

# Как увидит «нано»?

О.С.Соколова

В начале XXI в. в печати и масс-медиа появилось новое слово «нанотехнологии». Очень быстро во всем мире выросло число программ и публикаций, включающих это понятие. Сегодня в поисковой строке «nanoparticle» более 1.3 млн документов. Люди, далекие от биологии или физики, часто интересуются: что это за «нано» такое, которым занимаются на государственном уровне?

Наночастицы не возникли одновременно с термином «нанотехнологии». Как герой Мольера не знал, что говорит прозой, так и в наше время многие не догадываются, что наночастицы существуют миллионы лет и ученые начали их изучать еще в XIX в. Наночастица — это любая частица с размерами в нанометровом диапазоне. Этим условиям удовлетворяют биологические мембраны, макромолекулы, частицы коллоидного серебра и оксидов металлов, нанотрубки, фуллерены и многие другие *нанообъекты*.

Для того, чтобы понять, как устроены наночастицы, необходимо опуститься на уровень в миллиард раз меньший, чем окружающий нас мир. До сих пор, к сожалению, не изобрели прибора, который бы позволил *in vivo* наблюдать за процессами, происходящими на молекулярном уровне. В структурной биологии все еще пользуются разрушающими методами: рентгеноструктурным анализом, ядерно-магнитным резонансом (ЯМР), электронной микроскопией.



**Ольга Сергеевна Соколова**, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник кафедры биоинженерии биологического факультета Московского государственного университета им.М.В.Ломоносова. Область научных интересов — электронная микроскопия, структурная биология.

## Милли-микро-нано

Начнем спуск в мир «нано».

*Миллиметр* — одна тысячная часть метра ( $10^{-3}$  м), которую можно увидеть невооруженным глазом на обыкновенной линейке. Миллиметровая бумага, миллиметры ртутного столба, скорость оседания эритроцитов: все эти значения нам давно знакомы, мы сталкиваемся с ними в повседневной практике.

*Микрометр* ( $10^{-6}$  м) — одну миллионную часть метра — уже не увидишь невооруженным глазом. Размер около 1 мкм имеют клетки прокариот. Клетки эукариот в 20—40 раз больше, однако их все равно не разглядеть без помощи светового микроскопа.

Основная характеристика этого прибора, определяющая качество его оптической системы, — разрешающая способность, которая определяется как минимальное расстояние между двумя точками изображения объекта, наблюдаемыми раздельно. Так как человечес-

кий глаз наиболее чувствителен к желто-зеленой части спектра, в световой микроскопии используются светом с длиной волны около 550 нм. В этих условиях теоретический предел разрешения равен половине длины волны, т.е. 225 нм. Наночастицы с этим разрешением не очень-то разглядишь.

*Нанометр* — одна миллиардная часть метра ( $10^{-9}$  м). Официального определения наночастицы до сих пор не существует, поэтому большинство исследователей и производителей пользуются документом Британского института стандартов (BSI), который в 2008 г. определил наночастицы, как частицы, имеющие одно или более измерений не более 100 нм [1].

В структурной биологии помимо нанометра распространена единица *ангстрем* (ångström), которая, строго говоря, не входит в систему «СИ». Символ для обозначения этой единицы — Å. Эта величина была названа в честь шведского физика Андер-

са Йонаса Ангрема (1814—1874), известного своими работами по спектроскопии, астрофизике и магнетизму. Ангстрем часто употребляется в научной литературе для обозначения длин химических связей, длины волны электромагнитного излучения и разрешения атомных и молекулярных структур различных наночастиц.

### Как увидеть наночастицы?

Наночастицы можно разглядеть и сфотографировать только с применением электронного микроскопа. Наиболее широко для визуализации наночастиц используют метод трансмиссионной (просвечивающей) электронной микроскопии (ПЭМ).

Разрешающая способность электронного микроскопа существенно увеличена по сравнению со световым. Длина волны электронов находится в диапазоне  $10^{-12}$  м и зависит от величины ускоряющего напряжения. Микроскопы с ускоряющим напряжением 300 кВ должны бы увеличивать теоретическое разрешение до долей Å, однако на практике этого не происходит из-за различных aberrаций (искажений изображения линзой микроскопа); различают сферическую, хроматическую aberrацию и астигматизм.

