

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ «ФЕДЕРАЛЬНЫЙ  
НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР «КРИСТАЛЛОГРАФИЯ И  
ФОТОНИКА» РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК»

*На правах рукописи*

БОЙКОВА АНАСТАСИЯ СЕРГЕЕВНА

**ФОРМИРОВАНИЕ ТОНКОПЛЕНОЧНЫХ УПОРЯДОЧЕННЫХ  
БЕЛКОВЫХ СТРУКТУР ИЗ ПОЛИДИСПЕРСНЫХ  
КРИСТАЛЛИЗАЦИОННЫХ РАСТВОРОВ ЛИЗОЦИМА**

Специальность 01.04.07 – «Физика конденсированного состояния»

Диссертация на соискание ученой степени  
кандидата физико-математических наук

Научный руководитель:  
член-корреспондент РАН, профессор,  
доктор физико-математических наук  
Ковальчук Михаил Валентинович

Москва 2019

**ОГЛАВЛЕНИЕ**

ВВЕДЕНИЕ .....	5
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	13
1.1. Методы получения белковых пленок.....	16
1.1.1. Адсорбция на границах раздела .....	17
1.1.2. Ленгмюровская технология .....	20
1.1.3. Послойное формирование .....	28
1.1.4. Самоорганизующиеся монослои .....	32
1.1.5. Иммобилизация, основанная на ковалентном связывании .....	35
1.2. Методы исследования органических пленок и тонких слоев.....	38
1.2.1. Рентгеновская рефлектометрия .....	38
1.2.2. Стоячие рентгеновские волны в области полного внешнего отражения .....	51
1.2.3. Геометрия скользящего падения рентгеновского излучения.....	60
1.3. Исследование тонких пленок и монослоев на основе белка лизоцима.....	64
1.4. Исследование влияния, оказываемое осадителем, на структуру раствора лизоцима и других белков .....	69
1.5. Заключение .....	72
ГЛАВА 2. МЕТОДИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ.....	75
2.1. Методика получения образцов .....	75
2.1.1. Приготовление растворов.....	75
2.1.2. Формирование ленгмюровских монослоев и получение белковых пленок на твердых подложках.....	76
2.2. Методика проведения исследований белковых пленок на твердых подложках.....	78
2.2.1. Рентгеновская рефлектометрия .....	78

2.2.2. <i>Стоячие рентгеновские волны в области полного внешнего отражения.</i> .....	79
2.2.3. <i>Атомно-силовая микроскопия</i> .....	80
2.3. Методика проведения исследования белковых монослоев на поверхности жидкости.....	81
2.3.1. <i>Формирование монослоев лизоцима</i> .....	81
2.3.2. <i>Исследование монослоев лизоцима на поверхности жидкости методом стоячих рентгеновских волн в области полного внешнего отражения</i> .....	82
2.4. Методика изучения структуры белковых растворов методом малоуглового рассеяния рентгеновского излучения .....	83
2.5. Заключение .....	86
ГЛАВА 3. СТРУКТУРА ПЛЕНОК ЛИЗОЦИМА НА ТВЕРДЫХ ПОДЛОЖКАХ, ПОЛУЧЕННЫХ С ПОМОЩЬЮ МОДИФИЦИРОВАННОГО МЕТОДА ЛЕНГМЮРА-ШЕФФЕРА ИЗ МОНОДИСПЕРСНОГО И ПОЛИДИСПЕРСНОГО РАСТВОРА БЕЛКА С ДОБАВЛЕНИЕМ ОСАДИТЕЛЯ ХЛОРИДА НАТРИЯ....	
3.1. Подготовка образцов.....	88
3.2. Результаты измерений методом рентгеновской рефлектометрии.....	90
3.3. Результаты измерений методом атомно-силовой микроскопии.....	94
3.4. Результаты измерений методом стоячих рентгеновских волн в области полного внешнего отражения.....	95
3.5. Модифицированный метод Ленгмюра-Шеффера для формирования белковых пленок на твердых подложках .....	97
3.6. Заключение .....	99
ГЛАВА 4. СТРУКТУРА ЛЕНГМЮРОВСКИХ МОНОСЛОЕВ ЛИЗОЦИМА НА ПОВЕРХНОСТИ ЖИДКОСТИ, СФОРМИРОВАННЫХ ИЗ МОНОДИСПЕРСНОГО И ПОЛИДИСПЕРСНОГО РАСТВОРА БЕЛКА С ДОБАВЛЕНИЕМ ОСАДИТЕЛЯ ХЛОРИДА КАЛИЯ.....	
	100

4.1. Результаты исследования структуры растворов лизоцима с осадителем хлоридом калия методом малоуглового рассеяния рентгеновских лучей.....	100
4.2. Результаты исследования ленгмюровского монослоя лизоцима, сформированного из полидисперсного раствора, методом стоячих рентгеновских волн в области полного отражения.....	106
4.3. Заключение .....	118
ГЛАВА 5. СТРУКТУРА ПЛЕНОК ЛИЗОЦИМА, ПОЛУЧЕННЫХ ИЗ МОНОДИСПЕРСНОГО РАСТВОРА И ПОЛИДИСПЕРСНОГО РАСТВОРА БЕЛКА С ДОБАВЛЕНИЕМ ОСАДИТЕЛЯ KI (В УСЛОВИЯХ КРИСТАЛЛИЗАЦИИ ЛИЗОЦИМА МОНОКЛИННОЙ СИНГОНИИ) НА ТВЕРДЫХ ПОДЛОЖКАХ. ....	
5.1. Подготовка образцов.....	120
5.2. Результаты измерений методом рентгеновской рефлектометрии.....	122
5.3. Результаты измерений методом стоячих рентгеновских волн в области полного внешнего отражения.....	123
5.4. Заключение .....	124
ВЫВОДЫ И ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ РАБОТЫ.....	125
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	127

## ВВЕДЕНИЕ

Важность экспериментального изучения физических состояний конденсированных веществ различной природы (как неорганических, так и органических соединений) и переходов между этими состояниями определяется их применением в различных областях науки и техники. Особенно могут быть подвержены таким переходам вещества биологического происхождения, в частности, белки, физическое поведение которых определяется сложностью их молекулярного строения. Изучение поведения таких сложномолекулярных объектов, состоящих из множества белковых молекул, и переходов между физическими состояниями остается малоизученной областью в современной физике конденсированного состояния. Изучение экспериментального состояния биоорганических систем позволит разработать методики, позволяющие внедрить сложные молекулярные объекты в технологические приложения.

Благодаря технологической революции, приведшей к развитию твердотельной микроэлектроники, и появлению методов, позволяющих изучать биологические объекты на молекулярном уровне, стало возможным соединение технологической базы неорганической микроэлектроники с биомолекулами, такими как белки. Такое совмещение дает возможность конструировать материалы нового типа – гибридные системы, основанные на сочетании неорганической и органической частей. В настоящее время создание таких гибридных структур и материалов на их основе является одной из ключевых задач во многих отраслях, связанных с безопасностью человека и экосистем, фармацевтикой и медицинской диагностикой.

К настоящему времени успешно спроектированы и реализованы в виде устройств системы, где белки на подложках используются в качестве функциональных единиц в биосенсорах, в которых молекулы белков организованы в виде слоевого ансамбля на подложке. Однако физическое поведение подобного молекулярного ансамбля, в котором функционируют одновременно множество отдельных белковых молекул, может быть чрезвычайно неустойчивым и зависящим от множества внешних факторов. В большей части

подобных устройств молекулы белка организуются в молекулярный слой на подложке из жидкой неупорядоченной среды - белкового раствора, в котором они пребывают в виде отдельных молекул. Экспериментальное состояние молекул белка в растворе таким образом будет определять и структуру получаемой пленки, в связи с чем в такой пленке, как и в растворе, также будет отсутствовать упорядоченность. Здесь ключевую роль играет раздел физики конденсированного состояния, исследующий природу преобразования вещества в процессе перехода от жидкой фазы к образованию упорядоченных пленочных структур. При этом наименее изученным остаются переходные состояния конденсированной среды. Ранее на примере низкомолекулярных органических соединений было показано, что использование упорядоченных полимерных пленок для создания ряда фотовольтаических материалов по сравнению с неупорядоченными способно значительно повысить их эффективность. Это позволяет предположить, что эффективность биосенсорных устройств можно повысить, применяя для их создания упорядоченные белковые пленки. По этой причине развитие новых подходов для получения упорядоченных белковых пленок является актуальной задачей на сегодняшний момент и в целом будет важным этапом на пути создания биоорганических гибридных систем.

Для получения слоистых систем на основе органических молекул в настоящий момент широко используется ленгмюровская технология, в которой для организации пленки предполагается использование монодисперсного раствора вещества. Формирование упорядоченных белковых слоев представляет более трудоемкую задачу по сравнению с получением упорядоченных пленок из простых соединений ввиду того, что структура белковых молекул чрезвычайно чувствительна к изменениям внешних условий. При этом для формирования белковой пленки с помощью ленгмюровской технологии так же используют монодисперсный белковый раствор.

Ранее было обнаружено, что в растворе белка лизоцима при добавлении осадителя хлорида натрия (NaCl) в условиях роста кристалла лизоцима тетрагональной сингонии образуются олигомерные частицы лизоцима, которые

могут быть элементарными единицами роста будущего кристалла. Было предположено, что эти олигомеры, образующиеся в растворе, можно использовать для получения ленгмюровских монослоев и пленок, и они будут оказывать непосредственное влияние на структуру белковой пленки, полученной из раствора белка с добавлением осадителя.

В настоящей работе был предложен и применен ранее не использованный подход к получению белковых пленок на основе ленгмюровской технологии, основанный на формировании пленок белков из полидисперсного раствора, одним из компонентов которого является предкристаллизационный кластер – белковый олигомер. Изучение особенностей такого перехода молекулярной белковой системы из неупорядоченного раствора (3D системы) в упорядоченную пленку (2D система) является важной задачей фундаментального исследования переходов между физическими состояниями веществ различной природы (в том числе и органических) в современной физике конденсированного состояния.

#### **Цель и задачи работы:**

Целью диссертационной работы является разработка метода формирования тонкопленочных упорядоченных белковых структур на основе ленгмюровской технологии из полидисперсных растворов лизоцима и изучение структурных особенностей полученных пленок.

В соответствии с поставленными целями в работе решались следующие задачи:

1. Получение и исследование структурных характеристик пленок лизоцима на твердой подложке, сформированных как из монодисперсного раствора («классический» метод), так и из полидисперсного раствора белка с добавлением осадителя NaCl («модифицированный» метод);

2. Исследование структуры растворов лизоцима с добавлением осадителя KCl (в условиях роста кристаллов тетрагональной сингонии) методом малоуглового рентгеновского рассеяния;

3. Получение и исследование структурных характеристик монослоев лизоцима на поверхности жидкости, сформированных из полидисперсных растворов с добавлением осадителя KCl;

4. Апробация разработанного метода получения пленок на примере полидисперсных растворов лизоцима в условиях кристаллизации моноклинной сингонии (с осадителем KI).

#### **Научная новизна:**

1. Разработана модификация метода получения ленгмюровских белковых слоев с использованием полидисперсных растворов, содержащих белковые кластеры-олигомеры;

2. Методами рентгеновской рефлектометрии и стоячих рентгеновских волн в области полного внешнего отражения обнаружено специфическое экспериментальное состояние конденсированного вещества на основе кристаллизационного раствора белка лизоцима на поверхности жидкости в ленгмюровской ванне в виде многослойной структуры из слоев белковых молекул и слоев ионов осадителя;

3. Изучена структура пленок типа «белок-осадитель» методами рентгеновской рефлектометрии и стоячих рентгеновских волн в области полного внешнего отражения. Определено, что ионы хлора образуют слой  $\sim 1.0$  нм, который тесно примыкает к пленке на границе раздела жидкость/пленка;

4. Сформирована многослойная структура на основе белка лизоцима и ионов осадителя на твердой подложке из полидисперсных растворов; показано, что ионы осадителя образуют слои на границе раздела воздух/пленка;

5. Установлено, что толщина сформированной белковой пленки на поверхности жидкости и на твердой подложке соответствует диаметру наибольшего олигомера из полидисперсного раствора.

#### **Практическая значимость:**

1. Тонкопленочные структуры нового типа на основе комбинации молекул белков и кремниевой подложки могут быть применены для конструирования



гибридных органо-неорганических систем ввиду однородной структуры белковой пленки высокого качества;

2. Изучение особенностей взаимодействия белковой пленки с пленкой ионов осадителя может дать новую информацию о взаимодействии между молекулами белков и осадителем в растворе (в т.ч. о функционировании белков).

**На защиту выносятся следующие основные результаты и положения:**

1. Модификация ленгмюровской технологии получения белковых пленок за счет использования предварительно сформированного полидисперсного раствора;

2. Данные об образовании специфического экспериментального состояния конденсированного вещества на основе кристаллизационного раствора белка лизоцима на поверхности жидкости в ленгмюровской ванне в виде многослойной структуры из слоев белковых молекул толщиной, соответствующей диаметру октамера лизоцима 6.5 нм и плотностью 0.8 ед. относительно кремниевой подложки, и слоев ионов осадителя толщиной 1.0 нм;

3. Данные о структуре пленки, сформированной из монодисперсного раствора лизоцима, с толщиной 4 нм, соответствующей диаметру мономера лизоцима, и плотностью 0.2 ед. относительно кремниевой подложки;

4. Данные о структуре пленки, сформированной на основе полидисперсного раствора лизоцима (с параметрами для роста кристаллов моноклинной сингонии), на твердой подложке с толщиной 4 нм и плотностью 0.8 ед. относительно кремниевой подложки.

**Личный вклад автора:**

Все результаты, представленные в работе, получены лично автором или при ее непосредственном участии. Автором лично изготовлены все изученные образцы – монослои на поверхности жидкости и белковые пленки на твердых подложках. Автор непосредственно принимала участие в проведении рентгеновских экспериментов в лабораторных условиях и на источниках синхротронного

излучения. Обсуждение результатов и их интерпретация проводились совместно с научным руководителем и с соавторами публикаций.

#### **Достоверность полученных результатов:**

Достоверность представленных в работе результатов подтверждается использованием современных методов расчета и современного программного обеспечения, а также наличием публикаций в рецензируемых научных изданиях и докладами на различных национальных и международных конференциях.

#### **Апробация результатов работы:**

Материалы, вошедшие в диссертационную работу, докладывались на международных и всероссийских конференциях. Работа поддержана Российским фондом фундаментальных исследований (проект № 18-32-00381 мол\_а).

#### **Публикации автора по теме диссертации:**

A1. M.V. Kovalchuk, A.S. **Boikova**, Yu.A. Dyakova, K.B. Ilina, P.V. Konarev, M.A. Marchenkova, Yu.V. Pisarevskiy, P.A. Prosekov, A.V. Rogachev, A.Yu. Seregin. Thin Solid Films. 2019. V. 677. P. 13–21.

A2. **А.С. Бойкова**, Ю.А. Дьякова, К.Б. Ильина, М.А. Марченкова, А.Ю. Серегин, П.А. Просеков, Ю.А. Волковский, Ю.В. Писаревский, М.В. Ковальчук. Кристаллография. 2018. Том 63. № 5. С. 703–707.

A3. М.В. Ковальчук, **А.С. Бойкова**, Ю.А. Дьякова, М.А. Марченкова, А.М. Ополченцев, Ю.В. Писаревский, П.А. Просеков, А.Ю. Серегин. Кристаллография. 2017. Том 62. № 4. С. 650–656.

A4. Патент на изобретение № 2672410 (дата государственной регистрации 14.11.2018). М.В. Ковальчук, Ю.В. Писаревский, Ю.А. Дьякова, М.А. Марченкова, П.А. Просеков, А.Ю. Серегин, **А.С. Бойкова**, «Способ получения упорядоченных пленок лизоцима на твердых подложках в ленгмюровской ванне».

#### **Доклады на семинарах и конференциях:**

- А.С. Бойкова, К.Б. Ильина, М.А. Марченкова, А.Ю. Серегин, А.В. Рогачев, Ю.А. Дьякова, Ю.В. Писаревский, М.В. Ковальчук «Структурные особенности ленгмюровского слоя белка лизоцима, сформированного из

полидисперсного раствора на поверхности жидкости», VIII Международная конференция по фотонике и информационной оптике (Москва, 23 – 25 января 2019 г.).

- A.S. Boikova, M.A. Marchenkova, Yu.A. Dyakova, K.B. Ilina, A.Yu. Seregin, Yu.V. Pisarevsky, A.V. Rogachev, M.V. Kovalchuk «The advantages of the GI-XSW technique for investigation of protein langmuir monolayers formed from the polydisperse solutions», International conference and satellite school «Biomembranes 2018» (Dolgoprudny, Russia, 1 – 5 October 2018).

- M.A. Marchenkova, A.S. Boikova, Yu.A. Dyakova, K.B. Ilina, P.V. Konarev, A.E. Kryukova, Yu.V. Pisarevskiy, P.A. Prosekov, A.V. Rogachev, A.Yu. Seregin and M. V. Kovalchuk «Structural characteristics of lysozyme langmuir layers grown from an oligomeric mixture formed in the early stages of lysozyme crystallization», 14th Biennial Conference of High Resolution X-ray Diffraction and Imaging XTOP 2018 (Bari, Italy, 3 – 7 September 2018).

- А.С. Бойкова, Ю.А. Дьякова, М.А. Марченкова, К.Б. Ильина, А.Ю. Серегин, П.А. Просеков, Ю.В. Писаревский, М.В. Ковальчук «Модификация метода Ленгмюра–Шеффера для получения упорядоченных белковых пленок», VII Международная молодежная научная школа-конференция «Современные проблемы физики и технологий» (г. Москва, 16 – 21 апреля 2018 г.).

- A.S. Boikova, Yu.A. Dyakova, K.B. Ilina, M.A. Marchenkova, P.A. Prosekov, A.Yu. Seregin, Yu.V. Pisarevsky, M.V. Kovalchuk, «Modification of the Langmuir–Schaefer Method for Fabrication of Ordered Protein Films» / European XFEL Users' Meeting and Satellite Meetings (Hamburg, Germany, 24 – 26 January 2018).

- A.S. Boikova, K.B. Ilina, Y.A. Dyakova, M.A. Marchenkova, P.A. Prosekov, A. Yu. Seregin, A.E. Blagov, Yu.V. Pisarevsky, M.V.Kovalchuk «New Approach To Ordered Protein Films Formation», RACIRI Summer School 2017. (Ronneby, Sweden 19 – 26 August 2017).

- M.A. Marchenkova, A.S. Boikova, Yu.A. Dyakova, A.M. Opolchentsev, P.A. Prosekov, Yu.V. Pisarevsky, A.Yu. Seregin, M.V. Kovalchuk «A New Approach

to Ordered Protein Films Formation», ECS4 - 4th European Crystallography School (Warsaw, Poland, 2 – 7 July 2017).

- А.Е. Благов, А.С. Бойкова, Ю.А. Волковский, Ю.А. Дьякова, К.Б. Ильина, М.А. Марченкова, Ю.В. Писаревский, П.А. Просеков, М.В. Ковальчук «Методика in situ исследования образования упорядоченных белковых структур», Первый Российский кристаллографический конгресс (Москва, 21 – 26 ноября 2016 г.).

- A.S. Boikova, K.B. Iina, Y.A. Dyakova, M.A. Marchenkova, P.A. Prosekov, A. Yu. Seregin, A.E. Blagov, Yu.V. Pisarevsky, M.V.Kovalchuk «In Situ investigation technique of protein ordered structures formation», RACIRI Summer School 2016 (Repino, Russia, 21 – 28 August 2016).

#### **Структура и объем диссертации:**

Диссертация состоит из введения, 5 глав, выводов и списка цитируемой литературы. Объем диссертации составляет 137 страниц, включая 48 рисунков, 2 таблицы и список литературы из 180 наименований.

## ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

В настоящее время стремительно растет интерес к использованию гибридных органо-неорганических структур и материалов для создания новых устройств микроэлектроники, солнечных элементов, химических и биохимических сенсоров [1–3]. Такие устройства на основе органических молекул могут обладать лучшими функциональными характеристиками по сравнению с неорганическими материалами и при этом быть более дешевыми и экологически чистыми в производстве [4]. Уже сейчас органические молекулы успешно используются как компоненты в электронных устройствах, сенсорах, дисплеях и в ряде фотовольтаических устройств [5–8]. За последние десятилетия удалось добиться значительного прогресса в мониторинге загрязнения окружающей среды, пищевой и текстильной промышленности и медицинской диагностике благодаря развитию органической базы, совершенствованию матриц, уменьшению времени отклика и размеров системы.

В связи со стремительным развитием методов, позволяющих исследовать структуру биологических молекул на атомном уровне [9–11], представляется перспективным совмещение неорганических компонент, являющихся основой современных устройств твердотельной микроэлектроники, с биоорганическими молекулами. Такое совмещение открывает путь к конструированию не просто гибридных систем, а устройств нового типа, которые смогут воспроизводить процессы, происходящие в живых организмах и имеющие место в целом в природе.

Одними из самых перспективных кандидатов среди биологических молекул для использования в создании биосенсорных устройств являются молекулы белков. Белки являются наиболее широко изученным классом биологических молекул и остаются перспективными на сегодняшний момент ввиду широкого набора функций, выполняемыми ими в живых системах. Так, предполагается, что в человеческом организме существуют не менее 20 000 белков, выполняющих различные функции [12]. Самый многообразный и наиболее высокоспециализированный класс составляют белки, которые обладают

каталитической активностью, так называемые ферменты (или энзимы). Также существуют белки, выполняющие транспортные функции (к их числу относятся, например, гемоглобин, связывающий кислород и доставляющий его к периферическим тканям), сократительные и двигательные белки, дающие возможность клетке передвигаться или менять форму. К их числу относятся белки актин и миозин, участвующие в сокращении мышц, эластомерный белок ризелин, механические свойства которого позволяют некоторым видам насекомых совершать прыжки, в несколько раз превышающих их собственный размер [13]. К числу других важнейших классов белков относятся структурные белки, придающие прочность биологическим объектам (например, фибриллярный белок коллаген), а также защитные белки (антитела) и регуляторные (рецепторные) белки, участвующие в регуляции клеточной или физиологической активности (некоторая часть гормонов человека). Как можно видеть, свойства молекул белков чрезвычайно многообразны, что делает их объектами пристального изучения до сих пор.

Особо привлекательно с точки зрения использования белков в биосенсорной технологии являются их функции, связанные с передачей и обработкой сигналов как внутри клетки, так и при взаимодействии клеток друг с другом и с окружающей средой. В большинстве случаев передача сигналов происходит с помощью последовательных биохимических реакций, осуществляемых ферментами. Такой класс, как рецепторные белки, способны специфически связывать молекулы, несущие различные сигналы для клетки, а также могут реагировать на изменение внешних факторов путем конформационных изменений, индуцируемых внешним сигналом (к числу таких белков можно отнести зрительный белок хромопротеин родопсин, что делает его кандидатом на использование в сенсорных устройствах, имитирующих зрительные процессы [14].

За последние два десятилетия многое было известно о механизме восприятия запаха в биологических системах. Обладая знаниями о функционировании обонятельной системы и методах экспрессии белков - биологических рецепторов,

становится возможным их использование для имитации работы обонятельной системы. Устройство, которое называется «биоэлектронный нос», выполняет функцию, аналогичную системе восприятия запаха человеком, может быть реализовано путем сочетания обонятельных клеток или рецепторов с достижениями нанотехнологий [15]. После выяснения механизма обоняния в начале 1990-х годов были проведены обширные исследования по разработке электронных устройств, которые имитируют функцию носа животных. Большинство устройств состоит из нескольких датчиков, которые реагируют на химические соединения. Однако электронные устройства имеют ограничения с точки зрения чувствительности и селективности. По этой причине была предложена новая концепция сенсорных устройств, функционирующих на основе биомолекул. Биоэлектронный нос обычно состоит из первичных и вторичных преобразователей. Первичный преобразователь является биологическим элементом распознавания, таким как обонятельный рецептор (ОР) или клетки, экспрессирующие их на своей поверхности. Вторичный преобразователь – это высокочувствительная оптическая или электронная сенсорная платформа, которая преобразует биологические процессы в измеримые сигналы. Поскольку ОР обеспечивают способность распознавать запахи, биоэлектронный нос может близко имитировать обонятельную систему человека или животного. Концепция анализа одорантов с использованием биоэлектронного носа принципиально отличается от стратегии детектирования запахов с использованием электронных устройств, которые основаны исключительно на распознавании модельных веществ с использованием матричных элементов. При использовании ОР в качестве первичного чувствительного материала сенсоры могут точно различать целевую молекулу среди смеси различных соединений. Кроме того, сенсоры на основе ОР более чувствительны, чем электронные датчики. Благодаря таким характеристикам биоэлектронный нос в настоящее время является перспективным элементом в различных областях, таких как диагностика заболеваний, оценка безопасности пищевых продуктов и мониторинг окружающей среды [16].

В технологии конструирования биосенсорных устройств на основе белков и ферментов основные усилия исследовательских групп сконцентрированы на возможностях сохранения конформации молекул и контроля их каталитической активности, большое влияние на которые оказывает интерфейс между твердотельной подложкой и макромолекулой. Важность осуществления такого контроля привела к развитию эффективных техник иммобилизации, пригодных к осаждению и закреплению молекул к поверхности подложки с сохранением их биологической активности. Интерфейс должен быть подобран таким образом, чтобы передача сигнала могла осуществляться максимально быстро и эффективно. Наиболее подходящим вариантом организации интерфейса представляется организация молекул белков в виде двумерного слоя, что позволяет увеличивать площадь контакта с внешней средой и воздействующими факторами [17].

Ранее на примере низкомолекулярных органических соединений было показано, что использование упорядоченных полимерных двумерных структур для создания ряда фотовольтаических материалов способно значительно повысить их эффективность [18]. Это позволяет предположить, что эффективность биосенсорных устройств можно повысить, применяя для их создания упорядоченные белковые пленки.

Получение планарных белковых гибридных систем, представляющих из себя ансамбли биомолекул в виде двумерной структуры на твердых поверхностях, является важной задачей для конструирования сенсорных систем, обладающих специфической чувствительностью, свойственной молекулам белков и ферментов. Связи с этим возникает задача, касающаяся поиска наиболее эффективных методов получения упорядоченных белковых планарных структур и способов осаждения такой системы на твердые подложки.

### **1.1. Методы получения белковых пленок**

На сегодняшний момент можно выделить несколько методов получения ансамбля молекул белков в виде пленки на твердой подложке. Среди них наиболее широко применяемыми являются методы, основанные на



адсорбционных свойствах молекул белков и поверхностей (куда, в частности, входят адсорбция на различных границах раздела и ленгмюровская технология), методы послойной сборки, методы самосборки, методы химического связывания и др. У каждого из них есть как преимущества, так и недостатки, и выбор каждого конкретного метода зависит от условий поставленной задачи и требуемых структуры и свойств будущего материала.

### *1.1.1. Адсорбция на границах раздела*

Адсорбция белков на твердых поверхностях является одним из наиболее широко используемых методов получения белковых пленок. Данный метод имеет важное медицинское значение в связи с изучением адсорбционных свойств биоимплантов и созданием биосенсоров; также он применяется в пищевой промышленности.

Адсорбция белковых молекул на твердых поверхностях является активно изучаемой областью на протяжении последних нескольких десятков лет. Этот возросший интерес обусловлен не только вопросом усовершенствования элементарной базы биосенсорных устройств, но и нуждами современной биомедицины. Некоторые процедуры предполагают осуществление контакта разрабатываемого материала с кровью и с другими биологическими жидкостями, что является важным вопросом при создании искусственных имплантов и других фармацевтических применений.

Достаточно большое число работ посвящено исследованию явления адсорбции в целом и конкретных аспектов, влияющих на структуру формируемых на границе раздела пленок и стабильность молекул. К числу таких аспектов относятся гидрофобные свойства поверхности, зависимость от pH среды, ионной силы, изменение концентрации белка, температура, присутствие в растворе различных добавок [19–25]. Такое обилие исследуемых параметров возникает в связи с тем, что адсорбция белковых макромолекул является сложным комплексным процессом, который управляется различными силами, такими как силы Ван-дер-Ваальса, гидрофобные и электростатические взаимодействия.

В данном методе процесс формирования осуществляется путем соприкосновения поверхности подложки с жидкой средой, в которой растворены биомолекулы. Более упрощенный вариант создания такого контакта обеспечивается посредством погружения подложки в раствор, в котором молекулы белка пребывают в требуемом состоянии (рис. 1.1). Чаще всего такой средой является буферный раствор белка, обеспечивающий стабильность молекулы. Время нахождения подложки в растворе белка может варьироваться от нескольких минут до нескольких часов в зависимости от свойств подложки и белка.

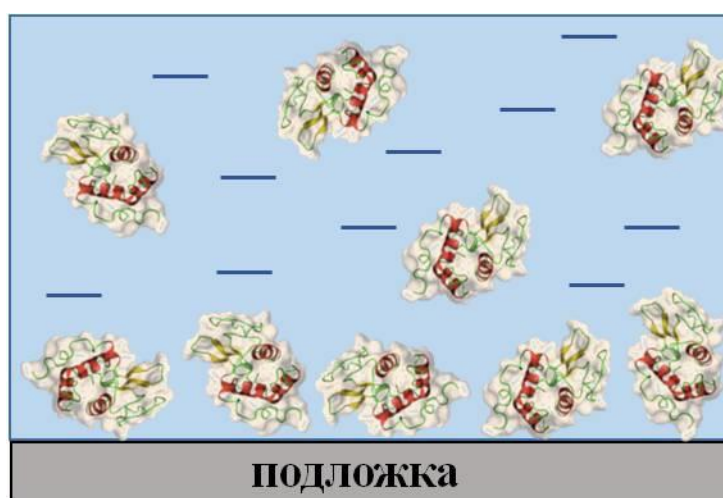


Рис. 1.1. Модель получения белковой пленки на твердой подложке с помощью адсорбции.

При соприкосновении неорганической подложки с биологическими веществами адсорбция белков чаще всего происходит мгновенно. В связи с этим много усилий исследователей направлено на исследование поведения белковых молекул при контакте с различными твердыми поверхностями. И, несмотря на то, что, как ранее показывали, количество белка, адсорбирующееся на твердой подложке, сильно зависит от взаимодействия между поверхностью и белком, степень адсорбции также может легко изменяться в результате смещения баланса различных сил, оказывающих влияние на адсорбцию [26].

В качестве основной проблемы, возникающей при формировании молекулярных слоев в процессе адсорбции, можно указать необходимость контролирования ориентации молекул, на которую оказывает влияние большое

число параметров. Поэтому по большей части выяснение ориентации молекул в получаемой пленке проводится после ее формирования путем сравнения экспериментально получаемой величины покрытия поверхности белковым слоем с теоретическим значением поверхностного покрытия монослоя с определенной ориентацией [27,28]. Другой вариант заключается в измерении толщины белковой пленки и ее сопоставление с размерами молекулы белка.

Ориентация молекул играет важную роль в создании биосенсоров, так как при использовании ферментов главной проблемой является поиск условий для правильной ориентации каталитически активного ферментного центра, что напрямую влияет на функциональные свойства создаваемого устройства.

Большое влияние на процесс формирования белковых слоев может оказывать присутствие в растворе различных добавок, оказывающих влияние на стабильность молекул белка и величину покрытия поверхности белковым слоем [24,29,30]. Так, в нескольких работах было показано, что в присутствии таких добавок, как соли неорганических кислот, являющихся электролитами и способными оказывать влияние на растворимость белка, в процессе адсорбции могут формироваться многослойные пленки [21,31,32].

Сильное взаимодействие между молекулами белка и твердой поверхностью часто приводит к необратимой адсорбции, которая во многих случаях отмечается разрушением вторичной и третичной структуры, тем самым вызывая денатурацию белковой молекулы. Природа подложки, включая степень ее гидрофобности, тип заряда и плотность оказывают наиболее сильное влияние на структуру и конформационное состояние сформированных белковых слоев, однако это влияние в большей части осложняется и поверхностными свойствами самих белковых молекул.

Наиболее удобными объектами для изучения адсорбционных свойств являются глобулярные белки, то есть такие, в которых полипептидные цепи плотно свернуты в объеме, что делает такую молекулу относительно стабильной. Это свойство предотвращает полный распад белковой молекулы на поверхности подложки в случайную структуру. Так как пространственные размеры ряда

глобулярных белков достаточно хорошо известны, то, измерив толщину адсорбированного слоя, можно определить ориентацию молекул в слое и понять, происходят ли конформационные изменения в структуре белковой молекулы.

Тем не менее, адсорбционный метод формирования белковых пленок на границе раздела жидкость/подложка имеет недостатки, одним из которых является проблема контроля толщины осаждаемого на подложку слоя. Адсорбция из водной среды приводит к формированию белковых слоев и многослойных пленок на их основе, структура которых, включая ориентацию и положение молекул относительно друг друга в слое, остается неизвестной, и по этой причине упорядоченность в такой пленке может отсутствовать. В связи с этим требуется применение других методик получения белковых пленок с возможностью контроля толщин и структуры получаемых слоев.

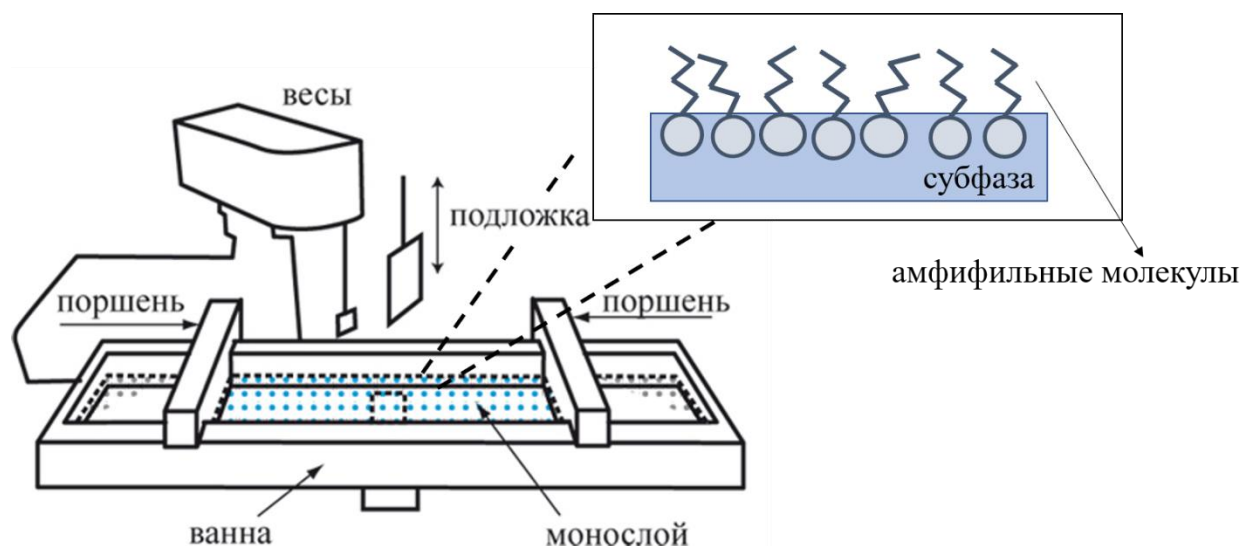
### *1.1.2. Ленгмюровская технология*

Ленгмюровская технология (технология Ленгмюра-Блоджетт/Ленгмюра-Шеффера, ЛБ/ЛШ-технология) позволяет контролируемо получать упорядоченные тонкие слои из органических молекул. Основное преимущество данного метода заключается в том, что, в отличие от адсорбции, он позволяет создавать структуры с определенной заданной геометрией путем контроля толщины и ориентации молекул в монослое [33].

Основная заслуга в развитии данной технологии принадлежит И. Ленгмюру и его ученице К. Блоджетт [34–38]. Идея метода заключается в формировании на водной поверхности или водного раствора (субфазы) мономолекулярного слоя амфифильного органического вещества с последующим переносом сформированных слоев на твердую подложку, в результате чего образуется упорядоченная органическая пленка [39]. Стоит отметить, что ленгмюровская технология является более частным случаем адсорбции, так как она основана на адсорбционных свойствах, то есть на нековалентном связывании молекул амфифильного вещества и подложки.

При оптимизации всех параметров, влияющих на формирование органической пленки, данная технология является одной из самых многообещающих для

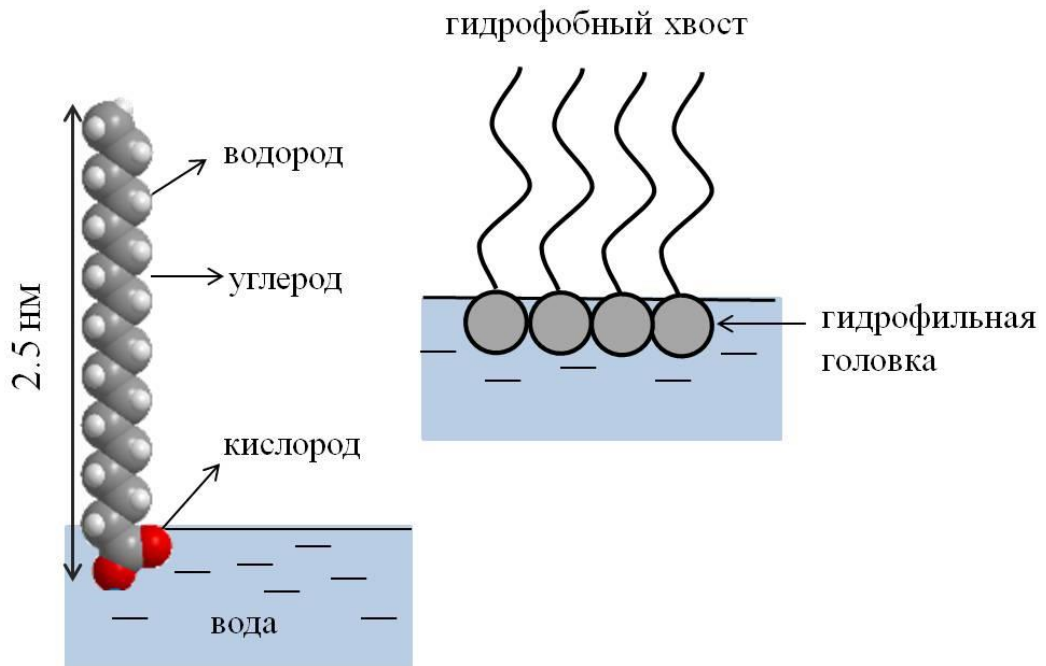
приготовления тонких пленок из амфифильных молекул, так как она позволяет с высокой точностью контролировать толщину монослоя, его гомогенность, а также дает возможность переносить монослои практически на любую твердую поверхность.



*Рис. 1.2. Принципиальная схема формирования ленгмюровских пленок на поверхности жидкой субфазы и переноса на подложки в технологии Ленгмюра-Блоджетт.*

Формирование монослоев амфифильных молекул на поверхности жидкости проводят с помощью ленгмюровской ванны (рис. 1.2). На поверхность водной субфазы помещается капля поверхностно-активного вещества (ПАВ) в органическом испаряющемся растворителе (например, хлороформе). Благодаря особенностям своего строения молекулы амфифильного соединения (рис. 1.3) не тонут в воде и ориентируются относительно поверхности таким образом, что гидрофильная часть оказывается погруженной в воду, а гидрофобная, наоборот, направлена в воздушную среду.

Следующим этапом является формирование конденсированного монослоя с помощью подвижных барьеров, который осуществляется за счет уменьшения рабочей площади поверхности субфазы.



