

На правах рукописи

Киселев Глеб Александрович

**ИЗУЧЕНИЕ СЕНСОРНЫХ СВОЙСТВ ОРГАНИЧЕСКИХ И ПОЛИМЕРНЫХ
ПЛЕНОК НА ТВЕРДОЙ ПОДЛОЖКЕ**

Специальности 02.00.06 – высокомолекулярные соединения,
01.04.07 – физика конденсированного состояния

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата физико-математических наук

Москва 2007

Работа выполнена на кафедре физики полимеров и кристаллов физического факультета Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова

Научный руководитель:

доктор физико-математических наук, профессор
Яминский Игорь Владимирович

Официальные оппоненты:

Доктор физико-математических наук, профессор
Гиваргизов Евгений Инвиевич
Кандидат физико-математических наук
Прохоров Валерий Васильевич

Ведущая организация:

Государственный научно-исследовательский институт физических проблем
им. Ф.В. Лукина

Защита состоится « 25 » апреля 2007 г. в _____ часов на заседании диссертационного совета Д 501.002.01 в Московском государственном университете им. М.В. Ломоносова по адресу: 119992 Москва, Воробьевы горы, МГУ, физический факультет, ауд. ____

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке физического факультета МГУ.

Автореферат разослан « » _____ 2007г.

Ученый секретарь
Диссертационного совета Д 501.002.01
кандидат физико-математических наук

Лаптинская Т.В.

Общая характеристика работы

Актуальность работы. Многие процессы, протекающие в тонких органических и полимерных слоях в настоящий момент недостаточно изучены в силу ограниченных возможностей большинства косвенных методов анализа свойств тонких пленок. При этом знания об энергетических причинах самоорганизации субъединиц монослоев и сил кооперативных взаимодействий биополимеров вблизи поверхности являются насущной необходимостью в областях сенсорных приложений, биосовместимых материалов и медицинских приборов, контактирующих с физиологическими жидкостями, таких как зонды, протезы, контактные линзы и т.д. Подобная задача актуальна также в исследованиях механизмов агрегации биополимеров в клеточных мембранах, приводящих к нарушениям ионного обмена и нейродегенеративным заболеваниям человека.

Благодаря использованию современных микрокантилеверных преобразователей поверхностных реакций совместно с методами атомно-силовой микроскопии (АСМ) становится возможным получение более полной информации о морфологии и энергетических свойствах монослойных пленок, с чем связан интенсивный рост числа публикаций по данной тематике в ведущих научных журналах.

Появление кантилеверов во многом обусловлено интенсивным развитием атомно-силовой микроскопии. Устройства с микромеханическими преобразователями зарекомендовали себя в качестве полноценного научного инструмента, применяемого в исследованиях межмолекулярных взаимодействий в монослойных пленках низкомолекулярных веществ, биополимерных объектов, а также в областях химии поверхностных реакций, биологии и медицине. Существенной особенностью кантилевера, не имеющей альтернативных аналогов, является способность прямого измерения натяжения в пленках, помещенных на одну из его сторон. Благодаря этому информация о состоянии исследуемых объектов, получаемая с помощью микромеханических систем, оказывается уникальной и, вообще говоря, отличается от той, которую дают распространенные методы анализа массы, а также оптических, и электрических свойств пленок. Уникальность информации состоит в том, что она непосредственно характеризует энергию межмолекулярных взаимодействий

внутри пленки, преобразующуюся в статический изгиб кантилевера (энергию аналитического сигнала).

Основной **целью** диссертационной работы являлось получение новых экспериментальных данных с использованием зондовой микроскопии и микрокантилеверных систем о свойствах самоорганизующихся монослойных пленок сераорганических соединений, иммунных комплексов и белков, иммобилизованных на твердой подложке, и разработка методики иммобилизации биополимеров на поверхности кантилевера. Методическая часть работы включала в себя также разработку научного прибора на основе атомно-силового микроскопа, позволяющего прецизионно измерять массу микрообъектов и латеральные напряжения в тонких пленках, помещенных на поверхность кантилевера. В соответствии с поставленной целью решались следующие **задачи исследования**.

1. Выявить и охарактеризовать основные механизмы, инициирующие аналитический сигнал деформаций микрокантилеверного преобразователя при комплексации ионов двухвалентных металлов в рецепторном слое молекул бис-4-(2-пиридилметиленаминофинил)дисульфида на примере самоорганизующихся монослоев сурфактантов: тиофенола, 4-аминотиофенола и гексантиола.
2. Разработать методику ковалентной и физической иммобилизации биополимеров на кремниевой и золотой поверхностях кантилевера. Исследовать морфологию рецепторных слоев прямых биополимерных кантилеверных анализаторов морфина и высокомолекулярного антигена – пероксидазы хрена (ПХ). Изучить механизмы, отвечающие за возникновение поверхностного натяжения в рецепторной пленке при различных методах иммобилизации молекул IgG в рецепторе.
3. С помощью АСМ исследовать процессы образования фибрилл лизоцима при низких рН из монослойных пленок на модифицированных гидрофильной и гидрофобной поверхностях. Изучить кинетику и измерить абсолютные значения сил изгиба кантилевера на примере молекул лизоцима, привитых на золотой и кремниевой сторонах кантилевера. Построить схему расчета сил парных взаимодействий соседних белковых звеньев, находящихся на поверх-

ности кантилевера, исходя из данных о величине изгиба кантилевера и о структуре монослойной пленки.

4. Разработать методику закрепления микрочастиц и реализовать метод измерения их массы с использованием кантилевера атомно-силового микроскопа в резонансном режиме. Провести сопоставление модельных и экспериментальных результатов определения массы с помощью кантилевера для оценки относительной погрешности измерения массы и разрешающей способности разработанной системы микровзвешивания. Исследовать индивидуальные сорбционные свойства одиночных микрочастиц хроматографического сорбента (силикагеля с модифицированной поверхностью).

Материалы и методы. Измерения проводились на атомно-силовом микроскопе ФемтоСкан (Центр перспективных технологий, Россия) в режиме прерывистого контакта на воздухе с использованием кантилеверов NSC14 (MikroMasch, Россия) из кремния с номинальной жесткостью 5 Н/м и резонансной частотой сканирования в диапазоне 150–170 кГц. Обработка изображений осуществлялась с помощью программы ФемтоСкан Онлайн (Центр перспективных технологий, Россия). В качестве подложек для образцов были выбраны свежесколотые с золотым напылением (напылитель Eiko IB-3) и подвергнутые различным модификациям поверхности слюды. В качестве модификатора слюды (кремния в случае кантилеверов), аминирующего поверхность, использовался 3-аминопропилсилатран (АПС), для аминирования золотой поверхности – 4-аминотиофенол. Модификация аминированных поверхностей для последующей иммобилизации белков производилась с помощью глутарового альдегида. Остаточные альдегидные группы блокировались трис-(гидрокси-метиламино)метаном).

Измерение сил в пленках и массы на поверхности микрокантилеверов осуществлялось с помощью разработанного в рамках данной работы устройства, тестирование которого для экспериментов прецизионного контроля массы проводилось с использованием полистироловых калибровочных микросфер и пьезосканера атомно-силового микроскопа. Диаметр полистироловых микросфер определялся на растворе электронном микроскопе (НИТАСНІ S-520). Для измерения массы использовались кантилеверы Nanosensors с резонансной частотой 320 кГц и жесткостью 42 Н/м. При измерении сил в тонких пленках применялись кремниевые консоли frC01

жесткостью 0,03 Н/м (изготовленные в Государственном научно-исследовательском институте физических проблем им. Ф.В. Лукина, Москва).

Иммобилизация белков на поверхности кантилеверов и образцов для АСМ проводилась в одинаковых условиях путем непосредственного контакта поверхности и буфера с модификатором.

Конъюгат морфин-овальбумин, сыворотка крови кролика, содержащая специфические антитела к морфину, растворы морфина были предоставлены сотрудниками Института физиологически активных веществ (ИФАВ). Эксперименты с данными веществами проводились на территории ИФАВ.

Иммобилизатор IgG – белок А, пероксидаза хрена (ПХ), анти-ПХ-IgG кролика, бычий сывороточный альбумин (БСА) и овальбумин были предоставлены сотрудниками кафедры химической энзимологии химического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова.

Низкомолекулярные сурфактанты (4-аминотиотиофенол, гексанотиол, тиофенол, бис-4-(2-пиридилметиленаминофинил)дисульфид, 3-аминопропилсилатран, трис-(гидрокси метиламинометан), глутаровый альдегид), буферные солевые растворы (фосфатный (рН = 7,0), ацетатный (рН = 4,5), глициновый (рН = 3,0)), растворы солей ($MX_2 \cdot 6H_2O$, где M – Co, Cu, Ni и X – ClO_4) были предоставлены сотрудниками кафедр органической химии, химии нефти и органического катализа химического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова.

Научная новизна диссертации.

1. Установлен факт увеличения поверхностного давления в самоорганизующейся пленке молекул бис-4-(2-пиридилметиленаминофинил)дисульфида (лиганда), иммобилизованной на поверхности кантилевера, вследствие возрастания электростатической плотности в пленке в результате комплексации ионов Co^{2+} , Ni^{2+} , Cu^{2+} с молекулами лиганда. Показана обратимость реакции образования хелатных комплексов в рецепторе. Обнаружено различие в значениях поверхностных сил при комплексации ионов Co^{2+} , Ni^{2+} , Cu^{2+} в слое лиганда, связываемое с тем, что энергии образования соответствующих хелатных комплексов отличаются друг от друга.
2. Разработаны методики ковалентной и физической иммобилизации белков на кремниевых и золотых поверхностях кантилевера. Впервые реализованы высо-

коселективные микрокантилеверные анализаторы на основе биополимерной пары – пероксидазы хрена и IgG – с чувствительностью к нескольким наномолям аналита в 1 л буферного раствора. Показано, что конформационные изменения молекул IgG при связывании с пероксидазой генерируют аналитический сигнал деформаций кантилевера, характеризующий уменьшение энтропии макромолекулярных комплексов.

