УДК 539.2 577 601

Применение атомно-силовой микроскопии для 3D-анализа результатов гибридизации нуклеиновых кислот на микрочипах

Е. В. Дубровин[1*], Г. В. Преснова[2], М. Ю. Рубцова[2], А. М. Егоров[2,3], В. Г. Григоренко[2], И. В. Яминский[1,2]

[1]Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, физический факультет, 119991, Москва, Ленинские горы, 1, стр. 2

[2]Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, химический факультет, 119991, Москва, Ленинские горы, 1, стр. 3

[3]Российская медицинская академия последипломного образования, 125993, Москва, ул. Баррикадная, 2/1

*E-mail: dubrovin@polly.phys.msu.ru

Поступила в редакцию 20.09.2014

После доработки 25.02.2015

РЕФЕРАТ **Олигонуклеотидные микрочипы считаются в настоящее время одним из наиболее эффективных методов генодиагностики. Способность атомно-силовой микроскопии (АСМ) характеризовать трехмерную морфологию отдельных молекул, находящихся на поверхности носителя, позволяет использовать ее как эффективный инструмент 3D-анализа поверхности микрочипа для детекции нуклеиновых кислот. Высокое разрешение АСМ открывает потенциальные возможности для снижения порога детекции ДНК-мишени, повышения соотношения сигнал/шум. В представленной работе разработан подход к оценке результатов гибридизации нуклеиновых кислот, меченных золотыми наночастицами, на кремниевых микрочипах на основе АСМ-исследования поверхности как на воздухе, так и в жидкости, учитывающий их трехмерную структуру. Для количественной оценки результатов гибридизации предложен критерий, интерпретируемый как доля площади поверхности, занимаемой наночастицами.**

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА **ДНК, атомно-силовая микроскопия, гибридизация, наночастицы золота, олигонуклеотидные микрочипы, β-лактамазы CTX-M-типа.**

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ **АСМ – атомно-силовая микроскопия; ГОПС – γ-глицидоксипропилтриметоксисилан; ПЦР – полимеразная цепная реакция; СЭМ – сканирующая электронная микроскопия; EDTA – этилендиаминтетрауксусная кислота.**

ВВЕДЕНИЕ

Технология олигонуклеотидных микрочипов – относительно новый метод, который появился в середине 1990-х годов и основан на гибридизации олигонуклеотидных зондов с нуклеиновыми кислотами-мишенями [1]. Этот метод позволяет анализировать одновременно фрагменты последовательностей большого количества нуклеиновых кислот и представляет собой мощный инструмент для клинической диагностики [2], определения чувствительности к лекарственным средствам [3], токсикологических исследований [4], а также применяется в других научных и научно-практических областях биологии и медицины [5].

ДНК-микрочип состоит из твердой подложки, на которой иммобилизовано большое количество олигонуклеотидных зондов известной последовательности. Эти зонды способны гибридизоваться с комплементарными фрагментами молекул ДНК или РНК из анализируемого образца. Наиболее распространенный метод детекции результата гибридизации зонда с ДНК-мишенью – использование флуоресцентных красителей [6]. В качестве метки в технологии микрочипов применяют также радиоизотопы [7], ферменты [8] и наночастицы золота [9]. Наряду с флуоресцентной и оптической детекцией используют детекцию электрохимическую [10] и с помощью поверхностного плазмонного резонанса [11]. Поверхность микрочипов в последние годы активно изучают с помощью микроскопии высокого разрешения. Метод сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) использовали для изучения поверхности микрочипов из стекла с олигонуклеотидными зонда-

ми, меченными биотином и выявленными с использованием полимеров стрептавидина с пероксидазой и усиления на основе реакции восстановления серебра [12]. Было показано, что формирующиеся в процессе усиления наночастицы серебра адсорбируются на поверхности и отчетливо различимы на поверхности данным методом. Сканирующая электронная микроскопия была использована для регистрации гибридизации модельной одноцепочечной ДНК длиной 46 нуклеотидов в формате сэндвич. Для этого олигонуклеотидные зонды первого типа иммобилизовали на носителе, ДНК выявляли с использованием вторых олигонуклеотидных зондов, меченных наночастицами золота [13]. Для регистрации ДНК предложен простой способ подсчета числа частиц на единице поверхности, что обеспечило высокую чувствительность метода и лучшее соотношение сигнал/шум по сравнению с использованием флуоресцентного зонда.

Атомно-силовая микроскопия (АСМ), основанная на принципе работы профилометра – прибора для измерения неровностей поверхности, имеет приблизительно такое же латеральное разрешение, как и СЭМ, однако заметно превосходит ее по вертикальному разрешению. Кроме того, АСМ не требует вакуумного окружения для исследования образцов, позволяя изучать их в различных условиях: как на воздухе, так и в жидкости.

