

## Оригинальные статьи

Научная статья

УДК 538.9

<https://doi.org/10.17308/kcmf.2021.23/3741>

### Исследования локализации белка Dps в матрице нитевидного кремния методом растровой электронной микроскопии

Е. В. Паринова<sup>1</sup> ✉, С. С. Антипов<sup>1,2</sup>, V. Sivakov<sup>3</sup>, Ю. С. Какулия<sup>1</sup>, С. Ю. Требунских<sup>1</sup>,  
Е. А. Беликов<sup>1</sup>, С. Ю. Турищев<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Воронежский государственный университет,  
Университетская пл., 1, Воронеж 394018, Российская Федерация

<sup>2</sup>Балтийский федеральный университет имени Иммануила Канта  
ул. Университетская, 1, Калининград 236041, Российская Федерация

<sup>3</sup>Leibniz Institute of Photonic Technology,  
Albert Einstein str. 9, Jena 07745, Germany

#### Аннотация

Работа посвящена микроскопическим исследованиям морфологии поверхности и внутренней части массивов нитевидного кремния до и после совмещения с наноматериалом природного происхождения бактериальным белком Dps.

Нитевидный кремний формировался методом жидкофазного металл-ассистированного химического травления. Для получения рекомбинантного белка в качестве продуцентов использовались клетки *Escherichia coli*, а очистку осуществляли хроматографически. Совмещение нитевидного кремния с молекулами белка проводилось путем наслаивания в лабораторных условиях с последующим высушиванием. Полученный в результате гибридный материал изучался методом растровой электронной микроскопии с высоким разрешением. Производились исследования развитой поверхности нитевидного массива до и после совмещения с биокультурой. Изучению также подвергались сколы, показывающие детали морфологии внутренней части гибридного материала. Исходные массивы нитевидного кремния имеют резкие границы в поверхностной части и в глубине массива, помимо этого, дополнительные переходные слои не обнаружены. Диаметр нитей кремния составляет около 100 нм, высота более микрометра, в то время как расстояния между нитями составляют несколько сотен нанометров. Формируемые таким образом поры доступны для заполнения белком при осаждении.

Продемонстрирована эффективность применения метода растровой электронной микроскопии для изучения морфологии поверхности гибридного материала «нитевидный кремний – бактериальный белок Dps». Показано, что поры нитевидного массива, обладающего чрезвычайно развитой поверхностью, могут подвергаться совмещению с био-материалом путем осаждения вглубь пустот. Молекулы белка могут при этом достигать дна массива нитевидной матрицы. Полученные результаты демонстрируют возможность активации доступной и управляемо развитой поверхности нитевидного кремния при помощи наноразмерных молекул белка Dps.

**Ключевые слова:** нитевидный кремний, развитая поверхность, белок ферритин-подобный Dps, растровая электронная микроскопия, совмещение

**Благодарности:** работа выполнена при поддержке стипендии Президента Российской Федерации СП-189.2021.1 для молодых ученых.

**Для цитирования:** Паринова Е. В., Антипов С. С., Sivakov V., Какулия Ю. С., Требунских С. Ю., Беликов Е. А., Турищев С. Ю. Исследования локализации белка Dps в матрице нитевидного кремния методом растровой электронной микроскопии. *Конденсированные среды и межфазные границы*. 2021;23(4): 644–648. <https://doi.org/10.17308/kcmf.2021.23/3741>

✉ Паринова Елена Владимировна, e-mail: [parinova@phys.vsu.ru](mailto:parinova@phys.vsu.ru)

© Паринова Е. В., Антипов С. С., Sivakov V., Какулия Ю. С., Требунских С. Ю., Беликов Е. А., Турищев С. Ю., 2021



Контент доступен под лицензией Creative Commons Attribution 4.0 License.

**For citation:** Parinova E. V., Antipov S. S., Sivakov V., Kakuliia I. S., Trebunskikh S. Yu., Belikov E. A., Turishchev S. Yu. Dps protein localization studies in nanostructured silicon matrix by scanning electron microscopy. *Kondensirovannyye sredy i mezhfaznye granitsy = Condensed Matter and Interphases*. 2021;23(4): 644–648. <https://doi.org/10.17308/kcmf.2021.23/3741>

## 1. Введение

Массивы нитевидного кремния (Si-NW) являются известным материалом, в том числе наноматериалом, технологии формирования которого хорошо проработаны [1]. Si-NW традиционно привлекает внимание исследователей как материал, обладающий важными свойствами: видимой фотолюминесценцией при комнатной температуре [2] или возможностью использования для генерации водорода [3]. Однако самым главным свойством этого материала является простая и экономичная технология воспроизводимого получения в сочетании с чрезвычайно развитой поверхностью [4], которая доступна для активации при совмещении с многочисленными функциональными материалами, включая нано-биоматериалы природного происхождения. При таком подходе к использованию доступной поверхности массивов нитевидного кремния контролируемой морфологии первостепенными являются вопросы принципиальной возможности совмещения с необходимым материалом.

