

Исследование аминомодифицированных зондов для атомно-силовой микроскопии биомолекул

А. П. Лиманский

НИИ микробиологии и иммунологии им. Мечникова
Ул. Пушкинская, 14, Харьков, 61057, Украина

Arizona State University, Department of Microbiology
Tempe, AZ 85287-2701, USA

Зонды из нитрида кремния для атомно-силовой микроскопии были модифицированы в парах производного аminosилана. Аминомодифицированные зонды охарактеризованы посредством силовых измерений в водных растворах при различных значениях ионной силы и pH. Показана возможность иммобилизации ДНК на поверхности модифицированного зонда.

Введение. Развитие атомно-силовой микроскопии (АСМ) сделало возможным измерение специфических взаимодействий рецептор—лиганд для единичных молекул [1—5]. В этих работах лиганд и рецептор ковалентно присоединяли к субстрату и зонду соответственно, а силу связи между молекулами (а именно — силу, необходимую для разрыва межмолекулярных связей) находили посредством силовых измерений — определения зависимости силы или отклонения зонда от расстояния между взаимодействующими молекулами.

Как правило, молекулярная модификация поверхностей субстрата и зонда предшествует этапу функционализации поверхностей — присоединению взаимодействующих молекул, например, комплементарных нитей ДНК или пары узнающих молекул: биотина и стрептовидина, антигена и антитела. Для модификации АСМ-зондов их поверхности обрабатывают либо с непосредственным образованием самоассоциированных монослоев (SAM), либо предварительно напыляют тонкий слой золота с последующим образованием SAM. При этом для модификации зачастую используют различные производные силанов. Алкилсиланы среди них имеют преимущество, поскольку их SAM могут быть непосредственно адсорбированы на поверхности кантиливера из нитрида кремния без предварительного покрытия золотом [6, 7].

Один из наиболее удобных методов приготовления модифицированной поверхности для АСМ состоит в функционализации свежесколотой слюды аминогруппами. Процедура модификации слюды 3-аминопропилтриэтоксисиланом (АПТЭС) позволяет получать стабильные изображения биологических макромолекул в воздухе и водном растворе [8]. Также известно, что силаны, подобные АПТЭС, образуют хорошо упорядоченные SAM на поверхности оксида кремния, слюды, стекла [9—11]. Традиционными методами, используемыми для характеристики поверхностей, являются масс-спектрометрия с ионизацией вторичными ионами (SIMS — second ionization mass spectrometry) и рентгеновская фотоэлектронная спектроскопия (XPS — X-ray photoelectron spectroscopy). Однако эти методы весьма затруднительно использовать для характеристики степени модификации зондов, радиус закругления которых составляет ~ 50 нм.

В представленной работе изложены результаты использования АСМ для исследования степени модификации поверхностей зонда из нитрида кремния посредством измерения зависимости силы адгезии между зондом и субстратом от расстояния между ними (force distance measurements). Измерены силы адгезии для двух пар поверхностей: немодифицированный зонд—слюда и аминомодифицированный зонд из нитрида кремния (АП-зонд)—слюда при различных ионных условиях в водных растворах.

Материалы и методы. Модификация Si_3N_4 -зондов. Для до- и постмодификационной очистки Si_3N_4 -зонды промывали хромовой смесью, тщательно ополаскивали ультрачистой водой с удельным сопротивлением $\sim 17 \text{ M}\Omega \cdot \text{см}$ (ModuPure Plus, Continental Water System Corp.), обдували аргоном и на заключительном этапе очищали посредством коротковолнового УФ-облучения в течение 45 мин. После УФ/озоновой очистки Si_3N_4 -зонды для модификации сразу же помещали в стеклянный эксикатор в атмосферу АПТЭС на 15 мин (АП15'-зонд), 1 или 2 ч (АП1- и АП2-зонд соответственно) при комнатных условиях. Модифицированные зонды хранили в эксикаторе в атмосфере аргона. В качестве субстрата использовали свежесколотую слюду.

Атомно-силовая микроскопия. Все измерения выполнены на атомно-силовом микроскопе Nanoscope III Multi Mode System («Digital Instruments», США) с D-сканером и коммерческой жидкостной ячейкой. Графики отклонение зонда—Z-позиция (зависимости отклонения зонда АСМ от расстояния между поверхностями зонда и слюды (в дальнейшем силовые графики) записаны с частотой 1—3 Гц и амплитудой 200—400 нм. Графики сила—расстояние получены из зависимостей отклонение зонда—Z-позиция (т. е. положение сканера по оси Z) посредством программного обеспечения Nanoscope III Software v. 4.23b15.

