



На правах рукописи

**Беликов Евгений Александрович**

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

Специальность 1.3.8. Физика конденсированного состояния

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени

кандидата физико-математических наук

Воронеж 2025

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Воронежский государственный университет»

Научный  
руководитель: Доктор физико-математических наук, доцент  
**Турищев Сергей Юрьевич**

Официальные  
оппоненты: **Гуда Александр Александрович**  
доктор физико-математических наук, Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Южный федеральный университет», Центр наукоемкого приборостроения, заведующий научной лабораторией

**Ситников Александр Викторович**  
доктор физико-математических наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Воронежский государственный технический университет», факультет радиотехники и электроники, кафедра твердотельной электроники, профессор

Ведущая  
организация: Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Федеральный исследовательский центр «Институт катализа им. Г.К. Борескова Сибирского отделения Российской академии наук», г. Новосибирск

Защита состоится **«15» января 2026 г.** в **17 ч. 00 мин.** на заседании диссертационного совета 24.2.288.03 при Воронежском государственном университете по адресу: 394018, г. Воронеж, Университетская пл., д. 1, ауд. 428.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБОУ ВО «Воронежский государственный университет» и на сайте <http://www.science.vsu.ru/dissinfo&cand=3552>

Автореферат разослан «    » ноября 2025 года.

Ученый секретарь  
диссертационного совета  
24.2.288.03



Голощاپов Дмитрий Леонидович

## АКТУАЛЬНОСТЬ

В настоящее время одним из ключевых научных направлений физики конденсированного состояния является развитие технологий и современная диагностика новых многофункциональных наноматериалов [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 до ~ 12 нм в зависимости от типа ферритина. Именно металл-оксидное ядро ферритинов представляет ключевой интерес для нужд физики и технологии функциональных 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 наноразмерных объектах, 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 просвечивающей (в т.ч. крио-) 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 РЕЕМ (PhotoEmission Electron Microscopy – фотоэмиссионная электронная микроскопия) использованных в данной работе для изучения состава, макроструктуры, атомного и электронного строения биогибридных материалов на основе молекул белка бактериоферритина 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.

**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.

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

**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 состоянием  $Fe^{3+}$  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.

**Практическая ценность** 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 т.д.

#### **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 спектроскопии 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 в 7 научных статьях в ведущих рецензируемых изданиях, входящих в перечень ВАК и индексирующихся базами данных Web of Science и Scopus. Работы [A1-A3] опубликованы в журналах первого квартиля (Q1), [A4-A7] – третьего (Q3). В опубликованных работах полностью отражено основное содержание, результаты и выводы, сформулированные в диссертационной работе.

### **Структура и объем диссертации**

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.

## ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ ДИССЕРТАЦИИ

**Во введении** выполнено обоснование актуальности темы диссертации, сформулированы цели, задачи и объекты исследования, положения, выносимые на защиту. Определена научная новизна и практическая значимость полученных результатов. Приведены сведения о публикациях и апробации работы.

**В первой главе** на основе данных из литературных источников приводится описание биогибридных структур на основе неорганических наночастиц молекул ферритина Dps, а также клеточной культуры *Escherichia coli*, как источника этих молекул. Помимо этого, описаны физические основы методов просвечивающей (ТЕМ) и сканирующей (SEM) электронной микроскопии, метода фотоэмиссионной электронной спектроскопии (PEEM), чувствительных к поверхности методов спектроскопии ближней тонкой структуры края рентгеновского поглощения (XANES) и рентгеновской фотоэлектронной спектроскопии (XPS).

**Во второй главе** основное внимание уделяется описанию методик получения образцов молекул ферритина Dps. Также, последовательно излагаются основные параметры и условия применения методов исследования полученных образцов.

**В третьей главе** представлены результаты исследований размера, формы, состава и локального атомного окружения биогибридных материалов на основе молекул белка бактериоферритина Dps.

Результаты, полученные методом ТЕМ, позволяют утверждать, что размеры неорганических наночастиц составляют  $\sim 1-7$  нм (Рисунок 1, а). На рисунке отчетливо видны темные точки, распределенные по поверхности углеродной подложки. При повышенном увеличении можно отметить их сферическую морфологию. Данные объекты представляют собой неорганические ядра, сформированные внутри органической оболочки молекул белка Dps. Анализ полученных изображений позволяет сделать следующие заключения. Преобладающая морфология наблюдаемых на ТЕМ-изображениях частиц характеризуется как квазисферическая или сферическая. Размер частиц варьируется и может составлять от  $\sim 7$  нм до преимущественно  $\sim 2-3$  нм. Агломерация отсутствует, а визуализируемые частицы наблюдались по всей поверхности образца. В то же время методом криоэлектронной микроскопии (cryo-EM) была установлена способность молекул ферритина Dps формировать различные элементы структуры при мгновенной заморозке до криогенных температур (Рисунок 1, б). Доминирующим структурным элементом являются гексагональные блоки (обозначены цифрой "1"), состоящие из центральной молекулы белка, окруженной шестью другими молекулами. Четко прослеживается упорядоченность в расположении молекул, которая может распространяться до субмикронных размеров, что видно по цепочкам молекул (обозначены цифрой "4"). В структуре также присутствуют отклонения от упорядоченного расположения молекул, обозначенные на Рисунке 1 (б) как "2" – области, где частицы расслаиваются друг относительно друга, и "3" – разрыв слоя и нарушение упорядоченного чередования молекул. Этот результат получен по нашим данным впервые для белковых молекул бактериоферритина Dps, в первую очередь при условиях формирования пробы cryo-EM без присутствия контрастирующих агентов, как правило ураниловых солей, зачастую искажающих изображения изучаемых объектов природного происхождения, особенно в нанометровом масштабе.