*Рис. 1.3. Модель молекулы типичного амфифильного соединения (в качестве примера приведена молекула жирной кислоты).*

Пусть в монослое площадью  $A$  содержится  $N_s$  молекул, которые располагаются в монослое далеко друг от друга настолько, что их можно считать невзаимодействующими. Тогда эти молекулы можно считать идеальным газом и к их описанию можно применить двумерный аналог уравнения Менделеева-Клапейрона:

$$PV = Nk_B T \text{ – трехмерный идеальный газ} \quad (1.1)$$

$$\pi V = N_s k_B T \text{ – двумерный идеальный газ} \quad (1.2)$$

Зная полное число амфифильных молекул и регистрируя значения площади, занимаемой монослоем при движении барьера, можно построить изотерму сжатия в координатах  $\pi - A$ , то есть зависимость размера площади, приходящейся на одну молекулу  $A = \frac{S}{N_s}$ , от поверхностного давления  $\pi$ , которое регистрируется с помощью весов Вильгельми. Состояние монослоя принято характеризовать поверхностным давлением, которое определяется как разность между

поверхностным натяжением  $\sigma_0$  воды и поверхностным натяжением воды, покрытой монослоем  $\sigma$  ( $\sigma < \sigma_0$ ):

$$\pi = \sigma_0 - \sigma, \quad (1.3)$$

Изотерма сжатия ( $\pi - A$  изотерма) будет содержать информацию о межмолекулярном взаимодействии в монослое и о специфике поведения сложной амфифильной молекулы на поверхности субфазы, происходящие в процессе изменения поверхностного давления.

В общем случае в процессе сжатия монослой претерпевает цепочку последовательных фазовых превращений (*рис. 1.4*). При очень малых поверхностных давлениях молекулы амфифильного вещества не взаимодействуют друг с другом, что позволяет представлять монослой в виде двумерного идеального газа (*участок 1 на рис. 1.4*). Увеличение поверхностного давления приводит к переходу из газообразной фазы в изотропно-жидкую фазу (*участок 2 на рис. 1.4*). В этой фазе молекулы уже начинают оказывать сильное взаимодействие друг на друга, но их упорядоченность практически отсутствует, и углеводородные хвосты становятся хаотично ориентированными. При дальнейшем перемещении барьеров состояние монослоя переводится в анизотропно-жидкую (жидкокристаллическую) фазу (*участок 3 на рис. 1.4*). В этой фазе углеводородные хвосты ориентированы преимущественно вдоль нормали к поверхности, но при этом все еще сохраняя достаточную гибкость. Дополнительное сжатие монослоя переводит его в двумерное конденсированное состояние (*участок 4 на рис. 1.4*). Ориентация углеводородных хвостов становится строго фиксированной, причем положения атомов в соседних молекулах коррелированы. При дальнейшем сжатии происходит коллапс и, как следствие, разрушение упорядочивания (*участок 5 на рис. 1.4*).

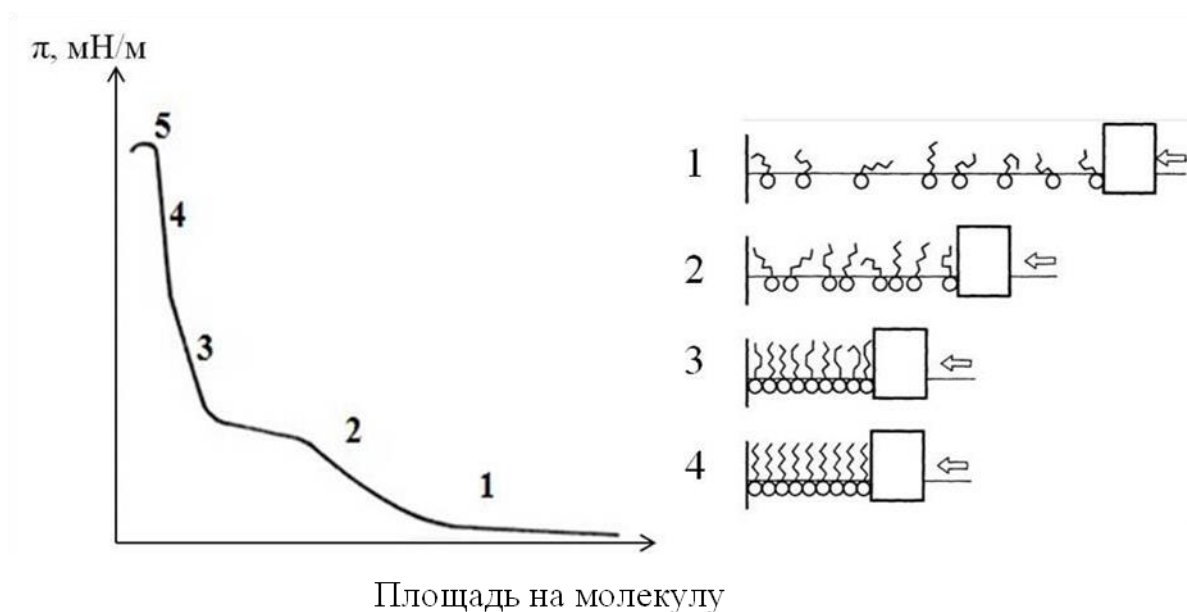


Рис. 1.4. Типичная изотерма сжатия и соответствующие ей состояния монослоя.

Существует несколько способов переноса монослоя с поверхности жидкости на твердые подложки. Самыми распространёнными среди них являются метод Ленгмюра-Блоджет (ЛБ) и метод Ленгмюра-Шеффера (ЛШ) (рис. 1.5).

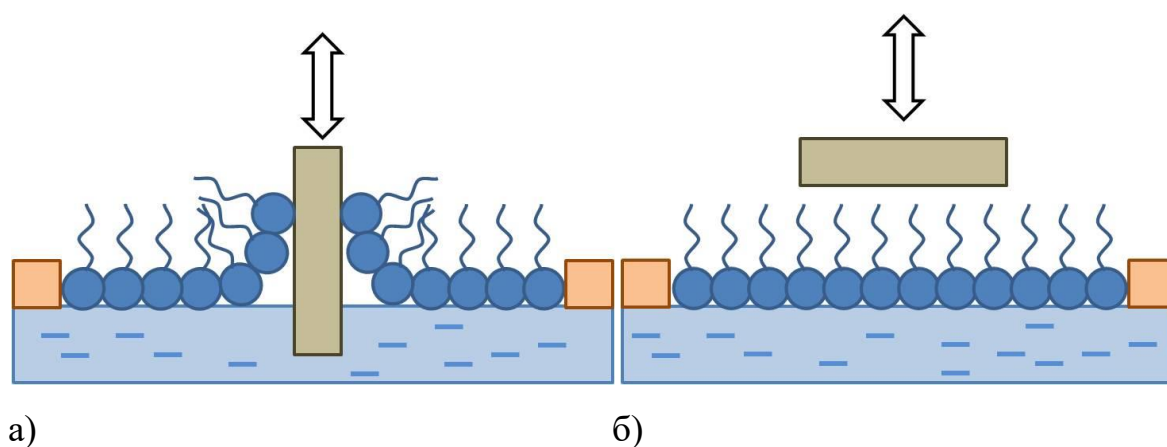


Рис. 1.5. Схемы переноса монослоев на твердые подложки (а) - ЛБ, (б) - ЛШ.

Способ ЛБ заключается в вертикальном перемещении подложки относительно монослоя (рис. 1.5. (а)). Ориентация амфифильных молекул на подложке зависит от того, опускают ли подложку сквозь монослой в субфазу или поднимают из воды в воздух. Второй способ предложен В. Шеффером и заключается в том, что подложка ориентируется практически горизонтальным образом и приводится в соприкосновение с монослоем (рис. 1.5. (б)).



Критерием качества переноса монослоев является коэффициент переноса  $k$ , определяемый по формуле:

$$k = \frac{(S_1 - S_2)}{S_n} \quad (1.4)$$

где  $S_1$  и  $S_2$  – площади монослоя в момент начала переноса и после окончания переноса соответственно,  $S_n$  – площадь подложки. Положительное значение коэффициента переноса означает, что вещество перенеслось на подложку, отрицательное значение указывает, что, наоборот, произошел обратный перенос вещества с подложки.

Значение поверхностного давления, при котором производится перенос, зависит от природы молекул, составляющих монослой, и чаще всего определяется эмпирически. Принято считать, что с помощью ЛБ и ЛШ методов монослой лучше переносить в конденсированной фазе, что повышает эффективность переноса. В таком случае сильная когезия молекул в слое препятствует отрыву монослоя от поверхности подложки в процессе переноса. И, хотя оптимальное значение поверхностного давления сильно зависит от природы составляющих монослой частиц, биологические молекулы редко успешно переносятся при значениях давления ниже, чем 10 мН/м, и выше, чем 40 мН/м, когда происходит коллапс.

Как было ранее замечено, с помощью технологий ЛБ и ЛШ можно формировать органические слои из молекул, которые относятся к классу амфифильных веществ. Самыми простейшими представителями таких веществ являются жирные кислоты, молекулы которых состоят из полярной «головки» и углеводородного неполярного «хвоста». Такие молекулы состоят из двух частей, характеризующихся различным поведением по отношению к воде, что и заставляет их ориентироваться определенным способом.

Белки, несмотря на то, что их молекулу нельзя четко разделить на полярную и неполярную части, тем не менее, имеют в своем составе аминокислотные остатки, которые могут обладать как гидрофобными, так и гидрофильными свойствами.

Именно эти индивидуальные свойства аминокислотных остатков делают молекулы белков амфифильными, из чего следует принципиальная возможность получения монослоев белков.

Самые ранние работы по исследованию поведения монослоев белков были сделаны И. Ленгмюром и В. Шеффером [40–42]. Так, исследуя доступные на тот момент белки, было показано, что их молекулы, наряду с жирными кислотами, также способны формировать монослои на поверхности жидкости. Для переноса на твердые подложки был предложен способ Шеффера, описанный выше и заключающийся в горизонтальном соприкосновении подложки с монослоем. Однако подобные ранние исследования по получению белковых пленок не нашли широкого применения, что, по-видимому, было связано со сложностью процесса очистки и выделения чистого белка.

Однако с развитием методов выделения и очистки и первыми успехами в области расшифровки структуры белковых молекул интерес к продолжению изучения монослоев белков начал возрождаться [43,44].

В целом, оба способа, ЛБ и ЛШ, подходят для переноса белковых монослоев на твердые подложки. Однако подавляющее большинство исследователей сходится во мнении, что горизонтальный перенос методом ЛШ лучше подходит для формирования белковых пленок, так как с помощью него получают более однородные и воспроизводимые слои на подложках [45–50].

При адсорбции глобулярных белков на водной поверхности сразу возникают два существенных вопроса, касающихся взаимодействия субфазы и положения белковой молекулы. Первый вопрос касается возможности поверхности приводить к денатурации белка, а второй вопрос относится к степени погруженности белковой молекулы в субфазу. Благодаря неоднородности распределения полярных, неполярных и заряженных групп поверхность молекулы белка будет содержать области в той или иной степени как гидрофобные, так и гидрофильные. Разница в гидрофобных свойствах будет приводить к проявлению поверхностной активности молекулы глобулярного белка. На водной поверхности белок может адсорбироваться либо гидрофобными участками над поверхностью,

либо в денатурированном состоянии, когда минимизируется его гидрофобная свободная энергия путем сворачивания белка таким образом, чтобы неполярные части избирательно раскрывались наружу. Точное определение ориентации адсорбированного белкового слоя и степень его погруженности в водную субфазу может дать возможность определить, какой из путей наиболее вероятен и тем самым дать информацию об общем соотношении гидрофобных и гидрофильных частей в молекуле.

Так как некоторые белки являются водорастворимыми, то второй существенной проблемой получения монослоев на водной поверхности является возможность диффундирования молекулы белка в глубину субфазы. Чтобы минимизировать этот эффект, для приготовления монослоев можно использовать добавки, которые снижают растворимость белка. Такими добавками чаще всего выступают неорганические соли, являющиеся электролитами, которые при их добавлении в субфазу препятствуют проникновению молекул белка с поверхности вглубь субфазы [51,52].

Помимо формирования монослоя непосредственно на поверхности жидкости белки могут достаточно легко адсорбироваться из водной субфазы в липидный слой, образованный на границе раздела воздух/жидкость. В таком случае белок может быть либо «встроен» в предварительно сформированный монослой, либо белковые молекулы могут взаимодействовать только с полярными группами липидов [53,54]. Другой способ формирования белково-липидных пленок основан на предварительном образовании липидного слоя и его однократном либо многократном переносе на твердую подложку. Далее сформированные однослойные или многослойные пленки ЛБ погружаются в раствор, содержащий молекулы белка, в котором происходит взаимодействие белковых молекул с липидными структурами. В общем случае замечено, что поверхностное давление и состав липидного монослоя (природа функциональных липидных групп) оказывают значительное влияние на адсорбцию белка и на характер его взаимодействия с монослоем [55,56]. В целом, такой способ формирования

является перспективным с точки зрения создания биоподобных белково-липидных мембран и моделирования их поведения [57].

В [58] исследовались ЛБ пленки, сформированные из раствора, содержащего смесь бычьего сывороточного альбумина (БСА) и липида фосфатидилхолина. Было показано, что на структуру белково-липидной пленки большое влияние оказывает значение рН субфазы. Так, в пленке, сформированной при фиксированном давлении и при значении рН, равном изоэлектрической точке белка (ИТ), белковые молекулы проникают в липидный слой и распределяются в нем, не влияя на толщину липидного слоя. В ИТ белок имеет нулевой поверхностный заряд, тем самым он не взаимодействует с липидами. При рН, превышающем ИТ, белок имеет отрицательный заряд, и его молекулы электростатически притягиваются к поверхности липидной пленки, что приводит к увеличению толщины полученной ЛБ пленки.

Обычно при исследовании структуры липидных бислоев (как аналог биоподобной липидной мембраны) их наносят непосредственно на твердую подложку (например, кварц или кремний). Такая система не будет являться идеальной моделью биологической клеточной мембраны, потому как на их поведение и, в частности, на способ взаимодействия их с другими целевыми объектами, будет косвенно влиять электростатическое поле от подложки. Для решения этой проблемы могут быть использованы дополнительно нанесенные на подложку самоорганизующиеся слои [59].

### *1.1.3. Послойное формирование*

Метод послойного формирования («слой за слоем», layer-by-layer, LbL, послойная самосборка), как показывают ранее проведенные исследования, подходит для производства слоистых структур для конструирования таких устройств как сенсоры, фотовольтаические и электрохимические устройства и топливные элементы. Основой данного метода является простое чередование адсорбции комплементарных мультивалентных соединений на подложку через электростатические взаимодействия, водородную связь и другие вторичные взаимодействия [60,61].

Метод послойного формирования был предложен прежде всего в качестве альтернативы таким методам получения многослойных структур, как ЛБ и самоорганизующиеся монослои. Получение пленок ЛБ требует дорогостоящей аппаратуры, и сам этот метод используется преимущественно для осаждения амфифильных соединений, в то время как самоорганизующиеся монослои имеют низкую эффективность получения и применимы только к ограниченному диапазону поверхностей подложки. В противоположность им техника послойного осаждения представляет собой достаточно простой процесс получения слоевых ансамблей на водной основе, в которой отсутствуют жесткие ограничения на выбор осаждаемых веществ и материалу подложек [62].

Электростатическая поэтапная сборка была впервые предложена в 1990-х годах и оказалась возможной для создания упорядоченных многослойных структур путем последовательной адсорбции полианионов и поликатионов [63]. В технике послойного осаждения может быть использовано большое разнообразие материалов, и изготовление пленки выполняется в мягких условиях, что особенно важно для сохранения активности биомолекул.

Вещества, которые могут быть использованы в этой технологии, включают в себя широкий спектр соединений, например, традиционные полиэлектролиты (полимеры, в состав которых входят группы, способные к ионизации в растворе), проводящие полимеры, дендримеры, белки, нуклеиновые кислоты, сахараиды, вирусы частиц, неорганические коллоидные частицы, а также непосредственно пленки ЛБ и липидные мембраны [64]. В большинстве случаев послойное осаждение основывается на электростатических взаимодействиях.

В настоящее время существуют три метода нанесения покрытий с помощью послойного осаждения: погружение, распыление и центрифугирование.

В большинстве случаев формирование покрытий происходит с помощью погружения подложки поочередно в резервуары, каждый из которых содержит определенные контрионы. Данный процесс является относительно простым и не требует специального дорогостоящего оборудования, что делает его широко распространенным. Стандартный эксперимент заключается в последовательном

погружении подложки, на которую требуется нанести покрытие, в сосуды, содержащие типичные полиэлектролиты (рис. 1.6). Процесс повторяется до тех пор, пока не будет достигнуто требуемое количество слоев. Поскольку полиэлектролиты хранятся в индивидуальных резервуарах, то это позволяет точно контролировать их концентрацию, измеряя ее до нанесения и после нанесения. Кроме того, подложка, на которую будет нанесено покрытие, оказывается полностью погруженной в резервуарный раствор, что обеспечивает равномерное покрытие подложки.

Хотя данный способ осаждения является простым, сам процесс нанесения занимает относительно много времени по причине необходимости достижения равновесной адсорбции для каждого этапа погружения, что особенно критично в случае слабо заряженных полиэлектролитов.

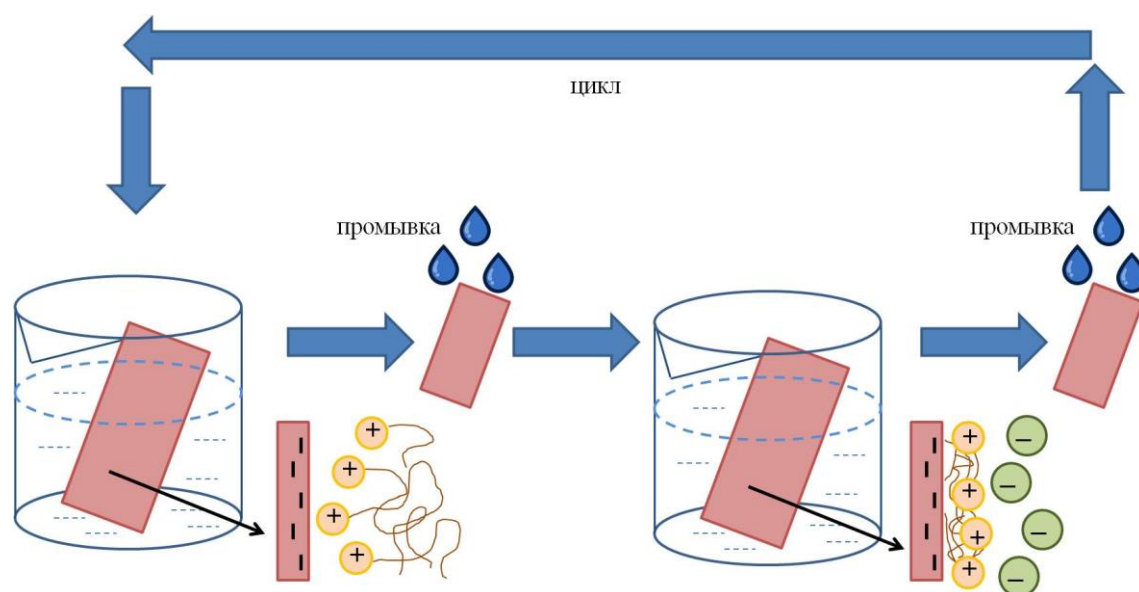
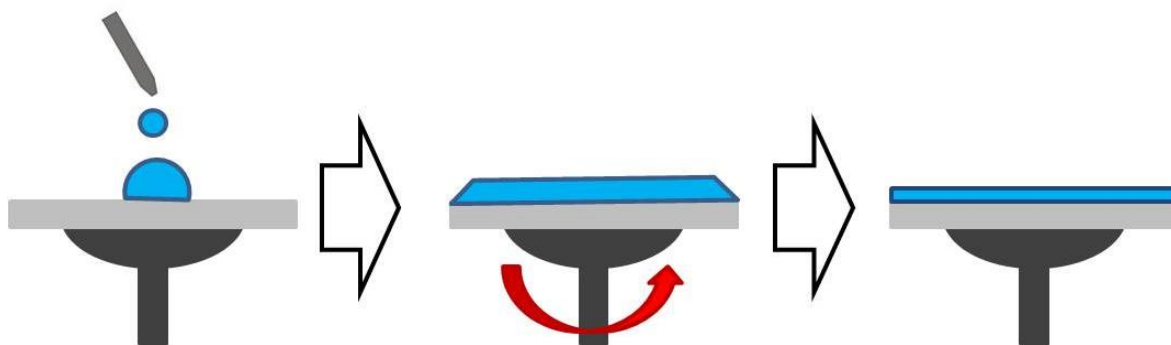


Рис. 1.6. Схема, иллюстрирующая метод послойного осаждения на примере последовательного погружения подложки в резервуары с растворами.

Другим способом осаждения является центрифугирование (англ. «spin-coating»), в котором раствор, содержащий осаждаемое вещество, наносится на плоскую поверхность, которая затем начинает быстро вращаться (рис. 1.7). Удаление жидкости с поверхности подложки происходит при помощи вращательного движения. Толщина получаемой пленки в значительной степени контролируется вязкостью раствора, угловой скоростью и временем, в течение

которого происходит вращение. Процесс протекает достаточно быстро (~ 30 с на один слой), что значительно сокращает время изготовления пленки. Основными недостатками данного способа являются обеспечение гомогенности покрытия поверхностей, которые имеют неправильные формы, а также невозможность осаждения пленок на трехмерные подложки.



*Рис. 1.7. Иллюстрация осаждения раствора с помощью метода центрифугирования.*

Осаждение с помощью распыления имеет много преимуществ по сравнению с погружением и центрифугированием. В отличие от последнего, распыление обеспечивает однородное покрытие трехмерных подложек. Осаждение происходит быстрее, чем при погружении, ускоряя процесс более чем в 250 раз, при этом сохраняя высокое качество покрытия. Осаждение распылением может выполняться без операции промывки, в отличие от погружения. Однако к числу недостатков этого способа можно отнести значительный разброс получаемых профилей осажденных пленок.

Силы, в результате которых происходит формирование многослойных структур, не ограничиваются только электростатическими взаимодействиями. Также могут быть использованы различные взаимодействия, включая взаимодействие типа металл лиганд, водородную связь, перенос заряда и биоспецифическое распознавание [65].

Большинство белков, особенно растворимых в воде, имеют заряженные участки на поверхности их молекулы, и по этой причине адсорбция белков, основанная на электростатическом связывании, используется в методе

последовательного осаждения для построения различных пленочных структур на основе белковых молекул.

С помощью последовательного осаждения получают многослойные глинистые минерально-белковые пленки на основе ряда белков (протамин, лизоцим и папаин). Многослойные структуры, включающие до 15 слоев, осаждались на подложки, сделанные из стекла, кварца и селенида цинка. В таких пленках средняя толщина белковых слоев имела значение, сопоставимое с размером одиночной молекулы белка [66]. Также с помощью последовательного осаждения формировались многослойные структуры на основе белка стрептавидина и сополимера poly(L-lysine-co- $\epsilon$ -biotinyl-L-lysine), в котором также продемонстрировано, что среднее значение толщин белковых пленок, получаемых данным способом, также соответствует размеру одиночной молекулы белка [67].

#### *1.1.4. Самоорганизующиеся монослои*

Самоорганизующиеся монослои (СОМ) представляют собой упорядоченные молекулярные образования, которые формируются самопроизвольно за счет адсорбции молекул поверхностно-активного вещества, головная группа которого обладает определенной спецификой по отношению к подложке [68]. Перспектива использования СОМ обусловлена прежде всего развитием материальной базы современной органической электроники. Одним из основных компонент таких устройств являются органические полевые транзисторы, в которых в качестве проводящего слоя используются органические сопряженные олигомерные и полимерные молекулы, наносимые тонким слоем между электродами [69].

Интерес к общему явлению самоорганизации и, в частности, к СОМ, частично возникает в связи с актуальностью их использования в науке и технике. В отличие от ультратонких пленок, сформированных с помощью, например, молекулярно-лучевой эпитаксии и химического осаждения из газовой фазы, СОМ сильно упорядочены и ориентированы и могут включать широкий диапазон алкильных групп. Широкие возможности химического синтеза позволяют подбирать соединения с требуемым составом для каждой конкретной поверхности.

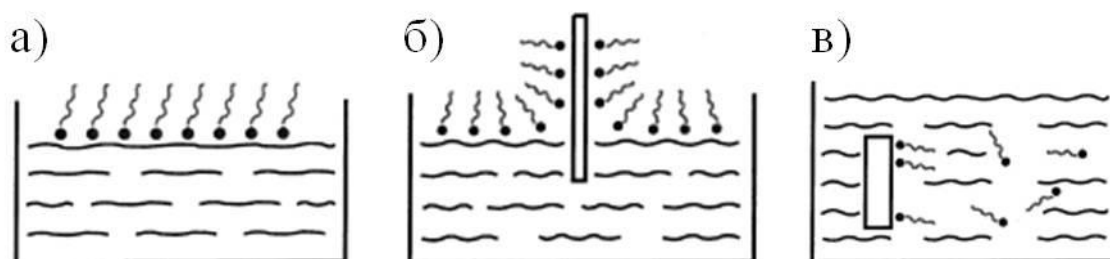


СОМ являются одной из самых простых форм из числа самоорганизующихся веществ. Их конструкция обусловлена термодинамически предпочтительной поверхностной сегрегацией молекул на границе раздела фаз, например, на поверхности твердого тела, контактирующей с жидкостью или другой окружающей средой. Чаще всего СОМ образованы небольшими органическими молекулами, которые обладают амфифильными свойствами и имеют размеры порядка нескольких нанометров. Одним из самых известных примеров самоорганизации молекул в области биологии является клеточная биомембрана, представляющая собой бислой, образованный липидными молекулами. Мембрана является жидкокристаллической структурой, одновременно имея упорядоченность и в то же время сохраняя латеральную подвижность, что делает ее интересным объектом для изучения [70]. Однако построение двухслойной модели такой мембраны и изучение ее свойств затруднено ввиду ее хрупкости и нестабильности, и по этой причине часто исследуются не биомолекулярные, а мономолекулярные липидные слои.

Наилучшими материалами, доступными в настоящее время для изучения, являются монослои, образованные различными серосодержащими органическими соединениями, такими как алкантиолами, на металлических поверхностях, например, Au [71]. Помимо химической природы поверхности, выбор которой определяется свойствами монослоя, также необходимо учитывать кристаллическое состояние и качество субстрата. Металлические монокристаллы очень часто используются для осаждения СОМ, которые представляют собой хорошо разработанные подложки. Более того, они предоставляют возможность свободно выбирать кристаллографическую ориентацию.

Молекулы, используемые в СОМ, как и в случае ленгмюровских монослоев, являются амфифильными, и по этой причине иногда нельзя дать четкое ограничение в их определении (*рис. 1.8*). Ленгмюровские слои находятся на поверхности жидкости и, как правило, относительно слабо связаны с подложкой. Молекулы СОМ находятся на твердых подложках и подвергаются химической сорбции, то есть становятся сильно связанными [68]. Промежуточным случаем

могут быть молекулы на жидкой подложке с сильным взаимодействием, такие как тиолы, самоорганизующиеся на жидкой ртути [72]. При понижении температуры происходит замерзание подложки, что можно рассматривать как переход от ленгмюровского слоя к СОМ.



*Рис. 1.8. Монослои из амфифильных молекул: а) ленгмюровский монослой на поверхности жидкости, б) монослои ЛБ на твердой подложке, в) самоорганизующийся монослой из водной среды [68].*

Существует два способа осаждения СОМ на твердые поверхности. Первым из них и самым простым с технологической точки зрения является осаждение из жидкой среды (рис. 1.8 (в)). Заранее тщательно очищенную подложку погружают в соответствующий раствор на определенный период времени, в течение которого происходит сборка монослоя. Главным требованием в этом случае является химическая чистота раствора осаждаемого соединения, обеспечение которой может быть нетривиальной задачей.

Другим способом является осаждение из газовой фазы, принцип которого также довольно прост. Подложка располагается в камере, обеспечивающей высокий вакуум, которая позволяет проводить очистку поверхности, например, ионным распылением и отжигом, как это делается для монокристаллов металла. Камера оснащается дополнительным клапаном, через который осуществляется подача управляемого потока осаждаемых молекул. Данный способ, несмотря на его простоту, является дорогостоящим по сравнению с осаждением из жидкой фазы, и по этой причине он является менее популярным в использовании.

СОМ-технология обеспечивает мощный инструмент для конструирования монослоев биологических молекул на различных подложках. САМ, собранные из биомолекул, нашли довольно широкое применение в области создания

иммуносенсоров. В качестве функционального элемента биосенсора, обеспечивающего связывание антител, обычно используется белок А. Этот белок часто используется в биохимических исследованиях, так как он обладает способностью хорошо связывать многие иммуноглобулины, в частности, иммуноглобулины класса G.

Для возможности осаждения белковых молекул на твердую поверхность они подвергаются химической обработке, в результате которой к молекуле белка прикрепляется функциональная сульфгидрильная группа – SH. Выдерживание подложки в растворе, содержащем белок, приводит к формированию самоорганизованного монослоя белка [73].

Часто конечной целью изучения самоорганизующихся монослоев биомолекул является разработка структур для интегрированной электроники, свойствами которых можно управлять на молекулярном уровне. Одним из способов достижения этой цели является поиск подходящих моделей в биологии. Такие компоненты, сконструированные на основе биомолекулярных объектов, сами по себе могут обладать свойствами самоорганизации, что позволяет контролировать их поведение на молекулярном уровне. Биомолекулы также открывают возможность сочетать биологические функции с возможностями нанoeлектроники, однако основной проблемой является подбор интерфейса между молекулярной пленкой и электродом, который обеспечил бы хороший электрический сигнал.

В настоящее время делаются активные попытки исследовать электрические свойства молекул белков, осажденных на проводящих поверхностях. Так, в [74] исследовались слои белка гидрофобина на гидрофобной графитовой подложке. Самоорганизация молекул этого белка в упорядоченный слой возможна благодаря его специфическим свойствам, что позволяет избежать проблемы неконтролируемой ориентации молекул белка на подложке.

#### *1.1.5. Иммунизация, основанная на ковалентном связывании*

Выбор подходящего метода иммобилизации особенно актуален для ферментов, так как главной проблемой является сохранение каталитической

активности в случае каждого конкретного фермента. Термин «иммобилизованные ферменты» определяется как «ферменты, которые физически прикреплены к конкретным твердым носителям и, таким образом, ограничены, и которые могут использоваться многократно и непрерывно при сохранении их каталитической активности» [75]. Ранее были рассмотрены такие методы, как адсорбция и послойное осаждение. Адсорбция, являясь наиболее простым методом, имеет недостатки, к числу которых относится слабая связь молекул фермента с поверхностью, поэтому изменения температуры, рН или ионной силы среды могут привести к десорбции фермента и потери его активности. Кроме того, биосенсоры на основе адсорбированного фермента могут иметь плохую стабильность при их эксплуатации и хранении ввиду неспецифической адсорбции других белков или веществ на поверхности носителя, что может вызвать загрязнение и, как следствие, помехи для приема сигнала. Послойное осаждение, основанное на формировании противоположно заряженных слоев, позволяет формировать многослойные структуры. Единственный недостаток, однако, заключается в том, что большой заряд слоев и поверхности может вызвать искажение кинетики связывания, что может изменить зависимость стабильности фермента от рН.

Для того, чтобы обойти недостатки этих методов, используются методы, основанные на ковалентных взаимодействиях. Иммуобилизация фермента посредством ковалентного связывания является одним из наиболее широко используемых методов, в которых стабильные комплексы между функциональными группами на поверхности молекул фермента и матрицей подложки образуются посредством ковалентных связей.

Основным требованием является то, чтобы ковалентная связь, устанавливаемая между функциональной группой, присутствующей в ферменте, с носителем, не должна быть существенной для ферментативной активности. Возможности биоинженерии позволяют производить модификацию молекул фермента, добавляя к ней с помощью химических методов функциональные группы. Функциональные группы ферментов, которые могут быть использованы

в ковалентном связывании, включают в себя следующие группы: аминогруппа, карбоксильная группа, фенольная группа, сульфгидрильная группа, тиоловая группа, имидазольная группа, индольная группа и гидроксильная группа. Обычно ковалентное связывание производят через боковые цепи аминокислот лизина (амино-аминогруппа), цистеина (тиоловая группа), аспарагиновой и глутаминовой кислот (карбоксильная группа). Процедура связывания фермента с твердой подложкой проходит в две стадии: (1) активация поверхности с использованием линкерных молекул, таких как глутаральдегид или карбодиимид, и (2) ковалентное связывание фермента с активированной подложкой [76]. Молекулы линкера представляют собой многофункциональные реагенты (глутаральдегид или карбодиимид), которые действуют как связующие звено между поверхностью и ферментом посредством ковалентной связи. В то время как первая группа соответствует поверхности иммобилизации и образует так называемый самоорганизующийся монослой, вторая основа, связанная с предварительно активированной подложкой, затем образует ковалентную связь с ферментом. Различные линкеры выбираются исходя из свойств поверхности (неорганический материал, природный или синтетический полимер, мембраны) и протоколов иммобилизации (непосредственно на поверхности датчика или на тонкой мембране, прикрепленной к датчику). Однородность СОМ и контроль количества иммобилизованного фермента являются важными преимуществами ковалентного связывания. К числу недостатков этого метода можно отнести высокий риск денатурации фермента, которая может произойти в результате модификации его молекулы. По сравнению с адсорбцией, ковалентное связывание требует более длительного времени инкубации, поскольку образование СОМ и последующее связывание ферментов с ним может занимать несколько часов. Процесс также является трудоемким и требует обеспечения химической чистоты всех используемых реагентов. Кроме того, метод требует большого объема образца, но иммобилизовать можно только небольшое количество фермента (~ 0.02 г на грамм матрицы). Процедура иммобилизации в значительной степени

повышает стабильность фермента, но также может приводить к снижению его активности.

## **1.2. Методы исследования органических пленок и тонких слоев**

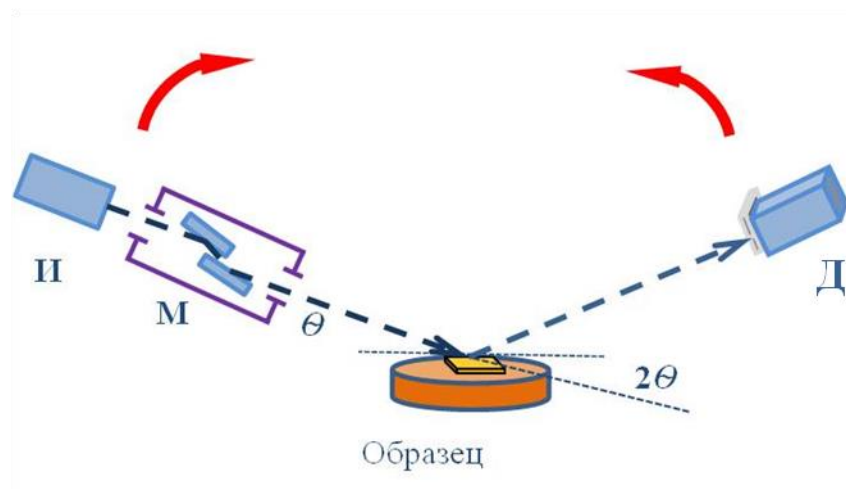
В 1.1.1. - 1.1.5 были рассмотрены различные методы получения органических, в том числе и белковых, слоев и многослойных систем. Качество материалов, созданных на их основе, а также их свойства и характеристики напрямую зависят от требований, предъявляемых к конечной структуре разрабатываемых объектов. Совершенство структуры оказывает прямое влияние на свойства материала, и по этой причине ее контроль чрезвычайно важен для возможности конструирования материалов для их дальнейшего применения в технологических разработках.

Особое место среди методов исследования структуры пленок занимают методы, в основе которых лежит взаимодействие рентгеновского излучения с веществом. Рентгеновское излучение, обладая малой длиной волны, способно проникать через значительные слои вещества, оно рассеивается электронами, и длина рентгеновского излучения сопоставима с межатомными расстояниями, что обуславливает его высокую разрешающую способность.

### *1.2.1. Рентгеновская рефлектометрия*

Для исследования методом рентгеновской рефлектометрии (РР) наличие у образца кристаллической решетки не является обязательным условием, так как в основе этого метода лежит рассеяние рентгеновского излучения на градиенте электронной плотности по глубине образца (*рис. 1.9*). Метод РР чувствителен к распределению показателя преломления в образце. Измерение интенсивности отраженной компоненты производится в области малых углов. Этот метод дает возможность определить такие параметры, как толщины слоев, профиль распределения электронной плотности по глубине и шероховатость слоев и границ раздела. Метод РР используется для: (1) исследования монокристаллических, поликристаллических и аморфных материалов; (2) оценки шероховатости поверхности и толщины границ раздела; (3) определения

структуры однослойных и многослойных систем и (4) измерения толщин пленок от нескольких нанометров до нескольких сотен нанометров.



*Рис. 1.9. Принципиальная схема эксперимента РР. На рисунке приведены следующие обозначения: И – источник излучения, М – монохроматор, Д – детектор отраженного излучения.*

Область применения РР включает в себя широкий диапазон материалов, к изучению которых она может быть применяться. Рентгеновские зеркала, многослойные системы, обладающие гигантским магнетосопротивлением, магнитные диски и другие функциональные устройства состоят из ультратонких пленок. Физические свойства и характеристики этих устройств часто в решающей степени зависят от структуры их границ раздела. Отражательную способность рентгеновских лучей применяют для структурных исследований не только кристаллических материалов, но и разупорядоченных и аморфных структур, какими чаще всего являются органические слоистые системы. Данный метод используется для определения характеристик самых разных материалов, в том числе поверхностных слоев жидкостей, органических веществ, слоев адсорбированных молекул, покрытий в оптике и химико-термической обработке металлов, а также различных слоев, используемых в микро- и оптоэлектронике.

Контроль атомного уровня и характеристика структуры ультратонких пленок становятся все более важными. Методы анализа поверхности широко используются при характеристике тонких пленок, а также в процессах производства устройств для осуществления мониторинга их структуры *in - situ*.

В настоящее время исследование тонкопленочных структур преимущественно проводится на источниках синхротронного излучения, которое благодаря ряду своих свойств имеет преимущество перед рентгеновским излучением, получаемым с помощью лабораторных источников.

Рентгеновские лучи, как и видимый свет, распространяются прямолинейно и преломляются при прохождении через границу двух сред с различными оптическими плотностями. В соответствии с законом Снеллиуса при переходе из вакуума в среду происходит преломление лучей. Так как преломление имеет место при всех длинах волн излучения, то законы преломления для рентгеновских лучей будут такими же, как и для оптического излучения.

Пусть на границу раздела с различными показателями преломления  $n_1$  и  $n_2$  падает плоская электромагнитная волна  $\vec{E}_{in}$  под углом  $i_1$ . При ее падении происходит расщепление на отраженную  $\vec{E}_r$  и преломленную  $\vec{E}_{ir}$  волну (рис. 1.10). Для этих волн справедлив закон Снеллиуса [77]:

$$n_1 \sin(i_1) = n_2 \sin(i_2) \quad (1.5)$$

При падении электромагнитных волн из вакуума ( $n_1 = 1$ ) показатель преломления определяется выражением:

$$n = \frac{\sin(i_1)}{\sin(i_2)} \quad (1.6)$$

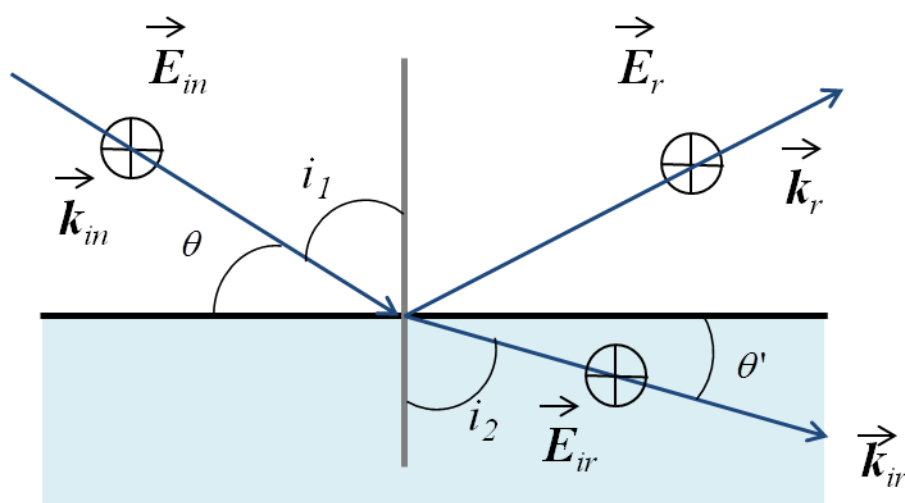


Рис. 1.10. Падающая ( $\vec{E}_{in}, \vec{k}_{in}$ ), отраженная ( $\vec{E}_r, \vec{k}_r$ ) и преломленная ( $\vec{E}_{ir}, \vec{k}_{ir}$ ) волны на границе раздела двух сред с показателями преломления  $n_2 < n_1$ .



