и 14 рисунка 5.2) и вдоль поверхностей нитей, иногда с полным заполнением пустот, вглубь, до подложки (части 5, 6, 15 и 16 рис. 5.2).

Однако, как это особенно видно на частях 3 (участок слева) и 4 (участок справа) рисунка 5.2, наблюдаются, помимо остаточного количества локализованного белка и каркаса массива нитей, объекты иной морфологии и размеров. Ранее, методом XPS (Главы 3 и 4) показано присутствие остаточных следов солей, в основном NaCl, как весомой компоненты растворов (буферных растворов), в которых существуют молекулы белка. Данные SEM позволяют предположить наблюдение микрокристаллов солей, сформировавшихся после высушивания. Известно, что результатом процедуры дополнительной промывки, сформированной после наслаивания молекул белка в буферном растворе, может стать удаление остаточных следов солей. Нами использовалась следующая процедура. Непосредственно после наслаивания раствора, содержащего молекулы белка бактериферритина Dps, на поверхность сформированного объекта проводилось однократное наслаивание 10 мкл деионизованной воды Milli-Q с последующим ее удалением через 30 сек с использованием фильтровальной бумаги без контакта с поверхностью структуры и последующим высушиванием образца при 37 °C. Результаты изучения морфологии структур Si-NW после совмещения с белком и последующей промывки приведены на рисунке 5.2 в

частях 7, 8 и 17, 18 для поверхности, в частях 9, 10 и 19, 20 для сколов. Использовались образцы-дублиеры, сформированные одновременно с теми (рис. 5.2), которые не были подвергнуты промывке. Представляется возможным отметить, что результат промывки приводит к удалению микрокристаллов солей сохраняя при этом, в определенном количестве, белок в массиве нитей кремния.

5.2 Особенности атомного строения структур, сформированных при интеграции массивов нитевидного кремния с молекулами белка бактериоферритина Dps

В этом разделе приведем результаты исследований методом XPS состояния структур, сформированных при интеграции массивов нитевидного кремния с молекулами белка бактериоферритина Dps особенности морфологии которых были представлены выше. На рисунке 5.3 приведены обзорные XPS-спектры подложек нитевидного кремния р-типа после интеграции с молекулярной культурой. Обзорные спектры исходных подложек и нитевидных массивов до взаимодействия с белком не представлены из-за их высокой степени подобия, за исключением различий в соотношении интенсивностей 2s и 2p линий кремния к 1s линии кислорода, обусловленных увеличением окисляемой поверхности нитевидных структур в силу морфологических особенностей итогового массива [141].

В спектрах образцов после нанесения белка Dps из *E.coli* идентифицированы все характерные линии биологической компоненты, включая интенсивную 1s линию углерода и 1s линии азота и кислорода. Наличие слабых линий натрия и хлора, совместно с Na KLL Оже-линией, свидетельствует о присутствии остаточных сигналов соли на поверхности. Анализ результатов SEM и XPS в комплексе может указывать на вероятное покрытие кристаллов NaCl остаточным слоем молекулярной культуры Dps.

Дело в том, что на изображениях SEM кристаллы наблюдаются в достаточном количестве, в то же время сигналы атомов натрия и хлора на обзорных XPS спектрах малы, что может указывать на их покрытие, возможно фрагментарное, белком.

Для установления физико-химического состояния более глубоких частей нитевидного массива изученные образцы подвергались травлению ионами аргона при ускоряющем напряжении 3 кВ на протяжении 20 минут, что для кремниевого «остова» структуры дало удаление, по качественной оценке, более 20 нм. Анализ спектра после ионного травления выявил преобладание линий NaCl, подтверждая наличие белкового покрытия на солевых частицах. Увеличение интенсивности кремниевых линий указывает на частичное удаление белкового слоя с обработанной поверхности.

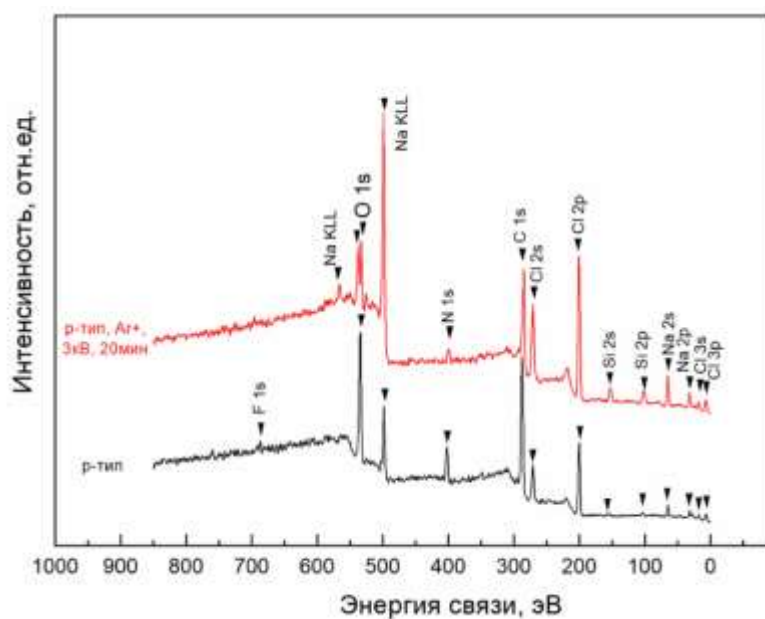


Рисунок 5.3 – Обзорные XPS спектры образца нитевидного кремния, сформированного на подложке p-типа до (черным) и после (красным) травления ионным пучком (Ar^+ 3 кВ 20 мин) после интеграции с белком Dps. Отмечены характерные элементы, составляющие изученную поверхность пробы [141]

В настоящем исследовании, в отличие от ранее опубликованных работ [122, 142], использовался более интенсивный режим ионного травления (3 кВ, 20 минут). Калибровочные измерения на станции НАНОФЭС синхротрона

«Курчатов» НИЦ Курчатовский институт показали скорость травления кремния около 2.5 нм/мин, тогда как для молекулярной культуры этот параметр может варьироваться в более широких пределах [143]. Ионное травление до таких глубин приводит к значительным изменениям физико-химического состояния изученной части образца.

Особый интерес представляет эволюция линии 1s кислорода, сохранившей интенсивность, но приобретшей двухкомпонентную структуру. Сохранение интенсивности может быть связано с устойчивым заполнением пор белком, тогда как появление второй компоненты обусловлено вкладом естественного оксида кремния с поверхности открытого нитевидного массива.

Стабильность положения и относительной интенсивности углеродной линии подтверждает успешность выбранной методики интеграции белка Dps в структуру (пустот) нитевидного массива. Результаты XPS-анализа для n-типа кремния после нанесения молекулярной культуры представлены на рисунке 5.4.

