



Краткие сообщения

Краткое сообщение

УДК 538.9

<https://doi.org/10.17308/kcmf.2026.28/13601>

Научная специальность ВАК – 1.3.8. Физика конденсированного состояния

Клетки *E. coli* как источник биогибридного материала: исследование методами электронной микроскопии и микроанализа

С. Ю. Турищев¹✉, Е. А. Беликов¹, Е. В. Паринаова¹, Д. З. Куреши¹, О. А. Чувенкова¹,
В. Сиваков², С. С. Антипов¹

¹ФГБОУ ВО «Воронежский государственный университет»,
Университетская пл., 1, Воронеж 394018, Российская Федерация

²Leibniz Institute of Photonic Technology,
Albert-Einstein-Str., 9, Jena 07745, Germany

Аннотация

Цель работы: Работа посвящена исследованиям клеток кишечной палочки *E. coli*, сформированных в условиях суперпродукции белка бактериоферритина Dps. Молекулы этого белка способны формировать биогибридные структуры, аккумулируя в своих внутренних полостях неорганические наночастицы системы железо-кислород с идентичными свойствами, в том числе размерами в пределах единиц нанометров. Известные подходы для получения молекул белка бактериоферритина Dps основаны на разрушении их источника – клеток *E. coli*. Важным вопросом для изучения и последующего применения является установление возможности выделения молекул этого белка без разрушения клеток *E. coli* для формирования биогибридных структур.

Экспериментальная часть: Клетки кишечной палочки *E. coli* выращивались в условиях суперпродукции молекул белка бактериоферритина Dps, затем наносились на подложку фольги молибдена для проведения исследований методами электронной микроскопии и энергодисперсионного микроанализа. По данным о морфологии и элементном составе изучена возможность формирования молекул белка без разрушения клеток, с целью формирования биогибридных структур на их основе.

Выводы: Установлено, что в условиях суперпродукции белка молекулы бактериоферритина Dps вырабатываются клетками кишечной палочки *E. coli* с возможными выбросами заметного количества этого белка во внеклеточное пространство. Морфология самих клеток *E. coli* не претерпевает изменений в условиях суперпродукции и при выбросах белка. При добавлении соли Мора в культуральную жидкость белок, выделяемый во внеклеточное пространство, содержит заметное количество атомов железа, что может являться результатом формирования биогибридных структур молекулами бактериоферритина Dps. Полученные результаты демонстрируют возможный, простой и доступный способ формирования биогибридных структур, содержащих наночастицы системы железо-кислород, для использования в технологиях, среди которых адресная доставка наночастиц или функционализация доступных поверхностей.

Ключевые слова: клетки *E. coli*, молекулы белка Dps, суперпродукция белка, биогибридный материал, растровая электронная микроскопия, энергодисперсионный микроанализ, морфология и состав

Источник финансирования: Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 25-12-00413, <https://rscf.ru/project/25-12-00413/>. ВС выражает признательность Немецкому научно-исследовательскому фонду (DFG) за финансовую поддержку в рамках проекта № SI1893/18-1 (2018–2019 гг.).

Для цитирования: Турищев С. Ю., Беликов Е. А., Паринаова Е. В., Куреши Д. З., Чувенкова О. А., Сиваков В., Антипов С. С. Клетки *E. coli* как источник биогибридного материала: исследование методами электронной микроскопии и микроанализа. *Конденсированные среды и межфазные границы*. 2026;28(1): 153–158. <https://doi.org/10.17308/kcmf.2026.28/13601>

✉ Турищев Сергей Юрьевич, e-mail: tsu@phys.vsu.ru

© Турищев С. Ю., Беликов Е. А., Паринаова Е. В., Куреши Д. З., Чувенкова О. А., Сиваков В., Антипов С. С., 2026



Контент доступен под лицензией Creative Commons Attribution 4.0 License.

