

*На правах рукописи*

**Образцова Екатерина Александровна**

**АТОМНО-СИЛОВАЯ МИКРОСКОПИЯ УГЛЕРОДНЫХ  
НАНОСТРУКТУР, БИОМАКРОМОЛЕКУЛ И ИХ КОМПЛЕКСОВ**

Специальность 01.04.07 - физика конденсированного состояния  
02.00.06 – высокомолекулярные соединения

**Автореферат**

Диссертации на соискание учёной степени  
кандидата физико-математических наук

Москва – 2008г.

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

Научный руководитель: доктор физико-математических наук, профессор  
ЯМИНСКИЙ Игорь Владимирович

Официальные  
оппоненты: доктор физико-математических наук, профессор  
ЧЕРНОЗАТОНСКИЙ Леонид Александрович

кандидат физико-математических наук,  
ЕЖОВ Александр Анатольевич

Ведущая организация: Федеральное государственное унитарное  
предприятие "Научно-исследовательский физико-  
химический институт им. Л. Я. Карпова"

Защита состоится «5» ноября 2008 г. в 15<sup>30</sup> на заседании диссертационного совета  
Д501.002.01 при Московском государственном университете им. М.В. Ломоносова  
по адресу: 119991, Москва, Ленинские Горы, МГУ, физический факультет, ауд.  
ЮФА

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке физического факультета МГУ.

Автореферат разослан «    » \_\_\_\_\_ 2008 г.

Ученый секретарь  
диссертационного совета Д 501.002.01  
при Московском государственном университете,  
кандидат физико-математических наук

Лаптинская Т.В.

## Общая характеристика работы

Диссертационная работа посвящена разработке методов атомно-силовой микроскопии для визуализации углеродных наноструктур, биомакромолекул и их комплексов и применению этих методов для изучения воздействия одностенных углеродных нанотрубок на биологические объекты. В работе было проанализировано действие углеродных наноматериалов на биологические макромолекулы, частицы растительных вирусов и живые бактериальные клетки. Для корректной оценки изменений, вызванных взаимодействием между исследованными материалами, предварительно были исследованы физические свойства обоих классов используемых объектов.

Структурной основой большинства наноуглеродных материалов является графен, представляющий собой единичный двумерный слой атомов углерода с гексагональной упаковкой. Для экспериментального изучения структуры и электронных свойств углеродных нанотрубок, графитовых пленок нанометровой толщины и самого графена были использованы методы атомно-силовой микроскопии (АСМ), сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) и спектроскопии резонансного комбинационного рассеяния света (КРС). Интерпретация экспериментальных результатов производилась на основе известных теоретических подходов и новых моделей, разработанных в результате сотрудничества с другими лабораториями в рамках работы по теме диссертации.

Для характеристики биологических макромолекул и частиц до и после взаимодействия с углеродными структурами в большинстве случаев был использован метод атомно-силовой микроскопии. Оказывая минимальное внешнее воздействие, этот метод позволяет исследовать структуру, размеры и форму объектов, которые в данном случае зависят от внешних факторов. Дополнительно были использованы такие методы, как флуоресцентная спектроскопия и определение способности бактерий к делению и дыханию. Оценка полученных результатов была проведена с использованием известных характеристик для биологических объектов.

## Актуальность работы

Повышенное внимание к взаимодействию наночастиц с биологическими объектами в последние годы вызвано, прежде всего, началом широкого применения нанообъектов в продуктах массового бытового и промышленного потребления. Однако воздействие используемых наноматериалов на биологические системы, в том числе и на человека, полностью не изучено. Результаты, полученные в последнее время в различных лабораториях, во многом противоречат друг другу [1, 2].

Таким образом, исследование наноматериалов и их взаимодействия с биологическими объектами в настоящее время **актуально**. В данной работе рассматриваются два типа наноструктур: *углеродные наноструктуры* в виде – углеродных нанотрубок, графеновых кластеров и малослойных графитовых пленок нанометровой толщины, а также *биологические микро и нанообъекты* – бактерии, вирусные частицы, ДНК, белки. Основная часть работы посвящена визуализации углеродных и биологических наноструктур и анализу взаимодействия этих двух классов частиц.

## **Цель и задачи исследования**

**Целью** данной работы было определение характера взаимодействия углеродных нанотрубок с различными биологическими объектами.

