

О ВОЗМОЖНОСТИ АНАЛИЗА ФРАГМЕНТОВ БИОПОЛИМЕРОВ С ПОМОЩЬЮ ТУННЕЛЬНОЙ МИКРОСКОПИИ

© 2015 г. Е.Ю. Чаплыгин, Р.А. Морозов*, В.К. Неволин*

ЗАО «Зеленоградский нанотехнологический центр», 124498, Москва, Зеленоград, проезд 4806, 5/23;

*Национальный исследовательский университет «МИЭТ», 124498, Москва, Зеленоград, проезд 4806, 5

E-mail: vkn@miee.ru

Поступила в редакцию 05.02.14 г.

После доработки 31.03.14 г.

С помощью сканирующей туннельной микроскопии получено изображение фрагментарной последовательности биополимерных молекул на примере бактериальных ДНК в естественных условиях (атмосферный воздух). Адсорбат воздуха (в основном пары воды), покрывающий молекулы, увеличивает локальную туннельную проводимость, а в силу избирательной адсорбции косвенно отражает локальную проводимость фрагментов, состоящих из разных последовательностей разных атомов, и сопутствует их туннельной проводимости. После обработки экспериментальных данных получены образные изображения фрагментов с увеличенными топографическими признаками для их последующей возможной идентификации.

Ключевые слова: биополимерные молекулы, сканирующая туннельная микроскопия, адсорбат воздуха, образные изображения.

Зондовая микроскопия используется в биологии сравнительно давно и накоплен значительный методический опыт [1–4]. Отдельные достижения уникальны, они получены на уровне «высокого искусства» и вполне заслуженно представлены в справочных изданиях [5]. Нашей задачей является распространение зондовой микроскопии для более массового и недорогого исследования биополимерных молекул в атмосфере воздуха. Однако наличие в атмосфере воздуха паров воды приводит к тому, что биомолекулы покрыты в основном адсорбатом воды. Более того, гидрофильность биомолекул приводит к тому, что в атмосфере воздуха биомолекулы плотно «укутаны» пленкой связанной воды [6], толщина которой, в частности, на поверхности твердых тел составляет около нанометра [7]. С одной стороны, это существенно затрудняет получение информации об отдельных фрагментах молекулы (полезный информативный сигнал весьма мал), с другой – позволяет реализовать туннельный режим в области более доступных наноамперных токов для возможной последующей идентификации фрагментов.

Стандартные методики сканирующей туннельной микроскопии (СТМ), описанные в ме-

тодических руководствах пользователя зондовых микроскопов и монографиях [8], не позволяют добиться фрагментарного разрешения биополимерных молекул. Модельные представления для сканирования и обработки СТМ-изображений, изложенные ниже, позволяют получать такое образное изображение нанообъекта, например фрагмента полимерной молекулы в цифровом виде, которое позволяет отличать его по характерным признакам. Такой подход, с одной стороны, не требует получения атомного разрешения поверхности молекул, что весьма трудоемко, особенно в атмосфере воздуха. С другой стороны, позволяет получать достаточно полную и востребованную информацию о фрагментарной последовательности, например, биополимерных молекул.

МОДЕЛЬНЫЕ ПРЕДСТАВЛЕНИЯ ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ ОБРАЗНОГО ИЗОБРАЖЕНИЯ МОЛЕКУЛ

Под образным изображением нанообъекта будем понимать его топографию, отличающуюся от истинной, но сохраняющую отличительные признаки.

За основу возьмем простую формулу туннельного тока между двумя электродами, используемую в большинстве руководств и учебников по сканирующей туннельной микроско-

Сокращение: СТМ – сканирующая туннельная микроскопия.

пии [8]. Влияние атмосферы воздуха учтем следующим образом:

$$J_t = \frac{V}{R_{0t}} e^{-dk}, \quad (1)$$

где d – межэлектродный зазор, V – приложенное напряжение ($V = \text{const}$), R_{0t} – величина сопротивления при коротком замыкании, когда $d = 0$, $k_t = \frac{2}{\hbar} \sqrt{2mq\bar{\varphi}}$ (\hbar – постоянная Планка, m , q – соответственно масса и заряд электрона, $\bar{\varphi} = (\varphi_1 + \varphi_2)/2$ – среднее значение работ выхода электронов из двух электродов – образца и зонда). Формула (1) справедлива в случае $V \ll \bar{\varphi}$.