For citation: Turishchev S. Yu., Belikov E. A., Parinova E. V., Kureshi D. Z., Chuvenkova O. A., Sivakov V., Antipov S. S. *E. coli* cells as a source of biohybrid material: electron microscopy and microanalysis study. *Condensed Matter and Interphases*. 2026;28(1): 153–158. <https://doi.org/10.17308/kcmf.2026.28/13601>

1. Введение

Природоподобные материалы и структуры являются перспективным объектом современных научных исследований и проработки технологических подходов с точки зрения низкой затратности или эффективности и гибкости в их практическом использовании [1–5]. Ярким примером такого класса объектов являются молекулы белка, например бактериоферритина Dps (DNA-binding Protein from Starved cells – ДНК-связывающий белок голодающих клеток) бактерий кишечной палочки *Escherichia coli* (*E. coli*) который является представителем бактериальных ферритинов [1, 4]. Эти природные объекты известны своей способностью формировать внутри пустот молекул неорганические наночастицы системы железо-кислород (Fe–O) заданного состава и заданного размера [1, 4, 6–8]. Более того, результатом формирования биогибридного материала является тот факт, что каждая из частиц изначально, в силу своего природного происхождения, является упакованной в органический контейнер, собственно молекулу белка. Такие объекты могут храниться длительное, практически не ограниченное время без изменения макро- и микроскопических свойств. Наконец учитывая, что хранение молекулярной культуры или биогибридного материала происходит в жидкой среде, такие объекты удобно точно и целевым образом доставлять в рамках используемой технологии [9]. Источником молекул бактериоферритина Dps являются клетки кишечной палочки *E. coli*. Традиционным способом получения белка здесь является его выделение при полном разрушении клеток-источников, с дальнейшей последовательностью сложных, зачастую затратных биофизических и биохимических процедур очистки, фильтрации и стабилизации молекулярной культуры [1–2, 7, 10]. В дальнейшем, уже после того как клетки разрушены, а молекулярная культура бактериоферритина Dps выделена, для формирования биогибридного материала происходит взаимодействие с продуктами разложения соли Мора $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ как источника двухвалентного железа (Fe^{2+}) в культуральном растворе. Природная функция молекул Dps состоит в депонировании или аккумуляции оксида железа Fe^{2+} , токсичного для биологической культуры, в наночастицу преимущественно состоящую из

железа Fe^{3+} , связанного с кислородом [4, 8]. Отметим, что размеры внешних стенок молекулы белка, по данным полученным нами ранее, не превышают десяти нанометров, при этом размеры наночастиц сформированных внутри молекул, могут составлять несколько нанометров [4, 6, 7]. Одна молекула белка Dps может выступать как однократная «установка» для контролируемого получения биогибридной структуры с неорганической наночастицей заданных свойств, в том числе, размеров, вплоть до единиц нанометров. Привлекательным развитием подходов для получения молекулярной культуры или биогибридных объектов на ее основе является попытка использовать клетки кишечной палочки *E. coli* для выделения белка без их разрушения, то есть многократно. Тогда клетку, объект гораздо более массивный, по сравнению с молекулой, можно рассматривать как своего рода «фабрику» по производству гибридных структур.

Отметим, что при такой модификации клеточной культуры, которая приводит к выделению белка в достаточных количествах [11] и без разрушения клеток, ключевым вопросом является влияние источника атомов железа, например, соли Мора, необходимого для образования биогибридных наноструктур, на свойства, в первую очередь морфологию (модифицированных) клеток *E. coli*. Попытки использования клеток для многократного производства молекул могут привести к нарушению формы такого природного источника биогибридного материала. Поэтому важной и нужной задачей является изучение морфологии и элементного состава модифицированной клеточной культуры.