Так как для рентгеновского излучения  $n < 1$ , то угол падения пучка  $i_1$  оказывается больше угла преломления  $i_2$  ( $i_1 > i_2$ ), следовательно, существует такой минимальный угол  $(i_1)_{\min}$ , при котором излучение не проникает из вакуума в вещество.

Показатель преломления среды  $n$  для электромагнитного излучения зависит от частоты  $\omega$  и, следовательно, от энергии падающей волны. Частотная зависимость показателя преломления  $n(\omega)$  демонстрирует резонансное поведение, если энергия падающей волны соответствует электронному переходу внутри атомов материала. До достижения резонансной частоты значение показателя преломления растет с увеличением частоты (диапазон нормальной дисперсии). Непосредственно выше резонансной частоты  $n$  сильно падает и снова поднимается до следующей резонансной частоты и т. д. Чем выше частота, тем меньше становится значение показателя преломления вдали от резонансных частот.

Энергия рентгеновских лучей, находящаяся в пределе около 10 кэВ, находится намного выше энергии связи большинства электронов в атоме. Это приводит к тому, что показатель преломления для рентгеновских лучей обычных материалов немного меньше 1.

Согласно теории Лоренца, в общем виде абсолютный показатель преломления среды может быть записан как:

$$n = \frac{\sin(i_1)}{\sin(i_2)} = 1 - \delta - i\beta \quad (1.7)$$

Реальная часть показателя преломления определяет рассеяние, а мнимая отвечает за поглощение рентгеновского излучения в среде. Параметры  $\delta$  и  $\beta$  определяются следующими выражениями:

$$\delta = \frac{r_e N_A}{4\pi} \lambda^2 \frac{\rho_m}{M} (Z + f^I) \quad (1.8)$$

$$\beta = \frac{r_e N_A}{4\pi} \lambda^2 \frac{\rho_m}{M} f^{II} \quad (1.9)$$

где  $r_e = 2.81777 \cdot 10^{-13}$  см – классический радиус электрона;  $N_A = 6.02214 \cdot 10^{23}$  моль<sup>-1</sup> – число Авогадро;  $\lambda$  – длина волны падающего излучения;  $\rho_m$  – плотность вещества;  $M$  – молярная масса;  $Z$  – заряд атома,  $f^I, f^{II}$  – дисперсионные поправки к атомному фактору рассеяния для данного химического элемента, которые зависят от энергии падающего излучения

Значения  $\delta$  и  $\beta$  для большинства веществ составляют  $10^{-7} - 10^{-5}$ , следовательно, вакуум для рентгеновского излучения является оптически наиболее плотной средой. Для рентгеновских лучей при отражении от границы раздела вакуум/среда ( $n_2 < 1$ ) наблюдается эффект полного внешнего отражения (ПВО) в диапазоне углов  $0 < \theta < \theta_c$ .

Величину критического угла ПВО можно определить, исходя из выражения (1.7):

$$\cos(i_c) = 1 - \delta - i\beta \quad (1.10)$$

Если пренебречь поглощением:

$$\theta_c^2 = 2\delta \quad (1.11)$$

Исходя из выражений (1.8) и (1.11) видно, что величина критического угла зависит от длины волны и от плотности среды.

При  $\theta < \theta_c$  интенсивность отраженного излучения равна интенсивности падающего. При  $\theta > \theta_c$  отношение интенсивностей  $\frac{I}{I_0}$  приближенно описывается

выражением:

$$\frac{I}{I_0} \approx \frac{\delta^2}{4\theta_0^4} \quad (1.12)$$

Принимая во внимание (1.11), видно, что соотношение (1.12) резко убывает при  $\theta_0 > \theta_{cr}$ . Этим обусловлены особенности метода рентгеновской рефлектометрии, связанные с необходимостью детектирования отраженного пучка в широком диапазоне интенсивностей: изменение угла падения от  $0.2\theta_{cr}$  до

$3.0\theta_{cr}$  приводит к уменьшению отражающих свойств поверхности приблизительно на шесть порядков [78].

Рассмотрим ситуацию, когда монохроматический пучок рентгеновского излучения падает из вакуума под малым углом скольжения на тонкий слой, нанесенный на плоскую идеально гладкую подложку. Также допустим, что материал, из которого сделана подложка, оптически менее плотен, чем материал слоя.

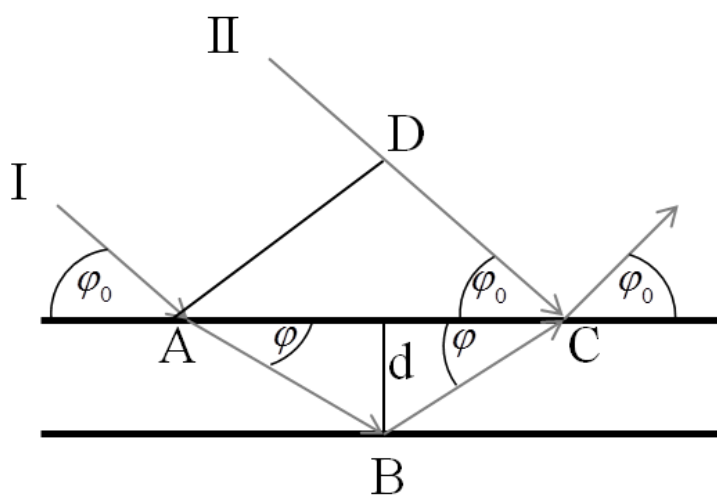


Рис. 1.11. Процесс отражения и преломления рентгеновских лучей в системе вакуум/слой/подложка.

Разность хода  $\Delta$  лучей I и II равна  $\Delta = (AB + BC) - DC$  (рис. 1.11). Можно определить, что  $AB + BC = \left(\frac{2d}{\sin \varphi}\right)$  и  $DC = \left(\frac{2d}{\operatorname{tg} \varphi}\right) * \cos \varphi_0$ .

Тогда разность хода с учетом показателя преломления  $n$  равняется:

$$\Delta = \frac{2d}{\sin \varphi} n - \frac{2d}{\operatorname{tg} \varphi} \cos \varphi_0 = \frac{2d}{\sin \varphi} n (1 - \cos^2 \varphi) = 2d * n * \sin \varphi \quad (1.13)$$

Представим разность хода как функцию угла падения  $\varphi_0$ :

$$\Delta = 2d \sqrt{n^2 - \cos^2 \varphi_0} = 2d \sqrt{\sin^2 \varphi_0 - 2\delta + \delta^2} \quad (1.14)$$

Учитывая, что  $2\delta = (\varphi_0)_c^2$  (2.7), находим:

$$\Delta \approx 2d \sqrt{\varphi_0^2 - (\varphi_0)_c^2} \quad (1.15)$$

Интерференционному максимуму будет соответствовать условие  $\Delta = m\lambda_0$ , где  $m$  целое число,  $\lambda_0$  длина волны после:

$$2d\sqrt{\varphi_0^2 - (\varphi_0)_c^2} = m\lambda_0, \text{ или } \varphi_0^2 = (\varphi_0)_c^2 + \left(\frac{\lambda}{2d}\right)^2 \quad (1.16)$$

Условие для интерференционного максимума будет иметь вид:

$$2d\sqrt{\varphi_0^2 - (\varphi_0)_c^2} = (2m + 1)\frac{\lambda_0}{2} \quad (1.17)$$

Выражения (1.15) и (1.16) позволяют определить угловое расстояние между двумя соседними экстремумами:

$$(\varphi_0)_m^2 - (\varphi_0)_{m+1}^2 = (2m + 1)\frac{\lambda^2}{4d^2} \quad (1.18)$$

Из (1.18) следует, что угловое расстояние между экстремумами уменьшается с толщиной слоя  $d$ . Поэтому оно дает достаточную информацию для определения толщины покрытий. Впервые экспериментальную интерференционную картину отражённого излучения от слоя на подложке наблюдал Киссинг [79], поэтому минимумы и максимумы интерференционной картины носят название киссинговских осцилляций.

Рассмотрение слоя на подложке позволяет сделать заключение о возможности интерференции рентгеновских лучей от многослойных структур. Границы раздела слоев предполагаются параллельными друг другу и поверхности подложки. Такие структуры можно представить, как последовательность двойных слоев толщиной  $d_1$  и  $d_2$  и показателями преломления  $n_1$  и  $n_2$  (рис. 1.12). Особенностью периодических многослойных структур является то, что отражение падающего на них рентгеновского излучения удовлетворяет закону Вульфа-Брэгга.

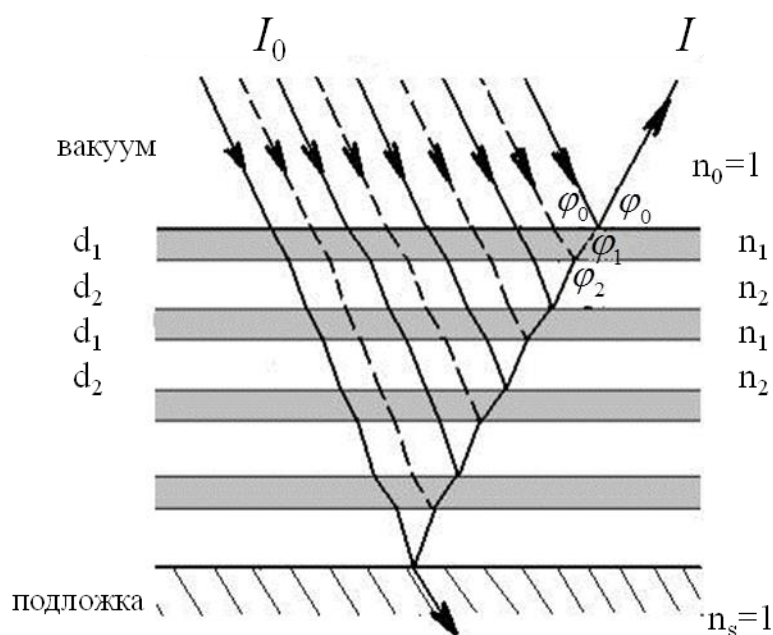


Рис. 1.12. Схема отражения рентгеновского излучения от многослойной структуры с периодом  $d_1+d_2$ , нанесенной на подложку.

Усиление интенсивности в результате интерференции происходит, когда разность хода лучей, отраженных от двух соседних плоскостей, будет кратно целому числу длин волн. При этом условии отражение излучения определяется выражением [80]:

$$2d_1 \sin \varphi_1 + 2d_2 \sin \varphi_2 = m\lambda \quad (1.19)$$

Учитывая, что углы  $\varphi_0, \varphi_1, \varphi_2$  приблизительно одинаковые, условие (1.19) можно записать в виде:

$$2(d_1 + d_2) \sin \varphi_m \approx m\lambda \quad (1.20)$$

где  $\varphi_m$  - усредненный угол скольжения падающего излучения для слоев  $d_1$  и  $d_2$ .

Закон Вульфа Брэгга может быть представлен зависимостью:

$$\varphi_m^2 \approx (\varphi_0)_c^2 + \left(m \frac{\lambda}{2(d_1 + d_2)}\right)^2 \quad (1.21)$$

Интенсивность максимума Вульфа-Брэгга примерно на порядок больше интенсивности соответствующего максимума Киссинга и обычно уменьшается с увеличением порядка отражения.

Глубина проникновения рентгеновского пучка в толщу материала ( $D$ ) зависит от угла падения в области критических углов [78]:

$$D = \frac{\lambda}{\sqrt{2\pi} \sqrt{\sqrt{(\alpha_i^2 - \alpha_{cr}^2)^2 + 4\beta^2} - (\alpha_i^2 - \alpha_{cr}^2)}} \quad (1.22)$$

В работах [81,82] показано, что с помощью комбинирования функций поглощения, отражения и глубины проникновения рентгеновского излучения возможно сканировать структуру тонкопленочного образца по толщине, поскольку при определенном угле падения наблюдаемый отклик материала обусловлен отражением от сравнительно тонкого слоя на определенной глубине пленки.

Одним из следствий формулы (1.22) является потенциальная возможность определения электронной плотности по толщине пленки [78]. В качестве примера рассмотрим материал, который состоит из  $N$  слоев. Для упрощения предположим, что эти слои являются идеально гладкими. Нумерацию слоев будем отсчитывать от верхней границы раздела пленка/вакуум. Пусть для первого слоя  $z_1 = 0$  и  $N = 1$ . Толщину  $j$ -ого слоя обозначим как:

$$z_{j-1} - z_j \equiv d_j \quad (1.23)$$

Коэффициент преломления  $j$ -ого слоя обозначим как (согласно выражению (1.0)):

$$n_j = 1 - \delta_j + i\beta_j \quad (1.24)$$

Пусть  $k_{ij}$  и  $T_j$  соответственно волновой вектор и амплитуда рентгеновской волны, проходящей через  $j$ -ый слой, а  $k_{ij}$  и  $R_j$  соответственно волновой вектор и амплитуда волны, отраженной от этого слоя. Для каждой границы раздела обязательным условием является необходимость непрерывности вектора электрической напряженности. Для решения этой задачи Параттом была разработана рекурсивная процедура решения полученной системы уравнений [83]:

$$X_j \equiv \frac{R_j}{T_j} = \exp(-2ik_{zj}z_j) \frac{r_{j,j+1} + X_{j+1} \exp(2ik_{zj+1}z_j)}{1 + r_{j,j} X_{j+1} \exp(2ik_{zj+1}z_j)} \quad (1.25).$$

Для начала процедуры рекурсии считается, что пленка является достаточно толстой, а функцию отражения от подложки полагают  $R_{N+1} = 0$ . Тогда:

$$R_{j+1} = \frac{T_j r_{j+1,j} \exp[-i(k_{z_{j+1}} + k_{z_j})z_j] + R_j \exp[-i(k_{z_{j+1}} - k_{z_j})z_j]}{t_{j+1,j}} \quad (1.26)$$

$$T_{j+1} = \frac{T_j \exp[-i(k_{z_{j+1}} - k_{z_j})z_j] + R_j r_{j+1,j} \exp[i(k_{z_{j+1}} + k_{z_j})z_j]}{t_{j+1,j}} \quad (1.27)$$

Характерная рефлектометрическая зависимость представляет собой кривую, спадающую по закону четвертой степени, на которую наложены периодические осцилляции Киссинга. Их происхождение связано с интерференцией рентгеновских волн, отраженных от границ раздела слой/воздух и слой/подложка. Ширина этих осцилляций непосредственно связана с одной из наиболее важных величин, определяемых с помощью РР, толщиной материала:

$$d = \frac{2\pi}{\Delta q_z} \quad (1.27)$$

где  $\Delta q_z$  – расстояние между двумя соседними минимумами на кривой рефлектометрии.

В случае идеально гладких границ раздела фаз коэффициент преломления пленки зависит только от ее высоты  $z$  над поверхностью подложки. Однако реальные поверхности являются всегда в той или иной степени шероховатыми, и по этой причине каждую шероховатую поверхность представляют набором идеально гладких поверхностей, находящихся на некотором расстоянии от границы раздела. Шероховатость поверхности приводит к уменьшению интенсивности отраженного рентгеновского излучения. В реальности наблюдаемое снижение интенсивности имеет еще большее значение из-за эффекта тени – рассеяния пучка, отраженного от углубления поверхности на ее выступах [78].

Для нахождения функции распределения электронной плотности по глубине из рефлектометрических данных традиционно применяется метод наименьших квадратов, использующий теорию Парратта. При этом подходе для уточнения

структуры тонкопленочного материала с помощью варьирования параметров модельного образца добиваются согласованности рассчитанного сигнала с экспериментальными данными. Однако известно, что в этом случае отсутствуют единственность и устойчивость найденного решения системы полученных уравнений [84]. Особенно большие трудности возникают при интерпретации данных рефлектомерии для систем с низким контрастом электронной плотности, материал которых составляют элементы, расположенные в периодической таблице близко друг к другу. К числу таких систем можно отнести многослойные образцы, имеющие в составе атомы таких металлов как, например, железо и хром, а также органические и биоорганические материалы, не имеющих в своем составе тяжелых элементов. Особо эта проблема является актуальной для изучения пленок ЛБ/ЛШ, в которых для повышения контраста электронной плотности в структуру пленок вводятся атомы металлов.

Несмотря на присутствующие сложности при обработке экспериментальных данных, метод РР активно применяется для исследования органических однослойных и многослойных систем, сформированных на границе раздела воздух/подложка. Такие системы могут быть получены на кремниевой подложке и представлять из себя, например, многослойные системы, сформированные из органических материалов, например, полимеров. Структуры слоев и морфология границ раздела такой системы является важным вопросом при конструировании электронных фотовольтаических устройств, так как состояние интерфейса оказывает прямое влияние на функциональность будущего устройства. Метод рефлектометрии, использующийся для контроля структуры органических слоев, является неразрушающим методом исследования органических материалов, что и делает его широко распространённым методом исследования. Так, например, РР использовалась для определения толщины слоев и шероховатости интерфейса гетеросистемы, состоящей из последовательных слоев полимеров РЗНТ/PSSA [85]. Было показано, что шероховатость поверхности исследуемой пленки согласуется с результатами измерений методом атомно-силовой микроскопии (АСМ).



Поскольку возможность применения рефлектометрии определяется наличием градиента электронной плотности, то часто объектами изучения являются многослойные структуры, полученные с помощью технологии ЛБ/ЛШ [86–88]. Метод ЛБ/ЛШ позволяет формировать слои с включением различных тяжелых элементов, в частности, ионов металлов, что позволяет создать систему с градиентом электронной плотности.

Изучение влияния ионов металлов на пленки, сформированные из жирных кислот, важно с точки зрения изучения взаимодействия металлических ионов с органическими материалами, в том числе с биоматериалами и биоподобными системами, на фундаментальном уровне.

Известно, что небольшое количество этих ионов способно изменить свойства монослоя жирной кислоты, снижая его растворимость и создавая высоковязкую пленку на поверхности воды. Структура полученных пленок ЛБ/ЛШ зависит от рН субфазы, температуры и индивидуальных свойств самих характеристик ионов. Более того, в разных условиях различные ионы дают пленки с разной структурой и свойствами. Это может быть связано с различиями в ионизации и степенях гидратации ионов [89]. Структурные исследования сложных белково-липидных систем, которые способны моделировать структуру и работу биологических мембран, важны не только с точки зрения изучения фундаментальных процессов, происходящих в клетке, но и с позиции разработки самоорганизующихся искусственных мембранных систем для их применения в области доставки лекарств в клинической диагностике и в качестве компонентов биосенсоров. Атомные структуры отдельных компонентов этих биологических и биоподобных мембран, таких как, например, стеринны, гликолипиды и липопротеины, могут быть успешно определены с помощью рентгеноструктурного анализа или спектроскопии ядерного магнитного резонанса (ЯМР-спектроскопии). Однако эти методы затруднительно применить к исследованию бислойной мембраны, которая, по существу, является жидкокристаллической структурой, не имеющей дальнего порядка [90]. Такие уникальные свойства мембран требуют привлечения других техник исследования и контроля их структуры, таких как РР. Так, в [91] РР

в комбинации с нейтронной рефлектометрией применялась для исследования бислоев ДПФХ и димиристоил фосфатидилглицерола на твердых подложках при взаимодействии их с тау-белком, который участвует в патогенезе болезни Альцгеймера.

Исследование многослойных пленок ЛБ/ЛШ позволило расширить границу применимости рефлектометрии для изучения слоистых систем не только на твердых поверхностях, но и на границе раздела жидкость/воздух. В [92] метод РР впервые был применен к изучению ленгмюровского монослоя стеарата свинца на поверхности водной субфазы.

В работе [93] исследовалась возможность образования комплексов ДНК с монослоями цвиттер-ионного природного липида ДПФХ на границе раздела вода/воздух в присутствии катионов  $Ca_2$ . В частности было показано, что присутствие этих ионов является существенным для образования комплекса ДПФХ с ДНК. Толщина слоя ДНК, прикрепленного к монослою липида со стороны субфазы, равнялась 25-26 Å, и такое значение толщины показывает, что молекула ДНК пребывает преимущественно в двухцепочечной форме. В отличие от ДПФХ, в присутствии аминоксодержащего амфифильного соединения октадециламина наблюдается расщепление ДНК.

Однако применение рефлектометрии имеет и некоторые ограничения. Например, высокий поток синхротронного излучения ввиду его высокой интенсивности по сравнению с рентгеновским излучением из лабораторного источника может оказывать разрушительное влияние в особенности на материалы, особенно органической природы. В [94] были обнаружены структурные изменения в полимерных тонких пленках при их облучении рентгеновским излучением с различными плотностями падающего потока и температуры образца. Показано, что влияние излучения может быть существенным для одного типа полимера и оказывать в меньшей степени воздействие на другой тип полимера. Рассеяние рентгеновских лучей на жидкости, приводит к увеличению выхода вторичных электронов и свободных радикалов, которые могут повредить органическую пленку [95]. Кроме того,

потеря интенсивности рентгеновского излучения и увеличение фона из-за воды ограничивает диапазон, в котором могут быть получены полезные данные, тем самым ограничивая пространственное разрешение. Также, поскольку органические материалы обычно имеют электронную плотность, аналогичную плотности воды, то контраст электронной плотности может быть небольшим, что затрудняет обнаружение границ раздела и оценку покрытия пленки.

### *1.2.2. Стоячие рентгеновские волны в области полного внешнего отражения*

Несмотря на все достоинства, которые имеет РР при исследовании органических и биоорганических слоевых ансамблей, существенным ограничением метода является отсутствие специфичности по отношению к элементному составу исследуемого материала. По этой причине для более детального исследования структуры образцов, в том числе слоистых систем и приповерхностных слоев, потребовалось развитие более чувствительных методик, которые позволили бы дать информацию не только о структуре, но и о положении атомов на поверхности или непосредственно внутри слоя.

Метод стоячих рентгеновских волн (СРВ), сочетая в себе возможности отражательной способности рентгеновских лучей и спектроскопии, используется для разрешения структуры в атомном масштабе при исследовании тонких пленок и приповерхностных слоев.

Взаимодействие рентгеновских лучей с веществом происходит различными способами, такими как фотоэлектрическое поглощение, упругое и неупругое (комptonовское) рассеяние и рождение электронно-дырочных пар. Эти процессы часто приводят к образованию различных типов вторичных рентгеновских лучей, таких как флуоресцентные, когерентные и комptonовские рентгеновские лучи, а также различных типов электронов, а именно фотоэлектронов, оже-электронов и комptonовских электронов отдачи. Свойства материала обычно характеризуются измерением одного или нескольких типов из этих вторичных электронов и рентгеновских лучей [96]. Таким образом, наиболее прямым и естественным способом изучения и практического использования СРВ является регистрация вторичных излучений, возникающих при поглощении рентгеновских квантов.

Метод СРВ основан на использовании пространственно-модулированного электромагнитного поля, которое возникает при динамической дифракции в кристалле, для возбуждения вторичного излучения (фотоэлектронов) от атомов, составляющих кристалл. Стоячая волна, являющаяся результатом интерференции между падающей и дифрагированной волнами, в случае брэгговской дифракции, имеет тот же период, что и кристаллическая решетка, легко чувствует малейшее отклонение атомных плоскостей (или отдельных атомов) от их правильных положений в идеальном кристалле (*рис. 1.13*). Анализ угловой зависимости характеристического вторичного излучения позволяет с высокой точностью определить позиции атомов относительно системы дифракционных плоскостей, тем самым характеризуя разупорядоченность системы. Результирующая стоячая волна внутри и над поверхностью кристалла имеет фиксированную периодичность межплоскостного расстояния и успешно использовалась для определения местоположения атомов в объеме кристаллов [97,98]. Однако в условиях классического рентгеновского дифракционного эксперимента эффект, связанный со стоячей волной, проявляется слабо, что связано со значительной разницей в значениях амплитуд упругого и неупругого рассеяния. Стоячая волна в кристалле обнаруживается в традиционном рентгеновском эксперименте в виде аномальной угловой зависимости поглощения [99] и в виде слабой асимметрии кривой дифракционного отражения в геометрии Брэгга. В виду этого практическое использование метода СРВ осуществляется с регистрацией вторичных излучений, возникающих при поглощении квантов рентгеновского излучения.

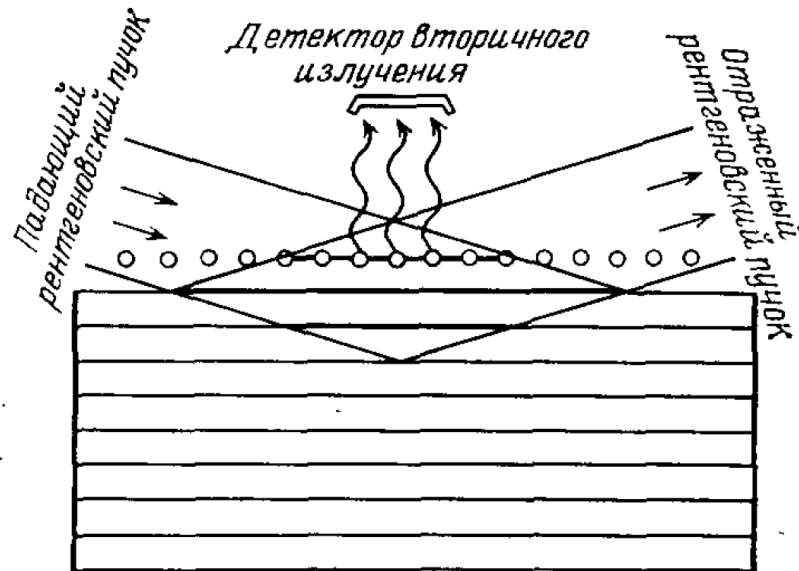


Рис. 1.13. Схема формирования стоячей волны и выход вторичного излучения от примесных атомов при дифракции рентгеновских лучей в геометрии Брэгга [100].

Использование суперпозиции двух когерентно связанных рентгеновских волн позволяет локализовать интенсивность рентгеновского излучения в виде интерференционных полос поля СВВ, тем самым позволяя получить пространственно локализованный периодический зонд со шкалой длин, эквивалентной периоду СВВ (рис. 1.14):

$$D = \frac{\lambda}{2 \sin \theta} = \frac{2\pi}{Q} \quad (1.28)$$

где  $\lambda$  - длина волны рентгеновского излучения,  $2\theta$  – угол рассеяния между двумя когерентно связанным волновыми векторами  $K_R$  и  $K_0$ , и  $Q$  – вектор рассеяния, который определяется как:

$$Q = K_R - K_0 \quad (1.29)$$

Вектор  $Q$  также иногда называется вектором стоячей волны, поскольку он направлен перпендикулярно плоскости равной интенсивности СВВ и имеет величину, обратную величине  $D$ .

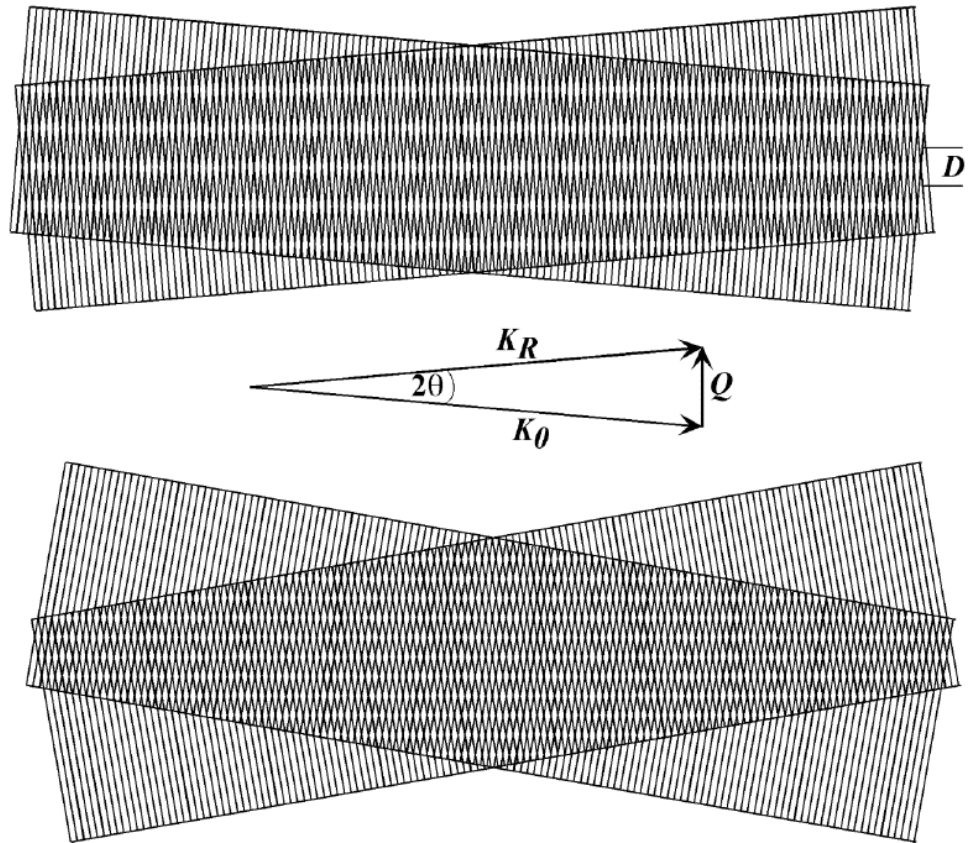


Рис. 1.14. Верхняя часть рисунка: поле стоячей волны формируется из суперпозиции плоских волн с длиной волны  $\lambda$  и углом рассеяния  $2\theta$ . Период стоячей волны  $D$  определяется согласно выражению (1.29). Две плоские волны представлены в обратном пространстве волновыми векторами  $K_0$  и  $K_R$ ,

$$K_0 = K_R = \frac{2\pi}{\lambda}. \text{ стоячая волна определяется вектором стоячей волны } Q \text{ и}$$

определяется по формуле (1.30). Нижняя часть рисунка: увеличение угла  $2\theta$  ведет к уменьшению периода  $D$  [101].

Условия, при которых может формироваться стоячая волна, могут быть реализованы посредством: (1) сильной брэгговской дифракции от одиночного кристалла, (2) сильной брэгговской дифракции от искусственных периодических структур [102], (3) ПВО от зеркальной поверхности [101] и (4) слабой кинематической дифракции Брэгга от монокристаллической тонкой пленки. Сильная брэгговская дифракция от одиночного кристалла генерирует СВВ с периодом, эквивалентным расстоянию между дифракционными плоскостями; обычно между 0.5 и 10 ангстрем. Случаи (2) и (3) возникают при малых углах падения, или малых  $Q$ , и, согласно выражению (1.28), будут генерировать волны с большим периодом, приблизительно от 20 до 2000 ангстрем.

Метод СВ используется для исследования примесей в объеме структуры одиночного кристалла, также его использование охватывает широкий спектр поверхностных, интерфейсных и тонкопленочных структур [103]. Во всех случаях фаза стоячей волны прямо связана с отражающими (или дифрагирующими) плоскостями решетки подложки или границы раздела, и далее могут быть использованы для непосредственного определения абсолютных положений выбранных элементов относительно этих плоскостей. Доступность источников синхротронного излучения значительно увеличивает чувствительность и применимость метода СВ. Синхротронное излучение обладает высокой интенсивностью в широкой области спектра, и его использование позволяет анализировать более тонкие приповерхностные слои кристалла и фиксировать положения от небольшого числа примесных атомов.

Слоистые системы, представляющие собой аperiodические многослойные структуры и органические пленки, часто имеют значения периода и качество границ раздела, которые не позволяют использовать метод СВ в условиях брэгговской дифракции. Потребность в исследовании таких систем привела к развитию метода СВ в области ПВО. Данный метод предполагает одновременную регистрацию угловых зависимостей зеркальной компоненты рентгеновского отражения и выхода флуоресцентного излучения от образца в области скользящих углов [97].

Для изучения структуры целого ряда систем, особенно биологических объектов, которые имеют размеры порядка сотни ангстрем, необходимо формировать СВ с периодом сотни и тысячи ангстрем. Для решения подобных задач и используют явление ПВО. Это явление характерно для рентгеновского излучения при падении его под малыми углами скольжения на плоскую поверхность материала, что делает необязательным использование дифракционного отражения, так как для генерации СВ можно использовать любое вещество, имеющее форму плоского зеркала. Для ПВО значение  $D$  (1.28) обычно варьируется от нескольких нм до мкм в при увеличении угла в условиях ПВО. При этом СВ существует как в объеме кристалла в виде экспоненциально

затухающей волны, так и над его поверхностью в области перекрытия падающего и отраженного пучков. Для исследования тонкопленочных структур основную информацию несет стоячая волна, образованная над поверхностью в области нахождения исследуемого материала, нанесенного на отражающую поверхность.

Во время ПВО в результате интерференции между падающими и зеркально отраженными рентгеновскими лучами происходит формирование СВВ над зеркальной поверхностью. Плоскости, образуемые узлами и пучностями стоячей волны, располагаются параллельно плоскости поверхности и имеют переменный период (1.29). Явление ПВО наблюдается в интервале между значениями угла  $\theta = 0$  и  $\theta = \theta_c$  (критический угол). Соответствующий период стоячей волны тем самым варьируется в пределах от  $D = \infty$  до  $D = D_c \approx \frac{\lambda}{2\theta_c}$  (критический период).

Исходя из выражения для реальной части показателя преломления  $\delta$  (1.8) и значения критического угла  $\theta_c = \sqrt{2\delta}$ , можно вычислить значение критического периода:

$$D_c = \frac{1}{2} \sqrt{\frac{\pi}{N_e r_e}} \quad (1.30)$$

Помимо небольших эффектов, возникающих в результате аномальной дисперсии, критический период не зависит от длины волны и является свойством материала, которое определяется электронной плотностью  $N_e$ .

Обычно на практике в условиях ПВО угол скольжения изменяется вблизи критического угла в интервале нескольких десятков угловых минут. Путем варьирования величины угла скольжения становится возможным управлять пространственным положением узлов и пучностей стоячей волны и изменять ее период в широких пределах. Для локализации интересующих атомов по отношению к зеркальной поверхности с помощью поворачивания зеркала измеряют угловую зависимость интенсивности выхода вторичного излучения, на которой фиксируется модуляция, связанная с прохождением пучности стоячей волны через положение атома. Характерные модуляции, наблюдающиеся в



угловой зависимости выхода флуоресценции в области ПВО, соответствуют интерференционному характеру волнового поля над поверхностью подложки и возникают благодаря изменениям фазы при изменении угла падения. В этом смысле угловую область ПВО можно назвать фазочувствительной.

Еще одной важной особенностью области полного отражения является то, что глубина проникновения рентгеновского излучения в образец очень мала, что резко снижает спектральный фон, что, в свою очередь, повышает чувствительность обнаружения на несколько порядков. Это свойство является принципиальным для метода рентгенофлуоресцентного анализа в области ПВО – высокопрецизионного метода, позволяющего определять содержание следовых элементов в микроколичествах исследуемых образцов. Период, амплитуда и фаза такого поля СВВ сильно зависят от угла падения [104]. Этот тип поля СВВ может быть успешно использован для определения положения тяжелых ионов в органических монослоях или толстых пленках ЛБ/ЛШ, а также наночастиц металлов [105], нанесенных на плоские поверхности.

За последние несколько лет метод СВВ в ПВО был разработан как очень простой и количественный аналитический метод определения характеристик монослоев на границе раздела жидкость/воздух [106]. Использование монохроматического синхротронного рентгеновского излучения, падающего на поверхность жидкости под углом скольжения  $\theta_i \sim 0.8 * \theta_{cr}$ , приводит к получению высокой поверхностной чувствительности ( $\sim 8$  нм). Используемая энергия рентгеновского излучения зависит от типа элемента, который предполагается обнаружить.

В [107] представлен анализ распределения интенсивности волнового поля, связанного с генерацией СВВ над зеркальной поверхностью при полном отражении для образца вакуум/пленка/подложка на примере неорганических и органических пленок для случая, когда показатель преломления пленки больше, чем у подложки. Толщина ультратонкой пленки может быть оценена по значению периода СВВ, сформированной выше границы раздела пленка/подложка в области полного отражения. Показано, что в некоторых случаях толщина ультратонкой

пленки может быть приблизительно получена только из формы кривой отражения рентгеновского излучения при углах падения, меньших, чем критический угол подложки. Также продемонстрировано, что интерференционные явления, ответственные за модуляцию отражения рентгеновского излучения и угловой зависимости флуоресценции, могут быть использованы для характеристики ультратонких пленок. Также метод СРВ в комбинации с регистрацией флуоресценции в области ПВО применялся для исследования распределения тяжелых ионов в ЛБ пленках на примере стеариновой кислоты, что показало потенциальные возможности исследования многослойных органических систем [108].

В [109] исследовано взаимодействие катионов  $Mn^{2+}$  с монослоем бегеновой кислоты. Зондирование с помощью регистрации флуоресцентного сигнала позволило точно определить количество катионов, притягивающихся к монослою, а регистрация зеркального отражения показала, что эти катионы конденсируются в чрезвычайно тонкой области ( $< 0.5$  нм).

В [110] исследовались монослои порфирина-фуллереновой диады с включенным в ее структуру ионом цинка на поверхности водной субфазы и на кремниевых подложках методами СРВ и РР. В результате на основании анализа распределения по глубине атомов Zn и электронной плотности пленки сделан вывод о преимущественной ориентации молекул диад в монослоях и показано, что молекулы сохраняют свою ориентацию при переносе монослоя с поверхности жидкой субфазы на твердую подложку.

Особо метод СРВ оказался полезным при исследовании в области биологического материаловедения. В последние годы с связи с развитием технического оснащения и источников синхротронного излучения применение рентгеновских методик, включая СРВ, расширилось на более широкий круг задач из различных областей, связанных с биологическими системами и коллоидными структурами. Такое развитие делает синхротронное излучение основой методов исследования, связанных с рентгеновским рассеянием [111].

В [112] впервые были зафиксированы экспериментальные угловые зависимости флуоресценции от ленгмюровских монослоев фталоцианинов, имеющих в своем составе атомы металлов, и фосфолипидов на границе раздела воздух/вода. Позиция атомов металлов, определенная с помощью метода СРВ, находилась в хорошем согласии с расчетными данными.

Также активно ведутся работы по применению метода СРВ для исследования структуры слоев, созданных в том числе и на основе молекул белков и ферментов. В [113] проводилось изучение защитного действия бисфосфонатного препарата ксидифона на мембраносвязанный фермент, поврежденный ионами свинца. В качестве модельной системы была использована белково-липидная система  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФаза/фосфатедилэтаноламин, нанесенная на кремниевую подложку. Одновременная регистрация рентгеновского отражения и сигнала флуоресценции позволило определить положение ионов свинца до и после взаимодействия модельной системы с лечебным препаратом, что позволило напрямую наблюдать влияние ионов на белково-липидный слой.

Исследования белковых пленок на основе белка гемоглобина, сформированных на поверхности жидкости, были выполнены в работе [114]. Измерения методом СРВ в области ПВО позволили обнаружить существенное усиление способности белка связывать ионы металлов в результате конформационных перестроек белковых молекул, вызванных действием различных повреждающих факторов.

Метод стоячих рентгеновских волн был применен для изучения образования белково-липидной пленки на водной субфазе [115]. Было исследовано влияние различных токсических реагентов (тяжелых металлов и мочевины) на белково-липидные взаимодействия на примере слоев глюкозооксидазы и бегеновой кислоты. Анализ угловой зависимости выхода флуоресценции предоставил информацию о молекулярном расположении в биоорганических наносистемах на водной поверхности.

### *1.2.3. Геометрия скользящего падения рентгеновского излучения*

В случае исследования образцов, представляющих из себя тонкие наноструктурированные пленки, малоугловое рассеяние в скользящих углах падения (GISAXS) является важным инструментом для исследования их морфологии и латеральной упорядоченности. Этот метод является чувствительным к размеру и форме частиц и к корреляционным расстояниям между ними в диапазоне от нескольких нанометров до нескольких сотен нанометров в реальном пространстве. Таким образом, метод GISAXS обладает высокой поверхностной чувствительностью вследствие используемой геометрии измерения.

