

ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ УЛЬТРАЗВУКА ПРИ ОСАЖДЕНИИ МИОГЛОБИНА ИЗ РАСТВОРОВ НА АКТИВНЫЕ ГКР-ПОДЛОЖКИА.С. Бабурин¹И.А. Богинская²И.Н. Курочкин³И.А. Родионов⁴И.А. Рыжиков²М.В. Седова²Б.Д. Тонанайский⁵Н.Д. Ушаков⁵

baburin@bmstu.ru

i.boginskaya@bk.ru

ikur@genebee.msu.ru

irodionov@bmstu.ru

ilyaryzhikov@rambler.ru

nanocom@yandex.ru

bogdan0995@gmail.com

washburn3000@yandex.ru

¹ Всероссийский научно-исследовательский институт автоматики им. Н.Л. Духова, Москва, Российская Федерация

² Институт теоретической и прикладной электродинамики РАН, Москва, Российская Федерация

³ Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН, Москва, Российская Федерация

⁴ НОЦ «Функциональные микро/наносистемы», Москва, Российская Федерация

⁵ Московский физико-технический институт (государственный университет) г. Долгопрудный, Московская обл., Российская Федерация

Аннотация

В настоящее время актуальна задача регистрации спектров комбинационного рассеяния растворов белков с концентрацией менее 1 мкг/мл. Для повышения концентрации и усиления сигнала комбинационного рассеяния от этих белков проводится пробоподготовка путем высушивания капли раствора на поверхности подложки, усиливающей сигнал комбинационного рассеяния белков. Исследовано влияние ультразвука на процесс осаждения белка на поверхность и его конформация. Проведены эксперименты по пробоподготовке раствора белка миоглобина в воде с концентрацией 1 мкг/мл на подложках, представляющих собой тонкие (не более 100 нм) пленки серебра с наноразмерной структурой поверхности, изготовленные на подложках из слюды. После ультразвукового воздействия получены кристаллоподобные структуры белка, амплитуда спектров комбинационного рассеяния которых существенно больше амплитуды аналогичных спектров, полученных после высушивания растворов белка такой же концентрации при нормальных условиях без воздействия ультразвука. Обнаружено влияние ультразвука на характер агрегации, кристаллизации и конформации белков, амплитуду и форму их спектров комбинационного рассеяния

Ключевые слова

ГКР-активные подложки, конформация белка, акустохимия, пробоподготовка, ультразвук, миоглобин

Поступила в редакцию 13.10.2017
МГТУ им. Н.Э. Баумана, 2018

Работа выполнена при поддержке гранта РНФ № 16-14-00209 от 11 января 2016

Введение. Пробоподготовка сложных биологических объектов, таких как белки, бактерии, вирусы для регистрации их методом поверхностно-усиленного гигантского комбинационного рассеяния (ГКР) на подложках, представляющих собой тонкие пленки, является важной задачей, определяющей достоверность получаемых результатов. В настоящее время существует проблема регистрации проб белков низких (менее 1 мкг/мл) концентраций на подложках ограниченной площади, требующих высушивания раствора.

Пробоподготовка с помощью высушивания должна обеспечивать химическую стабильность пробы и не превышать времени, заложенного на анализ. Выполнение этих условий необходимо для использования технологии в биомедицинской практике. Пробоподготовка с помощью УЗ-сушки является перспективным и актуальным методом для образцов растворов белков, поскольку позволяет уменьшить время высушивания и не вызывает разложение белка.

В процессе пробоподготовки важными аспектами являются: агрегатное состояние и морфология осадка; скорость высушивания раствора; ГКР на активных подложках; конформация осажденных белков к поверхности активных ГКР-подложек; влияние агрегации и конформации на изменение ГКР-спектра белка.

В настоящее время не решены проблемы управляемого формирования осадка в части его агрегации, морфологии, скорости осаждения и конформации. Необходимо выделить значимые факторы, влияющие на протекание процесса формирования осадка.

Для решения возникающих задач разработан лабораторный стенд, позволяющий управлять воздействием на анализируемые растворы, нанесенные на поверхность активных ГКР-подложек с возможностью фото- и видеофиксации протекающих микромасштабных процессов.

Исследуемые пробы анализировались методом спектроскопии комбинационного рассеяния с использованием лазерного конфокального спектрального микроскопа на длине волны 780 нм.

Также экспериментально подбирают наиболее подходящие для ГКР-анализа подложки с разным характером топологии поверхности (наноразмерная шероховатость, волнистость, форма элементов рельефа).

Топологию поверхности контролируют, используя атомно-силовую микроскопию и оптическую интерферометрию.

Осаждение белков происходит как в аморфной форме, так и в кристаллической. В этом случае характер наблюдаемых ГКР-спектров может отличаться. В аморфной форме, как правило, белки имеют спектры комбинационного рассеяния (КР), соответствующие литературным данным. Для кристаллической формы белка спектры могут видоизменяться. Также можно ожидать дополнительное усиление отдельных линий спектра, если сформированный кристалл является достаточно добротным оптическим резонатором.

Свойство ультразвука способствовать кристаллизации впервые наблюдалось в 1928 г. [1] за много лет до серьезного применения в контроле образования кристаллов в промышленном масштабе. Ультразвук в растворе создает

кавитационные пузырьки с высокими давлением и температурой внутри. Эти структуры считаются потенциальными центрами зарождения кристаллов. В то же время акустические волны могут увеличивать как вероятность удара между молекулами, так и скорости массопереноса, тем самым увеличивая частоту зарождения [1].

Исследования в этой области показали, что УЗ-облучение раствора с наличием преципитатов приводит к образованию кристаллов белка в более широком диапазоне условий кристаллизации. Также выявили, что УЗ-воздействие можно выгодно использовать при кристаллизации белка не только для активации зарождения кристаллов белка, но и повышения их качества [1].

Исследования в области кристаллизации с применением ультразвука проводились на частотах 20...100 кГц. Это связано с тем, что на низких частотах зарождение кавитации происходит при более низких мощностях. Частоты меггерцовых диапазонов зачастую используются для эхокардиографии, так как они не порождают кавитацию в тканях человека [2].