Несмотря на явную геометрическую аналогию в построении оптических схем светового и электронного микроскопов, между ними есть существенные различия. Одно из них состоит в механизме формирования контраста изображения. В световом микроскопе окрашенный препарат оптически больше соответствует абсорбционной решетке, так как в нем избирательно поглощается свет определенных участков спектра, а в электронном — фазовой решетке, поскольку в нем происходит в основном рассеяние (отклонение траекторий) электронов от первоначального направления. Чем выше концентрация тяже-

лых атомов в объекте, тем сильнее рассеиваются электроны. Если мы имеем дело с биологической макромолекулой, в которой тяжелых атомов нет, то их (осмий, уран и свинец) искусственно вводят на стадии контрастирования. Электроны, рассеянные на большие углы, задерживаются апертурной диафрагмой, расположенной в задней фокальной плоскости объектива, и не участвуют в формировании изображения. Причем чем меньше диаметр диафрагмы, тем больше рассеянных электронов задерживается и тем выше контраст изображения.

Преимущество просвечивающей электронной микроскопии перед другими методами структурной биологии заключается в том, что она позволяет визуализировать не только трехмерную структуру, но и динамику (конформационные перестройки) самых разнообразных нанобиологических объектов с разрешением от 2—5 нм до атомного (1.8 нм). Одновременно в ПЭМ отсутствуют многие недостатки таких методов, как рентгеноструктурный анализ и ядерно-магнитный резонанс: в нем нет лимитирующего размера частиц, не обязательно наличие кристаллов, количество и концентрация используемого материала достаточно малы. Модификация метода — крио-ПЭМ — позволяет наблюдать макромолекулы в нативном водном окружении в состоянии, близком к физиологическому.

### Немного истории

Просвечивающую электронную микроскопию биологических макромолекул начали разрабатывать более 40 лет назад в Великобритании, США и СССР. Вначале ученые изучали лишь изображения молекул крупных белков, окрашенных негативно солями тяжелых металлов (в качестве примеров можно упомянуть рибосомальные субъединицы, бактериофаги). Эти изобра-



Рис. 1. Трехмерная реконструкция части оболочки вируса полиомы (модель 80-х годов).

жения идентифицировали и интерпретировали непосредственно на микрофотографии [2].

После того как исследователи догадались, что проекционные структуры — это суммарная плотность трехмерного объекта, стало возможным реконструировать трехмерные объекты по набору проекций с различными координатами [3]. Трехмерные реконструкции с конца 60-х до 80-х годов XX в. представляли собой вырезанные из пенопласта или оргстекла стопки, каждый слой которых соответствовал одной проекции (рис. 1). Только появление в середине 1990-х годов современных компьютеров с графическими программами избавило биологов от необходимости орудовать лобзиком.

В 80-х годах впервые применили криоэлектронную микроскопию, позволяющую изучать наночастицы, не окрашивая их, а помещая в моментально замороженный тонкий (около 0.5 нм) слой воды [4]. Этот метод позволил определить внутреннюю структуру молекул.

### Готовим образцы

Электронная микроскопия высокого разрешения — кропотливый процесс и для получения качественной трехмерной структуры требует определенной последовательности действий (рис. 2).