3. Впервые реализован контроль селективной реакции определения морфина на поверхности кантилевера. Установлено, что причиной деформаций кантилевера при диссоциации комплексов морфин-IgG на его поверхности является спонтанное снятие напряжения в рецепторной пленке, которое сообщалось системе при иммобилизации молекул IgG в рецепторе.
4. Обнаружен катализ роста фибрилл лизоцима из химически иммобилизованного монослоя на поверхностях золота и слюды при $pH = 3,0$. Впервые получены данные по морфологии и размеру фибрилл лизоцима, выросших из монослоя химически иммобилизованных молекул белка. С помощью микрокантилеверной системы проведены измерения сил в пленках привитого лизоцима на гидрофобных и гидрофильных поверхностях кантилевера при «кислом» значении $pH = 3,0$. Обнаружена корреляция между скоростями процессов роста фибрилл из монослоев на гидрофильных и гидрофобных подложках и развитием сил в пленке белка на данных поверхностях.
5. Предложена качественная модель, объясняющая возможность образования фибрилл из молекул белка, находящихся на поверхности в связанном состоянии.
6. Предложена схема расчета парных взаимодействий соседних белковых звеньев, находящихся на поверхности кантилевера, на основе данных о величине изгиба кантилевера и структуре монослойной пленки. Экспериментально определены силы парных взаимодействий молекул лизоцима в монослое на поверхности кантилевера.
7. Разработана методика закрепления микрочастиц на поверхности кантилевера и реализован метод измерения их массы с помощью кантилевера атомно-силового микроскопа в резонансном режиме. Впервые охарактеризованы сорбционные свойства одиночных микрочастиц хроматографического сорбента диасорб-60-S16 к парам полярных и неполярных растворителей.

Практическая значимость работы. Результаты диссертации позволяют продвинуться в решении следующих задач:

- исследовании кооперативных взаимодействий в биополимерных пленках;
- разработке новых методов исследования массовых свойств микрообъектов;
- создании новых прямых методов иммунохимического анализа на базе микроэлектромеханических систем;
- создании высокочувствительных сенсоров на ионы металлов в жидкостях, разработка ионоселективных электродов;
- создании методов диагностики и профилактики нейродегенеративных заболеваний животных и человека, вызванных прионными патогенными белками.

Следует отметить, что результаты диссертации могут быть полезны в физике биополимеров, биофизике, молекулярной биологии и медицине.

Апробация работы. Основные результаты диссертационной работы были доложены на следующих научных конференциях:

- Международный симпозиум «Молекулярный дизайн и синтез супрамолекулярных архитектур», Казань, 2004.
- Международная конференция «Scanning Tunneling Microscopy/Spectroscopy and Related Techniques in conjunction with 13th International Colloquium on Scanning Probe Microscopy», Sapporo, Japan, 2005.
- Международный конгресс «Биотехнология: состояние и перспективы развития» Москва, 2005.
- Международная конференция «Малый полимерный конгресс», Москва, 2005.
- Международная конференция «Биотехнология и медицина», Москва, 2006.
- Международная конференция «International Conference on Nanoscience and Technology 2006», Switzerland, Basel, 2006.
- Всероссийская конференция (с международным участием) «Химия поверхности и нанотехнология», Санкт-Петербург, 2006.
- «Четвертая всероссийская каргинская конференция», Москва, Россия, 2007.

Личный вклад автора. Все экспериментальные измерения зондовой микроскопии проведены автором. Все образцы приготовлены автором лично (за исключением синтеза химических веществ). Разработка многофункционального научного из-

мерительного комплекса и проведенные на нем измерения выполнены автором лично. Анализ и интерпретация экспериментальных данных проведены автором лично.

Публикации. По теме диссертации опубликовано 20 работ.

Структура и объем диссертационной работы. Диссертационная работа состоит из введения, шести глав, заключения, списка литературы, включающего 203 наименования. Работа изложена на 138 страницах, содержит 74 рисунка и 9 таблиц.

Основное содержание работы

Во **введении** отмечается актуальность темы диссертационной работы, определяются ее цели и задачи.

Глава 1 содержит обзор литературы по теме диссертации. В обзоре кратко представлены основы методов зондовой микроскопии, в особенности атомно-силовой микроскопии (раздел 1.1.1) и силовой спектроскопии (раздел 1.1.2), и их применения при исследовании свойств биополимерных систем. В разделе 1.1.3 рассматриваются аспекты функционирования современных перспективных микрокантилеверных устройств в качестве высокочувствительных многофункциональных биохимических датчиков. Проанализированы основные факторы, отвечающие за выработку аналитического сигнала микрокантилеверных сенсоров. Представлен спектр применений микромеханических систем и схем регистрации аналитического сигнала (раздел 1.3), при этом особое внимание уделено анализу супрамолекулярных структур рецепторных слоев силовых преобразователей. В обзоре также кратко описаны основные характеристики и принципы функционирования распространенных преобразователей биофизических реакций в аналитический сигнал (раздел 1.2).

Изложение результатов диссертации логически разделено на две части: экспериментальную (главы 2 – 5) и теоретическую (главы 6 – 8).

Глава 2 содержит описание разработки и конструкторской сборки научного прибора на основе атомно-силового микроскопа (раздел 2.2), предназначенного для исследования физико-химических свойств тонких пленок и микрообъектов, помещенных на поверхность кантилевера (рис. 1б).

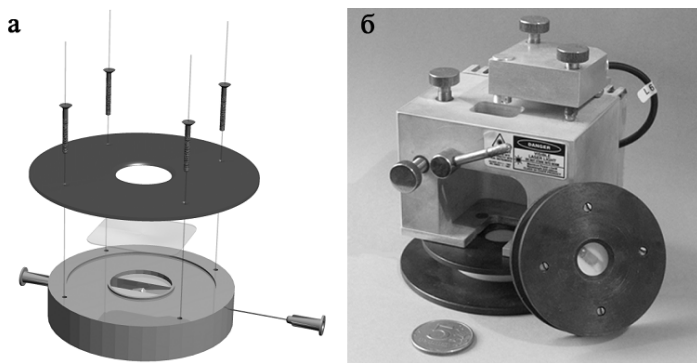


Рис. 1. а) Сборка жидкостной ячейки, содержащей кантилевер. б) Универсальная микрокантилеверная сенсорная система.

В цель работы входило проведение калибровки и тестирования комплекса и создание оптимальных методов закрепления объектов исследования на поверхности кантилевера.

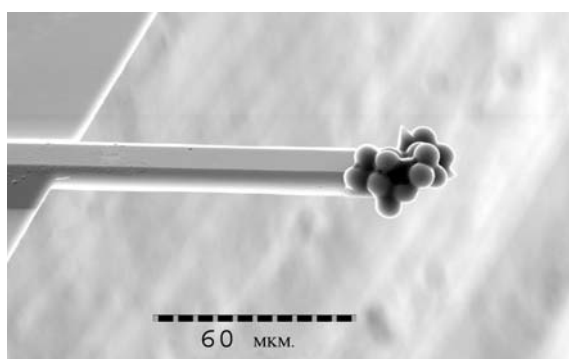


Рис. 2. Изображение кантилевера с пятнадцатью полистирольными микрошариками, прикрепленными к его концу с помощью эпоксидного клея.

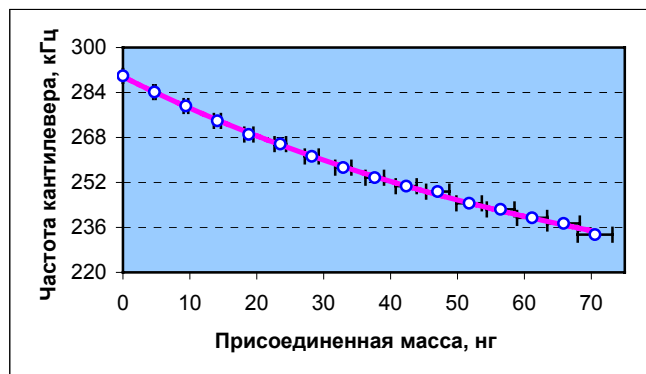


Рис. 3. Зависимость резонансной частоты балки кантилевера от изменения массы на ее конце при последовательном прикреплении калибровочных микросфер. Сплошная кривая – теоретический расчет.

Ошибка метода измерения массы микрообъектов с помощью кантилеверера оценивалась на основе сопоставления экспериментальных данных и теоретического расчета массы (глава 6) последовательно, одна за другой, взвешиваемых полистироловых микрошариков (рис. 3), закрепляемых на свободном конце кантилевера «Nanosensors» эпоксидным клеем (рис. 2). Эта ошибка, обусловленная дисперсией локализации частиц на поверхности кантилевера, не превышала 5%. Достигнутая разрешающая способность измерения массы одиночных объектов составила 1 пг (что сравнимо с массой одной бактериальной клетки *E-coli*) и на порядок превзошла чувствительность традиционного метода кварцевого микровзвешивания.

В разделе 2.3.3 проанализированы артефакты метода микровзвешивания, связанные с температурными градиентами в измерительной системе и флуктуациями

плотности (влажности среды). Было установлено, что при измерении масс меньших 10^{-9} г во избежание теплового дрейфа и для сохранения величины ошибки не более 5% требуется поддерживать в системе стабильность температуры (колебания температуры не должны превышать $1\text{ }^{\circ}\text{C}$). Флуктуации влажности среды также значительно ухудшают стабильность микровзвешивающей системы. В связи с этим на примере кантилеверов CSC12(E) было показано, что микрорезонансные системы можно использовать в качестве измерителей влажности среды. Для устранения перечисленных артефактов была разработана герметичная ячейка (рис. 1а), обеспечивающая необходимую стабильность температурных и диссипационных вкладов в ошибку измерений.