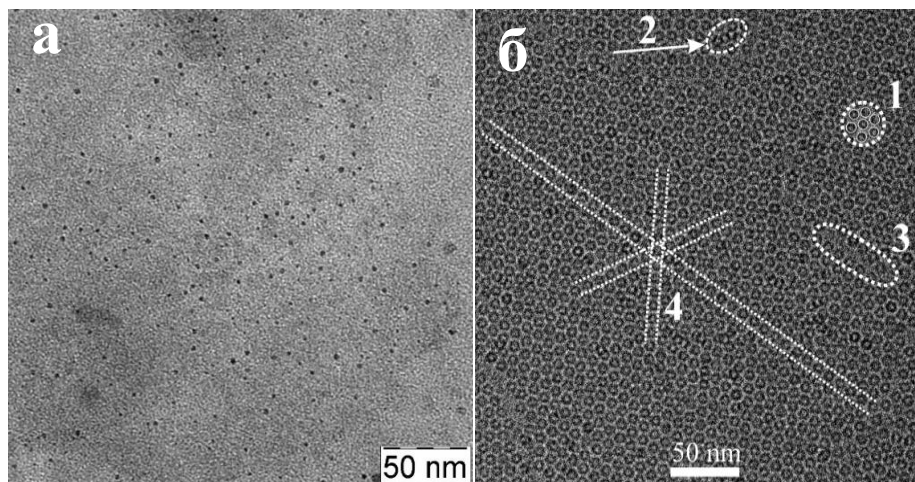


Рисунок 1 – а: изображение ТЕМ образца с концентрацией  $\sim 1,2$  мг белка/мл с солью Мора 0,25 мМ; б: изображение стую-ЕМ исходных (без накопленных наночастиц) молекул белка бактериоферритина Dps в ячейке углеродной сетки.

Для получения информации о составе и электронном строении биогибридных материалов на основе бактериоферритина Dps был применен синхротронный метод XANES. Анализ полученных XANES Fe  $L_{2,3}$  спектров молекулярной культуры белка Dps после насыщения внутренних полостей молекул неорганическими наночастицами из растворенной в культуральной жидкости соли Мора проходил в сопоставлении с известными данными эталонных соединений железа, его оксидов и гидроксидов, соли Мора ( $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2$ ) и иных ожидаемых в составе частиц соединений, данные XANES для которых были получены в идентичных условиях регистрации спектров. На рисунке 2 приведем сопоставление с наиболее близкой тонкой структурой спектра оксида  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ .

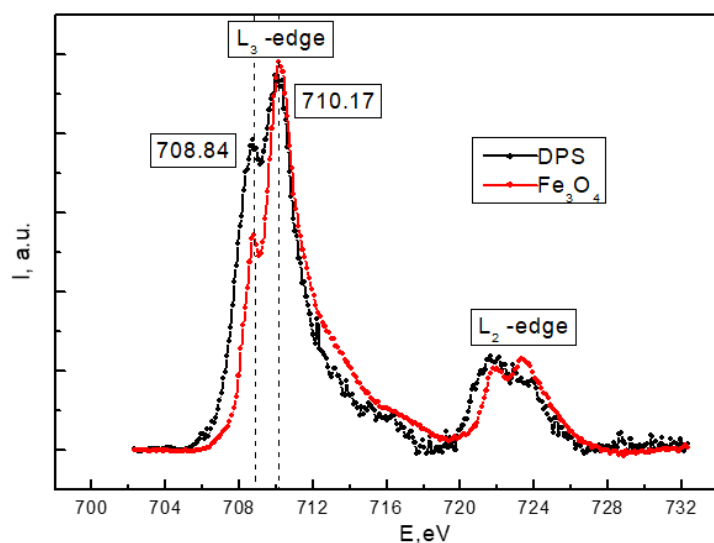


Рисунок 2 – Сопоставление спектров XANES бактериоферритина Dps и  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ .

Наибольшее сходство основных особенностей тонкой структуры XANES Fe  $L_{2,3}$  спектров по обнаружено со спектром  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ . Более детальный анализ выявил заметные различия в тонкой структуре спектров биогибридного материала на основе молекулярной культуры бактериоферритина Dps и  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ .

При энергии 708.8 эВ наблюдается более интенсивный пик в спектре бактериоферритина Dps, тогда как на 710.17 эВ характерный основной максимум спектра эталонного  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  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 (гидро)оксидов железа. Для более точной оценки состава было проведено математическое моделирование по методике [4]. Полученные результаты позволили говорить о значительном вкладе в формирование неорганического ядра оксидов FeO и  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  в соотношении 36% и 64% соответственно.

Данные о составе и физико-химическом состоянии поверхности в целом для биогибридных материалов на основе молекул белка Dps были получены методом

рентгеновской фотоэлектронной спектроскопии XPS. Рисунок 3 демонстрирует XPS данные для: исходная проба после нанесения на подложку (initial), его состояние после ионного травления в спектрометре при 1 кВ, 1 мкА, в течение 30 минут (initial+ion sputtering), образец той же пробы, после отжига ex-situ в водородной атмосфере при 400°C (anneal H<sub>2</sub> 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 (H<sub>2</sub> anneal 400 C + 0.5 hour sputter и H<sub>2</sub> anneal 400 C + 1 hour sputter соответственно).

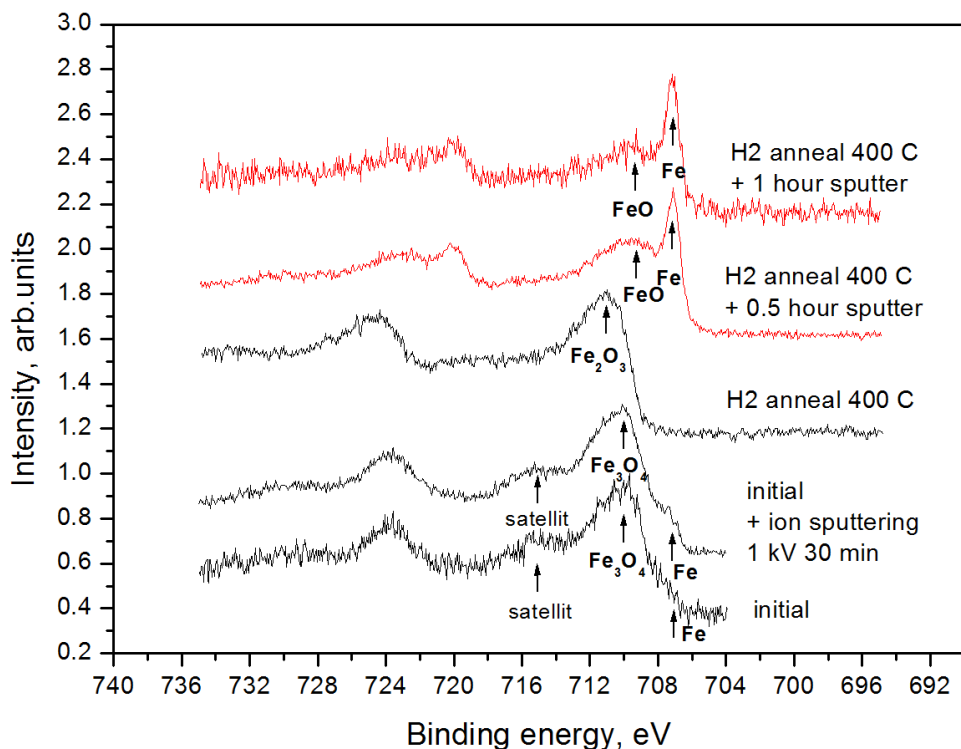


Рисунок 3 – Данные XPS Fe 2p для биогибридного молекулярного материала после наслаивания (initial), после ионного травления (initial+sputtering), после отжига в водороде (H<sub>2</sub> anneal) и после ионного травления отожженных образцов (H<sub>2</sub> anneal+sputter).

Данные для неотожженных (исходных) образцов биогибридного материала показали хорошее качественное согласие с результатами исследования синхротронным методом XANES. А именно наблюдение различных соединений оксидов железа в слое поверхности образца, при этом отличия в соотношении вклада оксидов обусловлены различными глубинами информативного слоя, меньшими для XPS (ок. 3 нм) и в три раза большими для XANES (ок. 10 нм).

Для образца, подвергнутого отжигу ex-situ в водородной атмосфере при 400°C и получасовому ионному травлению, возможно выделить 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 металла Fe<sup>0</sup> 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 состав по сравнению с исходным материалом, и с образцами после отжига в водороде. Показано, что в процессе переноса образцов, отожженных в водороде, в камеру спектрометра происходит полное окисление железа. Последующее применение ионного травления удаляет оксидный слой, что подтверждает возможное наличие структуры типа "ядро-оболочка" и выявляет внутреннюю неокисленную

составляющую небольших кластеров, состоящих из атомов железа.