Впервые эта техника была продемонстрирована в [116] с использованием лабораторного источника на примере изучения неорганических пленок из золота. Тем не менее, полностью потенциал малоуглового рассеяния при скользящих углах реализуется, когда в качестве источника рентгеновского излучения используется синхротрон, что связано с рядом причин. Во-первых, требуется высокий поток фотонов, чтобы исследовать поверхностные структуры, которые могут присутствовать в меньшем количестве по сравнению с объемом подложки, что способно значительно ослабляет сигнал рассеяния; во-вторых, для улучшения пространственного разрешения требуются высоко коллимированный пучок, тем самым делая синхротронное излучение с его низкой расходимостью и частичной когерентностью чрезвычайно эффективным; в-третьих, источники синхротронного излучения позволяют проводить настройку длины волны, которая может быть использована для определения химического состава пленки и поверхностного слоя одновременно с изучением их морфологических особенностей [117].

Основная особенность рассеяния в скользящих углах заключается в используемой геометрии. Рентгеновский луч падает на поверхность образца при малом угле падения  $\alpha_i$ , который обычно составляет десятые доли градуса. Интенсивность рассеяния регистрируется с помощью двумерного (2D) детектора как функция угла отражения,  $\theta_f$ , и угла рассеяния вне плоскости,  $\psi$ , которые

определяют плоскость рассеяния. Типичные расстояния от образца до детектора находятся в диапазоне 2 – 5 м, типичные значения модуля вектора рассеяния  $q$  составляют диапазон 1 – 0.01 нм<sup>-1</sup>, то есть метод позволяет исследовать частицы размерами от одного до нескольких сотен нанометров в реальном пространстве. Обычно система координат в геометрии, реализуемой в эксперименте, выбирается таким образом, чтобы ось X совпадала с направлением рентгеновского пучка, ось Y была направлена параллельно поверхности исследуемого образца, а ось Z была направлена перпендикулярно его поверхности (рис. 1.15).

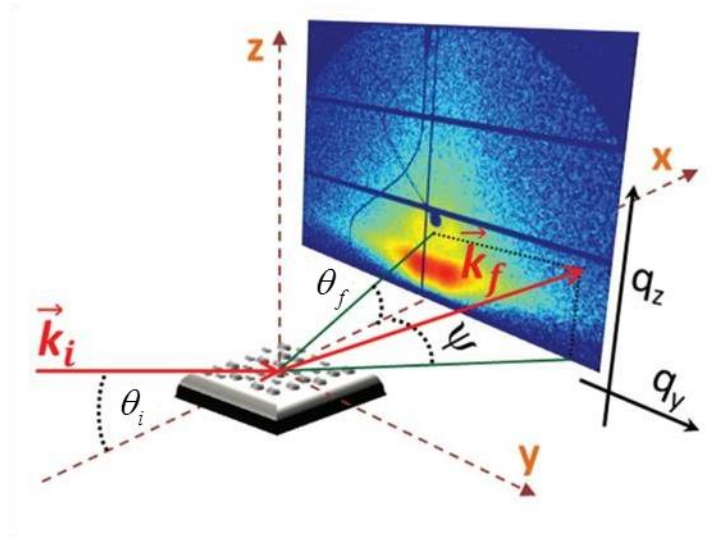


Рис. 1.15. Схема рассеяния, реализуемой в геометрии скользящего падения. Образец находится под небольшим наклоном под углом  $\theta_i$  относительно падающего пучка. Диффузное рассеяние регистрируют с использованием 2D-детектора как функции углов рассеяния  $\theta_f$  и  $\psi$  [117].

В этой системе координат вектор рассеяния  $\vec{q}$  в случае падения монохроматического пучка рентгеновского излучения с волновым вектором  $\vec{k}_i$  и волновым числом  $k_0 = \frac{2\pi}{\lambda}$ , рассеивающегося по направлению оси  $\vec{k}_f$ , определяется выражением:

$$\vec{q} = \vec{k}_f - \vec{k}_i = \begin{pmatrix} q_x \\ q_y \\ q_z \end{pmatrix} = \frac{2\pi}{\lambda} \begin{pmatrix} \cos(\theta_f)\cos(\psi) - \cos(\theta_i) \\ \cos(\theta_f)\sin(\psi) \\ \sin(\theta_i) + \sin(\theta_f) \end{pmatrix} \quad (1.32)$$

Поскольку в случае рентгеновских лучей показатель преломления меньше единицы, то полное внешнее отражение имеет место для углов, меньших критического угла  $\alpha_c(\lambda)$  материала, который определяется выражением (1.10):

$$\alpha_c = \sqrt{2\delta} \quad (1.33)$$

Диффузное рассеяние при условии  $\theta_{i,f} = \theta_c$  имеет максимум, который называется пиком Йонеды [118], и его положение зависит от характеристик исследуемого материала, как следует из формул (1.33) и (1.8). Глубина проникновения рентгеновского излучения варьируется от нескольких нанометров (для углов падения ниже  $\theta_c$ ) до нескольких микрон (для углов падения выше  $\theta_c$ ). В случае идеально гладкой пленки глубина проникновения  $\Lambda$  определяется как глубина, на которой интенсивность рентгеновского излучения ослабляется на величину  $1/e$ , для  $\theta_i, \theta_c \ll 1$  и  $\theta_i = \theta_f$  принимает следующее выражение:

$$\Lambda = \frac{\lambda}{4\pi} \sqrt{\frac{2}{\sqrt{\theta_i^2 - \theta_c^2 + 4\beta^2} - (\theta_i^2 - \theta_c^2)}} \quad (1.34)$$

В (1.34) величина  $\beta$  есть мнимая часть показателя преломления (1.9).

Рассеяние в скользких углах может рассматриваться как частный случай дифракции при скользких углах падения (GID) для малых углов. Геометрия эксперимента GID аналогична геометрии GISAXS. Варьирование глубины проникновения затухающего волнового поля осуществляется путем изменения угла падения  $\theta_i$  в области значений, близких к  $\theta_{cr}$ , что делает этот метод поверхностно - чувствительным. В отличие от GISAXS, для угла  $\psi$  обычно выбирается большее значение, приблизительно  $\psi \geq 5^\circ$ . Метод GID, применяющийся для исследования поверхностей в плоскости  $xu$ , может рассматриваться в качестве дополняющего метода исследования тонких пленок и приповерхностных слоев к РР, который применяется для исследования структуры пленок по глубине (вдоль оси  $z$ ).

В целом, и GID, и GISAXS, применяются для изучения структуры и текстуры молекулярных пленок на водной поверхности, в том числе органических и биоорганических пленок [119].

В [120] GID применялся для исследования конденсированной фазы ленгмюровских монослоев жирных кислот на границе раздела воздух/вода с целью тщательного извлечения структурных факторов с последующим подгонкой молекулярных параметров, в результате чего была показана потенциальная возможность использования данного метода для получения информации о структуре, близкой к атомному разрешению.

С помощью GID исследовалось влияние, оказываемое ионами металлов на ленгмюровские монослои жирных кислот на границе раздела воздух/вода. Такие монослои могут использоваться в качестве матриц для выращивания ориентированных кристаллов из растворенных солей. Было показано, что ионы свинца, разбавленные в субфазе, образуют упорядоченный слой толщиной около 5 Å, при этом не проникая в сам органический слой [121].

Так как рентгеновская дифракция широко используется для определения структур макромолекул, представляющих биологический интерес, таких как ДНК, белки и биологические комплексы, то GID применяется для исследования двумерных структур, образованных этими молекулами.

В работе [122] изучались двумерные ансамбли, сформированные белком стрептавидином, который связывался монослоем биотинилированного липида на границе раздела воздух/вода. Было показано, что сжатие монослоя резко изменяло дифракционную картину, указывая на то, что на структуру белка могут сильно влиять внешние параметры, такие как латеральное давление или плотность. С помощью анализа ширины пиков было показано, что агрегаты, состоящие из 100 мономеров, способствуют дифракции.

Также с помощью дифракции был исследован монослой, образуемый молекулами бактериородопсина (основного белка пурпурной мембраны) на поверхности воды в ленгмюровской ванне [123]. Разрешение, достигнутое в

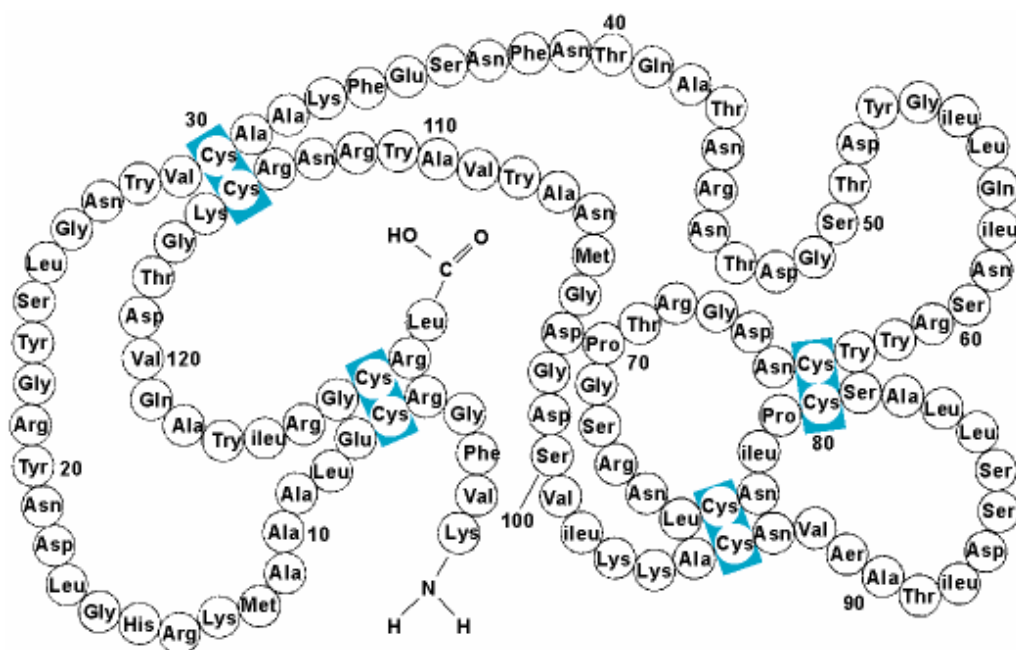
эксперименте, составило приблизительно 9 Å при исследовании кристаллитов, образуемых белком на поверхности жидкости.

В [124] GISAXS с микрофокусной линией луча использовался для изучения влияния температуры на реорганизацию белка, происходящую в многослойной белковой пленке ЛШ для ферментов ацилазы, пенициллина G и уреазы. Было показано, что после нагревания и охлаждения происходит резкое увеличение дальнего порядка в многослойных белковых пленках, что ранее также было показано для пленок белков иммуноглобулина, тиоредоксина, цитохрома P450 и бактериородопсина [125].

### **1.3. Исследование тонких пленок и монослоев на основе белка лизоцима**

Лизоцим белка куриного яйца (HEWL) [126] является небольшим глобулярным водорастворимым белком с молекулярной массой 14.3 кДа, который имеет в своем составе 129 аминокислотных остатков и 4 дисульфидные связи (Cys6 - Cys127, Cys30 - Cys115, Cys64 - Cys80, Cys76 - Cys94) (*рис. 1.16*). Интерес к исследованию лизоцима как модельного объекта, в том числе и для изучения процессов адсорбции и особенностей формирования ленгмюровских монослоев на его основе, обусловлен прежде всего достаточно широким интервалом условий его стабильности и функционирования в качестве фермента. Также этот белок также широко используется для исследования механизмов кристаллизации и роста белковых кристаллов.





*Рис. 1.16. Аминокислотная последовательность яичного белка лизоцима. Показаны С и N - концевые остатки и дисульфидные связи [127].*

Лизоцим интересен с технологической точки зрения, так как недавно [128] было обнаружено, что кристаллы лизоцима моноклинной и тетрагональной сингонии способны проявлять прямой пьезоэлектрический эффект и пироэлектрический эффект (только моноклинной сингонии), что в перспективе может быть использовано при создании сенсоров на основе пьезоэффекта.

Лизоциму посвящен большой ряд работ по изучению процессов адсорбции на различных границах раздела, в том числе и на границе жидкость/твердая поверхность [19,21,31,129–131]. В частности, в ряде работ с помощью применения РР показано, что глобулярные белки, в том числе и лизоцим, при адсорбции из водного раствора на поверхность, обладающую гидрофильными свойствами, не подвергаются денатурации, в отличие от адсорбции на гидрофобные поверхности [19,23]. Структурная конформация молекул лизоцима, адсорбированных на границе раздела гидрофильный кремний/жидкость, определяется электростатическим отталкиванием молекул в слое, величина которого определяется поверхностной концентрацией белка и поверхностным зарядом молекул при заданном значении водородного показателя рН. Изменение ориентации молекул происходит только тогда, когда концентрация молекул на поверхности достаточно высока, чтобы преодолеть отталкивание между

молекулами. Адсорбированный лизоцим сохраняет свою третичную структуру на кремнии, и значительной денатурации не происходит [21]. Эти данные показывают, что структурные изменения, вызываемые адсорбцией, не приводят к разрушению белка на гидрофильной поверхности.

Важными параметрами, оказывающими влияние на формирование белковых монослоев, являются водородный показатель рН и температура. Так, в зависимости от значения рН молекула белка может иметь положительный, отрицательный или нулевой заряд (тогда говорят, что белок находится в своей изоэлектрической точке). Имея тот или иной поверхностный заряд их молекулы, белки могут претерпевать различные конформационные изменения в процессе адсорбции на границе воздух/жидкость. рН также оказывает влияние на взаимодействие между молекулами белка, что в свою очередь влияет на конечную структуру монослоя. Температура является важным фактором, влияющим на свойства белков, а в случае ферментов на их каталитическую активность. Таким образом, при осуществлении формирования монослоев белков важно контролировать температуру субфазы и температуру окружающей среды.

В работе [26] с помощью РР исследовался процесс адсорбции ряда глобулярных белков, в том числе лизоцима, на гидрофильных кремниевых подложках и подложках с гидрофобным покрытием. Показано, что поверхности, обладающие гидрофильными свойствами, являются более предпочтительными для сохранения нативной структуры белковой молекулы. При нейтральном рН среды слой лизоцима имеет толщину 4 нм, что совпадает с размером глобулы белка [132], в то время как в сильно щелочной среде при рН 11 толщина адсорбированного слоя увеличивается до 6 нм, что можно объяснить уменьшением практически до нуля поверхностного заряда молекулы лизоцима (такое рН практически равно значению изоэлектрической точки лизоцима, которая равна порядка 10.7 [133]).

В рассмотренных выше работах показано, что глобулярные белки и, в частности, лизоцим при адсорбции из водного раствора на поверхность, обладающую гидрофильными свойствами, не денатурируют, тем самым

формируя слои с преимущественной ориентацией молекул белка. Это было показано при условиях, соответствующих физиологическим, и при добавлении в раствор добавки в виде ионов солей.

В ряде работ на примере белка лизоцима рассмотрено влияние различных неорганических солей, являющихся сильными электролитами, на монослой белка [134–137]. В общем случае было показано, что ионы солей ведут к увеличению толщины адсорбированного монослоя, в тоже время уменьшая поверхностную плотность белка, что говорит о значительном изменении конформации молекул лизоцима на границе воздух/жидкость.

В работе [137] проведено исследование процесса адсорбции лизоцима в концентрированном солевом растворе. В частности, был исследован эффект «высаливания», проявляющийся на границе воздух/жидкость при добавлении в раствор солей. Эффект «высаливания» заключается в том, что гидратированные ионы солей уменьшает число доступных для взаимодействия с белком молекул воды. Растворимость белка – макроскопическое свойство, проявляющееся вследствие различных молекулярных взаимодействий, таких как взаимодействия между молекулами белка, молекулой белка и ионом, ионом и водным окружением и молекулы белка с водой, и к тому же зависящее от температуры, рН, типа ионов и концентрации. Показано, что молекулы белка претерпевают конформационное изменение в присутствии солевых ионов на водной поверхности, причем степень этого изменения зависит от рН раствора. Степень адсорбции лизоцима при рН ниже изоэлектрической точки уменьшается, что говорит о наличии сильного отталкивания между белковыми молекулами.

Относительная небольшая масса лизоцима и наличие четырех дисульфидных связей определяют жесткость его структуры. Это, по предположению [138], способствует тому, что молекула лизоцима претерпевает медленное разворачивание ее структуры («unfolding») на границе воздух/жидкость, что делает ее достаточно устойчивой относительно больших временных интервалов.

Получение монослоев лизоцима в общем случае связано с тем, что достижение гомогенности монослоя чаще всего обеспечивается с помощью

факторов, которые приводят к потере молекулой ее вторичной и третичной структуры, то есть разворачиванию аминокислотных остатков и значительному изменению конформации белковой молекулы (так называемая «поверхностная денатурация»). Такими факторами чаще всего оказываются использование субфазы с высокой концентрацией каких-либо дополнительных добавок (например, неорганической соли) или со значением рН, близким к изоэлектрической точке белка, что уменьшает растворимость белка в первом случае и приводит к потере поверхностного заряда белковой молекулы. Также на гомогенность слоя влияет время, которое проходит между нанесением монослоя на поверхность жидкости и началом его сжатия. Так, в [139] показано, что за время, приблизительно равное трем часам, молекула лизоцима на поверхности воды при определенном значении концентрации белка способна полностью утратить свою третичную структуру.

В работе [136] методом РР исследовано формирование монослоев лизоцима на границе воздух/жидкость в присутствии ионов солей в зависимости от типа аниона. Так, известно, что ионы по степени, оказываемой на растворимость белка, формируют лиотропные ряды, так называемые ряды Гофмейстера [140–146]. При значении рН ниже изоэлектрической точки молекула лизоцима имеет положительный поверхностный заряд; таким образом, влияние анионов, вероятно, будет иметь более сильный эффект, нежели катионов. Так, было показано, что анионы действительно оказывают различное влияние на конформацию молекул в слое при их высокой концентрации в субфазе. Было сделано предположение, что молекулы лизоцима и анионы могут формировать нерастворимые комплексы друг с другом, которые затем ведут к кристаллизации.

Ленгмюровская технология также широко используется для формирования пленок лизоцима на твердых подложках. В частности, в [47] были проведены получение и изучение термостабильности многослойных пленок лизоцима, сформированных на кремниевых подложках. Получение пленок было произведено с помощью переноса ЛШ, количество слоев в пленках варьировалось от 100 до 200. Влияние термической обработки на структуру пленок было

исследовано с помощью Фурье-спектроскопии в инфракрасной области. Показано, что вплоть до 100° С происходит удаление из пленки воды, не полностью связанной водородными связями. Интенсивность полос в спектре не изменялась по мере нагревания до 150° С, – пленка сохраняла свою структуру. При повышении температуры до 200° С наблюдалось небольшое снижение интенсивности, что указало на нарушение структуры пленок. При температуре 250° С наблюдалось сильное снижение интенсивности, что говорило о термической деградации пленок лизоцима.

В работе [147] с помощью контроля изотерм сжатия и АСМ исследовано взаимодействие лизоцима и монослоев цвиттер-ионных липидов ДПФХ и дипальмитоилфосфатидилэтаноламина в процессе адсорбции. В результате анализа показано, что высота и диаметр белковых кластеров, адсорбированных на поверхности липидов, находятся в диапазоне 3.7–13.9 нм и 47.5–66.8 нм соответственно. Также показано, что лизоцим оказывает влияние не только на конформацию липидного монослоя, но и на процесс его самоорганизации (что согласовывалось с результатами анализа зависимостей поверхностного давления от времени).

#### **1.4. Исследование влияния, оказываемое осадителем, на структуру раствора лизоцима и других белков**

Неорганические соли слабых кислот, например, хлорид натрия (NaCl) используются в качестве кристаллизационных агентов – осадителей, для получения кристаллов различных белков, в том числе и лизоцима [148]. По предложению ряда авторов, добавление соли оказывает влияние на взаимодействие белковых молекул между собой, изменяя характер этого взаимодействия от отталкивания (в чистом растворе белка) к притяжению (с добавлением осадителя) [149,150]. Для исследования растворов белков наиболее эффективным методом исследования является малоугловое рассеяние рентгеновских лучей (МУРР) и нейтронов (МУРН). Эти методы позволяют исследовать вещества самой разнообразной структуры, содержащие неоднородности с размерами в диапазоне 1–10<sup>3</sup> нм, что делает растворы белков

подходящими объектами для изучения [151]. Малоугловое рассеяние позволяет получать информацию об общей форме и структурных переходах биологических макромолекул и их комплексов в растворе путем моделирования трехмерной структуры на основе измеренного профиля одномерного рассеяния [152,153] (рис. 1.17).

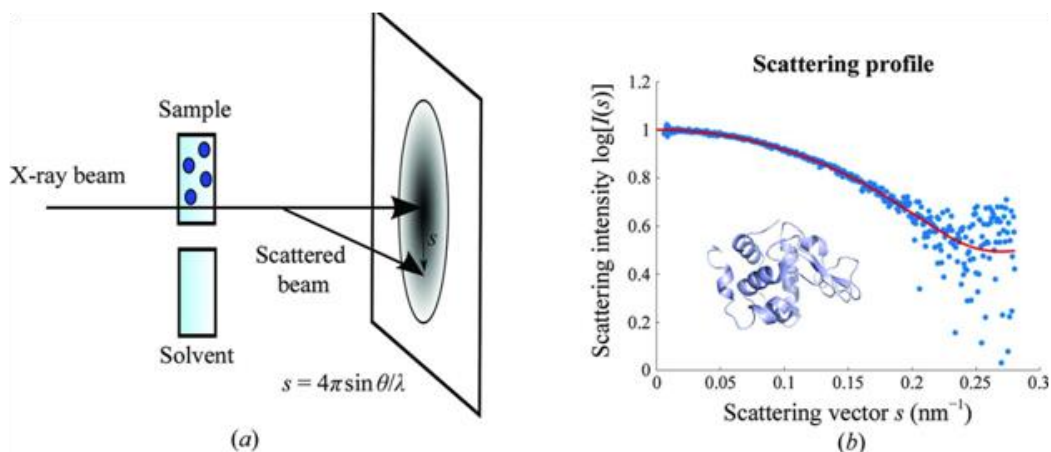


Рис. 1.17. (а) Схема эксперимента МУРР. Макромолекулярный раствор подвергается воздействию коллимированного монохроматического пучка рентгеновских лучей, и в результате регистрируется угловая зависимость рассеянного излучения. (б) Профиль рассеяния от раствора лизоцима. Условия эксперимента приведены в [152].

Этот метод особенно подходит для исследования гибких и неупорядоченных белков, не имеющих выраженной пространственной структуры, больших биомолекулярных комплексов и олигомерных смесей, а также кинетики процессов, протекающих в нативных условиях, которые трудно исследовать с помощью других методов структурной биологии.

Различные группы исследователей использовали МУРР и МУРН, а также их комбинацию, для исследования белковых растворов с целью изучения механизмов кристаллизации, где в большинстве случаев указывалось на увеличение размеров частиц и образование агрегатов в белковом растворе в условиях кристаллизации, что отражалось на увеличении радиуса инерции [154,155]. Однако структура таких агрегатов не была определена.

В работах [156–159] с помощью применения методов МУРР и МУРН обнаружено, что в растворе лизоцима при добавлении осадителя NaCl в условиях

кристаллизации лизоцима тетрагональной сингонии образуются олигомерные частицы лизоцима, димеры и октамеры, состоящие соответственно из объединения двух и восьми молекул (мономеров) лизоцима. В работах [156,157] показано, что по мере увеличения температуры количество олигомеров в растворе уменьшалось, особенно сильный эффект изменения температуры наблюдали для октамеров. Полученные результаты показали высокую вероятность того, что единицей роста кристалла лизоцима может являться октамер. Дальнейшее изучение растворов лизоцима методом МУРН при добавлении осадителя NaCl и варьировании таких параметров, как температура и концентрация белка, показало, что увеличение концентрации белка также приводит к увеличению объемной концентрации октамеров в растворе [159]. Использование в качестве растворителя тяжелой воды ( $D_2O$ ) также оказывает заметное влияние на процентное содержание октамеров, что связано, по всей видимости, с изменением растворимости белка [158]. На основании результатов проведенных исследований определено, что в растворе лизоцима в условиях кристаллизации тетрагональной фазы образуются олигомеры, в том числе и октамеры, которые могут являться элементарными структурными единицами будущего кристалла. Для кристалла лизоцима тетрагональной сингонии предложена структура октамеров, являющихся упорядоченными единицами, путем трансляции которых может быть построена кристаллическая решетка. В работе [160] с помощью молекулярного моделирования промоделирована динамика октамеров двух типов, один из которых формируется путем вращения асимметричного элемента вокруг винтовой оси  $4_3$ , а другой – вращением вокруг винтовой оси 2 порядка четырех димеров. Показано, что в присутствии осадителя стабилен октамер с винтовой осью симметрией  $4_3$ , в то время как другой диссоциирует на составные элементы как в присутствии, так и в отсутствие осадителя.

Для подтверждения предположения, является ли образование олигомеров в растворе на начальной стадии кристаллизации общим свойством процесса кристаллизации белков или их группы, методом МУРР был исследован ряд других модельных белков: протеиназы К и термолизина [161,162]. Для растворов

исследуемых белков показано, что, как и в случае лизоцима, при добавлении осадителя в условиях кристаллизации также образуются олигомеры; в случае протеиназы К этими олигомерами являются димеры, а в случае термолизина – гексамеры. Однако вопрос об образовании олигомеров как необходимом условии для дальнейшего роста кристаллов остается все еще открытым и требует дальнейшего изучения.

### **1.5. Заключение**

Белки ввиду наличия множества функций, выполняемыми ими в живой природе, являются перспективным материалом для их использования в качестве функциональных единиц при конструировании таких устройств, как биосенсоры. Например, такое устройство, как биоэлектронный нос, имитирующее обонятельную систему человека, состоит из белковой части - обонятельного рецептора, и сенсорной платформы, считывающей сигнал при акте воздействия детектируемого вещества. Потребности в разработке более чувствительных датчиков путем усовершенствования их элементной базы привели исследователей к разработке наиболее эффективных методов организации молекул белков в виде слоевого ансамбля, что позволяет наиболее эффективно организовать связь белковых молекул с поверхностью.

Однако трудности получения белковых слоев вызваны прежде всего сложностью структурной организации белковой молекулы, которая чрезвычайно чувствительная к условиям внешней среды. Важность контроля условий, в которых белок сохраняет свою вторичную и третичную структуру, обусловлена тем, что функции, выполняемые белком, напрямую зависят от его структуры. К способам получения белковых пленок, которые позволяют сохранять нативное состояние белка, относятся адсорбция на границе раздела фаз, технология ЛБ/ЛШ, послойное осаждение. Эти методы позволяют формировать моно- и многослойные структуры с сохранением конформационного состояния белковой молекулы, однако в случае, например, адсорбции, контроль толщины и молекулярной ориентации пленок вызывают трудности в виду специфики самого метода. По этой причине наиболее привлекательным методом выглядит



ленгмюровская технология, которая позволяет формировать упорядоченные органические и биоорганические слои с возможностью контроля их толщины и состава.

Для исследования структуры белковых пленок применяется широкий набор методов, среди которых особое распространение получили методы с использованием рентгеновского и синхротронного излучения. К числу таких методов относятся РР, позволяющая получать информацию о толщине, электронной плотности и шероховатости тонких пленок и поверхностных слоев, и метод СРВ в ПВО, заключающийся в одновременной регистрации рентгеновского отражения и выхода вторичного излучения, что позволяет с атомарным разрешением определить положение атомов в слое. Этим обусловлено применение СРВ в ПВО в исследовании взаимодействия органических, в том числе и белковых, слоев с различными ионами.

В ряде работ изучалось формирование слоев модельного белка лизоцима на различных поверхностях и границах раздела при варьировании внешних условий и ионного состава водной среды. В результате было показано, что добавление таких добавок, как соли-электролиты, способно оказывать сильное влияние на взаимодействия между белковыми молекулами, что в ряде случаев при определенных условиях приводило к изменению толщины и плотности сформированных белковых слоев. Однако изучение влияния солей на формирование слоев лизоцима основывалось на методах, которые не позволяли непосредственно определять положение анионов и катионов относительно слоя лизоцима. Важность изучения влияния, которое оказывают неорганические соли на взаимодействия между молекулами белка, связана еще с тем фактом, что соли используются в качестве осадителей для кристаллизации белков.

Множество работ посвящено исследованию влияния осадителя на молекулы белков и факторов, влияющих на кристаллизацию. Так, показано, что добавление в раствор лизоцима осадителя в условиях кристаллизации приводит к образованию в растворе олигомеров белка, в том числе и октамеров, которые, по

предположению ряда авторов, являются единицами роста будущего кристалла белка.

Таким образом, участие таких олигомеров для формирования белковых пленок с упорядоченной структурой может привести к созданию нового типа гибридных систем и сенсоров, в которых в качестве функциональных элементов будут использоваться не одиночные молекулы белка, а изначально упорядоченные белковые комплексы.

## ГЛАВА 2. МЕТОДИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

### 2.1. Методика получения образцов

#### 2.1.1. Приготовление растворов

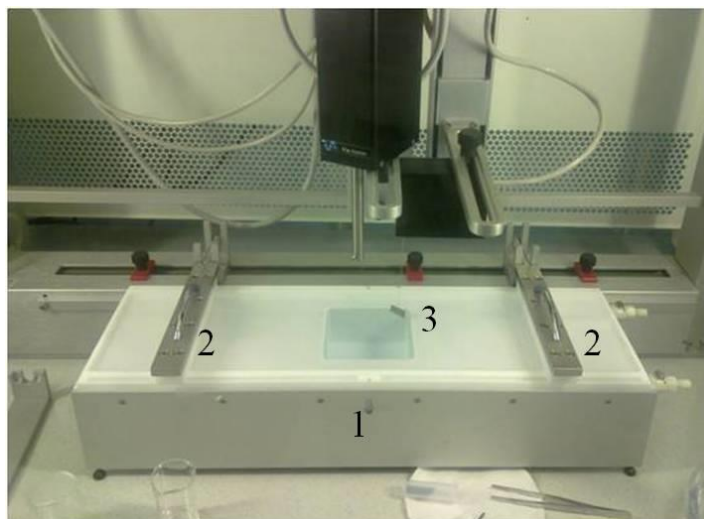
Для приготовления растворов использовали: белок лизоцим куриного яйца (CAS#12650–88–3, Sigma-Aldrich) и ацетат натрия (CAS# 6131–90–4, Helicon). В качестве буфера использовали натрий - ацетатный буфер (0.2 М  $\text{CH}_3\text{COONa}/\text{CH}_3\text{COOH}$ , pH 4.5, далее - буфер). Для приготовления растворов использовали сверхчистую воду (сопротивление воды 18 МОм\*см), полученную с помощью системы Simplicity 185 (Millipore). В качестве осадителей на различных этапах исследований использовались следующие неорганические соли: хлорид натрия ( $\text{NaCl}$ , CAS# 7647–14–5, Helicon), хлорид калия ( $\text{KCl}$ , CAS # 7447-40-7, abcr GmbH) и йодид калия ( $\text{KI}$ , CAS # 7681-11-0, Sigma-Aldrich).

Общий способ приготовления растворов, используемых в работе, был следующим. Белок с начальной концентрацией 80 мг/мл растворяли в буфере. Для исключения из раствора крупных частиц и агрегатов полученный маточный раствор фильтровали с помощью мембранных фильтров (Millex) с диаметром пор 0.22 мкм, затем центрифугировали в течение 10 мин с частотой 10000 об./мин. Растворы осадителей требуемой начальной концентрации (которая варьировалась исходя из задач эксперимента) растворяли в том же буфере, что и сам белок, далее его фильтровался с помощью мембранных фильтров (Millex) с диаметром пор 0.22 мкм. Для получения монодисперсного раствора лизоцима (т.е. раствора, содержащего только мономеры) раствор белка начальной концентрации разводили путем добавления буфера до достижения требуемой концентрации. Полидисперсный раствор лизоцима (т.е. раствор, в котором образуются олигомеры) готовили следующим образом: раствор белка начальной концентрации смешивали с раствором осадителя в объемной соотношении 1:1 (в равных пропорциях). Полученный в результате смешения раствор содержал концентрации белка и осадителя в два раза меньше исходных. Далее этот раствор

использовался для формирования монослоев на поверхности водной субфазы в ленгмюровской ванне и получения белковых пленок на твердых подложках.

### *2.1.2. Формирование ленгмюровских монослоев и получение белковых пленок на твердых подложках*

Получение пленок из растворов лизоцима происходило с помощью ленгмюровской технологии. Формирование монослоев на поверхности водной субфазы проводилось на автоматизированной установке KSV5000 LB (KSV Instruments), которая состоит из односекционной кюветы (ленгмюровская ванна) и двух барьеров, расположенных идвигающихся симметрично относительно друг друга по краям ванны, управляемых с помощью шаговых двигателей (рис. 2.1).



*Рис. 2.1. Фотография установки KSV5000 LB. 1 – ленгмюровская ванна, 2 – подвижные барьеры, 3 – весы Вильгельми.*

Ванна и барьеры изготовлены из полимера политетрафторэтилена (тефлон). Данный материал обладает низкой адгезией и не смачивается ни водой, ни жирами, ни большинством органических растворителей, что обеспечивает высокую химическую инертность и предотвращает утечку субфазы. Площадь рабочей поверхности ванны составляет  $750 \text{ см}^2$ , диапазон скоростей движения барьеров составляет от  $0.01$  до  $400 \text{ мм/мин}$ . Также установка оборудована датчиком поверхностного давления (весы Вильгельми) для контроля величины поверхностного давления с точностью до  $0.01 \text{ мН/м}$ . Перед нанесением вещества поверхность субфазы очищалась с помощью специального наноса.

В качестве субфазы для формирования монослоев лизоцима использовалась ультрачистая вода Millipore. Монодисперсный и полидисперсный растворы лизоцима объемами соответственно 500 мкл и 1000 мкл наносились на поверхность субфазы с помощью стеклянного микрошприца Hamilton. Сразу после нанесения раствора происходило сжатие монослоя с помощью барьеров со скоростью 20 мм/мин до момента, когда поверхностное давление достигнет значения 14 мН/м (рис. 2.2). После достижения указанного значения происходил перенос сформированного слоя на кремниевую подложку методом ЛШ («горизонтальное касание»).

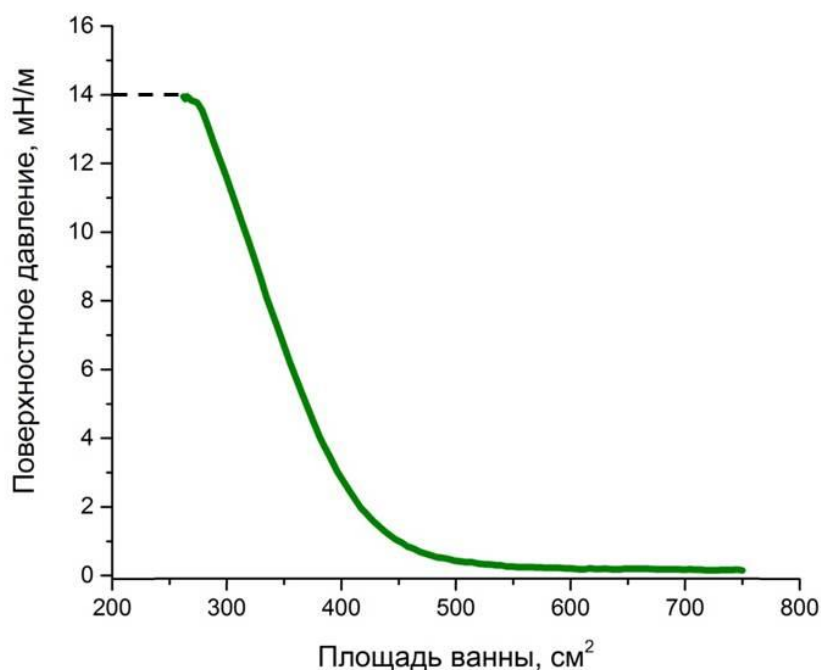


Рис. 2.2. Изотерма сжатия монослоя лизоцима.

Подложки были изготовлены из кремниевой пластины толщиной  $380 \pm 15$  мкм ориентации [100] с гидрофильной поверхностью («Протон Альфа»). Площадь подложек составляла порядка  $1.5 \times 2$  см<sup>2</sup>.

Сразу после переноса образцы помещались в специальную герметичную ячейку, сконструированной по типу кристаллизационной ячейки, которая ранее использовалась для исследования роста кристаллов белков на твердой подложке [163]. Данная ячейка обеспечивает химическую чистоту и позволяет сохранять молекулы белка в их нативном состоянии (рис. 2.3). Корпус ячейки сделан из тефлона, верхняя часть ячейки представляет из себя окно из материала,

прозрачного для света и слабо-поглощающего в рентгеновском диапазоне, что позволяет проводить рентгеновские исследования полученных пленок лизоцима непосредственно в самой ячейке. Загрузка образца происходила следующим образом: в колодец ячейки наливался раствор осадителя начальной концентрации, которая использовалась ранее для приготовления смешанного раствора белка с осадителем. Объем раствора осадителя, помещенного в углубление, составлял 500 мкл. После этого в ячейку помещался образец.

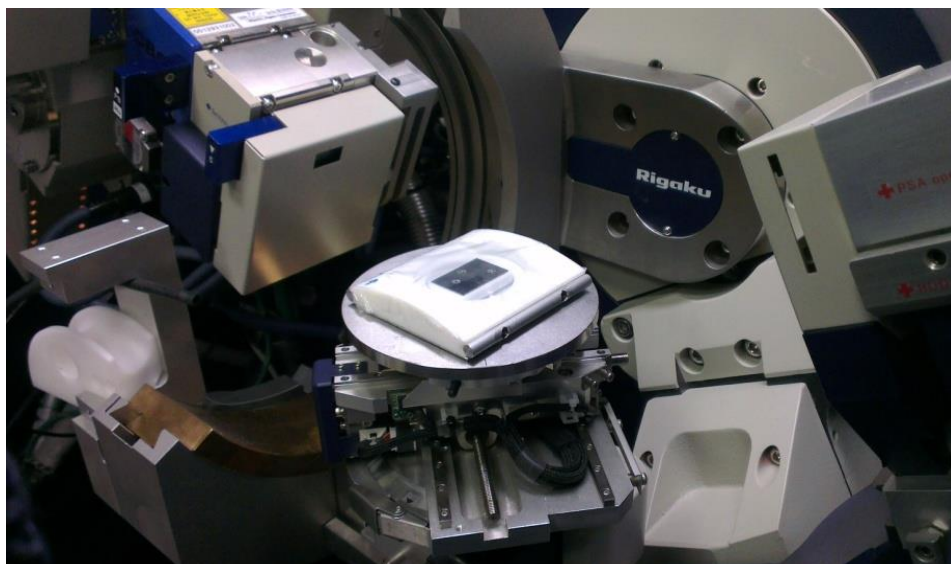


*Рис. 2.3. Герметичная ячейка с помещенным внутрь нее образцом.*

## **2.2. Методика проведения исследований белковых пленок на твердых подложках**

### *2.2.1. Рентгеновская рефлектометрия*

Экспериментальные кривые рентгеновской рефлектометрии получены на дифрактометре SmartLab (Rigaku), оснащенном источником излучения с вращающимся молибденовым анодом мощностью 9 кВт (рис. 2.4). Использовалась спектральную линию  $\text{MoK}\alpha_1$  (энергия 17.5 кэВ), интенсивность пучка регистрировал NaI-детектор. В плоскости рассеяния приемные щели обеспечивали угловое разрешение  $0.012^\circ$ , в поперечном направлении падающий пучок засвечивал весь образец.



*Рис. 2.4. Дифрактометр SmartLab (Rigaku) с герметичной ячейкой, в которую помещен образец.*

### *2.2.2. Стоячие рентгеновские волны в области полного внешнего отражения.*

Так как исследуемая в работе система (раствор белка и сформированная на его основе белковая пленка) содержит в своем составе такие элементы как сера (S), входящая в состав ряда аминокислотных остатков белка, а также компоненты осадителей (анионы и катионы), то это позволяет провести структурные исследования белковой пленки СВВ в области ПВО. Форма угловой зависимости зеркальной компоненты рентгеновского отражения дает информацию о распределении общей электронной плотности по нормали к поверхности, которая определяет распределение СВВ. Угловая зависимость выхода рентгеновской флуоресценции атомов определенного сорта определяется как профилем распределения данного элемента по глубине, так и распределением интенсивности СВВ.