Для этого необходимо было решить следующие **задачи**:

- 1) Исследовать физические свойства углеродных нанотрубок, в том числе:
  - разработать методику контроля и идентификации получаемых образцов углеродных наноструктур с помощью АСМ;
  - провести анализ электронных свойств углеродных наноструктур с помощью спектроскопии резонансного комбинационного рассеяния света;
  - сравнить свойства углеродных нанотрубок, имеющих цилиндрическую поверхность, со свойствами плоских графеновых чешуек и тонких графитных пленок.
- 2) Охарактеризовать топологию и физические свойства биомакромолекул и биологических частиц, в том числе:
  - разработать методику исследования биообъектов с помощью АСМ;
  - исследовать характеристики, поведение и стабильность биообъектов при нанесении на поверхность слюды, при взаимодействии с зондом атомно-силового микроскопа, а также при некоторых других внешних воздействиях.
- 3) Изучить влияние углеродных нанотрубок на биологические объекты:
  - разработать методики создания образцов, обеспечивающие возникновение взаимодействия выбранных биологических объектов с углеродными нанотрубками;
  - разработать процедуру контроля наличия такого взаимодействия и образования комплексов;
  - исследовать характеристики биологических объектов в процессе их взаимодействия с углеродными наноструктурами с помощью атомно-силовой микроскопии и спектроскопических методов;
  - проанализировать возможные изменения в структуре и свойствах исследуемых объектов и сделать заключение о характере взаимодействия между ними.

## **Научная новизна диссертации**

1. Впервые получены образцы одно- и малослойных графеновых кластеров, на подложках различного состава. На основе статистического анализа АСМ изображений разработана новая эффективная методика определения количества слоев в кластере графена, достоверность которой проверена сопоставлением с данными, полученными методом КРС.
2. Впервые произведен систематический сравнительный анализ поведения полосы двухфононного КРС в малослойных пленках графита, графеновых кластерах и углеродных нанотрубках. Выявлены особенности, зависящие от числа слоев и длины волны возбуждающего излучения.
3. Разработана оригинальная методика получения одиночных комплексов одностенная углеродная нанотрубка/ДНК на поверхности слюды. С

помощью АСМ и КРС получены новые данные о топологии и фоновых спектрах этих комплексов.

4. Разработаны новые экспериментальные методы исследования стабильности А и Х вирусов картофеля и вируса табачной мозаики с помощью атомно-силовой микроскопии. Впервые показано, что воздействие одностенных углеродных нанотрубок не влияет на стабильность и топографию нитевидных РНК-содержащих растительных вирусов.
5. Разработана новая методика исследования воздействия углеродных нанотрубок на живые клетки с использованием бактериального флуоресцентного биосенсора. С помощью АСМ определены топологические характеристики клеток до и после взаимодействия с наноструктурами.
6. Впервые при использовании комбинации методов АСМ и КРС показано, что при непосредственном механическом контакте с одностенными углеродными нанотрубками происходит разрушение бактериальных клеток вследствие нарушения клеточной стенки и мембраны.

### **Практическая значимость работы**

Данная диссертация посвящена новому активно развивающемуся направлению в науке о наноматериалах. Применение наноматериалов в продуктах, предназначенных как для бытового использования (косметические средства, ткани, материалы повышенной прочности и т.п.), так и для специфических применений в различных отраслях науки техники (электронные приборы, лазерная техника и пр.), привело к необходимости изучения взаимодействия различных наноструктур с биологическими объектами, и, в конечном счете, с живыми организмами. К наноматериалам, наиболее широко используемым в настоящее время, относятся углеродные нанотрубки, представляющие собой цилиндрические образования из графена. Указанные обстоятельства послужили основанием для выбора целей и задач данной работы, направленной на исследование взаимодействия нанотрубок с биологическими объектами.

В ходе работы были разработаны следующие методики:

- комплексной АСМ и КРС диагностики графеновых кластеров для определения числа слоев в каждом из них;
- АСМ анализа нитевидных РНК-содержащих растительных вирусов;
- реализации и комплексного анализа контролируемого взаимодействия углеродных нанотрубок с биологическими объектами методами АСМ, КРС, флуоресцентной спектроскопии.

Полученные результаты могут быть применены на практике для анализа воздействия наноматериалов на биологические объекты, в том числе, и на человека. Результаты исследования кластеров графена могут быть использованы для формирования элементов наноэлектроники и в метрологии.

### **Основные положения, выносимые на защиту**

1. Атомно-силовая микроскопия позволяет эффективно определить число слоев в графеновом кластере.
2. Форма полосы двухфонового комбинационного рассеяния света с максимумом вблизи  $2700\text{ см}^{-1}$  однозначно соответствует особенностям электронной структуры графеновых кластеров с числом слоев от 1 до 5.

3. Линейное увеличение частотного положения полосы двухфононного КРС при увеличении энергии квантов возбуждающего излучения происходит в соответствии с механизмом двойного резонанса и ходом дисперсионных кривых для электронов и фононов в графене, тонких графитовых пленках и одностенных углеродных нанотрубках.
4. Методика АСМ исследования стабильности нитевидных растительных вирусов при взаимодействии с одностенными углеродными нанотрубками.
5. Сочетание методов АСМ и КРС позволяет выявить формирование комплексов одностенная углеродная нанотрубка/ДНК.
6. При непосредственном контакте с одностенными углеродными нанотрубками происходит разрушение бактериальных клеток. Метод комплексного анализа действия углеродных нанотрубок на бактериальные клетки с помощью атомно-силовой микроскопии и комбинационного рассеяния света.

