

УДК 579.842

Задача 5

Сканирующая зондовая микроскопия бактериальных клеток

© А.В. Большакова, И.В. Яминский

Описание задачи физического практикума “Сканирующая зондовая микроскопия бактериальных клеток”. Цель работы: изучение морфологии бактериальных клеток методом атомно–силовой микроскопии. Лабораторная работа выполняется на атомно–силовом микроскопе ФемтоСкан с использованием программного обеспечения для обработки изображений ФемтоСкан Онлайн, выпускаемого Центром перспективных технологий.

1. Введение

Изобретение атомно–силового микроскопа (АСМ) Г. Биннигом, К. Квейтом и Ч. Гербером в 1986 году открыло перед учеными новые возможности. С появлением АСМ было успешно преодолено ограничение, существовавшее для туннельного микроскопа — возможность визуализировать только проводящие объекты.

Пространственное разрешение АСМ сравнимо с разрешением электронного микроскопа, хотя и немного уступает ему. Основное преимущество АСМ перед электронным микроскопом — возможность получать высокое пространственное разрешение при наблюдении объектов в естественных для них условиях (например, в жидкости). Это свойство атомно–силового микроскопа особенно важно при исследовании биологических объектов.

Целью данной лабораторной работы является изучение морфологии бактериальных клеток методом атомно–силовой микроскопии.

2. Принцип работы АСМ

Острая игла (зонд) расположена на упругой балке известной жесткости, называемой кантилевером (Рис. 1.). При приближении зонда к образцу возникают силы взаимодействия между иглой и поверхностью образца. Это взаимодействие, как правило, состоит из сил упругого отталкивания, ван-дер-ваальсова притяжения, капиллярных сил и сил трения. Режим работы АСМ, при котором сканирующая игла и образец находятся в контакте, называется контактным режимом работы АСМ. Он может быть реализован двумя разными способами. В первом случае, при перемещении зонда по поверхности исследуемого объекта, регистрируется изгиб кантилевера и преобразуется в данные о высоте рельефа (режим постоянной высоты). Во втором случае, сканирование производится таким образом, чтобы изгиб кантилевера был постоянен (режим постоянной силы), а система обратной связи поднимала и опускала иглу над поверхностью, поддерживая величину силы и записывая информацию о высоте объекта. Изгиб кантилевера регистрирует оптическая система, состоящая из лазера и четырехсекционного фотодиода (А, В, С, D). Как правило, исследуемый образец крепится с помощью магнитного держателя к пьезосканеру, который обеспечивает перемещение образца в трех направлениях. Таким образом, зонд при сканировании остается неподвижным, а образец движется. Однако, существуют микроскопы, в которых, наоборот, движется зонд.

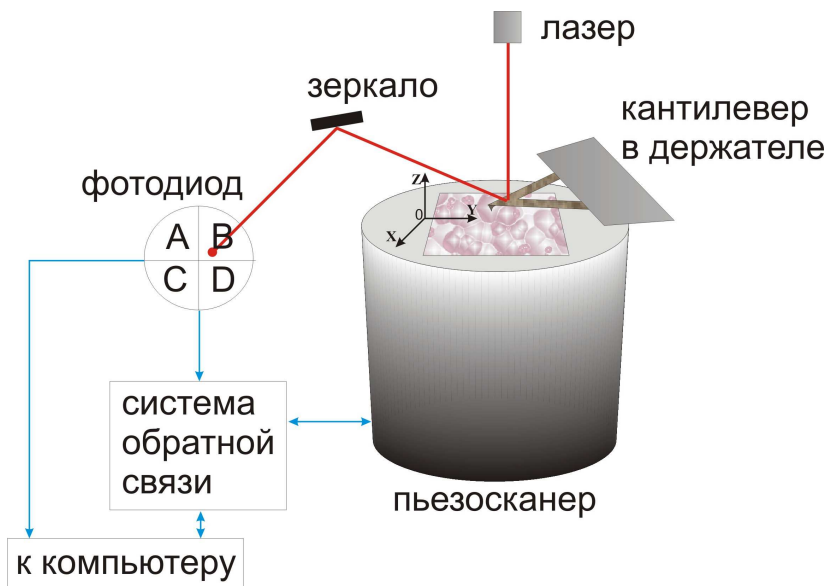


Рис. 1. Принципиальная схема АСМ.