Для анализа экспериментальных данных применяли следующий подход. Исследуемые образцы представляли в виде слоистых систем, характеризующихся определенным профилем распределения электронной плотности по глубине. Каждый слой такой системы задавали следующим набором параметров: толщина; электронная плотность, определяемая поляризуемостью слоя; неидеальность верхней межслоевой границы, обусловленная размытием межслойных границ; концентрация атомов S и компонентов осадителя. Методом рекуррентных

соотношений Парратта [83] проводили теоретический расчет рефлектометрии для данной слоистой модели. На основе заданного профиля распределения электронной плотности рассчитывали распределение СВВ и в рамках дипольного приближения получали теоретические угловые зависимости выхода флуоресценции. Подбор параметров слоистой системы производился с учетом соответствия минимуму функции оценки расхождения теоретических и экспериментальных зависимостей ( $\chi^2$ ). Путем минимизации расхождения между экспериментальной и теоретической кривыми с помощью алгоритма Левенберга–Марквардта [164] были получены профили распределений электронной плотности и элементов в системе (S, Cl, K и I), соответствующие в большей степени экспериментальным данным.

Исследования методом СВВ в области ПВО проводили на синхротронной станции «РКФМ» («КИСИ-Курчатов», НИЦ «Курчатовский институт»). Использовали монохроматическое излучение с энергией 12 кэВ, для монохроматизации применяли двукратный монохроматор Si (111). Пятно засветки пучка на поверхности образца устанавливали с помощью щелей, его размер составлял  $5 \times 0.1$  мм. Флуоресцентный сигнал из пятна засветки регистрировал SDD-детектор Amptek X123. Одновременно регистрировали угловые зависимости выхода характеристической рентгеновской флуоресценции ( $SK\alpha$ ,  $ClK\alpha$ ) и зеркальной компоненты рентгеновского отражения. Измерения проводили в диапазоне углов падения пучка на образец от  $0^\circ$  до  $0.3^\circ$ . Время набора сигнала в точке составляло 600 с.

### *2.2.3. Атомно-силовая микроскопия*

После проведения измерений методом РР высушенные пленки были исследованы методом АСМ в полуконтактном режиме.

Принцип работы атомно-силового микроскопа основан на регистрации силового взаимодействия между поверхностью исследуемого образца и зондом, называемым кантилевером. Изменение рельефа поверхности приводит к изменению силы, действующей на кантилевер, что проявляется в изменении величины его изгиба. Полуконтактный режим, в котором зонд в нижней точке



своих колебаний касается образца, является наиболее универсальным из методов АСМ, в том числе и для исследования органических образцов.

Исследование методом АСМ проводилось на приборе NTEGRA Prima (NT-MDT). Использован кремниевый зонд типа NA\_НС (резонансная частота 235 кГц, радиус закругления острия менее 10 нм, коэффициент жесткости 12 Н/м). Размеры области сканирования варьировались в пределах от  $1 \times 1$  до  $100 \times 100$  мкм. Максимальная скорость сканирования составляла 30 мкм/с. По изображениям построены профили поверхности и гистограммы распределения высот, определена средняя шероховатость поверхности.

### **2.3. Методика проведения исследования белковых монослоев на поверхности жидкости**

#### *2.3.1. Формирование монослоев лизоцима*

Монослои лизоцима, сформированные из монодисперсного или полидисперсного раствора, были получены в лэнгмюровской ванне NIMA 601A (Nima Technology), изготовленной из тефлона и оснащенной одним подвижным барьером. Поверхностное давление измерялось с помощью весов Вильгельми, сделанных из фильтровальной бумаги Whatman, расположенных на краю ванны, противоположному первоначальному положению барьера. Рабочая площадь ванны составляла  $700 \text{ см}^2$ . Точность измерения поверхностного давления составляла  $\pm 0.1 \text{ мН/м}$ . Перед нанесением монослоя поверхность ванны и барьер очищали хлороформом и этанолом, а затем промывали водой. Образование монослоя происходило при температуре  $20 \text{ }^\circ\text{C}$ .

Монослой лизоцима без осадителя из монодисперсного раствора формировали путем нанесения с помощью автоматической пипетки исходного раствора объемом 500 мкл с начальной концентрацией 80 мг/мл. Сразу после нанесения происходило сжатие монослоя с помощью барьера со скоростью  $30 \text{ см}^2/\text{мин}$  до достижения поверхностным давлением значения  $14 \text{ мН/м}$ .

Для образования монослоя лизоцима с осадителем КС1 из полидисперсного раствора использовали 1200 мкл смешанного раствора лизоцима-КС1 с

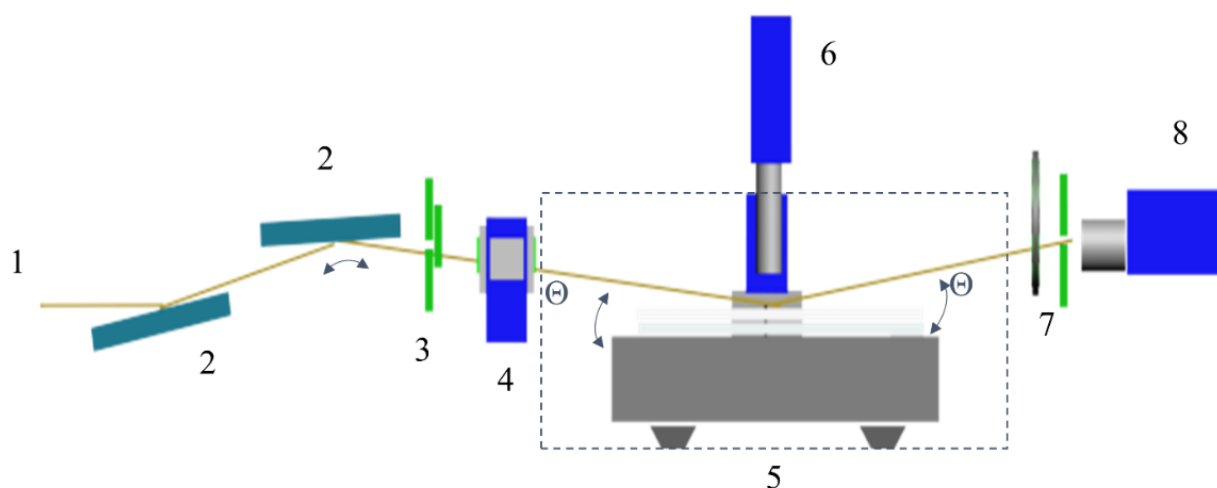
концентрациями белка и соли 40 мг/мл и 25 мг/мл соответственно. Нанесение раствора происходило через 30 мин после начала смешивания. Сразу же после осаждения монослой сжимался подвижным барьером со скоростью 30 см<sup>2</sup>/мин до достижения поверхностного давления  $\pi = 14$  мН/м.

После того, как поверхностное давление в монослоях достигло 14 мН/м, начинали измерение СРВ. В ходе эксперимента поверхностное давление не изменялось и поддерживалось постоянным.

### *2.3.2. Исследование монослоев лизоцима на поверхности жидкости методом стоячих рентгеновских волн в области полного внешнего отражения*

Измерения проводились на станции «Ленгмюр» («КИСИ-Курчатов», НИЦ «Курчатовский институт») (рис. 2.5). Был использован монохроматический рентгеновский луч с энергией 13 кэВ для возбуждения рентгеновской флуоресценции S K $\alpha$ , Cl K $\alpha$  и K K $\alpha$ . Данные рефлектометрии и флуоресценции регистрировались одновременно для углов падения пучка на поверхность жидкости в диапазоне от 0 до 0.13°. Спектры рентгеновской флуоресценции регистрировались с помощью детектора VORTEX SDD, зеркальное отражение рентгеновского излучения регистрировалось сцинтилляционным детектором. Время набора сигнала в каждой точке составляло 300 с. Для уменьшения фонового сигнала флуоресценции от рассеяния на воздухе ленгмюровская ванна помещалась в ячейку с замкнутой атмосферой, заполненной гелием. Для обеспечения доступа к ванне ячейка была оснащена съемным колпаком, который представлял из себя воздухонепроницаемую камеру, изготовленную из оргстекла с окнами из тонкой рентгенопрозрачной фольги и оборудованную каналами для подачи и вывода газов, а также выводом для флуоресцентного детектора, регистрирующее окно которого располагалось параллельно поверхности образца. После нанесения белкового раствора на поверхность водной субфазы в ленгмюровской ванне ячейку закрывали и вводили гелий. Степень замещения воздуха оценивалась путем фиксации уменьшения интенсивности линии Ar K $\alpha$  в флуоресцентном спектре, которая возбуждалась, когда рентгеновский луч проходил через воздух. Синхротронный пучок ориентировали параллельно

поверхности ванны с использованием рентгеновских оптических элементов. Барьер ленгмюровской ванны использовался для сжатия монослоя до заданного значения поверхностного давления, поверхностное давление поддерживалось постоянным во время проведения рентгеновского эксперимента. Для устранения внешних вибраций использовалась вибрационная защита. Измерения проводились при комнатной температуре 20 °С.



*Рис. 2.5. Оптическая схема станции «Ленгмюр». 1 – луч после прохождения монохроматора; 2 – зеркало; 3 – щели; 4 – ионная камера; 5 – ленгмюровская ванна в ячейке с гелием; 6 – SDD детектор; 7 – щель и аттенюаторы; 8 – сцинтилляционный детектор.*

#### **2.4. Методика изучения структуры белковых растворов методом малоуглового рассеяния рентгеновского излучения**

Для получения информации об олигомерном составе раствора лизоцима с добавлением осадителя проведены исследования методом МУРР растворов лизоцима с осадителем KCl и без него (последний в качестве контроля). Концентрация белка в исследуемых растворах была выбрана таким образом, чтобы ослабить влияние межчастичных взаимодействий между молекулами лизоцима в растворе, влияющих на форму кривой рассеяния, в то же время соответствуя кристаллизационным условиям, благоприятным для образования олигомеров. Исследуемый раствор белка с осадителем готовили по следующей схеме: раствор лизоцима с начальной концентрацией 40 мг/мл смешивался с раствором осадителя KCl концентрации 0.4 М в том же буфере при объемном

соотношении 1:1. Таким образом, конечные концентрации белка и соли в растворе составляли 20 мг/мл и 0.2 М соответственно. Раствор белка без осадителя, используемый в качестве контроля, готовился с помощью разведения исходного белкового раствора (с концентрацией 40 мг/мл) буфером в соотношении 1:1.

Измерения проводились на синхротронной станции BM29 BioSAXS [165] (Европейский источник синхротронного излучения, Гренобль, Франция), энергия излучения составляла 12.4 кэВ, рассеяние излучения от образца регистрировалось двухкоординатным детектором Pilatus 1M. Расстояние образец–детектор составляло 2.9 м. Исследуемые образцы помещались в специальную термостатируемую роботизированную систему [166] в кюветы из полистирола объемом 200 мкл. Раствор из кюветы с помощью робота помещали в проточный кварцевый капилляр диаметром 1.8 мм, в котором проводились измерения. Исследуемый раствор равномерно продвигался по капилляру, при этом пучок попадал в одну и ту же точку на капилляре, но все время в новую часть образца. За время движения образца по капилляру было сделано 10 съемок. Время экспозиции каждого измерения составляло 1 с. Сечение пучка на образце составляло 700 мкм<sup>2</sup>. Во время измерений температура капилляра с образцом варьировалась в диапазоне от 30 до 10°C.

Первичную обработку экспериментальных малоугловых данных (радиальное усреднение, нормировку на интенсивность прошедшего пучка, проверку на наличие радиационного повреждения, поправку на чувствительность детектора) проводили с помощью автоматической системы обработки данных SaxsAnalysis [167]. Следующие этапы обработки (усреднение сигнала от буферного раствора, вычитание усредненного сигнала от буфера из экспериментальных данных рассеяния раствором белков и нормировка на концентрацию белка) выполняли с помощью программы PRIMUS [168], входящей в программный пакет ATSAS [169]. В результате были получены обработанные экспериментальные данные зависимости интенсивности  $I$  МУРР от модуля вектора рассеяния  $s$  (где

$s = \frac{4\pi \sin \theta}{\lambda}$ ,  $2\theta$  – угол рассеяния,  $\lambda$  – длина волны) для растворов белка в различных условиях. Угловой диапазон составлял  $0.003 < s < 0.5 \text{ \AA}^{-1}$ . Радиационного повреждения на исследуемых образцах не обнаружено.

Добавление осадителя в раствор лизоцима в определенных условиях приводит к изменению олигомерного состава раствора, когда наряду с мономерными частицами начинают образовываться мультимеры (олигомеры более высокого порядка, например димеры, тетрамеры и так далее). Вследствие этого анализ данных проводился с учетом присутствия нескольких компонентов в системе.

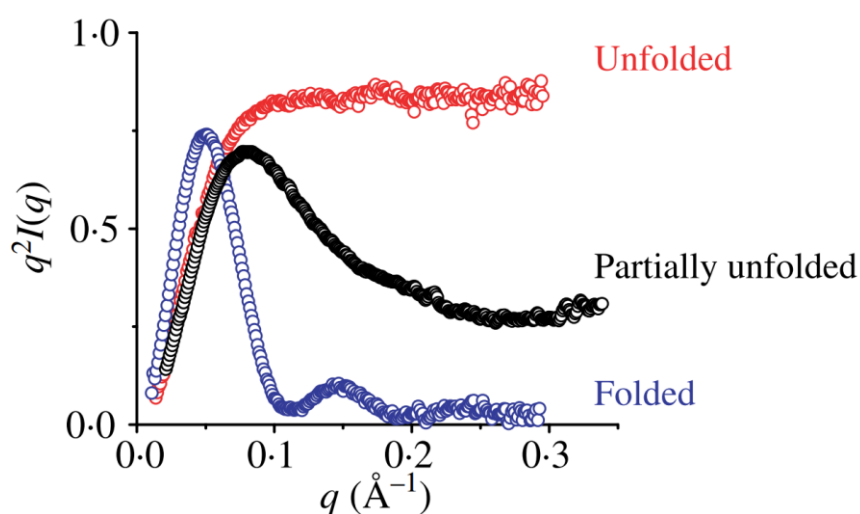
После первичной обработки экспериментальные кривые малоуглового рассеяния обрабатывали с помощью программы OLIGOMER [168] для определения объемных долей мономеров и олигомеров разного порядка. Расчет теоретических кривых олигомерных компонентов проводился с помощью программы CRY SOL [170]. В качестве мономерного компонента была взята известная структура мономера лизоцима (PDB ID: 4WLD), а модели димера, тетрамера, гексамера и октамера получены по методике, описанной в [157]. Качество приближения оценивалось с помощью минимизации невязки  $\chi^2$  между экспериментальными данными и теоретическими модельными приближениями по формуле, приведенной в [171].

Расчет радиуса инерции  $R_g$  проводился в программе OLIGOMER. Для смеси средний радиус инерции определяется радиусами инерции ( $R_{g_i}$ ) каждого отдельного компонента смеси (мономеров и других олигомеров), взвешенными на соответствующие объемные доли ( $\omega_i$ ) и молекулярные массы ( $M_{\omega_i}$ ) компонентов:

$$R_g = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n \omega_i (M_{\omega_i} * R_{g_i})^2}{\sum_{i=1}^n \omega_i * M_{\omega_i}^2}} \quad (2.1)$$

Для определения присутствия в растворе лизоцима денатурированных молекул данные МУРР были построены в координатах Кратки ( $s^2 I(s)$  от  $s$ ).

Такое представление данных позволяет получить информацию о конформации белковой молекулы в растворе. По виду кривой, построенной в координатах Кратки, можно различить, в каком состоянии молекулы белка находятся в растворе (свернутая или развернутая глобула). В качестве примера на *рис. 2.6* показаны графики Кратки нескольких смоделированных профилей рассеяния, полученных с учетом различных возможных конформационных состояний белка [172].



*Рис. 2.6. Смоделированные кривые МУРР для различных конформаций белка: нативная глобулярная (синяя линия), частично-свернутое состояние (красная линия) и развернутая (черная линия) [172].*

Для молекулы белка в нативном состоянии график Кратки (синяя линия) характеризуется наличием большого колоколообразного пика, положение которого в основном определяется средним размером частицы). Когда белок претерпевает переход в полностью развернутую случайную спираль, кривая демонстрирует непрерывный рост в зависимости от вектора рассеяния (черная линия на *рис. 2.6*). Для белка, который имеет полужесткую структуру, график Кратки имеет тенденцию показывать очень большой пик и слегка увеличивающийся профиль в более длинном диапазоне, что указывает на гибкость (красная линия на *рис. 2.6*).

## 2.5. Заключение

Для формирования ленгмюровских монослоев белка лизоцима на поверхности жидкости были использованы монодисперсный и полидисперсный растворы

лизоцима. Дальнейший перенос сформированных монослоев на кремниевые подложки осуществлялся с помощью метода ЛШ («горизонтальный перенос»).

Исследование структурных особенностей пленок белка лизоцима, сформированных из монодисперсного раствора (т.е. раствора, содержащего только мономерные частицы белка) и полидисперсного раствора (раствора, содержащего олигомеры) проводилось следующими методами: РР, СРВ в области ПВО и АСМ.

Рентгеновские исследования белковых пленок на твердых подложках проводилось на лабораторном дифрактометре SmartLab (Rigaku) и на синхротронной станции «РКФМ» («КИСИ-Курчатов», НИЦ «Курчатовский институт»). Исследование методом АСМ проводилось в полуконтактном режиме на приборе NTEGRA Prima (NT-MDT).

Исследования ленгмюровских белковых монослоев на поверхности жидкости методом СРВ в области ПВО были проведены на синхротронной станции «Ленгмюр» (НИЦ «Курчатовский институт»).

Для исследования структуры монодисперсного и полидисперсного белковых растворов был применен метод МУРР. Эксперименты были проведены на синхротронной станции BM29 «BioSAXS» (Европейский источник синхротронного излучения).

### **ГЛАВА 3. СТРУКТУРА ПЛЕНОК ЛИЗОЦИМА НА ТВЕРДЫХ ПОДЛОЖКАХ, ПОЛУЧЕННЫХ С ПОМОЩЬЮ МОДИФИЦИРОВАННОГО МЕТОДА ЛЕНГМЮРА-ШЕФФЕРА ИЗ МОНОДИСПЕРСНОГО И ПОЛИДИСПЕРСНОГО РАСТВОРА БЕЛКА С ДОБАВЛЕНИЕМ ОСАДИТЕЛЯ ХЛОРИДА НАТРИЯ**

Ранее в работах [156,157,173] было показано, что добавление осадителя NaCl к раствору белка лизоцима при соблюдении условий кристаллизации (концентрация белка и осадителя, pH, состав буфера и температура) приводит к процессу образования олигомеров в растворе, в том числе и октамеров лизоцима. Эти октамеры могут принимать непосредственное участие в построении кристалла белка и представляют собой упорядоченные мотивы данного кристалла. В результате было сделано предположение, что образующиеся в растворе октамеры, являясь весьма устойчивыми образованиями [174], принимают участие в процессе формирования монослоя как единые структурные элементы, что должно повлиять на структуру конечной пленки.

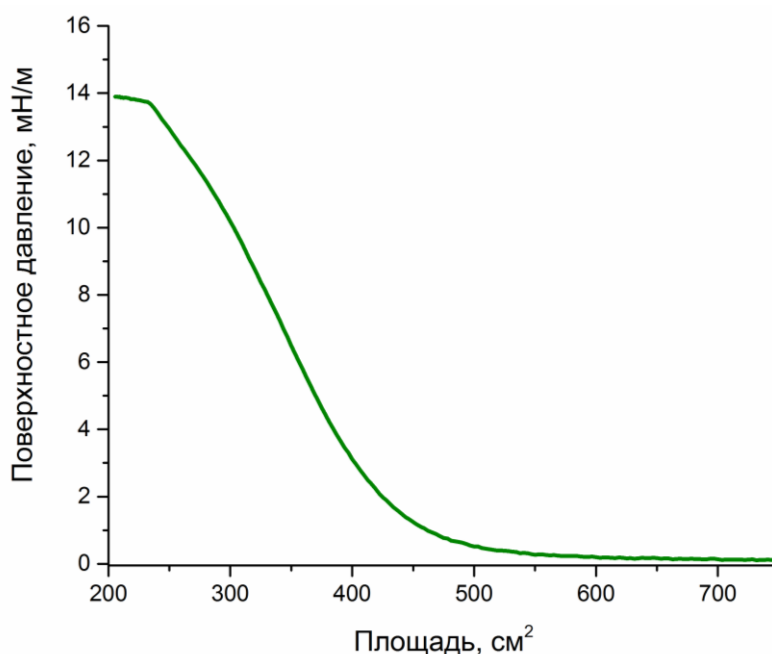
Для проверки этого предположения для формирования белковых монослоев был использован полидисперсный раствор лизоцима, содержащий олигомеры белка. Данный раствор был приготовлен в условиях, соответствующих образованию кристаллов тетрагональной сингонии (осадитель NaCl, концентрации белка и соли). Сформированный монослой переносили на кремниевые подложки методом ЛШ (горизонтально касались подложкой монослоя). Структурные особенности полученных белковых пленок исследовали методами РР, АСМ и СРВ в области ПВО.

#### **3.1. Подготовка образцов**

Монослой лизоцима с осадителем формировали с помощью ленгмюровской ванны KSV 5000 LB (KSV Instruments). Поверхностное давление измеряли с помощью весов Вильгельми с платиновой пластиной. Эксперименты проводили при температуре  $18.5 \pm 0.5^\circ\text{C}$ . Перед экспериментом поверхность ванны очищали этанолом и промывали чистой водой. В качестве субфазы использовали чистую воду. Раствор наносили на предварительно очищенную поверхность субфазы с



помощью автоматической пипетки Eppendorf. Для формирования монослоя лизоцима с осадителем на поверхность субфазы наносили 1000 мкл раствора лизоцима с NaCl. Для приготовления такого раствора за 1 ч до эксперимента маточный белковый раствор смешали с раствором NaCl в равных объемах. Таким образом, концентрации лизоцима и соли в буферном растворе составили 40 и 25 мг/мл соответственно. Такие концентрации белка и осадителя соответствуют условиям кристаллизации лизоцима тетрагональной сингонии. Монослой лизоцима формировали сразу после нанесения раствора, скорость составляла 20 мм/мин, в процессе формирования происходила регистрация изотермы сжатия - зависимости поверхностного давления от площади (*рис. 3.1*). Перенос монослоев на кремниевую подложку осуществляли при фиксированном значении поверхностного давления (14 мН/м) методом ЛШ путем однократного касания поверхности подложки с поверхностью субфазы с монослоем.



*Рис. 3.1. Изотерма сжатия монослоя лизоцима с добавлением осадителя NaCl.*

После переноса монослоя подложку помещали в чашку Петри, которую закрывали парафиновой пленкой (*Рис. 3.2.*), или в специальную кристаллизационную ячейку – в специальное углубление наливали около 1 мл

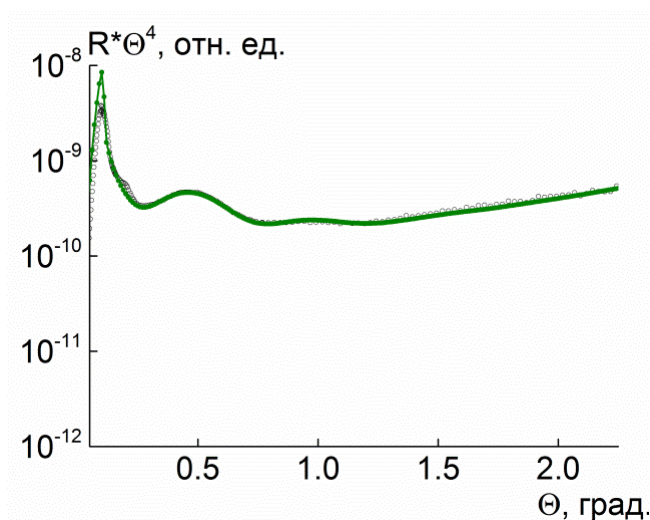
раствора осадителя концентрации 50 мг/мл. Измерения пленок на методом РР осуществлялись с использованием измерительной ячейки.



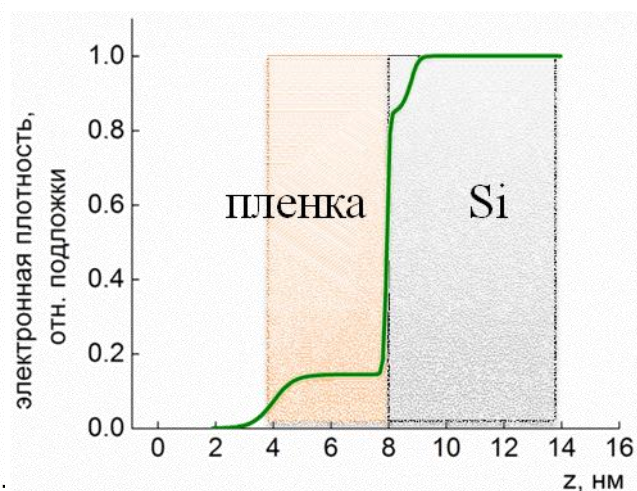
*Рис. 3.2. Образец, помещенный сразу после переноса в чашку Петри.*

### **3.2. Результаты измерений методом рентгеновской рефлектометрии**

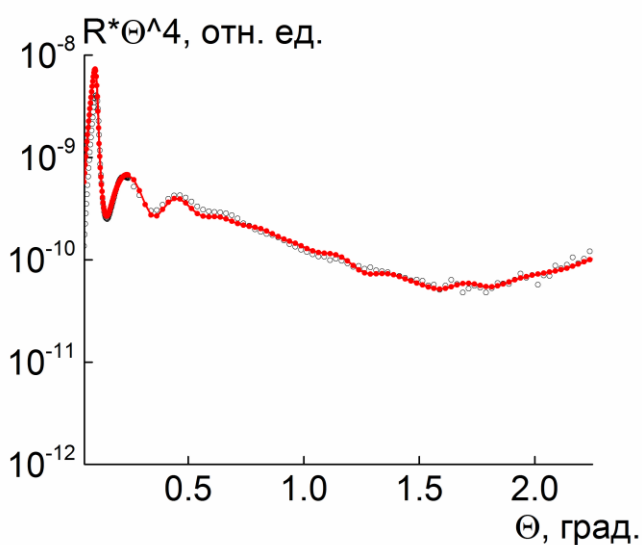
Экспериментальные кривые РР, полученные для пленок лизоцима, представлены на *рис. 3.3 (а, в)*. Кривые приведены для двух типов пленок, сформированных из монодисперсного раствора (зеленая кривая) и полидисперсного раствора с добавлением NaCl (красная кривая). Профили распределения электронной плотности, соответствующие угловым зависимостям РР, представлены на *рис. 3.3 (б, г)*. Профили нормированы на электронную плотность Si подложки. Также приведена экспериментальная кривая РР, соответствующая чистой кремниевой подложке Si (*рис. 3.4 (а)*). Значение невязки  $\chi^2$  между экспериментальными и расчетными кривыми РР для белковых пленок не превышало 4.0, начиная со значения угла падения 0.3 градуса без учета «дрожания» пучка. Для подложки значение  $\chi^2$  не превышало 1.5.



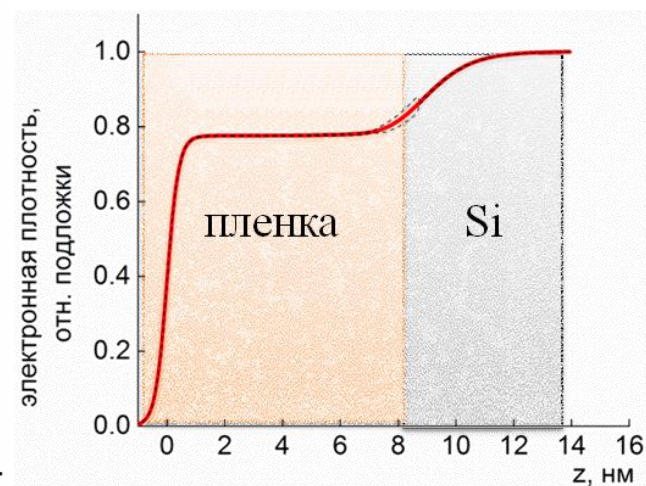
а)



б)



в)



г)

Рис. 3.3. Экспериментальные кривые  $RR$  (черные линии), соответствующие им расчетные кривые (цветные линии) и рассчитанные профили электронной плотности (нормированные на электронную плотность подложки), полученные для: пленки лизоцима, сформированной из монодисперсного раствора ((а, б), зеленые кривые); пленки лизоцима, полученной из полидисперсного раствора с добавлением осадителя  $NaCl$  ((в, г), красные кривые).

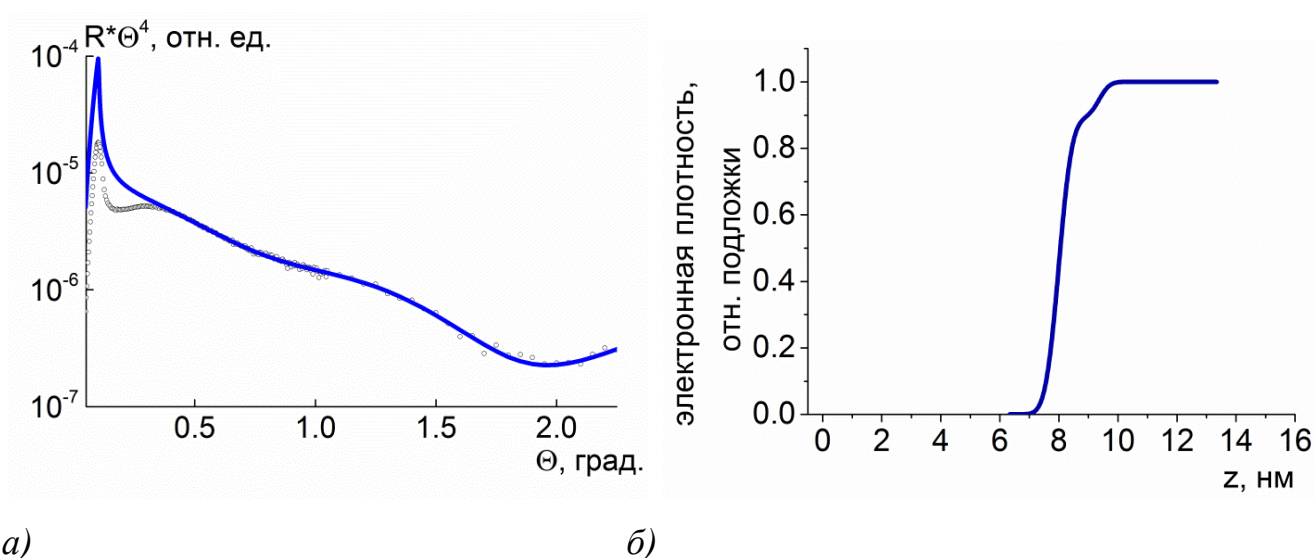


Рис. 3.4. (а) - Экспериментальная кривая  $PP$  (черная линия), соответствующая ей расчетная кривая (синяя линия) и (б) - рассчитанный профиль электронной плотности, полученные для подложки  $Si$  без белковой пленки.

Полученные профили распределения электронной плотности указывают на образование более плотной пленки лизоцима, сформированной из полидисперсного раствора. Толщина сформированной пленки составляет приблизительно  $73 \text{ \AA}$ , что почти в два раза превышает значение толщины пленки, сформированной из раствора чистого белка ( $40 \text{ \AA}$ ). Толщина пленки лизоцима, сформированной на  $Si$  подложке из монодисперсного раствора лизоцима, соответствует усредненному значению диаметра мономера лизоцима.

Плотность пленки, полученной из раствора белка с добавлением осадителя, почти в четыре раза превышает аналогичную величину для белковой пленки без осадителя, из чего можно предположить, что пленка лизоцима, сформированная из полидисперсного раствора, является более однородной и плотноупакованной по сравнению с пленкой лизоцима, сформированной из белкового раствора без добавления  $NaCl$ . Пониженное значение плотности такой пленки указывает на то, что такая пленка имеет «островковую» неоднородную структуру. Также возможно присутствие слоя  $H_2O$  между подложкой и пленкой белка.

Также было проведено исследование процесса формирования белковых пленок на твердых подложках непосредственно после их переноса с поверхности субфазы. Экспериментальные кривые  $PP$  были зарегистрированы после переноса пленок лизоцима и лизоцима с осадителем  $NaCl$  по истечении времени 6, 12 и 20

часов после осуществления переноса их на твердые подложки (рис. 3.5.). В период проведения съемки образцы находились в герметичной ячейке.

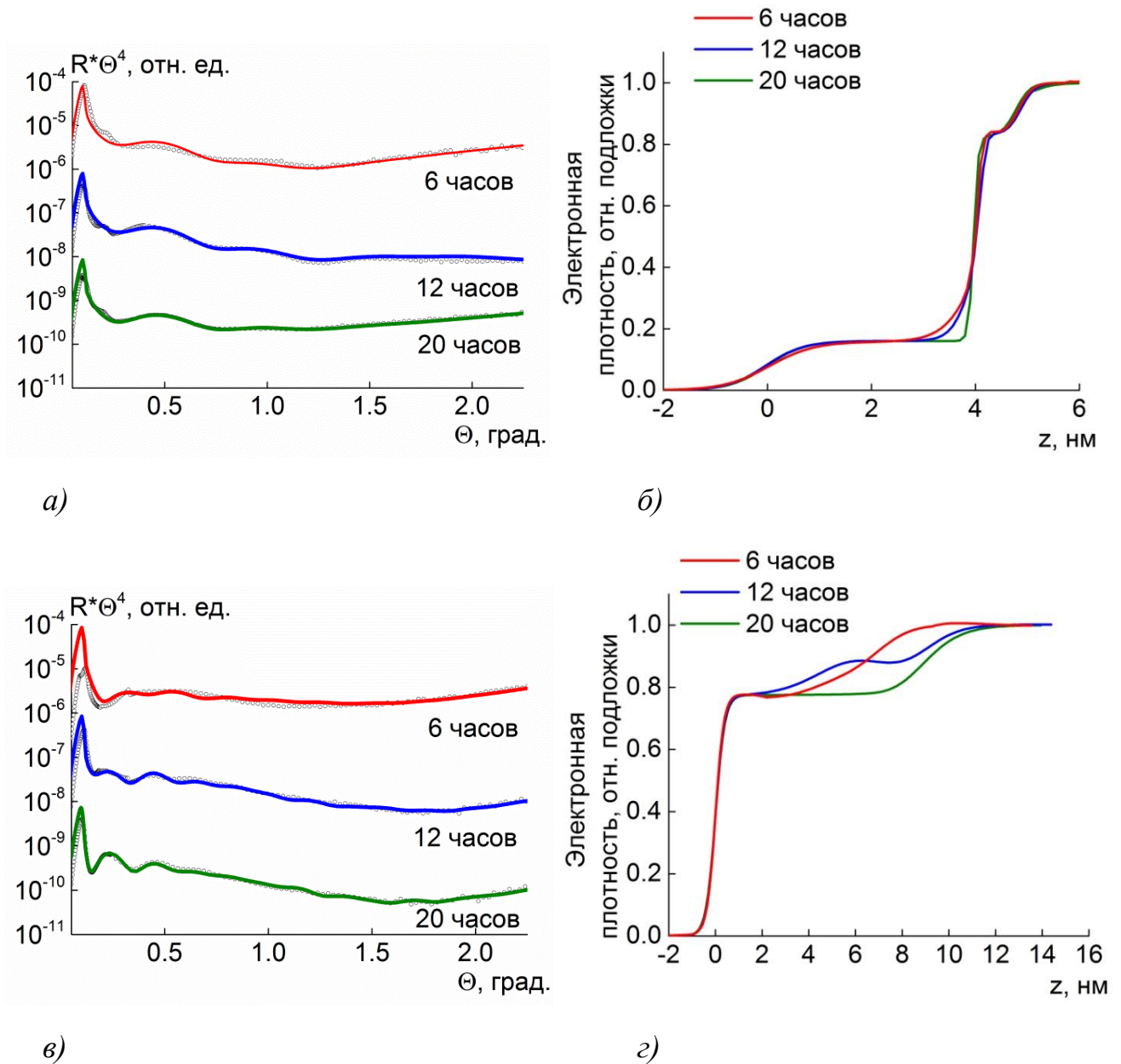
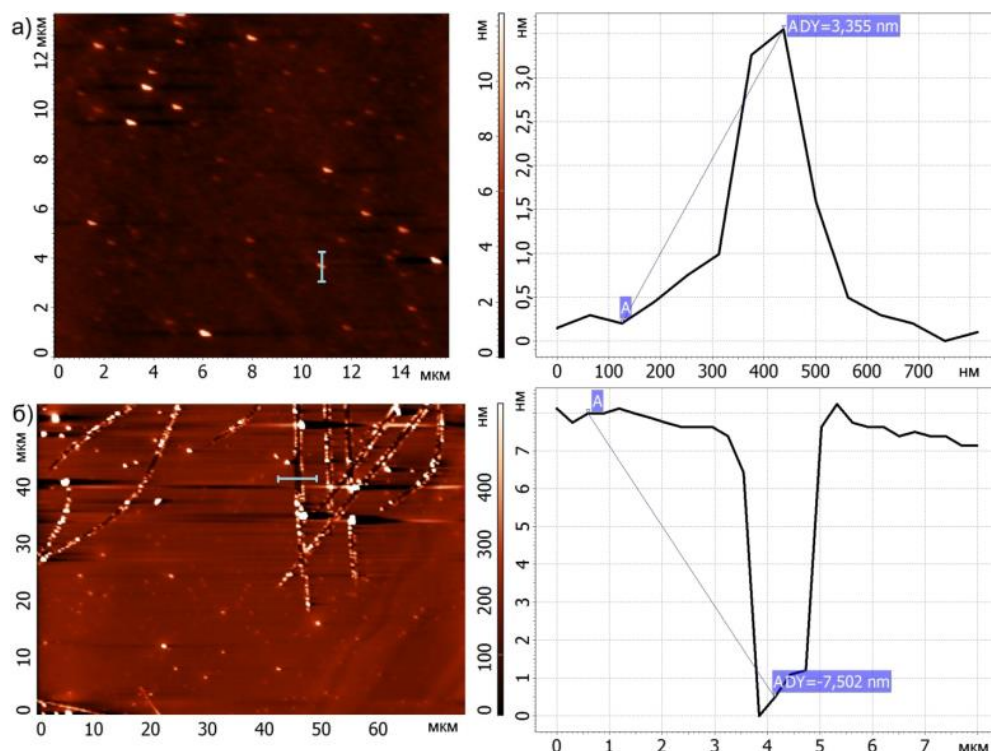


Рис. 3.5. Кривые РР (а и в) и соответствующие им профили электронной плотности (б и г) от двух типов пленок: пленки чистого белка (а и б) и пленки белка с добавлением осадителя NaCl. Кривые были получены по истечении времени 6, 12 и 20 часов (красная, синяя и зеленая кривая соответственно) после переноса пленки на твердую подложку.

В результате определено, что формирование белковой пленки происходит через приблизительно 20 часов после переноса с поверхности водной субфазы на подложку. Также можно видеть, что основные изменения по мере высыхания пленки происходят на границе пленка-подложка.

### 3.3. Результаты измерений методом атомно-силовой микроскопии

Данные о структуре пленок лизоцима, полученные с помощью метода РР, также подтверждены методом АСМ. На *рис. 3.6* представлены морфология двух типов пленок и профиль их поверхности.