Следует отметить, что атомно-силовая микроскопия накопила большой опыт изучения адсорбированных на подложках молекул ДНК и РНК без использования каких-либо меток [14–16]. В ряде работ АСМ использовали как средство визуализации и анализа биоспецифических взаимодействий, таких, как связывание фрагментов бактериальных клеток из раствора с антителами [17], бактериофагов с клеткой-хозяином [18] и других взаимодействий рецептор–лиганд [19]. Описано применение АСМ для анализа топографии поверхности ДНК-микрочипов, что позволяло оптимизировать технологию их приготовления [20, 21]. Преимуществом метода является отсутствие специальной пробоподготовки поверхности микрочипов и относительно простая процедура сопряжения микрочипа с микроскопом для последующего анализа (например, в большинстве случаев достаточно просто прикрепить носитель на специальную магнитную шайбу). АСМ-анализ поверхностей ДНК-микрочипов после их экспонирования в анализируемый раствор позволил сделать вывод о гибридизации зонда с комплементарными ДНК-мишенями [22] или введенными в них наночастицами золота [23]. В ряде работ АСМ позволила выработать количественные критерии оценки гибридизации ДНК-мишени на поверхности микрочипа. Использование количественного подхода при АСМ-анализе ДНК-микрочипов крайне важно, так как позволяет количественно сравнивать эффективность гибридизации, в том числе при значительно меньших (по сравнению с общепринятыми методами детектирования) концентрациях мишени. Например, в качестве количественного критерия использовалась высота слоя на поверхности биочипа, полученная в результате АСМ-нанолитографии [24]. В случае, когда гибридизованные мишени как-либо морфологически выделяются на поверхности, таким критерием может быть количество связавшихся ДНК-мишеней [25] или ассоциированных с ними наночастиц [26] на единицу поверхности. В настоящей работе мы развиваем основанный на использовании АСМ подход к исследованию поверхностей кремниевых олигонуклеотидных микрочипов после проведения гибридизации с возможностью количественного анализа ее результатов. Особенностью развиваемого подхода является учет суммарной площади, занимаемой связавшимися с поверхностью микрочипа мишенями (связанными с ними наночастицами).

Мы предполагали, что уникальная способность АСМ визуализировать одиночные мишени (наночастицы) на поверхности микрочипа и получать информацию об их высоте и других размерах позволит внести дополнительный основанный на морфологии критерий при отборе «истинных» мишеней и, таким образом, снизить порог обнаружения мишеней, повысить соотношение сигнал/шум, а также уменьшить количество материала, необходимого для изготовления микрочипов. В качестве модельных ДНК использовали нуклеиновые кислоты, кодирующие бактериальные β-лактамазы типа CTX-M, которые отвечают за развитие устойчивости к цефалоспоринам у грамотрицательных бактерий – возбудителей инфекционных заболеваний [27, 28].

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Наночастицы золота получали по методу Френса, основанному на восстановлении золотохлористоводородной кислоты цитратом натрия [29]. Размеры наночастиц золота определяли методом СЭМ в растровом сканирующем электронном микроскопе Supra-40 (Carl Zeiss, Германия) со встроенным в колонну микроскопа детектором вторичных электронов InLens.

Для получения конъюгата стрептавидина с наночастицами золота стрептавидин (2 мг в 200 мкл 10 мМ К-фосфатном буфере pH 7.2) модифицировали 3.2 мг меркаптоянтарной кислоты в присутствии 3 мг карбодиимида в течение ночи при +4°С. После этого добавляли 10 мкл 10 мМ EDTA, перемешивали в течение 30 мин при комнатной температуре, полученный раствор диализовали против фосфатного буфера

с EDTA. Доводили pH раствора коллоидного золота до 7.0 свежеприготовленным раствором Na_2CO_3 и добавляли стрептавидин, модифицированный меркаптоянтарной кислотой. После инкубации в течение 1 ч при комнатной температуре раствор центрифугировали (30 мин, 11000 об/мин, 4°C). Затем супернатант удаляли, осадок растворяли в 10 мМ К-фосфатном буфере pH 7.2.

Для идентификации нуклеиновых кислот, кодирующих β-лактамазы CTX-M-типа, использовали зонд 5'-TTTTTTTTTTTTTTT-ATATCGCGGTGATCTGGCC-3'. Для контроля неспецифической гибридизации использовали зонд 5'-TTTTTTTTTTTTTT-CTAGACAGCCACTCATA-3'. Эти зонды модифицировались аминогруппой на 5'-конце.

Амплификацию генов β-лактамаз CTX-M-типа размером 870 п.н. с одновременным включением биотина проводили методом ПЦР как описано в [30].