Процесс кристаллизации характеризуется фазовой диаграммой, иллюстрирующей зависимость состояния белкового раствора от регулирующего параметра (рис. 1).

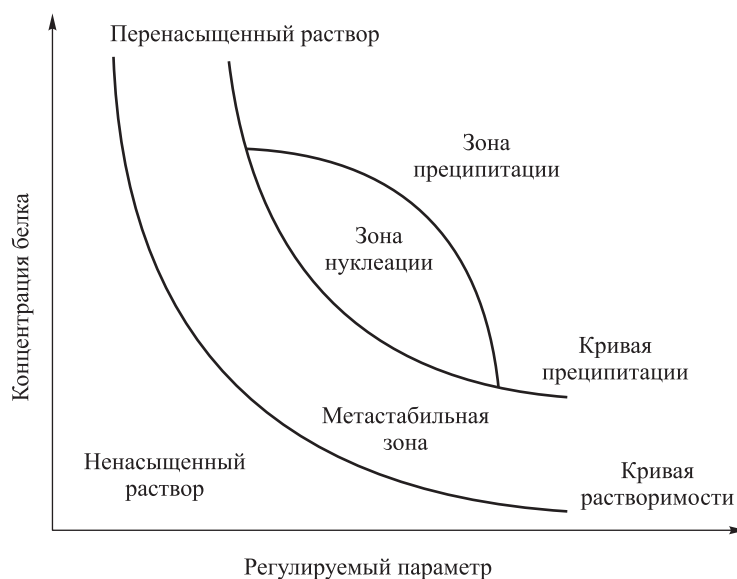


Рис. 1. Пример типичной фазовой диаграммы белка [3]

В первой зоне, где высокая концентрация макромолекул, наблюдается выпадение аморфного осадка белка. При более низкой концентрации белка, во второй зоне диаграммы, наблюдается образование центров нуклеации, которые при переходе в третью, метастабильную зону с более низкой концентрацией макромолекул инициируют рост кристаллов. При этом в метастабильной зоне не образуются новые центры кристаллизации, а наблюдается лишь рост кристаллов. В четвертой зоне диаграммы, зоне ненасыщенного раствора, не проис-

ходит ни образования центров нуклеации, ни роста кристаллов, а белок полностью переходит в растворенное состояние.

Макромолекулы в кристаллизационном растворе существуют не только в виде мономеров, но и в виде высокомолекулярных агрегатов и кластеров макромолекул. Нуклеация — динамический процесс, при котором множество макромолекул в различных промежуточных состояниях объединяются в правильную кристаллическую решетку только тогда, когда в данных условиях это термодинамически выгодно. В свою очередь, правильный рост кристаллов наблюдается только в том случае, если растворимость белка снижается достаточно медленно. В противном случае выпадающий аморфный осадок белка будет служить препятствием к образованию центров нуклеации. Важным условием получения качественных кристаллов является снижение концентрации перенасыщенного раствора на достаточный для образования центров нуклеации уровень (рис. 2) [3].

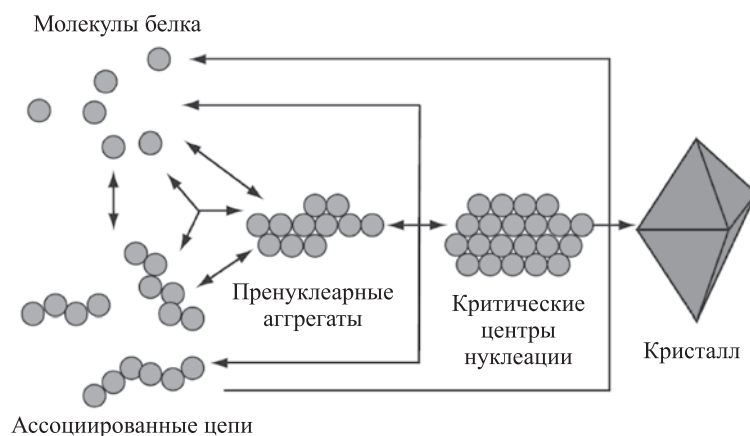


Рис. 2. Обратимая ассоциация молекул белка в кристалл [3]

Таким образом, метод УЗ-воздействия в целях уменьшения времени пробоподготовки перспективен для выполнения поставленных задач. Очевидно, что ультразвук определенной частоты и интенсивности излучения может положительно влиять на процесс нуклеации белковых кристаллов. Однако ранее не ставилось задач как по пробоподготовке на активных ГКР-подложках с применением ультразвука, так и по уменьшению времени высыхания исследуемого раствора.

Описанные в литературе эксперименты проводились на частотах 20... 130 кГц и занимали продолжительное время. Исходя из того, что существует проблема быстрой сушки пробы, в опытах использовался УЗ-резонатор, работающий на больших частотах (1,4 МГц).

Экспериментальная часть. Для проведения экспериментов по уменьшению времени сушки растворов белков малых концентраций и объема и исследования влияния ультразвука на конформацию осажденного белка был создан стенд, состоящий из бинокулярного микроскопа МБС-9; установки УЗ-воздействия (рис. 3); камеры для микроскопа ToprCamc разрешением 3264/2448px; освети-

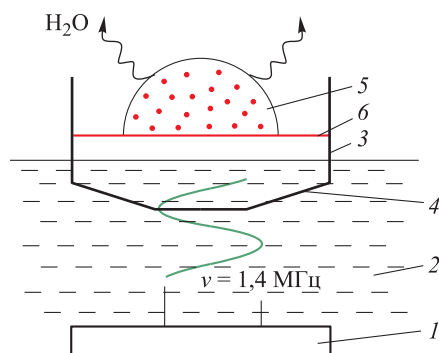


Рис. 3. Схема установки УЗ-воздействия:

1 — пьезоэлемент; 2 — водная среда; 3 — вакуумная резина; 4 — пластиковый стакан; 5 — раствор белка; 6 — ГКР-подложка

ли аналита заданной концентрации при комнатной температуре на воздухе и при УЗ-воздействии на подложках различных типов. Концентрация миоглобина в растворе составляла 1 мкг/мл, объем капли 3 мкл. Нанесение выполнялось высокоточным дозатором Thermo Scientific. Анализ высушенных образцов проводился на спектрометре комбинационного рассеяния WITec 500 Alpha с мощностью лазера с длиной волны 785 нм.