С помощью резонансной кантилеверной системы были исследованы микрочастицы силикагеля с поверхностью, модифицированной гидрофобными углеводородными молекулами, для изучения сорбции паров толуола. Результаты измерений сорбции паров толуола частицами сорбента диасорб-60-С16, закрепленными на конце кантилевера, представлены на графике зависимости массы паров растворителя поглощенных частицей частице сорбента, от массы самой частицы (рис. 4).

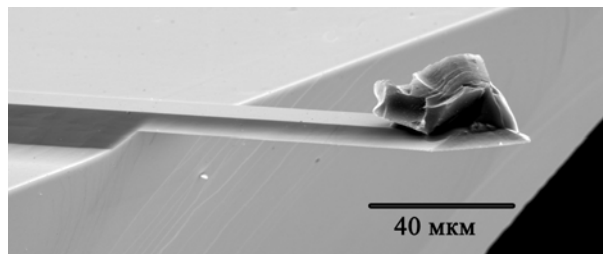
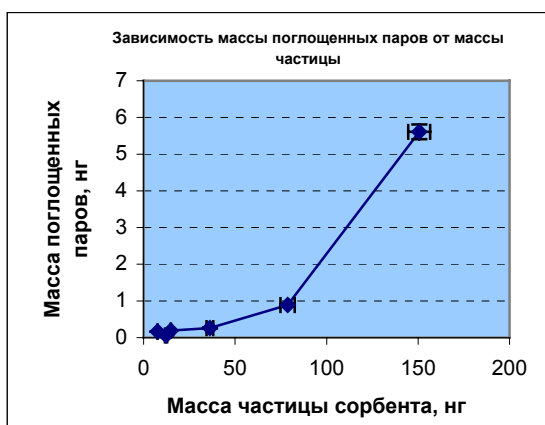


Рис. 4. Зависимость массы адсорбированных паров толуола на поверхности частиц диасорб-60-С16 от массы самих частиц сорбента. Кантилевер с прикрепленной частицей диасорб-60-С16 массой $78,6 \pm 4,9$ нг (справа).

Из рисунка 4 видно, что кривая, проведенная через экспериментальные точки зависимости поглощенной массы паров Δm от массы частиц силикагеля M , отлична от зависимости $\Delta m \sim M^{2/3}$ для частицы, имеющей гладкую поверхность, как у микросфер изображенных на рис. 2. В случае монослойной сорбции для сорбента с максимальной фрактальной размерностью $D = 3$ изменение массы частицы $\Delta m \sim M^X$, где $X = 1$. В зависимости, показанной на рис. 4, степенной коэффициент $X > 1$, что может говорить о лучшей способности частиц с большей массой к мультислойной

сорбции, очевидно, обусловленной замедлением диффузии молекул сорбата во внутренних порах крупной частицы.

Метод резонансного микровзвешивания с использованием кантилевера позволяет оценить кинетические коэффициенты сорбции и десорбции паров, которые стоят в показателе экспоненты решения уравнения Ленгмюра: $k_{сорб} = k_d + k_a C$. В случае десорбции концентрация сорбата над поверхностью близка к нулю и $k_{сорб} = k_d$.

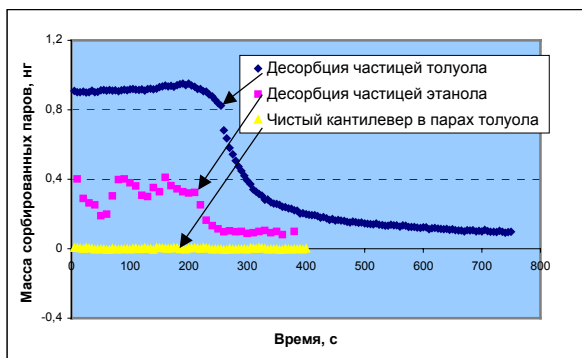


Рис. 5. Кинетические кривые десорбции паров этанола и паров толуола с поверхности частицы диасорб-60-С16.

Различие сорбционных характеристик частицы диасорб-60-С16 при поглощении паров толуола и этанола объясняется тем, что модифицированная поверхность данного сорбента сорбирует молекулы полярных растворителей (спиртов, ацетона, воды) хуже, чем неполярных (толуол, бензол, хлороформ) (см. рис. 5). Коэффициент десорбции, зависящий от энергии связи молекулы сорбата с адсорбентом, для этанола оказался большим, чем для толуола, что подтверждает гидрофобность модифицированного силикагеля.

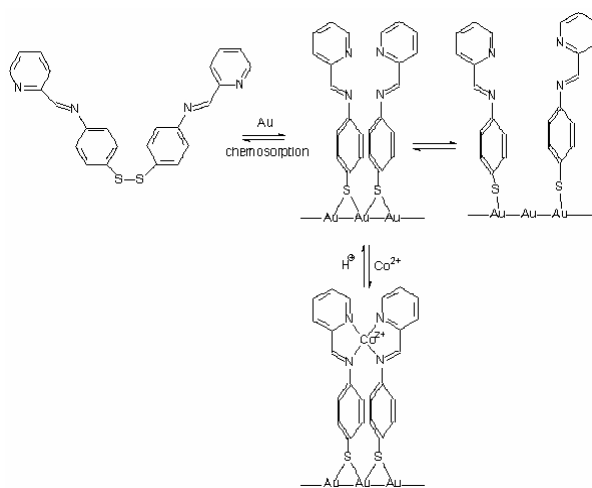


Рис.6. Вверху: схема химической реакции бис-4-(2-пиридилметиленаминофенил)дисульфида с золотой подложкой. Внизу: реакция обратимого образования металлокомплекса.

нола оказался большим, чем для толуола, что подтверждает гидрофобность модифицированного силикагеля.

Глава 3 посвящена применению разработанной микрокантилеверной системы (раздел 2.2) для исследования свойств самоорганизующегося рецепторного слоя молекул бис-4-(2-пиридилметиленаминофенил)дисульфида (лиганда), способных образовывать хелатный комплекс с ионами двухвалентных металлов: Co^{2+} , Ni^{2+} , Cu^{2+} , как показано на

рис. 6. Обратимое разрушение образовавшихся металлокомплексов в слое молекул лиганда осуществлялось посредством инкубации кантилевера в водном растворе соляной кислоты (10^{-2} М), которая производилась в течение 1 часа.

Хемосорбция лиганда на золотой стороне кантилевера сопровождалась изгибом балки в сторону растущего монослоя (рис. 7), т.е. наблюдался эффект увеличения поверхностного натяжения. Данные по изменению краевого угла смачивания

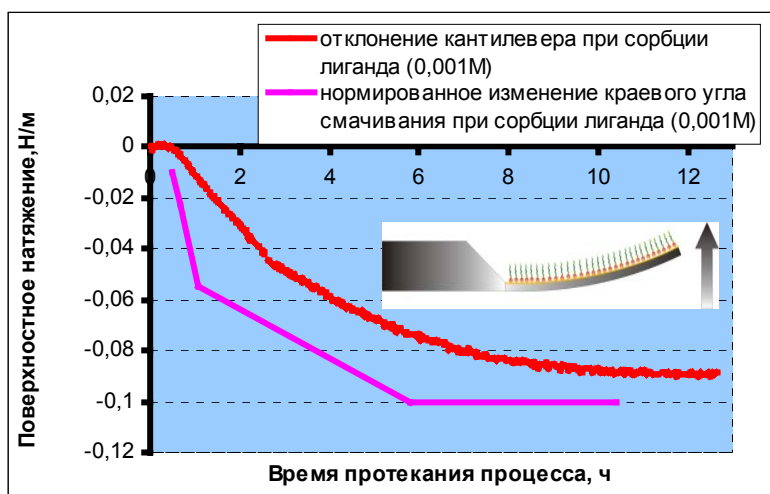


Рис. 7. Хемосорбция лиганда 10^{-3} М из метанола на золотую поверхность. Данные изгиба кантилевера — верхняя кривая. Нормированное изменение краевого угла смачивания капли воды на золотой подложке, модифицированной лигандом, с течением времени — нижняя кривая. Направление изгиба кантилевера показано на вставке.

капли воды на золотой подложке в зависимости от времени ее инкубации в растворе лиганда (10^{-3} М) соответствуют результатам, полученным с помощью микрокантилеверной системы (рис. 7), которые говорят о том, что за 8 – 10 часов на золотой поверхности из раствора лиганда образуется плотно упакованный слой молекул.

При помещении кантилевера в водный раствор, содержащий ионы Co^{2+} , наблюдался его значительный изгиб в сторону немодифицированной кремниевой поверхности (рис. 8а). Данное поведение системы обуславливалось увеличением зарядовой плотности рецепторного слоя за счет привнесения ионов атомов двухвалентных металлов, которые вместе с молекулами лиганда, иммобилизованными на золотой поверхности, образуют хелатные комплексы (рис. 6). После инкубации кантилевера в водном растворе соляной кислоты (10^{-2} М) наблюдалась его релаксация в исходное состояние, в котором он находился до момента помещения в раствор соли (рис. 8б). Таким образом, с помощью метода измерения силового изгиба кантилевера была подтверждена обратимость реакции образования металлокомплекса (см. рис. 6). Повторное помещение кантилевера в раствор соли вызывало отклик системы, аналогичный наблюдавшемуся в предыдущем цикле эксперимента (рис. 8в).