Метод растровой электронной микроскопии (РЭМ) является одним из наиболее востребованных в диагностике разнообразных объектов, включая наноразмерные структуры и биоматериалы. Возможности метода позволяют с высоким латеральным разрешением изучать особенности морфологии объектов самого различного происхождения, в том числе природного [3, 9, 12–14]. Одним из самых востребованных дополнительных методов растровой электронной микроскопии является возможность проведения энергодисперсионного рентгеновского микроанализа объекта, изучаемого в электронном микроскопе. Применение этого метода, в рамках единого эксперимента с изучением морфологии посред-

ством растровой электронной микроскопии позволяет получить информацию о присутствии того или иного элемента в составе микроскопического участка изучаемого объекта. Исследованиям модифицированных клеток *E. coli* как многократного источника молекулярного материала или биогибридных структур методами РЭМ и микроанализа посвящена настоящая работа.

2. Экспериментальная часть

Для достижения условий суперпродукции белка предварительно выращенные клетки *E. coli* BL21*(DE3) до оптической плотности 0.4 ($\lambda = 600$ нм) отмывали буферным раствором, содержащим 0.1M Tris-HCl (pH 8.0) от остатков питательной среды и подвергали воздействию CaCl_2 согласно методике, описанной в [15] для формирования перфораций в клеточной мембране. Затем к клеточной суспензии добавляли предварительно подготовленный водный раствор кольцевых молекул плазмидной ДНК pGEMdps (пДНК), содержащих полноразмерную копию гена Dps. Исходя из насыщающей концентрации пДНК при трансформации равной 10 мкг/мл, к клеткам добавляли по 0.5 мкл их раствора с последующей получасовой инкубацией на льду, затем подвергали тепловому воздействию при 42 °C в течение 2 минут. Затем пробирки помещали в ледяную баню на 2 минуты, после чего клетки переносили в 750 мкл SOC-раствора, содержащего триптон (20 г/л), дрожжевой экстракт (5.5 г/л), NaCl (10 мМ), KCl (2.5 мМ), $\text{MnCl}_2/\text{MgSO}_4$ (10 мМ), глюкозу (20 мМ) и инкубировали 1 час, при 37 °C в термостате при постоянном перемешивании при 180 об/мин. После этого суспензию клеток центрифугировали, а полученный осадок объемом примерно 50 мкл высевали на чашки Петри с LB-агаром (pH 7.4), содержащим триптон (10 г/л), дрожжевой экстракт (5 г/л), NaCl (10 г/л), бактоагар (15 г/л) и ампициллин (20 мкг/мл). Рост полученных клеток осуществляли при 37 °C в присутствии ампициллина (20 мкг/мл) на протяжении 16 часов в присутствии 0.02 мМ IPTG. Наличие рекомбинантного белка Dps контрольно оценивали с помощью электрофореза в 12.5%-ном денатурирующем полиакриламидном геле по модифицированному методу Дэвиса. Далее клетки осаждали центрифугированием при 10 000 об/мин, отмывали два раза от среды холодным буфером, содержащим 0,1M Tris-HCl (pH 8.0) и использовали для исследований. В качестве источника железа использовали све-

жеприготовленный раствор соли Мора, которую добавляли в раствор белка до достижения концентрации ионов железа 0.25 мМ и инкубировали его в течение 15 минут, после чего добавляли такую же порцию соли Мора и повторяли инкубацию, полученный образец использовали в исследованиях. Образцы представляли собой результат наслаивания клеточной культуры на предварительно очищенную фольгу молибдена.

Использовался растровый электронный микроскоп Carl Zeiss ULTRA 55, оснащенный приставкой для энергодисперсионного микроанализа. Применялся режим регистрации вторичных электронов с малыми значениями ускоряющих напряжений до 5 кВ, необходимый для работы с биоструктурами. Для оценки площадей, занимаемых клетками, и оценки разброса их формы, использовался программный пакет Image J. Был получен энергодисперсионный (рентгеновский) спектр от участка поверхности площадью ~ 15×20 мкм, для которого было выполнено картирование распределения элементов.