**В четвертой главе** приводятся результаты изучения клеток *E.coli* как источника молекулярной культуры белка бактериоферритина Dps, на основе которой представляется возможным сформировать биогбридные материалы. В отличие от традиционного метода однократного получения культуры молекул белка, путем разрушения клеток и последовательности достаточно сложного набора технологических подходов выделения молекулярной культуры, предлагается использование модифицированных клеток *E.coli* в состоянии суперпродукции белка Dps, что позволяет осуществлять многократное получение молекулярной культуры. Предполагается возможность выхода белковых молекул через клеточную мембрану во внеклеточное пространство без разрушения клетки, а также потенциальное насыщение молекул белка Dps неорганическими наночастицами посредством растворения соли Мора в среде существования клеточной культуры. Проведены исследования распределения атомов железа внутри клетки, на мембране и во внеклеточном пространстве при добавлении соли Мора в культуральный раствор модифицированных клеток *E.coli*, находящихся в состоянии суперпродукции белка Dps.

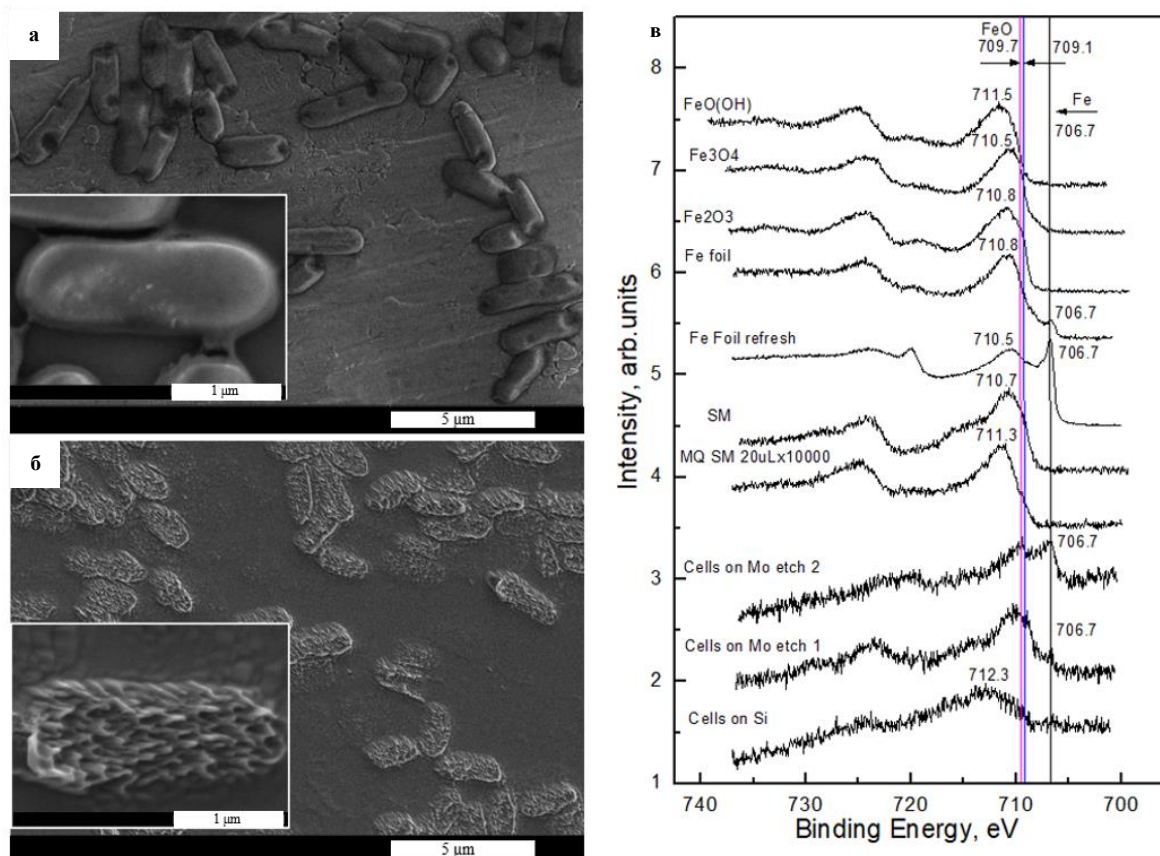


Рисунок 4 – Морфология и состав массива клеток *E.coli* в состоянии суперпродукции белка Dps: а) – SEM исходного массива; б) – SEM после удаления ~ 300 нм верхних частей клеток *E.coli* ионным пучком; в) – данные XPS экспериментальных проб (три нижних спектра с высоким накоплением, использовались подложки Si или Mo, этапы травления обозначены как etch 1 и etch 2) в сопоставлении с набором спектров эталонных соединений (FeO(OH), Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>, Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, фольга железа Fe foil и in situ очищенная Fe foil refresh, соль Мора SM и соль Мора после растворения в воде MQ SM).