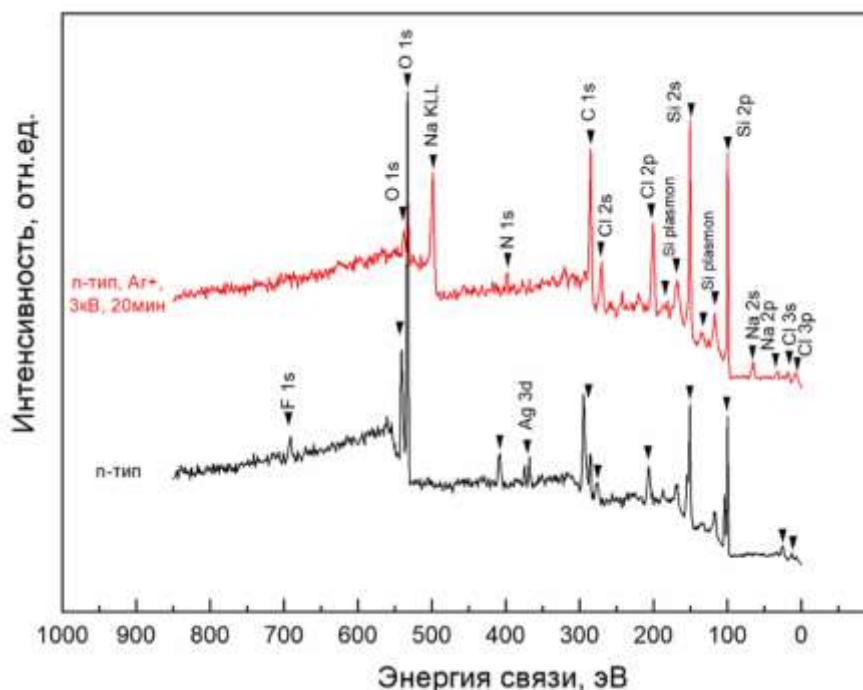


Рисунок 5.4 – Обзорные XPS спектры образца нитевидного кремния, сформированного на подложке n-типа до (черным) и после (красным) травления ионным пучком (Ar⁺ 3 кВ 20 мин) после интеграции с белком Dps. Отмечены характерные элементы, составляющие изученную поверхность пробы [141]

Анализ обзорных XPS спектров нитевидного кремния n-типа показал высокую интенсивность кремниевых линий, что согласуется с данными SEM о возможном неполном заполнении пор. Максимальную интенсивность демонстрирует двухкомпонентная линия кислорода, отражающая вклад как от оксида кремния, так и от белковых молекул. Присутствие значительного количества белка в порах подтверждается интенсивными линиями углерода и азота. Минимальное содержание соли в поверхностном слое (~3 нм) определяется по слабым линиям хлора при отсутствии натрия. Наблюдаемый дублет Ag 3d объясняется утроенным временем осаждения серебра для пластин n-типа по сравнению с p-типом при одинаковой длительности промывки [141], для формирования нитевидного кремниевого массива.

Ионное травление существенно модифицирует физико-химическое состояние структуры: линия кремния становится однокомпонентной, а интенсивность линии кислорода значительно снижается, что указывает на удаление естественного оксида с развитой поверхности нитевидного массива. Сохранение двухкомпонентной структуры кислородной линии и усиление углеродного сигнала свидетельствуют о стабильном присутствии белка Dps в порах. Появление характерных линий NaCl подтверждает предположение о локализации остаточных солей культуральной среды или буферных растворов в глубине пор нитевидных массивов n-типа [141].

Отдельного внимания заслуживают некоторые наблюдения, требующие дополнительных исследований: присутствие атомов фтора на поверхности после нанесения белка, снижение относительной интенсивности азотной линии после ионного травления для обоих типов подложек, а также вопрос эффективного удаления остаточных солей из буферных растворов и культуральной среды клеток *E.coli* – продуцентов Dps [141].

Наконец, были изучены образцы массивов нитевидного кремния после интеграции с молекулами белка бактериоферритина Dps и после удаления остаточных солей путем промывок (см. выше) [144]. Обзорные спектры РФЭС приведены на рисунке 5.5 для массивов нитевидного кремния p- и n- типа после

наслоения молекулярной культуры Dps клеток *E.coli* и последующей промывки. Отмечаются все линии, соответствующие биологической компоненте изученных биогибридных структур. Для обоих типов использованных подложек основной является 1s линия кислорода. Существенная интенсивность 1s линии кислорода исключает вклад только от естественного оксида SiO₂, покрывающего нити кремния. Причиной такой высокой интенсивности линии кислорода наряду с наблюдением линий 1s углерода и азота (в порядке уменьшения относительной интенсивности сигнала) является молекулярная культура белка Dps, локализованная в массиве Si-NW. Также наблюдаются незначительные по интенсивности 2s и 2p линии кремния от непокрытых молекулярной культурой нитей. Наконец следует отметить слабый по относительной интенсивности набор линий хлора (2s и 2p) и натрия (линия 2p и Оже линия KLL). Отметим, что для биогибридных структур, не подвергнутых удалению остаточной соли NaCl, в ряде случаев сигнал от Оже линии KLL натрия был одним из основных по интенсивности, как и сигнал от атомов хлора (см. выше). Таким образом, можно утверждать, что примененный подход к растворению и удалению остаточной соли приводит к практически полному удалению NaCl из состава поверхности изученных биогибридных структур Si-NW – молекулярная культура белка Dps клеток *E.coli*. Наконец следует отметить общую схожесть в наблюдаемых линиях РФЭС по их энергетическому положению и относительной интенсивности (рис. 5.5, два нижних спектра). Это говорит о практически одинаковом физико-химическом состоянии поверхности изученных биогибридных структур после наслоения молекулярной культуры Dps клеток *E.coli* и последующей промывки вне зависимости от типа подложки и режима ее обработки. То есть локализация биоматериала наблюдается в порах массивов Si-NW для обоих типов морфологии поверхности исходного массива нитей кремния. А процесс промывки позволяет удалять остаточную соль NaCl с поверхности биогибридных структур.

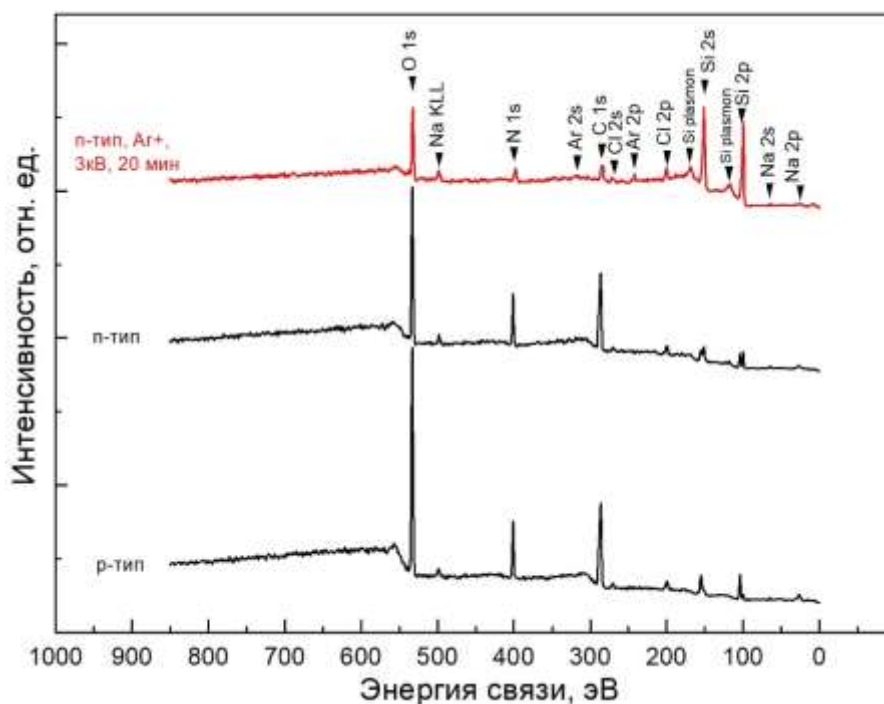


Рисунок 5.5 – Обзорные XPS спектры образцов нитевидного кремния, сформированного на подложке n- и p-типа до (черным) и после (красным) травления ионным пучком (Ar^+ 3 кВ 20 мин), интегрированных с молекулами Dps после промывки остаточной соли. Отмечены характерные элементы, составляющие изученную поверхность пробы [144]