Силовые графики получены в режиме force calibration plot mode. Значения силы адгезии усреднены для 10—30 графиков. В одном цикле сближения—удаления записывали данные для 256—512 точек. Все силовые измерения выполнены с V-образными кантиливерами из нитрида кремния с золотым напылением и зондом E (Microlevers, Park Scientific Instruments, Inc., Sunnyvale, CA) (рис. 1). Каждый кантиливер содержал шесть Si_3N_4 -зондов (a—e), отличающихся геометрическими размерами и, следовательно, константой жесткости. Резонансные частоты зондов измерены с помощью встроенной опции Nanoscope III tune-up mode в воздухе (без учета возможного сдвига резонансной частоты за счет демпфирования воздуха). Константу жесткости оценивали индивидуально для каждого зонда посредством метода резонансной частоты Клевленда (Cleveland), в котором значение константы жесткости пропорционально резонансной частоте в третьей степени ненагруженного кантиливера [12]:

$$K = 2\pi^3 l^3 \omega^3 \sqrt{\rho^3 / E(v_0)^3}, \quad (1)$$

где K — константа жесткости; E — модуль эластичности; v_0 — измеренная резонансная частота; ρ — плотность материала; ω , l — ширина и длина кантиливера соответственно.

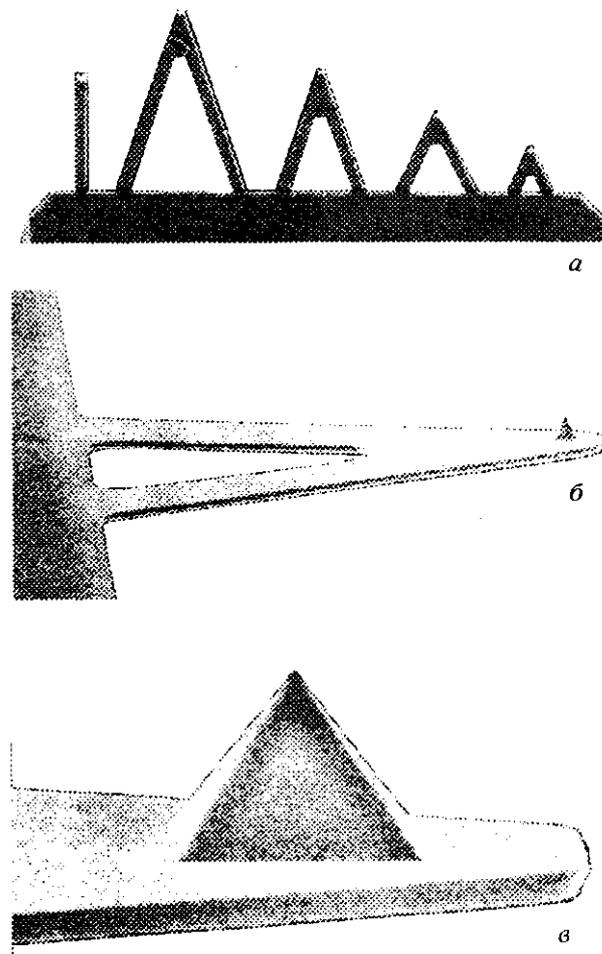


Рис. 1. Кантиливеры для атомно-силовой микроскопии высокого разрешения: а — чип конфигурация с пятью кантиливерами; б — кантиливер со стандартным зондом; в — кантиливер с острым коническим зондом. Кантиливеры из нитрида кремния с золотым напылением характеризуются различной константой жесткости, формой и геометрическими размерами зондов. Радиус кривизны зондов колеблется в пределах 10—50 нм

Для расчета K по методу Клевленда необходимо знание плотности материала. Стехиометрия и плотность кантиливеров варьируют в широких пределах в зависимости от условий реакции их получения. В данной работе для V-образных кантиливеров с золотым напылением использовано значение плотности для нитрида кремния $\rho_{SiN} = 2,8 \text{ г/см}^3$, которое соответствует стехиометрии N:Si = 1,1 [13], и $\rho_{Au} = 19,6 \text{ г/см}^3$. Эффективное значение

плотности композитного материала для Si_3N_4 -Au кантиливера рассчитывали из соотношения:

$$\rho_{\text{комп}} = (\rho_{\text{SiN}} \cdot h_1 + \rho_{\text{Au}} \cdot h_2) / (h_1 + h_2),$$

где $h_1 + h_2$ — общая толщина кантиливера; h_1 — толщина Si_3N_4 ; h_2 — толщина Au покрытия [14]. Определенная таким образом плотность V-образных композитных Si_3N_4 кантиливеров с золотым покрытием составила $3,80 \text{ г/см}^3$. Использованы следующие буферные растворы: 10 мМ трис-HCl, pH 7,6, 1 мМ ЭДТА (1 × ТЕ буфер); 10 мМ трис, 7 мМ NaOH, pH 11,2; фосфатный буфер с pH 7—9 и ионной силой $I = 10 \text{ мМ}$.

Для проведения силовых измерений при различных ионных условиях использовали четыре кантиливера. Каждая серия силовых измерений состояла из последовательных записей силовых графиков для пары поверхностей АП-зонд—слюда в растворах 1 × ТЕ, 10 × ТЕ и pH 11,2. Сначала были записаны силовые кривые для пары поверхностей АП1 зонд—слюда для четырех кантиливеров (№№ 1—4, см. табл. 1 и 2). Затем эти четыре кантиливера из АП1-зондов были «превращены» в АП2-зонды: с поверхностей АП1-зондов были удалены аминогруппы посредством последовательных промываний в хромовой смеси, ультрачистой воде и облучения коротковолновым УФ излучением. После модификации в парах АПТЭС в течение 2 ч получены АП2-зонды, и силовые измерения при различных ионных условиях выполнены для пары поверхностей АП2-зонд—слюда. Статистическую обработку значений силы адгезии проводили с помощью программного пакета KaleidaGraph.