Было изучено несколько идентичных образцов для которых использовались подложки кремния или молибдена. Ионное травление с целью изучения атомного строения внутренней части клеток 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. 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 природного объекта как бактерии кишечной палочки. Для первого этапа травления - это оценка составила около 300 нм, второй этап травления, по нашей оценке, позволил удалить ещё около 500 нм. Данные SEM для исходного массива клеток, полученные перед выполнением фотоэлектронных экспериментов представлены на рисунке 4 (а). А на рисунке 4 (б) показан результат обработки ионным пучком массива клеток кишечной палочки после первого этапа. Направление ионов на вставке рисунка 4 (б) 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 атомного строения внутренней части клеток в состоянии суперпродукции после взаимодействия с солью Мора. Показано что поверхность изученных объектов (мембрана клеток *E.coli*) и внутренняя часть клеток (после удаление верхней части ионным пучком) содержит атомы железа в различном зарядовом состоянии, в том числе, после самого продолжительного ионного травления в состоянии  $Fe^0$ . Данные XPS демонстрируют хорошее согласие с результатами изучения молекулярной культуры и биогибридных объектов на ее основе, приведенными в главе 3.

Результаты исследований массивов клеток кишечной палочки, представленные выше, показали необходимость получения данных от отдельно взятых клеток. Впервые для массива клеток *E.coli*, с использованием высокопроизводительного лабораторного (Hg лампа) и синхротронного источников излучения был применен метод спектромикроскопии РЕЕМ, который позволяет получить информацию о морфологии изучаемого объекта малого размера, в том числе химически селективно, а также же рентгеноэлектронные данные от малого участка поля зрения. При использовании синхротронного излучения РЕЕМ применялся в режиме регистрации спектров XANES в области Fe  $L_{2,3}$  края железа. В ходе проводимых РЕЕМ исследований состояние массива клеток *E.coli* контролировались комбинацией методов XPS и SEM. На рисунке 5 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 в изученных объектах и, соответственно низкая интенсивность сигнала позволили получить относительно нерезкие изображения с полем зрения 10 мкм. Тем не менее, на «навигационной части» изображения (рисунок 5, а) отчетливо видны контуры отдельных клеток и участков внеклеточного пространства. 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, обозначен ROI-2. Сигнал XANES от этих участков представлен на рисунке 5 (б). 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  $3+$ .

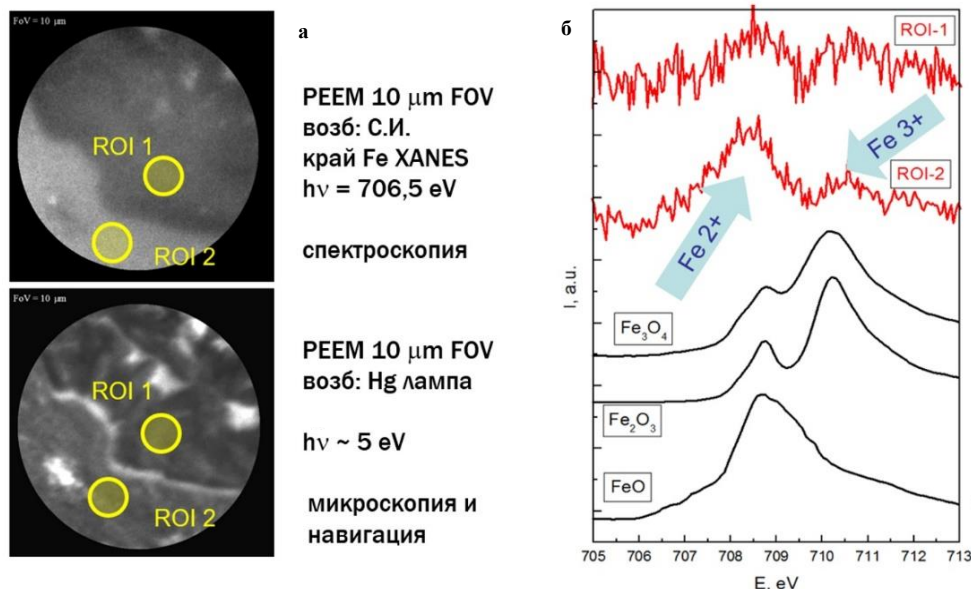


Рисунок 5 – а: РЕЕМ изображения участка поверхности массива клеток *E.coli* в состоянии суперпродукции в режимах навигации (Hg лампа) и спектроскопии (синхротронное излучение). б: XANES Fe  $L_{2,3}$  спектры от характерных участков изображения ROI-1 и ROI-2 совместно со спектрами XANES эталонных соединений.

Этот результат также находится в хорошем согласии с результатами главы 2 по изучению наночастиц оксидов железа биогибридных структур на основе молекул белка бактериоферритина Dps и 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. Для участка поверхности мембраны одиночной клетки (участок ROI-1) выделить те же две характерные спектральные особенности также представляется возможным, однако этот сигнал характерен значительно меньшей интенсивностью, так как атомы железа в различном зарядовом состоянии  $2+$  и  $3+$ , находятся в верхних слоях мембраны клеток в крайне малых количествах.