Белок Dps (ДНК-связывающий белок голодающих клеток) бактерий кишечной палочки *Escherichia coli* (*E.coli*) является представителем бактериальных ферритинов [5]. Размер оболочки бактериального белка Dps составляет около 9 нм. Белковая часть включает 12 одинаковых субъединиц со структурой гомо-додекамера [5, 6]. Молекулы белка Dps способны осуществлять накопление (депонирование) неорганических наночастиц системы железо-кислород [7] внутри полых частей диаметром до 5 нм [7, 8]. Таким образом, ферритин Dps является потенциальным контейнером природного происхождения, который может служить для накопления, хранения и адресной доставки наноматериалов. Ранее синхротронным методом спектроскопии ближней тонкой структуры края рентгеновского поглощения был показан сложный композитный состав наночастицы, который формируется из продуктов окисления ионов  $Fe^{2+}$  в ферроксидазных центрах молекул природного Dps, выделенного из бактерий *E.coli*, выращенных аэробно [9]. Более того, методом крио-электронной микроскопии показана возможность формирования одномерных структур молекул Dps [5, 8].

Наконец отметим, что метод растровой электронной микроскопии (SEM) является одним из наиболее востребованных в диагностике раз-

нообразных объектов, включая наноразмерные структуры и биоматериалы. Возможности метода позволяют с высоким латеральным разрешением изучать особенности морфологии объектов самого различного происхождения. Однако вопрос применимости метода SEM для прецизионного изучения гибридных нано-биоматериалов требует экспериментальной проверки в силу сложного состава и структуры таких объектов.

Таким образом, вопрос изучения возможности совмещения массивов нитевидного кремния Si-NW с природным наноматериалом – бактериальным белком Dps является актуальным с точки зрения разработки и применения гибридных материалов, сочетающих неорганические структуры, обладающие заданными свойствами с функциональными наноматериалами природного происхождения. Настоящая работа посвящена применению метода растровой электронной микроскопии высокого разрешения для изучения структур, сформированных в результате совмещения массивов нитевидного кремния с бактериальным белком Dps.

## 2. Экспериментальная часть

Для получения массивов нитевидного кремния использовался метод металл-ассистированного жидкофазного химического травления [2, 10]. Стандартные подложки кристаллического кремния *n*-типа проводимости с удельным сопротивлением  $\sim 1-5 \Omega/\text{см}$  промывались в 2 % растворе плавиковой кислоты HF в течение 10 с. Далее на поверхность происходило осаждение наночастиц серебра в результате погружения на 30 с очищенных подложек кремния в раствор  $AgNO_3$  (0.01 М) и HF (5 М). Следующим этапом было травление подложек в 30 % растворе  $H_2O_2$  и HF (5 М) в течение 180 секунд с последующей промывкой в 65 % растворе  $HNO_3$  (для удаления наночастиц серебра) с дополнительной промывкой в воде в течение 10 минут. Сформированные таким образом структуры высушивались на воздухе в лабораторных условиях.

Рекомбинантный белок Dps получался с использованием клеток *Escherichia coli* BL21\*(DE3) в качестве продуцентов. Клетки *E.coli* были трансформированы плазмидой pGEM\_dps. В работе [5] приведены подробные сведения о биосинтезе белка, его последующем выделении и очистке. Раствор белковых молекул имел концентрацию

2 мг/мл в исходном буфере 10 мМ NaCl, 50 мМ tris-HCl (pH 8.0) и 0.1 мМ EDTA.

Молекулы белка осаждались на поверхность сформированных и предварительно исследованных массивов Si-NW наслаиванием 10 мкл раствора. После чего полученная структура высушивалась в лабораторных условиях, промывалась деионизированной водой (вытягиванием) с целью удаления остаточных солей и вновь высушивалась при тех же условиях.