3. Результаты и обсуждение

На рис. 1 приведено изображение поверхности клеточного массива, сформированного на поверхности фольги молибдена, полученного методом РЭМ. Данные о форме и размерах клеток, их массивов (скоплений), представлены на рис. 1а, информация о форме и размерах одиночной клетки дана на рис. 1б, а секция «в» этого же рисунка представляет результат оценки размеров клеток участка поверхности рис. 1а, выполненной по площадям клеток. Отметим, что размеры клеток кишечной палочки, выращенных в условиях суперпродукции белка, составляют порядка трех микрометров в длину и одного микрометра в ширину, что соответствует выбранному типу клеток [12], имеют в целом овальную форму с четкими границами, наблюдение которых позволяет предположить, что высота клетки сопоставима с ее шириной, в том числе после вакуумирования сформированного клеточного массива в камере электронного микроскопа. Также отметим, что в результате наслаивания удается сформировать достаточно плотный слой клеток, распределенных по поверхности фольги «островками» высотой в одну клетку, неполностью покрывающих несущую поверхность молибдена. Условия суперпродукции белка при формировании клеточного массива не приводят к существенным нарушениям морфологии клеток. Часть клеток, однако, име-

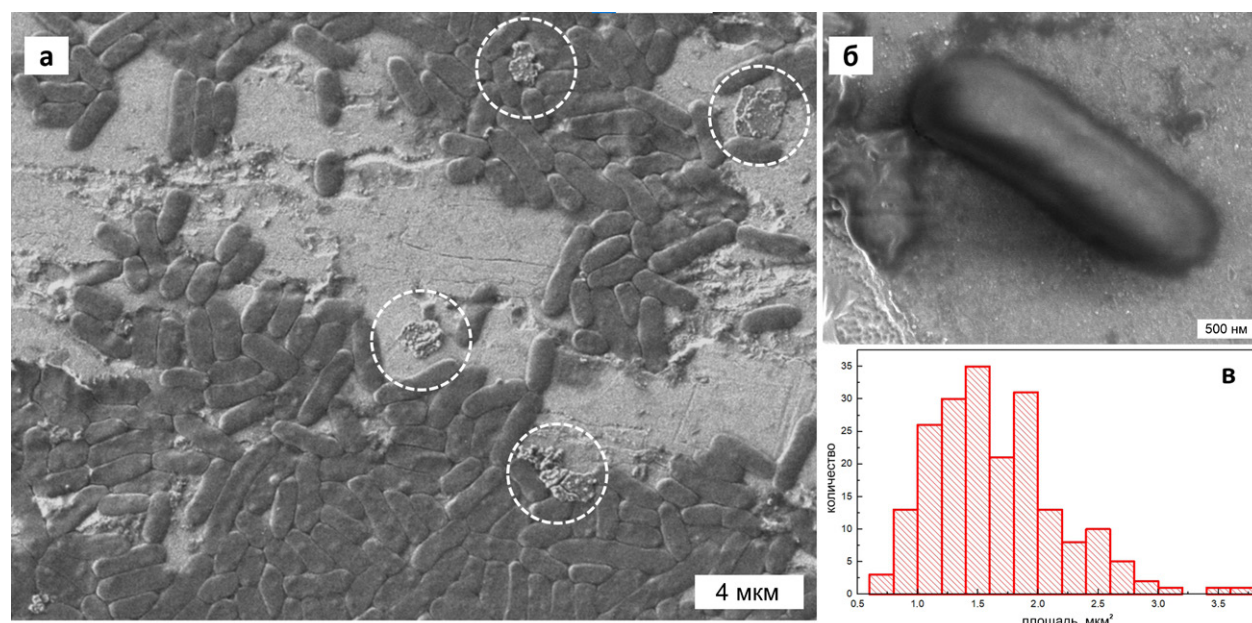


Рис. 1. Растровая электронная микроскопия массива клеток кишечной палочки *E. coli* на подложке фольги молибдена. а: массив клеток, белым пунктиром выделены участки выброса белка; б: изображение одиночной клетки *E. coli*; в: распределение клеток по площадям их поверхности