В связи с наблюдаемой идентичностью физико-химического состояния поверхности изученных структур мы провели удаление значительной части поверхности за 20 минут травления при относительно высоком напряжении, ускоряющем ионы аргона (3 кВ) только для образца биогибридной структуры, сформированной на подложке n-типа. Существенно понижается относительная интенсивность линии O 1s, что говорит об удалении существенной части локализованной в порах культуры молекул Dps. Одновременно практически ту же интенсивность приобретают линии кремния, как результат значительного отличия в скоростях ионного профилирования биоматериала и неорганического кремниевого «каркаса». Тем не менее линия азота и углерода все еще наблюдаются, подтверждая нахождение молекулярной культуры Dps в глубине пор. В то же время линии остаточной соли не меняют относительной и малой интенсивности. Причиной такого наблюдения является неполное удаление соли

NaCl, которая тем не менее равномерно распределяется в объеме биогибридной структуры, вероятно, за счет переосаждения в результате растворения при промывке водой. Наблюдение линий аргона связано с проведением ионного травления (профилирования) поверхности.

5.3 Выводы к главе 5

1. Впервые осуществлено успешное совмещение нано-биоматериала молекулярной культуры белка Dps с высокоразвитой поверхностью массива нитевидного кремния. Продемонстрировано, что молекулы белка бактериоферритина Dps эффективно проникают в кремниевые поры субмикронного размера, заполняя их и формируя покрытие на развитой поверхности массива кремниевых нитей. Этот подход открывает перспективы для функционализации поверхности нитевидного кремния с использованием белковых молекул ферритина в качестве наноконтейнеров для адресной доставки материалов и создания функциональных гибридных нанобиоматериалов.

2. Комплексное исследование методами рентгеновской фотоэлектронной спектроскопии (XPS) и растровой электронной микроскопии (SEM) впервые продемонстрировало возможность эффективного заполнения пустот в массивах нитевидного кремния белковыми молекулами бактериального ферритина Dps из клеток *E.coli*. Установлено, что морфология исходного массива нитевидного кремния оказывает существенное влияние на характеристики наполнения пустот белком Dps.

3. Полученные взаимодополняющие данные методов SEM и XPS создают научную основу для дальнейшей разработки технологий функционализации развитой поверхности кремниевых нитей путем управляемого покрытия при контролируемой доставке биогибридного материала, что имеет значительный потенциал для биомедицинских и биотехнологических приложений.

Заключение и выводы из работы

В результате проведенных комплексных исследований по достижению цели и решению поставленных в работе задач установлены специфика морфологии, состава, структуры, особенности атомного и электронного строения биогибридных материалов с неорганическими наночастицами оксидов железа, формируемых на основе молекулярной культуры белка Dps от бактериальных клеток кишечной палочки *E.coli*, а также установлены условия интеграции белка и развитой поверхности массивов нитевидного кремния для их функционализации. Полученные следующие основные научные результаты:

1. Разработаны подходы к синтезу и пробоподготовке биогибридных материалов на основе молекулярной культуры белка Dps бактерий кишечной палочки *E.coli*, в том числе для синхротронного рентгеноэлектронного эксперимента.

2. Впервые экспериментально, методом криоэлектронной микроскопии высокого разрешения без применения контрастирования обнаружено, что в нативном (исходном) состоянии природный контейнер неорганических наночастиц представляет собой молекулу белка Dps с внешними размерами до 10 нм и размерами внутренней полости до 7 нм.

3. Неорганические наночастицы внутри полых частей молекул, с размерами, не превышающими ее внутренней диаметр, не агрегируют. В нативном (исходном) состоянии молекулы белка Dps способны формировать квазиупорядоченные слои толщиной в одну молекулу.

4. Композиционный состав неорганических наночастиц биогибридных материалов формируют ионы атомов железа в различном зарядовом состоянии Fe^{2+} и Fe^{3+} , обладающие способностью к восстановлению до металлического состояния при термической обработке в водороде или (и) ионной бомбардировке.

5. Впервые показана возможность выполнения экспериментов высокого разрешения с использованием высокопроизводительных лабораторных и

синхротронных источников излучения химически селективным методом фотоэмиссионной электронной спектроскопии РЕЕМ для поверхности (внешней части мембраны) отдельной клетки кишечной палочки *E.coli*.

6. Показано, что вакуумирование клеточного материала, длительное воздействие высокоинтенсивного электромагнитного излучения, в том числе синхротронного, до 10^{12} фот./сек и до 10 часов, высокое напряжение до 12 кВ в области сосредоточения клеток *E.coli*, не оказывают существенного влияния на морфологию и особенности физико-химического состояния изучаемых объектов.

7. Впервые проведено изучение клеток кишечной палочки *E.coli*, как постоянного источника молекул белка Dps. Показано, что белковые молекулы бактериоферритина Dps, как основу биогибридного материала включающего ионы железа в различном зарядовом состоянии Fe^{2+} и Fe^{3+} , возможно получать без разрушения клетки, многократно используя бактерии *E.coli* в состоянии суперпродукции белка.

8. Впервые показана способность молекул белка бактериоферритина Dps проникать вглубь развитой 3D поверхности массивов нитевидного кремния, тем самым открывая возможность для ее функционализации по всей высоте массива нитей от подложки до поверхности. Показано влияние остаточных солей среды существования молекул на физико-химическое состояние результата интеграции с развитой поверхностью массивов нитей кремния и возможность эффективного удаления этих солей при сохранении покрытия белком поверхности нитей кремния.