### **Апробация работы**

Основные результаты диссертационной работы были изложены на следующих научных конференциях:

- 2-ая Международная конференция «Современные достижения бионаноскопии», 17-19 июня 2008, Москва, физич. ф-т МГУ;
- XXII<sup>nd</sup> International Winterschool on Electronic Properties of Novel Materials, 1-8 March, 2008, Kirchberg (Austria);
- 3<sup>rd</sup> International conference « Stimuli Responsive Polymeric Materials (STIPOMAT) », Les Diableretz (Switzerland), October, 14-17 (2007);
- Первая Всероссийская Школа-семинар «Современные достижения бионаноскопии», 11-17 июня 2007, Москва, физический факультет МГУ;
- The topical meeting of the European Group of Research (GDRE) “Nano-E” on optical properties of carbon nanotubes, Paris (France), May, 25 (2007);
- GDRE-06, Obernai, France, 16-19 October, 2006;
- The Summer school “Nanobio”, Cargese, France, 19-29 July, 2006;
- 20<sup>th</sup> General Conference of the Condensed Matter Division of European Physical Society, Prague (Czech Republic), 19-20 July, 2004.

### **Личный вклад автора**

Все экспериментальные измерения методами зондовой микроскопии, комбинационного рассеяния света и флуоресценции выполнены автором лично.

Образцы графена и комплексных частиц углеродная нанотрубка/ДНК для исследования методами атомно-силовой микроскопии и спектроскопии комбинационного рассеяния света приготовлены автором лично.

Автор принимал непосредственное участие в приготовлении образцов вирусов, бактерий и белков совместно с сотрудниками НИИ ФХБ им. Белозерского и биологического факультета МГУ. Методики приготовления образцов для исследования взаимодействия биологических объектов с углеродными нанотрубками разработаны автором. Также автор принимал участие в создании математической модели электронных дисперсионных кривых для графена совместно с сотрудниками Института общей физики им. А.М. Прохорова РАН.

Анализ и интерпретация экспериментальных данных проведены автором лично.

### **Публикации**

По теме диссертации опубликовано 14 работ, включая 5 статей в реферируемых журналах, входящих в список ВАК.

### **Структура и объем диссертационной работы**

Диссертационная работа состоит из введения, пяти глав, заключения и списка литературы, включающего 150 наименований. Работа изложена на 120 страницах и содержит 49 рисунков.

### **Основное содержание работы**

**Во введении** обоснована актуальность темы диссертационной работы, формулируется цель работы, обсуждается новизна и практическая значимость полученных результатов.

**В Главе 1** представлен обзор литературы по теме диссертационной работы. В обзоре описаны опубликованные данные о свойствах материалов, исследовавшихся в данной работе. Отдельно рассмотрены основные физические свойства углеродных наноматериалов и биологических объектов. Проведен обзор физических методов исследования, применявшихся в работе и их особенностей при изучении данного класса объектов. Глава состоит из 4х параграфов.

Первый параграф посвящен описанию углеродных нанотрубок и графеновых кластеров. Вводятся основные понятия. Анализируются способы описания этих углеродных наноматериалов.

Каждая углеродная нанотрубка представляет собой цилиндр, сформировавшийся из полосы конечной ширины идеального моноатомного слоя графита. Такой слой, состоящий из гексагонально упакованных атомов углерода, принято называть *графеном*. Теоретическое описание углеродных нанотрубок и других графитоподобных структур базируется на физических свойствах графена. Однако, до недавнего времени не удавалось синтезировать этот материал, поэтому экспериментальное исследование его свойств только начинается. В данном параграфе описан способ микромеханического отщепления слоев графена, использованный в экспериментах. Также рассмотрены различия в физических свойствах плоского графена и цилиндрических углеродных нанотрубок, обусловленные различием их структуры.

Во втором параграфе приведено описание биополимеров - биологических макромолекул, являющихся основой всех живых организмов. Рассматриваются такие высокомолекулярные соединения как нуклеиновые кислоты и белки, а также структуры на их основе – вирусные частицы и бактериальные клетки.