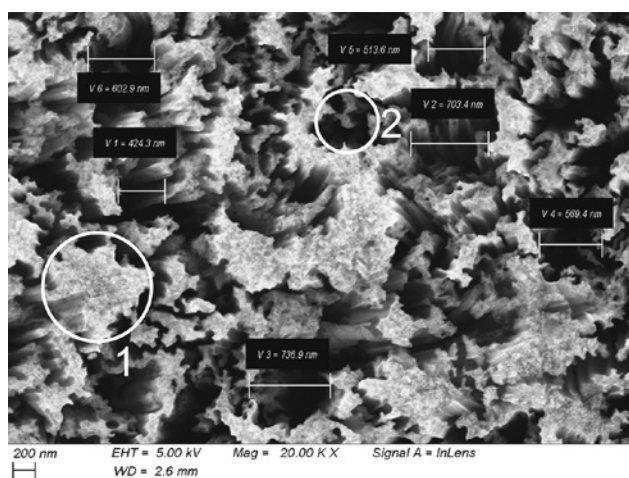
Морфология поверхностей исходного массива Si-NW и гибридной структуры на его основе с наслаиванием белком, а также сколы гибридной структуры исследовались методом растровой электронной микроскопии. Использовался микроскоп Carl Zeiss ULTRA 55 в режиме регистрации вторичных электронов с малыми значениями ускоряющих напряжений 2, 3 и 5 кВ, необходимыми для работы с био-структурами.

Для оценки площадей, занимаемых нитевидным массивом и пустотами, а также степени заполнения массивов молекулярной культурой использовался программный пакет Image J.

### 3. Результаты и обсуждение

На рис. 1 представлена морфология исходной поверхности нитевидного кремния. Отмечены наибольшие по значению широкие пустоты V1–V6, которые образовались в результате травления. Ширина таких пор составляет до 737 нм. В то же время наблюдаются поры с шириной менее 100 нм.

Отметим, что края массивов нитей резкие, при этом сами массивы Si-NW имеют морфологические особенности размерами менее 50 нм



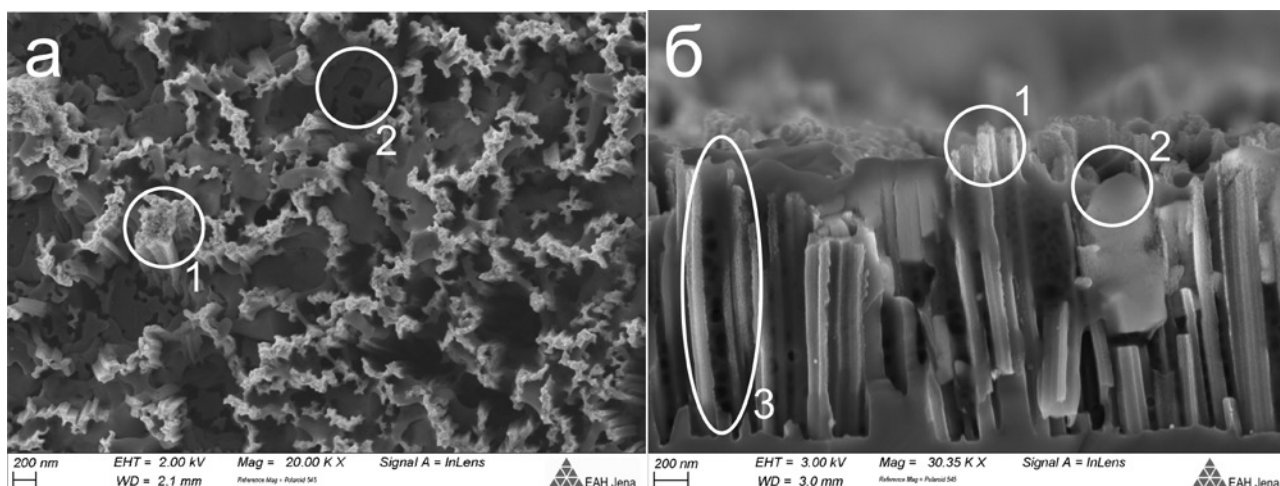
**Рис. 1.** Морфология поверхности исходного массива нитевидного кремния. Определены размеры пустот (пор) наибольшей ширины

как результат локальных процессов травления, не стимулированных наночастицами серебра [2, 10]. Заметных морфологически переходных слоев в исходном массиве нитевидного кремния не наблюдается. Для оценки в латеральной проекции обозначены площади, которые учитывались при расчете: 1 – поверхность массивов нитей, включая доступные для наблюдения боковые части стенок пор; 2 – пустоты (поры). Количественно соотношение площадей участков типа 1 и типа 2 составляет 48 к 52 %.