Поверхность кремниевых пластин очищали кислородной плазмой в установке реактивного ионного травления RDE-300 (Alcatel, Франция) в течение 30 мин. Затем поверхность кремния химически модифицировали [31]. Для этого кремний обрабатывали 10 мМ раствором 3-глицидопропилтриметоксисилана (ГОПС) в сухом толуоле в течение 12 ч при 80°C, затем отмывали и выдерживали при 100°C в течение 10 мин. Олигонуклеотидные зонды, модифицированные на 5'-конце аминогруппой, наносили на поверхность модифицированного кремния из растворов с концентрацией 20 пмоль/мкл в 0.25 М Na-фосфатном буфере, содержащем 0.3 М Na_2SO_4. После иммобилизации блокировали свободные центры связывания белков на поверхности кремния в растворе, содержащем 1% БСА и 1% казеин в 10 мМ К-фосфатном буфере pH 7.2, содержащем 0.15 М NaCl. На олигонуклеотидном микрочипе проводили гибридизацию 1 нМ ДНК, меченной биотином, в буфере 0.05 М NaH_2PO_4, 0.5 М NaCl, 0.005 М EDTA, pH 7.4 при температуре 45°C в течение 2 ч. Отмывку проводили 10 мМ К-фосфатным буфером pH 7.2, содержащим 0.15 М NaCl и 0.1% Твин 20. Затем микрочип инкубировали с раствором конъюгата стрептавидина с наночастицами золота в концентрации 40 нг/мл по белку в течение 45 мин при 37°C и отмывали.

В работе использовали атомно-силовой микроскоп Nanoscope IIIa (Digital Instruments, США) в режиме прерывистого контакта (tapping mode). Сканирование проводили на воздухе с использованием коммерческих кантилеверов fpN10 («Микромаш», Эстония), в жидкости – кантилеверами NP-S1 (Veeco, США) с частотой сканирования 2.1 Гц, 512 × 512 точек. Обработку и анализ изображений проводили с использованием программного обеспечения Фемтоскан Онлайн (Центр перспективных технологий, Россия).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Гибридизационный анализ на кремниевых микрочипах проводили с использованием олигонуклеотидных зондов, иммобилизованных на поверхности кремния, модифицированного γ-глицидоксипропилтриметоксисиланом (ГОПС). Структура олигонуклеотидного зонда для выявления нуклеиновых кислот, кодирующих β-лактамазы CTX-M-типа, и контрольного зонда приведена в разделе «Экспериментальная часть». Реакцию гибридизации проводили с ДНК-мишенью размером 870 п.н., в которую вводили биотин в процессе ПЦР. Молекулы биотина в образовавшихся на носителе дуплексах выявляли конъюгатом стрептавидина с наночастицами золота. В работе использовали наночастицы золота сферической формы размером 27 ± 3 нм. После проведения гибридизации и выявления дуплексов конъюгатом стрептавидина с наночастицами золота поверхность микрочипов исследовали с помощью АСМ.

На *рис. 1* представлены полученные в буфере АСМ-изображения поверхности микрочипов до и после гибридизации с меченными золотыми наночастицами нуклеиновыми кислотами, кодирующими β-лактамазы CTX-M-3. Морфологически

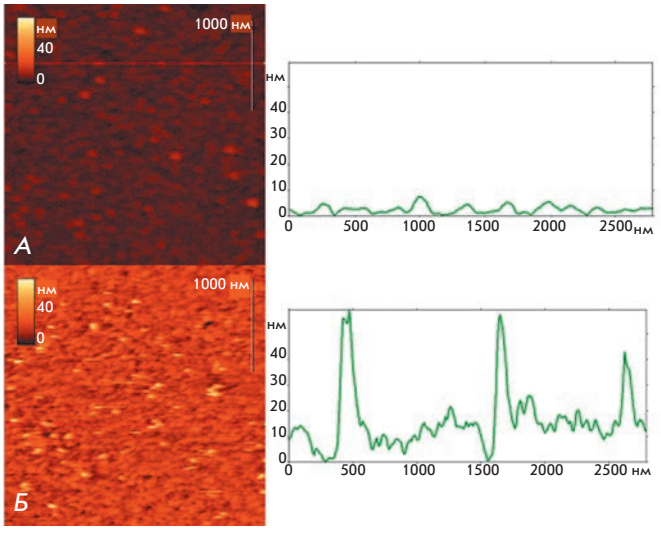


Рис. 1. АСМ-изображения поверхности микрочипов, полученные в буфере до (*А*) и после (*Б*) гибридизации с ДНК-мишенью, меченной биотином, и взаимодействия с конъюгатом стрептавидина с наночастицами золота. Справа приведены вертикальные профили поверхностей микрочипов вдоль линии, проведенной на соответствующем изображении слева