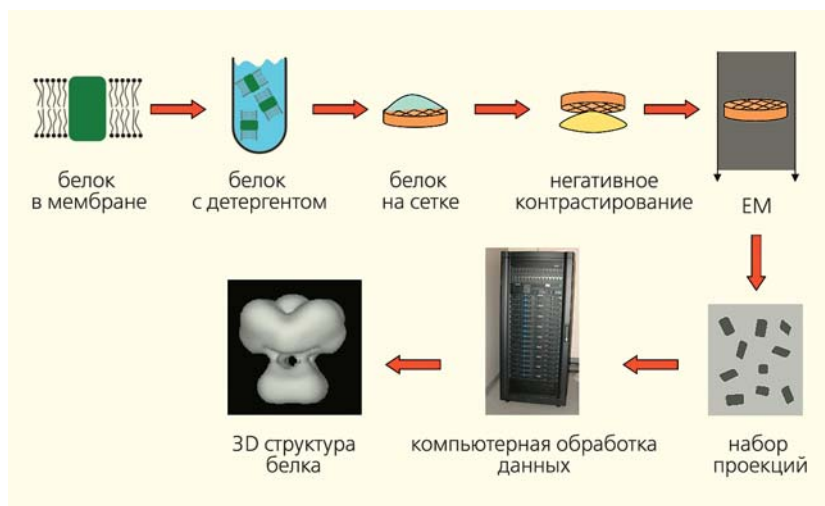


Рис.2. Схема подготовки образцов для получения трехмерной структуры белковой молекулы.

Во-первых, чтобы наблюдать отдельные частицы, белок необходимо получить в очищенном виде. Для этого клетки или ткани механически разрушают, мембраны растворяют в детергенте и применяют различные модификации хроматографического разделения. Чистота препарата и определяет получение структуры с высоким разрешением. Еще один критический параметр — концентрация. Для крио-ПЭМ необходим препарат с концентрацией 0.5–1.0 мг/мл, а для негативного контрастирования еще меньше — 0.05–0.1 мг/мл.

Во-вторых, образец нужно поместить в колонну электронного микроскопа. Для его просмотра используют сетки, сделанные из немагнитного материала — меди, никеля, платины (диаметр 3 мм и 200–400 ячеек на дюйм). Сверху сетку покрывают углеродной пленкой, получаемой при распылении графита в специальных установках. На эту пленку и помещаются объекты исследования (срезы, замороженные срезы, наночастицы, целые клетки либо двумерные кристаллы). Поскольку углерод гидрофобен, подложку обрабатывают в атмосфере тлеющего разряда, чтобы придать ей гидрофильные свойства для доступности водным растворам. Сетки, по-

крытые углеродом, помещают в специальную камеру прибора, где создается частичный вакуум. Когда между катодом и анодом подается высокое напряжение, разность потенциалов ионизирует газ, находящийся в камере. Негативно заряженные ионы осаждаются на углерод, придавая ему отрицательный заряд и гидрофильные свойства.

Хотя углеродная пленка очень тонкая (20 нм) и, как правило, не мешает визуализации объектов, в криомикроскопии используют сетки с отверстиями в углеродной подложке, которые уменьшают поглощение и рассеивание пучка электронов слоем углерода.

### Криомикроскопия

Возможности структурной биологии значительно расширились с появлением криомикроскопии. С ее помощью нанобъекты можно реконструировать в нативном состоянии, в буфере или клеточном окружении. Это позволяет изучать различные функциональные и конформационные изменения в молекулах. Поскольку в криомикроскопии замораживание моментальное (менее чем 1 мс), возможно фиксировать корот-

коживущие структурные конформации, если нанести лиганд на сетку непосредственно перед замораживанием. Таким образом определяли структуру активированного никотинового ацетилхолинового рецептора со временем жизни около 10 мс [5].

Замораживают образцы, быстро помещая их на приготовленную сетку в криоген, в качестве которого обычно используют этан (его теплоотдача значительно меньше, чем у жидкого азота, а температура сжижения незначительно выше:  $-188^{\circ}\text{C}$ ). Вода, окружающая образец, моментально замораживается, и тот оказывается в слое аморфного льда. Очень важно не допустить образования так называемого кубического льда, который адсорбирует электроны и не дает возможности идентифицировать образец.

### Начинаем реконструкцию

Рассмотрим, как формируется изображение в электронном микроскопе. Электроны, проходя через вещество объекта, рассеиваются, т.е. изменяют свои траектории. Число рассеянных электронов возрастает с увеличением плотности вещества, его атомного номера, толщины образца и с уменьшением энергии электронов. В результате упругого рассеяния меняются импульсы частиц, а при неупругом рассеянии наряду с изменением импульсов меняется также их внутреннее состояние.