На рис. 2 представлены результаты совмещения массивов нитевидного кремния с белком Dps после высушивания в лабораторных условиях. Прежде чем обсудить результат совмещения, обратим внимание на то, что скол гибридной структуры (рис. 2 б) дает представление о морфологии отдельных нитей и их высоте в целом. Отметим, что боковые поверхности нитей морфологически схожи с поверхностью участков массивов. Особенно это заметно для участков непротравленной поверхности (например, см. выделенную область 1 на рис. 1). Высота практически вертикальных нитей составляет более микрометра (рис. 2 б). Следовательно, и глубина пустот (пор), доступных для заполнения молекулами белка, превышает микрометр. При этом отдельно взятые нити, которые, с другой стороны, мы можем рассматривать как стенки пустот (пор), однородны.

Малые ускоряющие напряжения, используемые при регистрации данных (приведены на рисунках), оказались достаточными для формирования изображений (рис. 2) морфологии гибридных био-структур достаточной резкости и степени детализации.

На рис. 2 явно заметно, что пустоты между нитями массива Si-NW заполнены белком. Области 1 (как и на рис. 1) отмечают поверхность непротравленных участков, в том числе непокрытых осажденной молекулярной культурой. В то же время области 2 явно содержат морфологически выраженные участки, соответствующие остаточным объемам молекулярной культуры, которые находятся в пустотах после высушивания гибридных структур в лабораторных условиях и вакуумирования в рабочей камере микроскопа. В самом деле, материал, который заполняет поры, морфологически более однороден, чем поверхность (стенки) нитей кремния, и располагается именно в доступных для осаждения (совмещения) пустотах. На рис. 2 б отдельно отмечена область 3, подтверждающая



**Рис. 2.** Морфология (а) – поверхности и (б) – внутренней части (скола) массива нитевидного кремния после совмещения с белком Dps

факт заполнения молекулярной культурой всего объема поры. Оценка соотношения незаполненных участков поверхности (1) и покрытия белка (2) составляет 30 и 70 % общей площади участка микроскопического изображения поверхности. Этот факт подтверждает успешность проведенного впервые совмещения нано- биоматериала молекулярной культуры белка Dps с доступной развитой поверхностью массива нитевидного кремния.

#### 4. Выводы

Впервые проведено совмещение нано- биоматериала молекулярной культуры белка Dps с доступной развитой поверхностью массива нитевидного кремния. Методом растровой электронной микроскопии высокого разрешения показано, что молекулы ферритина Dps могут успешно проникать в поры кремния субмикронного размера, заполняя их и покрывая высокоразвитую поверхность массива нитей кремния в целом. Подобный подход может быть использован при функционализации поверхности массивов нитевидного кремния посредством использования молекул ферритина в качестве контейнеров нанометрового размера для задач адресной доставки материалов и формирования функциональных гибридных нано- биоматериалов в целом.

#### Заявленный вклад авторов

Все авторы сделали эквивалентный вклад в подготовку публикации.

#### Конфликт интересов

Авторы заявляют, что у них нет известных финансовых конфликтов интересов или личных

отношений, которые могли бы повлиять на работу, представленную в этой статье.

#### Список литературы

1. Xiao Yu, Yuchen Wang, Hong Zhou, Yanxiang Liu, Yi Wang, Tie Li, Yuelin Wang. Top-down fabricated silicon-nanowire-based field-effect transistor device on a (111) silicon wafer. *Small*. 2013;9(4): 525–530. <https://doi.org/10.1002/sml.201201599>
2. Sivakov V. A., Voigt F., Berger A., Bauer G. and Christiansen S. H. Roughness of silicon nanowire sidewalls and room temperature photoluminescence. *Phys. Rev. B*. 2010;82: 125446. <https://doi.org/10.1103/PhysRevB.82.125446>
3. Ming T., Turishchev S., Schleusener A., Parinova E., Koyuda D., Chuvankova O., Schulz M., Dietzek B., Sivakov V. Silicon suboxides as driving force for efficient light enhanced hydrogen generation on silicon nanowires. *Small*. 2021;17: 2007650. <https://doi.org/10.1002/sml.202007650>
4. Ravi P. Srivastava, Dahl-Young Khang. Structuring of Si into multiple scales by metal-assisted chemical etching. *Advanced Materials*. 2021;33(47): 2005932. <https://doi.org/10.1002/adma.202005932>
5. Almiron M., Link A. J., Furlong D., Kolter R. A novel DNA-binding protein with regulatory and protective roles in starved *Escherichia coli*. *Genes & Development*. 1992;6: 2646–2654. <https://doi.org/10.1101/gad.6.12b.2646>
6. Dubrovin E. V., Dadinova L. A., Petoukhov M. V., Soshinskaya E. Yu., Mozhaev A. A., Klinov D. V., Schaffer T. E., Shtykova E. V., Batishchev O. V. Spatial organization of Dps and DNA–Dps complexes, *Journal of Molecular Biology*. 2021;433(10): 166930. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2021.166930>
7. Antipov S., Turishchev S., Purtov Yu., Shvyreva U., Sineelnikov A., Semov Yu., Preobrazhenskaya E., Berezhnoy A., Shusharina N., Novolokina N., Vakh-