Схема эксперимента. Пластиковый стакан заливается водой в достаточном объеме, чтобы под прокладкой из вакуумной резины не образовывалось воздушных пузырьков и ее верхняя часть оставалась сухой. На резиновую прокладку помещается подложка. С помощью дозатора Thermo Scientific на подложку наносится капля раствора аналита объемом 3 мкл.

Сверху, над установкой УЗ-воздействия, помещается микроскоп с подключенной к компьютеру камерой, и выполняется настройка фокусного расстояния. Одновременно с включением прибора запускается секундомер. Наблюдение и фиксацию процесса высушивания раствора ведут с помощью видеокамеры.

После окончания сушки фиксируется время, подложка изымается и помещается в спектрометр комбинационного рассеяния WITec 500 Alpha для измерения ГКР-спектров полученных образцов в различных точках осадка.

Используемые в опытах подложки получены путем нанесения тонких наноструктурированных пленок серебра на поверхность пластины слюды методом электронно-лучевого испарения в вакууме. Расстояние между источником металла и подложкой составляло 380 мм, давление в камере 10^{-5} тор. Скорость напыления 20 нм/с. При напылении осуществлялся контроль толщины по пропусканию на образце-свидетеле — оптический контроль с использованием предварительных расчетов зависимости пропускания от толщины слоя серебра. Ток пучка электронов 30 мА, напряжение на катоде 8 кВ. Перед напылением подложки из слюды очищаются в плазме в остаточной атмосфере (давление в камере 10^{-2} тор, ток 150 мА, напряжение на катоде 1,5 кВ).

теля в окуляре Optem International; секундомера. Параметры установки УЗ-воздействия следующие: резонансная частота пьезоэлемента 1,4 МГц; выходной ток на пьезоэлементе 750 мА; длина волны в воде 1 мм.

В ходе эксперимента определены факторы, влияющие на морфологию и структуру получаемого осадка: природа белка, температура, состояние поверхности подложки.

В ходе эксперимента проводилось сравнение КР-спектров для образцов, полученных путем высушивания капли

Управление процессом нанесения позволяет создавать на поверхности атомарно гладкой слюды пленку серебра толщиной 100 нм с развитой топологией нанометровой размерности. Эксперименты проводились на подложках с различной морфологией, характеризуемой разбросом размеров среднеквадратической шероховатости в интервале от 0,5 до 10 нм и наличием или отсутствием особенностей (углублений и выступов) в несколько десятков нанометров, расположенных на расстояниях в десятые доли микрона. Однако кристаллоподобные структуры при подготовке ультразвуковым методом наблюдались только на подложках типа Ag 131 (характеристики приведены далее).

Используемый метод атомно-силовой микроскопии (АСМ) позволяет характеризовать морфологию поверхности подложек с разрешением до 1 нм. Измерения проводились в полуконтактной моде на микроскопе компании NT-MDT Solver P47 H [4–7].

Далее приведено АСМ-изображение одной использованной подложки (рис. 4), на которой получены положительные результаты по УЗ-пробоподготовке. Каждая подложка характеризуется, в частности, среднеквадратической шероховатостью, а также размером особенностей рельефа. В частности, на поверхности приведенной подложки измеренная среднеквадратическая шероховатость rms составила 9,5 нм.

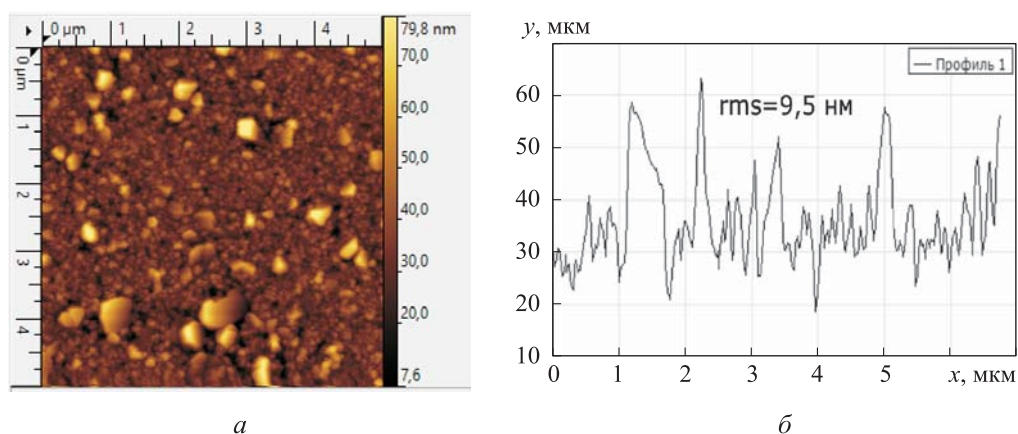


Рис. 4. АСМ-изображение использованной подложки: морфология поверхности (а); профиль поверхности (б)

Результаты экспериментов. Основной эксперимент по УЗ-пробоподготовке проведен с использованием подложки Ag 131 с толщиной пленки серебра 100 нм, осажденной на поверхности слюды толщиной 100 мкм. Концентрация белка в растворе составляла 1 мкг/мл, время пробоподготовки 1 мин 47 с, объем пробы (капли) 3 мкл, время накопления спектра 15 с, мощность лазера для снятия спектра 60 мВт.