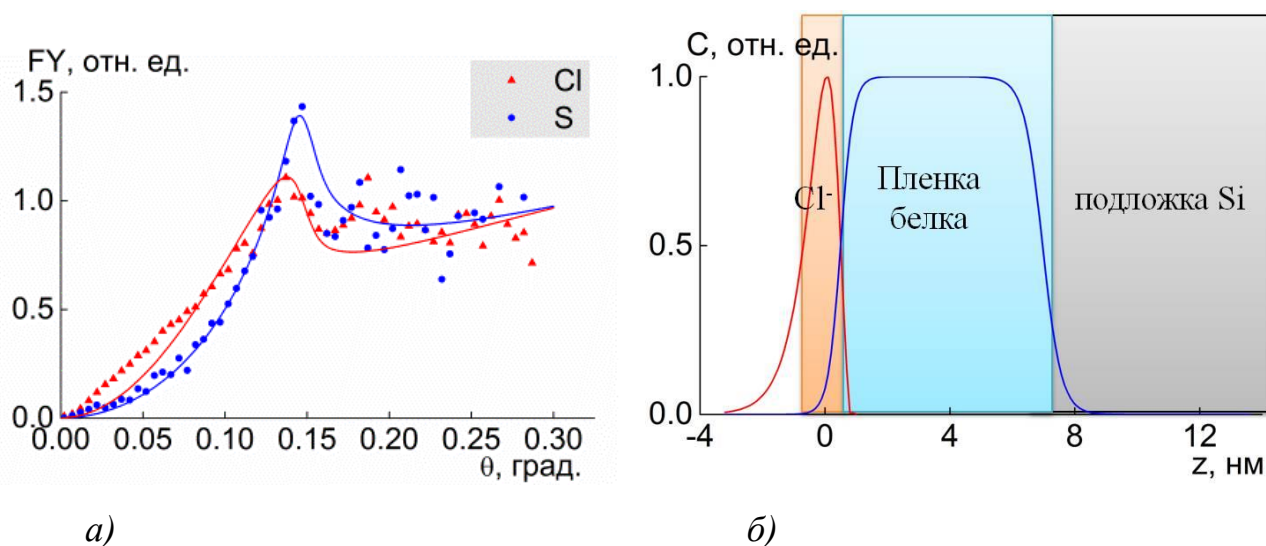
*Рис. 3.6. Изображения АСМ (слева) и профиль изменения высоты (справа) пленки лизоцима (а) и лизоцима с осадителем NaCl (б), перенесенных на Si подложки методом ЛШ.*

Толщина пленки лизоцима без осадителя составляет 3.5 нм, а сама пленка имеет островковую структуру. Пленка лизоцима с осадителем имеет более однородную структуру и толщину 7.5 нм. Такое значение соответствует размеру октамеров, образующихся в растворе белка при добавлении осадителя в условиях кристаллизации, плюс толщина тонких слоев буфера между пленкой и подложкой и на поверхности пленки. Диаметр октамеров в полидисперсном растворе, согласно данным МУРР в приближении сферической формы, составляет 6.02 нм [157]. Измеренные значения толщины для этих двух типов пленок соответствуют значениям, полученным из данных РР.

### 3.4. Результаты измерений методом стоячих рентгеновских волн в области полного внешнего отражения

Для получения данных о положении ионов осадителя NaCl полученные пленки были исследованы методом СРВ в области ПВО.

На *рис. 3.7. (а)* представлены угловые зависимости выхода флуоресценции для элементов S (сера присутствует в аминокислотном остатке цистеине, содержащемся в белке) и Cl, а на *рис. 3.7. (б)* – соответствующие им профили распределения этих элементов по толщине пленки (профили распределения элементов S и Cl приведены к единице). В данных условиях эксперимента определение положения катионов осадителя  $\text{Na}^+$  затруднено в виду того, что ионы натрия также присутствуют в составе буфера, на основе которого были приготовлены все белковые растворы.



*Рис. 3.7. (а) – Угловые зависимости выхода флуоресценции FY для Cl (красные треугольники) и S (синие кружки); (б) – профили распределения Cl (красная линия) и S (синяя линия) по толщине z пленки лизоцима, сформированной из раствора с добавлением осадителя NaCl и перенесенной на кремниевую подложку модифицированную методом ЛШ.*

Кривая распределения атомов Cl (*рис. 3.7. (б)*) по толщине пленки показывает, что ионы хлора располагаются преимущественно вблизи поверхности пленки лизоцима, образуя тонкий слой толщиной порядка 0.7 нм. Однако на угловой зависимости выхода флуоресценции хлора (*рис. 3.7. (а)*) в области малых углов наблюдается расхождение между расчетными и экспериментальными данными.

Данное расхождение может быть обусловлено присутствием над поверхностью пленки «разреженного» слоя с плотностью порядка нескольких процентов от плотности слоя ионов  $\text{Cl}^-$ .

Атомы серы распределены в молекуле лизоцима относительно равномерно (содержатся в аминокислотах Cys-6, Met-12, Cys-30, Cys-64, Cys-76, Cys-80, Cys-94, Met-105, Cys-115, Cys-127), на основании чего по распределению атомов серы можно судить о положении молекул белка. По полученной кривой распределения атомов S можно сделать вывод о том, что сера распределена достаточно равномерно в слое, толщина которого составляет 6.5 нм. Такое значение толщины сопоставимо с диаметром октамеров, которые образуются в растворе при добавлении осадителя. Результат подтверждает данные, полученные с помощью методов РР и АСМ: толщина слоя серы соответствует диаметру октамеров, формирующихся в растворе при добавлении осадителя. Исходя из данных можно предположить, что при использовании полидисперсного раствора белка, в котором при добавлении осадителя образуются октамеры) для формирования ленгмюровского монослоя на твердую подложку переносится пленка, толщина которой почти вдвое превышает размеры мономера лизоцима и соответствует диаметру октамера. Такое значение толщины пленки говорит о том, что при нанесении пленки на поверхность водной субфазы октамеры не подвергаются разрушению и остаются стабильными.

Распределение атомов  $\text{Cl}^-$  по толщине пленки показывает, анионы осадителя  $\text{Cl}^-$  образуют тонкий слой на границе пленка/воздух. Это говорит о том, что слой ионов осадителя переносится с поверхности водной субфазы вместе с белковым слоем. На *рис. 3.8* схематично представлена модель полученной белковой пленки, построенная на основании экспериментальных данных СРВ.





*Рис. 3.8. Схема белковой пленки, сформированной из раствора лизоцима с осадителем NaCl, полученной модифицированным методом ЛШ, построенная на основе данных исследования СРВ в области ПВО.*

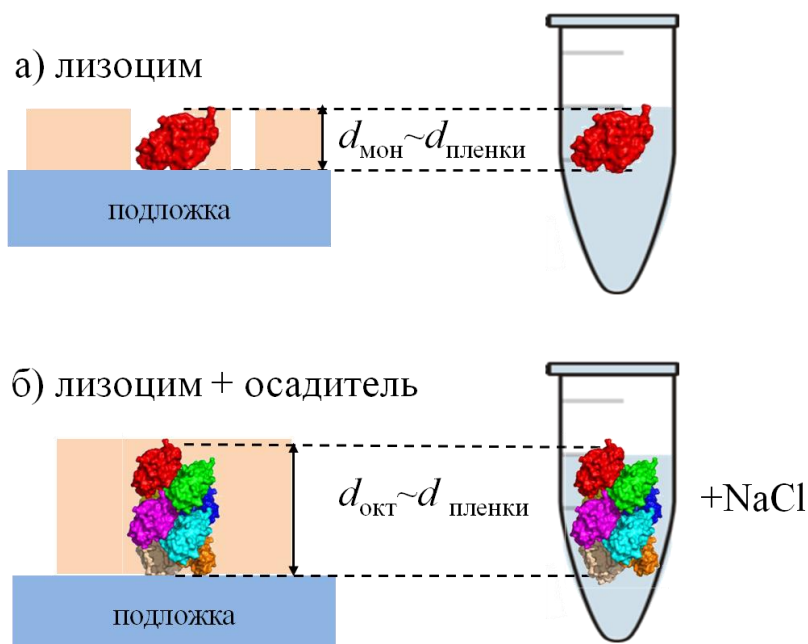
Таким образом, в результате проведенных исследований показано, что пленка белка лизоцима, полученная из раствора белка с добавлением осадителя в условиях, благоприятствующих образованию олигомеров белка в растворе, обладает более высокой электронной плотностью и является более однородной по сравнению с пленкой лизоцима, полученной из раствора белка без добавления осадителя, содержащего только мономерные частицы.

Данные исследования, по всей вероятности, указывают на непосредственное участие олигомеров лизоцима в образовании пленки лизоцима на твердой подложке.

### **3.5. Модифицированный метод Ленгмюра-Шеффера для формирования белковых пленок на твердых подложках**

Исследования пленок белка лизоцима, выполненные методами РР, СРВ в области ПВО и АСМ, показали, что пленка, формируемая из полидисперсного раствора и перенесенная на поверхность кремниевой подложки с помощью метода ЛШ, является более однородной и гомогенной по сравнению с пленкой, полученной из монодисперсного раствора. В результате был предложен способ получения белковых пленок, основанный на модификации метода ЛШ и заключающийся в использовании для формирования монослоев и дальнейшего их переноса методом ЛШ предварительно подготовленного белкового раствора, параметры которого (концентрации белка и осадителя, тип буфера и его рН) соответствуют кристаллизационным условиям белка (рис. 3.9). Данный метод был

апробирован на примере белка лизоцима в условиях роста кристаллов тетрагональной сингонии.



*Рис. 3.9. Предполагаемые модели пленок лизоцима в зависимости от структуры исходного белкового раствора: а – раствор мономеров лизоцима приводит к формированию островковой пленки толщиной 4 нм; б – раствор с октамерами (которые образуются в условиях кристаллизации лизоцима тетрагональной сингонии – при использовании хлорида натрия в качестве осадителя) приводит к формированию однородной пленки толщиной 6 нм.*

Использование полидисперсного белкового раствора, в котором при добавлении осадителя образуются олигомеры, для формирования ленгмюровского монослоя на поверхности жидкости и дальнейшего его переноса на твердую подложку методом ЛШ способно оказывать существенное влияние на структуру полученной белковой пленки. В результате белковая пленка, сформированная из полидисперсного раствора, имеет толщину, почти в два раза превышающую толщину пленки, сформированной из монодисперсного раствора, белка, а плотность такой пленки почти в 4 раза превышает плотность пленки белка без осадителя. Значения толщины и электронной плотности позволяют предположить, что октамеры, образующиеся в растворе при добавлении осадителя, могут принимать непосредственное участие в процессе формирования ленгмюровского монослоя на поверхности водной субфазы. Вместе с тем важно отметить, что более плотная пленка также может образовываться и из отдельных

мономеров белка, которые под действием барьеров в присутствии осадителя, оказывающего влияние на взаимодействие молекул белка между собой [175], формируют более плотноупакованную пленку.

Полученные экспериментальные данные показывают, что использование предложенного в работе способа получения белковых модификации метода ЛШ позволяет получать белковые пленки, обладающие принципиально новой структурой.

### **3.6. Заключение**

Предложен и на примере белка лизоцима реализован способ получения упорядоченных белковых пленок на твердых подложках, основанный на модификации метода ЛШ. Данный способ заключается в использовании для формирования ленгмюровского монослоя лизоцима на поверхности водной субфазы полидисперсного раствора белка, содержащего олигомеры, которые образуются в растворе при добавлении осадителя (NaCl) в условиях кристаллизации лизоцима тетрагональной сингонии.

Методами РР и АСМ показано, что толщина пленки, сформированной из полидисперсного раствора, соответствует диаметру октамеров - олигомерных частиц, состоящих из восьми мономеров лизоцима. Показано, что электронная плотность и однородность пленок, полученных предложенным способом, существенно выше, чем пленок лизоцима, полученных «традиционным» способом из раствора белка, содержащего только мономеры. Такое различие в структурных характеристиках пленок можно объяснить тем, что в случае использования полидисперсного раствора содержащиеся в нем октамеры участвуют в формировании монослоя как единое целое.

Анализ данных, полученных методом СРВ в области ПВО, подтвердил, что такие пленки имеют толщину, соответствующую диаметру октамеров. При этом наблюдается тонкий слой ионов осадителя  $Cl^-$  на границе раздела воздух/пленка.

Результаты работы, описанные в главе, отражены в публикациях [А3] и [А4].

## **ГЛАВА 4. СТРУКТУРА ЛЕНГМЮРОВСКИХ МОНОСЛОЕВ ЛИЗОЦИМА НА ПОВЕРХНОСТИ ЖИДКОСТИ, СФОРМИРОВАННЫХ ИЗ МОНОДИСПЕРСНОГО И ПОЛИДИСПЕРСНОГО РАСТВОРА БЕЛКА С ДОБАВЛЕНИЕМ ОСАДИТЕЛЯ ХЛОРИДА КАЛИЯ**

Ранее проведенные исследования, показали, что пленка лизоцима, сформированная из раствора белка с добавлением осадителя NaCl на твердой подложке, имеет толщину и электронную плотность такие, как если бы такая пленка формировалась из олигомерных частиц лизоцима - октамеров. Применение метода СРВ в области ПВО показало, что ион соли Cl<sup>-</sup> образует на границе воздух/пленка тонкий слой толщиной порядка 1 нм (*рис. 2.12*). Однако неясным оставался вопрос об участии олигомеров в формировании ленгмюровского монослоя белка на поверхности жидкости непосредственно до его переноса на твердую подложку.

Так как ранее использованный осадитель NaCl имеет в своем составе тот же катион, который содержится и в используемом для приготовления растворов буфере, то для определения положения катионов осадителя была использована соль хлорида калия (KCl). Добавление этого осадителя к белку при соблюдении кристаллизационных условий также способствует росту кристаллов лизоцима тетрагональной сингонии, как и в случае NaCl.

### **4.1. Результаты исследования структуры растворов лизоцима с осадителем хлоридом калия методом малоуглового рассеяния рентгеновских лучей**

Для изучения олигомерного состава и временной стабильности олигомеров полидисперсный раствор лизоцима с добавлением осадителя KCl был исследован с помощью метода малоуглового рассеяния рентгеновского излучения.

Для этого раствор лизоцима с концентрацией 40 мг/мл в натрий - ацетатном буфере (0.2 М, pH 4.5) был смешан с раствором неорганической соли KCl концентрации 0.4 М в том же самом буфере. Конечные концентрации лизоцима и KCl в исследуемом растворе составляли 20 мг/мл и 0.2 М соответственно. Измерения проводились при температуре раствора 20 °С.

Добавление осадителя KCl в условиях, рассматриваемых в работе, способствует образованию кристаллов лизоцима тетрагональной сингонии. Было предположено, что структура раствора белка меняется схожим образом (происходит образование олигомеров), как и в случае осадителя NaCl. Чтобы подтвердить это предположение, было проведено изучение олигомерного состава растворов лизоцима с добавлением осадителя и без, которые далее были использованы для формирования ленгмюровских монослоев. Также получены данные об образовании олигомеров в течение промежутка времени, которое обычно проходило после смешения растворов отдельных компонент (белка и осадителя) до образования монослоя.

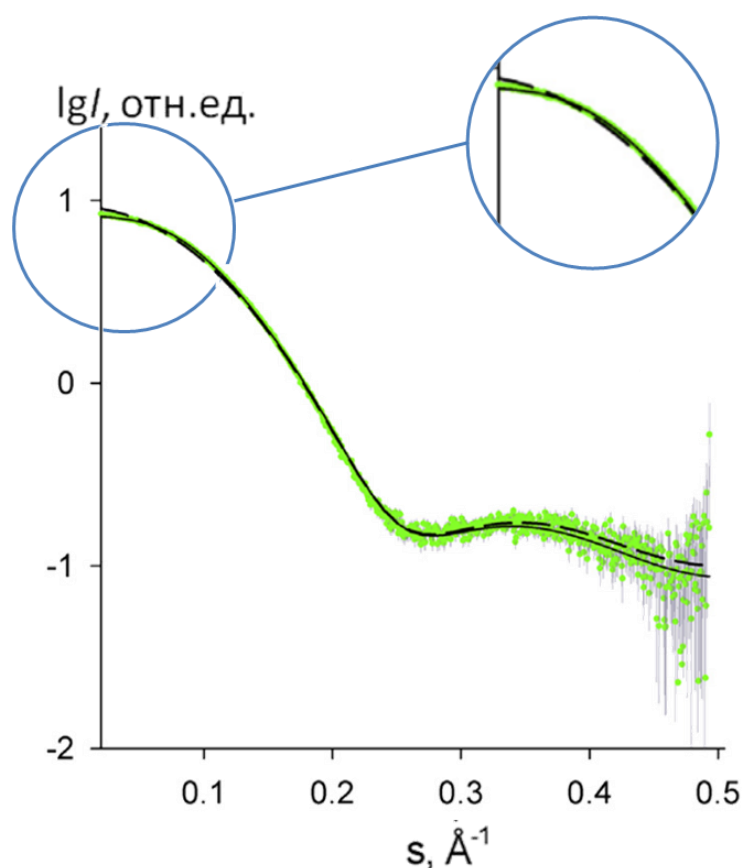


Рис. 4.1. Экспериментальная кривая МУРР от раствора лизоцима без осадителя (зеленая линия) и теоретические кривые от кристаллографической структуры (PDB ID: 4WLD) мономера лизоцима (черные линии), рассчитанные программой CRY SOL для системы идеальных невзаимодействующих мономеров (пунктирная кривая) и программой MIXTURE для системы отталкивающихся мономеров в приближении Перкуса-Йовика.

На *рис. 4.1* приведены экспериментальная кривая МУРР от раствора лизоцима без добавления осадителя КС1 и кривые от кристаллографической структуры (PDB ID: 4WLD) мономера лизоцима, рассчитанные программой CRY SOL для системы идеальных невзаимодействующих мономеров и программой MIXTURE [169] для системы отталкивающихся мономеров в приближении Перкуса-Йовика. При моделировании теоретической кривой для системы, в которой мономерные частицы лизоцима рассматриваются как частицы с отталкивающим взаимодействием, величина невязки  $\chi^2$  может иметь высокое значение ( $\chi^2$  превышает 5.0) (*рис. 4.1, вставка*). При рассмотрении отталкивающих взаимодействий в приближении Перкуса-Йовика для потенциала взаимодействия, отвечающего модели жестких сфер [176], величину невязки удалось минимизировать до значения 1.48. Данные МУРР показали, что в растворе лизоцима без добавления осадителя присутствуют только мономеры (*таблица 2.1*).

*Таблица 2.1. Объемная доля мономеров лизоцима в монодисперсном растворе при температуре 20 °С и радиус инерции  $R_g$ , рассчитанных из кривых малоуглового рассеяния программой CRY SOL.*

Мономеры, %	$R_g$ , Å
100%*	14.3±0.1

\*Доля мономеров 100%, остальные олигомеры в растворе отсутствуют.

На *рис. 4.2* и *рис. 4.3* показаны экспериментальные кривые МУРР (цветные линии) для раствора лизоцима с добавлением осадителя КС1 с концентрациями белка и соли 20 мг/мл и 0.2 М соответственно. Экспериментальные кривые МУРР были измерены по истечении времени 0, 100 и 170 минут после смешивания растворов. Наилучшие модельные кривые, рассчитанные программой OLIGOMER, и объемные доли олигомерных компонентов показаны на *рис. 4.2* (черные линии) и в *таблице 2.2*. Вычисленные кривые совпадают с экспериментальными данными во всем угловом диапазоне, значение невязки  $\chi^2$  не превышает 1.0.

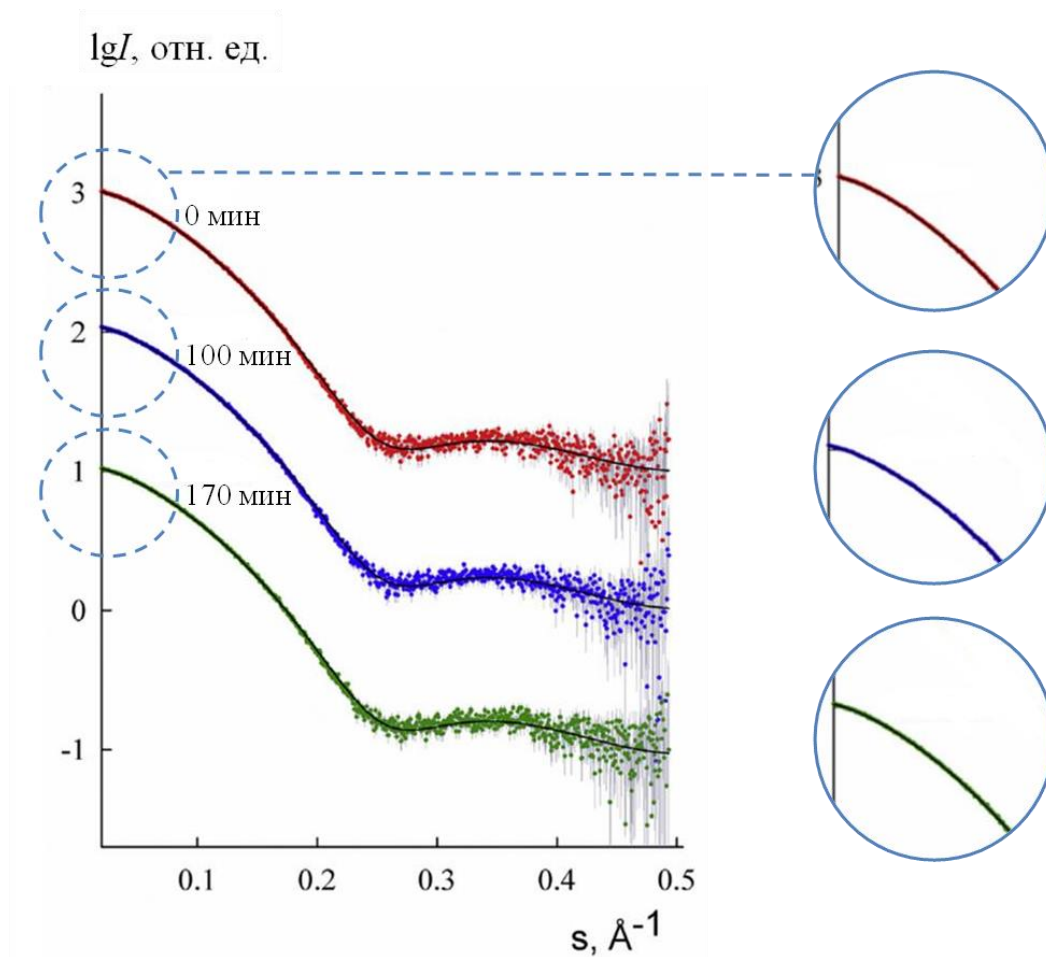


Рис. 4.2. Экспериментальные кривые МУРР от раствора лизоцима с добавлением осадителя KCl (цветные линии) и теоретические кривые, рассчитанные в программе OLIGOMER (черные линии), в зависимости от времени. Кривые смещены по вертикали для лучшей визуализации.

Таблица 2.2. Объемные доли мономеров и олигомеров (димеров, тетрамеров, гексамеров и октамеров) лизоцима в полидисперсном растворе с добавлением осадителя KCl и радиусы инерции  $R_g$  при температуре 20 °С, полученные из кривых малоуглового рассеяния.

Время, мин	$R_g$ , Å	Мон., %	Дим., %	Тетр., %	Гекс., %	Окт., %	$\chi^2$
0	19.1±0.2	88.2±0.4	9.4±0.4	0	0	<b>2.3±0.1</b>	0.92
100	18.9±0.2	87.9±0.4	10.0±0.4	0	0	<b>2.2±0.1</b>	0.92
170	19.1±0.2	87.9±0.4	9.7±0.4	0	0	<b>2.3±0.1</b>	0.90

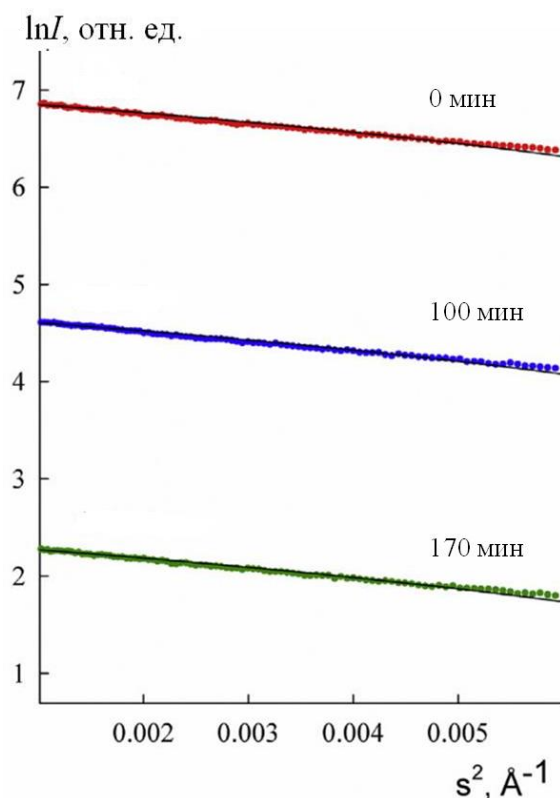
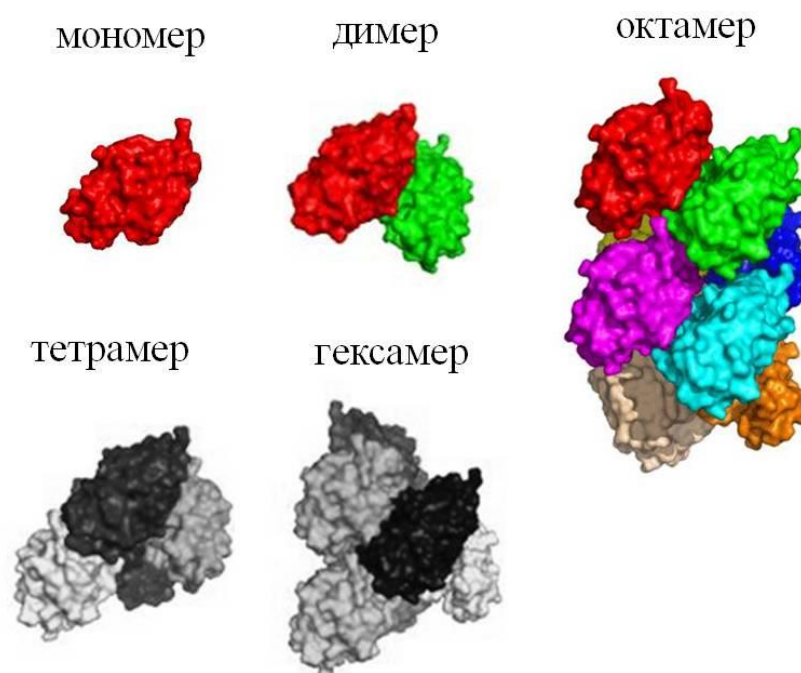


Рис. 4.3. Графики МУРР в координатах Гинье для раствора лизоцима с осадителем KCl.

Анализ экспериментальных кривых МУРР показал, что, помимо мономеров, в растворе лизоцима с осадителем KCl образуются около 10% димеров и 2% октамеров. Тетрамеры, гексамеры и олигомеры, состоящие более чем из 8 молекул белка, в растворе не были обнаружены (рис. 4.4.). Для сравнения, в растворе лизоцима без осадителя все молекулы являются мономерами, которые отталкиваются друг друга. Со временем (на протяжении времени от 0 до 170 минут) объемная доля октамеров в кристаллизационном растворе остается постоянной величиной и равняется приблизительно 2.3% с учетом погрешности. Ранее было показано, что при увеличении концентрации белка в растворе наблюдается увеличение количества октамеров, образующихся в растворе в условиях роста кристаллов лизоцима тетрагональной сингонии [173]. По этой причине для формирования ленгмюровского слоя был использован раствор с более высокой концентрацией белка. Таким образом, раствор белка с осадителем, используемый для формирования монослоя, содержал по меньшей мере 2.3% (процентное содержание в объеме раствора) октамеров.





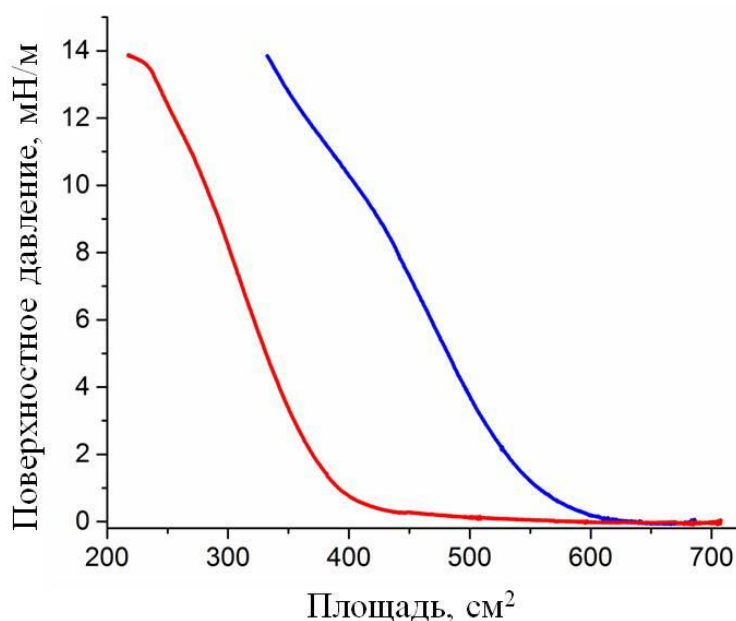
*Рис. 4.4. Модели мономера, димера, тетрамера, гексамера и октамера лизоцима, выделенные из кристаллической структуры. Процедура выделения описана в [157].*

Следует также отметить, что при тех условиях, в которых были приготовлены белковые растворы, которые затем использовались для формирования монослоев в ленгмюровской ванне и измерений МУРР, в ходе экспериментов образование кристаллов лизоцима не было зафиксировано. Согласно данным, полученным в [159], рост кристаллов лизоцима в таких условиях (концентрация белка 20 мг/мл и температура 20°C) наблюдался только через 36 часов после смешивания раствора белка и раствора осадителя. Тем не менее, можно отметить, что длительность измерения МУРР (почти 3 часа) была недостаточной для получения кристаллов лизоцима с заметными размерами, которые могли бы существенно повлиять на результаты МУРР и вызвать появление узких дифракционных пиков на кривых малоуглового рентгеновского рассеяния.

#### **4.2. Результаты исследования ленгмюровского монослоя лизоцима, сформированного из полидисперсного раствора, методом стоячих рентгеновских волн в области полного отражения**

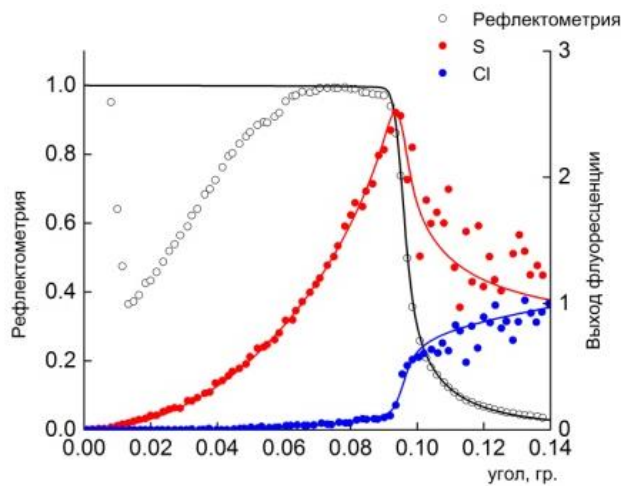
Для образования монослоя лизоцима с осадителем КСІ из полидисперсного раствора использовали 1200 мкл смешанного раствора лизоцима-КСІ с концентрациями белка и соли 40 мг/мл и 25 мг/мл соответственно. Нанесение раствора происходило через 30 мин после начала смешивания. Сразу же после осаждения монослой сжимался подвижным барьером со скоростью 30 см<sup>2</sup>/мин до достижения поверхностного давления  $\pi = 14$  мН/м. При измерении СРВ поверхностное давление не изменялось и поддерживалось постоянным.

На *рис. 4.5* показаны изотермы сжатия монослоя чистого лизоцима и монослоя лизоцима с КСІ. Для монослоя, образованного из белкового раствора с осадителем, повышение давления начинается раньше (соответствует большей площади), причиной чему может быть то, что осадитель препятствует переходу молекул белка вглубь субфазы. Добавление осадителя изменяет распределение заряда на поверхности белковых молекул, что приводит к возникновению сил притяжения между ними; по этой причине наиболее предпочтительным поведением белковых молекул будет формирование двумерного слоя, а не растворение в объеме субфазы. Это предположение согласуется с результатами, описанными выше.

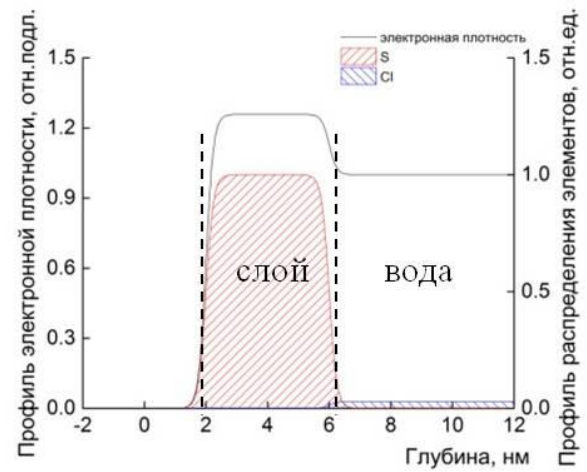


*Рис. 4.5. Изотермы сжатия монослоя чистого лизоцима (красная линия) и монослоя лизоцима с KCl (синяя линия), сформированных на водной поверхности*

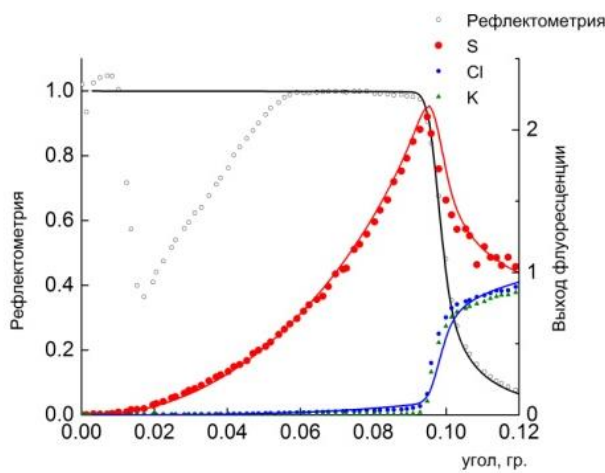
На *рис. 4.6* представлены угловые зависимости зеркальной компоненты рентгеновского отражения и угловые зависимости выхода флуоресценции, а также профили распределения электронной плотности элементов, присутствующих в исследуемой системе: S, K и Cl. Кривые приведены для ленгмюровских слоев, образованных из раствора лизоцима без осадителя (*a, б*) и раствора лизоцима, содержащего осадитель (*в, г*). Стоит отметить, что в обоих случаях наблюдается присутствие ионов хлора, в то время как сигнал от ионов K<sup>+</sup> наблюдается только для монослоя, образованного из раствора белка, содержащего осадитель. Присутствие ионов хлора в случае монослоя лизоцима без осадителя может объясняться наличием примесей в воде. В общем случае экспериментальные данные указывают, что молекулы лизоцима не проникают вглубь субфазы, в основном концентрируясь на границе раздела воздух/жидкость.



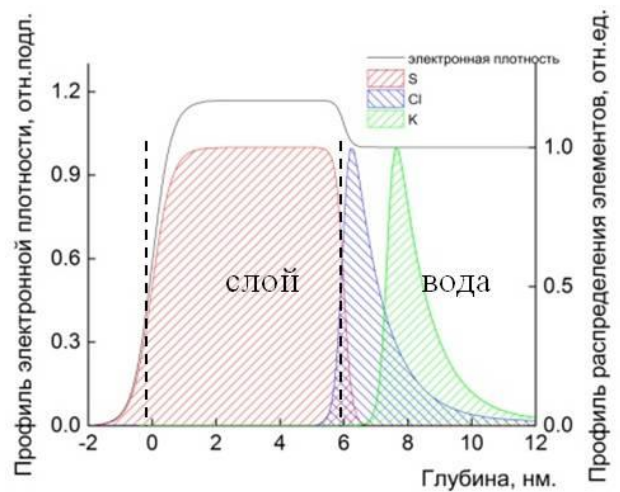
а)



б)



в)



г)

Рис. 4.6. а, в – угловые зависимости выхода флуоресценции  $FY$  для  $Cl$  (синие треугольники),  $K$  (зеленые кружки) и  $S$  (красные кружки); б, г – профили распределения хлора (синяя область), калия (зеленая область) и серы (красная область) по толщине  $z$  лезгмюровских монослоев лизоцима, сформированных из раствора с добавлением осадителя  $KCl$  и без на поверхности водной субфазы.

Для анализа экспериментальных данных использовалась модель двухслойной структуры: первый слой состоял из водной «подложки», а второй – из лизоцима. Шероховатость границы раздела воды считалась  $\sigma = 0.33$  нм из-за термически индуцированных капиллярных волн [177]. Базовое значение электронной плотности пленки оценивалось по экспериментальной величине критического угла ПВО и примерно в 1.3 раза превышала электронную плотность воды. Предполагалось, что атомы серы равномерно распределены по толщине пленки.

Толщина монослоя чистого лизоцима, рассчитанная таким способом, составила  $4.0 \pm 0.5$  нм.

Значение толщины ленгмюровского монослоя лизоцима, полученного из раствора с добавлением KCl, близко к 6 нм, что почти в два раза превышает толщину пленки, полученную из раствора чистого белка. Такое значение толщины можно объяснить тем, что в формировании слоя участвуют олигомерные частицы белка, образующиеся в растворе на начальной стадии кристаллизации. Можно предположить, что олигомеры лизоцима при переносе их из раствора на поверхность водной субфазы не разрушаются (рис. 4.7).

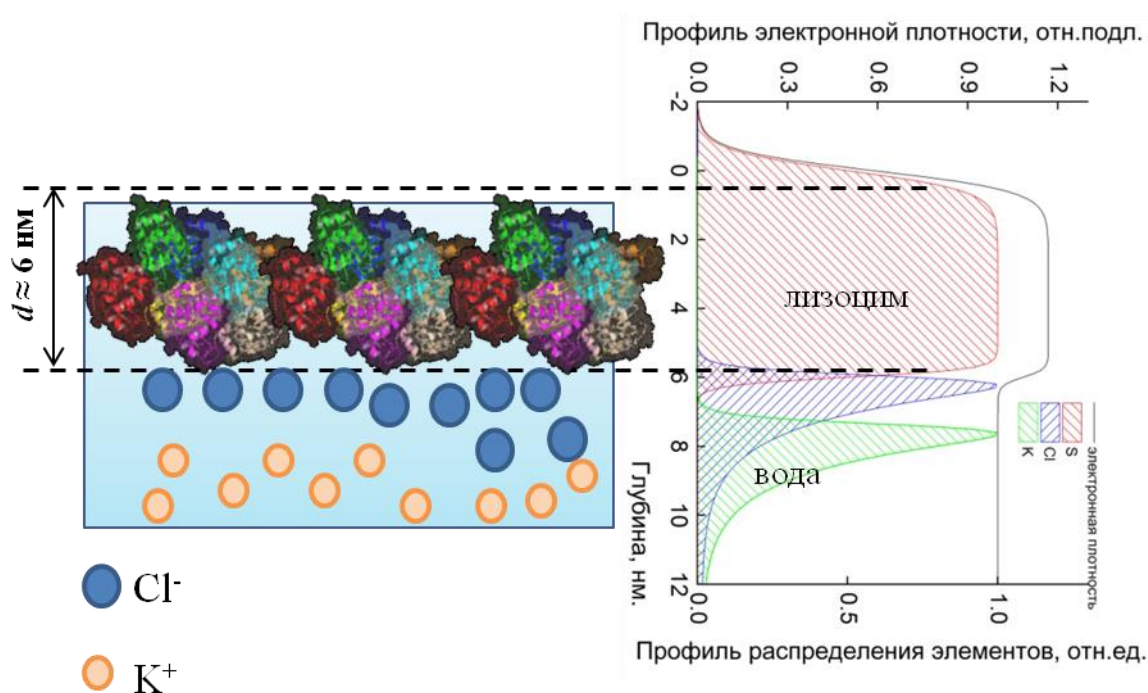


Рис. 4.7. Предполагаемая модель монослоя лизоцима (слева), сформированного из полидисперсного раствора, содержащего олигомеры, построенная на основе профиля распределения элементов (справа) по данным СРВ.