tel V, Artyukhov V., Ozoline J. The oligomeric form of the Escherichia coli Dps protein depends on the availability of iron ions. *Molecules*. 2017;22(11): 1904. <https://doi.org/10.3390/molecules22111904>

8. Antipov S. S., Pichkur E. B., Praslova N. V., Preobrazhenskaya E. V., Usoltseva D. S., Belikov E. A., Chuvankova O. A., Presnyakov M. Yu., Artyukhov V. G., Ozoline O. N., Turishchev S. Yu. High resolution cryogenic transmission electron microscopy study of Escherichia coli Dps protein: first direct observation in quasinative state. *Results in Physics*. 2018;11: 926–928. <https://doi.org/10.1016/j.rinp.2018.10.059>

9. Turishchev S. Yu., Antipov S. S., Novolokina N. V., Chuvankova O. A., Melekhov V. V., Ovsyanikov R., Senkovskii B. V., Timchenko A. A., Ozoline O. N., Domashevskaya E. P. A soft X-ray synchrotron study of the charge state of iron ions in the ferrihydrite core of the ferritin Dps protein in Escherichia coli. *Biophysics*. 2016;61(5): 705–710. <https://doi.org/10.1134/S0006350916050286>

10. Huang Z., Shimizu T., Senz S., Zhang Z., Zhang X., Lee, W., ... Gösele U. Ordered arrays of vertically aligned [110] silicon nanowires by suppressing the crystallographically preferred <100> etching directions. *Nano Letters*. 2009;9(7): 2519–2525. <https://doi.org/10.1021/nl803558n>

### Информация об авторах

*Парина Елена Владимировна*, к. ф.-м.н., н. с. совместной лаборатории «Электронное строение твердого тела» Воронежский государственный университет, Воронеж, Российская Федерация; e-mail: [parinova@phys.vsu.ru](mailto:parinova@phys.vsu.ru). ORCID iD: <https://orcid.org/0000-0003-2817-3547>.

*Antipov Сергей Сергеевич*, д. б. н., доцент кафедры биофизики и биотехнологии, Воронежский государственный университет, Воронеж, Российская Федерация; e-mail: [ss.antipov@gmail.com](mailto:ss.antipov@gmail.com).

*Владимир Сиваков*, PhD, руководитель группы, Leibniz Institute of Photonic Technology, Jena, Germany; e-mail: [vladimir.sivakov@leibniz-ipht.de](mailto:vladimir.sivakov@leibniz-ipht.de). ORCID iD: <https://orcid.org/0000-0002-3272-501X>.

*Какулия Юлия Сергеевна*, ведущий инженер кафедры общей физики, Воронежский государственный университет, Воронеж, Российская Федерация; e-mail: [kakuliia@phys.vsu.ru](mailto:kakuliia@phys.vsu.ru).

*Требунских Сергей Юрьевич*, к. ф.-м. н., н. с. совместной лаборатории «Электронное строение твердого тела» Воронежский государственный университет, Воронеж, Российская Федерация; e-mail: [tsu@phys.vsu.ru](mailto:tsu@phys.vsu.ru).

*Беликов Евгений Александрович*, инженер совместной лаборатории «Электронное строение твердого тела» Воронежский государственный университет, Воронеж, Российская Федерация; e-mail: [tsu@phys.vsu.ru](mailto:tsu@phys.vsu.ru).

*Турищев Сергей Юрьевич*, д. ф.-м. н., доцент, и.о. заведующего кафедрой общей физики, Воронежский государственный университет, Воронеж, Россия; e-mail: [tsu@phys.vsu.ru](mailto:tsu@phys.vsu.ru). ORCID iD: <https://orcid.org/0000-0003-3320-1979>.

*Поступила в редакцию 01.09.2021; одобрена после рецензирования 15.10.2021; принята к публикации 15.11.2021; опубликована онлайн 25.12.2021.*