Совместно с результатами SEM и микроанализа, показавшими характерные области выброса белка содержащего атомы железа во внеклеточное пространство сделано предположение о механизме экзоцитоза, как возможном пути переноса молекул белка и(или) биогибридного материала на его основе, из внутренней части клетки к мембране, с последующим выбросом во внеклеточное пространство, при достижении избыточного количества молекул внутри клетки. Таким образом показана возможность многократного использования клетки *E.coli* в режиме суперпродукции белка как источника молекул Dps и биогибридного материала на их основе. При этом вакуумирование, длительное воздействие высокоинтенсивного электромагнитного излучения, в том числе синхротронного, до  $10^{12}$  фот./сек и до 10 часов, высокое напряжение до 12 кВ, необходимое для формирования РЕЕМ изображений в области сосредоточения клеточного материала, не оказывают существенного влияния на морфологию бактерий, и как результат, на особенности физико-химического состояния изученных объектов.

**В пятой главе** приводятся результаты исследований совмещения молекул белка бактериоферритина Dps с развитой поверхностью массивов нитевидного кремния (Si-NW). 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 6. Использовали подложки р- и n- типа проводимости разной степени легирования, что дало различную морфологию, в том числе размер пустот между нитями и, оценочно, шероховатость. Части рисунка 6 (1, 2) показывают морфологию исходной поверхности Si-NW сформированных на пластинах n- типа различной проводимости (морфологии), поверхности структур после нанесения и высушивания белка (3, 4), сколы тех же образцов (5, 6). Стрелками на указанных рисунках показаны те области изображений, которые содержат остаточные (локализованные) элементы белка.

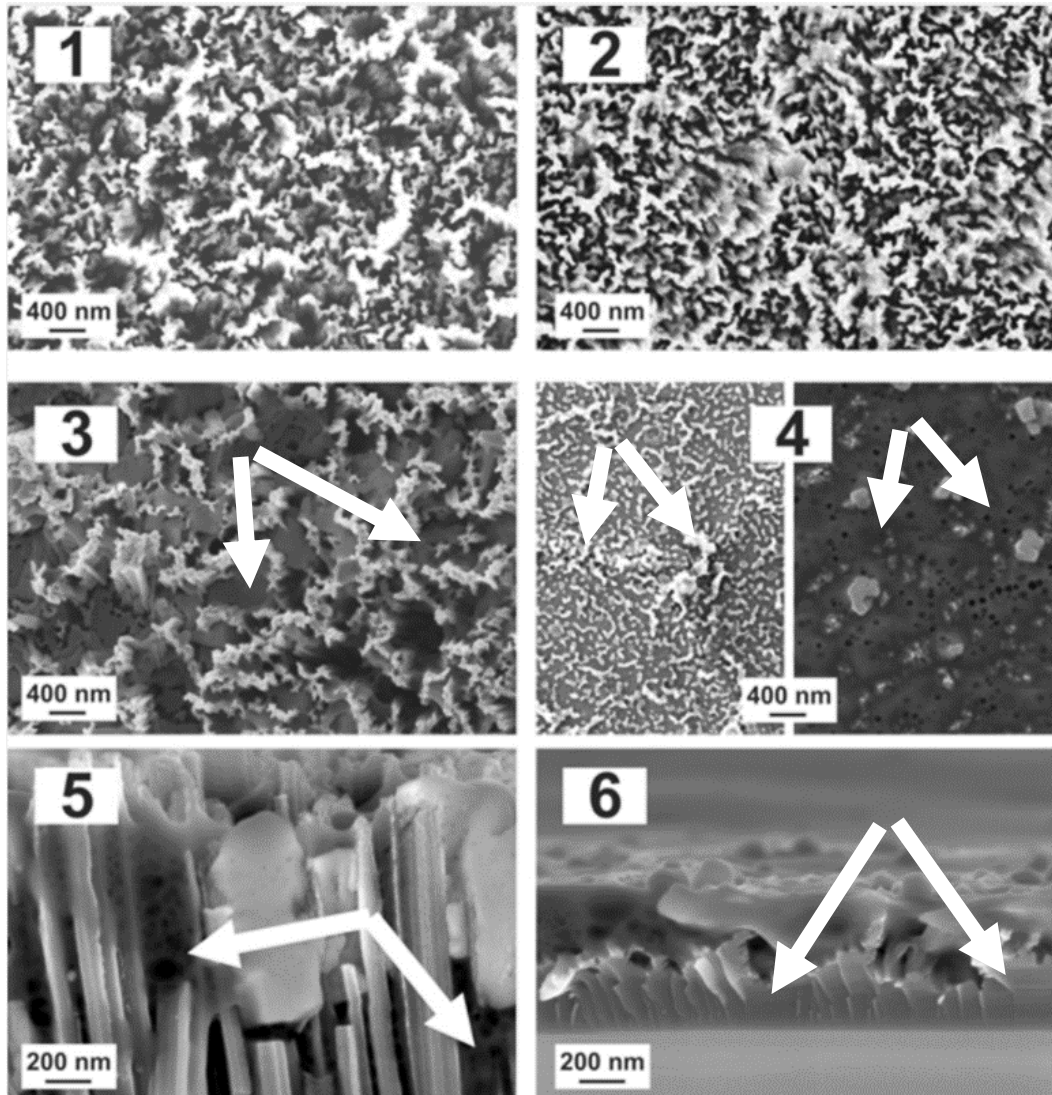


Рисунок 6 – Результаты совмещения молекул белка бактериоферритина Dps с поверхностью нитевидного кремния по данным SEM: 1 и 2 - исходные массивы, 3 и 4, 5 и 6 поверхности и сколы соответственно для структур после нанесения белка и высушивания (вакуумирования).