Проводимость молекулы через ее поперечное сечение будем описывать через механизм прыжкового туннелирования. Известно, что электронный транспорт в молекулярных структурах представляет собой цепь последовательных квантовых прыжков электронов [9]. Считаем, что наличие молекул адсорбата, встроившихся в структуру биополимерной молекулы, не меняет механизм проводимости, а в силу избирательной адсорбции косвенно отражает локальную проводимость фрагментов, состоящих из разных последовательностей разных атомов, и сопутствует их туннельной проводимости. В нашем случае электрон из подложки должен туннелировать через ряд атомов фрагмента и молекул адсорбата в структуре молекулы и далее туннелировать на зонд через зазор величиной d .

Тогда ток в точке x над поверхностью образца согласно закону Ома для участка цепи можно записать в виде:

$$J(x) = \frac{V}{R_p(x) + R_t(x)}. \quad (2)$$

Здесь предполагается, что сканирование идет вдоль поверхности по одной координате x . Туннельное сопротивление зазора d согласно формуле (1) равно

$$R_t(x) = R_{0t}(x) e^{d(x)k_t(x)},$$

где $R_p(x)$ – сопротивление поперечного сечения молекулы, покрытой адсорбатом, в точке x . В нашем случае последовательного соединения элементов цепи $R_p(x) = R_{0p}(x)$. Тогда

$$J(x) = \frac{V}{R_p(x)} \frac{1}{1 + e^{d(x)k_t(x)}}. \quad (3)$$

Поскольку всегда $e^{d(x)k_t(x)} > 1$, то

$$J(x) \approx \frac{V}{R_p(x)} e^{-d(x)k_t(x)}. \quad (4)$$

Для дальнейших рассуждений переопределим выражение для $R_p(x)$ в виде, не противоречащем установившимся представлениям о прыжковой проводимости [10]:

$$R_p(x) = R_{0p} e^{l(x)k_p(x)}. \quad (5)$$

Здесь $l(x)$ – характерный размер молекулы в поперечном сечении в точке x , $k_p(x)$ – коэффициент, учитывающий туннельную проницаемость молекулы, покрытой адсорбатом, в поперечном сечении в точке x , $k_p(x) > 0$, R_{0p} – величина сопротивления между подложкой и молекулой. Для простоты считаем эту величину постоянной, перенеся все функциональные зависимости в показатель экспоненты. Тогда окончательно выражение для туннельного тока в цепи запишется в виде:

$$J(x) \approx \frac{V}{R_{0p}(x)} e^{-l(x)k_p(x) - d(x)k_t(x)}. \quad (6)$$

Рассмотрим режим постоянного тока. Обычно задается постоянная логарифмическая величина тока в цепи. Имеем:

$$\ln J(x) = \ln \frac{V}{R_{0p}} - l(x)k_p(x) - d(x)k_t(x) = \text{const}. \quad (7)$$

Из формулы (7) следует, если переопределить константу, то в режиме постоянного тока должна сохраняться величина

$$l(x)k_p(x) + d(x)k_t(x) = \text{const}. \quad (8)$$

Из формул (7) и (8) можно видеть, что следует задавать туннельный ток в цепи такой, чтобы при сканировании в области вершины молекулы величина $d(x)$ была минимальной. В этом случае вклад собственной проводимости молекулы будет наибольшим. Из формулы (8) также следует, что должно выполняться равенство величин в произвольной точке подложки x_1 и в области вершины молекулы на поверхности подложки x_2

$$d(x_1)k_t(x_1) = l(x_2)k_p(x_2) + d(x_2)k_t(x_2) = \text{const}. \quad (9)$$

Здесь учитывается, что в произвольной точке на поверхности подложки вне пределов молекулы величина $l(x)$ равна нулю.