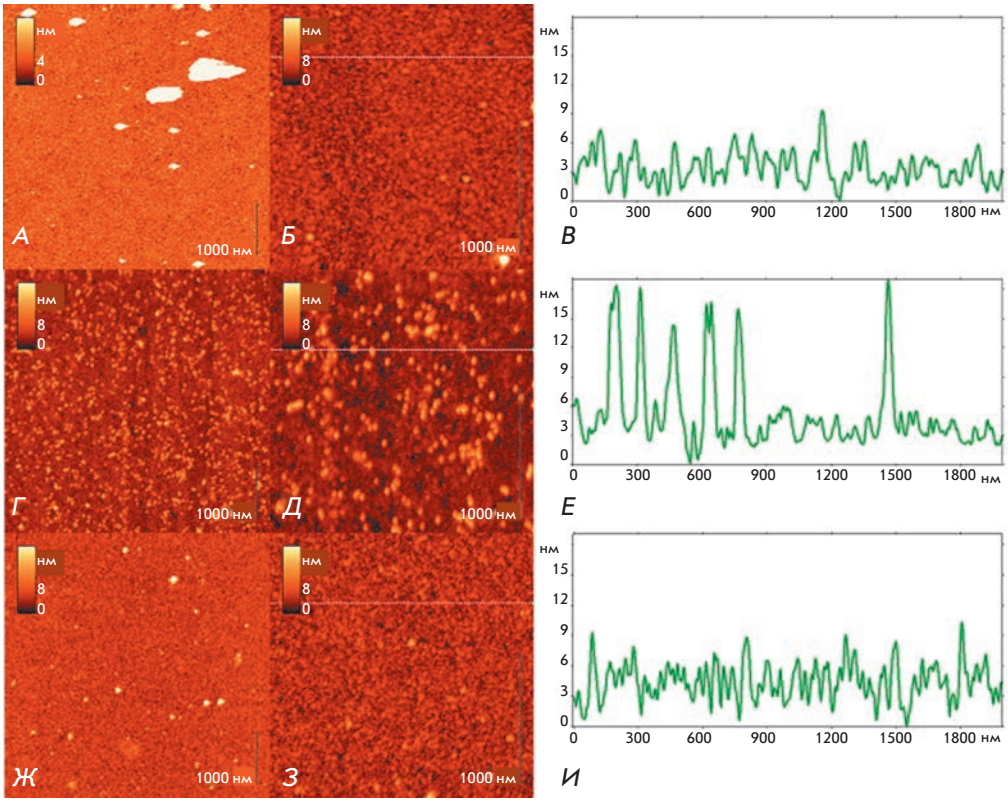


Рис. 2. АСМ-изображения и вертикальные профили поверхности кремниевых микрочипов. *А–В* – иммобилизованные олигонуклеотидные зонды на γ-ГОПС-модифицированном кремнии до экспонирования в анализируемый раствор; *Г–Е* – после экспонирования в анализируемый раствор ДНК-мишени и введения наночастиц в дуплексы; *Ж–И* – участки микрочипов без олигонуклеотидных зондов на поверхности после их экспонирования в анализируемый раствор ДНК-мишени и конъюгата стрептавидина с наночастицами золота

поверхность микрочипов с дуплексами ДНК состоит из плотно уложенных глобул диаметром 5–10 нм, которые представляют собой кремний, модифицированный γ-ГОПС и олигонуклеотидами. Сходные структуры наблюдали ранее в случае других олигонуклеотидных микроматриц на кремнии [22]. После гибридизации с меченой ДНК на этой поверхности появляются наночастицы, которые являются маркерами продуктов гибридизации. Их высота составляет 30–50 нм (*рис. 1Б*). Изображения наночастиц в жидкой среде нестабильны, нечетки и изобилуют многочисленными сбоями сканирования, что выражается в появлении светлых полос. Это, скорее всего, связано с тем, что наночастицы в составе ДНК плохо фиксированы на поверхности, поскольку в гибридизации участвует только небольшой участок нуклеиновой кислоты протяженностью 18 нуклеотидов из 870. В связи со слабой адгезией на поверхности высота наночастиц, измеряемая методом АСМ, превышала значение 27 ± 3 нм, полученное для этих частиц методом СЭМ. Выявление на поверхности микрочипов наночастиц золота в составе дуплексов ДНК является важным результатом, поскольку доказывает наличие связывания комплементарных участков ДНК и олигонуклеотидов *in situ*. Количественную оценку результатов гибридизации ДНК предпочтительней проводить после высушивания поверхности микрочипа, чтобы повысить стабильность АСМ-изображений золотых наночастиц.

Типичные АСМ-изображения и профиль поверхности олигонуклеотидных микрочипов до проведения гибридизации, полученные на воздухе, представлены на *рис. 2А–В*. В данном случае микрочип имеет однородную поверхность, состоящую из глобул высотой до 10 нм, на которой встречаются объекты случайной формы высотой до 330 нм (белые структуры на *рис. 2А*). Глобулярная поверхность в целом повторяет вид поверхности, наблюдавшейся в буфере (*рис. 1А*), при этом высокие объекты, вероятно, представляют собой примеси из буферных растворов, загрязнения из воздуха и появляются случайным образом в процессе приготовления микрочипов и проведения процесса идентификации ДНК. Метод АСМ позволяет напрямую контролировать общую площадь таких структур, которая мала по сравнению с рабочей поверхностью микрочипа.