Третий параграф посвящен проблеме взаимодействия биологических объектов с наночастицами и, в частности, с углеродными нанотрубками. В работе приводится описание результатов исследования токсичности и воздействия углеродных наноструктур на различные биологические объекты. Некоторые исследования указывают на возможность вредного воздействия углеродных наноматериалов на живые организмы. Однако результаты экспериментальных

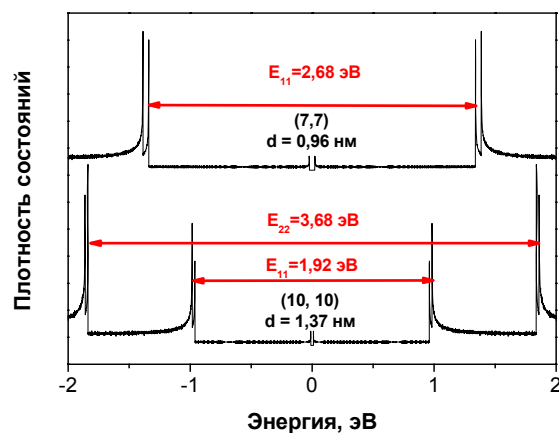
исследований, проводившихся различными группами, зачастую противоречат друг другу.

В четвертом параграфе описаны методы, применяемые для исследования наноструктур. Основное внимание уделяется методам атомно-силовой микроскопии и оптической спектроскопии. В этом разделе также проанализированы основные особенности и проблемы, встречающиеся при изучении углеродных наноструктур и биологических макромолекул.

**В Главе 2** содержится описание использованных в работе экспериментальных аналитических методик и оборудования, материалов и способов приготовления образцов.

**Глава 3** посвящена описанию результатов, полученных при изучении свойств углеродных наноматериалов. Углеродные нанотрубки были основным объектом исследования в работе. Для получения дополнительных данных были исследованы также некоторые физические свойства образцов графена и графитных пленок нанометровой толщины.

Одним из наиболее эффективных методов исследования углеродных нанотрубок является резонансное комбинационное рассеяние света (КРС). Эффективность КРС диагностики одностенных углеродных нанотрубок обусловлена двумя факторами – размерно-индуцированными изменениями частоты и формы полос и высокой интенсивностью сигнала вследствие резонансного характера рассеяния [3]. Резонансное КРС реализуется практически для любого образца нанотрубчатого материала вследствие наличия в нем ансамбля нанотрубок различного диаметра, каждому значению которого соответствует уникальная электронная структура. В случае, когда энергия падающих фотонов близка к энергии разрешенных оптических переходов для нанотрубок определенного диаметра, спектр КРС не только несет информацию о геометрии нанотрубки, но и позволяет исследовать электронную структуру вещества в диапазоне энергий, сравнимых с величиной энергии фотонов возбуждающего лазерного излучения (~ 1-3 эВ). Плотность одноэлектронных состояний для нанотрубок дискретна – она представляет собой набор дельта-образных максимумов (сингулярностей Ван Хофа), симметрично расположенных относительно уровня Ферми (Рис.1). Энергетический зазор между симметричными максимумами определяется диаметром нанотрубки. Оптические переходы  $E_{11}$ ,  $E_{22}$ ,  $E_{33}$ ... (с сохранением волнового вектора  $k$ ) разрешены только между симметричными сингулярностями Ван Хофа.



*Рис.1. Параметры плотности одноэлектронных состояний для ОУН различного диаметра: (7,7) и (10,10).*



В данной работе КРС было применено для исследования геометрических параметров одностенных углеродных нанотрубок, а также для контроля их электронной структуры и свойств при взаимодействии с биологическими объектами. В экспериментах были использованы одностенные углеродные нанотрубки (ОУНТ), полученные методом дугового разряда. Типичные спектры КРС от ОУНТ (Рис.2) содержат три наиболее интенсивные полосы: *G* (*graphite*) полоса с частотой  $\sim 1592 \text{ см}^{-1}$ , соответствующая С-С колебаниям, параллельным поверхности нанотрубки; *2D* - полоса двухфононного рассеяния с частотой  $\sim 2700 \text{ см}^{-1}$ , являющаяся обертоном *D* (*disorder*) полосы с частотой  $\sim 1350 \text{ см}^{-1}$ , появляющейся в спектре при разупорядочении кристаллической решетки; и набор “дыхательных” полос в области низких частот –  $150\text{-}250 \text{ см}^{-1}$ , соответствующих радиальным колебаниям нанотрубок различного диаметра.

Для демонстрации резонансного характера КРС в углеродных нанотрубках были зарегистрированы спектры с использованием различных длин волн возбуждающего излучения (1064 нм, 646 нм, 514.5 нм, 457.9 нм). Было обнаружено селективное резонансное возбуждение нанотрубок различных диаметров и геометрий при изменении длины волны возбуждающего излучения. Как видно из Рис. 2, варьирование энергии фотонов возбуждающего излучения, приводит к резонансному КРС в нанотрубках, имеющих также различный характер проводимости. В наших экспериментах было зафиксировано, что при использовании возбуждающего лазерного излучения с длиной волны 1064 нм, 514.5 нм и 457.9 нм основной вклад вносят полупроводниковые нанотрубки, обуславливая специфическую расщепленную форму *G* полосы с двумя наиболее интенсивными компонентами. В то же время, наблюдающаяся при возбуждении с длиной волны 647 нм уширенная и асимметричная *G* полоса свидетельствует о наличии электрон-фононного взаимодействия, и, следовательно, о металлическом характере проводимости в селективно возбужденных нанотрубках [4]. Изменение формы асимметричной полосы может использоваться как чувствительный