ют размеры меньше ($\sim 1 \times 1$ мкм) или большие ($\sim 5 \times 1$ мкм), чем указано выше (рис. 1в). Это является результатом проходящего деления клеток в момент нанесения на подложку. Помимо формирующихся массивов клеток и непокрытых клетками участков фольги молибдена выделяется ряд элементов, обозначенных на рис. 1а белым пунктиром. Размер этих элементов сопоставим с размером клетки, они имеют случайные контуры, неравномерную морфологию и примыкают непосредственно к отдельно взятым клеткам, либо находится в пределах клеточного массива. Такие элементы не наблюдаются на поверхности массивов самих клеток и не находятся на отдельно взятых участках поверхности подложки, не покрытых *E. coli*. В то же время заметных нарушений формы и размеров клеток, к которым примыкают указанные элементы морфологии, не наблюдается. Следует учесть, что модифицированные клетки кишечной палочки формировались в условиях суперпродукции молекул белка бактериоферритина Dps, помещались после наслоения на поверхность подложки в камеру растрового электронного микроскопа и вакуумировались. Таким образом, происхождение этих массивов может быть связано с выбросами избыточного количества белка во внеклеточное пространство, в том числе при переходе в условия вакуума.

Рис. 2 содержит результаты микроанализа элементного состава участка поверхности, по-

крытого клеточным массивом. На рис. 2а приведено электронно-микроскопическое изображение участка поверхности, от которого получено картирование распределения атомов железа и азота (рис. 2б) и зарегистрирована спектральная информация (рис. 2в), содержащая сигнал от всех сортов атомов изучаемого участка образца размером около 15×20 мкм. Выбор атомов Fe и N для получения карты распределения элементов продиктован тем, что атомы азота содержатся только в клетках *E. coli* и не находятся на поверхности подложки.

В то же время атомы железа, как результат растворения соли Мора в культуральной жидкости, могут содержаться как в самих клетках, так и вокруг них. Кроме того, молекулы белка бактериоферритина Dps способны аккумулировать внутри своих полостей результат растворения соли Мора, формируя наночастицу системы железокислород, состоящую из ионов атомов железа в различном зарядовом состоянии: Fe^{2+} и Fe^{3+} [4, 8]. Именно «выброс» во внеклеточное пространство молекул белка бактериоферритина Dps предполагался нами в результате изучения данных РЭМ (см. выше, рис. 1а) для клеток *E. coli*, сформированных в условиях суперпродукции этого белка. Именно сигнал от атомов железа подтверждается спектральной информацией, полученной от наблюдаемого микроучастка поверхности (рис. 2в, пик при 700 эВ). В то же время данные картирования (рис. 2б) указывают на наиболь-