Изображения поверхности микрочипов с дуплексами ДНК, меченными золотыми наночастицами, представлены на *рис. 2Г–Е*. На них наблюдается большое количество отдельных сферических частиц высотой от 10 до 30 нм, а также их небольшие агрегаты, объединяющие до 10–15 частиц. Учитывая диаметр используемых нами золотых наночастиц (27 ± 3 нм) и возможность их частичного погруже-

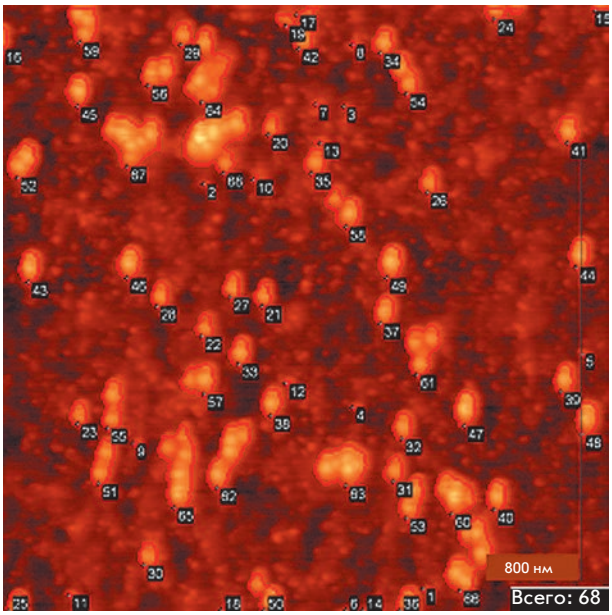


Рис. 3. Алгоритм выделения объектов на АСМ-изображении. Выделенные объекты обведены

ния в олигонуклеотидную матрицу при гибридизации зондов с ДНК-мишенями, можно интерпретировать наблюдаемые на АСМ-изображениях сферические частицы как золотые наночастицы – маркеры гибридизованных молекул ДНК.

Для контроля специфичности гибридизации и выявления дуплексов на *рис. 2Ж–И* приведены АСМ-изображения и профиль поверхности контрольной области микрочипа, на которую олигонуклеотидные зонды не наносились, при этом гибридизация с ДНК-мишенью с последующим введением золотых наночастиц производилась стандартным образом. На данных изображениях на фоне модифицированного γ-ГОПС кремния наблюдается небольшое (по сравнению с *рис. 2Г–Е*) количество объектов различного размера.

Для интерпретации результатов гибридизации зондов с мишенями, содержащими золотые наночастицы в качестве меток, мы разработали метод количественного анализа АСМ-изображений поверхности микрочипов. Суть его состоит в 3D-анализе поверхности микрочипа, т.е. в учете высот и площадей объектов, выявляемых на поверхности носителя после проведения всех стадий анализа. Метод АСМ позволяет получать информацию о высоте объекта с высокой точностью до долей нанометра, это позволяет отсортировывать наблюдаемые на поверхности микрочипов объекты по высоте. Таким образом, становится возможным выявление результатов комплементарной гибридизации по высоте наночастиц, используемых в качестве метки, в этом случае можно не учитывать неспецифически связавшиеся с поверхностью микрочипа объекты, имеющие меньшую высоту.

Для анализа АСМ-изображений, представленных на *рис. 2А,Г,Ж*, выделяли все наблюдаемые объекты. Математически суть такого выделения сводилась к поиску нулевого уровня фона на гистограмме как наиболее вероятного распределения высот всех 512 × 512 точек АСМ-изображения и построению пороговой плоскости, выше которой все части поверхности принимаются за объекты. В используемой нами программе обработки изображения (см. методику) данный алгоритм интегрирован в полуавтоматическую функцию. Все выделенные объекты характеризуются рядом легко вычисляемых геометрических характеристик, таких, как высота, площадь, объем, периметр, форм-фактор, отражающий форму объекта, и другие. На *рис. 3* приведен пример автоматического выделения объектов на АСМ-изображении, содержащем золотые наночастицы.

Диапазон высот, внутри которого выделенные объекты будут считаться метками, выбирается индивидуально в каждой задаче, исходя из информации об используемых метках и особенностей строения микроматрицы. В качестве нижнего и верхнего предела этого фильтра мы использовали значения 10 и 30 нм. Выбор верхнего предела (30 нм) связан с известным из данных СЭМ распределением диаметра наночастиц золота 27 ± 3 нм. В связи с тем, что объекты, имеющие высоту свыше 30 нм, практически не наблюдались на АСМ-изображениях микрочипов после гибридизации с меченными золотыми наночастицами ДНК-мишенями, мы не рассматривали возможность «вертикального» расположения агрегатов наночастиц на поверхности. Поскольку измеряемая с помощью АСМ высота объектов может быть занижена (в силу деформации поверхности кантилевером), а также, принимая во внимание возможное частичное погружение золотых наночастиц в олигонуклеотидную (и ГОПС-) матрицу, выбор нижней границы (10 нм) диапазона был сделан эмпирически на основе анализа нижней границы распределения высот наночастиц золота на соответствующем АСМ-изображении. В принципе, данный шаг (выбор диапазона высот фильтра) также можно алгоритмизировать, задавшись пороговым значением доли наблюдаемых объектов внутри данного диапазона по отношению ко всем наблюдаемым объектам на поверхности. На поверхностях с маленьким количеством примесей такое пороговое значение будет близко к единице, т.е. большинство наблюдаемых объектов будут соответствовать наночастицам (выбранный нами диапазон соответствует пороговому значению 0.9).