С понижением концентрации ионов кобальта в растворе величина деформации кантилевера

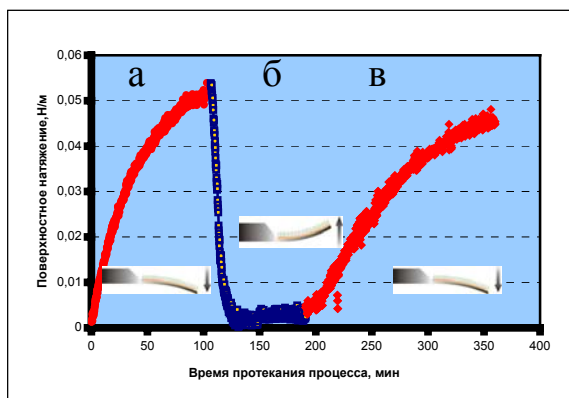


Рис. 8. Кинетика изгиба кантилевера при последовательной инкубации в водных растворах: а) $\text{Co}(\text{ClO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (концентрация 10^{-3}M), б) HCl и в) $\text{Co}(\text{ClO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (концентрация 10^{-3}M).

уменьшалась, а при концентрации 10^{-7}M соотношение сигнал/шум составляло $2,3 \pm 0,1$, что близко мини-

мальному обнаруживаемому сигналу. Таким образом, можно заключить, что предельная концентрация обнаружения ионов кобальта в воде для описанной системы составляла порядка 10^{-7}M .

Конкурирующим фактором для сил электростатического отталкивания являются конформационные изменения молекул при образовании металлокомплексов. В случае ионов Co^{2+} проявляется явное доминирование электростатических сил отталкивания, создающих в слое избыточное давление. На рисунке 9 показаны отклики кантилевера на первичный цикл инкубации в водном растворе (10^{-3}M) солей двухвалентных металлов $\text{MX}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (где $M - \text{Co}, \text{Cu}, \text{Ni}$; $X - \text{ClO}_4$). Наибольший силовой отклик соответствует нахождению кантилевера в водном растворе соли кобальта, а наименьший – в растворе соли меди. По данным электронной спектроскопии комплексов бис-4-(2-пиридилметиленаминофинил)дисульфида с ионами

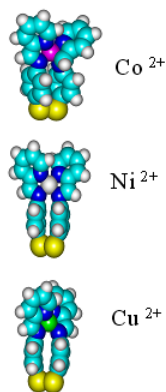
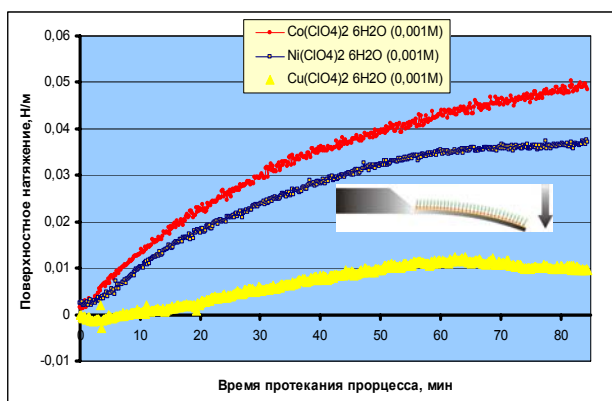


Рис. 9. Кинетика изгиба кантилевера при инкубации в водных растворах: $\text{MX}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ($M - \text{Co}, \text{Cu}, \text{Ni}$; $X - \text{ClO}_4$) (цикл 1, концентрация 10^{-3}M). В правой части рисунка изображены соответствующие формы комплексов.

металлов было показано, что комплексы с никелем имеют форму плоского квадрата, комплексы с кобальтом – тетраэдральную форму, а форма комплекса с медью не может быть определена однозначно на основе электронного спектра. Таким образом, можно заключить, что степень отклика кантилевера при комплексообразовании

непосредственно зависит также от формы комплекса, определяемой величиной затраченной энергии.

Глава 4 содержит результаты исследования реакций аффинного взаимодействия макромолекул антител на поверхности кантилевера со специфическими антигенами двух типов – гаптеном и высокомолекулярным белком, вследствие чего разбита на две части. В разделе 4.1 предложен прототип анализатора опиатных препаратов, работающего по конкурентной схеме (рис. 10), анализом для которого являлся морфин. В

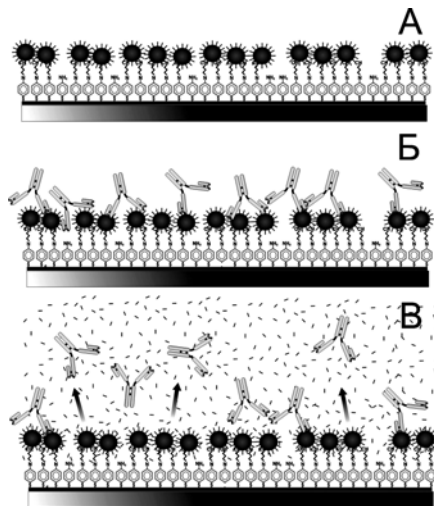


Рис. 10. Схема конкурентного иммуноанализа: А) кантилевер с монослойной пленкой антигенов; Б) адсорбция антител на специфическую рецепторную поверхность кантилевера, содержащую антиген; В) десорбция антител с поверхности под действием молекул антигена.

настоящей работе химическая иммобилизация антигена производилась посредством его ковалентного конъюгирования с овальбумином и последующей прививки конъюгата к поверхности кантилевера для сохранения иммуногенных свойств морфина (рис. 10а). В соответствии с конкурентной схемой анализа (рис. 10) для получения на поверхности кантилевера иммунных комплексов проводилась адсорбция антител на привитый конъюгат. Адсорбция антител кролика на поверхности кантилевера, содержащей морфин, сопровождалась изгибом балки в сторону рецепторного слоя (рис. 12). Такое поведение системы объясняется стремлением антител связать, по меньшей мере, две соседние молекулы конъюгата на поверхности, что вызывает эффективное натяжение белкового слоя. Этот факт был подтвержден также данными атомно-силовой микроскопии (рис. 11). При контакте гидрофобизированной поверхности слюды, модифицированной физически сорбированным конъюгатом морфин-овальбумина (рис. 11а), с антителосодержащей сывороткой было замечено возникновение агрегированных каплевидных образований (рис. 11б), которые свидетельствуют о том, что молекулы антител, связываясь с конъюгатом, инициируют поверхностное натяжение в белковой пленке.

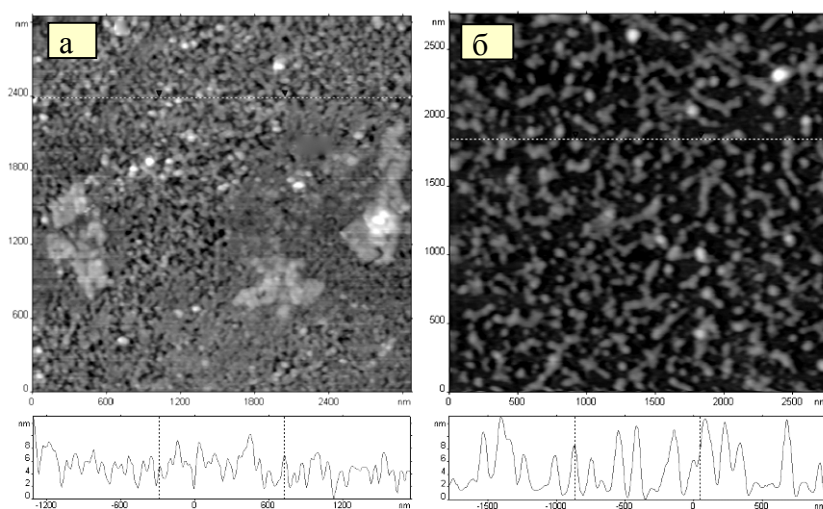


Рис. 11. а) Слой конъюгата на поверхности гидрофобизированной слюды после многократной промывки в фосфатном буфере (ФБ) (размер изображения 2,8х2,8 мкм). б) Слой конъюгата на поверхности гидрофобизированной слюды после контакта с разбавленной в ФБ сывороткой крови со специфическими антителами (размер изображения 2,8х2,8 мкм).

Как видно из рис. 12, при сорбции антител из сыворотки крови кролика с разбавлением 1:150 кривая сорбции удовлетворяет экспоненциальной аппроксимации уравнения Ленгмюра и выходит на насыщение за 70–80 минут. При повышенных концентрациях сыворотки (1:50) из-за сильных флуктуаций интенсивности, связанных с оптической неоднородностью раствора, шум в системе увеличивался, но сила изгиба кантилевера оставалась прежней. Данные результаты говорят о том, что кантилевер с иммобилизованным антигеном можно использовать в качестве теста, позволяющего анализировать плазму крови на предмет содержания в ней специфических антител, при диагностике различных заболеваний или допинг-теста.

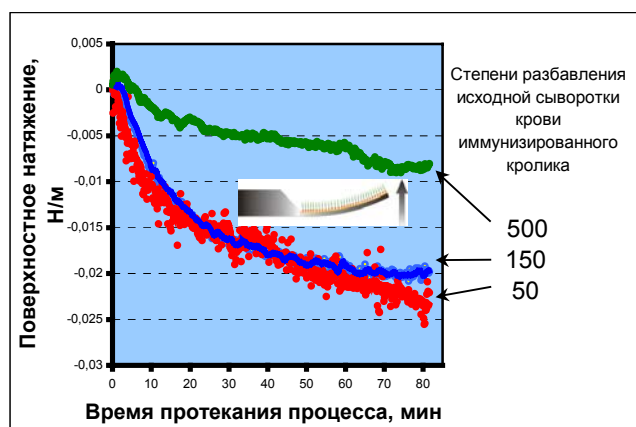


Рис. 12. Сорбция антител на поверхность кантилевера, содержащую конъюгат овальбумина с морфином.