2.1. Режим прерывистого контакта АСМ

В режиме прерывистого контакта кантилевер совершает колебательные движения с резонансной частотой. При приближении к поверхности образца изменяются параметры колебаний (амплитуда и фаза), что дает нам возможность получать информацию о состоянии поверхности образца. Обычно, этот режим используется для изучения мягких материалов (материалов с пониженной поверхностной жесткостью: полимеров, биологических объектов и т. д.), которые в контактном режиме могут быть повреждены иглой.

2.2. Различные виды данных, получаемых в контактном режиме АСМ

Информацию о поверхности образца можно регистрировать в трех видах: высота (**Height**), отклонение (**Deflection**), трение (**Friction**). Изображение типа **Height** содержит данные о высоте образца в каждой точке (регистрируется перемещение пьезосканера по оси Z). В этом режиме записи содержится информация о рельефе поверхности. В режиме **Deflection** в каждой точке отображается ошибка, регистрируемая в системе обратной связи (сигнал с фотодиода вида A+B-C-D). В этом режиме хорошо видны микроскопические детали поверхности. В режиме **Friction** записывается тангенциальная составляющая деформации кантилевера (сигнал с фотодиода вида A+C-B-D). В нем можно видеть, где разделяются области с различным коэффициентом трения (например, состоящие из различных материалов), но с одинаковым рельефом.

Сигналы от пьезосканера и фотодиода 16-ти разрядным аналого-цифровым преобразователем (АЦП) преобразуются в массив цифровых данных, из которого формируется изображение размером 512×512 точек, глубиной 8 бит на цвет. Поверхность образца представляется топографической картой, на которой, чаще всего, более светлые участки соответствуют большим значениям высоты и отклонения.

Дальнейшая работа с экспериментальными данными должна проводиться в специальной программе для обработки АСМ-изображений.

2.3 Артефакты, вызванные конечными размерами зонда

Сканирующая игла АСМ имеет конечный радиус кривизны, из-за этого реальные размеры слишком узких или слишком высоких объектов искажаются. Механизм возникновения подобных артефактов изображен на Рис. 2. На Рис. 3 представлена бактерия, края которой повторяют форму иглы. По таким изображениям можно оценить форму и размеры зонда.

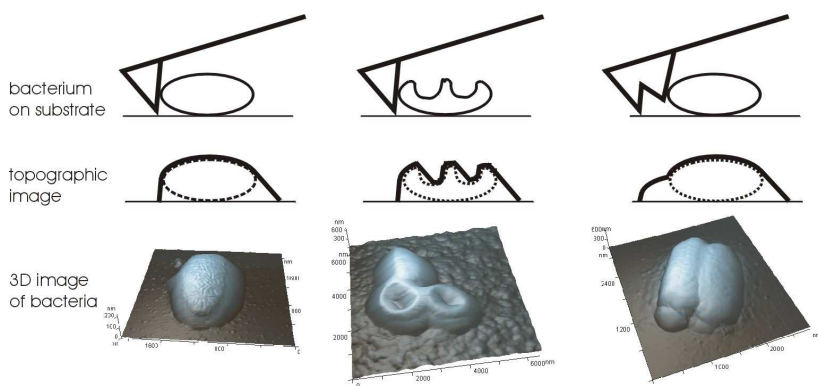


Рис. 2. Механизм возникновения уширения при сканировании. Сплошная линия — профиль поверхности, регистрируемый АСМ; пунктирная — реальный профиль бактерии.

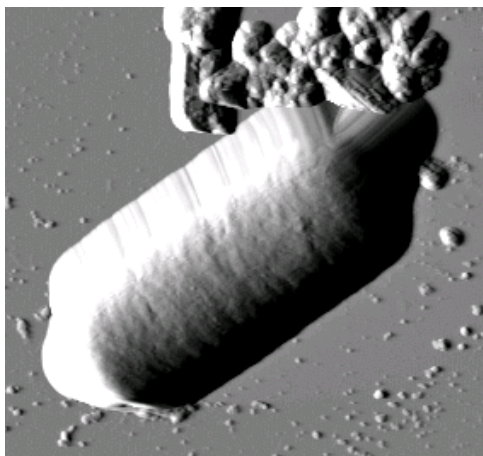


Рис. 3. *Lactobacillus*. Края бактерии повторяют форму зонда.

2.4. Температурный дрейф

При сканировании неизбежно происходит локальный нагрев образца за счет работы прибора. Разные части микроскопа имеют разный коэффициент температурного расширения, вследствие этого можно наблюдать так называемый температурный дрейф. То есть при повторном сканировании одного участка происходит смещение образца (см. Рис. 4.). Этот эффект практически не заметен при сканировании участков большой площади (больше 100 мкм²), но существенен на малых полях сканирования.