После высушивания образец был помещен в КР-спектрометр WITec 500 Alpha, и в режиме работы прибора в качестве оптического микроскопа были

получены изображения поверхности при разных увеличениях, представленные на рис. 5. Высушенная капля раствора с миоглобином показана на рис. 5, *а*. По центру осадка имеется площадь с осажденными на ней кристаллоподобными частицами белка. Это предположение сделано на основе наличия огранки у наблюдаемых частиц. Оно совпадает с данными о возможности кристаллизации белков под УЗ-воздействием [1, 2].

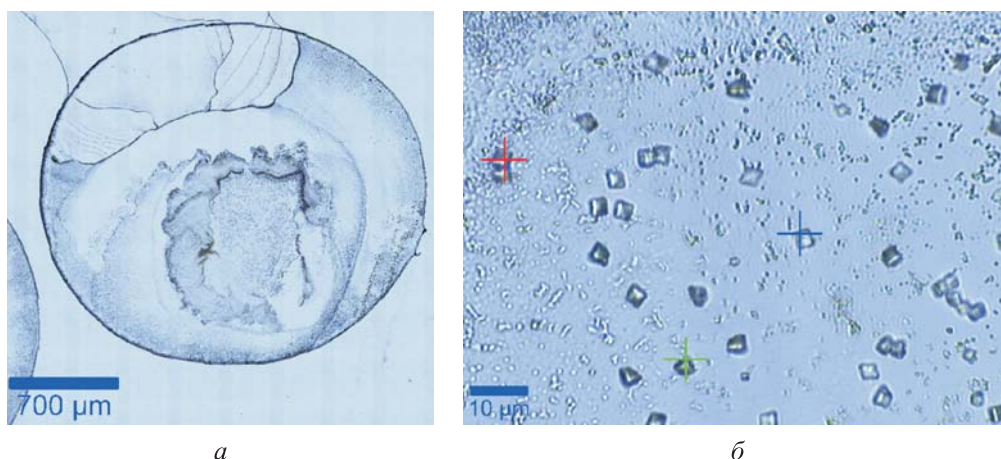


Рис. 5. Высушенная капля раствора с миоглобином; способ пробоподготовки — ультразвуковой; исходный объем капли 3 мкл:
а — объектив 10×/0,24; *б* — объектив 50×/0,9

Капля не является однородным слоем осажденного вещества в отличие от капель, высыхающих с образованием кофе-ринга — такого типа осадка от высушенной капли, в котором основная масса сосредоточена на окружности.

В настоящем эксперименте наблюдается перераспределение вещества с максимальной концентрацией в центре. При этом отсутствуют протяженные участки вещества, а весь осадок представляет собой совокупность небольших образований, часть из которых является кристаллоподобными (см. рис. 5).

Следующие измерения были выполнены на микроинтерференционном микроскопе Zygo NewView 7300. На рис. 6 приведены профили отдельных кристаллов, по которым можно оценить их размеры.

Из статистической оценки измерений, выполненных на приборе Zygo NewView 7300, получено, что средний размер кристаллических образований составляет ~2,7 мкм, а средняя высота 534,5 нм; среднее расстояние между образованиями ~12,2 мкм.

Осажденное вещество было исследовано с использованием спектрального, конфокального КР-микроскопа WITec. Разрешение прибора позволяло измерять КР-спектр одного кристаллоподобного образования (или микроагломерата белка) в пределах следа высушенной капли. Представлены спектры, измеренные с наиболее крупного агломерата (рис. 7).

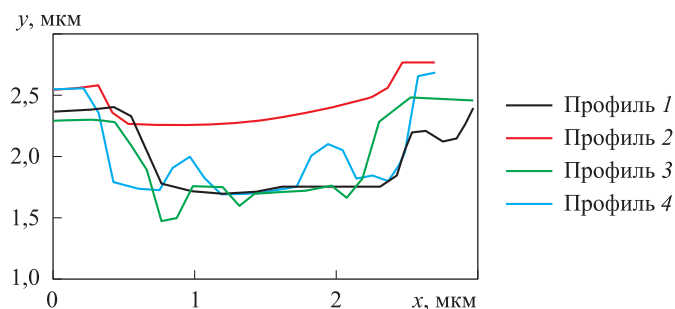


Рис. 6. Профили (1–4, черная, красная, зеленая, синяя кривые соответственно) отдельных кристаллов (размер основания $1,92 \pm 0,24$ мкм, высота $0,73 \pm 0,11$ мкм); способ пробоподготовки — ультразвуковой; исходный объем капли 3 мкл

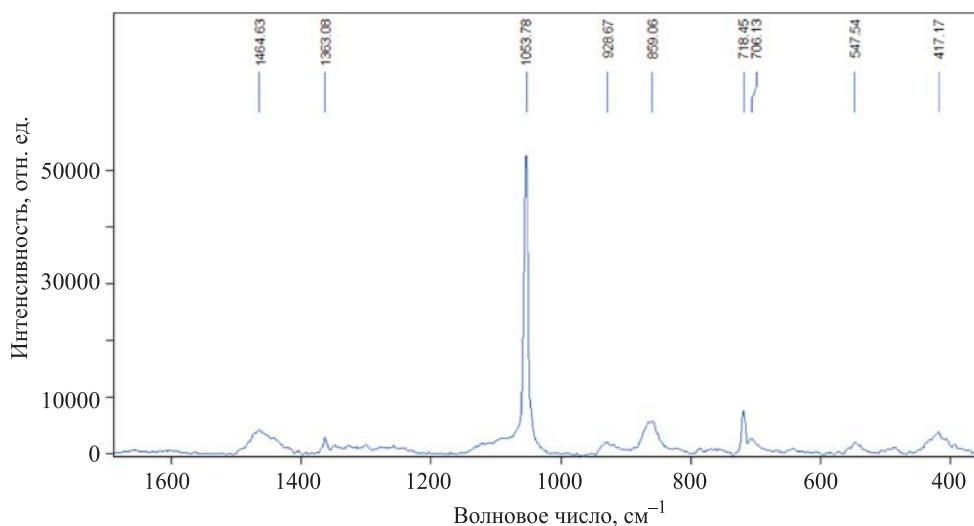


Рис. 7. Спектр, полученный с кристаллоподобных образований миоглобина; способ пробоподготовки — ультразвуковой; исходный объем капли 3 мкл; время накопления 15 с; мощность лазера 60 мВт; концентрация белка в растворе 1 мкг/мл

Итак, в результате УЗ-воздействия получены кристаллоподобные структуры со спектрами, характеризующимися дополнительным усилением отдельных спектральных линий, присутствующих в спектрах миоглобина, линии фенилаланина. При этом наблюдается значительное уменьшение, вплоть до исчезновения некоторых линий в спектре, таких как амид I, II, III и линий гема. Это явление может быть связано с конформацией молекулы белка при кристаллизации и ориентацией кристаллографических плоскостей относительно усиливающей поверхности.