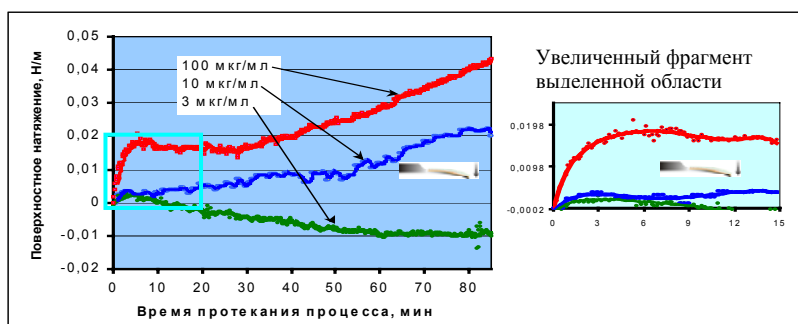


Рис. 13. Десорбция антител с поверхности сенсора под действием морфина с концентрациями 3, 10 и 100 мкг/мл

Интенсивный изгиб балки в начале процесса десорбции антител при введении морфина (5–10 мин) объясняется резким снятием напряжения в рецепторной пленке (рис. 13) при появлении в ней структурных дефектов. После интенсивного изгиба

кантилевера, сопровождающегося разрушением монослоя связанных молекул антител, начинается параллельный конкурирующий процесс реорганизации белкового слоя в рецепторе, что приводит к значительному замедлению развития напряжений в пленке и потере информативности аналитического сигнала.

Таким образом, с использованием микрокантилеверов впервые проведены реакции образования и разрушения биополимерных комплексов на поверхности кантилевера по конкурентной схеме. Пороговая чувствительность сенсора к морфину составила 3 мкг/мл. Полученные результаты позволяют говорить о потенциальной применимости микрокантилеверных преобразователей для детектирования низкомолекулярных веществ в плазме крови животных или человека.

В разделе 4.2 основной задачей являлось определение возможности прямого анализа белков с помощью микрокантилеверных систем, а точнее, экспериментальное определение степени латеральных напряжений в монослойной пленке макромолекул IgG при связывании с классическим белком – пероксидазой хрена (ПХ). Во многих методах прямого анализа аналитический сигнал вырабатывается в результате изменения плотности рецепторного слоя, которое может быть обусловлено также неспецифическим связыванием посторонних биополимерных объектов, содержащихся в анализируемом растворе. В случае определения фактов связывания аналита с помощью измерения сил, генерируемых в белковом слое, степень влияния неспецифического связывания на аналитический сигнал заметно уменьшается благодаря низким энергиям неспецифических связей и, следовательно, их незначительному вкладу в поверхностное натяжение рецепторной пленки.

В данной работе ставилось целью сопоставление эффективности методов физической иммобилизации (с помощью белка А) и статистической ковалентной прививки IgG на поверхности кантилевера (рис. 14) по отношению к генерируемому сигналу связывания антигена. Для

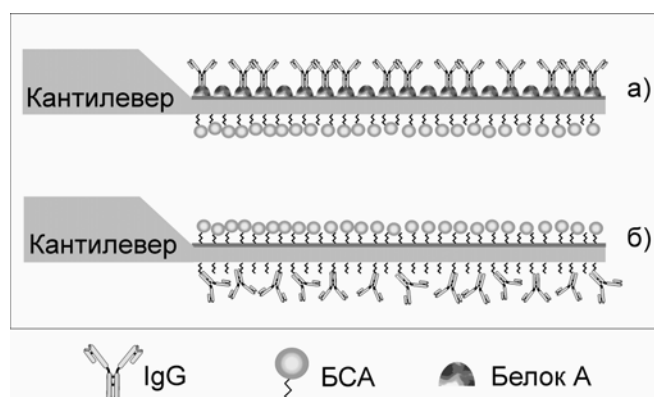


Рис. 14. Архитектура рецептора микрокантилеверного анализатора пероксидазы хрена: а) при иммобилизации IgG с помощью белка А на позолоченную сторону кантилевера, б) при ковалентной иммобилизации антител на кремниевую сторону кантилевера.

исключения неспецифического связывания с немодифицированной поверхностью кантилевера, не имеющей рецепторного слоя, она блокировалась химически привитым БСА (метод ковалентной иммобилизации белков описан в разделе 4.1.2).

После добавления ПХ в фосфатный солевой буферный раствор (ФСБР) с $pH = 7,0$ кантилевер с физически иммобилизованным рецептором начинал деформироваться в сторону рецепторного слоя (кинетика изгиба показана на рис. 15).

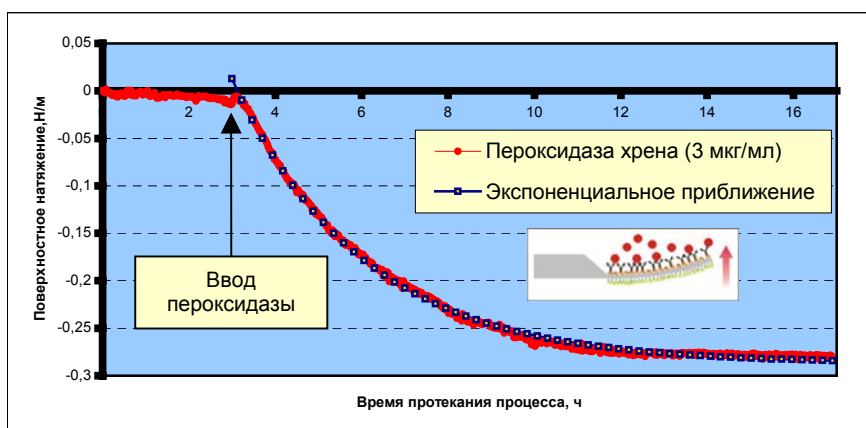


Рис. 15. Кинетика изгиба кантилевера с физически иммобилизованным рецепторным слоем при введении раствора ПХ с концентрацией 3 мкг/мл.

После регенерации сенсора в глициновом буфере с $pH = 3,0$ и повторной поэтапной иммобилизации антител его чувствительность к пероксидазе понизилась более чем в четыре раза (см. табл. 1).

С помощью атомно-силового микроскопа был произведен контроль свойств поверхности рецепторного слоя кантилевера на стадиях подготовки и функционирования сенсора. На рисунке 16 показаны изменения параметров шероховатости поверхностей в результате появления на ней новых белковых комплексов:

$$R_a = \frac{1}{N} \sum_{n=1}^N |r_n|, R_q = \frac{1}{N} \sum_{n=1}^N r_n^2, R_{sk} = \frac{1}{NR_q^3} \sum_{n=1}^N r_n^3, R_{max},$$

где $R_a, R_q, R_{sk}, R_{max}$ — средняя и среднеквадратичные шероховатости, параметр симметрии, максимальный профиль поверхности соответственно; r_n — высоты точек массива изображения; N — число точек. Исходя из данных, полученных с помощью АСМ, можно сделать вывод, что на поверхности образуются специфические иммунные пары антител с пероксидазой, которые изменяют рельеф рецепторного слоя с увеличением параметров шероховатости, т.е. на поверхности появляются качественно новые объекты, очевидно, влияющие на развитие сил в сенсорном слое.

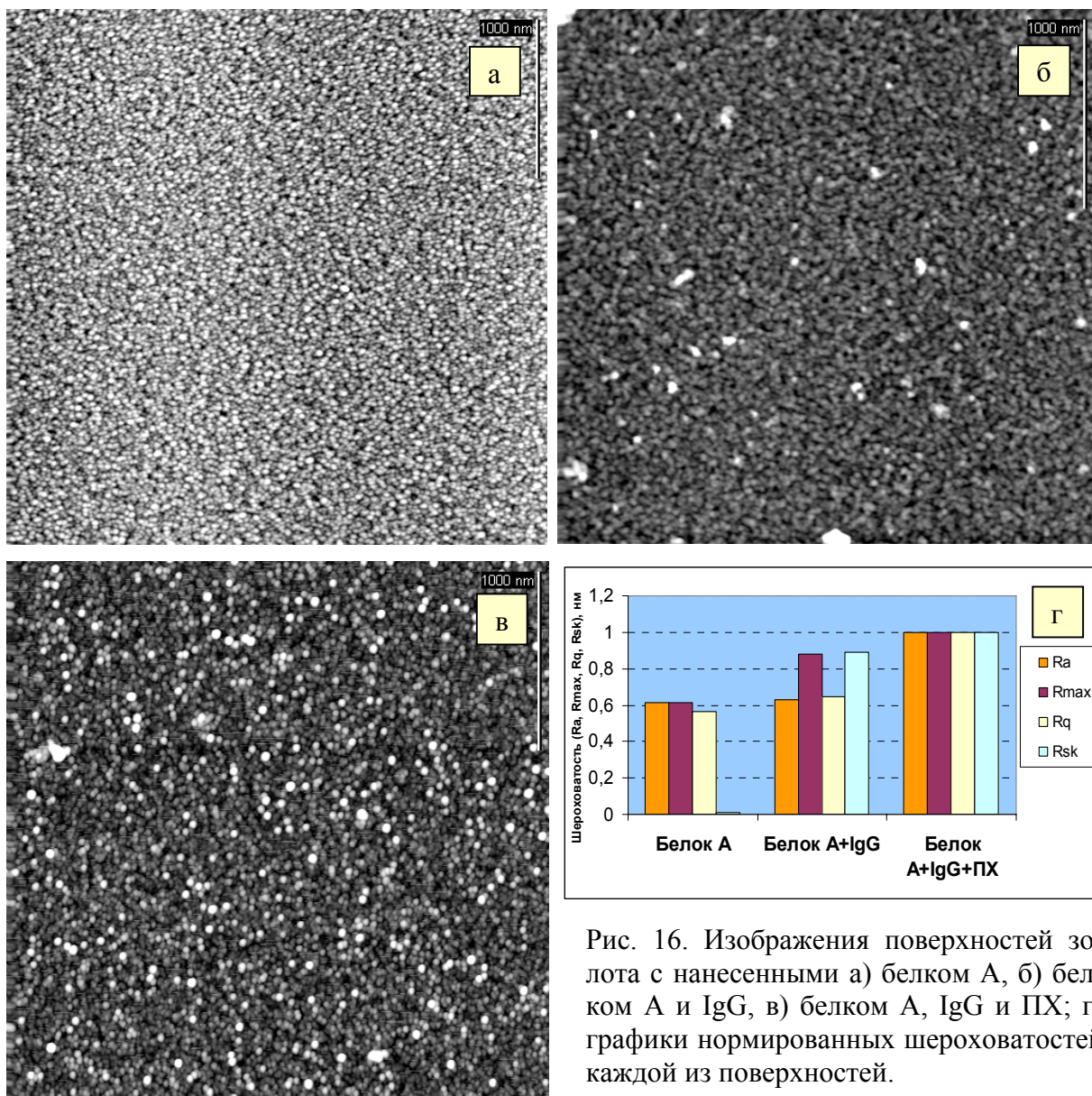


Рис. 16. Изображения поверхностей золота с нанесенными а) белком А, б) белком А и IgG, в) белком А, IgG и ПХ; г) графики нормированных шероховатостей каждой из поверхностей.