3. Изучение бактерий методами АСМ

Применяя метод атомно–силовой микроскопии, можно не только получить топографическое изображение поверхности бактерий, но и изучать различные механические и биофизические свойства их поверхности. АСМ дает возможность исследовать *in situ* реакции бактерий на различные антибиотики, создает благоприятные условия для наблюдения деления бактерий, изучения адсорбции вирусов на бактерии и т. д.

Для изучения бактерий методами атомно–силовой микроскопии существует простейшая методика приготовления образцов [**Ошибка! Источник ссылки не найден.**]: на поверхность подложки (свежесколотой слюды) наносится капля (приблизительно 4 мкл) свежеприготовленной дисперсии бактерий в дистиллированной воде с концентрацией 10⁹ бактерий на 1 мл. Наблюдение с помощью АСМ можно начинать сразу же после высыхания капли, то есть через 1 – 2 минуты. Было обнаружено, что кратковременное нахождение бактерий в дистиллированной воде не приводит к немедленному лизису бактерий. Необходимость высушивания (фиксации) бактерий

на поверхность подложки приводит к сплющиванию бактерий. Это одно из ограничений метода сканирующей микроскопии применительно к исследованию бактерий. Из-за него приходится оперировать двумя различными поперечными размерами (ширина и высота) вместо одного (диаметр).

Так же нельзя забывать, что при изучении бактерий с помощью сканирующего зондового микроскопа реально мы можем наблюдать только бактериальные клеточные стенки.

3.1. Строение бактериальных клеточных стенок

Снаружи бактериальную клетку покрывает плотная, часто многослойная структура — клеточная оболочка (стенка). Клеточные стенки — продукт жизнедеятельности клетки: их компоненты синтезируются клеткой, выделяются из цитоплазмы и собираются вне клетки, вблизи плазматической мембраны в виде сложных неоднородных комплексов [2].

Клеточная стенка бактерий может составлять 20–30% от сухой массы бактерии. Опорным каркасом клеточной стенки бактерий служит однородный полимер — пептидогликан (муреин). Весь жесткий каркас, окружающий бактериальную клетку — это одна гигантская мешкообразная молекула полисахарида–пептида. Благодаря ему, при сканировании с различной силой не происходит разрушения бактериальной клеточной стенки (Рис. 5.).

Основа структуры муреинового мешка — сеть параллельных полисахаридных цепей, построенных из чередующихся дисахаров (ацетилглюкозамина с ацетилмурамовой кислотой), связанных многочисленными пептидными поперечными связями. Основу пептидной части муреина составляют тетрапептиды, образованные различными аминокислотами.

В состав бактериальной стенки помимо муреинового каркаса входит большое количество дополнительных компо-

нентов. У грамположительных бактерий¹ сопутствующими компонентами служат: теиховые кислоты, полисахариды, полипептиды и белки. Клеточная стенка таких бактерий обладает большой прочностью из-за многослойности муреинового каркаса.

Стенки грамотрицательных бактерий содержат однослойную муреиновую сеть, составляющую 12% сухой массы стенки. Сопутствующие компоненты (липопротеиды, сложные липополисахариды) составляют до 80% сухой массы стенки. Они образуют сложную наружную липопротеиновую мембрану.