Силовые измерения с функционализированными АП-зондами. Для силовых измерений с АП-зондом, функционализированным с глутаральдегидом (ГА), использовали аминомодифицированный кантиливер № 2, который был модифицирован из АП2-зонда № 2 посредством приведенной выше процедуры. После начального инжектирования в жидкостную ячейку для АСМ фосфатного буфера и записи набора силовых кривых в ячейку вводили с помощью шприца растворы ГА с концентрацией 0,03; 0,3 и 3 мМ и записывали соответствующие серии силовых кривых. Для функционализации АП1-зондов с ДНК в жидкостную ячейку, содержащую 1 × ТЕ буфер, инжектировали раствор ДНК с концентрацией ~ 0,4 мкг/мл. Затем через 1 мин осторожно промывали ячейку раствором 1 × ТЕ буфера (~ 200 мкл) и записывали набор силовых кривых.

Приготовление образцов ДНК для АСМ. Аминомодифицированную слюду получали обработкой в парах АПТЭС свежесколотой слюды, согласно ранее описанной методике [15] в течение 1 (АП1-слюда) и 2 (АП2-слюда) ч. На полоску модифицированной АП1-слюды размером 1 см^2 наносили сначала каплю объемом 20 мкл буферного раствора 1 × ТЕ, 900 мМ KCl или фосфатный буфер, pH 9, $I = 10 \text{ мМ}$. Затем осторожно наслаивали каплю раствора ДНК с концентрацией ~ 0,4 мкг/мл и объемом 7 мкл. После промывки и обдува потоком аргона полученные образцы хранили при давлении ~ 30—100 мм рт. ст. при комнатной температуре. Изображения ДНК записаны в режиме, соответствующем вибрирующему варианту АСМ

Таблица 1

Резонансная частота и константа жесткости для немодифицированных и аминомодифицированных V-образных Si_3N_4 кантиливеров с золотым напылением (АП-кантиливер; определенные из уравнения (1))

Кантиливер	АП-кантиливер		Кантиливер	
	Константа жесткости, пН/нм	Резонансная частота, кГц	Константа жесткости, пН/нм	Резонансная частота, кГц
1	51,2	27,2	—	—
2	49,4	27,0	51,2	27,1
3	47,5	26,5	51,2	27,1
4	49,4	27,0	—	—
5	51,2	27,2	51,2	27,2
6	47,5	26,5	43,7	25,7
7	79,8	31,7	—	—
8	79,8	31,7	—	—

Примечание. «—» — Измерений не проводили.

Таблица 2

Силы адгезии (нН) для аминомодифицированных кантиливеров АП1, АП2 и АП15' (в скобках) при различных ионных условиях и концентрации глутаральдегида (ГА)

Кантиливер	10 мМ трис-НСl, рН 7,6	100 мМ трис-НСl, рН 7,6	рН 11,2
<i>АП1-зонд</i>			
1	3,25±0,42 (1,12±0,07)	1,58±0,46	0,80±0,25
2	1,67±0,23	0,91±0,19	0,08±0,02
3	4,60±0,65 (1,02±0,24)	0,19±0,15	0,44±0,13
4	1,54±0,28	0	0
<i>АП2-зонд</i>			
1	0,78±0,25	0,20±0,07	0
2	1,14±0,46	0,55±0,11	0
3	2,07±0,32	0,49±0,13	0,04±0,04
4	0,91±0,30	0,53±0,19	0,04±0,02
<i>АП1-зонд, кантиливер 2</i>			
Фосфатный буфер, рН 7, I = 10 мМ	0,03 мМ ГА	0,3 мМ ГА	3 мМ ГА
1,80±0,25	3,06±0,42	0,89±0,21	0,80±0,28

Результаты и обсуждение. Контактная атомно-силовая микроскопия в режиме силовых измерений использована для определения силы адгезии между АП-зондом из нитрида кремния и слюдой. На рис. 2 представлено схематическое изображение модифицированного зонда из Si_3N_4 . В процессе одного цикла силовых измерений зонд сначала приближается к поверхности свежесколотой слюды (этому движению соответствует график сближения), а затем удаляется (при записи графика удаления регистрируют силу адгезии). Сила адгезии была измерена в цикле отклонение зонда—расстояние как сила, необходимая для отрыва зонда от поверхности субстрата — слюды.

Для расчета взаимодействующих сил между субстратом и зондом АСМ необходимо знание константы жесткости K кантиливера. Следующие три метода определения K для АСМ кантиливера являются наиболее широко распространенными: 1) измерение сдвига резонансной частоты кантиливера как функция добавленной массы; 2) анализ тепловых флуктуаций; 3) сравнение констант жесткости кантиливера по отношению к эталонному кантиливеру с известной жесткостью [13].