На основании формулы (9) можно сформулировать алгоритм обработки экспериментальных данных. Если из топографии поверхности $Z(x)$ с расположенной на ней молекулой $Z(x)$ вы-

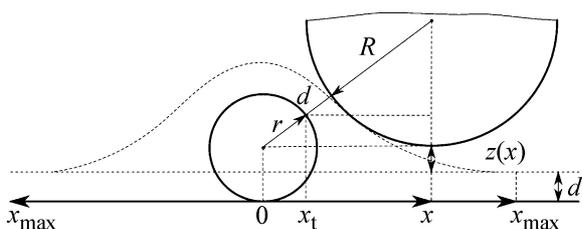


Рис. 1. Модель сканирования наночастицы зондом с конечным радиусом в режиме постоянного тока.

часть плоскость $Z_0(x) = \text{const}$, которая выше всех исходных шероховатостей подложки, то получим изображение молекулы в виде:

$$\Delta Z(x) = Z(x) - Z_0(x). \quad (10)$$

Для большей избирательности определения фрагментарной последовательности в молекуле увеличим изображение по оси Z , введя коэффициент $n > 1$, и получим изображение молекулы в виде:

$$n\Delta Z(x). \quad (11)$$

Для применения такого алгоритма определения фрагментов молекулы необходимо, чтобы шероховатость подложки была значительно меньше поперечных размеров молекулы (иначе говоря, подложки должны быть с атомной гладкой поверхностью), а уровень шумов прибора по оси Z должен быть менее 0,01–0,02 нм.

Предыдущие рассуждения справедливы для точечного зонда и не учитывают конечные размеры острия зонда. Как правило, радиус острия зонда R на высоте наночастицы, лежащей на подложке, больше радиуса поперечного сечения молекул r , $R \gg r$. В этом случае, например, нанотрубка или молекула ДНК, лежащая на подложке, «сканирует» острие зонда [11]. Главное, что латеральные размеры поперечного изображения нанотрубки во много раз превышают ее радиус (рис. 1, пунктирная кривая огибающая частицу радиуса r). Далее для простоты в качестве молекул будем рассматривать молекулы с круговым сечением типа нанотрубок. Из простых геометрических соображений можно получить неявное выражение для $Z(x)$:

$$(r + d + R)^2 = x^2 + (R + Z(x) + d - r)^2. \quad (12)$$

Из этой формулы следует, что максимальное расстояние от центра нанотрубки, на котором начинается (или кончается) ее сканирование ($Z(x_{\text{max}}) = 0$), равно:

$$x_{\text{max}} \approx 2\sqrt{Rr}. \quad (13)$$

При выводе этой формулы учитывалось, что $R > d$. Размеры максимального латерального изображения нанотрубки равны $2x_{\text{max}} \approx 4\sqrt{Rr}$. Например, при радиусе нанотрубки $r = 1$ нм и радиусе зонда $R = 10$ нм латеральное изображение частицы составляет 12,6 нм, что более чем в шесть раз больше диаметра нанотрубки. Заметим при этом, что имеется «мертвая» зона на поверхности нанотрубки, которая не сканируется. В латеральном направлении вдоль оси x сканируется только часть поверхности частицы, равная (см. рис. 1)

$$2x_t \approx 2r\sqrt{\frac{r}{R}} < 2r. \quad (14)$$

Например, при радиусе нанотрубки $r = 1$ нм и радиусе зонда $R = 10$ нм $2x_t \approx 0,63$ нм, что составляет $\sim 30\%$ от диаметра нанотрубки. В связи с этим реальное «растяжение» изображения в латеральном направлении значительно больше и составляет:

$$\frac{x_{\text{max}}}{x_t} \approx \frac{2R}{r}. \quad (15)$$

При радиусе нанотрубки $r = 1$ нм и радиусе зонда $R = 10$ нм реальное растяжение изображения вдоль оси x может достигать двадцатикратного значения.