Основное следствие неупругого рассеяния электронов — диссипация их энергии в образце, приводящая к радиационному повреждению. Хотя действие рентгеновского излучения в 1000 раз более разрушительно, размер пучка при рассеянии электронов в 100 тыс. раз больше. Поэтому радиационное поражение остается серьезной проблемой в электронной микроскопии. Чтобы его предотвратить, образец охлаждают и стараются не подвергать избыточ-

ному электронному излучению (работа в режиме низкой дозы — 4–10 электронов на  $\text{\AA}^2$ ). В результате отношение сигнал/шум оказывается низким, что лимитирует количество информации, которую можно получить от одной молекулы. Следовательно, получить структуру с высоким разрешением от одной молекулы невозможно. Теоретически для этого требуется по крайней мере 10 тыс. молекул, а на практике еще больше: например, для получения атомной структуры бактериородопсина потребовалось 5 млн молекул [6].

Электронная микрофотография состоит из двумерных проекций трехмерных объектов. Для того чтобы собрать несколько десятков тысяч индивидуальных изображений частиц с нескольких десятков микрофотографий или ПЗС-изображений, существуют различные программы. Сбор частиц проводят вручную на экране компьютера (с помощью мышки), полуавтоматически и автоматически. В этом случае достаточно указать мышкой несколько соответствующих пар частиц в разных концах микрофотографии, а программа экстраполирует положение других частиц.

Для определения трехмерной структуры различные виды объекта необходимо выровнять и совместить. Объект может иметь симметрию (кристаллическую, спиральную, икосаэдрическую, ротационную) или быть асимметричным (рис.3). Наличие симметрии означает повторение одного и того же мотива. Наличие осей 2-го, 3-го и других порядков обуславливает ротационную симметрию (например, ионные каналы [7, 8], родопсин [6], светособирающие комплексы [9]). Симметрическая операция спирального смещения приводит к появлению спиральной симметрии (актиновые филаменты, амилоиды). Следует иметь в виду, что зеркальных изомеров к существующим молекулам, как правило, нет, поэтому любые типы

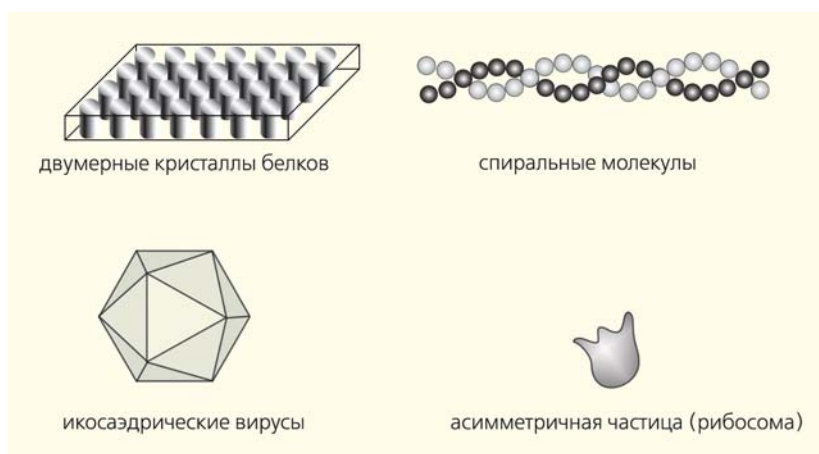


Рис.3. Разнообразие бионанообъектов, изучаемых методом ПЭМ [18].

симметрических упаковок белковых молекул могут иметь только оси, а не плоскости симметрии. Отношение сигнал/шум образца симметрия увеличивает, уменьшая таким образом общее количество изображений, необходимых для получения трехмерной реконструкции.

Существуют три основных принципа реконструкции. Во-первых, изображения частиц нужно получить в максимально возможном количестве ориентаций. Этого можно добиться, используя симметрию, поворот сетки на заданные углы, а также при произвольном расположении наночастиц в образце.

Во-вторых, необходимо определить ориентацию (углы поворота) и центр для каждой частицы (рис.4). Для уточнения этих параметров обычно проводят перекрестное сравнение между различными изображениями или сравнение с проекционными изображениями предварительно полученной трехмерной модели.