При высоком уровне воспроизводимости после нескольких циклов регенерации кантилевер с ковалентно иммобилизованными макромолекулами IgG (рис.17) показал чувствительность в полтора раза меньшую, чем в случае иммобилизации антител с помощью белка А. Блокировка поверхности сенсора, не являющейся рецепторным слоем, обеспечила невосприимчивость анализатора к внешним неспецифическим воздействиям контрольных белков (БСА и овальбумина) при высоких концентрациях (рис. 17).

Сопоставляя результаты контроля иммунохимических реакций на поверхности кантилевера (табл. 1), можно увидеть, что в результате физической иммобилизации антител на поверхности кантилевера силы, возникающие в монослое антител, в полтора раза больше, чем при химической прививке. Это связывается с увеличен-

ной мобильностью молекул IgG на поверхности в комплексе с белком А и жесткой детерминированностью их посадки на поверхность, в результате чего конформационные изменения молекул IgG при образовании иммунной пары могут быть большими, чем при случайной химической иммобилизации антител.

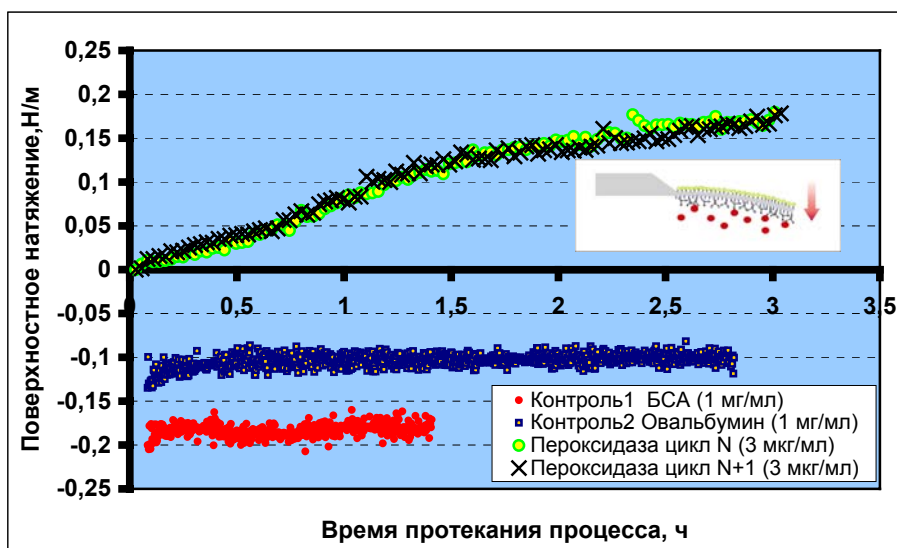


Рис. 17. Кинетика изгиба кантилевера с ковалентно иммобилизованным рецепторным слоем при N -ом и $(N+1)$ -ом цикла регенерации в глициновом буфере ($pH = 3,0$) при введении раствора ПХ с концентрацией 3 мкг/мл. Контрольные белки БСА и овальбумин с концентрациями 1 мг/мл. Нулевой уровень отклонений кантилевера сигналов контрольных белков для наглядности смещен в сторону отрицательных значений.

Известно, что в непосредственной близости к поверхности многие белковые молекулы из-за частичной денатурации могут в значительной степени изменить свою конформацию, кроме того при афинном типе связывания IgG с белком химическая прививка не позволяет молекулам IgG естественным образом изменять пространственную структуру, т.е. константа связывания антител может уменьшиться.

Таблица 1. Сравнение характеристик рецепторных слоев молекул IgG, закрепленных на поверхности с помощью методов физической и химической иммобилизации.

Метод иммобилизации \ Параметры анализатора	Чувствительность (максимальная сила изгиба при одинаковых концентрациях, 3 мкг/мл, за время работы анализатора), Н/м.	Воспроизводимость после регенерации (отношение сил изгиба кантилевера до и после его регенерации)	Невосприимчивость к БСА и овальбумину	Скорость работы сенсора при одинаковых концентрациях анализируемого вещества, ч ⁻¹
Физическая прививка	0,28± 0,03	0,23±0,001	БСА – есть Овальбумин – данных нет	0,33±0,01
Химическая прививка	0,18± 0,02	0,89±0,04	БСА – есть Овальбумин – есть	0,77±0,03

Химическая прививка показала два основных достоинства, связанных с более высокой концентрацией IgG на поверхности, обеспеченной методом иммобилизации: повышенная скорость определения аналита и высокая степень воспроизводимости результатов после физического разрушения белкового комплекса IgG и ПХ с помощью глицинового буфера (pH = 3,0). Высокая степень воспроизводимости по максимальной силе аналитического сигнала (чувствительности) связана, по-видимому, с отсутствием сложных белковых комплексов, помимо образовавшихся иммунных пар в рецепторном слое, которые в «кислой» среде глицинового буфера (pH = 3,0) могут необратимо агрегировать, из-за чего константа связывания антител может значительно понизиться. При обоих способах посадки молекул IgG было обнаружено, что связавшиеся молекулы пероксидазы повышают поверхностное натяжение рецепторной пленки, поэтому кантилевер изгибается в сторону иммобилизованного слоя антител. Аналогичные результаты, полученные на других объектах исследования, объяснялись некоторыми авторами изменением электростатического заряда и полярности образующихся иммунных комплексов. На основе полученных данных (табл. 1), предполагается также, что ослабления латеральных сил в биополимерной пленке могут быть связаны с эффектом уменьшения конфигурационной энтропии комплексов, обусловленной увеличением компактности или «жесткости» иммунных пар. В более общей форме генезис поверхностного натяжения белковых пленок связывается с реорганизацией ее субъединиц, стремящихся минимизировать свободную энергию системы в целом.

Глава 5 посвящена исследованию процессов образования фибрилл вблизи поверхности в зависимости от ее типа на примере лизоцима из куриных яиц.

Для определения кинетики агрегации лизоцима вблизи поверхности белок с концентрацией 1 мг/мл иммобилизировался на поверхности кантилевера, покрытой золотой пленкой, с помощью метода химической прививки из ацетатного буфера (рН = 4,5). Белок также химически прививался к гидрофильной кремниевой поверхности кантилевера в то время, когда его сторона, покрытая золотом, оставалась немодифицированной. Установлено, что время процесса агрегации соседних молекул ковалентно иммобилизованного монослоя лизоцима на золоте при комнатной температуре и рН = 3,0 составляет 14 часов, после чего в монослое возникает плотная сетка фибриллярных образований. Как известно, агрегация в объеме происходит в тех же условиях при более высокой температуре, $\approx 57^{\circ}\text{C}$.

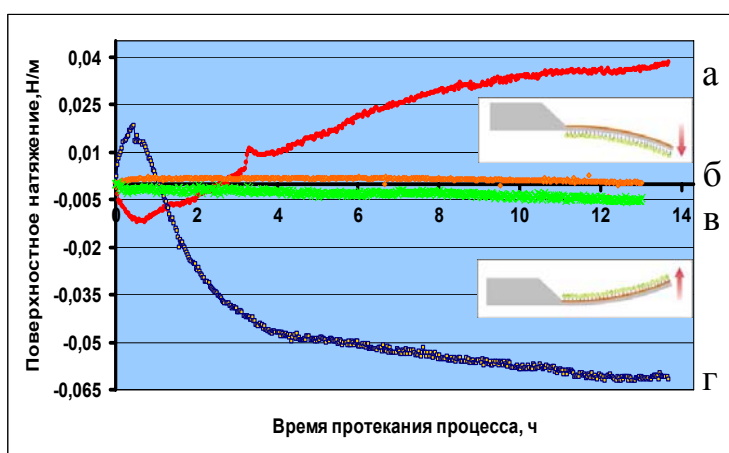
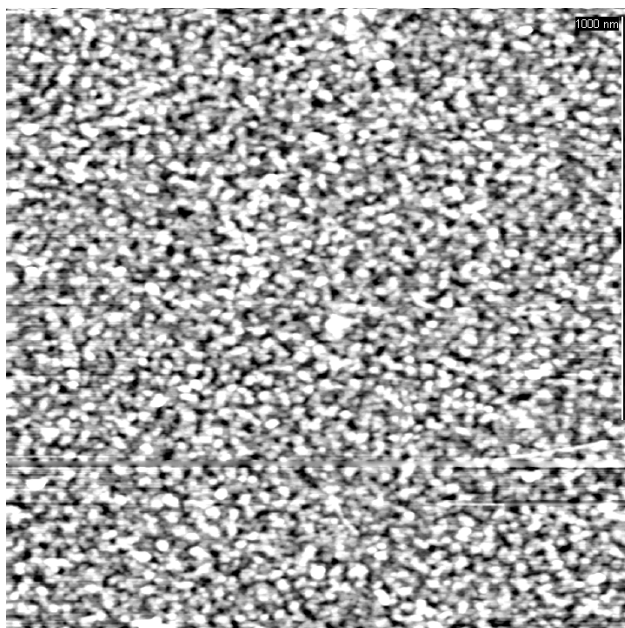
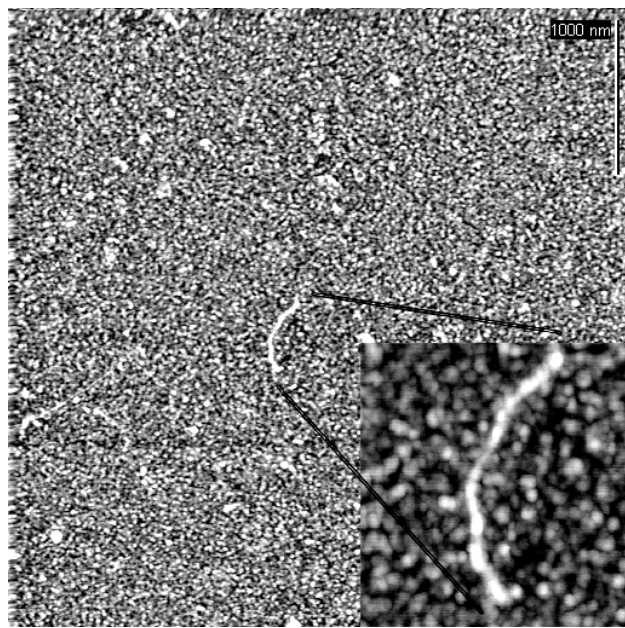