Список литературы

1. Bharat Bhushan Handbook of nanotechnology 2017 / Bharat Bhushan. – Springer, 2017. – 1500 p.
2. Safa Kasap Handbook of Electronic and Photonic Materials / Safa Kasap, Peter Capper. – Springer, 2017. – 1572 p.
3. В.В. Никандров «Неорганические полупроводники в биологических и биохимических системах: биосинтез, свойства и фотохимическая активность» / В.В. Никандров // Успехи биологической химии – 2000. – Т. 40. – С. 357-396.
4. Lee, L. Viruses and virus-like protein assemblies – Chemically programmable nanoscale building blocks/ Lee, L. A.; Niu, Z.; Wang// Q. Nano Res. – 2009. – V.2. – P.349.
5. Behrens, S. Synthesis of inorganic nanomaterials mediated by protein assemblies / Behrens, S. S.// J. Mater. Chem. – 2008. – V. 18. – P. 3788.
6. Truffi M. Ferritin nanocages: a biological platform for drug delivery, imaging and theranostics in cancer / Truffi M, Fiandra L, Sorrentino L, Monieri M, Corsi F, Mazzucchelli S. // Pharmacol Res. – 2016. – V. 107. – P.57-65.
7. Harrison P.M. The ferritins: molecular properties, iron storage function and cellular regulation / P.M. Harrison, P. Arosio // Biochim. Biophys. Acta. – 1996. – V. 1275, №3. – P. 161-203.
8. Loehr, T. Iron Carriers and Iron Proteins / Loehr, T. – VCH Publishers, Inc, 1989. – p. 123–238.
9. Andrews S.C. Iron storage in bacteria / S.C. Andrews // Adv. Microb. Physiol. – 1998. – V40. – P. 281–351.
10. Massover, W. H. The ultrastructure of ferritin macromolecules. The lattice structure of the core crystallites/ Massover, W. H., Cowley, J. M. // Proc. Natl. Acad. Sci. – 1973. – V. 36. – P. 3847–3851.
11. Massover W.H. Ultrastructure of Ferritin and Apoferritin: A Review / W.H. Massover // Micron. – 1993. – V. 24. – P. 389–486.

12. Theil E.C. The ferritin family of iron storage proteins / E.C. Theil // *Adv. Enzymol.* – 1990. – V. 63. – P. 421–449.
13. S. Franceschini Antioxidant Dps protein from the thermophilic cyanobacterium *Thermosynechococcus elongates* / S. Franceschini [et al.] // *FEBS J.* – 2006. – V. 273. – P. 4913–4928.
14. Martinez A. Protection of DNA during oxidative stress by the nonspecific DNA-binding protein Dps / A. Martinez, R. Kolter // *J. Bacteriol.* – 1997. – V. 179. – P. 5188–5194.
15. A.J. Hudson Overproduction, purification and characterization of the *Escherichia coli* ferritin / A.J. Hudson [et al.] // *Eur. J. Biochem.* – 1993. – V. 218, №3. – P. 985-995.
16. Andrews S.C. Bacterioferritin and ferritin are distantly related in evolution: conservation of ferroxidase-centre residues / S.C. Andrews, J.R. Guest, J.M.A. Smith // *FEBS Lett.* – 1991. – V. 293. – P. 164-168.
17. Ford G.C. Ferritin: Design and Formation of an Iron-Storage Molecule / Ford G.C., Harrison P.M., Rice D.W., Smith J.M., Treffry A., White J.L., Yariv J. // *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* – 1984. – V. 304. – P. 551-565.
18. Mann S. Reconstituted and native iron-cores of bacterioferritin and ferritin / Mann S., Williams J.M., Treffry A., Harrison P.M. // *J. Mol. Biol.* – 1987. – V. 198. – P. 405-416.
19. RCSB Protein Data Bank (RCSB PDB) URL: <http://rcsb.org>
20. S. Perrett Biological and Bio-inspired Nanomaterials / S. Perrett [et al.] // *Advances in Experimental Medicine and Biology.* – 2019. – V. 1174. – P. 1-33.
21. Alaleona F. *Thermosynechococcus elongatus* DpsA binds Zn(II) at a unique three histidine containing ferroxidase center and utilizes O₂ as iron oxidant with very high efficiency, unlike the typical Dps proteins / Alaleona F., Franceschini, S., Ceci P., Ilari A. Chiancone E. // *The FEBS J.* – 2010. – V.277, №4. – P. 903-917.
22. Haikarainen T. Structural characterization and biological implications of di-zinc binding in the ferroxidase center of *Streptococcus pyogenes* Dpr /

Haikarainen T., Tsou C.C., Wu J.J., Papageorgiou A.C. // Biochemical and Biophysical Research Communications. – 2010. – V.398, №3. – P. 361-365.

23. Ilari A. Iron incorporation into *Escherichia coli* Dps gives rise to a ferritin-like microcrystalline core / Ilari A., Ceci P., Ferrari D., Rossi G. L., Chiancone E. // The Journal of Biological Chemistry. – 2002. – V.277, № 40. – P. 37619-37623.

24. Ilari A. The dodecameric ferritin from *Listeria innocua* contains a novel intersubunit iron-binding site / Ilari A., Stefanini S., Chiancone E., Tsernoglou D. // Nature Structural Biology. 2000. V.7. P. 38–43.

25. Pesek J. Structure and mechanism of iron translocation by a Dps protein from *Microbacterium arborescens* / Pesek J., Buchler R., Albrecht R., Boland W., Zeth, K. // The Journal of Biological Chemistry. – 2011. – V. 286, № 40. – P. 34872-34882.

26. Zeth K. Iron-oxo clusters biomineralizing on protein surfaces: structural analysis of *Halobacterium salinarum* DpsA in its low- and high-iron states / Zeth K., Offermann S., Essen L. O., Oesterhelt D. // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. – 2004. – V.101, № 38. – P. 13780-13785.

27. Thieme D. The Dps protein of *Escherichia coli* is involved in copper homeostasis / Thieme D. Grass G. // Microbiological Research. – 2010. – V.165, № 2. – P. 108-115.

28. R.A. Grant The crystal structure of Dps, a ferritin homolog that binds and protects DNA / R.A. Grant [et al.] // Nat. Struct. Biol. – 1998. – V. 5. – P. 294–303.

29. Lacqua A. Emergence of biofilm-forming subpopulations upon exposure of *Escherichia coli* to environmental bacteriophages / Lacqua A., Wanner O., Colangelo T., Martinotti M.G., Landini P. // Appl. Environ. Microbiol. – 2006. – V.72. – P. 956-959.

30. Li H. Identification and network of outer membrane proteins regulating streptomycin resistance in *Escherichia coli* / Li H., Wang B.C., Xu W.J., Lin X.M.,

Peng X.X. Li H., Wang B.C., Xu W.J., Lin X.M., Peng X.X. // J. Proteome Res. – 2008. – V.7. – P. 4040-4049.

31. Luciano Beneduce *Escherichia coli* O157:H7 general characteristics, isolation and identification techniques // Luciano Beneduce, Salvatore Massa [et al.] // Annals of Microbiology – 2003. – V. 53(4) – P. 511-527.

32. Vogt R.L. *Escherichia coli* O157:H7 outbreak associated with consumption of ground beef / Vogt R.L., Dippold L. // Public Health Rep : journal. — 2005. — V. 120, № 2. — P. 174-178.

33. P. Feng Enumeration of *Escherichia coli* and the Coliform Bacteria / Peter Feng [et.al] // Bacteriological Analytical Manual – 2002. – Chapter 4. – P. 1-18.

34. J. Sambrook Molecular cloning: a laboratory manual / J. Sambrook, E. F. Fritsch, T. Maniatis // Cold Spring Harbor Laboratory Press. – 1989. – P.1546.

35. Wen-Ru Li Antibacterial activity and mechanism of silver nanoparticles on *Escherichia coli* // Wen-Ru Li [et al.] // APPLIED MICROBIAL AND CELL PHYSIOLOGY. – 2010. – V. 85 – P. 1115-1122.

36. Anderson H.C. Electron microscopic studies of induced cartilage development and calcification / Anderson H.C. // J. Cell Biol. journal. – 1967. – V. 35, № 1. – P. 81-101.