Для сравнения результатов УЗ-пробоподготовки и сушки на воздухе при комнатной температуре были проведены следующие эксперименты.

Контрольный эксперимент 1. Для измерения рельефа осадка, образованного без УЗ-воздействия, использовали стеклянную подложку с осажденным на нее миоглобином с концентрацией 1 мкг/мл, время пробоподготовки составило 37 мин.

В результате исследований высушенных капель на воздухе на подложках из стекла (рис. 8) и активных ГКР-подложках на основе серебра выявили, что размеры некристаллических агломератов на границе капель достигают 1 мкм и более, что сопоставимо по размерам с кристаллическими образованиями при обработке белка ультразвуком, что позволяет сравнивать амплитуды КР-спектров.

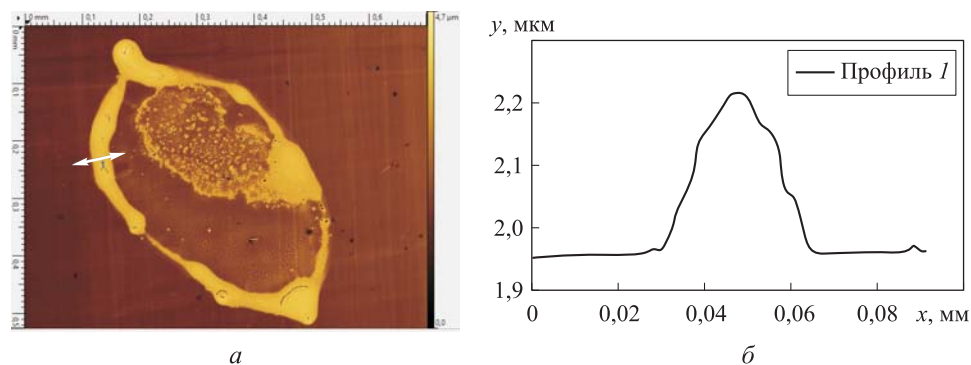


Рис. 8. Высушенная на стекле капля миоглобина с концентрацией 1 мкг/мл (объектив 10×); способ пробоподготовки — высушивание на воздухе (а); рельеф осадка (б); расположение на осадке см. рис. 10, а

Контрольный эксперимент 2. Для подтверждения эффекта ГКР на серебряных подложках измерен спектр миоглобина с использованием подложки в виде предметного стекла. Концентрация белка в осажденном растворе составляла 10 мкг/мл. Сушка проводилась на воздухе в течение 28 мин; время накопления спектра 60 с; мощность лазера для снятия спектра 60 мВт. Среднее значение амплитуды этого спектра миоглобина составило 100 относительных единиц (рис. 9).

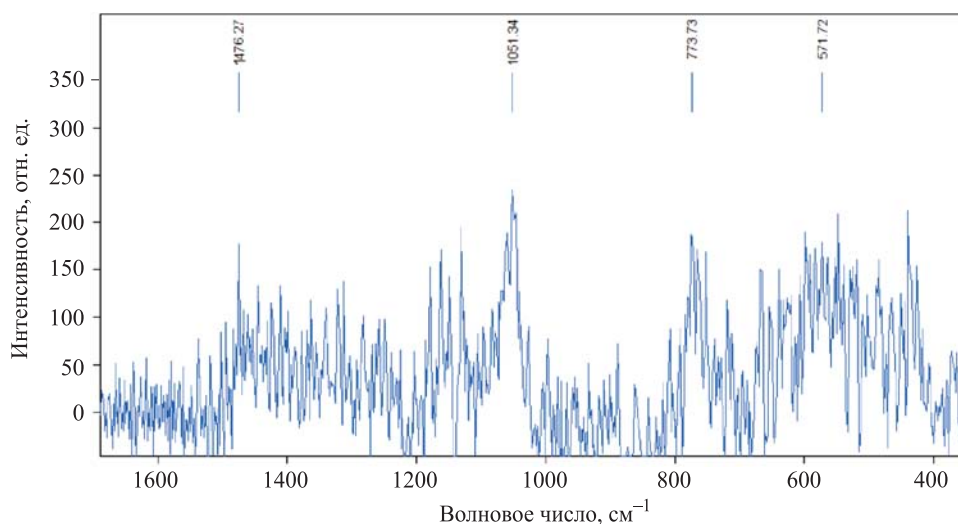


Рис. 9. Спектр, полученный с агломератов миоглобина на стекле; способ пробоподготовки — высушивание на воздухе; исходный объем капли 3 мкл; концентрация белка в растворе 10 мкг/мл

Контрольный эксперимент 3. Измерение собственного спектра серебряной подложки Ag 131 (рис. 10).