Гистограммы распределения высот объектов в выбранном диапазоне приведены на *рис. 4* для рабочей поверхности микрочипов до гибридизации (*рис. 4А*), после гибридизации (*рис. 4Б*), а также для контрольной поверхности микрочипов без иммобилизованных зондов, экспонированной в раствор с ДНК-мишенью в тех же экспериментальных условиях (*рис. 4В*). Гистограммы суммируют данные, полученные из АСМ-изображений, в трех различных точках каждой из поверхностей. Для наглядности гистограммы приведены в одном масштабе. Для количественного сравнения эффективности гибридизации использовали суммарную площадь отобранных с учетом высоты объектов (s_i), нормированную на площадь всего АСМ-изображения S_i: $k = \Sigma s_i/S$ и выраженную в процентах. Таким образом, агрегаты наночастиц будут учитываться более эффективно, так как их площадь пропорциональна числу входящих в них частиц. По смыслу параметр k отражает долю площади, занимаемой наночастицами-метками, в общей поверхности микрочипа. В связи с эффектом уширения выступающих объектов кантилевером атомно-силового микроскопа следует иметь в виду, что параметр k служит оценкой сверху для доли площади, занимаемой наночастицами. Параметр k с погрешностями для проведенных экспериментов представлен на *рис. 5*. Доля площади, занимаемой золотыми наночастицами при комплементарной гибридизации, оценивается в 8%, при отсутствии комплементарного связывания – 0.5%, тогда как площадь поверхности фоновых частиц не превышает 0.2%. При этом соотношение сигнала к шуму составило 16 и 40 соответственно. Для сравнения, в работе [13] соотношение сигнал/шум при флуоресцентной детекции составило 10 (при концентрации мишени 1 нМ).

Предлагаемый нами подход позволяет использовать количественный критерий для оценки гибридизации олигонуклеотидных зондов с ДНК-мишенями и дает возможность сравнивать эффективность идентификации ДНК на различных микрочипах. Важное отличие развитого нами подхода от общепринятых способов детекции гибридизации зонда с ДНК-мишенью, описанных во «Введении» (например, флуоресцентная и оптическая детекция), состоит в возможности визуализации единичных актов связывания мишени. Благодаря этому порог детекции ДНК-мишеней может быть значительно снижен по сравнению с общепринятыми способами, которые подразумевают наличие сигнала одновременно от большого количества связавшихся мишеней. Например, в работе [13], где для оценки эффективности гибридизации использовали прямой подсчет наночастиц по ПЭМ-изображениям, минимальный порог чувствительности обеспечивался по детекции