Следует отметить, что с помощью уравнения (1), представляющего модификацию первого мето-

да, можно легко оценить константу жесткости кантиливеров, но с невысокой точностью. Мы использовали его для сравнения константы жесткости различных кантиливеров. Полученные значения константы жесткости для восьми кантиливеров из различных областей одного набора представлены в табл. 1. Можно видеть, что различие констант жесткости кантиливеров, взятых из ограниченной области набора, значительно меньше, чем следует из спецификации производителя, — от 60 до 150 пН/нм.

На рис. 3 представлены силовые графики, записанные для АП-зонда и свежесколотой слюды при различных ионных условиях. Каждый график отклонение зонда— Z -позиция состоит из двух кривых. Кривая сближения представляет собой зависимость отклонения зонда от расстояния между зондом и субстратом при сближении их поверхностей, а кривая удаления — зависимость отклонения зонда от расстояния между зондом и субстратом при взаимном удалении их поверхностей. Характер обеих частей силового графика указывает на поверхностные свойства взаимодействующих зонда и субстрата. Поскольку немодифицированный зонд и свежесколотая слюда отрицательно заряжены при рН 7,6 в $1 \times \text{TE}$ буфере, между ними отсутствуют

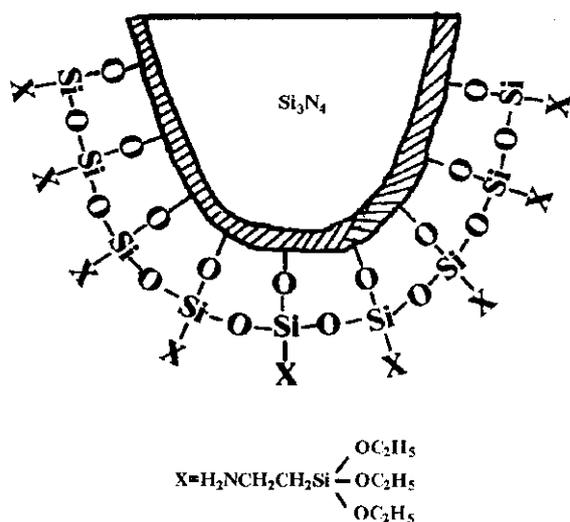


Рис. 2. Схематическое изображение модифицированного зонда для атомно-силового микроскопа

силы адгезии (в этом случае силовые графики аналогичны кривым на рис. 3, *и*). Модификация зондов в парах АПТЭС приводит к появлению пика на кривой удаления зависимости сила—расстояние. Этот адгезивный эффект обусловлен, в основном, электростатическим взаимодействием между положительно заряженными аминогруппами АП-зонда и отрицательно заряженными силанольными группами слюды (рис. 3, *а, г, ж*). Рассчитанные значения силы адгезии для АП1- и АП2-зондов приведены в табл. 2. Эти данные показывают, что увеличение ионной силы в 10 раз приводит к уменьшению силы адгезии между АП1-зондом и слюдой в 1,7—2 раза для кантиливеров 1 (рис. 3, *б*) и 2 (рис. 3, *д*). Разброс значений сил адгезии для АП1-кантиливеров 1, 2 и 4 может быть объяснен различным радиусом закругления зондов, образованием на их поверхности САМ с различной плотностью аминов. Для кантиливера 4 адгезивный эффект в $10 \times \text{TE}$ буфере полностью исчезает (рис. 3, *з*) и на кривой сближения можно наблюдать электростатическое отталкивание в неконтактной области. Отсутствие адгезивного эффекта в этом случае может быть объяснено механическим удале-