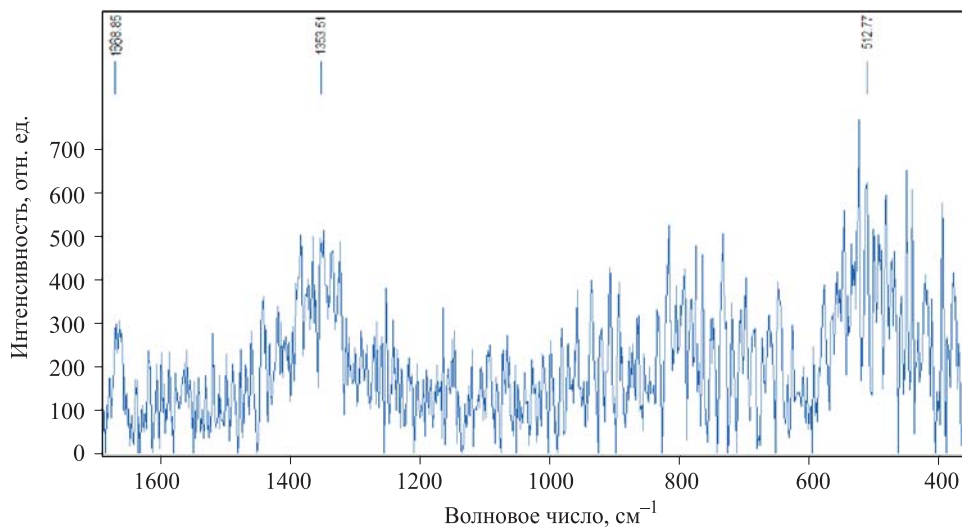


Рис. 10. Спектр подложки Ag 131; время накопления 60 с; мощность лазера 60 мВт

Контрольный эксперимент 4. Измерение спектра миоглобина без УЗ-воздействия проводилось на серебряной подложке Ag 131 с толщиной слоя серебра 100 нм на поверхности слюды толщиной 100 мкм; концентрация раствора миоглобина 1 мкг/мл, объем капли 3 мкл. Высушивание проводилось при нормальных условиях на воздухе и заняло 35 мин. Время накопления спектра 60 с, мощность лазера для снятия спектра 60 мВт.

Из рис. 11 следует, что белок относительно равномерно занимает часть внутреннего пространства высушенной капли. Ограниченные образования не наблюдаются.

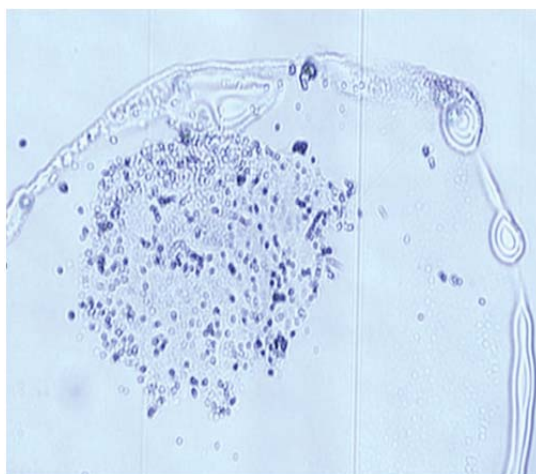


Рис. 11. Общий вид высушенной капли (объектив 10×/0,24); размер снимка 350 × 350 мкм

Осажденное вещество исследовано с использованием спектрального конфокального КР-микроскопа. Разрешение прибора позволяло измерить КР-спектр с одного микроагломерата белка в пределах следа высушенной капли. Приведен спектр миоглобина (рис. 12), полученный с наиболее крупного агломерата белка.

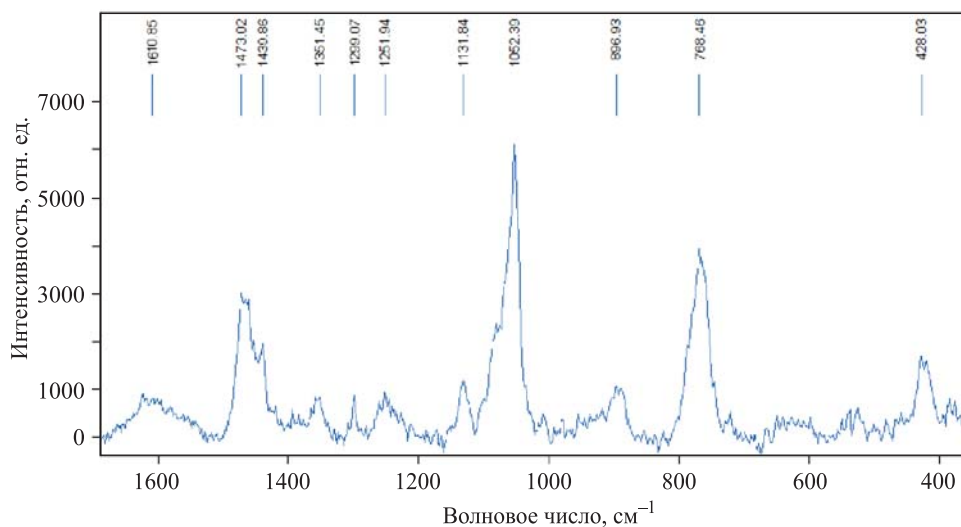


Рис. 12. Спектр, полученный с микроагломерата миоглобина; способ пробоподготовки — на воздухе; исходный объем капли 3 мкл; время накопления 60 с; мощность лазера 60 мВт; концентрация белка в растворе 1 мкг/мл

Обсуждение результатов. Сравнивая спектры, полученные в ходе контрольных экспериментов, выявили, что при нанесении белка из раствора методом высушивания на воздухе на используемые активные ГКР-подложки наблюдается усиление КР-сигнала белка более чем в 30 раз по отношению к аналогичному спектру, снятому при нанесении белка на стекло. Следует отметить также, что спектр образца на стекле находится на уровне шумов. Сравнение спектров с УЗ-воздействием и без показывает, что при наличии УЗ-воздействия время пробоподготовки сокращается более чем в 20 раз, наблюдается усиление отдельных линий спектров белка более чем в 40 раз с учетом времени накопления спектра. При этом в зоне анализа присутствуют крупные ограниченные кристаллоподобные объекты. Без УЗ-воздействия наблюдаются малоразмерные неограниченные агломераты, спектры которых имеют меньшую амплитуду. Отметим, что объем вещества, с которого снимаются КР-спектры для используемого конфокального микроскопа фирмы WiTec с объективом 50×/0,9, равен ~4 мкм³. Объем кристаллоподобного объекта — такого же порядка, для аморфных агломератов белка — объем значительно больше, т. е. этот фактор не является значимым для выводов о большем эффекте усиления для кристаллических объектов.