В-третьих, изображения частиц необходимо сдвинуть (в направлении  $x$  или  $y$  на рис.4), чтобы привести все объекты к одинаковому виду. Только после этого можно рассчитывать трехмерную реконструкцию. Образцы с разной геометрией требу-

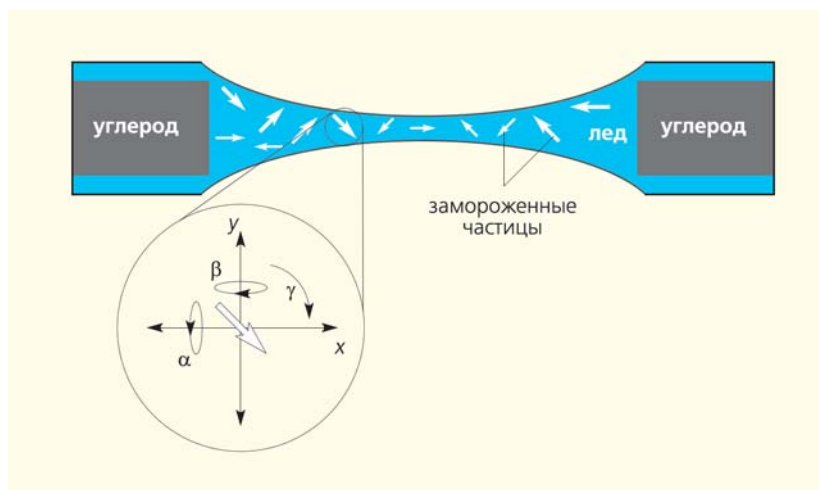


Рис.4. Схема ориентации молекул, замороженных в слое аморфного льда, и пять параметров наночастиц, которые необходимо определить для построения трехмерной реконструкции: углы поворота  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  и направления сдвига  $x$ ,  $y$  [19].

ют специальных схем сбора и разных подходов к реконструкции. В настоящее время есть множество программ для расчета трехмерных структур, в основе которых лежат принципы взаимной корреляции [10].

### Проводим интерпретацию

Полученную в результате анализа трехмерную структуру необходимо обработать, чтобы определить локализацию доменов и/или другие структурные особенности. Рассмотрим распространенные методы интерпретации трехмерной структуры.

Наиболее широко распространенный метод — докинг кристаллической структуры. Он используется в тех случаях, когда известна кристаллическая структура части молекулы или комплекса (рис.5,а), и проводить его можно вручную [11] или автоматически [12]. Докинг атомных структур позволяет уточнить строение олигомерного белка, определить специфические взаимоотношения между отдельными основаниями, либо даже уточнить кристаллическую структуру — так, как это было сделано для вируса табачной мозаики [13]. Для сопоставления трехмерной реконструкции и кристаллической структуры последнюю можно привести к низкому разрешению. Так сде-

тали при интерпретации доменной структуры потенциал-зависимых калиевых каналов [8].

Для интерпретации расположения удаленных доменов используют мутагенез. Для точного определения позиции рассчитывают разностное изображение между проекциями или трехмерными структурами дикого типа и транскрибированного мутанта. Так определяли положение С-концевых доменов ионных каналов (рис.5,б,в), удаленных при получении полноразмерной атомной структуры [14], и их перераспределение в результате присоединения β-субъединицы ионным каналом *Shaker* [15].

Иммуномечение применяется для идентификации отдельных частей структуры или мест связывания лигандов, если имеются антитела против отдельных эпитопов, входящих в состав изучаемой молекулы. Целая молекула антитела достаточно гибкая, поэтому при усреднении нескольких изображений комплекса с антителом отношение сигнал/шум часто уменьшается (рис.6) [16]. Этот метод имеет некоторые ограничения. Например, если антитела получены против гибких неструктурированных петель в структуре белка, определить место их связывания путем суммирования многих изображений невозможно. Для удаления несвязыв-

шихся антител используют методы хроматографического разделения, приводящие к значительному разведению исследуемого образца.