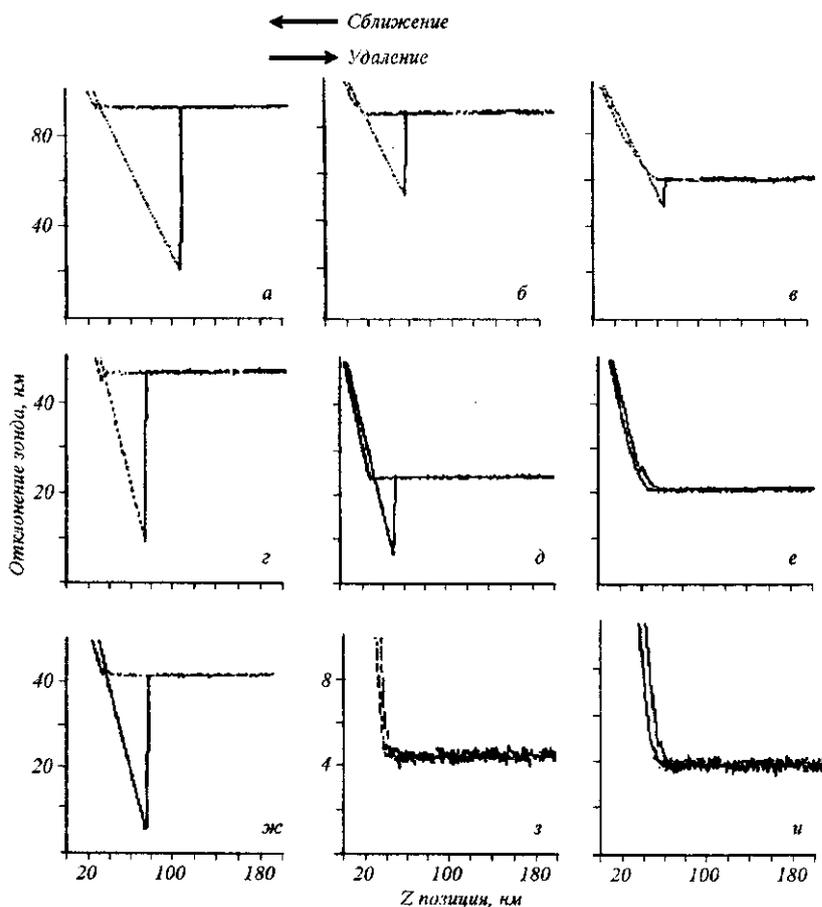


Рис. 3. Зависимости сила—расстояние для взаимодействующих поверхностей АП1-зонд—свежесколотая слюда для различных кантиливеров: *а—в* — кантиливер 1; *г—е* — кантиливер 2; *ж—и* — кантиливер 4. Силовые кривые получены в буферных растворах $1 \times \text{TE}$ (*а, г, ж*), $10 \times \text{TE}$ (*б, д, з*) и при pH 11,2 (*в, е, и*). Все силовые графики записаны с зондом Е

нием САМ с поверхности зонда под воздействием приложенной силы. Известно, что производные алкилсиланов могут реагировать с силанольными группами на поверхности нитрида кремния посредством образования ковалентных связей и возможной стабилизации водородными связями, а также с молекулами воды, адсорбированными на поверхности Si_3N_4 , без образования ковалентных связей между поверхностью зонда и САМ [16]. Во время цикла силовых измерений после сближения кантиливера и слюды их поверхности соприкасаются. Затем, поскольку сканер продолжает поступательное движение, происходит вдавливание (indentation) кантиливера в поверхность слюды. И хотя все силовые измерения выполнены при минимально возможном значении $Z_{\text{indentation}} \sim 10\text{--}20$ нм, эффект вдавливания кантиливера может приводить к механическому повреждению аминповерхности зонда. Таким образом, можно предположить, что САМ, образованные без стабилизации ковалентными связями, были удалены с поверхности кантиливера 4 во время силовых измерений.

Значения сил адгезии для АП2-зондов каждого из 4 исследуемых кантиливеров в 1,5—4 раза ниже по сравнению с АП1-зондами (см. табл. 2). Уменьшение силы адгезии свидетельствует о более низкой поверхностной плотности амингрупп, покрывающих зонд. Необходимо также принять во внимание, что АП1-слюда (аминоповерхность которой близка по своим физико-химическим свойствам к поверхности АП-зонда) позволяет получать гораздо более качественные АСМ изображения ДНК, чем АП2-слюда (результаты не приведены). Эти данные показывают, что, поскольку механизм модификации Si_3N_4 композитной керамики не выяснен, эмпирически определенный протокол модификации продолжительностью обработки 1 ч в парах АП-ТЭС позволяет получать аминомодифицированную поверхность с наиболее высоким значением силы адгезии.

Для последующей функционализации АП-зондов использованы нековалентное связывание ДНК и химическое взаимодействие с ГА. Ковалентное связывание амингрупп АП-зонда с карбонильными группами ГА приводит к образованию Шиффова основания [17]. В результате происходит уменьшение поверхностной плотности заряда АП-зонда и, следовательно, силы адгезии для системы АП-зонд + ГА—слюда (рис. 4, а—д, табл. 2). Немонотонное изменение силы адгезии в диапазоне концентраций ГА 0,03—3 мМ может быть объяснено, на взгляд автора, существованием нескомпенсированных ван-дер-ваальсовых сил, приводящих к увеличению силы адгезии для нейтрально заряжен-

ных поверхностей. Данные химической силовой микроскопии (chemical force microscopy) по рН титрованию модифицированных поверхностей подтверждают, что сила адгезии может резко изменяться вблизи изоэлектрической точки [18—20]. Взаимодействие отрицательно заряженных фосфатных групп молекул ДНК с положительно заряженными амингруппами АП-зонда приводит к их нейтрализации и исчезновению эффекта адгезии (рис. 4, з). В этом случае силовые кривые для АП-зонда с иммобилизованной ДНК в $1 \times \text{TE}$ буфере подобны силовым графикам для пары немодифицированный зонд—свежесколотая слюда. Силовые графики АП-зонд + ДНК в $1 \times \text{TE}$ буфере (рис. 4, з, д), записанные с интервалом в несколько секунд, показывают, что молекулы ДНК, адсорбированные на АП-зонде, лабильны и под воздействием приложенной силы могут приводить к появлению одного (рис. 4, д) или нескольких пиков адгезии. В процессе силовых измерений эти пики могут исчезать (рис. 4, з) и появляться снова (рис. 4, д). Силовые графики системы АП1-зонд—АП1-слюда (рис. 4, е) демонстрируют наличие значительного адгезивного эффекта, несмотря на то, что обе поверхности несут суммарный положительный заряд. Существенно более высокое значение работы сил адгезии (т. е. площади под кривой удаления) для пары АП1-зонд—АП-слюда (рис. 4, е) при одинаковом пиковом значении силы адгезии с парой АП1-зонд—слюда указывает на образование значительно большего количества межмолекулярных связей между АП1-зондом и АП-поверхностью.