Отметим, что белковый материал, заполняющий поры, имеет более однородную структуру по сравнению с поверхностью кремниевых нитей и располагается именно в доступных для заполнения пустотах. Таким образом, методом SEM установлена возможность локализации молекулярной культуры белка бактериоферритина Dps в развитой поверхности нитевидного кремния в верхних частях массива (части 3 и 4 рисунка 6) и вдоль поверхностей нитей, иногда с полным заполнением пустот, вглубь, до подложки (части 5 и 6 рисунка 6). Помимо остаточного количества локализованного белка и каркаса массива нитей, наблюдались и объекты иной морфологии и размеров. Методом XPS в главах 3 и 4 показано присутствие остаточных следов солей, в основном NaCl, как весомой компоненты растворов (буферных растворов), в которых существуют молекулы белка. Правая половина части 4 рисунка 6 демонстрирует наличие остаточных кристаллов соли на поверхности изученных объектов.

Атомное строение структур, сформированных при интеграции массивов нитевидного кремния с молекулами белка бактериоферритина Dps особенности морфологии которых были представлены выше было изучено методом XPS. Для установления физико-химического состояния глубоких частей изученных объектов проводилось травление поверхности ионами аргона при ускоряющем напряжении 3 кВ на протяжении 20 минут, что для кремниевого «остова» структуры дало удаление, по качественной оценке, более 20 нм. Ионное травление в данном режиме приводит к значительным изменениям состава и физико-

химического состояния в целом изученной части образца.

Анализ обзорных XPS спектров нитевидного кремния n-типа (Рисунок 7) показал высокую интенсивность линий кремния, что согласуется с данными SEM о возможном неполном заполнении (покрытии) пор. Максимальную интенсивность демонстрирует двухкомпонентная линия кислорода, отражающая вклад от оксида кремния и от белковых молекул. Присутствие значительного количества белка в порах подтверждается интенсивными линиями углерода и азота.