**Кластеризация и образование комплексов.** Когда концентрация детергента снижается до критической, молекул детергента не хватает для образования мицеллы вокруг каждой молекулы белка, поэтому несколько молекул образуют кластер. При этом их мембранные части оказываются окружены одной мицеллой (рис.6,2,д). В этом случае можно понять, какая часть белка — мембранная.

**Мечение наночастицами золота** применяется как при иммуномечении (меченые антитела), так и при непосредственной пришивке золотой наночастицы к молекуле (с помощью S-связи, по аминокислоте и др.). Для мечения, как правило, используют коммерческие препараты наночастиц золота (например, Nanoprobes). Преимущества этого метода в том, что наночастица золота маленькая, а линкер, привязывающий частицу к молекуле, — короткий, поэтому мечение очень точное. Но эти же параметры не позволяют использовать нанозолото в сочетании с негативным контрастированием, которое практически полностью маскирует частицу золота.

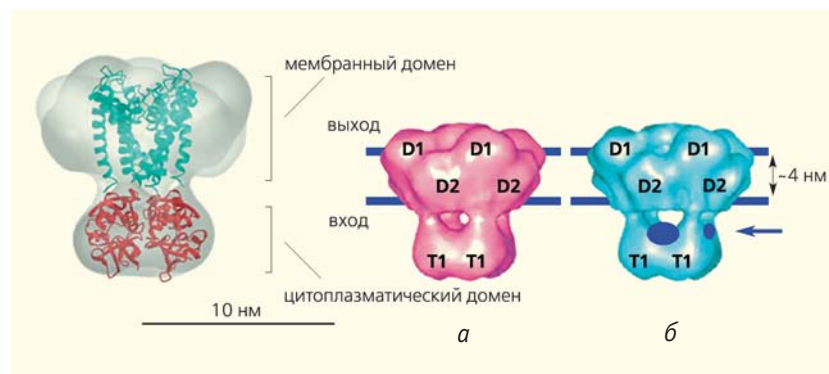


Рис.5. Докинг кристаллической структуры в электронную плотность ионного канала, полученную с разрешением 25 Å (слева). Справа — сравнение трехмерных структур полноразмерного калиевого канала (а) и канала с удаленным С-концом (б). Разностный пик показан синей стрелкой в составе мутантного канала.

### Техногенные наночастицы

В наноразмерном состоянии многие вещества небиологической природы приобретают новые свойства и становятся весьма активными биологически. Это, с одной стороны, открывает новые возможности применения наноматериалов в биомедицине, фармакологии, производстве продуктов питания, при решении экологических и сельскохозяйственных проблем. С другой стороны, высокая биологическая активность наночастиц несет в себе и потенциальный риск нежелательных токсических эффектов для

работников предприятий нанотехнологического сектора, потребителей продукции нанодустрии, экологических систем, контактирующих с нанотехнологическими производствами и их отходами. Установлено, что многие наночастицы обладают высокой проникающей способностью: легко проходят через мембраны клеток, обнаруживаются в клеточном ядре, преодолевают гематоэнцефалический барьер. Охарактеризовать морфологию наночастиц, продемонстрировать внутриклеточную локализацию, качественно оценить накопление и агрегацию частиц в клетках и тканях позволяет просвечивающая электронная микроскопия [17].

Итак, мы убедились, что просвечивающая электронная микроскопия — один из полноценных структурных методов. Она с успехом применяется для изучения наночастиц и позволяет получить неоценимую структурную информацию. Достижения последних лет позволили получить изображения с разрешением для симметричных структур до 1.9 Å (аквапорин), и 3.5 Å для