37. S. S. Antipov The nucleoid protein Dps binds genomic DNA of *Escherichia coli* in a non-random manner // S. S. Antipov [et al.] // PLOS ONE – 2017. – V.12, №8. – P. 1-27

38. Jutz G. Ferritin: a versatile building block for bionanotechnology / Jutz G, van Rijn P, Santos Miranda B, Böker A // Chem Rev. – 2015. – V. 115, № 4. – P. 1653–1701.

39. Wong K.K.W. Biomimetic synthesis of cadmium sulfide–ferritin nanocomposites / K.K.W. Wong, S. Mann // Adv. Mater. – 1996. – V. 8. – P. 928-932.

40. M. Okuda Fabrication of nickel and chromium nanoparticles using the protein cage of apoferritin / M. Okuda [et al.] // *Biotechnol. Bioeng.* – 2003. – V. 84, № 2. – P.187-94.
41. Takagi H. Localized unfolding at the junction of three ferritin subunits. A mechanism for iron release? / H. Takagi [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 1998. – V. 273. – P. 18685-18688.
42. Sang H. Ferritin-Templated Quantum-Dots for Quantum Logic Gates /Sang H. Choi, Jae-Woo Kim, Sang-Hyon Chu, Yeonjoon Park, Glen C. King, Peter T. Lillehei, Seon-Jeong Kim, James R. Elliott // *Proc. of SPIE.* – 2005. – V. 5763. – P. 213-232.
43. Швырева У.С. Бактериоферритин: свойства и структурная организация регуляторной области гена *dps* / У.С. Швырева, М.Н. Тутукина, О.Н. Озолинь // *Биофизика.* – 2011. – Т. 56, №2. – С. 821-830.
44. A. Miura Non-volatile flash memory with discrete bionanodot floating gate assembled by protein template // Atsushi Miura, Rikako Tsukamoto, Shigeo Yoshii, Ichiro Yamashita, Yukiharu Uraoka and Takashi Fuyuki // *Nanotechnology.* – 2008. – V. 19. – P. 1-6.
45. Suzuki M. Preparation and catalytic reaction of Au/Pd bimetallic nanoparticles in Apo-ferritin / Suzuki M., Abe M., Ueno T., Abe S., Goto T. et al. // *Chemical Communications.* – 2009. – V.32. – P.4871-4873
46. Tetter S. Enzyme encapsulation by a ferritin cage / Tetter S, Hilvert D. // *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* – 2017. – V. 56, № 47, – P. 14933-14936.
47. Yang Z. Encapsulation of platinum anticancer drugs by apoferritin / Yang Z, Wang X, Diao H, Zhang J, Li H, Sun H, Guo Z // *Chem. Commun.* – 2007. – V. 33. – P. 3453-3455.
48. Xing R. Characterization and cellular uptake of platinum anticancer drugs encapsulated in apoferritin / Xing R, Wang X, Zhang C, Zhang Y, Wang Q, Yang Z, Guo Z // *J.Inorg.Biochem.* – 2009. – V. 103, № 7. – P. 1039-1044.
49. П.Г. Георгиев Центр коллективного пользования ИБГ РАН. Методическое пособие / П.Г. Георгиев // ИБГ РАН Москва. – 2013. – С. 43.

50. W. Brown *Dynamic Light Scattering: the Method and Some Applications* / W. Brown // Clarendon Press. – 1993. – P. 735.
51. Д.В. Штанский *Просвечивающая электронная микроскопия высокого разрешения в нанотехнологических исследованиях* / Рос. хим. ж. (Ж. Рос. хим. об-ва им. Д. И. Менделеева). – 2002. – Т. XLVI, №5. – С. 81-89.
52. С.М. Жарков *Методы современной просвечивающей электронной микроскопии в исследовании материалов* / С.М. Жарков // *Journal of Siberian Federal University. Chemistry*. – 2009. – Т. 4, № 2. – С. 294-306.
53. Matthew H. *Specimen preparation for correlating transmission electron microscopy and atom probe tomography of mesoscale features* / H. Matthew, I. Dieter, et al. // *Ultramicroscopy*. – 2014. – V.147 – P. 25-32.
54. Qiao He *Antibacterial mechanism of ultrasound against Escherichia coli: Alterations in membrane microstructures and properties* / Qiao He, Donghong Liu, Mingming Guo, Muthupandian Ashokkumar, Xingqian Ye, Tony Z. Jin, Mingming Guo // *Ultrasonics Sonochemistry*. – 2021. – V. 73. – P. 105509
55. Lingling Zhou *The antimicrobial effect of a novel peptide LL-1 on Escherichia coli by increasing membrane Permeability* / Lingling Zhou, Kaiqi Lian, Mengting Wang, Xueyi Jing, Yuanchen Zhang, Jinling Cao // *BMC Microbiology*. – 2022. – V. 22, № 220. – P. 1-10
56. N. Dennis Chasteen *Mineralization in Ferritin: An Efficient Means of Iron Storage* / N. Dennis Chasteen, Pauline M. Harrison // *Journal of Structural Biology*. – 1999. – V. 126. – P. 182-194
57. Намба К. *Криоэлектронная микроскопия: эволюция оборудования и методов.* / Намба К., Като Т. // *ЛАБОРАТОРИЯ И ПРОИЗВОДСТВО*. – 2019. – №3. – С. 92-102.
58. Fadi Bou-Abdallah *Unveiling the stochastic nature of human heteropolymer ferritin self-assembly mechanism* / Fadi Bou-Abdallah, Jeremie Fish, Genki Terashi, Yuanyuan Zhang, Daisuke Kihara, Paolo Arosio // *Protein Science*. – 2024. – V. 33. – e.5104

59. Голдстейн, Дж. Растровая Электронная микроскопия и рентгеновский микроанализ / Голдстейн, Дж. Ньюбери, Д. // М.: Мир. – 1984. – 303 с.
60. Weilie Zhou Scanning Microscopy for Nanotechnology: Techniques and Applications / Weilie Zhou, Zhong Lin Wang – Springer, 2007.
61. Морис Ф. Микроанализ и растровая электронная микроскопия / Морис Ф., Мени Л., Тиксье Р. – М.: Металлургия, 1985. – 392 с.
62. С.С. Горелик Рентгенографический и электронно-оптический анализ. / С.С. Горелик, Ю.А. Скаков, Л.Н. Расторгуев. – М.: МИСиС, 1994. – 330 с.
63. В.Д. Андреева Электронная микроскопия материалов: Учебное пособие / В.Д. Андреева, И.И. Горшков. — СПб.: Изд-во Политехн. ун-та, 2016. — 139 с.
64. John J. Alvear-Daza Resistance and induction of viable but non culturable states (VBNC) during inactivation of *E. coli* and *Klebsiella pneumoniae* by addition of H₂O₂ to natural well water under simulated solar irradiation / John J. Alvear-Daza, Alejandra García-Barco et. al // Water Research. – 2021. – V. 188. – P. 1-11.
65. Qiao He Antibacterial mechanism of ultrasound against *Escherichia coli*: Alterations in membrane microstructures and properties / Qiao He, Donghong Liu, Mingming Guo, Muthupandian Ashokkumar, Xingqian Ye, Tony Z. Jin, Mingming Guo // Ultrasonics Sonochemistry. – 2021. – V. 73. – P. 105509
66. Мазалов Л.Н. Рентгеноэлектронная спектроскопия и ее применение в химии / Мазалов Л.Н. // Сорровский образовательный журнал. – 2000. – Т.6, №4. – С. 37-44.
67. В. Vincent Crist Handbook of The Elements and Native Oxide / В. Vincent Crist. – XPS International, Inc., 1999. – 548 p.
68. В.А. Трапезников Рентгеноэлектронная спектроскопия сверхтонких поверхностных слоев конденсированных систем. / В.А. Трапезников, И.Н. Шабанова. – М.: Наука, 1988. – 200с.