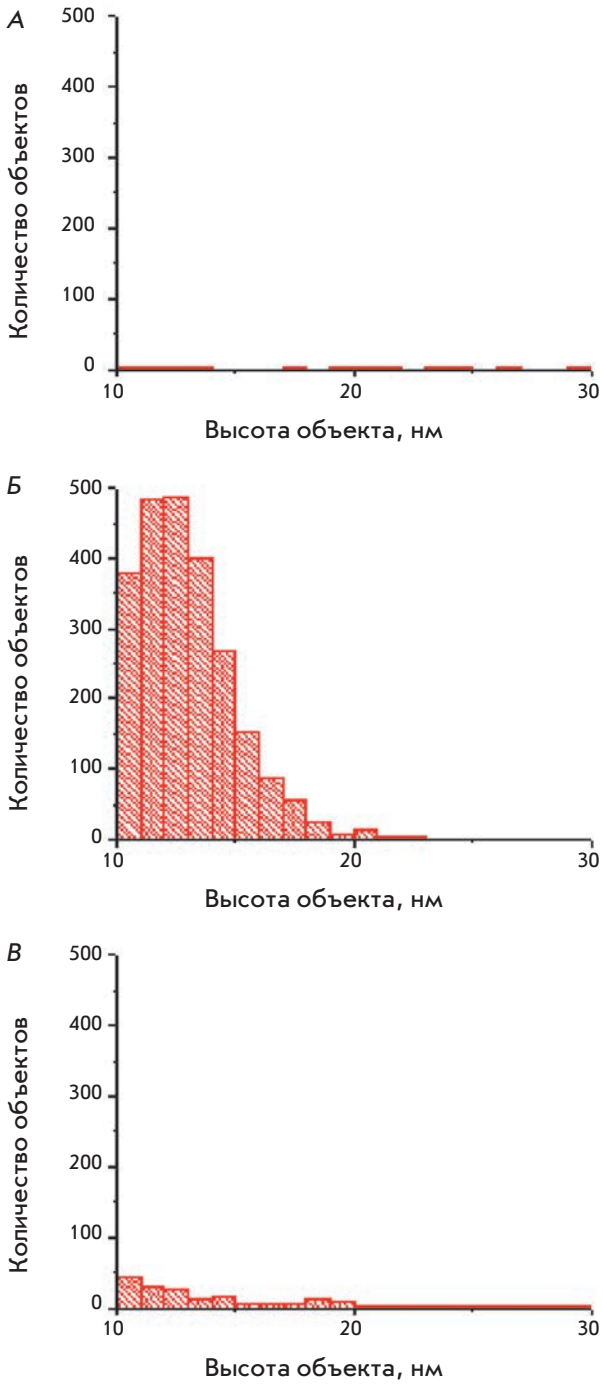


Рис. 4. Гистограммы распределения по высотам объектов в диапазоне 10–30 нм, наблюдаемых на АСМ-изображениях поверхности микрочипов до (*А*) и после (*Б*) гибридизации с ДНК-мишенью и конъюгатом стрептавидина с золотыми наночастицами, а также для контрольной поверхности микрочипов без олигонуклеотидных зондов после экспонирования в анализируемый раствор ДНК-мишени (*В*). Данные для каждой гистограммы суммированы по трем АСМ-изображениям размером 5 × 5 мкм^2

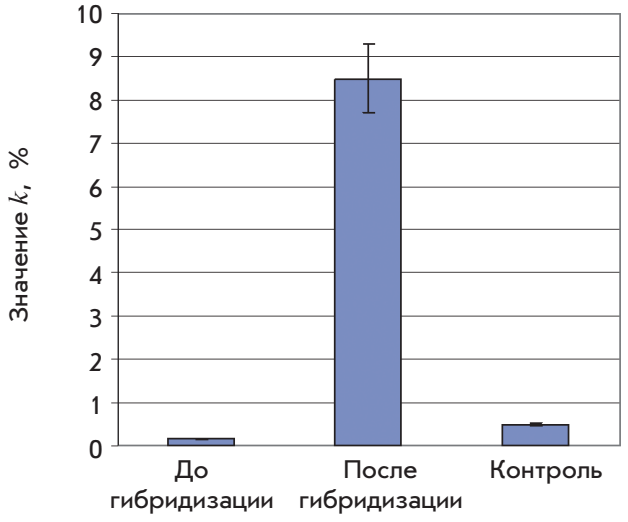


Рис. 5. Значение параметра k (в процентах) для поверхности микрочипов до и после гибридизации с ДНК-мишенью и конъюгатом стрептавидина с золотыми наночастицами, а также для контрольной поверхности микрочипов без олигонуклеотидных зондов после экспонирования в раствор ДНК-мишени. Параметр рассчитывали по трем АСМ-изображениям размером 5 × 5 мкм²

в среднем одной наночастицы на квадратный микрометр, при этом минимальная детектируемая концентрация оказалась в 1000 раз меньше, чем при использовании флуоресцентных меток.

Стоит подчеркнуть, что использование развитого нами подхода (и параметра k) не ограничено системами с использованием наночастиц в качестве маркеров ДНК. Этот же подход может быть применен для детекции молекул или других мишеней без использования меток. В таком случае параметр k (или его аналог, где в числителе суммируются не площади, а объемы) будет характеризовать количество связавшегося материала (мишени).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В данной работе метод АСМ был применен к исследованию олигонуклеотидных микрочипов для идентификации ДНК, кодирующих бактериальные β-лактамазы CTX-M-типа. Введение в дуплексы ДНК наночастиц золота позволяет использовать метод АСМ для эффективной детекции результатов гибридизации ДНК-мишеней с олигонуклеотидными зондами как в жидком, так и воздушном окружении. Для количественного описания процессов гибридизации нуклеиновых кислот разработан подход к оценке результатов гибридизации с применением трехмерного анализа АСМ-изображений поверхности микрочипа, учитывающий высоту и площадь наночастиц золота, используемых в качестве метки. Этот метод позволяет игнорировать неспецифически связавшиеся с поверхностью и отличающиеся от меток по высоте частицы, а также учитывать агрегаты наночастиц-мишеней, что позволяет увеличить чувствительность детекции. Для изученных в работе кремниевых микрочипов параметр k, соответствующий доле площади, занимаемой наночастицами после гибридизации с меченой специфической ДНК, был равен 8%, в то время как контрольные значения не превысили 0.5%. Способность получать трехмерную морфологию отдельных гибридизованных молекул ДНК является основным преимуществом АСМ перед другими методами детекции связывания на олигонуклеотидных микрочипах. Получение информации о трехмерном строении объекта позволяет использовать более точные морфологические критерии при выявлении гибридизованных молекул ДНК. ●