Наличие «мертвой» зоны на поверхности молекулы при сканировании позволяет решать вопросы закрепления молекул на поверхности подложки. Рассмотрим систему из молекулы на подложке, приклеенной проводящим пленочным клеем, толщиной r . Тогда имеет место уравнение

$$(r + d + R)^2 = x^2 + (Z(x) + R + d)^2. \quad (16)$$

В этом случае

$$\tilde{x}_{\text{max}} \approx \sqrt{r^2 + 2rR} \approx r. \quad (17)$$

Формально латеральные размеры изображения несколько больше поперечных размеров молекулы, и получается, что весьма полезно «приклеивать» молекулы к подложке проводящей пленкой толщиной r . В этом случае в латеральном направлении вдоль оси x сканируется только часть поверхности частицы, равная

$$\tilde{x}_t \approx x_{\text{max}} \frac{r}{r+R} \approx r \frac{r}{r+R}. \quad (18)$$

Тогда

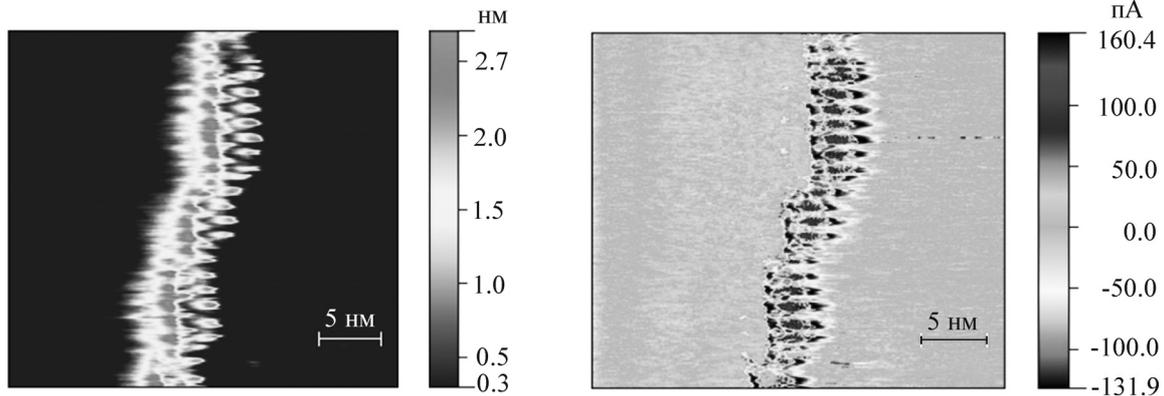


Рис. 2. СТМ-изображение двойной спирали бактериальной ДНК: режим постоянного тока (а); режим токового контраста (б).

$$\tilde{x}_t/x_t \approx \frac{1}{r+R} \sqrt{\frac{R}{r}}. \quad (19)$$

Для рассмотренного выше примера соотношение $\tilde{x}_t/x_t \approx 0,287$. Иначе говоря, при погружении молекулы на половину в проводящую среду сканируется меньшая часть ее поверхности (только треть поверхности от максимально возможной величины при сканировании в латеральном направлении). Это «окно» туннельной прозрачности для определения фрагментов молекулы. Приведенные выше формулы предназначены для оценки латерального расширения изображения для зонда в виде цилиндра с полусферой радиуса R . Можно рассмотреть другой предельный случай – конический зонд с малым углом раскрытия. При смещении такого зонда от вершины молекулы туннельный ток пойдет по наикратчайшему пути через его боковую поверхность, тем самым расширяя латеральное изображение. Таким образом, для латерального разрешения имеет значение не только наличие крайнего атома на вершине острия, но поперечные размеры зонда на высоте молекулы над плоской поверхностью. Как правило, размеры и форма острия зонда случайны, и их можно экспериментально оценить при исследовании тестовых структур [11].

Полученные выше формулы справедливы для идеально плоской поверхности подложки, если поверхность подложки, на которой лежит молекула, шероховатая, то надо вычесть плоскость $Z_0(x) = \text{const}$, такую, что она выше всех исходных шероховатостей подложки в соответствии с формулой (10). В результате будем иметь отдельное изображение частицы, растянутое в латеральном направлении. Заметим еще, что для сканирования принципиальное значение имеет совершенство поверхности острия зонда,

поскольку оно накладывается на изображение наночастицы.