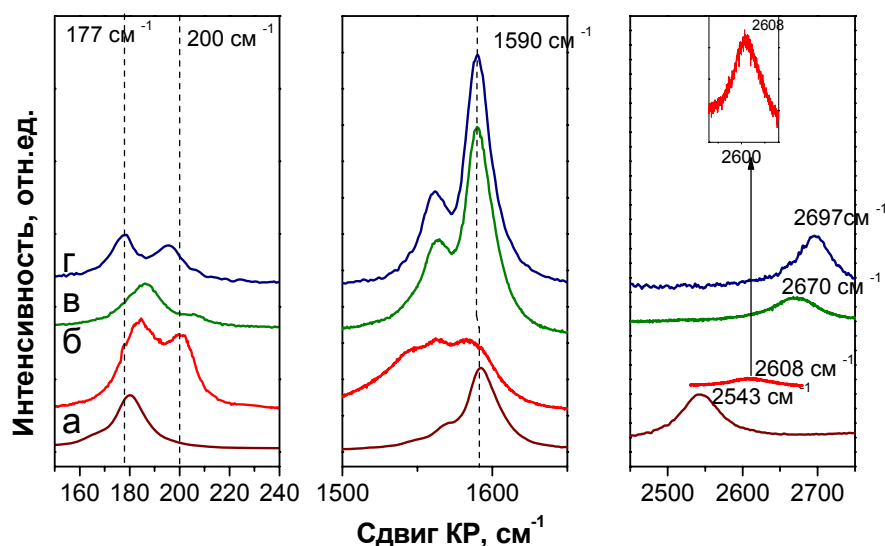


Рис. 2. Различные спектральные области («дыхательной», *G* и *2D* полос) в спектрах КРС одностенных углеродных нанотрубок. Длины волн возбуждающего излучения :  
*a* – 1064 нм, *б* – 647 нм, *в* – 514.5 нм, *г* – 457.9 нм.

инструмент контроля изменения электронной структуры нанотрубки при образовании комплексов с биообъектами.

Оптические и электронные свойства углеродных нанотрубок достаточно глубоко исследованы экспериментально. Теоретические объяснения этих свойств основаны на расчетах для одиночного листа гексагонально упакованных атомов углерода – графена. До недавнего времени этот материал рассматривался лишь в качестве теоретической модели. Получить графен практически впервые удалось только в 2004 году [5]. Одной из задач данной работы было формирование и характеристика этого материала для получения дополнительных экспериментальных данных при изучении свойств аналогичных нанокристаллических материалов, в частности, комплексов углеродных наноструктур и биомолекул.

Метод микромеханического отщепления для получения графеновых слоев, предложенный сравнительно недавно, состоит в переносе на подложку кластеров графита, отщепленных с помощью адгезивной ленты от кристалла высокоориентированного пиролитического графита (ВОПГ). Несмотря на идейную простоту данного метода, его практическая реализация была связана с решением многочисленных проблем:

- после отщепления необходимо было определить место расположения единичных (атомарно тонких) слоев графена на подложке;
- требовалась разработка методики точного определения числа атомных слоев в кластере;
- необходимо было обеспечить визуализацию и хорошую адгезию графеновых кластеров на подложках из различных материалов, и т.д.

Именно эти проблемы были решены в данной диссертации.

Для сохранения чистоты поверхности адгезивная лента была исключена из процесса формирования графена. Кластеры графена с малым числом слоев отщеплялись от кристаллов ВОПГ и переносились на другие поверхности методом прессования. Были получены кластеры графена на кремниевых подложках с тонким (300 нм) слоем  $\text{SiO}_2$ , а также впервые - на подложках, покрытых тонкими пленками  $\text{ZrO}_2$  и  $\text{ZnS}$ . Была продемонстрирована возможность визуализации кластеров графена с малым числом слоев на подложках  $\text{ZrO}_2$  и  $\text{ZnS}$ .

В данной работе атомно-силовая микроскопия была использована как основной метод идентификации и характеристики графеновых кластеров. В работах других авторов, опубликованных к настоящему времени, этот метод использовался как иллюстративный [6]. АСМ изображения не рассматривались как источник количественной информации. В диссертационной работе была разработана оригинальная методика определения числа графеновых слоев методом АСМ, дополненным статистическим анализом толщин зарегистрированных кластеров.