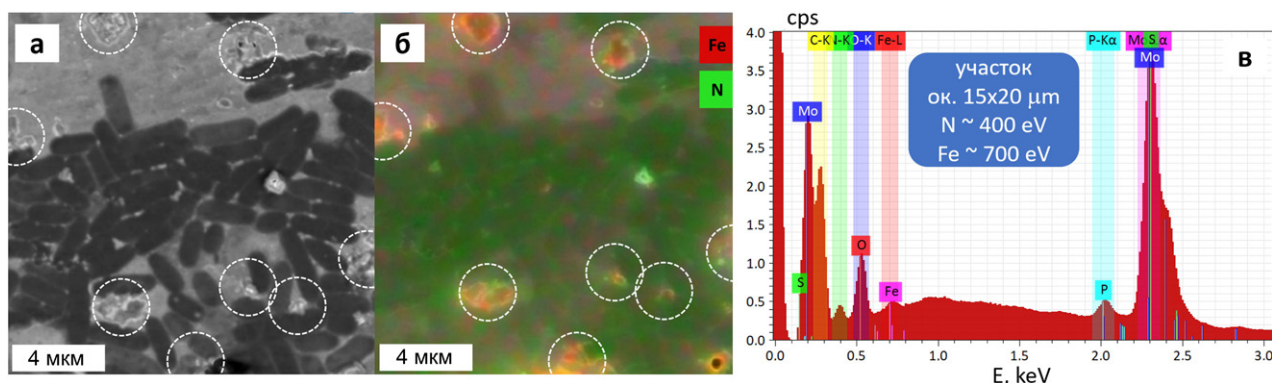


Рис. 2. Энергодисперсионный микроанализ участка поверхности с массивом клеток кишечной палочки *E. coli* на подложке фольги молибдена. а: РЭМ изображение, белым пунктиром выделены участки выброса белка; б: картирование распределения атомов железа (красный цвет) и азота (зеленый цвет); в: энергодисперсионный рентгеновский спектр

ший вклад сигнала от атомов железа на участках, обозначенных на рис. 1а, рис. 2а и б пунктирной белой линией. Эти участки мы связываем с «выбросом» белка Dps модифицированными клетками *E. coli* во внеклеточное пространство.

4. Выводы

Таким образом, по результатам изучения морфологии и элементного состава представляется возможным утверждать следующее. В условиях суперпродукции при росте клеток кишечной палочки *E. coli* молекулы бактериоферритина Dps вырабатываются в количествах, допускающих выброс этого белка во внеклеточное пространство без нарушения формы и размеров клеток кишечной палочки *E. coli*. Белок, выделяемый во внеклеточное пространство, содержит заметное количество атомов железа, что может являться результатом формирования биогибридных структур молекулами бактериоферритина Dps без разрушения их источника – клеток кишечной палочки. Такой подход к формированию биогибридных материалов на основе молекул белка клеточного происхождения может рассматриваться как перспективный для получения наночастиц системы железо–кислород заданных свойств, в том числе подлежащих длительному хранению или использованию в технологиях, например, адресной доставки наночастиц, функционализации доступных поверхностей.

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. Никандров В. В. Неорганические полупроводники в биологических и биохимических системах: биосинтез, свойства и фотохимическая активность. *Успехи биологической химии*. 2000;40: 357–396.
2. Behrens S. S. Synthesis of inorganic nanomaterials mediated by protein assemblies. *Journal of Materials Chemistry*. 2008;18: 3788–3798. <https://doi.org/10.1039/B806551A>
3. *Biological and Bio-inspired Nanomaterials. Properties and Assembly Mechanisms*. S. Perrett, A. K. Buell, T. P. J. Knowles (ed.). Singapore: Springer; 2019. 440 p. <https://doi.org/10.1007/978-981-13-9791-2>.
4. Паринова Е.В., Антипов С.С., Беликов Е.А., ... Турищев С.Ю. Исследования био-наногибридного материала на основе бактериального ферритин-подобного белка DPS методами ПЭМ и РФЭС. *Конденсированные среды и межфазные границы*. 2022;24(2): 265–272. <https://doi.org/10.17308/kcmf.2022.24/9267>
5. Назаровская Д. А., Турищев С. Ю., Титова С. С., Шатов А. А., Тюрин-Кузьмин П. А., Осминкина Л. А. Фотолюминесцентные свойства наночастиц пористого кремния: синтез, характеристика и визуализация в клетках. *Конденсированные среды и межфазные границы*. 2025;27(3): 422–432. <https://doi.org/10.17308/kcmf.2025.27/13181>
6. Antipov S.S., Pichkur E.B., Praslova N.V., ... 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>
7. Antipov S., Turishchev S., Purtov Yu., ... Ozoline O. 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. Турищев С. Ю., Антипов С. С., Новолокина Н. В., ... Домашевская Э. П. Синхротронные исследования в мягком рентгеновском диапазоне зарядового состояния ионов железа в ферригидритном ядре ферритина Dps

Escherichia coli. *Биофизика*. 2016;61(5): 837–843. Режим доступа: <https://www.elibrary.ru/item.asp?id=27327330>