Для выяснения механизма иммобилизации ДНК на модифицированной АП-поверхности зонда нами были получены изображения ДНК на АП1-слюде при высокой ионной силе ($I = 900$ мМ) (рис. 5, а) и рН 9 (рис. 5, б). Несмотря на экранирование электростатических сил двойного слоя ионов на поверхности АП1-слюды и отрицательно заряженных фосфатных групп ДНК при $I = 900$ мМ, на поверхности АП-слюды все еще существуют сайты для связывания нуклеиновых кислот. Эти данные позволяют предположить, что в связывании молекул ДНК как с аминповерхностью модифицированного зонда, так и с поверхностью модифицированной слюды участвуют не только электростатические силы, но и возможно образование водородных связей между амингруппами АП-зонда с силанольными группами слюды. Поскольку ван-дер-ваальсовы силы не зависят от рН [21], взаимодействие ДНК с АП-зондом (как и в случае АП-слюды при рН 9, $I = 10$ мМ), по мнению автора, обусловлено суперпозицией электростатических и ван-дер-ваальсовых сил.

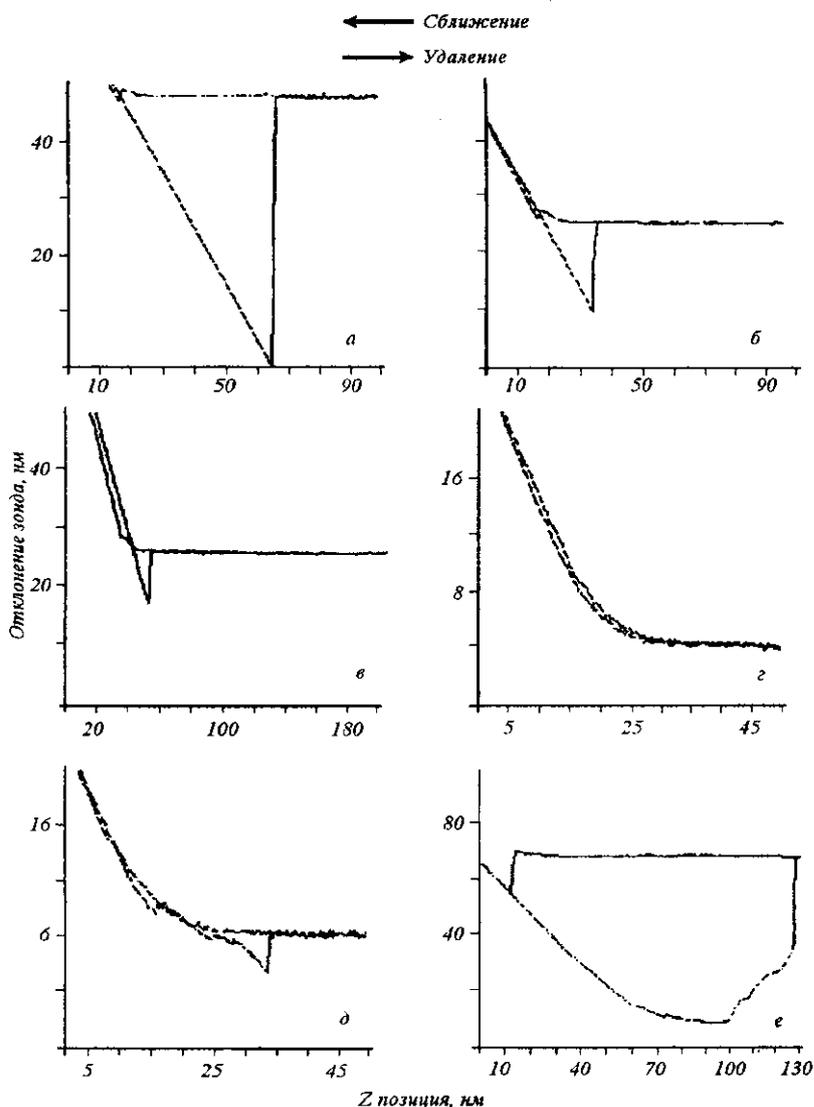


Рис. 4. Зависимости сила—расстояние для АП1-зонда, функционализованного с глутеральдегидом (ГА) и ДНК: *a* — АП1-зонд—свежесколотая слюда, фосфатный буфер, рН 7,0, $I = 10$ мМ; *b*, *в* — АП1-зонд + ГА—свежесколотая слюда; *b* — $C_{ГА} = 0,3$ мМ; *в* — $C_{ГА} = 3$ мМ; *г*, *д* — АП1-зонд + ДНК—свежесколотая слюда в $1 \times TE$ буфере; *e* — АП1-зонд—АП-слюда, фосфатный буфер, рН 7,0, $I = 10$ мМ