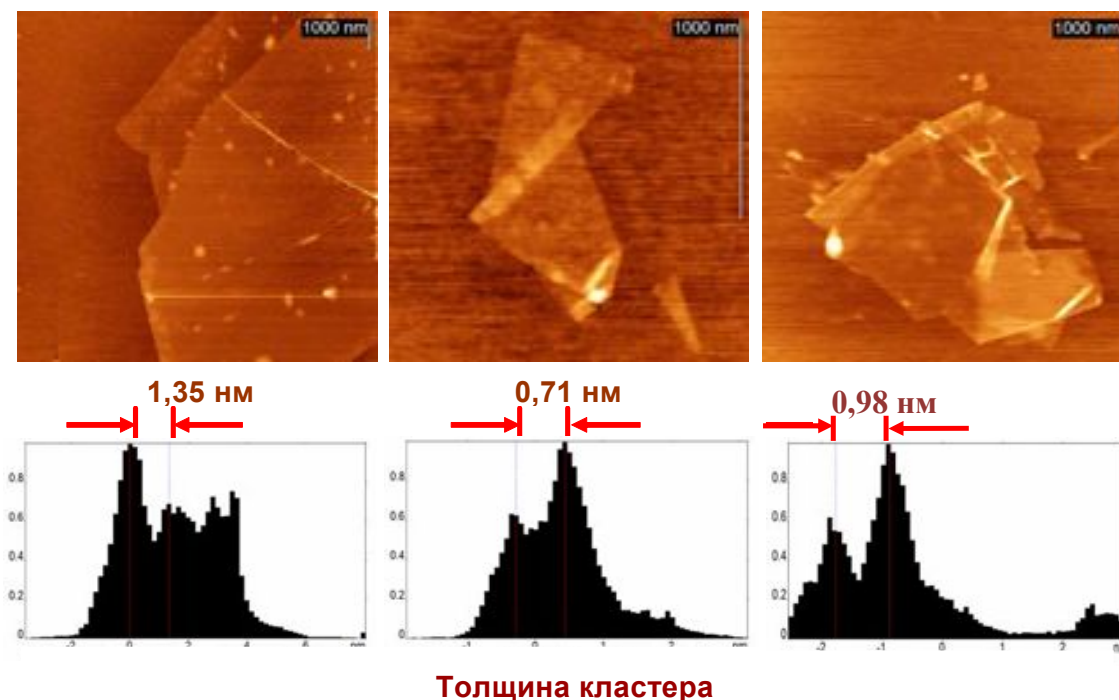
Слои графена, полученные методом микромеханического отщепления, неплотно прилегают к поверхности подложки, что затрудняет определение их толщины. В первых экспериментах по наблюдению кластеров графена с помощью АСМ была применена методика сканирования «на отрыве», т.е. сканирования при минимальной силе взаимодействия зонда с образцом, позволяющего удерживать его у поверхности. При этом уменьшалось механическое взаимодействие между зондом и образцом, что позволяло исследовать хрупкие и легко разрушающиеся объекты. В нашем случае результаты этих первых экспериментов оказались

достаточно неожиданными - все полученные кластеры графена, имели достаточно большую толщину, соответствующую 10 и более слоям. Однако, в ходе дальнейших экспериментов оказалось, что при постепенном повышении силы взаимодействия между зондом и поверхностью образца толщина графеновой пленки уменьшалась, причем размеры остальных объектов, находящихся на поверхности не изменялись. Это уменьшение происходило вплоть до значения  $\sim 0.7$  нм. Дальнейшее увеличение силы взаимодействия между зондом и образцом не влияло на толщину кластеров графена.

Такое поведение можно объяснить тем, что изначально кластеры графена неплотно прилегали к поверхности. Сканирование зондом при увеличенной силе взаимодействия с образцом привело к тому, что графеновые слои оказались более плотно прижатыми к поверхности.

С учетом полученных результатов, для дальнейших исследований была разработана следующая процедура измерений: для получения пробного изображения применялся режим «на отрыве»; выбирался участок, изображение которого необходимо было получить; сканирование выбранного участка производилось при постепенном увеличении силы взаимодействия зонда с образцом, вплоть до стабилизации получаемых значений толщины кластеров. В результате применения этой оригинальной методики удалось достоверно измерить толщины графеновых кластеров.