69. V. Sysoev A Gradient Microarray Electronic Nose Based on Percolating SnO₂ Nanowire Sensing Elements / Victor Sysoev, Joachim Goschnick, Thomas Schneider, et. al. // *Nanoletters*. – 2007. – V. 7, № 10. – P. 3182-3188.
70. Нефедов В.И. Рентгеноэлектронная спектроскопия химических соединений. Справочник. / Нефедов В.И. – М.: Химия. 1984. – 256 с.
71. Marit Kjærviik Surface characterisation of Escherichia coli under various conditions by near-ambient pressure XPS // Marit Kjærviik, Karin Schwibbert, Paul Dietrich, Andreas Thissen, Wolfgang E. S. Unger // *Surf.Interface. Anal.* – 2018. – V. 50. – P. 996–1000.
72. T. Lopez XPS characterization and E. Coli DNA degradation using functionalized Cu/TiO₂ nanobiocatalysts // T. Lopez, J.L. Cuevas, L. Ilharco, P. Ramírez, F. Rodríguez-Reinoso, E. Rodríguez-Castellón // *Molecular Catalysis*. – 2018. – V. 449. – P. 62-71.
73. Qi Chen Biological responses of Gram-positive and Gram-negative bacteria to nZVI (Fe⁰), Fe²⁺ and Fe³⁺ / Qi Chen, Jing Li, Yan Wu, Fangxia Shen, Maosheng Yao // *RSC Advances*. – 2013. – V. 3.– p. 13835-13842.
74. Фетисов Г.В. Синхротронное излучение. Методы исследования структуры веществ / Г.В. Фетисов // Изд-во Физматлит. – 2007. – Москва. – С. 672.
75. Durham P.J. Calculation of x-ray absorption near-edge structure, XANES / P.J. Durham J.B. Pendry // *Computer Physics Communications*. – 1982. – V.25. – P. 193 - 205.
76. Немошкаленко В.А. Теоретические основы рентгеновской эмиссионной спектроскопии / В.А. Немошкаленко, В.Г. Алешин // *Наукова думка*. – 1974. – Киев. – С. 376.
77. Зимкина Т.М. Ультратонкая рентгеновская спектроскопия / Т.М. Зимкина, В.А. Фомичев // Изд-во ЛГУ. – 1971. – Ленинград. – С. 132.
78. Румш М.А. К вопросу о применении вторичноэлектронных умножителей для изучения мягких рентгеновских спектров / М.А. Румш, А.П.

Лукирский, В.Н. Щемелев // Изв. АН СССР. Сер. Физ. – 1961. – Т. 25, № 8. – С. 1060-1065.

79. C. Scherk EXAFS investigation of the active site of iron superoxide dismutase of *Escherichia coli* and *Propionibacterium shermanii* / C. Scherk, M. Schmidt, H.-F. Nolting, B. Meier, F. Parak // *Eur Biophys J.* – 1996. – V. 24. – p. 243-250.

80. Gudrun Lisa Bovenkamp X-Ray Absorption Near-Edge Structure (XANES) Spectroscopy Study of the Interaction of Silver Ions with *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, and *Escherichia coli* // Gudrun Lisa Bovenkamp, Ulrike Zanzen, Katla Sai Krishna, Josef Hormes, Alexander Prange // *Applied and Environmental Microbiology.* – 2013. – V. 79, № 20. – p. 6385–6390.

81. Kleineberg U. Microcharacterization of the surface oxidation of Py/Cu multilayers by scanning X-ray absorption spectromicroscopy. / Kleineberg U., Haindl G., Hutten A., Reiss G., Gullikson E.M., Jones M.S., Mrowka S., Rekawa S. B., Underwood J. H. // *Appl.Phys.A.* – 2001. – V. 73, № 4. – P. 515-519.

82. Шмаль Г. Рентгеновская оптика и микроскопия. Пер. с англ. / Шмаль Г., Рудольф Д. – М.: Мир: 1987. – 464 с.

83. Polishchuk I. Coherently aligned nanoparticles within a biogenic single crystal: a biological prestressing strategy. / Polishchuk I., Bracha A. A., Bloch L., Levy D., Kozachkevich S., Etinger-Geller Y., Kauffmann Y., Burghammer M., Giacobbe C., Villanova J., Hendler G., Chang-Yu Sun, Giuffre A. J., Marcus M. A., Kundanati L., Zaslansky P., Pugno N. M., Gilbert G. P., Katsman A., Pokroy B. // *Science.* – 2017. – V. 358, № 6368. – P. 1294-1298.

84. Kalegowda Y. X-PEEM, XPS and ToF-SIMS characterisation of xanthate induced chalcopyrite flotation: Effect of pulp potential. / Kalegowda Y., Chan Y-L., Wei D-H., Harmer S. L. // *Surface Science.* – 2015. – V. 635. – P. 70-77.

85. Турищев С. Ю. Фотоэмиссионная электронная микроскопия массивов субмикронных столбиков никеля в матрице диоксида кремния. / Турищев С. Ю., Паринова Е. В., Кронаст Ф., Овсянников Р., Малащенко Н. В.,

Стрельцов Е. А., Иванов Д. К., Федотов А. К. // ФТТ. – 2014. – Т. 56, № 9. – С. 1851-1860.

86. Турищев С. Ю. Характеризация массивов субмикронных столбиков никеля в матрице диоксида кремния микроскопическими методами. / Турищев С. Ю., Паринова Е. В., Федотова Ю. А., Мазаник А. В., Федотов А. К., Апель П. Ю. // Конденсированные среды и межфазные границы. – 2013. – Т.15, №1. – С. 54-58.

87. Чувенкова О.А. Синхротронные исследования нитевидных кристаллов SnO₂ / О.А. Чувенкова [и др.] // Поверхность. рентгеновские, синхротронные и нейтронные исследования. – 2014. – №2. – С. 18 – 24.

88. Сайт компании Scienta Omicron. URL: <http://www.scientaomicron.com>

89. Griffith O.H. Historical perspective and current trends in emission microscopy, mirror electron microscopy and low-energy electron microscopy: An introduction to the proceedings of the second international symposium and workshop on emission microscopy and related techniques / O.H. Griffith, W. Engel // Ultramicroscopy. – 1990. – V.36. – P. 1-28.

90. Tonner, B.P. Photoelectron microscopy with synchrotron / B.P. Tonner, G.R. Harp // Rev. Sci. Instrum. – 1988. – V.59. – P. 853 - 858.