Рис. 18. Зависимость от времени поверхностного натяжения пленки лизоцима, находящейся а) на кремниевой и г) золотой поверхностях кантилевера. б), в) Результаты двух контрольных экспериментов, единственное отличие которых заключается в отсутствии этапа обработки кантилевера лизоцимом, показаны соответственно для золотой и кремниевой поверхностей кантилевера.

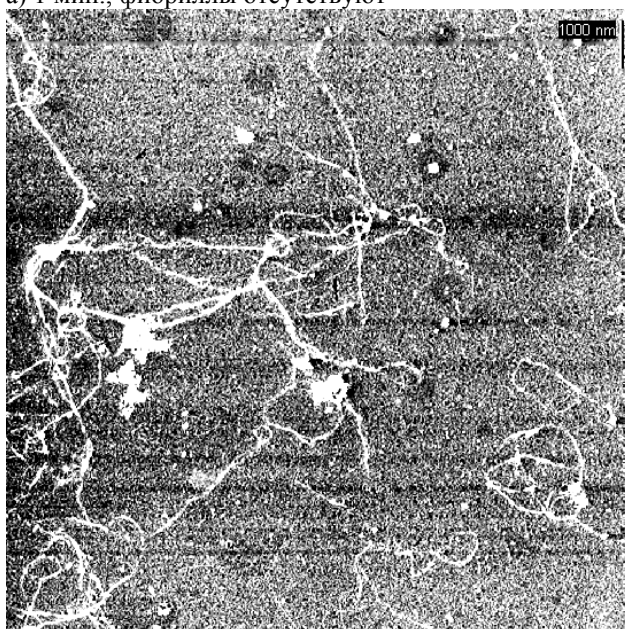
Обнаружено также, что кинетический коэффициент развития латеральных напряжений в монослое лизоцима на модифицированной гидрофобной (золотой) поверхности в 4.6 раз выше, чем на модифицированной гидрофильной (кремниевой) поверхности (рис.18), что коррелирует с данными атомно-силовой микроскопии, согласно которым среднее количество фибрилл на указанных подложках различается в 5 раз (рис. 19). Таким образом, было установлено, что скорости роста фибрилл пропорциональны скоростям развития сил агрегации молекул лизоцима на поверхностях с различными свойствами.



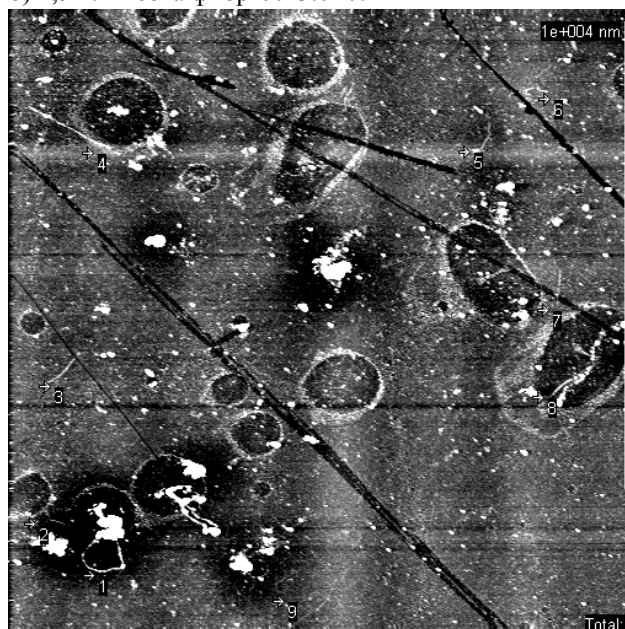
а) 1 мин., фибриллы отсутствуют



б) 4,5 ч. высота фибрилл 3.0 ± 0.4 нм



в) 19 ч., плотная сетка фибрилл: более 30 на кадре 13×13 мкм, высота фибрилл 3-10 нм



г) после 16 ч., плотность фибрилл: 5 ± 2 на кадре 13×13 мкм

Рис. 19. Изменение формы агрегатов лизоцима на гидрофобной поверхности золота а), б), в) и гидрофильной отрицательно заряженной поверхности слюды (кремния); г) в различные моменты времени нахождения монослая в буфере ($\text{pH} = 3,0$) при химической иммобилизации белка.

Для расчета силы взаимодействия двух соседних молекул лизоцима в пленке на основе экспериментальных данных (рис. 18а, г) использовалась модель гексагональной упаковки молекул в монослое (глава 7), состоящего из белковых глобул, каждая молекула которого взаимодействует с шестью соседними. Полученное значение силы взаимодействия составило 113 ± 24 пН, что близко к значению силы ($F_{T4} = 64 \pm 16$ пН), которую необходимо приложить к агрегату, состоящему из не-

скольких мономеров лизоцима T4 для того, чтобы разорвать связь между 21 и 124 остатками одного мономера.

В главе 6 рассмотрена модель колебаний балки, закрепленной с одного конца, в свободном колебательном состоянии. Модель позволят численно рассчитывать изменения собственной частоты кантилевера при изменении массы, сосредоточенной на его незакрепленном конце.

Глава 7 содержит новый метод оценки сил парных взаимодействий соседних белковых глобул в монослойной пленке, иммобилизованной на поверхности кантилевера, с учетом принятия допущения о структуре пленки. В данной модели рассматривается плотнейшая гексагональная упаковка белковых молекул на поверхности кантилевера (рис. 20).

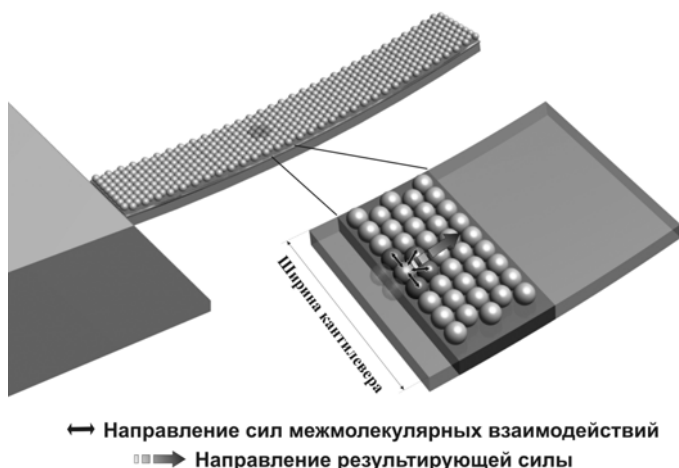


Рис. 20. Модель плотнейшей гексагональной упаковки монослоя белка на поверхности кантилевера. Стрелками указаны направления действия сил межмолекулярных взаимодействий и результирующей силы, влияющей на поверхностное натяжение белковой пленки.

Результирующая сила взаимодействия $F_{рез}$, приходящаяся на одну молекулу белка и представляющая собой суммарный вклад со стороны двух соседних молекул в эффективное поверхностное натяжение (рис. 20), рассчитывается по формуле

$$F_{рез} = \sigma d, \quad (1)$$

где d – характерный линейный размер (диаметр) молекулы, σ – поверхностное натяжение монослойной пленки. При расчете силы взаимодействия двух молекул F_2 учитывалось, что при образовании плотнейшего монослоя, состоящего из белковых глобул, каждая молекула взаимодействует с шестью соседними. Из принятой модели плотнейшей гексагональной упаковки следует, что результирующая сила $F_{рез}$ может быть разложена по базису сил парных взаимодействий молекул (рис. 20), тогда

$$F_2 = \frac{F_{рез}}{2 \cos(\pi / 6)}. \quad (2)$$

В главе 8 на основе мирового экспериментального опыта и новых данных атомно-силовой микроскопии белковых фибрилл, полученных в данной работе, предложена модель, описывающая механизм организации ковалентно иммобилизованных молекул на подложке в фибриллы.