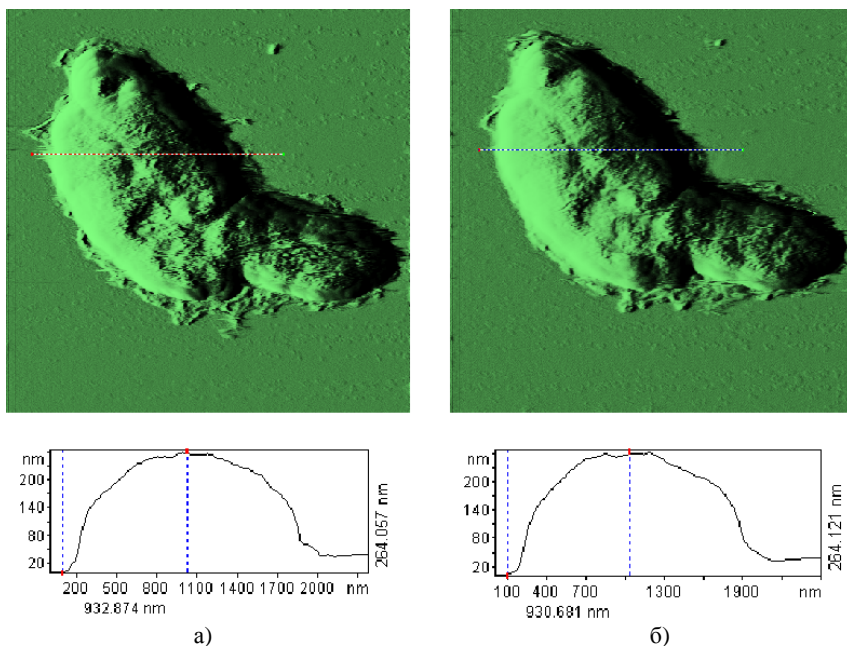


Рис.4. Два последовательно снятых изображения бактерии смещены друг относительно друга (температурный дрейф). а) Сила воздействия 440 нН, высота бактерии 264 нм; б) сила воздействия 230 нН, высота бактерии также 264 нм.

¹ При окраске по Граму (окраска кристаллическим фиолетовым, обработкой йодом, отмывка спиртом) бактерии по-разному воспринимают краситель: грамположительные остаются окрашенными после обработки спиртом, а грамотрицательные обесцвечиваются.

Наружная мембрана обеспечивает структурную целостность клетки, служит барьером, ограничивающим доступ различных веществ к плазматической мембране. На наружной мембране располагаются и рецепторы для бактериофагов (вирусов, паразитирующих на бактериях). Наружная мембрана содержит белки—порины, одна из функций которых — формирование гидрофильных пор, через которые может происходить диффузия молекул массой не более 900 дальтон (сахара, аминокислоты, небольшие олигосахара, пептиды).

3.2. Исследуемые бактерии

В данной лабораторной работе вам предстоит познакомиться с различными энтеробактериями (*Enterobacteriaceae* — семейство грамотрицательных бактерий) [Ошибка! Источник ссылки не найден.]:

Escherichia coli — грамотрицательная бактерия семейства кишечных (Рис. 5.). Имеет форму прямой палочки с закругленными концами ($\text{Ø}1,1\text{--}1,5 \text{ мкм} \times 2\text{--}6 \text{ мкм}$). Активно делится при температуре 37°C . Подвижна, движение осуществляется при помощи специальных длинных отростков (жгутиков). Встречается как нормальная микрофлора в нижнем отделе кишечника у млекопитающих. Некоторые штаммы вызывают желудочно—кишечные заболевания.

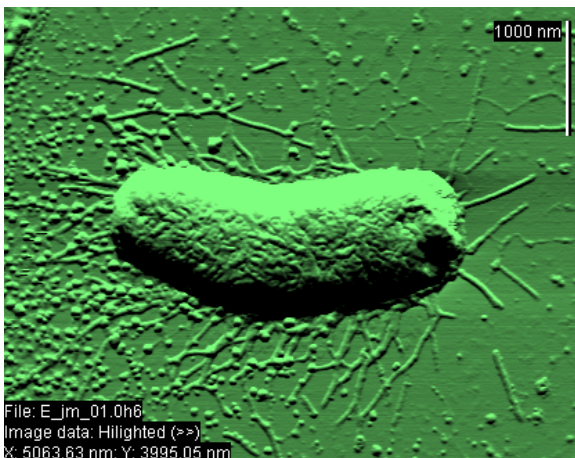


Рис. 5. *Escherichia coli*. Размер кадра $4,0 \times 5,1 \text{ мкм}^2$.

Klebsiella pneumoniae — грамотрицательная, неподвижная бактерия (Рис. 4.). Клетки заключены в капсулу из слизистого вещества, окружающего бактерию. Имеет форму прямой палочки (\varnothing 0,3–1,0 мкм \times 0,6–6 мкм). Размножается при температуре 37°C. Встречается в почве, воде, на фруктах и овощах. Обитает на слизистой оболочке носа, рта и кишечника здоровых людей. Условно патогенна: может вызвать пневмонию, инфекцию мочевых путей.

Helicobacter pylori — грамотрицательная, неподвижная (рис. 6). Открыта австралийскими учеными в 1983 г. Имеет форму спиральных, изогнутых или прямых палочек с закругленными концами (\varnothing 0,5–1,0 мкм \times 2,5–5 мкм). Размножается при температуре 30–37°C. Ассоциирована с гастритом В и язвенной болезнью желудка.