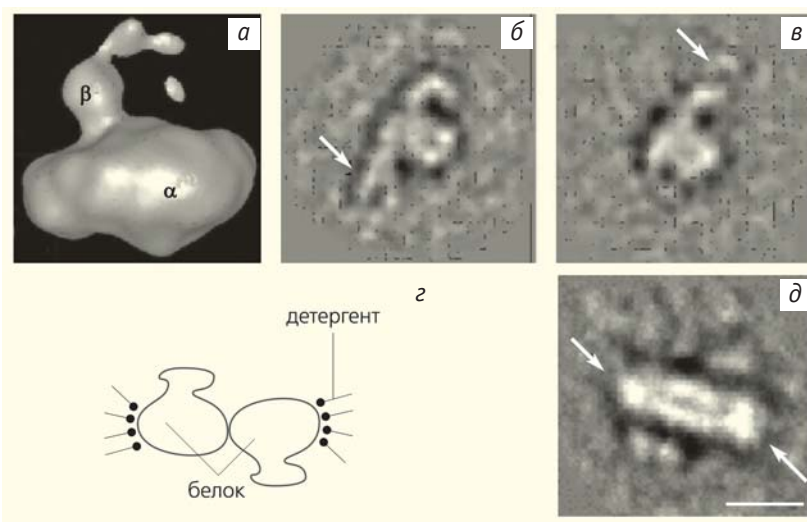


Рис.6. Структура кальциевого канала L-типа (а) и мечение его антителами (показано стрелками) против α-субъединицы (б) и β-субъединицы (в) кальциевого канала [18]. Внизу — схема образования кластеров мембранных белков (z) и кластер ионных каналов отмечен стрелками) (д) [20].

асимметричных частиц (рибосома). Создаются новые модели микроскопов с лучшими оптическими характеристиками и системами глубокого замораживания объектов в жидком гелии для сохранения их тонкой структуры. Развитие электрон-

ной томографии позволило заглянуть внутрь целой клетки и изучить ее молекулярное строение. Наномир постепенно раскрывает свои тайны и перестает быть загадкой для исследователей. Следующая станция — одна десятиллиардная метра. ■

**Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований. Проекты 07-04-12172-офи и 08-04-01348.**

## Литература

1. Nanotechnologies. Terminology and Definitions for Nano-Objects. Nanoparticle, Nanofibre and Nanoplate. 2008. P.16.
2. Киселев Н.И. Электронная микроскопия биологических макромолекул. М., 1965.
3. DeRosier D.J., Klug A. // Science. 1969. V.163. №874. P.1470.
4. Dubochet J., Adrian M., Chang J.J. et al. // Q. Rev. Biophys. 1988. V.21. №2. P.129—228.
5. Berriman J., Unwin N. // Ultramicroscopy. 1994. V.56. №4. P.241—252.
6. Henderson R., Schertler G.F. // Philos. Trans. R Soc. Lond. B Biol. Sci. 1990. V.326. №1236. P.379—389.
7. Sokolova O., Kolmakova-Partensky L., Grigorieff N. // Structure. 2001. V.9. P.215—220.
8. Orlova E.V., Papakosta M., Booy F.P. et al. // J. Mol. Biol. 2003. V.326. P.1005—1012.
9. Walz T., Grigorieff N. // J. Struct. Biol. 1998. V.121. №2. P.142—161.
10. Grigorieff N. // J. Struct. Biol. 2007. V.157. №1. P.117—125.
11. Pettersen E.F., Goddard T.D., Huang C.C. et al. // J. Comput. Chem. 2004. V.25. №13. P.1605—1612.
12. Wriggers W., Milligan R.A., McCammon J.A. // J. Structural Biology. 1999. V.125. P.185—195.
13. Sachse C., Chen J.Z., Coureux P.-D. et al. // J. Mol. Biol. 2007. V.371. P.812—835.
14. Long S.B., Tao X., Campbell E.B., MacKinnon R. // Nature. 2007. V.450. №7168. P.376—382.
15. Sokolova O., Accardi A., Gutierrez D. et al. // Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 2003. V.100. P.12607—12612.
16. Wolf M., Eberhart A., Glossmann H. et al. // J. Mol. Biol. 2003. V.332. P.171—182.
17. Ersen O., Werckmann J., Houllé M. et al. // Nano Lett. 2007. V.7. №7. P.1898—1907.
18. Saibil H. // Nat. Struct. Biol. 2000. V.7. №9. P.711—714.
19. Grigorieff N. Личное сообщение.
20. Sokolova O. // FEBS Lett. 2004. V.564. №3. P.251—256.