Выводы. Приведенные данные показывают, что АСМ в режиме силовых измерений может быть использована для характеристики аминомодифицированных и функционализированных АСМ зондов посредством определения силы адгезии между взаимодействующими поверхностями. При взаимодействии немодифицированного Si_3N_4 -зонда со свежесколотой слюдой адгезия отсутствовала. После аминомодификации зонда в парах АПТЭС силовые кривые иллюстрировали значительные (до 4,6 нН) силы адгезии. Значения силы адгезии для пары поверхностей АП-зонд—слюда уменьшались в ряду $I = 10$ мМ $\rightarrow I = 100$ мМ \rightarrow рН 11,2. Ранее нами показано, что такая же зависимость существует

для пары поверхностей аминомодифицированная слюда— Si_3N_4 -зонд. Отличие сил адгезии для системы АП-зонд—слюда при одном и том же типе модификации обусловлено вариацией радиусов закругления зондов, а также различным значением поверхностной плотности аминогрупп. Нековалентное связывание АП-зонд—ДНК и химическое взаимодействие АП-зонд—ГА показали возможность функционализации модифицированных АСМ зондов, что может найти применение в исследовании структурных особенностей поверхностей клеток, определении их микромеханических свойств, мониторинге клеточной динамики *in vitro*.

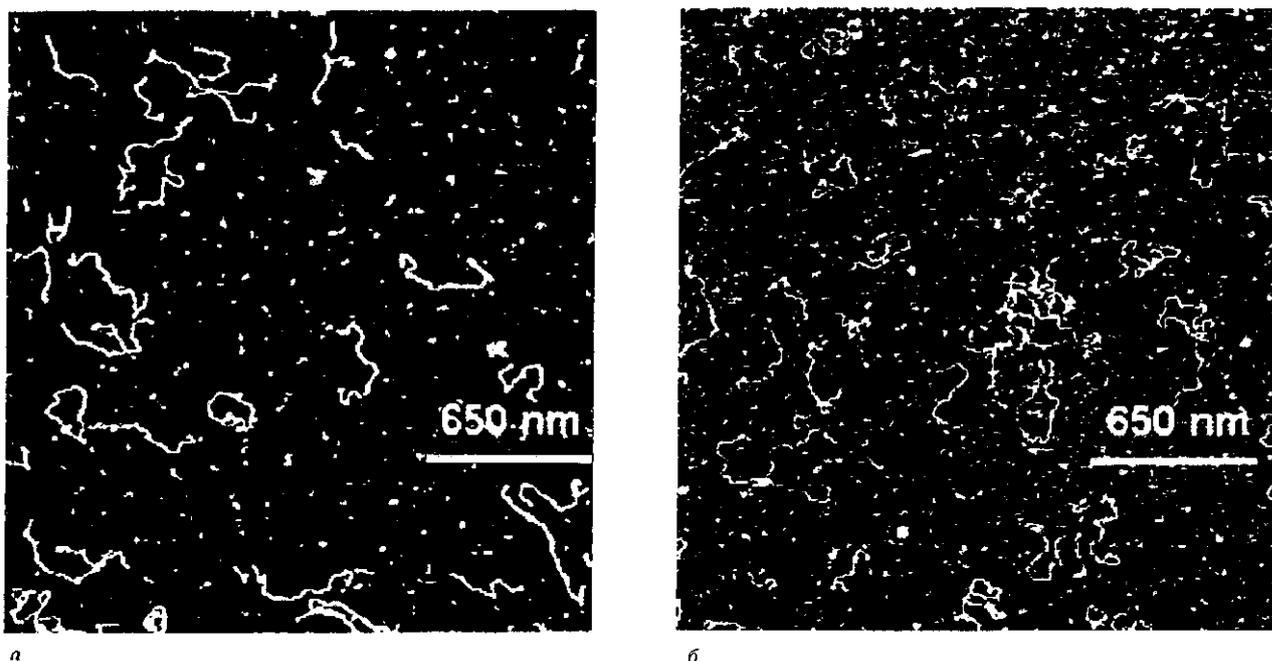


Рис. 5. АСМ изображения линейной плазмидной ДНК, полученные в воздухе после нанесения раствора ДНК на АП1-слою: а — 1 × TE буфер, 900 мМ КСl; б — фосфатный буфер, рН 9, I = 10 мМ. Размер кадра для обоих изображений 2,6 × 2,6 мкм

Работа поддержана грантом GM54991 Национального института здоровья (НИН, США).

A. P. Limanskii

Investigation of aminomodified tips for atomic force microscopy of biomolecules

Summary

Atomic force microscopy (AFM) was used for characterization of aminomodified tips in buffer solutions with different ionic strength (I) and pH values. Optimal conditions for tip modification in aminosilane vapour for following DNA immobilization were determined. Adhesion forces have been decreased for pair aminomodified tip — mica from I = 10 mM to I = 100 mM and pH 11.2. Functionalization of aminomodified tips by binding with glutaraldehyde and interaction with DNA was shown.