В приведенных выше рассуждениях влияние атмосферы воздуха учитывалось формально. В эксперименте ситуация является более сложной. Известно, что в атмосфере воздуха используется «самосжатый» режим туннелирования [7], когда острие туннельного зонда «протискивается» к поверхности образца, обеспечивая заданный туннельный ток. Наличие атмосферы воздуха и наличие адсорбата на электродах, тем не менее, позволяет получать атомное разрешение поверхности углеродных нанотрубок, состоящих из однородных атомов и однородной поверхности [12]. В случае, например, молекул ДНК ситуация является двойкой. Наличие адсорбированной пленки на молекулах позволяет «прижать» молекулу к поверхности подложки, задавая минимальный туннельный зазор в соответствии с формулой (9), и обеспечить поперечную проводимость молекулы. Это положительный фактор. Отрицательный фактор, который был описан выше, заключается в том, что связанная вода «забывает» нуклеотиды и затрудняет их идентификацию. Тем не менее, учитывая туннельную проводимость адсорбата [7] и избирательную адсорбцию молекул воды на различных фрагментах полимерной молекулы, это явление может в определенной мере способствовать идентификации отдельных фрагментов.

Малый угловой размер «окна» туннельной прозрачности и относительно малая кривизна этого участка поверхности позволяют получить дополнительную информацию о фрагментарной структуре молекул во время сканирования в режиме постоянного тока. Для этого используется известный в СТМ-микроскопии режим растекания тока. В режиме постоянного тока в каждой точке измеряется дополнительно от-

клонение тока в цепи относительно заданного среднего значения. При этом может воспроизводиться токовое изображение локальной проводимости молекулы в каждой точке сканирования.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ

На рис. 2 приведено СТМ-изображение двойной спирали бактериальной ДНК на подложках из пиролитического графита и показаны параметры сканирования для двух режимов: область сканирования 25×25 нм: (а) – режим постоянного тока, $U = 0,3$ В, $I = 0,25$ нА; (б) – режим токового контраста, $U = 0,3$ В. Высота фрагментов молекулы над поверхностью подложки отображается градацией яркости, также градацией яркости отображаются величины токов растекания в каждой точке на поверхности подложки.

Из рис. 2 можно видеть, высота молекул по шкале цветности соответствует ~ 2 нм, что согласуется со справочными данными. Как известно, высота нанообъектов на подложке в зондовой микроскопии измеряется наиболее точно. Латеральное поперечное уширение образного изображения молекулы ~ 7 нм. Тогда в соответствии с формулой (13) радиус острия зонда оценивается как $R \approx 3,2$ нм, а поперечные размеры $6,4$ нм, что в три раза превышает поперечные размеры молекулы и свидетельствует в пользу достаточно острого зонда. Расстояние между центрами фрагментов, регулярно расположенных вдоль молекулы, увеличено и составляет $\sim 1,4$ нм, между краями менее $\sim 0,7$ нм. Фрагменты совпадают или различаются по виду контура изображения и градации яркости.

Результаты получены на отечественном сканирующем зондовом микроскопе Solver P47 (ЗАО «Нанотехнология» НТ МДТ). Для получения максимально возможного разрешения использован стандартный набор известных процедур. Были предприняты меры по защите микроскопов от сейсмических и акустических колебаний. Для защиты от электромагнитных помех использовано автономное электропитание и дополнительное экранирование аппаратно-программными методами, описанными выше, и экспериментальным путем были определены области параметров сканирования с высоким разрешением.

Подложки из пиролитического графита для сканирования в атмосфере воздуха выбраны по следующим соображениям. С помощью скотча легко получают чистые и атомно-гладкие поверхности на подложке. Подложка из пиролитического графита позволяет в любой момент

проверить латеральное разрешение микроскопа путем получения атомного разрешения на участках поверхности, свободных от молекул. Толщина пленки адсорбата на этих подложках минимальна по сравнению с подложками из золота и кремния и при относительной влажности 50% составляет $(0,7 - 1,0) \pm 0,4$ нм, что меньше характерных поперечных размеров двухцепочечных молекул ДНК. На золотых подложках толщина адсорбата при относительной влажности 50% составляет $(6,6 - 7,0) \pm 0,6$ нм [7]. На таких подложках зацепившиеся за поверхность молекулы нужно «разыскивать» под толстым слоем адсорбата. Недостатком подложек из пирографита является то, что с поверхностью слабо связываются короткие молекулы, и они могут «выметаться» зондом за края области сканирования.