91. Турищев С.Ю. Фотоэмиссионная электронная микроскопия с использованием синхротронного излучения / Турищев С.Ю., Паринова Е.В., Овсянников Р., Кронаст Ф., Тарасов А.В., Марченко Д.Е. // Рентгеновские и электронные спектры и химическая связь: материалы XXII Всероссийская (с международным участием) конференции / Дальневосточный федеральный университет, Владивосток. – 2016. – С. 55.

92. Ovsyannikov R. Static and dynamic electronic structure of ferromagnetic Ni metal and Co₂FeSi Heusler alloy studied by photoemission spectroscopy. Dis. Cand. of Phys.-Math. Sciences / R. Ovsyannikov // Berlin, Germany – 2009. – P. 109.

93. Gilbert B. Charging phenomena in PEEM imaging and spectroscopy / B. Gilbert [et al.] // *Ultramicroscopy*. – 2000. – V.83. – P. 129 - 139.
94. De Stasio G. Compensation of charging in X-PEEM: a successful test on mineral inclusions in 4.4 Ga old zircon / G. De Stasio [et al.] // *Ultramicroscopy*. – 2003. – V.98. – P. 57 - 62.
95. Garvie L.A.J. Bonding in silicates: Investigations of the Si edge by parallel electron energy-loss spectroscopy / L.A.J. Garvie, P.R. Busek // *Am. Mineral*. – 1999. – V.84. – P. 946 - 964.
96. Gilbert B. XANES microspectroscopy of biominerals with photoconductive charge compensation / B. Gilbert [et al.] // *J. Electron Spectrosc. Relat. Phenom.* – 2001. – V.114. – P. 1005 - 1011.
97. Frazer B.H. The probing depth of total electron yield in the sub keV range: TEY-XAS and X-PEEM / B. H. Frazer [et al.] // *Surface Science*. – 2003. – V.537. – P. 161 - 167.
98. Wilde S.A. Evidence from detrital zircons for the existence of continental crust and oceans on the Earth 4.4 Gyr ago / S.A. Wilde [et al.] // *Nature*. – 2001. – V.409. – P. 175 - 178.
99. Valley J.W. A cool early Earth / J.W. Valley [et al.] // *Geology*. – 2002. – V.30. – P. 351 - 354.
100. Фетисов, Г. В. Синхротронное излучение. Методы исследования структуры веществ: учебное пособие / Г. В. Фетисов. – Москва: ФИЗМАТЛИТ, 2007. – 672 с.
101. Sivakov V. A. Realization of vertical and zigzag single crystalline silicon nanowire architectures. / Sivakov V. A., Brönstrup G., Pecz B., Berger A., Radnoczi G. Z., Krause M., Christiansen S. H. // *The Journal of Physical Chemistry C*. – 2010. – V.114. – P. 3798–3803.
102. Lo Faro M. J. Low cost synthesis of silicon nanowires for photonic applications. / Lo Faro M. J., Leonardi A. Al., D’Andrea C. et al. // *Journal of Materials Science: Materials in Electronics*. – 2020. – V.31. – P. 34–40.

103. Сайт Центр коллективного пользования научным оборудованием ФГБОУ «ВГУ». URL: <http://www.ckp.vsu.ru>
104. Сайт американской компании FEI Company (Field Electron and Ion Company). URL: <http://www.fei.com>
105. Сайт Европейского виртуального института анализа видов (EVISA). URL: <http://www.speciation.net/>
106. Официальный сайт Удмуртского федерального исследовательского центра Уральского отделения Российской академии наук (УдмФИЦ УрО РАН). URL: <https://udman.ru>
107. Официальный сайт Берлинского центра материалов и энергии имени Гельмгольца. URL: <http://www.helmholtz-berlin.de>
108. Lebedev A. M. NanoPES photoelectron beamline of the Kurchatov Synchrotron Radiation Source. / Lebedev A. M., Menshikov K. A., Nazin V. G., Stankevich V. G., Tsetlin M. B., Chumakov R. G. // Journal of Surface Investigation: X-ray, Synchrotron and Neutron Techniques. – 2021. – V. 15, № 5. –P. 1039–1044.
109. S.I. Fedoseenko Development and present status of the Russian – German soft X-ray beamline at BESSY II / S.I. Fedoseenko [et al.] // Nucl. Instr. And Meth. in Phys. Res. A. – 2001. – №. 470. - P. 84–88.
110. John F. Moulder Handbook of X-ray Photoelectron Spectroscopy / John F. Moulder [et.al], – Perkin-Elmer Corporation Physical Electronics Division, 1992. – 261 p.
111. «Шлюз данных Национального института стандартов и технологий (NIST)». URL: <https://srdata.nist.gov/xps>
112. Сайт журнала «Surface Science Spectra» (SSS). URL: <https://avs.scitation.org/>
113. Сайт компании Scienta Omicron. URL: <http://www.scientaomicron.com/>
114. Сайт компании SPECSGROUP. URL: <http://www.specs.de/>

115. Сайт компании ELMITEC Elektronenmikroskopie GmbH. URL: <http://www.elmitec-gmbh.com/>
116. Сайт компании Malvern Panalytical Ltd. URL: <http://www.malvern.com/>
117. В. Г. Артюхов Практикум по биофизике / В. Г. Артюхов, О. В. Башарина, Г. А. Вашанов и др. — Воронеж : Издательский дом ВГУ, 2016. — 313 с.
118. К. В. Бочаров Методы статического и динамического рассеяния света для исследования наночастиц и макромолекул в растворах. Учебно-методическое пособие / К. В. Бочаров, Н. И. Марукович, А. Ю. Куксин. – М.: МФТИ, 2016. – 40 с.
119. Официальный сайт ImageJ. URL: <https://imagej.net/>
120. С.Ю. Турищев Синхротронные исследования в мягком рентгеновском диапазоне зарядового состояния ионов железа в ферригидритном ядре ферритина Dps Escherichia Coli / С.Ю. Турищев, С.С. Антипов, Н.В. Новолокина, О.А. Чувенкова, В.В. Мелехов, Р. Овсянников, Б.В. Сеньковский, А.А. Тимченко, О.Н. Озолинъ, Э.П. Домашевская // БИОФИЗИКА. – 2016. – том 61, № 5. – с. 837–843.
121. Sergey Antipov The Oligomeric Form of the Escherichia coli Dps Protein Depends on the Availability of Iron Ions / Sergey Antipov, Sergey Turishchev , Yuriy Purtov, Uliana Shvyreva, Alexander Sinelnikov, Yuriy Semov, Elena Preobrazhenskaya, Andrey Berezhnoy, Natalia Shusharina, Natalia Novolokina, Viktor Vakhtel, Valeriy Artyukhov and Olga Ozoline // Molecules. – 2017. – V.22. – P. 1904.
122. Паринова Е. В. Исследования био-наногибридного материала на основе бактериального ферритин-подобного белка DPS методами ПЭМ и РФЭС. / Паринова Е. В., Антипов С. С., Беликов Е. А., Турищев С. Ю. и др. // Конденсированные среды и межфазные границы. – 2022. – Т. 24, № 2. – С. 265–272.