О. П. Лиманський

Дослідження аміномодифікованих зондів для атомно-силової мікроскопії біомолекул

Резюме

Атомно-силову мікроскопію (АСМ) використано для характеристики аміномодифікованих зондів у водних розчинах за різних значень іонної сили (I) та рН. Емпірично знайдено оптимальні умови для модифікації зондів у парах аminosилану для наступної іммобілізації ДНК. Значення сили адгезії для пари аміномодифікований зонд—слою зменшувалося в ряду I = 10 мМ → I = 100 мМ → рН 11,2. Продемонстровано можливість функціоналізації аміномодифікованих зондів за допо-

могою зв'язування з глутаральдегідом, а також шляхом нековалентної взаємодії з ДНК.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Moy V., Florin E.-L., Gaub H. Intermolecular forces and energies between ligands and receptors // Science.—1994.—266.—P. 257—259.
2. Hinterdorfer P., Baumgartner W., Gruber H., Schilcher K., Schindler H. Detection and localization of individual antibody-antigen recognition events by atomic force microscopy // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—1996.—93.—P. 3477—3481.
3. Hinterdorfer P., Schilcher K., Baumgartner W., Gruber H., Schindler H. A mechanistic study of the dissociation of individual antibody-antigen pairs by atomic force microscopy // Nanobiology.—1998.—N 4.—P. 39—50.
4. Graindbois M., Beyer M., Rief M., Clausen-Schaumann H., Gaub H. How strong is a covalent bond? // Science.—1999.—283.—P. 1727—1730.
5. Rief M., Pascual J., Saraste M., Gaub H. Single molecule force spectroscopy of spectrin repeats: low unfolding forces in helix bundles // J. Mol. Biol.—1999.—286.—P. 553—561.
6. Jo H., Blum F. Structure and adsorption of 3-acryloxypropyltrimethoxysilane // Langmuir.—1999.—15.—P. 2444—2449.
7. Frisbie C., Rozsnyai L., Noy A., Wrighton M., Lieber C. Functional group imaging by chemical force microscopy // Science.—1994.—265.—P. 2071—2074.
8. Shlyakhtenko L., Gall A., Weimer J., Hawn D., Lyubchenko Y. Atomic force microscopy imaging of DNA covalently immobilized on a functionalized mica substrate // Biophys. J.—1999.—77.—P. 568—576.
9. Kessel C., Granick S. Formation and characterization of a

- highly ordered and well-anchored alkylsilane monolayer on mica by self-assembly // *Langmuir*.—1991.—7—P. 532—538.
10. *Tian F., Xiao X., Loy M.* Humidity and temperature effect on frictional properties of mica and alkylsilane monolayer self-assembled on mica // *Langmuir*.—1999.—15.—P. 244—249.
 11. *McKendry R., Theoclitou M., Abell C., Rayment T.* Role of surface perfection in chemical force microscopy // *Langmuir*.—1998.—14.—P. 2846—2849.
 12. *Cleveland J., Manne S., Bocek D., Hansma P.* Nondestructive method for determining the spring constant of cantilever for scanning force microscopy // *Rev. Sci. Instrum.*—1993.—64.—P. 403—405.
 13. *Sader J., Larson I., Mulvaney P., White L.* Method for the calibration of atomic force microscope cantilevers // *Rev. Sci. Instrum.*—1995.—66.—P. 3789—3798.
 14. *Hazel J., Tsukruk V.* Spring constants of composite ceramic/gold cantilevers for scanning probe microscopy // *Thin Solid Films*.—1999.—339.—P. 249—257.
 15. *Lyubchenko Y., Jacobs B., Lindsay S.* Atomic force microscopy of reovirus dsRNA: a routine technique for length measurement // *Nucl. Acids Res.*—1992.—20, N 15.—P. 3983—3986.
 16. *Van der Werf K., Putman C., Grooth B., Greve J.* Adhesion force imaging in air and liquid by adhesion mode atomic force microscopy // *J. Appl. Phys. Lett.*—1994.—65.—P. 1195—1197.
 17. *Knapp D. R.* Handbook of analytical derivatization reactions.—New York: John Wiley and Sons, 1991.—540 p.
 18. *Tsukruk V., Bliznyuk V.* Adhesive and friction forces between chemically modified silicon and silicon nitride surfaces // *Langmuir*.—1998.—14.—P. 446—455.
 19. *Vezenov D., Noy A., Rozsnyai L., Lieber C.* Force titrations and ionization state sensitive imaging of functional groups in aqueous solutions by chemical force microscopy // *J. Amer. Chem. Soc.*—1997.—119.—P. 2006—2015.
 20. *Zhang H., He H., Wang J., Mu T., Liu Z.* Force titration of amino group — terminated self-assembled monolayers using chemical force microscopy // *Appl. Phys.*—1998.—A66.—P. S269—S271.
 21. *Butt H.* Measuring electrostatic, van der Waals, and hydration forces in electrolyte solutions with an atomic force microscope // *Biophys. J.*—1991.—60.—P. 1438—1444.

УДК 678.046.365:577.323
Надійшла до редакції 03.08.2000