Методом атомно-силовой микроскопии были получены топографические изображения кластеров графена, нанесенных на различные подложки (Рис. 3). Для анализа изображений была применена программы FemtoScan Online. С помощью функции определения распределения по высотам были получены следующие значения толщин для кластеров графена, различающихся цветом при



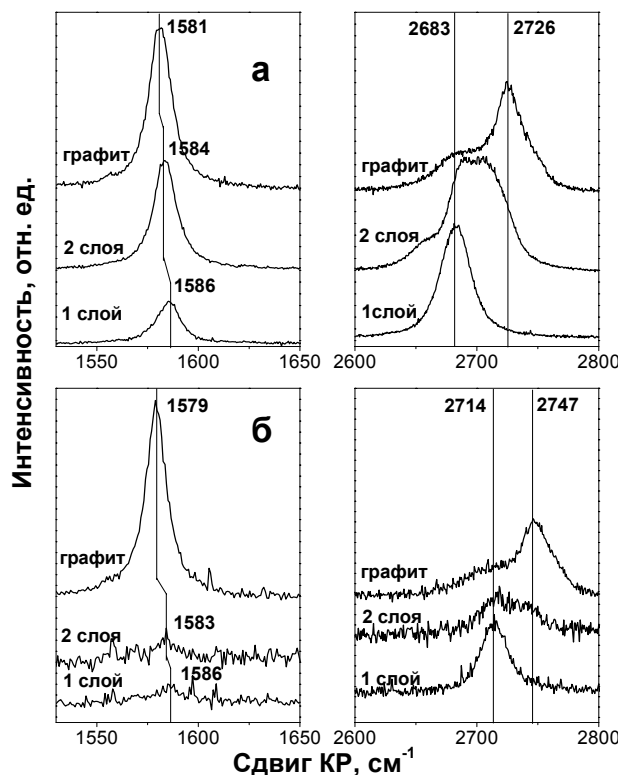
*Рис.3. Типичные топографические изображения чешуек графена различной толщины и статистическое распределение толщины по поверхности.*

их наблюдении в оптическом микроскопе: 0.7 нм, 1.1 нм, 1.4 нм, 1.7 нм, 2.1 нм и т.д. (ошибка измерений составляла  $\sim 0.2$  нм). Расстояние между слоями в кристалле графита составляет около 0,335 нм. Таким образом, полученный набор толщин кластеров графена соответствует последовательному добавлению отдельных графеновых слоев.

Приготовленные и охарактеризованные с помощью АСМ образцы были исследованы методом комбинационного рассеяния света. На *Рис. 4.* представлены характерные спектры одно- и двуслойного графена и ВОПГ. В полученных спектрах наблюдаются две интенсивные полосы: одна - с частотой вблизи  $1582 \text{ см}^{-1}$ , соответствующая G полосе графита; и вторая - с частотой вблизи  $2700 \text{ см}^{-1}$ , соответствующая 2D полосе графита и являющаяся результатом двухфононного КРС, для фононов с частотой  $\sim 1350 \text{ см}^{-1}$ , проявляющихся в КРС спектрах (полоса D) только при однофононном рассеянии с участием дефектов.

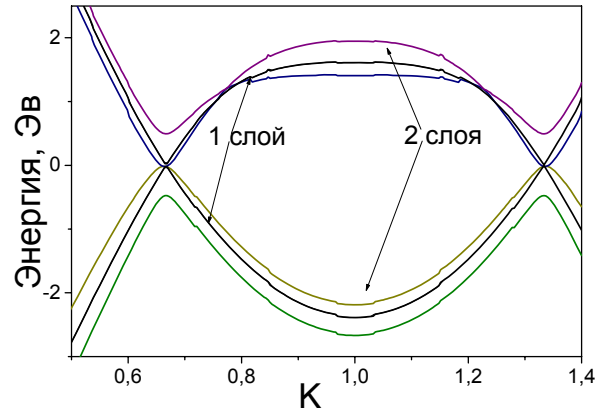
Анализ спектров КРС показал, что полученные кластеры графена содержат малое количество дефектов и хорошо упорядочены. Изменение толщины графеновых кластеров оказывает влияние, в основном, на форму, интенсивность и положение 2D полосы [7]. Форма этой полосы в спектре КР изменяется в соответствии с механизмом двойного резонанса [8], и ходом дисперсионных зависимостей энергии электронов и фононов для графена с различным числом слоев. Форма 2D полосы имеет настолько характерный вид для каждого числа слоев, что может использоваться для оценки этого параметра.

Электронная структура кластеров графена с различным числом слоев была рассчитана совместно с лабораторией спектроскопии наноматериалов ИОФ РАН им. А.М.Прохорова. Ход дисперсионных кривых был смоделирован при помощи теории функционала плотности, метода псевдопотенциала и разложения волновых функций электронов по плоским волнам. Расчет электронной структуры показал, что увеличение числа слоев графена в кластере приводит к расщеплению дисперсионных соотношений. Основным результатом расчета явилась демонстрация увеличения числа ветвей дисперсионной кривой электронов пропорционально числу слоев в кластере графена. Наличие нескольких ветвей открывает возможность осуществления различных вариантов электронных переходов при поглощении фотона. Если в случае двух слоев графена (*Рис.5*) существует 4 таких возможных перехода, то в случае трех слоев их уже 9, и т.д.