Выводы. 1. Впервые исследована возможность управлять УЗ-осаждением белка из раствора на поверхность активной ГКР-подложки в целях пробоподготовки для последующего измерения КР-спектров.

2. Используя ультразвук, можно сократить время высыхания капли более чем в 20 раз по сравнению с сушкой на воздухе. Впервые выявлено, что акустические волны влияют на конформацию белка и его морфологию на поверхности серебряных наноструктурированных пленок.

3. При УЗ-воздействии на нанесенный на поверхность активных ГКР-подложек раствор миоглобина появляются большие кристаллоподобные частицы, которые могут так ориентироваться относительно ГКР-подложки, что отдельные линии КР-спектра белка усиливаются более чем в 40 раз по сравнению со спектром частиц, полученных сушкой на воздухе.

4. Конформация высушиваемого материала приводит к образованию кристаллитов с усилением до 5 раз отдельных линий их КР-спектров относительно остальных линий.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Potential use of ultrasound to promote protein crystallization* / R. Crespo, P.M. Martins, L. Gales, F. Rochac, A.M. Damasa // *Journal of Applied Crystallography*. 2010. Vol. 43. No. 6. P. 1419–1425. DOI: 10.1107/S0021889810040951
URL: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1107/S0021889810040951>
2. *McCausland L.J., Cains P.W.* Power ultrasound — a means to promote and control crystallization in biotechnology // *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*. 2004. Vol. 21. No. 1. P. 3–10. DOI: 10.1080/02648725.2004.10648048
URL: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/02648725.2004.10648048>
3. *Chirkina A.A.* Modern problems of biochemistry. Methods of research. Art. 34 2013.
4. *Bennig G.K.* Atomic force microscope and method for imaging surfaces with atomic resolution. Patent US 4724318. App. 09.02.1986, publ. 04.08.1988.
5. *Martin Y., Williams C.C., Wickramasinghe H.K.* Method for imaging sidewalls by atomic force microscopy // *Appl. Phys. Lett.* 1994. Vol. 64. No. 19. Art. 2498. DOI: 10.1063/1.111578
URL: <https://aip.scitation.org/doi/abs/10.1063/1.111578>
6. *Meyer G., Amer N.M.* Novel optical approach to atomic force microscopy // *Appl. Phys. Lett.* 1988. Vol. 53. No. 12. Art. 1045. DOI: 10.1063/1.100061
URL: <https://aip.scitation.org/doi/abs/10.1063/1.100061>
7. *Dürig U., Gimzewski J.K., Pohl D.W.* Experimental observation of forces acting during scanning tunneling microscopy // *Phys. Rev. Lett.* 1986. Vol. 57. No. 19. Art. 2403. DOI: 10.1103/PhysRevLett.57.2403
URL: <https://journals.aps.org/prl/abstract/10.1103/PhysRevLett.57.2403>

Бабурин Александр Сергеевич — младший научный сотрудник ВНИИавтоматики им. Н.Л. Духова (Российская Федерация, 127055, Москва, Суцёвская ул., д. 22).

Богинская Ирина Анатольевна — канд. техн. наук, старший научный сотрудник Института теоретической и прикладной электродинамики РАН (Российская Федерация, 125412, Москва, Ижорская ул., д. 13).

Курочкин Илья Николаевич — д-р хим. наук, профессор, директор Института биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН (Российская Федерация, 119334, Москва, ул. Косыгина, д. 4).

Родионов Илья Анатольевич — канд. техн. наук, директор НОЦ «Функциональные микро/наносистемы» (Российская Федерация, 105005, Москва, 2-я Бауманская ул., д. 5, стр. 1).

Рыжиков Илья Анатольевич — канд. техн. наук, доцент, заведующий лабораторией Института теоретической и прикладной электродинамики РАН (Российская Федерация, 125412, Москва, Ижорская ул., д. 13).

Седова Марина Владимировна — ведущий научный сотрудник Института теоретической и прикладной электродинамики РАН (Российская Федерация, 125412, Москва, Ижорская ул., д. 13).

Тонанайский Богдан Дмитриевич — студент бакалавриата Московского физико-технического института (государственного университета) (Российская Федерация, Московская обл., 141700, г. Долгопрудный, Институтский переулок, д. 9).

Ушаков Никита Дмитриевич — студент магистратуры Московского физико-технического института (государственного университета) (Российская Федерация, Московская обл., 141700, г. Долгопрудный, Институтский переулок, д. 9).

Просьба ссылаться на эту статью следующим образом:

Бабурин А.С., Богинская И.А., Курочкин И.Н., Родионов И.А., Рыжиков И.А., Седова М.В., Тонанайский Б.Д., Ушаков Н.Д. Исследование влияния ультразвука при осаждении миоглобина из растворов на активные ГКР-подложки // Вестник МГТУ им. Н.Э. Баумана. Сер. Приборостроение. 2018. № 4. С. 97–111.