В общем случае форма угловой зависимости выхода флуоресценции от атомов, распределенных в пленке и субфазе, может быть сведена к двум типам кривых. Для атомов, преимущественно распределенных в пленке или в приповерхностной области (на глубине нескольких нанометров, что соответствует глубине проникновения рентгеновского излучения до критического угла), на кривой будет наблюдаться пик. Кривая для атомов, распределенных в субфазе, выглядит как обратная кривая рентгеновского отражения. То есть интенсивность

выхода флуоресценции начинает быстро возрастать при достижении критического угла и продолжает увеличиваться при больших значениях угла. Такая форма кривой наблюдается из-за увеличения глубины проникновения рентгеновских лучей с нескольких нанометров до сотен нанометров, что приводит к увеличению числа возбужденных атомов.

Когда атомы распределены и в исследуемой пленке, и в субфазе, будет наблюдаться суперпозиция этих двух типов кривых, описанных выше. В этом случае форма кривой будет связана с отношением числа атомов в пленке и в приповерхностном слое субфазы, толщина которого определяется глубиной проникновения рентгеновских лучей в субфазу. В этом случае, поскольку просканированный объем субфазы увеличился на несколько порядков (из-за увеличения глубины проникновения излучения), общий сигнал флуоресценции от атомов, растворенных в субфазе, может преобладать над сигналом от атомов в пленке даже при гораздо меньшей концентрации, чем в приповерхностном слое. Поскольку критический угол увеличился на глубину проникновения рентгеновских лучей в субфазу на несколько порядков, выход флуоресценции из атомов в субфазе может превышать сигнал от атомов в исследуемом образце, даже если их концентрация в субфазе ниже.

Угловая зависимость выхода флуоресценции хлора представляет собой наложение двух сигналов: из атомов, распределенных в субфазе (этот сигнал имеет форму обратной кривой отражения рентгеновских лучей от них) и сигнал от атомов в приповерхностном слое. В исследуемой системе сигнал от атомов, распределенных в субфазе, преобладает, что указывает на то, что значительная часть ионов хлора распределена в субфазе.

Форма угловой зависимости выхода флуоресценции К также представляет собой своего рода обратную кривую рентгеновского отражения, которая указывает, что, подобно ионам  $\text{Cl}^-$ , большинство из этих атомов диффундировали с поверхности субфазы в ее объем.

Сравнение формы угловой зависимости выхода флуоресценции ионов осадителя  $\text{Cl}^-$  и  $\text{K}^+$  позволяет предположить, что максимум профиля

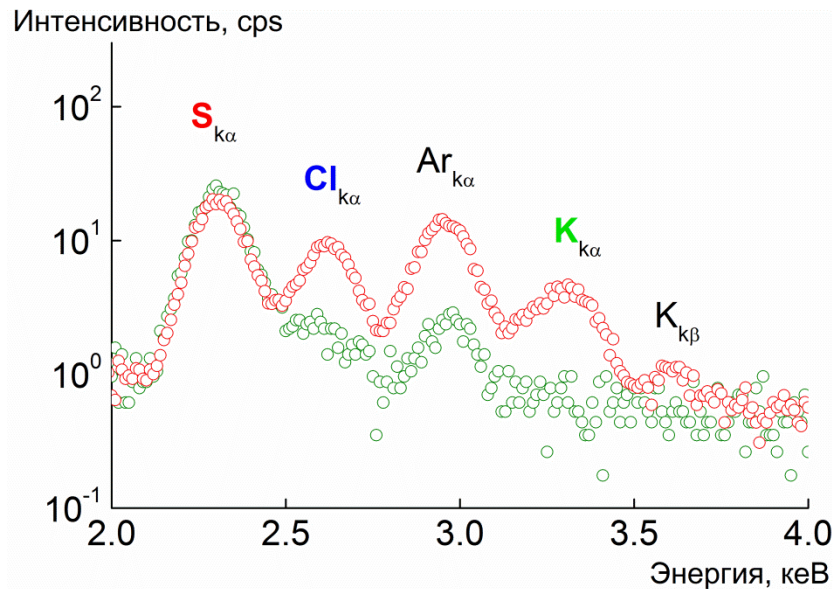
распределения  $\text{Cl}^-$  по глубине находится внутри субфазы, но ближе к белковой пленке, чем максимум профиля глубины распределения  $\text{K}^+$ . Распределение этих элементов характеризуется асимметрией; у них есть «хвостовая часть», которая простирается в глубину субфазы. Это распределение можно считать результатом диффузии ионов осадителя в глубину субфазы. Максимум распределения ионов хлора находится вблизи границы раздела субфаза/пленка, а максимум распределения калия находится на глубине примерно 2 - 3 нм от поверхности жидкости.

Ион хлора относится к космотропным ионам, в то время как ион калия относится к хаотронным ионам. Космотропные ионы являются сильно гидратированными и оказывают высаливающее и стабилизирующее влияние на молекулы белка [140], что позволяет предположить, что близость ионов  $\text{Cl}^-$  к белковому слою предотвращает распад октамеров.

Использование  $\text{KCl}$  в качестве осадителя вместо  $\text{NaCl}$  позволяет выявить положения как катиона  $\text{K}^+$ , так и аниона  $\text{Cl}^-$ . Можно видеть, что ионы  $\text{Cl}^-$  и  $\text{K}^+$  образуют тонкие слои вблизи границы субфаза/пленка, причем слой ионов хлора располагается ближе к монослою, чем ионы калия. Толщина слоя ионов хлора  $0.5 \pm 0.3$  нм, а толщина слоя ионов калия  $0.7 \pm 0.4$  нм. Данный результат можно объяснить преимущественно положительным поверхностным зарядом молекул белка в пленке со стороны, обращенной к субфазе.

Угловая зависимость выхода флуоресценции атомов S, на которой присутствует резкий пик ниже критического угла, указывает на предпочтительную локализацию этих атомов на поверхности жидкости.

Разность интенсивностей флуоресценции монослоя лизоцима с добавлением осадителя и без осадителя при энергиях около 2.7 и 3.3 кэВ была определена с высоким отношением сигнал/шум, как показано на *рис. 4.8*.



*Рис. 4.8. Область флуоресцентного спектра в пределах энергии 2.7 и 3.3 для ленгмюровских слоев лизоцима, сформированных из чистого белка (зеленый) и белка с осадителем (красный).*

Вышеприведенные результаты позволяют сделать вывод о том, что молекулы лизоцима не проникают в объем субфазы, а остаются на поверхности. Напротив, большинство ионов осадителя ( $\text{Cl}^-$  и  $\text{K}^+$ ) диффундируют вглубь субфазы, однако некоторое их количество образует тонкие слои в приповерхностной области белковой пленки. Толщина ленгмюровского слоя лизоцима, сформированного из полидисперсного раствора, приблизительно в два раза превышает размер одной молекулы белка и аналогична диаметру октамера лизоцима, образование которого ранее показано с помощью методов МУРР и МУРН [157,159].

Близость расположения ионов хлора  $\text{Cl}^-$ , имеющих отрицательный заряд, к белковому слою указывает на то, что октамер, из которых образуется пленка лизоцима, в целом имеет поверхностный положительный заряд. Для проверки этого предположения был проведен расчет поверхностного электростатического потенциала октамера.

В приближении Пуассона-Больцмана применительно к электростатическим взаимодействиям в биомолекулах все атомы растворенного вещества (атомы белковой молекулы) рассматриваются как частицы с низкой диэлектрической проницаемостью (что типично для органических молекул) и с точечными расположением зарядов в положениях атомов. Для молекул белков и



нуклеиновых кислот значение диэлектрической проницаемости находится обычно в пределах 2 - 4 [178], в то время как диэлектрическая проницаемость растворителя (в общем случае вода) имеет высокое значение (80). Тогда молекулу белка или бимолекулярного ансамбля можно рассмотреть как однородную систему, характеризующуюся диэлектрической проницаемостью  $\varepsilon$ .

Электростатический потенциал  $\psi(\vec{r})$  описывается с помощью уравнения Лапласа [178]:

$$\vec{\nabla} \left[ \vec{\nabla} \psi(\vec{r}) \right] = 0 \quad (3.1)$$

При наличии зарядов в системе вводится величина  $\rho(\vec{r})$ , которая характеризует пространственное распределение заряда (то есть плотность заряда), и уравнение (3.1) преобразовывается в уравнение Пуассона (в единицах системы СГС):

$$\varepsilon \vec{\nabla} \left[ \vec{\nabla} \psi(\vec{r}) \right] = -4\pi\rho(\vec{r}) \quad (3.2)$$

Принимая во внимание, что диэлектрическая проницаемость не является постоянной величиной, а изменяется с расстоянием, то уравнение (3.2) можно переписать в следующем виде:

$$\vec{\nabla} \left[ \varepsilon(\vec{r}) \vec{\nabla} \psi(\vec{r}) \right] = -4\pi\rho(\vec{r}) \quad (3.3)$$

Плотность заряда в молекуле белка определяется выбранной молекулярной моделью (чем может являться либо (PDB) структура белка, либо иная его теоретическая модель), что делает точный расчет зарядового распределения весьма трудной задачей, так как необходимо учесть сумму эффектов от зарядов, присутствующих в самой белковой молекуле, а также наличие диэлектрического и ионного распределений.

В системе взаимодействующих частиц плотность частицы в любой точке  $[\sigma(\vec{r})]$  может быть выражена относительно плотности этой же самой частицы в отсутствие взаимодействия  $[\sigma_0(\vec{r})]$  в следующем виде:

$$\sigma(\vec{r}) = g(\vec{r})\sigma_0(\vec{r}), \quad (3.4)$$

где  $g(\vec{r})$  - функция распределения этой частицы, которая является отношением реальной и средней плотностей частицы).

Эта функция распределения, в свою очередь, позволяет определить потенциал средней силы  $w(\vec{r})$ :

$$g(\vec{r}) = e^{[-w(\vec{r})]/kT} \quad (3.5)$$

Другими словами, распределение частиц описывается через распределение Больцмана, в котором с помощью введения потенциала средней силы можно свести усредненный эффект по всей системе в потенциал одной частицы. Градиент этого потенциала характеризует среднюю силу, действующую на частицу.

В системе, состоявшей из ионов, частицы будут преимущественно находиться в областях, в которых усредненный потенциал имеет высокое или низкое значение в зависимости от знака заряда. Тогда можно предположить, что ионный потенциал средней силы равен усредненному электростатический потенциалу, умноженному на заряд иона. Это предположение позволяет модифицировать уравнение (3.3) для неоднородной среды в уравнение Пуассона-Больцмана [178]:

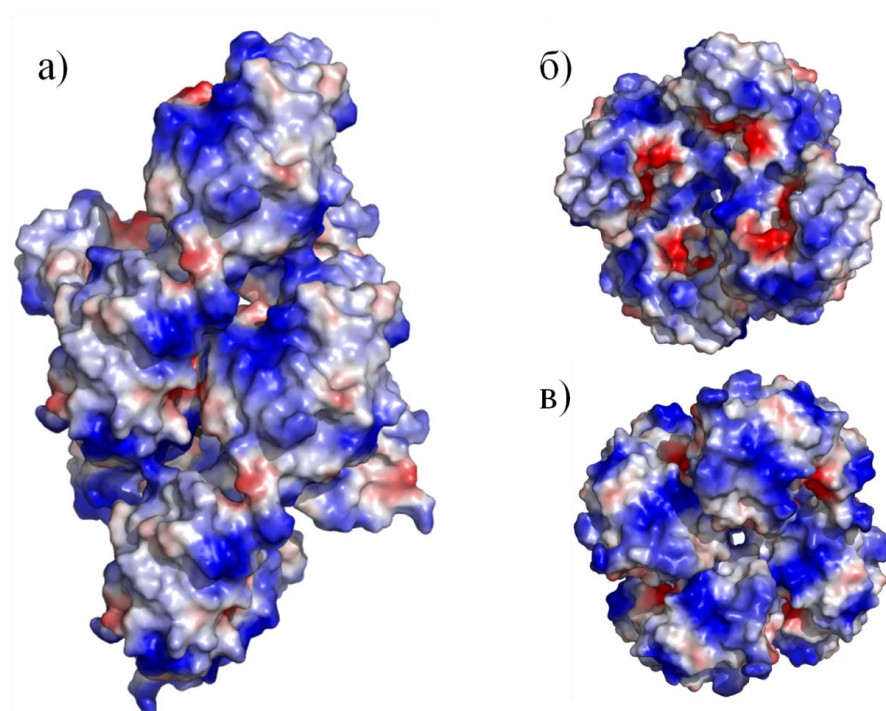
$$\vec{\nabla} \left[ \varepsilon(\vec{r}) \vec{\nabla} \psi(\vec{r}) \right] = -4\pi \rho^f(\vec{r}) - 4\pi \sum_i c_i^\infty z_i q \exp \frac{-z_i q \psi(\vec{r})}{kT} \lambda(\vec{r}), \quad (3.6)$$

где величина  $\rho^f(\vec{r})$  характеризует только молекулярные заряды,  $c_i^\infty$  является концентрацией иона  $i$  на бесконечном расстоянии от молекулы,  $z_i$  - валентность  $i$ -ого иона,  $q$  - заряд протона,  $k$  - постоянная Больцмана,  $T$  - температура и  $\lambda(\vec{r})$  описывает доступность иона на расстоянии  $\vec{r}$ .

В результате решения уравнения Пуассона – Больцмана можно получить распределение электростатического потенциала по всему пространству. Однако следует заметить, что, согласно уравнению (3.6), потенциал определяется локальной концентрацией ионов и их зарядов. Однако значения концентраций ионов, которые обычно рассчитывают на основе знания атомарной структуры белка или биомолекулярного комплекса, зависят от различных условий и окружения молекулы и могут отличаться от реальных значений в

рассматриваемой системе, в связи с чем расчет электростатического потенциала всегда носит приближенный характер.

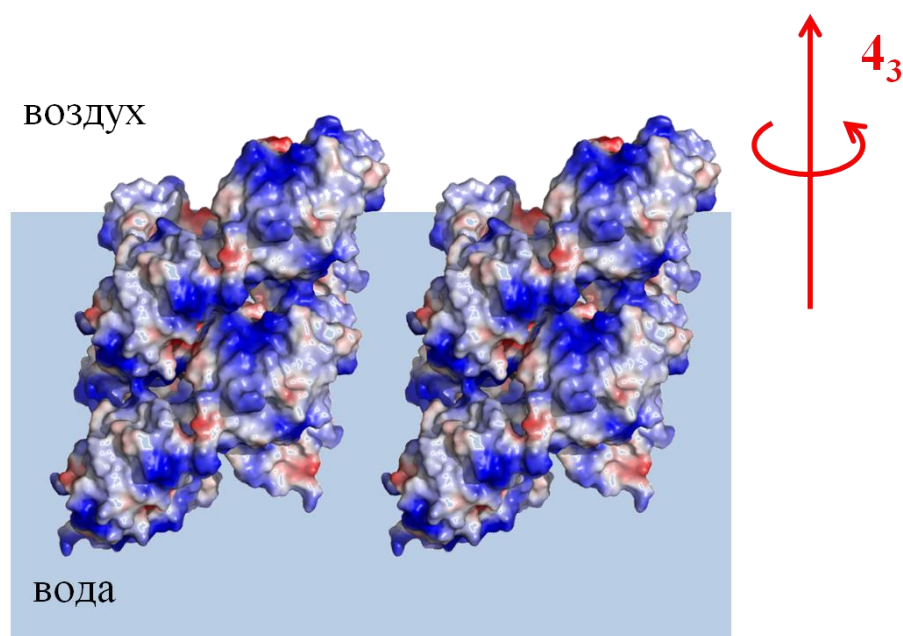
В данной работе расчет потенциала октамера лизоцима был произведен с использованием программного пакета APBS - PDB2PQR [179], который рассчитывает заряд ионов и их радиус на основе атомарной структуры белка, заключенной в PDB файле. Расчет был проведен при значении pH 7, который приблизительно соответствует значению pH субфазы. Визуализация распределения потенциала проводилась с помощью программы PyMol.



*Рис. 4.9. Распределение поверхностного электростатического потенциала октамера лизоцима: а) вид сбоку, б) вид сверху и в) вид снизу. Синий цвет соответствует положительно заряженным областям, красный цвет - отрицательно заряженным, белый - незаряженным областям.*

На рис. 4.9 представлено распределение поверхностного электростатического потенциала октамера лизоцима. Синий цвет соответствует положительно заряженным областям, красный цвет - отрицательно заряженным, белый - незаряженным областям. Можно видеть, что октамер лизоцима преимущественно имеет положительный поверхностный заряд, что согласуется с тем фактом, что отрицательно заряженные ионы хлора сильнее притягиваются к белковому слою. Преимущественно положительный заряд октамера лизоцима также объясняется

тем, что белок пребывает в среде с рН, значение которого меньше значения изоэлектрической точки лизоцима (ИТ  $\approx 11.00$ ). Также на рисунке приведены изображения, показывающие распределение потенциала в верхней и нижней части октамера. Можно видеть, что в нижней части располагаются полярные положительные области (рис. 4.9 (в)), а в верхней части октамера сосредоточены отрицательно заряженные (красный цвет) и незаряженные гидрофобные части (белый цвет) (рис. 4.9 (б)). На основании этого можно предположить, что октамер ориентируется на жидкости таким образом, что винтовая ось четвертого порядка направлена перпендикулярно поверхности жидкости (рис. 4.10).



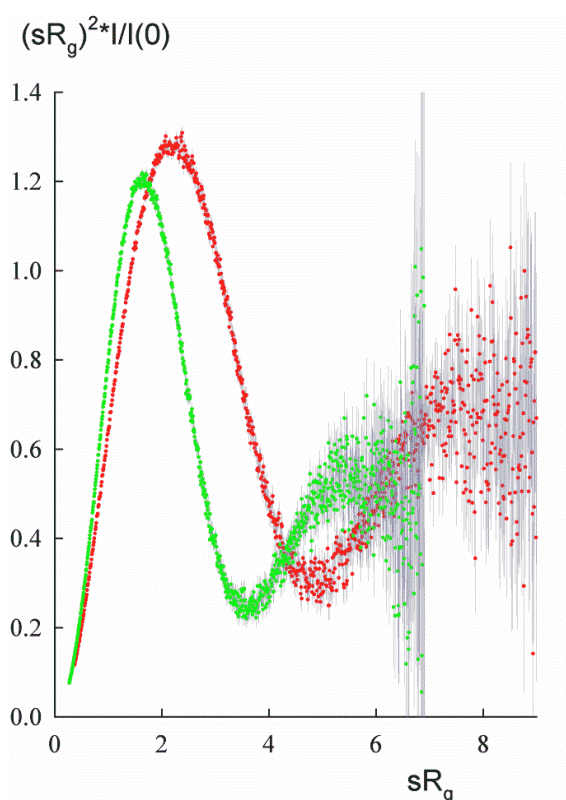
*Рис. 4.10. Модель ориентации октамера лизоцима на поверхности жидкости в ленгмюровском монослое с учетом распределения поверхностного потенциала.*

Притяжение октамеров в ленгмюровском слое может быть обусловлено наличием гидрофобных взаимодействий между октамерами, которые возникают между неполярными частями молекул, в результате чего система достигает своей максимальной термодинамической стабильности путем минимизации количества упорядоченных молекул воды, необходимых для окружения гидрофобных частей растворенных молекул. Это предположение согласуется с выводами, сделанными на основании расчетов молекулярного моделирования, что конечная

термодинамическая стабильность белкового кристалла обеспечивается гидрофобными контактами ближнего действия [180].

Важно отметить, что белковые молекулы, расположенные на границах раздела подложка/жидкость и воздух/жидкость, особенно подвержены разворачиванию и денатурации. Поэтому реальный состав белкового раствора может оказаться более сложным, чем аппроксимация, используемая для олигомерной смеси в разбавленном растворе при анализе кривых МУРР. Для того, чтобы определить наличие в растворе развернутых молекул белка, строят график в координатах Кратки, который позволяет на качественном уровне судить о конформации белка.

В данных, полученных путем анализа кривых МУРР, не было обнаружено доказательств наличия развёрнутых молекул, что видно из безразмерных графиков Кратки (рис. 4.11), которые имеют форму, типичную для глобулярных белков.



*Рис. 4.11. Безразмерные графики Кратки чистого раствора лизоцима (зеленая кривая) и раствора лизоцима с добавлением осадителя KCl при 0 мин. Колоколообразные профили, имеющих плато в области больших углов, указывают на отсутствие в растворе молекул лизоцима в развернутом состоянии в исследованных условиях.*

Многослойная система, сформированная из молекул белка и ионов осадителя, образованная на поверхности водной субфазы в ленгмюровской ванне, является достаточно стабильной, и в течение длительного времени ее распада не наблюдается. Это хорошо видно из практически идентичных экспериментальных данных рентгеновского отражения и флуоресценции, полученных в начале измерений и через 10 ч после первого измерения (рис. 4.12).

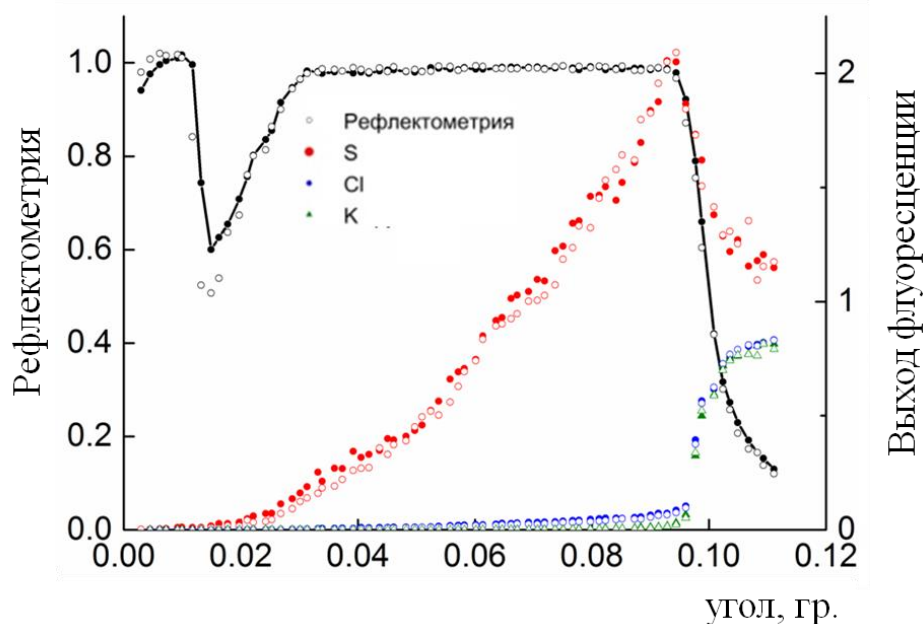


Рис. 4.12. Сравнение угловой зависимости зеркальной компоненты рентгеновского отражения и выхода флуоресценции для двух измерений. Пустые кружки - первое измерение, закрашенные кружки - последнее измерение (11-ое в серии).

Полученные результаты показывают, что октамеры, образующиеся в белковом растворе после добавления осадителя, не только не разрушаются после переноса их из раствора на водную поверхность в ленгмюровской ванне, но и сохраняют свою структуру при формировании ленгмюровского монослоя. При этом ионы осадителя образуют тонкие слои (толщина которых по порядку величины соответствует ионным радиусам) непосредственно под пленкой белка.

### 4.3. Заключение

Было проведено изучение ленгмюровских монослоев белка лизоцима на поверхности водной субфазы, сформированных из монодисперсного раствора,

содержащего мономеры белка, и полидисперсного раствора, в котором при добавлении в раствор осадителя образуются олигомеры. В качестве осадителя была использована неорганическая соль хлорид калия (KCl), добавление которой в раствор в определенных условиях приводит к росту кристаллов лизоцима тетрагональной сингонии. Анализ толщин полученных монослоев показал, что октамеры лизоцима, которые являются наибольшими из олигомеров, присутствующих в растворе, принимают участие в образовании монослоя, что оказывает влияние на его структуру. Полученный результат позволил сделать вывод о том, что октамеры, образующиеся в белковом растворе при добавлении осадителя KCl, не только не разрушаются при нанесении раствора на водную поверхность, но и сохраняют свою структуру при формировании ленгмюровского слоя. В то же время толщина ленгмюровского слоя лизоцима, сформированного из монодисперсного раствора, совпадает с диаметром мономера лизоцима.

Применение метода СРВ в области ПВО показало, что ионы соли образуют тонкие слои (с толщиной, приблизительно соответствующей ионным радиусам) непосредственно под пленкой белка. Толщина слоя ионов хлора составляет  $0.5 \pm 0.3$  нм, а толщина слоя ионов калия составляет  $0.7 \pm 0.4$  нм.

Основные результаты работы, описанные в главе, отражены в публикации [A1].

## **ГЛАВА 5. СТРУКТУРА ПЛЕНОК ЛИЗОЦИМА, ПОЛУЧЕННЫХ ИЗ МОНОДИСПЕРСНОГО РАСТВОРА И ПОЛИДИСПЕРСНОГО РАСТВОРА БЕЛКА С ДОБАВЛЕНИЕМ ОСАДИТЕЛЯ KI (В УСЛОВИЯХ КРИСТАЛЛИЗАЦИИ ЛИЗОЦИМА МОНОКЛИННОЙ СИНГОНИИ) НА ТВЕРДЫХ ПОДЛОЖКАХ.**

В предыдущих главах были рассмотрены ленгмюровские монослои на поверхности водной субфазы и пленки лизоцима на кремниевых подложках, полученные из растворов чистого белка и растворов белка с добавлением осадителей NaCl и KCl в условиях, благоприятных для образования кристаллов лизоцима тетрагональной сингонии. Было показано, что олигомеры лизоцима, образующиеся в растворе, принимают участие в формировании ленгмюровских монослоев и пленок на твердой подложке. Проведенные структурные исследования полученной пленки на кремниевой подложке, когда в качестве осадителя использован хлорид натрия, методом СРВ в ПВО показали, что ионы хлора образуют над поверхностью пленки лизоцима тонкий слой. К сожалению, определение положения ионов  $\text{Na}^+$  было затруднено из-за сильного поглощения флуоресцентного сигнала от этого элемента в окружающей среде.

Для определения структуры пленки и положения ионов осадителя с помощью предложенной модификации метода ЛШ была получена пленка лизоцима на кремниевой подложке из раствора белка, в котором в качестве осадителя вместо хлорида натрия (NaCl) была использована соль йодид калия (KI). Данный осадитель способствует росту кристаллов лизоцима моноклинной сингонии. Использование KI для получения белкового раствора с кристаллизационными параметрами позволило определить положение в белковой пленке как аниона, так и катиона. Структурные особенности полученных пленок исследованы с помощью методов РР и СРВ в ПВО.

### **5.1. Подготовка образцов**

Лизоцим концентрации 80 мг/мл растворяли в натрий - ацетатном буфере (0.2 М, pH 4.5). Полученный раствор центрифугировали в течение 10 мин с частотой 10000 об./мин. Соль KI концентрации 25 мг/мл растворяли в том же буфере.



Раствор KI в буфере фильтровался с помощью мембранных фильтров (Millex) с диаметром пор 0.22 мкм. Конечные концентрации лизоцима и KI в полученном растворе составляли 40 и 12.5 мг/мл соответственно. Размер кремниевой подложки, на которую производился перенос монослоя, составлял  $20 \times 15$  мм<sup>2</sup>. Поверхность подложки промывали чистой водой и высушивали. Монослой лизоцима с KI был сформирован в ленгмюровской ванне KSV 5000 LB (KSV Instruments) с двумя подвижными барьерами. Перед нанесением монослоя поверхности ванны и барьера очищались этанолом и промывались дистиллированной водой. Формирование монослоя происходило при температуре  $T = 20^\circ\text{C}$ . Раствор с концентрациями лизоцима и KI 40 и 12.5 мг/мл соответственно объемом 1000 мкл был нанесен на поверхность воды с помощью автоматической пипетки Eppendorf по истечении 30 мин после смешивания. Сразу после нанесения монослоя поджимался подвижными барьерами со скоростью 20 мм/мин до достижения значения поверхностного давления  $\pi = 14$  мН/м (Рис. 5.1.). После того как поверхностное давление достигало заданного значения, сформированный монослой лизоцима переносили методом ЛШ на кремниевую подложку. После переноса монослоя подложку помещали в герметичную ячейку, в специальное углубление наливали около 1 мл раствора KI концентрации 50 мг/мл.

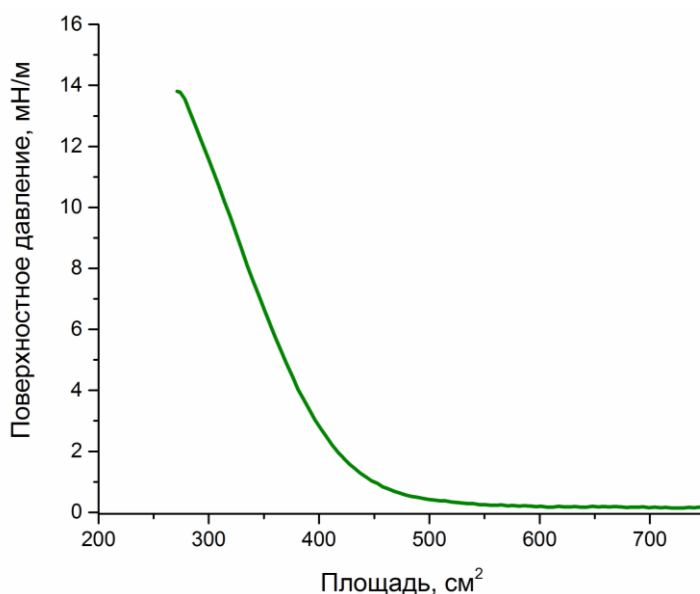
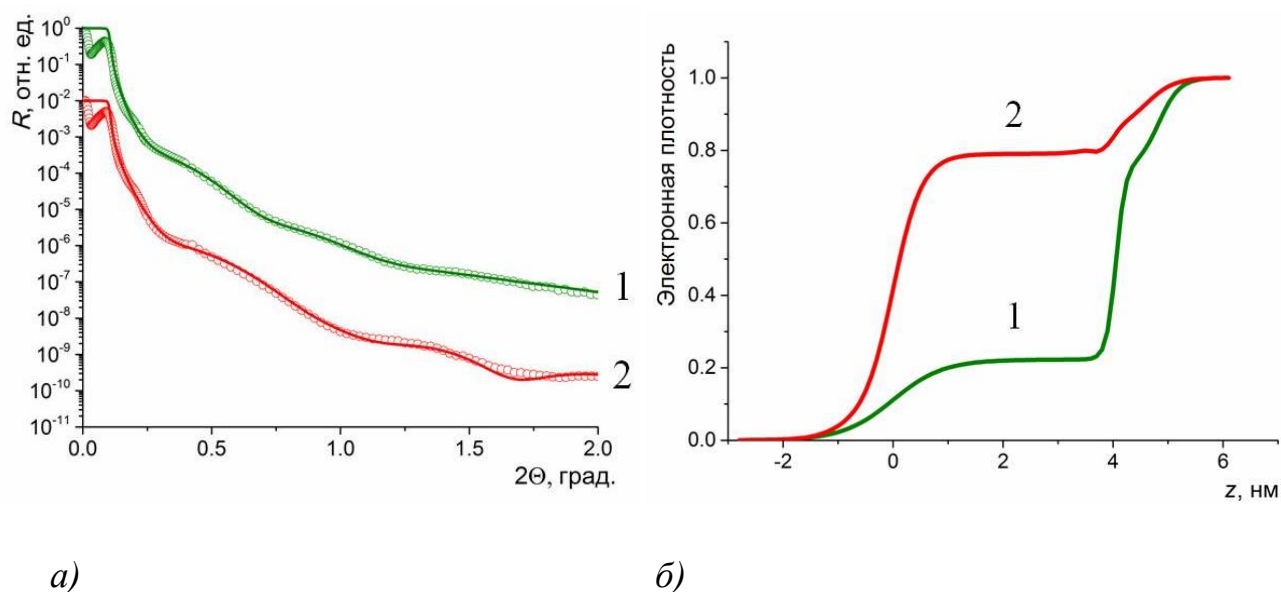


Рис. 5.1. Изотерма сжатия монослоя лизоцима с осадителем KI.

## 5.2. Результаты измерений методом рентгеновской рефлектометрии

На *рис. 5.2* представлены экспериментальные кривые РР, полученные для пленки чистого белка и пленки белка с осадителем KI, и соответствующие им профили распределения электронной плотности по толщине.

Анализ профилей электронной плотности показывает, что полученные пленки имеют толщину порядка 4 нм. Данная толщина соотносится с усредненным значением диаметра молекулы лизоцима, размеры которой приблизительно равны  $30 \times 30 \times 45 \text{ \AA}^3$  [137]. Однако в значениях электронной плотности имеются существенные различия. Электронная плотность пленки лизоцима, полученной из раствора с добавлением KI, превышает значение плотности пленки чистого белка почти в 4 раза (*рис. 5.2 (б)*). Результаты РР показывают, что при использовании для формирования белковой пленки раствора с параметрами, соответствующим кристаллизационным условиям, образуется более плотная и однородная пленка по сравнению с пленкой, образуемой из раствора чистого белка без добавления осадителя.

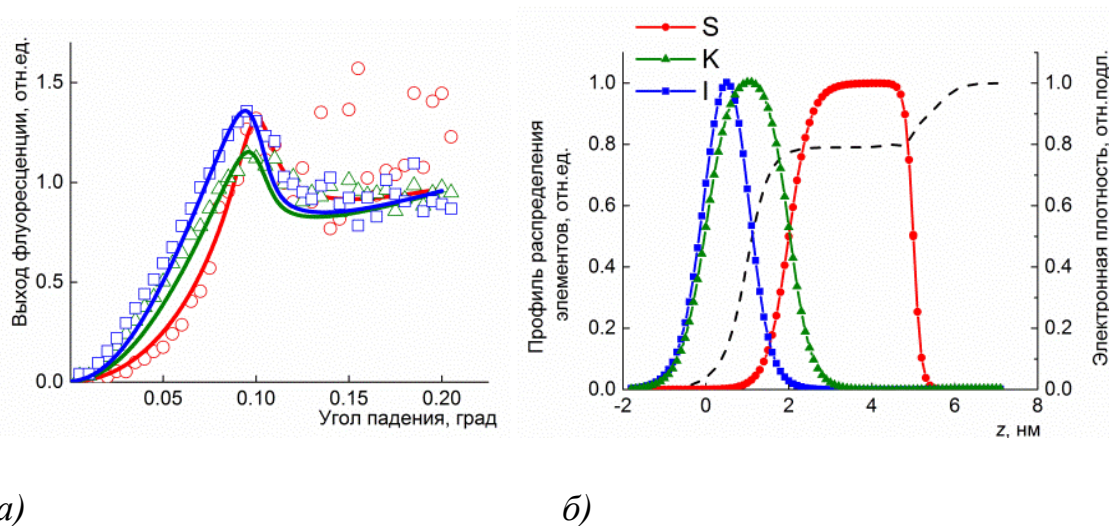


*Рис. 5.2. а* – угловые зависимости зеркальной компоненты рентгеновского отражения (точки – эксперимент, сплошные линии – расчет); *б* – рассчитанные профили электронной плотности, нормированные на электронную плотность подложки, от пленки лизоцима, сформированной из монодисперсного раствора (1, зеленая кривая), и от пленки лизоцима, сформированной из раствора с добавлением осадителя KI (2, красная кривая).

### 5.3. Результаты измерений методом стоячих рентгеновских волн в области полного внешнего отражения

Для определения наличия и месторасположения ионов соли проведены исследования пленки методом СРВ в ПВО.

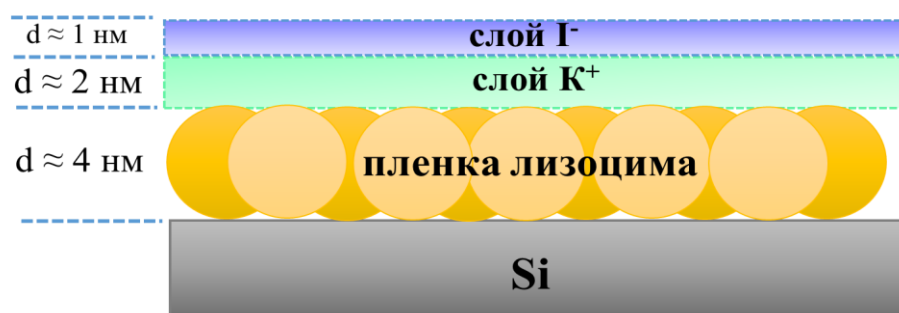
На *рис. 5.3* представлены результаты исследования пленки белка лизоцима, полученной из раствора с KI, перенесенной на кремниевую подложку методом ЛШ. Приведены угловые зависимости выхода флуоресценции от элементов серы (S), калия (K) и йода (I) (*рис. 5.3 (а)*), а также соответствующие профили распределения этих элементов по толщине исследуемой пленки (*рис. 5.3 (б)*). Профили распределения элементов приведены к единице.



*Рис. 5.3. а – угловые зависимости выхода флуоресценции для атомов S (кружки), K (треугольники) и I (квадраты); б – профили распределения атомов S, K и I по толщине z пленки лизоцима с добавлением осадителя KI, перенесенной на кремниевую подложку модифицированным методом ЛШ.*

Анализ данных СРВ в ПВО показывает, что толщина пленки, рассчитанной исходя из распределения атомов серы, согласуется с данными о толщине пленки, полученной в результате РР. При этом толщина слоя, формируемого ионами калия, составляет 2 нм, тогда как толщина слоя ионов йода составляет 1 нм. Слои калия и йода располагаются вблизи поверхности пленки лизоцима, при этом сильно перекрываясь, однако центр распределения ионов калия смещен ближе к пленке белка по сравнению с ионами йода (*рис. 5.4*). Сравнение полученных результатов образования пленки лизоцима из растворов с добавлением

осадителей KI и ранее исследованного NaCl (глава 3) показывает, что имеются существенные различия в структуре белковых пленок, сформированных из полидисперсных растворов лизоцима в условиях кристаллизации моноклинной и тетрагональной сингонии. В случае роста тетрагональной фазы распределение анионов и катионов осадителя имеет более выраженный характер, и более близко расположенным слоем к пленке лизоцима является слой, формируемый отрицательно заряженными ионами хлора, что свидетельствует о преимущественно положительном заряде молекул белка в пленке на границе. В случае формирования пленки лизоцима из раствора с осадителем, добавление которого приводит к росту кристаллов лизоцима моноклинной сингонии, полученное распределение ионных слоев говорит о том, что пленка лизоцима имеет, по всей видимости, слабый отрицательный заряд.



*Рис. 5.4. Схема белковой пленки, сформированной из раствора лизоцима с осадителем KI, полученной модифицированным методом ЛШ, построенная на основе анализа данных СРВ в области ПВО.*

#### 5.4. Заключение

Проведено исследование структурных особенностей пленок лизоцима на кремниевой подложке, полученных с помощью ранее разработанной модификации метода ЛШ. Пленки были сформированы из кристаллизационного раствора, параметры которого (буфер, pH, концентрации белка и осадителя KI) соответствовали условиям кристаллизации лизоцима моноклинной сингонии. С помощью методов РР и СРВ в области ПВО показано, что толщина полученной предложенным способом пленки белка равна порядка 4 нм, а электронная плотность пленки почти в 4 раза превышает плотность, рассчитанную для пленки,

сформированной из раствора белка без добавления осадителя. При этом было обнаружено, что ионы осадителя формируют над поверхностью пленки тонкие слои, образуя многослойную структуру. В целом, настоящая работа подтверждает результаты исследования пленки лизоцима, полученной из раствора с параметрами, соответствующими кристаллизации лизоцима тетрагональной сингонии, что свидетельствует об эффективности метода получения упорядоченных белковых пленок на твердой подложке.

Результаты работы, описанные в главе, отражены в публикации [A2].