При сравнении с зарубежными данными по исследованию молекул ДНК с помощью туннельной микроскопии [13,14] наши результаты выгодно отличаются тем, что явно выделяются все фрагменты в последовательности молекул. У нас использована цветная шкала градаций цвета как одна из осей координат для топографического изображения молекул, что важно в последующем для создания автоматической системы распознавания фрагментов молекул.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Биополимерные молекулы имеют замечательное свойство, заключающееся в том, что различные фрагменты молекулы имеют разную поперечную туннельную прозрачность и в связи с этим имеют характерное топографическое изображение, которое позволяет оценить их характерные размеры и идентифицировать их при наличии тестовых образцов. С помощью автоматической программы распознавания образных изображений фрагментов молекулы, на наш взгляд, можно с большей долей вероятности устанавливать их последовательность в молекулах.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. V. J. Morris, A. R. Kirby, and A. P. Gunning, *Atomic Force Microscopy for Biologists* (Imperial College Press, 1999).
2. *Force Microscopy. Applications in Biology and Medicine*, Ed. by B. P. Jena and J. K. H. Horber (published simultaneously in Canada, 2006).
3. *Сканирующая зондовая микроскопия биополимеров*, под ред. И.В. Яминского. (Научный мир, М., 1997).
4. И. В. Яминский, *Современные достижения бионаноскопии*, под ред. Дж. Дэвиса и М. Томпсона (Техносфера, М., 2011).

5. *Справочник Шпрингера по нанотехнологиям*, под ред. Б. Бхушана (Техносфера, М., 2010), т. 2.
6. В. А. Намиот, А. А. Анашкина, И. В. Филатов и др., *Биофизика* **57** (6), 925 (2012).
7. В. К. Неволин, *Зондовые нанотехнологии в электронике* (Техносфера, М., 2006).
8. В. Миронов, *Основы сканирующей зондовой микроскопии* (Техносфера, М., 2004).
9. П. М. Красильников, *Биофизика* **56** (5), 787 (2011).
10. *Физическая энциклопедия*, под ред. А.М. Прохорова (Изд –во «Советская энциклопедия», М., 1988–1999).
11. И. И. Бобринецкий, В. К. Неволин, А. А. Строганов и Ю. А. Чаплыгин, Патент РФ № 2317940 от 14.03.2006.
12. В. К. Неволин, А. А. Строганов и Ю. А. Чаплыгин, *Письма в ЖТФ* **29** (8), 84 (2003).
13. H. Tanaka and T. Kawai, *Nature Nanotechnology* **4** (8), 518 (2009).
14. E. Shapir, L. Sagiv, G. Livshitz, J. Ghabboun, et al., porath@chem.ch.huji.ac.il.

On the Possibility of Analysis of Biopolymer Fragments by Tunneling Microscopy

E.Yu. Chaplygin*, **R.A. Morozov****, and **V.K. Nevolin****

**Closed Joint-Stock Company "Zelenograd Nanotechnology Center",
proezd 4806, 5/23, Zelenograd, Moscow, 124498 Russia*

***National Research University "MIET", proezd 4806, 5, Zelenograd, Moscow, 124498 Russia*

An image of fragmented sequence of biopolymer molecules by example of bacterial DNA *in vivo* (in atmosphere air) was received by scanning tunneling microscopy. An air adsorbate (mainly water vapors) that covers the molecule's surface gives rise to local tunnel conductivity and by virtue of adsorption selectivity indirectly reflects local conductance of fragments that consist of different rows of various atoms, supporting their tunnel conductivity. Having processed experimental data fragment images are obtained with scaled-up topography characteristics for their further identification.

Key words: biopolymer molecules, scanning tunneling microscopy, air adsorbate, figurative images