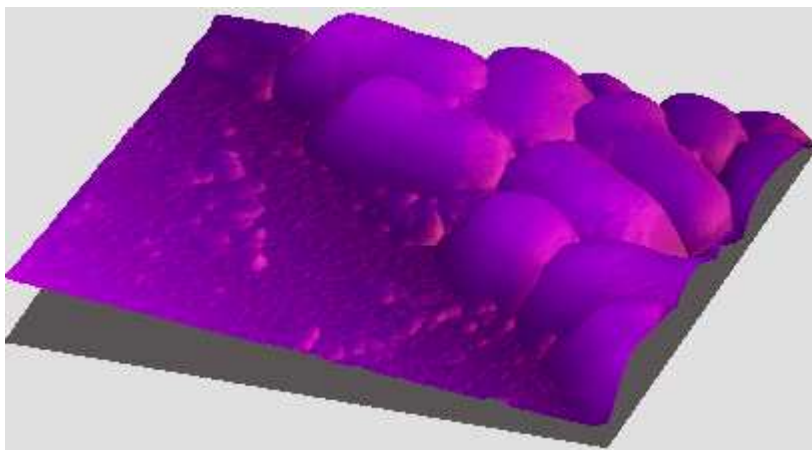


Рис. 6. *Helicobacter pylori*. Бактерии покрывают поверхность подложки монослойными островками. Размер кадра 3,9 \times 3,9 мкм².

Lactobacillus — обычно неподвижные, палочковидные (\varnothing 0,5–1,2 мкм \times 1–10 мкм) бактерии (Рис. 3.). Размножаются при температуре 30–40 °С. Вызывают молочно–кислое брожение. Широко распространены в окружающей среде, особенно часто встречаются в пищевых продуктах животного и

растительного происхождения. Входят в нормальную микрофлору пищеварительного тракта у птиц и млекопитающих.

4. Экспериментальная часть

Лабораторная работа выполняется на атомно–силовом микроскопе ФемтоСкан с использованием программного обеспечения ФемтоСкан Онлайн. Для успешного выполнения работы необходимо освоить простейшие навыки работы на АСМ и основные методы обработки АСМ–изображений.

4.1. Порядок работы на микроскопе

1. Приготовить образцы одного из видов бактерий на слюде по описанной выше методике.
2. Установить кантилевер в держатель и навести на него лазерный луч. Настроить показания фотодиода, используя программу ФемтоСкан Онлайн.
3. Установить приготовленный образец на предметный столик микроскопа. Подвестись к поверхности образца, настроить силу сканирования и обратную связь.
4. Получить несколько изображений бактерий в разных точках образца.
5. Получить несколько последовательных изображений одного и того же участка поверхности для определения температурного дрейфа.

4.2. Обработка результатов эксперимента

Дальнейшая обработка результатов проводится не только для экспериментально полученных изображений, но и для пред-

ложенных преподавателем файлов с изображениями других штаммов бактерий.

1. Проведите измерение длины, ширины и высоты бактерий. Найдите средние размеры для каждого предложенного штамма.
2. В предположении, что длина и объем бактерии в процессе приготовления образца не изменяются, найдите диаметр бактериальной палочки для каждого предложенного штамма.
3. Выберите по одному кадру для каждого вида бактерий и постройте с помощью программы ФемтоСкан Онлайн трехмерное изображение и поперечные сечения бактерий.
4. Постройте гистограмму и найдите по ней среднее значение высоты монослойного покрытия бактерий поверхности подложки. Сравните получившейся результат со средним значением высоты для одиночных бактерий.
5. Попытайтесь определить форму иглы (зонда) по кадрам с явно выраженными артефактами.
6. Сравнивая два последовательно снятых кадра, определите температурный дрейф ($\text{Å}/\text{с}$).

Для получения зачета по данной лабораторной работе необходимо предъявить печатный отчет, состоящий из нескольких полученных изображений бактерий, построенных трехмерных изображений, сечений и гистограммы, таблиц с данными и расчетов средних размеров бактерий, высоты монослойного покрытия, температурного дрейфа.

5. Литература

1. Сканирующая зондовая микроскопия биополимеров. М.: Научный мир (1997) – 88 с.
2. Ченцов Ю. С.. Общая цитология. М.: Издательство московского университета (1995).
3. Определитель бактерий Берджи. В 2-х томах., М.: Мир (1997) – 432 с. / 368 с.