123. S.S. Antipov High resolution cryogenic transmission electron microscopy study of Escherichia coli Dps protein: First direct observation in quasinative state / S.S. Antipov, E.B. Pichkur, N.V. Praslova, E.V. Preobrazhenskaya, D.S. Usoltseva, E.A. Belikov, O.A. Chuvenkova, M.Yu. Presnyakov, V.G. Artyukhov, O.N. Ozoline, S.Yu. Turishchev // Results in Physics. – 2018. – V. 11. – P. 926-928.
124. T. J. Regan, H. Ohldag, C. Stamm, F. Nolting, J. L€uning, and J. Sto€hr and R. L. White Chemical effects at metal–oxide interfaces studied by x-ray-absorption spectroscopy / T. J. Regan, H. Ohldag, C. Stamm, F. Nolting, J. L€uning, and J. Sto€hr and R. L. White // Phys. Rev. B. – 2001. – V. 64. – 214422.
125. Hidekazu Ikeno First Principles Calculation of Fe L_{2,3}-edge X-ray Absorption Near Edge Structures of Iron Oxides/ Hidekazu Ikeno, Isao Tanaka, toru Miyamae, Takahiro Mishima, Hirohiko Adachi and Kazuyoshi Ogasawara// Adv. Mater. – 2004. – V.45, № 5. – p.1414-1418.
126. Hidekazu Ikeno Ab initio charge transfer multiplet calculation on the L_{2,3} XANES and ELNES of 3d transition metal oxides/ Hidekazu Ikeno, Teruyasu Mizguchi, and Isao Tanaka// Phys.Rev. B – 2011. – V. 83. – 155107.
127. Frank M.F. Groot XANES spectra of transition metal compounds/ Frank M.F. Groot// Journal of Physics: Conference Series. – 2009. – V. 190. – (2009) 012004.
128. V.A. Terekhov Determination of the phase composition of the surface layers in porous silicon using ultrasoft X-ray emission spectroscopy and X-ray photoelectron spectroscopy techniques / V.A. Terekhov [et al.] // J. Electron Spectr. and Rel. Phen. – 2001. – V. 114-116. – P. 895 - 900.
129. Toru Yamashita Analysis of XPS spectra of Fe²⁺ and Fe³⁺ ions in oxide material/ Toru Yamashita, Peter Hayes // Applied Surface Science. – 2008. – V.254. – P. 2441–2449.
130. Elhadi D, CRISPRi engineering E. coli for morphology diversification./ Elhadi D, Lv L, Jiang X, et al.// Metab.Eng. – 2016. – V. 38. – P. 358–69.

131. Liu J. Viable but non-culturable state and toxin gene expression of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 under cryopreservation./ Liu J, Zhou R, Li L, et al.// *Res.Microbiol.* – 2016. – V. 20. – P.1-6.
132. Moghimi R. Superior antibacterial activity of nanoemulsion of *Thymus daenensis* essential oil against *E. coli*. / Moghimi R, Ghaderi L, Rafati H, et al.// *Food.Chem.* – 2016. – V.194. – P. 410-415.
133. S.Yu. Turishchev On the possibility of PhotoEmission Electron Microscopy for *E. coli* advanced studies / S.Yu. Turishchev, D. Marchenko, V. Sivakov, E.A. Belikov, O.A. Chuvenkova, E.V. Parinova, D.A. Koyuda, R.G. Chumakov, A.M. Lebedev, T.V. Kulikova, A.A. Berezhnoy, I.V. Valiakhmedova, N.V. Praslova, E.V. Preobrazhenskaya, S.S. Antipov // *Results in Physics.* – 2020. – V.16. – 102821.
134. Xiao Yu Top-down fabricated silicon-nanowire-based field-effect transistor device on a (111) silicon wafer. / Xiao Yu, Yuchen Wang, Hong Zhou, Yan xiang Liu, Yi Wang, Tie Li, Yuelin Wang. // *Small.* – 2013. – V. 9, № 4. – P. 525–530.
135. Sivakov V. A. Roughness of silicon nanowire sidewalls and room temperature photoluminescence. / Sivakov V. A., Voigt F., Berger A., Bauer G. and Christiansen S. H. // *Phys. Rev. B.* – 2010. – V. 82. – 125446.
136. Ming T. Silicon suboxides as driving force for efficient light enhanced hydrogen generation on silicon nanowires. / Ming T., Turishchev S., Schleusener A., Parinova E., Koyuda D., Chuvenkova O., Schulz M., Dietzek B., Sivakov V. // *Small.* – 2021. – V. 17. – 2007650.
137. Ravi P. Structuring of Si into multiple scales by metal-assisted chemical etching. / Ravi P. Srivastava, Dahl-Young Khang. // *Advanced Materials.* – 2021. – V. 33, № 47. – 2005932.
138. Е. В. Паринова Исследования локализации белка Dps в матрице нитевидного кремния методом растровой электронной микроскопии / Е. В. Паринова, С. С. Антипов, V. Sivakov, Ю. С. Какулия, С. Ю. Требунских, Е. А.

Беликов, С. Ю. Турищев. // Конденсированные среды и межфазные границы. – 2021. – Т. 23, № 4. – С. 644-648.

139. Huang Z. Ordered arrays of vertically aligned [110] silicon nanowires by suppressing the crystallographically preferred etching directions. / Huang Z., Shimizu T., Senz S., Zhang Z., Zhang X., Lee, W., Gösele U. // Nano Letters. – 2009. – V. 9, №7. – P. 2519–2525.

140. Parinova E.V. Localization of DPS protein in porous silicon nanowires matrix / Parinova E.V., Antipov S.S., Belikov E.A., Kakuliia I.S., Trebunskikh S.Y., Turishchev S.Y., Sivakov V. // Results in Physics. – 2022. – V. 35. – 105348.

141. Паринаова Е. В. Локализация молекул белка Dps *E.coli* в матрице нитевидного кремния по данным растровой электронной микроскопии и рентгеновской фотоэлектронной спектроскопии / Паринаова Е. В., Антипов С. С., Sivakov V., Беликов Е. А., Чувенкова О. А., Какулия Ю. С., Требунских С. Ю., Скоробогатов М. С., Чумаков Р. Г., Лебедев А. М., Артюхов В. Г., Турищев С. Ю. // Конденсированные среды и межфазные границы. – 2023. – Т.25, № 2. – С. 207-214.

142. Turishchev S. Yu. XPS investigations of MOCVD tin oxide thin layers on Si nanowires array. / Turishchev S. Yu., Chuvenkova O. A., Parinova E. V. et al. // Results in Physics. – 2018. – V.11. – P. 507–509.

143. Hüfner S. Very high resolution photoelectron spectroscopy. In: Lecture Notes in Physics. / Hüfner S. – Springer, 2007. – 397 p.

144. Е. В. Паринаова Локализация молекул белка Dps *E. coli* в нитевидном кремнии при удалении остаточной соли / Е. В. Паринаова, С. С. Антипов, V. Sivakov, Е. А. Беликов, О. А. Чувенкова, Ю. С. Какулия, С. Ю. Требунских, К. А. Фатеев, М. С. Скоробогатов, Р. Г. Чумаков, А. М. Лебедев, О. В. Путинцева, В. Г. Артюхов, С. Ю. Турищев // Конденсированные среды и межфазные границы. – 2023. – Т. 25, №3. – С. 454–461.