9. Паринаова Е. В., Антипов С. С., Sivakov V., ... Турищев С. Ю. Локализация молекул белка Dps *E. coli* в матрице нитевидного кремния по данным растровой электронной микроскопии и рентгеновской фотоэлектронной спектроскопии. *Конденсированные среды и межфазные границы*. 2023;25(2): 207–214. <https://doi.org/10.17308/kcmf.2023.25/11102>

10. Antipov S. S., Tutukina M. N., Preobrazhenskaya E. V., ... Ozoline O. N. The nucleoid protein Dps binds genomic DNA of *Escherichia coli* in a non-random manner. *PLOS ONE*. 2017;12(8): 1–27. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0182800>

11. Hudson A. J., Andrews S. C., Hawkins C., ... Gues J. R. Overproduction, purification and characterization of the *Escherichia coli* ferritin. *European journal of biochemistry*. 1993;218(3): 985–995. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1993.tb18457.x>

12. Turishchev S. Yu., Marchenko D., Sivakov V., ... Antipov S. S. On the possibility of photoemission electron microscopy for *E. coli* advanced studies. *Results in Physics*. 2020;16: 102821-1 -3. <https://doi.org/10.1016/j.rinp.2019.102821>

13. Alvear-Daza J. J., García-Barco A., Osorio-Vargas P., Gutierrez-Zapata H. M., Sanabria J., Rengifo-Herrera J. A. Resistance and induction of viable but non culturable states (VBNC) during inactivation of *E. coli* and *Klebsiella pneumoniae* by addition of H₂O₂ to natural well water under simulated solar irradiation. *Water Research*. 2021;188(116499):1-11. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2020.116499>

14. He Q., Liu D., Guo M., ... Guo M. Antibacterial mechanism of ultrasound against *Escherichia coli*: Alterations in membrane microstructures and properties. *Ultrasonics Sonochemistry*. 2021;73(105509): 1-12. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2021.105509>

15. Sambrook J. *Molecular cloning: a laboratory manual* J. Sambrook, E. F. Fritsch, T. Maniatis (eds.). Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1989. 1546 p.

Информация об авторах

Турищев Сергей Юрьевич, д. ф.-м. н., доцент, заведующий кафедрой общей физики и физического материаловедения, Воронежский государственный университет (Воронеж, Российская Федерация).

<https://orcid.org/0000-0003-3320-1979>
tsu@phys.vsu.ru

Беликов Евгений Александрович, аспирант кафедры общей физики и физического материаловедения, Воронежский государственный университет (Воронеж, Российская Федерация).

bp4nth3r@mail.ru

Паринаова Елена Владимировна, к.ф.-м.н., доцент кафедры общей физики и физического материаловедения, Воронежский государственный университет (Воронеж, Российская Федерация).

<https://orcid.org/0000-0003-2817-3547>
parinova@phys.vsu.ru

Куреша Дэниэль Зафарович, студент кафедры общей физики и физического материаловедения, Воронежский государственный университет (Воронеж, Российская Федерация).

kureshi@phys.vsu.ru

Чуvenкова Ольга Александровна, к.ф.-м.н., с.н.с., совместная научно-образовательная лаборатория «Атомное и электронное строение функциональных материалов» Воронежского государственного университета и Национального исследовательского центра «Курчатовский институт», Воронежский государственный университет (Воронеж, Российская Федерация).

<https://orcid.org/0000-0001-5701-6909>
chuvenkova@phys.vsu.ru

Sivakov Vladimir, PhD, руководитель группы, Leibniz Institute of Photonic Technology (Jena, Germany).

<https://orcid.org/0000-0002-3272-501X>
vladimir.sivakov@leibniz-ipht.de

Антипов Сергей Сергеевич, д.б.н., профессор кафедры биофизики и биотехнологии, Воронежский государственный университет, Воронежский государственный университет (Воронеж, Российская Федерация).

ss.antipov@gmail.com

Поступила в редакцию 11.08.2025; одобрена после рецензирования 25.08.2025; принята к публикации 05.09.2025; опубликована онлайн 01.04.2026.