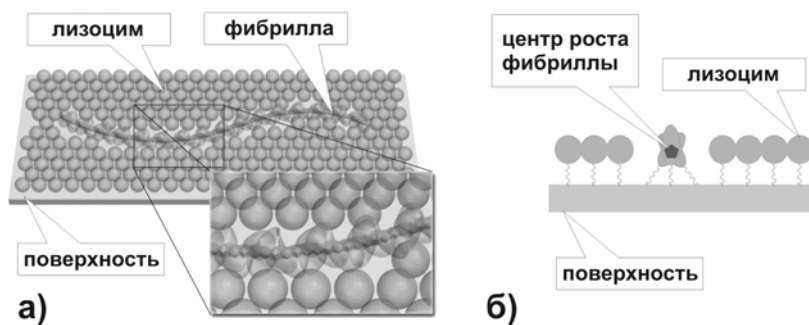


Рис. 21. Качественная модель образования фибрилл в монослое гексагонально упакованных белковых молекул. а) Трехмерная модель, б) двумерная модель сечения фибриллы.

Если считать молекулы сферами, прикрепленными к поверхности за один линкер (рис. 21б), то, опираясь на данные атомно-силовой микроскопии поверхности монослоя лизоцима на золоте, содержащего фибриллы (рис. 19б), можно предположить, что в процессе агрегации происходит изменение конформации молекулы белка таким образом, что одна ее часть переходит непосредственно в фибриллу, а другая, находящаяся в частично денатурированном состоянии, остается вне ее жесткого стержня.

Выводы

1. Впервые произведен прямой контроль сил, действующих в монослойных пленках группы серосодержащих соединений, во время их самоорганизации на золотой поверхности микрокантилевера. В низкомолекулярных пленках выявлены механизмы генерации латеральных сил, обусловленные гидрофобным и электростатическим взаимодействием между мономерами пленки. Показана связь сил, действующих в пленке, со структурой ее мономерного звена.
2. Впервые создан микрокантилеверный анализатор с рецептором из молекул бис-4-(2-пиридилметиленаминофинил)дисульфида, селективный к ионам тяжелых двухвалентных металлов – Co^{2+} , Cu^{2+} , Ni^{2+} , образующих с этими молекулами хелатный комплекс. Показано, что механический изгиб кантилевера главным обра-

зом зависит от двух конкурирующих факторов: конформационных трансформаций молекул в слое и изменения их зарядовой плотности. Определен порог чувствительности сенсора – 10^{-7} М.

3. Разработаны методики ковалентной и физической иммобилизации белков на кремниевой и золотой поверхностях кантилевера. Впервые реализованы высоко-селективные микрокантилеверные анализаторы на основе пары комплиментарных биополимеров – пероксидазы хрена и IgG – с чувствительностью к нескольким наномолям пероксидазы в литре буферного раствора. Показано, что конформационные изменения молекул IgG при связывании с пероксидазой уменьшают энтропию системы и генерируют аналитический сигнал деформаций кантилевера.
4. Впервые проведена реакция диссоциации макромолекулярного комплекса анти-тело–конъюгат (морфин-овальбумин) под действием морфина на поверхности кантилевера, показавшая, что скорость анализа морфина, по конкурентной схеме, может быть выше, чем скорость прямого анализа, проводимого с помощью кантилеверных сенсоров, за счет резкого снятия напряжений в рецепторе (при десорбции молекул антител), возникающих при длительном процессе реорганизаций молекул рецепторного слоя.
5. Впервые произведен контроль агрегации молекул лизоцима, физически и ковалентно иммобилизованных на поверхности кантилевера и образующих плотноупакованный монослой, посредством регистрации средних силовых напряжений в пленке. Обнаружено что агрегация молекул в связанном состоянии на поверхностях золота, кремния и слюды происходит в условиях, при которых в объеме они не агрегируют.
6. Построена универсальная модель изгиба кантилевера при взаимодействии субъединиц пленки, имеющих плотнейшую упаковку, которая позволяет производить расчет средней силы их парных взаимодействий. Предложена качественная модель, объясняющая возможность образования фибрилл из молекул белка, находящихся в связанном состоянии на поверхности.

Список публикаций по теме диссертации

1. Е.В. Украинцев, Г.А. Киселев, Д.В. Багров, П.В. Горелкин, А.А. Кудринский, Г.В. Лисичкин, И.В. Яминский. Атомные весы: новые возможности исследования взаимодействия молекул // *Датчики и системы*, – 2007, – № 1 (номер подписан в печать 22.10.2006), – сс.18-21.
2. Е.В. Украинцев, Г.А. Киселев, А.А. Кудринский, Г.В. Лисичкин, И.В. Яминский. Формирование фибрилл лизоцима на твердой подложке в условиях, при которых они не образуются в растворе // *Высокомолекулярные соединения*, – 2007, – том 49, – № 1, – сс.125-129 (публикация принята к печати 24.08.2006).
3. E. Beloglazkina, A. Majouga, N. Zyk, R. Rakhimov, I. Yaminsky, P. Gorelkin, G. Kiselev, A. Kutateladze. Bis-(4-(2-pyridylmethyleneiminophenyl))disulfide — A chelating ligand capable of self assembly on gold surface and its complexes with $M(BF_4)_2$ and $M(ClO_4)_2$; M – Co, Cu and Ni. Experimental and theoretical study // *Thin solid films*, – 2007, – Vol.515, – No.11, – pp.4649-4661.
4. I. Yaminsky, P. Gorelkin, G. Kiselev. Concurrence of Intermolecular Forces in Monolayers // *Japanese Journal of Applied Physics*, – 2006, – Vol.45, – No.3B, – pp.2316-2318.
5. Г.А. Киселев, Д.В. Багров, П.В. Горелкин, И.В. Яминский. Сенсор на основе атомно-силового микроскопа // *Сенсор*, – 2005, – No.4, – сс.22-26.
6. I.V. Yaminsky, G.A. Kiselev. Scanning Probe Microscopy of Biomacromolecules: Instrumentation and Experiments, in "Frontiers of Multifunctional Integrated Nanosystems" // *Ed. by E. Buzaneva, P. Schraff. Kluwer Academic Publishers*, – 2003, – pp.221-228.
7. И.В. Яминский, Г. А.Киселев, А.С. Филонов. Программа управления многофункциональным биосенсорным устройством – «Фемтоскан Бионайн» // *Свидетельство об официальной регистрации программы ЭВМ №2005612859*. Федеральная служба по интеллектуальной собственности, патентам и товарным знакам, Москва, – 2005.
8. Яминский И.В., Киселев Г.А., Филонов А.С. Аппаратура и методы наноскопии для биологии и медицины. // *Международная Конференция "Биотехнология и медицина"*, Москва, – 2006, – с.21.
9. Киселев Г. А., Яминский И.В. Атомные весы, как основа биологических и химических сенсоров. // *Международная Конференция "Биотехнология и медицина"*, Москва, – 2006, – с.26.
10. I. Yaminsky, P. Gorelkin and G. Kiselev. Concurrence of Intermolecular Forces in Monolayers. // *13th International Conference on Scanning Tunneling Microscopy/Spectroscopy and Related Techniques in conjunction with 13th International Colloquium on Scanning Probe Microscopy. Sapporo, Japan*, – 2005. – p.327.
11. Яминский И.В., Киселев Г.А. Разработка биологических и химических сенсоров на базе микрокантилеверов. // *Международный конгресс "Биотехнология:*

- состояние и перспективы развития". Материалы конгресса, часть 1, Москва, – 2005. – с.168.*
12. Киселев Г.А., Мешков Г.Б., Горелкин П.В., Багров Д.В., Дубровин Е.В., Ломоносов А.М., Филонов А.С., Лебедева О.В., Киселева О.И., Яминский И.В., Виноградова О.И. Механические свойства полиэлектrolитных композитных нано/микроструктур: от нанокапсул и нанотрубок к вирусам. // *Малый полимерный конгресс, Москва, – 2005, с. 24.*
 13. Г.А. Киселев, П.В. Горелкин, А.А. Кудринский, Г.В. Лисичкин, И.В. Яминский. Универсальный сенсор на основе атомно-силового микроскопа. // *Малый Полимерный Конгресс, Москва, – 2005, – с.94.*
 14. G.A. Kiselev, I.V. Yaminsky, G.F. Tereshenko. Chemical sensor on the basis of atomic force microscope. // *Third International Symposium "Molecular Design and Synthesis of Supramolecular Architectures". Kazan, Russia, – 2004. – p.102.*
 15. Украинцев Е.В., Киселев Г.А., Кудринский А.А., Лисичкин Г.В., Яминский И.В. Изучение агрегации лизоцима, иммобилизованного на поверхности золота и слюды, с помощью кантилевера для атомно-силовой микроскопии // *Третья всероссийская конференция «Химия поверхности и нанотехнология», Санкт-Петербург, – 2007, – сс.189-190.*
 16. Кудринский А.А., Киселев Г.А., Вертелов Г.К., Мягкова М.А., Яминский И.В., Лисичкин Г.В. Разработка микромеханического сенсора для определения морфина // *Третья всероссийская конференция «Химия поверхности и нанотехнология», Санкт-Петербург, – 2007, – сс.260.*
 17. G. Kiselev, A. Kudrinskii, E. Ukraintsev, I. Yaminsky, G. Lisichkin Atomic Balance Observation of Protein Aggregation on a Cantilever Surface // *International Conference on Nanoscience and Technology 2006, Swisserland, Basel, – 2006, – p.761.*
 18. Горелкин П.В., Киселев Г.А., Киселев Г.А., Мажуга А.Г., Белоглазкина Е.К., Зык Н.В., Яминский И.В. Исследование формирования заряженных пленок на твердых поверхностях // *Четвертая всероссийская каргинская конференция, Москва, – 2007, – том 3, – с.107.*
 19. Горелкин П.В., Киселев Г.А., Яминский И.В. Универсальный прецизионный прибор для изучения физико-химических свойств тонких пленок // *Четвертая всероссийская каргинская конференция, Москва, – 2007, – том 3, – с.108.*
 20. Киселев Г.А., Горелкин П.В., Яминский И.В. Прецизионный анализ процессов развития латеральных напряжений в тонких полимерных пленках на твердых поверхностях // *Четвертая всероссийская каргинская конференция, Москва, – 2007, – том 2, – с.391.*