## **ВЫВОДЫ И ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ РАБОТЫ**

1. Предложен метод получения белковых пленок на твердых подложках, основанный на ленгмюровской технологии, который заключается в использовании предварительно приготовленного раствора белка с образованием олигомеров. Предложенный подход был апробирован на примере белка лизоцима;
2. С помощью метода МУРР показано, что объемная доля наибольших олигомеров лизоцима – октамеров, образующихся в растворе на начальной стадии кристаллизации при добавлении осадителя хлорида калия, составляет приблизительно 2.3 % и мало изменяется в течение периода времени от 0 до 170 минут. Также показано, что в растворе белка без добавления осадителя присутствуют только мономеры лизоцима;
3. Установлена структура пленки лизоцима на кремниевой подложке, сформированной из полидисперсного раствора с добавлением осадителя хлорида натрия, условия которого соответствуют кристаллизации лизоцима тетрагональной сингонии. С помощью метода РР показано, что толщина белковой пленки равна 6.5 нм, а плотность практически в 4 раза превышает значение плотности пленки, сформированной из монодисперсного раствора. Исследования методом АСМ показали, что пленка имеет существенно более однородную структуру по сравнению с пленкой белка без осадителя. С помощью метода СРВ в области ПВО показано, что ионы хлора образуют на границе раздела пленка/воздух тонкий слой толщиной 0.7 нм;

4. Получена многослойная структура из ленгмюровского монослоя лизоцима на поверхности водной субфазы и слоев ионов осадителя в субфазе вблизи пленки белка. С помощью метода СРВ в области ПВО показано, что толщина белкового монослоя равна 6.5 нм и соответствуют диаметру наибольшего олигомера, образующегося в растворе на начальной стадии кристаллизации. Также показано, что ионы осадителя хлорида калия образуют тонкие слои на границе раздела пленка/жидкость, причем слой ионов хлора плотно примыкает к монослою и имеет толщину 0.5 нм, а пик распределения ионов калия смещен в глубь субфазы, и слой имеет толщину 0.7 нм;
5. Установлена структура пленки лизоцима на кремниевой подложке, сформированной из полидисперсного раствора в условиях кристаллизации лизоцима моноклинной сингонии. С помощью метода РР показано, что толщина белковой пленки равна 4 нм. С помощью метода СРВ в области ПВО показано, что ионы осадителя йодида калия образуют на поверхности пленки тонкие слои, причем толщина слоя ионов йода составляет 1 нм, а толщина слоя ионов калия составляет 2 нм;
6. С помощью методов РР и СРВ в области ПВО показано, что пленка лизоцима, сформированная из монодисперсного раствора белка, в котором содержатся только мономеры лизоцима, имеет толщину 4 нм, что соответствует диаметру мономера. Исследование методом АСМ показало, что пленка имеет «островковую» структуру, что соответствует значению пониженной плотности пленки по данным РР по сравнению с пленкой, сформированной из раствора белка с добавлением осадителя.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kalia S., Haldorai Y. Organic-inorganic hybrid nanomaterials / ed. Kalia S., Haldorai Y. Cham: Springer International Publishing, 2015. Vol. 267.
2. Sanchez C. et al. Applications of advanced hybrid organic–inorganic nanomaterials: from laboratory to market // Chem. Soc. Rev. 2011. Vol. 40, № 2. P. 696.
3. Fraden J. Handbook of Modern Sensors. Cham: Springer International Publishing, 2016.
4. Kumar S.A. Eco-Friendly Nano-Hybrid Materials for Advanced Engineering Applications. CRC Press, 2017.
5. Zhang X., Ju H., Wang J. Electrochemical sensors, biosensors and their biomedical applications // Journal of Chemical Information and Modeling. 2008. Vol. 53, № 9. 1689–1699 p.
6. Liu R. Hybrid Organic/Inorganic Nanocomposites for Photovoltaic Cells // Materials (Basel). 2014. Vol. 7, № 4. P. 2747–2771.
7. Hoppe H., Sariciftci N.S. Organic solar cells: An overview // J. Mater. Res. 2004. Vol. 19, № 07. P. 1924–1945.
8. Lambrianou A., Demin S., Hall E.A.H. Protein Engineering and Electrochemical Biosensors // Biosensing for the 21st Century. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2008. Vol. 109, № October 2007. P. 65–96.
9. Parker M.W. Protein Structure from X-Ray Diffraction // J. Biol. Phys. 2003. Vol. 29, № 4. P. 341–362.
10. Schlichting I. Serial femtosecond crystallography: The first five years // IUCrJ. International Union of Crystallography, 2015. Vol. 2, № 2013. P. 246–255.
11. Raunser S. Cryo-EM Revolutionizes the Structure Determination of Biomolecules // Angew. Chemie - Int. Ed. 2017. Vol. 56, № 52. P. 16450–16452.
12. Ponomarenko E.A. et al. The Size of the Human Proteome: The Width and Depth // Int. J. Anal. Chem. 2016. Vol. 2016. P. 1–6.
13. Su R.S.C., Kim Y., Liu J.C. Resilin: Protein-based elastomeric biomaterials // Acta Biomater. Acta Materialia Inc., 2014. Vol. 10, № 4. P. 1601–1611.
14. Minic J. et al. Immobilization of native membrane-bound rhodopsin on biosensor surfaces // Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj. 2005. Vol. 1724, № 3. P. 324–332.
15. Wasilewski T. et al. Bioelectronic nose: Current status and perspectives // Biosens. Bioelectron. 2017. Vol. 87. P. 480–494.
16. Park S.J. et al. Ultrasensitive Flexible Graphene Based Field-Effect Transistor (FET)-Type Bioelectronic Nose // Nano Lett. 2012. Vol. 12, № 10. P. 5082–5090.
17. Habibi M., Fanaei M., Emtiazi G. Light-sensitive biosensors based on photoactive marine cultivated strains // Sens. Rev. 2014. Vol. 34, № 3. P. 297–303.
18. Nelson J. Organic photovoltaic films // Curr. Opin. Solid State Mater. Sci. 2002. Vol. 6, № 1. P. 87–95.
19. Richter A.G., Kuzmenko I. Using in situ X-ray reflectivity to study protein adsorption on hydrophilic and hydrophobic surfaces: benefits and limitations. // Langmuir. 2013. Vol. 29, № 17. P. 5167–5180.

20. Marron-Brignone L., Morélis R.M., Coulet P.R. Immobilization through Adsorption of Luciferase on Langmuir–Blodgett Films. Influence of the Hydrophilicity or Hydrophobicity of the Surface on the Enzyme Kinetic Behavior // *Langmuir*. 1996. Vol. 12, № 23. P. 5674–5680.
21. Su T.J. et al. The Adsorption of Lysozyme at the Silica–Water Interface: A Neutron Reflection Study // *J. Colloid Interface Sci.* 1998. Vol. 203, № 2. P. 419–429.
22. Moreira L.A. et al. Effect of the ion-protein dispersion interactions on the protein-surface and protein-protein interactions // *J. Braz. Chem. Soc.* 2007. Vol. 18, № 1. P. 223–230.
23. Steadman B.L. et al. The effects of surface adsorption on the thermal stability of proteins // *Biotechnol. Bioeng.* 1992. Vol. 40, № 1. P. 8–15.
24. Wendorf J.R., Radke C.J., Blanch H.W. Reduced protein adsorption at solid interfaces by sugar excipients // *Biotechnol. Bioeng.* 2004. Vol. 87, № 5. P. 565–573.
25. Tie Y., Ngankam A.P., Van Tassel P.R. Probing macromolecular adsorbed layer structure and history dependence via the interfacial cavity function // *Langmuir*. 2004. Vol. 20, № 24. P. 10599–10603.
26. Hähl H. et al. Subsurface Influence on the Structure of Protein Adsorbates as Revealed by in Situ X-ray Reflectivity // *Langmuir*. 2012. Vol. 28, № 20. P. 7747–7756.
27. Kondo A., Mihara J. Comparison of adsorption and conformation of hemoglobin and myoglobin on various inorganic ultrafine particles // *J. Colloid Interface Sci.* 1996. Vol. 177, № 1. P. 214–221.
28. Lassen B., Malmsten M. Structure of protein layers during competitive adsorption // *J. Colloid Interface Sci.* 1996. Vol. 180, № 2. P. 339–349.
29. Van De Weert M. et al. The effect of a water/organic solvent interface on the structural stability of lysozyme // *J. Control. Release*. 2000. Vol. 68, № 3. P. 351–359.
30. Ramsden J.J., Prenosil J.E. Effect of Ionic Strength on Protein Adsorption Kinetics // *J. Phys. Chem.* 1994. Vol. 98, № 20. P. 5376–5381.
31. Lu J.R. et al. Lysozyme Adsorption Studies at the Silica/Water Interface Using Dual Polarization Interferometry // *Langmuir*. 2004. Vol. 20, № 5. P. 1827–1832.
32. Asanov A.N. et al. Interfacial aggregation of bovine serum albumin related to crystallization conditions studied by total internal reflection fluorescence // *J. Colloid Interface Sci.* 1997. Vol. 196, № 1. P. 62–73.
33. Peng J.B., Barnes G.T., Gentle I.R. The structures of Langmuir-Blodgett films of fatty acids and their salts. // *Adv. Colloid Interface Sci.* 2001. Vol. 91, № 2. P. 163–219.
34. Blodgett K.B., Langmuir I. Built-Up Films of Barium Stearate and Their Optical Properties // *Phys. Rev.* 1937. Vol. 51, № 11. P. 964–982.
35. Blodgett K.B. Films Built by Depositing Successive Monomolecular Layers on a Solid Surface // *J. Am. Chem. Soc.* 1935. Vol. 57, № 6. P. 1007–1022.
36. Blodgett K.B. Monomolecular films of fatty acids on glass // *J. Am. Chem. Soc.* 1934. Vol. 56, № 2. P. 495–495.



37. Blodgett K.B. Film Structure and Method of Preparation. 1940. P. 5.
38. Langmuir I., Schaefer V.J. Composition of Fatty Acid Films on Water Containing Calcium or Barium Salts // *J. Am. Chem. Soc.* 1936. Vol. 58, № 2. P. 284–287.
39. Blinov L.M. Physical Properties and Applications of Langmuir Monomolecular and Multimolecular Structures // *Russ. Chem. Rev.* 1983. Vol. 52, № 8. P. 713–735.
40. Langmuir I., Schaefer V.J. Activities of Urease and Pepsin Monolayers // *J. Am. Chem. Soc.* 1938. Vol. 60, № 6. P. 1351–1360.
41. Langmuir I., Schaefer V.J. Salted-Out Protein Films // *J. Am. Chem. Soc.* 1938. Vol. 60, № 11. P. 2803–2810.
42. Neurath H. et al. Built-up films of proteins and their properties // *Science* (80-. ). 1937. Vol. 85, № 2203. P. 76–80.
43. Hamaguchi K. Studies on protein denaturation by surface chemical method: IV. On the structure of lysozyme monolayer // *J. Biochem.* 1956. Vol. 43, № 3. P. 355–367.
44. Ray B.R., Augenstine L.G. Trypsin Monolayers at the Water–Air Interface. I. Film Characteristics and the Recovery of Enzymatic Activity. // *J. Phys. Chem.* 1956. Vol. 60, № 9. P. 1193–1199.
45. Choi J.-W. et al. Fabrication of Cytochrome c Multi-Layers by Schaefer Technique // *Mol. Cryst. Liq. Cryst. Sci. Technol. Sect. A. Mol. Cryst. Liq. Cryst.* 2000. Vol. 349, № 1. P. 187–190.
46. Eremenko A. et al. Monomolecular enzyme films stabilized by amphiphilic polyelectrolytes for biosensor devices // *Thin Solid Films.* 1995. Vol. 260, № 2. P. 212–216.
47. Pechkova E. et al. Thermal stability of lysozyme Langmuir-Schaefer films by FTIR spectroscopy. // *Langmuir.* 2007. Vol. 23, № 3. P. 1147–1151.
48. Bertoncello P. et al. Bacteriorhodopsin-based Langmuir-Schaefer films for solar energy capture // *IEEE Trans. Nanobioscience.* 2003. Vol. 2, № 2. P. 124–132.
49. Leblanc R.M., Huo Q. Langmuir and Langmuir–Blodgett Films of Proteins and Enzymes // *Encyclopedia of Surface and Colloid Science, Third Edition.* CRC Press, 2015. P. 3545–3571.
50. Erokhin V., Facci P., Nicolini C. Two-dimensional order and protein thermal stability: high temperature preservation of structure and function // *Biosens. Bioelectron.* 1995. Vol. 10, № 1–2. P. 25–34.
51. Dziri L., Puppala K., Leblanc R.M. Surface and Spectroscopic Properties of Acetylcholinesterase Monolayer at the Air/Water Interface // *J. Colloid Interface Sci.* 1997. Vol. 194, № 1. P. 37–43.
52. PAL P. et al. Protein monolayer formation at air–electrolyte interface: a Langmuir–Blodgett study // *Surf. Rev. Lett.* 2011. Vol. 18, № 06. P. 267–279.
53. Cabaj J. et al. Biosensing invertase-based Langmuir-Schaefer films: Preparation and characteristic // *Sensors Actuators, B Chem.* 2012. Vol. 166–167. P. 75–82.
54. Marchenkova M.A. et al. Cytochrome c Complexes with Cardiolipin Monolayer Formed under Different Surface Pressure // *Langmuir.* 2015. Vol. 31, № 45. P. 12426–12436.
55. Sui S.-F. et al. Conformational Changes of Proteins at an Interface Induced by a

- Supported Planar Phosphatidic Acid Monolayer // *J. Biochem.* 1994. Vol. 115, № 6. P. 1053–1057.
56. Zaitsev S.Y. Polymeric Langmuir Films With Glucose-Oxidase As Prototype Biosensors // *Sensors and Actuators B-Chemical.* 1995. Vol. 24, № 1–3. P. 177–179.
57. Girard-Egrot A.A.P., Blum L.L.J. Langmuir-Blodgett Technique for Synthesis of Biomimetic Lipid Membranes // *Nanobiotechnology of Biomimetic Membranes / ed. Martin D.K. Boston, MA: Springer US, 2007. Vol. 1. P. 23–74.*
58. Xie D. et al. Study on Biological Molecular LB Films and Properties // *Mol. Cryst. Liq. Cryst. Sci. Technol. Sect. A. Mol. Cryst. Liq. Cryst.* 1999. Vol. 337, № 1. P. 453–456.
59. Hughes A. V. et al. Floating Lipid Bilayers Deposited on Chemically Grafted Phosphatidylcholine Surfaces // *Langmuir.* 2008. Vol. 24, № 5. P. 1989–1999.
60. Hammond P.T. Building biomedical materials layer-by-layer // *Mater. Today.* Elsevier Ltd, 2012. Vol. 15, № 5. P. 196–206.
61. Keeney M. et al. Nanocoating for biomolecule delivery using layer-by-layer self-assembly // *J. Mater. Chem. B. Royal Society of Chemistry,* 2015. Vol. 3, № 45. P. 8757–8770.
62. Anzai J. et al. Layer-by-Layer Construction of Multilayer Thin Films Composed of Avidin and Biotin-Labeled Poly(amine)s // *Langmuir.* 1999. Vol. 15, № 1. P. 221–226.
63. Lvov Y., Essler F., Decher G. Combination of polycation/polyanion self-assembly and Langmuir-Blodgett transfer for the construction of superlattice films // *J. Phys. Chem.* 1993. Vol. 97, № 51. P. 13773–13777.
64. Ariga K., Ji Q., Hill J.P. Enzyme-Encapsulated Layer-by-Layer Assemblies: Current Status and Challenges Toward Ultimate Nanodevices // *Chinese Journal of Radiology.* 2010. Vol. 34, № 4. P. 51–87.
65. Izumrudov V.A. Self-assembly and molecular “recognition” phenomena in solutions of (bio)polyelectrolyte complexes // *Russ. Chem. Rev.* 2008. Vol. 77, № 4. P. 401–415.
66. Szabó T. et al. Layer-by-layer construction of ultrathin hybrid films with proteins and clay minerals // *J. Phys. Chem. C.* 2007. Vol. 111, № 34. P. 12730–12740.
67. Cassierr T., Lowack K. Layer-by-layer assembled protein / polymer hybrid films : nanoconstruction via specific recognition // *Supramol. Sci.* 1998. Vol. 5, № 98. P. 309–315.
68. Schreiber F. Structure and growth of self-assembling monolayers // *Prog. Surf. Sci.* 2000. Vol. 65, № 5–8. P. 151–257.
69. Борщёв О.В., Пономаренко С.А. Самоорганизующиеся органические полупроводники для монослойных полевых транзисторов // *Высокомолекулярные соединения С.* 2014. Vol. 56, № 1. P. 33–48.
70. Yeung S.Y. et al. Reversible Self-Assembled Monolayers (rSAMs) as Robust and Fluidic Lipid Bilayer Mimics // *Langmuir.* 2018. Vol. 34, № 13. P. 4107–4115.
71. Bishop A.R., Nuzzo R.G. Self-assembled monolayers: Recent developments and applications // *Curr. Opin. Colloid Interface Sci. Current Science Ltd.,* 1996. Vol. 1, № 1. P. 127–136.

72. Magnussen O.M. et al. Self-assembly of organic films on a liquid metal // *Nature*. 1996. Vol. 384, № 6606. P. 250–252.
73. Lee W. et al. Fabrication of self-assembled protein A monolayer and its application as an immunosensor // *Biosens. Bioelectron.* 2003. Vol. 19, № 3. P. 185–192.
74. Kivioja J.M. et al. Electrical transport through ordered self-assembled protein monolayer measured by constant force conductive atomic force microscopy // *Appl. Phys. Lett.* 2009. Vol. 94, № 18. P. 1–4.
75. Katchalski-Katzir E. Immobilized enzymes - learning from past successes and failures // *Trends Biotechnol.* 1993. Vol. 11, № 11. P. 471–478.
76. Nguyen H., Kim M. An Overview of Techniques in Enzyme Immobilization // *Appl. Sci. Conver. Technol.* 2017. Vol. 26, № 6. P. 157–163.
77. Павлинский Г.В. Основы физики рентгеновского излучения. Москва: ФИЗМАТЛИТ, 2007. 240 p.
78. Shcherbina M.A. et al. Modern approaches to investigation of thin films and monolayers: X-ray reflectivity, grazing-incidence X-ray scattering and X-ray standing waves // *Russ. Chem. Rev.* 2014. Vol. 83, № 12. P. 1091–1119.
79. Kiessig H. Untersuchungen zur Totalreflexion von Röntgenstrahlen // *Ann. Phys.* 1931. Vol. 402, № 6. P. 715–768.
80. de Boer D.K.G., Leenaers A.J.G., van den Hoogenhof W.W. Glancing-incidence x-ray analysis of thin-layered materials: A review // *X-Ray Spectrom.* 1995. Vol. 24, № 3. P. 91–102.
81. Dosch H., Batterman B.W., Wack D.C. Depth-Controlled Grazing-Incidence Diffraction of Synchrotron X Radiation // *Phys. Rev. Lett.* 1986. Vol. 56, № 11. P. 1144–1147.
82. Dosch H. Evanescent absorption in kinematic surface Bragg diffraction // *Phys. Rev. B.* 1987. Vol. 35, № 5. P. 2137–2143.
83. Parratt L.G. Surface Studies of Solids by Total Reflection of X-Rays // *Phys. Rev.* 1954. Vol. 95, № 2. P. 359–369.
84. Бабанов Ю.А. et al. Структурная характеристика мультислойных наноструктур Cr/Gd/Cr и Cr/Gd/Fe/Cr по данным рентгеновской рефлектометрии // *Физика Металлов И Металловедение.* 2015. Vol. 116, № 11. P. 1173–1183.
85. Neuhold A. et al. X-ray based tools for the investigation of buried interfaces in organic electronic devices // *Org. Electron. physics, Mater. Appl.* 2013. Vol. 14, № 2. P. 479–487.
86. Giannini C. et al. Molecular packing in new Langmuir-Blodgett systems investigated by X-ray specular reflectivity and grazing incidence X-ray diffraction // *Thin Solid Films.* 1996. Vol. 288, № 1–2. P. 272–278.
87. Pietsch U., Hoehne U., Moehwald H. Localization of a magnesium .delta.-sheet within a lead stearate Langmuir-Blodgett multilayer by x-ray reflectivity measurement // *Langmuir.* 1993. Vol. 9, № 1. P. 208–210.
88. Bukreeva T. V et al. X-ray reflectivity prove of Langmuir–Blodgett superlattice formation of lead and yttrium stearate alternative bilayers // *Mater. Sci. Eng. C.* 2002. Vol. 22, № 2. P. 129–133.

89. Milella E., Giannini C., Tapfer L. Structural characterisation of sodium behenate Langmuir—Blodgett films using X-ray diffraction techniques // *Thin Solid Films*. Elsevier Science S.A., 1997. Vol. 293, № 1–2. P. 291–294.
90. Foglia F., Lawrence M.J., Barlow D.J. Studies of model biological and biomimetic membrane structure: Reflectivity vs diffraction, a critical comparison // *Curr. Opin. Colloid Interface Sci*. Elsevier Ltd, 2015. Vol. 20, № 4. P. 235–243.
91. Jones E.M. et al. Interaction of Tau Protein with Model Lipid Membranes Induces Tau Structural Compaction and Membrane Disruption // *Biochemistry*. 2012. Vol. 51, № 12. P. 2539–2550.
92. Bosio L., Benattar J.J., Rieutord F. X-ray reflectivity of a Langmuir monolayer on water // *Rev. Phys. Appliquée*. 1987. Vol. 22, № 8. P. 775–778.
93. Cristofolini L. et al. Structural Study of the DNA Dipalmitoylphosphatidylcholine Complex at the Air–Water Interface // *Biomacromolecules*. 2007. Vol. 8, № 7. P. 2270–2275.
94. Richter A.G. et al. Thickness and Interfacial Roughness Changes in Polymer Thin Films during X-Irradiation // *Macromolecules*. 2006. Vol. 39, № 4. P. 1545–1553.
95. Mezger M. et al. Water and ice in contact with octadecyl-trichlorosilane functionalized surfaces: A high resolution x-ray reflectivity study // *J. Chem. Phys*. 2008. Vol. 128, № 24. P. 244705.
96. Tiwari M.K., Sawhney K.J.S. Structural characterization of thin layered materials using x-ray standing wave enhanced elastic and inelastic scattering measurements. // *J. Phys. Condens. Matter*. 2010. Vol. 22, № 17. P. 175003.
97. Zheludeva S.I. et al. X-ray standing waves in bragg diffraction and in total reflection regions using langmuir-blodgett multilayers // *Thin Solid Films*. 1990. Vol. 193–194, № PART 1. P. 395–400.
98. Koval'chuk M.V., Kohn V.G. X-ray standing waves—a new method of studying the structure of crystals // *Uspekhi Fiz. Nauk*. 1986. Vol. 149, № 05. P. 69–103.
99. Laue M. v. Die Absorption der Röntgenstrahlen in Kristallen im Interferenzfall // *Acta Crystallogr*. 1949. Vol. 2, № 2. P. 106–113.
100. Koval'chuk M. V et al. X-ray standing waves—a new method of studying the structure of crystals // *Sov. Phys. Uspekhi*. 1986. Vol. 29, № 5. P. 426–446.
101. Bedzyk M.J., Bommarito G.M., Schildkraut J.S. X-ray standing waves at a reflecting mirror surface // *Phys. Rev. Lett*. 1989. Vol. 62, № 12. P. 1376–1379.
102. Ghose S.K., Dev B.N. X-ray standing wave and reflectometric characterization of multilayer structures // *Phys. Rev. B*. 2001. Vol. 63, № 24. P. 245409.
103. Golovchenko J.A. et al. Solution to the Surface Registration Problem Using X-Ray Standing Waves // *Phys. Rev. Lett*. 1982. Vol. 49, № 8. P. 560–563.
104. Tiwari M.K., Sawhney K.J.S.S., Lodha G.S. Multilayer mirror as a substrate for total reflection X-ray fluorescence spectrometry // *Spectrochim. Acta Part B At. Spectrosc*. Elsevier B.V., 2010. Vol. 65, № 6. P. 434–440.
105. Tiwari M.K. et al. Investigation of metal nanoparticles on a Si surface using an x-ray standing wave field // *J. Appl. Phys*. 2008. Vol. 103, № 5. P. 054311.
106. Shapovalov V.L. et al. Elemental Analysis within the Electrical Double Layer Using Total Reflection X-ray Fluorescence Technique // *J. Phys. Chem. B*. 2007. Vol. 111, № 15. P. 3927–3934.

107. Zheludeva S.I. et al. X-ray Standing Waves in X-ray Specular Reflection and Fluorescence Study of Nano-Films // *J. Appl. Crystallogr. International Union of Crystallography*, 1997. Vol. 30, № 5. P. 833–838.
108. Zheludeva S.I. et al. X-ray total external reflection fluorescence study of LB films on solid substrate // *J. Phys. D. Appl. Phys.* 1993. Vol. 26, № 4A. P. A202–A205.
109. Daillant J. et al. Interaction of cations with a fatty acid monolayer. A grazing incidence x-ray fluorescence and reflectivity study // *Langmuir*. 1991. Vol. 7, № 4. P. 611–614.
110. Seregin A.Y. et al. Determination of preferential molecular orientation in porphyrin-fullerene dyad ZnDHD6ee monolayers by the X-ray standing-wave method and X-ray reflectometry // *Crystallogr. Reports*. 2013. Vol. 58, № 6. P. 934–938.
111. Cristofolini L. Synchrotron X-ray techniques for the investigation of structures and dynamics in interfacial systems // *Curr. Opin. Colloid Interface Sci. Elsevier Ltd*, 2014. Vol. 19, № 3. P. 228–241.
112. Zheludeva S.I. et al. Langmuir monolayers on water surface investigated by X-ray total reflection fluorescence // *Mater. Sci. Eng. C*. 2003. Vol. 23, № 5. P. 567–570.
113. Novikova N.N. et al. X-ray fluorescence methods for investigations of lipid/protein membrane models // *J. Synchrotron Radiat. International Union of Crystallography*, 2005. Vol. 12, № 4. P. 511–516.
114. Novikova N.N. et al. Total external reflection X-ray fluorescence analysis of protein-metal ion interactions in biological systems // *Crystallogr. Reports*. 2012. Vol. 57, № 5. P. 648–655.
115. Novikova N.N. et al. Spectral-selective X-ray methods for structure diagnostics of ordered bioorganic nanosystems on a liquid surface // *J. Surf. Investig. X-ray, Synchrotron Neutron Tech.* 2011. Vol. 5, № 5. P. 816–821.
116. Levine J.R. et al. Grazing-incidence small-angle X-ray scattering: new tool for studying thin film growth // *J. Appl. Crystallogr. International Union of Crystallography*, 1989. Vol. 22, № 6. P. 528–532.
117. Santoro G., Yu S. Grazing Incidence Small Angle X-Ray Scattering as a Tool for In- Situ Time-Resolved Studies // *X-ray Scattering. InTech*, 2017. P. 29–60.
118. Yoneda Y. Anomalous Surface Reflection of X Rays // *Phys. Rev.* 1963. Vol. 131, № 5. P. 2010–2013.
119. Berge B., Lenne P.-F., Renault A. X-ray grazing incidence diffraction on monolayers at the surface of water // *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* 1998. Vol. 3, № 3. P. 321–326.
120. Pignat J. et al. Grazing Incidence X-ray Diffraction on Langmuir Films: Toward Atomic Resolution † // *J. Phys. Chem. B*. 2006. Vol. 110, № 44. P. 22178–22184.
121. Kmetko J. et al. Ordering in the Subphase of a Langmuir Monolayer: X-ray Diffraction and Anomalous Scattering Studies // *Langmuir*. 2001. Vol. 17, № 16. P. 4697–4700.
122. Haas H., Brezesinski G., Möhwald H. X-ray diffraction of a protein crystal anchored at the air/water interface // *Biophys. J.* 1995. Vol. 68, № 1. P. 312–314.
123. Verclas S.A.W. et al. X-ray diffraction from a single layer of purple membrane at

- the air/water interface // *J. Mol. Biol.* 1999. Vol. 287, № 5. P. 837–843.
124. Pechkova E., Tripathi S., Nicolini C. MicroGISAXS of Langmuir–Blodgett protein films: effect of temperature on long-range order // *J. Synchrotron Radiat. International Union of Crystallography*, 2009. Vol. 16, № 3. P. 330–335.
  125. Erokhin V. et al. Synchrotron study of heat induced order in protein Langmuir–Blodgett films // *Thin Solid Films*. 1998. Vol. 327–329. P. 636–638.
  126. BLAKE C.C.F. et al. Structure of Hen Egg-White Lysozyme: A Three-dimensional Fourier Synthesis at 2 Å Resolution // *Nature*. 1965. Vol. 206, № 4986. P. 757–761.
  127. Wu T. et al. What is new in lysozyme research and its application in food industry? A review // *Food Chem. Elsevier*, 2019. Vol. 274, № September 2018. P. 698–709.
  128. Stapleton A. et al. The direct piezoelectric effect in the globular protein lysozyme // *Appl. Phys. Lett.* 2017. Vol. 111, № 14.
  129. Ethève J., Déjardin P. Adsorption Kinetics of Lysozyme on Silica at pH 7.4: Correlation between Streaming Potential and Adsorbed Amount // *Langmuir*. 2002. Vol. 18, № 5. P. 1777–1785.
  130. Felsovalyi F. et al. Reversibility of the adsorption of lysozyme on silica. // *Langmuir*. 2011. Vol. 27, № 19. P. 11873–11882.
  131. Kubiak-Ossowska K. et al. Lysozyme adsorption at a silica surface using simulation and experiment: effects of pH on protein layer structure // *Phys. Chem. Chem. Phys. Royal Society of Chemistry*, 2015. Vol. 17, № 37. P. 24070–24077.
  132. Yano Y.F. et al. Hofmeister Anion Effects on Protein Adsorption at an Air–Water Interface // *Langmuir*. 2016. Vol. 32, № 38. P. 9892–9898.
  133. Abeyrathne E.D.N.S., Lee H.Y., Ahn D.U. Sequential separation of lysozyme, ovomucin, ovotransferrin, and ovalbumin from egg white // *Poult. Sci.* 2014. Vol. 93, № 4. P. 1001–1009.
  134. Yano Y.F., Uruga T. Effect of salt ions on protein layers at the air-water interface under a crystallization condition // *Chem. Phys. Elsevier B.V.*, 2013. Vol. 419. P. 153–155.
  135. Yano Y.F. Kinetics of protein unfolding at interfaces // *J. Phys. Condens. Matter*. 2012. Vol. 24, № 50. P. 503101.
  136. Yano Y.F. et al. Hofmeister anion effects on protein adsorption at an air-water interface // *Langmuir*. 2016. Vol. 32, № 38. P. 9892–9898.
  137. Yano Y.F. et al. Protein Salting Out Observed at an Air–Water Interface // *J. Phys. Chem. Lett.* 2011. Vol. 2, № 9. P. 995–999.
  138. Hamaguchi K. Studies on protein denaturation by surface chemical method: I. The relationships between monolayer properties and urea denaturation of lysozyme // *J. Biochem.* 1955. Vol. 42, № 10. P. 449–459.
  139. Miñones Conde M. et al. How to obtain a well-spread monolayer of lysozyme at the air/water interfaces // *J. Colloid Interface Sci.* 2011. Vol. 361, № 1. P. 351–360.
  140. Zhang Y., Cremer P.S. Interactions between macromolecules and ions: the Hofmeister series // *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2006. Vol. 10, № 6. P. 658–663.
  141. Baldwin R.L. How Hofmeister ion interactions affect protein stability // *Biophys.*

- J. Elsevier, 1996. Vol. 71, № 4. P. 2056–2063.
142. Tadeo X. et al. Protein stabilization and the Hofmeister effect: The role of hydrophobic solvation // *Biophys. J.* 2009. Vol. 97, № 9. P. 2595–2603.
  143. Jungwirth P., Cremer P.S. Beyond Hofmeister // *Nat. Chem.* Nature Publishing Group, 2014. Vol. 6, № 4. P. 261–263.
  144. Kumar A., Venkatesu P. Does the stability of proteins in ionic liquids obey the Hofmeister series? // *Int. J. Biol. Macromol.* Elsevier B.V., 2014. Vol. 63. P. 244–253.
  145. Okur H.I. et al. Beyond the Hofmeister Series: Ion-Specific Effects on Proteins and Their Biological Functions // *J. Phys. Chem. B.* 2017. Vol. 121, № 9. P. 1997–2014.
  146. Kunz W., Lo Nostro P., Ninham B.W. The present state of affairs with Hofmeister effects // *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* 2004. Vol. 9, № 1–2. P. 1–18.
  147. Lu X. et al. Behavior of lysozyme adsorbed onto biological liquid crystal lipid monolayer at the air/water interface // *Chinese Phys. B.* 2016. Vol. 25, № 9. P. 090506.
  148. McPherson A., Gavira J.A. Introduction to protein crystallization // *Acta Crystallogr. Sect. F Struct. Biol. Commun. International Union of Crystallography*, 2014. Vol. 70, № 1. P. 2–20.
  149. Ducruix A. et al. Protein interactions as seen by solution X-ray scattering prior to crystallogenesis // *J. Cryst. Growth.* 1996. Vol. 168, № 1–4. P. 28–39.
  150. Bonneté F., Finet S., Tardieu A. Second virial coefficient: variations with lysozyme crystallization conditions // *J. Cryst. Growth.* 1999. Vol. 196, № 2–4. P. 403–414.
  151. Свергун Д.И. et al. Рентгеновское малоугловое рассеяние, синхротронное излучение и структура био- и наносистем // *Кристаллография.* 2011. Vol. 56, № 5. P. 847–875.
  152. Tuukkanen A.T., Spilotros A., Svergun D.I. Progress in small-angle scattering from biological solutions at high-brilliance synchrotrons // *IUCrJ.* 2017. Vol. 4, № 5. P. 518–528.
  153. Kikhney A.G., Svergun D.I. A practical guide to small angle X-ray scattering (SAXS) of flexible and intrinsically disordered proteins // *FEBS Lett.* Federation of European Biochemical Societies, 2015. Vol. 589, № 19PartA. P. 2570–2577.
  154. Boué F. et al. Small angle neutron scattering study of lysozyme solutions // *J. Cryst. Growth.* 1993. Vol. 133, № 3–4. P. 246–254.
  155. Zhang F. et al. Protein interactions studied by SAXS: effect of ionic strength and protein concentration for BSA in aqueous solutions. // *J. Phys. Chem. B.* 2007. Vol. 111, № 1. P. 251–259.
  156. Marchenkova M.A. et al. In situ study of the state of lysozyme molecules at the very early stage of the crystallization process by small-angle X-ray scattering // *Crystallogr. Reports.* 2016. Vol. 61, № 1. P. 5–10.
  157. Kovalchuk M. V. et al. Investigation of the Initial Crystallization Stage in Lysozyme Solutions by Small-Angle X-ray Scattering // *Cryst. Growth Des.* 2016. Vol. 16, № 4. P. 1792–1797.
  158. Boikova A.S. et al. Small-Angle X-ray Scattering Study of the Influence of

- Solvent Replacement (from H<sub>2</sub>O to D<sub>2</sub>O ) on the Initial Crystallization Stage of Tetragonal Lysozyme // *Crystallogr. Reports*. 2017. Vol. 62, № 6. P. 837–842.
159. Boikova A.S. et al. Octamer formation in lysozyme solutions at the initial crystallization stage detected by small-angle neutron scattering // *Acta Crystallogr. Sect. D. International Union of Crystallography*, 2017. Vol. 73, № 7. P. 591–599.
160. Кордонская Ю.В. et al. Исследование поведения олигомеров белка лизоцима в растворах методом молекулярной динамики // *Кристаллография*. 2018. Vol. 63, № 6. P. 902–905.
161. Boikova A.S. et al. Investigation of the Pre-crystallization Stage of Proteinase K in Solution ( Influence of Temperature and Precipitant Type ) by Small-Angle X-Ray Scattering. 2018. Vol. 63, № 6. P. 865–870.
162. Kovalchuk M. V. et al. Pre-crystallization phase formation of thermolysin hexamers in solution close to crystallization conditions // *J. Biomol. Struct. Dyn.* Taylor & Francis, 2019. Vol. 37, № 12. P. 3058–3064.
163. Ковальчук М.В. et al. Исследование in situ процессов роста и деградации кристаллов тетрагонального лизоцима на подложке кремния методом высокоразрешающей рентгеновской дифрактометрии // *Кристаллография*. 2014. Vol. 59, № 5. P. 749–754.
164. Pedersen J.S., Hamley I.W. Analysis of neutron and X-ray reflectivity data. II. Constrained least-squares methods // *J. Appl. Crystallogr.* 1994. Vol. 27, № pt 1. P. 36–49.
165. Pernot P. et al. Upgraded ESRF BM29 beamline for SAXS on macromolecules in solution // *J. Synchrotron Radiat. International Union of Crystallography*, 2013. Vol. 20, № 4. P. 660–664.
166. Round A. et al. BioSAXS Sample Changer: A robotic sample changer for rapid and reliable high-throughput X-ray solution scattering experiments // *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr. International Union of Crystallography*, 2015. Vol. 71. P. 67–75.
167. Brennich M.E. et al. Online data analysis at the ESRF bioSAXS beamline, BM29 // *J. Appl. Crystallogr. International Union of Crystallography*, 2016. Vol. 49, № 1. P. 203–212.
168. Konarev P. V. et al. PRIMUS : a Windows PC-based system for small-angle scattering data analysis // *J. Appl. Crystallogr.* 2003. Vol. 36, № 5. P. 1277–1282.
169. Franke D. et al. ATSAS 2.8: A comprehensive data analysis suite for small-angle scattering from macromolecular solutions // *J. Appl. Crystallogr. International Union of Crystallography*, 2017. Vol. 50, № 4. P. 1212–1225.
170. Svergun D.I., Barberato C., Koch M.H.J. CRY SOL - A program to evaluate X-ray solution scattering of biological macromolecules from atomic coordinates // *J. Appl. Crystallogr.* 1995. Vol. 28, № 6. P. 768–773.
171. Бойкова А.С. et al. Исследование влияния замены растворителя -H<sub>2</sub>O на D<sub>2</sub>O - на начальную стадию кристаллизации лизоцима тетрагональной сингонии методом малоуглового рентгеновского рассеяния // *Кристаллография*. 2017. № 6. P. 876–881.
172. Putnam C.D. et al. X-ray solution scattering (SAXS) combined with crystallography and computation: Defining accurate macromolecular structures,



- conformations and assemblies in solution // *Q. Rev. Biophys.* 2007. Vol. 40, № 3. P. 191–285.
173. Dyakova Y.A. et al. Small-angle X-ray scattering study of conditions for the formation of growth units of protein crystals in lysozyme solutions // *Crystallogr. Reports*. 2017. Vol. 62, № 3. P. 364–369.
174. Kordonskaya Y. V. et al. Study of the Behavior of Lysozyme Oligomers in Solutions by the Molecular Dynamics Method // *Crystallogr. Reports*. 2018. Vol. 63, № 6. P. 947–950.
175. Ries-Kautt M.M., Ducruix A.F. Relative effectiveness of various ions on the solubility and crystal growth of lysozyme. // *J. Biol. Chem.* 1989. Vol. 264, № 2. P. 745–748.
176. Baxter R.J. Percus–Yevick Equation for Hard Spheres with Surface Adhesion // *J. Chem. Phys.* 1968. Vol. 49, № 6. P. 2770–2774.
177. Braslau A. et al. Capillary waves on the surface of simple liquids measured by x-ray reflectivity // *Phys. Rev. A*. 1988. Vol. 38, № 5. P. 2457–2470.
178. Fogolari F., Brigo A., Molinari H. The Poisson-Boltzmann equation for biomolecular electrostatics: A tool for structural biology // *J. Mol. Recognit.* 2002. Vol. 15, № 6. P. 377–392.
179. Dolinsky T.J. et al. PDB2PQR: Expanding and upgrading automated preparation of biomolecular structures for molecular simulations // *Nucleic Acids Res.* 2007. Vol. 35, № SUPPL.2. P. 522–525.
180. Tautd A., Arnold A., Pleiss J. Simulation of protein association: Kinetic pathways towards crystal contacts // *Phys. Rev. E - Stat. Nonlinear, Soft Matter Phys.* 2015. Vol. 91, № 3. P. 1–11.