DOI: 10.18698/0236-3933-2018-4-97-111

INVESTIGATION OF ULTRASOUND INFLUENCE ON MYOGLOBIN DEPOSITION FROM SOLUTIONS ON SERS SUBSTRATES

A.S. Baburin¹

baburin@bmstu.ru

I.A. Boginskaya²

i.boginskaya@bk.ru

I.N. Kurochkin³

ikur@genebee.msu.ru

I.A. Rodionov⁴

irodionov@bmstu.ru

I.A. Ryzhikov²

ilyaryzhikov@rambler.ru

M.V. Sedova²

nanocom@yandex.ru

B.D. Tonanayskiy⁵

bogdan0995@gmail.com

N.D. Ushakov⁵

washburn3000@yandex.ru

¹Federal State Unitary Enterprise "All-Russia Research Institute of Automatics named after N.L. Dukhov" (VNIIA), Moscow, Russian Federation

²Institute of Theoretical and Applied Electrodynamics RAS, Moscow, Russian Federation

³Institute for Biochemical Physics (IBCP) RAS, Moscow, Russian Federation

⁴Scientific and Educational Center "Functional micro and nanosystems"

Moscow, Russian Federation

⁵Moscow Institute of Physics and Technology (State University), MIPT, Dolgoprudnyy, Moscow Region, Russian Federation

Abstract

The article deals with the problem of recording the Raman spectra of protein solutions with a concentration of less than 1 µg/ml, which appears very important at present. To increase the concentration and amplification of the Raman signal from these proteins, sample preparation was carried out by drying a drop of solution on the surface of the substrate, which amplifies the signal for the Raman proteins scattering. The ultrasound effect on the process of protein deposition on the surface and its conformation was studied. Moreover, we conducted experiments on the preparation of a protein solution of myoglobin in water at concentration of 1 µg/ml on substrates that are thin (not more than 100 nm) silver films with a nanoscale surface structure made on mica substrates. After ultrasonic treatment, crystal-like protein structures were obtained, the amplitude of the Raman spectra being much larger than the that of similar spectra obtained after drying solutions of protein of the same concentration under normal conditions without ultrasound. Findings of the research show that ultrasound affects the nature of aggregation, crystallization and conformation of proteins, the amplitude and shape of the Raman spectra

Keywords

SERS substrates, protein conformation, acoustochemistry, sample preparation, ultrasound, myoglobin

Received 13.10.2017

© BMSTU, 2018

This work was supported by the grant of the RNF No. 16-14-00209 of January 11, 2016

REFERENCES

- [1] Crespo R., Martins P.M., Gales L., Rochac F., Damasa A.M. Potential use of ultrasound to promote protein crystallization. *Journal of Applied Crystallography*, 2010, vol. 43, no. 6, pp. 1419–1425. DOI: 10.1107/S0021889810040951
Available at: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1107/S0021889810040951>
- [2] McCausland L.J., Cains P.W. Power ultrasound — a means to promote and control crystallization in biotechnology. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*, 2004, vol. 21, no. 1, pp. 3–10. DOI: 10.1080/02648725.2004.10648048
Available at: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/02648725.2004.10648048>
- [3] Chirkina A.A. Modern problems of biochemistry. *Methods of research*. Art. 34 2013.
- [4] Bennis G.K. Atomic force microscope and method for imaging surfaces with atomic resolution. Patent US 4724318. App. 09.02.1986, publ. 04.08.1988.
- [5] Martin Y., Williams C.C., Wickramasinghe H.K. Method for imaging sidewalls by atomic force microscopy. *Appl. Phys. Lett.*, 1994, vol. 64, no. 19, art. 2498. DOI: 10.1063/1.111578
Available at: <https://aip.scitation.org/doi/abs/10.1063/1.111578>
- [6] Meyer G., Amer N.M. Novel optical approach to atomic force microscopy. *Appl. Phys. Lett.*, 1988, vol. 53, no. 12, art. 1045. DOI: 10.1063/1.100061
Available at: <https://aip.scitation.org/doi/abs/10.1063/1.100061>
- [7] Dürig U., Gimzewski J.K., Pohl D.W. Experimental observation of forces acting during scanning tunneling microscopy. *Phys. Rev. Lett.*, 1986, vol. 57, no. 19, art. 2403. DOI: 10.1103/PhysRevLett.57.2403
Available at: <https://journals.aps.org/prl/abstract/10.1103/PhysRevLett.57.2403>

Baburin A.S. — Junior Research Fellow, Federal State Unitary Enterprise "All-Russia Research Institute of Automatics named after N.L. Dukhov" (VNIIA), (Sushevskaya ul. 22, Moscow, 127055 Russian Federation).

Boginskaya I.A. — Cand. Sc. (Eng.), Senior Research Fellow, Institute of Theoretical and Applied Electrodynamics RAS (Izhorskaya ul. 13, Moscow, 125412 Russian Federation).

Kurochkin I.N. — Dr. Sc. (Chem.), Professor, Director of Institute for Biochemical Physics (IBCP) RAS (Kosygina ul. 4, Moscow, 119334 Russian Federation).

Rodionov I.A. — Cand. Sc. (Eng.), Director of Scientific and Educational Center "Functional micro and nanosystems", Bauman Moscow State Technical University (2-ya Baumanskaya ul. 5, str. 1, Moscow, 105005 Russian Federation).

Ryzhikov I.A. — Cand. Sc. (Eng.), Assoc. Professor, Head of the Laboratory, Institute of Theoretical and Applied Electrodynamics RAS (Izhorskaya ul. 13, Moscow, 125412 Russian Federation).

Sedova M.V. — Leading Research Fellow, Institute of Theoretical and Applied Electrodynamics RAS (Izhorskaya ul. 13, Moscow, 125412 Russian Federation).

Tonanayskiy B.D. — Bachelor's Degree student, Moscow Institute of Physics and Technology (State University), MIPT (Institutskiy pereulok 9, Dolgoprudnyy, Moscow Region, 141700 Russian Federation).

Ushakov N.D. — Master's Degree student, Moscow Institute of Physics and Technology (State University), MIPT (Institutskiy pereulok 9, Dolgoprudnyy, Moscow Region, 141700 Russian Federation).

Please cite this article in English as:

Baburin A.S., Boginskaya I.A., Kurochkin I.N., Rodionov I.F., Ryzhikov I.A., Sedova M.V., Tonanayskiy B.D., Ushakov N.D. Investigation of Ultrasound Influence on Myoglobin Deposition from Solutions on Sers Substrates. *Vestn. Mosk. Gos. Tekh. Univ. im. N.E. Baumana, Priborostr.* [Herald of the Bauman Moscow State Tech. Univ., Instrum. Eng.], 2018, no. 4, pp. 97–111 (in Russ.). DOI: 10.18698/0236-3933-2018-4-97-111