Работа поддержана РФФИ (грант № 15-04-07678) и частично грантом Президента РФ для государственной поддержки молодых ученых (МК-312.2013.2).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Schena M., Shalon D., Davis R.W., Brown P.O. // Science. 1995. V. 270. P. 467–470.
2. Yoo S.M., Choi J.H., Lee S.Y., Yoo N.C. // J. Microbiol. Biotechnol. 2009. V. 19. № 7. P. 635–646.
3. Behr M.A., Wilson M.A., Gill W.P., Salamon H., Schoolnik G.K., Rane S., Small P.M. // Science. 1999. V. 284. P. 1520–1523.
4. Nuwaysir E.F., Bittner M., Trent J., Barnett J.C., Afshari C.A. // Mol. Carcinog. 1999. V. 24. P. 153–159.
5. Iida K., Nishimura I. // Crit. Rev. Oral Biol. Med. 2002. V. 13. P. 35–50.
6. Sassolas A., Leca-Bouvier B.D., Blum L.J. // Chem. Rev. 2008. V. 108. P. 109–139.
7. Herwig R., Aanstad P., Clark M., Lehrach H. // Nucl. Acids Res. 2001. V. 29. e117.
8. Ryan O., Smyth M.R., Fagain C.O. // Essays Biochem. 1994. V. 28. P. 129–146.
9. Lytton-Jean A.K., Han M.S., Mirkin C.A. // Anal. Chem. 2007. V. 79. P. 6037–6041.
10. Liao J.C., Mastali M., Gau V., Suchard M.A., Møller A.K., Bruckner D.A., Babbitt J.T., Li Y., Gornbein J., Landaw E.M., et al. // J. Clin. Microbiol. 2006. V. 44. P. 561–570.
11. Malic L., Cui B., Veres T., Tabrizian M. // Opt. Lett. 2007. V. 32. P. 3092–3094.
12. Hering K.K., Moller R., Fritzsche W., Popp J. // ChemPhysChem. 2008. V. 9. P. 867–872.

13. Kim H., Takei H., Yasuda K. // Sens. Actuators. B. 2010. V. 144. P. 6–10.
14. Adamcik J., Klinov D.V., Witz G., Sekatskii S.K., Dietler G. // FEBS Lett. 2006. V. 580. P. 5671–5675.
15. Dubrovin E.V., Staritsyn S.N., Yakovenko S.A., Yaminsky I.V. // Biomacromolecules. 2007. V. 8. P. 2258–2261.
16. Dubrovin E.V., Gerritsen J.W., Zivkovic J., Yaminsky I.V., Speller S. // Colloids Surf. B. 2010. V. 76. P. 63–69.
17. Dubrovin E.V., Fedyukina G.N., Kraevsky S.V., Ignatyuk T.E., Yaminsky I.V., Ignatov S.G. // Open Microbiol. J. 2012. V. 6. P. 22–28.
18. Dubrovin E.V., Popova A.V., Kraevskiy S.V., Ignatov S.G., Ignatyuk T.E., Yaminsky I.V., Volozhantsev N.V. // PLoS One. 2012. V. 7. № 10. e47348.
19. Dupres V., Verbelen C., Dufrêne Y.F. // Biomaterials. 2007. V. 28. P. 2393–2402.
20. Oh S.J., Cho S.J., Kim C.O., Park J.W. // Langmuir. 2002. V. 18. P. 1764–1769.
21. Legay G., Finot E., Meunier-Prest R., Cherkaoui-Malki M., Latruffe N., Dereux A. // Biosens. Bioelectron. 2005. V. 21. P. 627–636.
22. Lenigk R., Carles M., Ip N.Y., Sucher N.J. // Langmuir. 2001. V. 17. P. 2497–2501.
23. Festag G., Steinbruck A., Wolff A., Csaki A., Moller R., Fritzsche W. // J. Fluoresc. 2005. V. 15. P. 161–170.
24. Han W.H., Liao J.-M., Chen K.-L., Wu S.-M., Chiang Y.-W., Lo S.-T., Chen C.-L., Chiang C.-M. // Anal. Chem. 2010. V. 82. P. 2395–2400.
25. Cook M.A., Chan C.-K., Jorgensen P., Ketela T., So D., Tyers M., Ho C.-Y. // PLoS One. 2008. V. 3. e154.
26. Lavalley V., Chaudouët P., Stambouli V. // Surf. Sci. 2007. V. 601. P. 5424–5432.
27. Bush K. // Ann. N.Y. Acad. Sci. 2013. V. 1277. P. 84–90.
28. Рубцова М.Ю., Уляшова М.М., Бахман Т.Т., Шмид Р.Д., Егоров А.М. // Успехи биол. химии. 2010. Т. 50. С. 303–348.
29. Frens G. // Nat. Phys. Sci. 1973. V. 241. P. 20–22.
30. Rubtsova M.Yu., Ulyashova M.M., Edelstein M.V., Egorov A.M. // Biosens. Bioelectron. 2010. V. 26. № 4. P. 1252–1260.
31. Lamture J.B., Beattie K.L., Burke B.E., Eggers M.D., Ehrlich D.J., Fowler R., Hollis M.A., Kosicki B.B., Reich R.K., Smith S.R., et al. // Nucl. Acids Res. 1994. V. 22. P. 2121–2125.