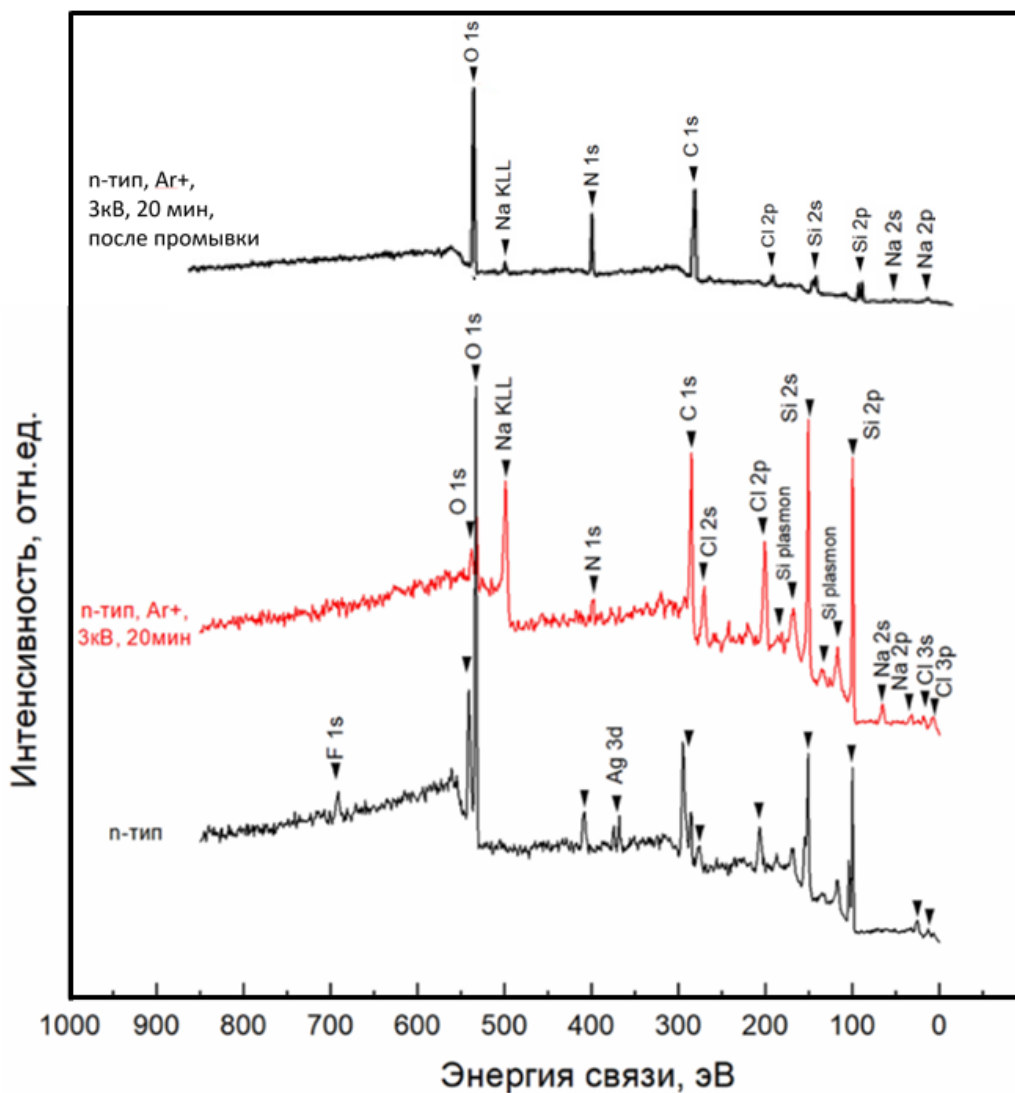


Рисунок 7 – Обзорные XPS спектры образца нитевидного кремния сформированного на подложке n-типа после интеграции с белком Dps до (черным, снизу) и после (красным) травления ионным пучком ( $\text{Ag}^+$ , 3кВ, 20 мин), а также после промывки остаточной соли и травления ионным пучком в том же режиме (черным, сверху). Отмечены характерные элементы, составляющие изученную поверхность.

Минимальное содержание соли в поверхностном слое ( $\sim 3$  нм) определяется по слабым линиям хлора при отсутствии натрия. Ионное травление приводит к существенной модификации физико-химического состояния структуры: линия кремния становится однокомпонентной, а интенсивность одной из линий кислорода значительно снижается, что указывает на удаление естественного оксида с развитой поверхности нитевидного массива кремния. В то же время 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. После удаления остаточных солей путем промывок изучаемого объекта (наслаивание 10 мкл деионизованной воды Milli-Q с последующим ее удалением) относительные интенсивности набора линий хлора (2s и 2p) и натрия (линия 2p и Оже линия KLL) существенно снижаются или же линии перестают наблюдаться. Таким образом, можно утверждать, что примененный подход к растворению остаточной соли NaCl приводит к ее практически полному удалению, при сохранении относительной интенсивности всех характерных остовных линий кислорода, азота и углерода входящих в состав молекул белка бактериоферритина Dps, покрывающего 3D-развитую поверхность массива нитей кремния. Аналогичная картина наблюдается для результатов полученных при исследовании массивов Si-NW, сформированных на подложках р-типа, при интеграции с белком Dps и после удаления соли.

Таким образом, комплексное исследование методами SEM и XPS впервые продемонстрировало возможность эффективного заполнения пустот в массивах нитевидного кремния белковыми молекулами бактериального ферритина Dps из клеток *E.coli*. Полученные данные демонстрируют перспективу разработки технологий адресной функционализации развитых поверхностей путем управляемого покрытия при контролируемой доставке биогибридного материала, что имеет значительный практический потенциал.

В заключении приведены основные результаты диссертации.

## ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ 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 полый части молекул, с размерами, не превышающими ее внутренней диаметр, не агломерируют. 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 цитированной 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. 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.

### Основное содержание диссертации изложено в следующих работах:

- A1 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.
- A2 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. - P. 102821.
- A3 Е. В. Паринава Исследования локализации белка Dps в матрице нитевидного кремния методом растровой электронной микроскопии / Е. В. Паринава, 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.
- A4 Паринава Е.В. Исследования био-наногибридного материала на основе бактериального ферритин-подобного белка DPS методами ПЭМ и РФЭС / Паринава Е.В., Антипов С.С., Беликов Е.А., Чувенкова О.А., Какулия Ю.С., Коюда Д.А., Требунских С.Ю., Скоробогатов М.С., Чумаков Р.Г., Лебедев А.М., Синельников А.А., Артохов В.Г., Овчинников О.В., Смирнов М.С., Турищев С.Ю. // Конденсированные среды и межфазные границы. – 2022. – Т. 24, № 2. – С. 265-272.
- A5 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. – P. 105348.
- A6 Е. В. Паринава Локализация молекул белка Dps E. coli в нитевидном кремнии при удалении

остаточной соли / Е. В. Паринова, 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.

A7 Е. В. Паринова Локализация молекул белка Dps *E.coli* в матрице нитевидного кремния по данным растровой электронной микроскопии и рентгеновской фотоэлектронной спектроскопии / Е. В. Паринова, С. С. Антипов, V. Sivakov, Е. А. Беликов, О. А. Чувенкова, Ю. С. Какулия, С. Ю. Требунских, М. С. Скоробогатов, Р. Г. Чумаков, А. М. Лебедев, В. Г. Артюхов, С. Ю. Турищев // Конденсированные среды и межфазные границы. – 2023. –Т. 25, №2. – С. 207-214.