*Рис.4. Сравнительное исследование формы и положения G и 2D полос в спектрах КР одно, двуслойного графена и объемного графита. Длина волны возбуждения: а – 514,5 нм, б – 457 нм.*

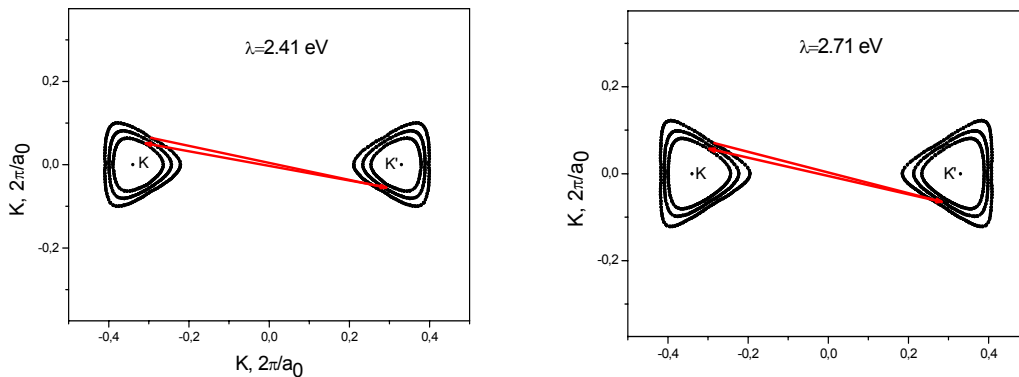
Следствием расщепления дисперсионных соотношений является формирование уширенных, состоящих из нескольких компонент 2D пиков во втором порядке спектров КРС. При увеличении числа слоев до 6 этот процесс заканчивается формированием непрерывного континуума электронных состояний, проявляющимся в виде двух широких пиков в спектрах многослойного графита. Оценки числа слоев графена, произведенные на основе данных КРС, хорошо согласовались с данными АСМ для различных графеновых кластеров.



**Рис.5.** Рассчитанные дисперсионные зависимости энергии электронов для одно- и двухслойного графена.

Ожидалось, что последствием линейного характера дисперсии электронов в малослойном графите будет изменение положений D и 2D полос в спектре КРС при варьировании длины волны возбуждающего излучения. В ходе работы были получены спектры КРС с использованием различных энергий фотонов (длин волн) возбуждающего излучения. На *Рис. 4* приведены спектры, полученные при двух длинах волн возбуждающего излучения – 514.5 нм и 457.9 нм. Зарегистрировано изменение положения D и 2D линий при варьировании энергии фотонов возбуждающего излучения. На *Рис. 6* представлены сечения дисперсионных поверхностей, соответствующие электронным переходам при возбуждении излучением с энергией фотонов 2.71 эВ (457.9 нм) и 2.41 эВ (514.5 нм), использованными в эксперименте. Стрелками показаны варианты возможных переходов, с потерей энергии на возбуждение двух фононов, частоты которых соответствовали 2D экспериментально наблюдаемым в спектре КРС максимумам с энергиями 0,169 эВ (при возбуждении с энергией 2,71 эВ) и 0,166 эВ (при возбуждении с энергией 2,41 эВ).

Таким образом, было показано, что в соответствии с механизмом двойного резонанса и ходом дисперсионных кривых электронов и фононов положение D и



**Рис.6.** Сечения дисперсионных поверхностей энергии электронов в однослойном графене, соответствующие энергиям электронных переходов 2,71 эВ и 2,41 эВ.

2D полос в спектре КРС зависит от длины волны возбуждающего излучения. Аналогичные закономерности были выявлены при исследовании КРС в графитных пленках нанометровой толщины. При этом также впервые было обнаружено, что интенсивность 2D линии возрастает с уменьшением энергии фотонов возбуждающего излучения, что может являться следствием изменения плотности фононных состояний. Выявлено, что положение и форма 2D полосы определяется особенностями электронной структуры нанографитных материалов и может служить индикатором ее изменения, например, при взаимодействии с биологическими объектами.

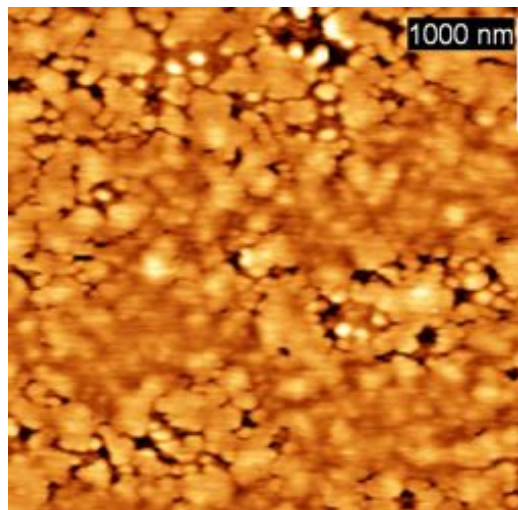
**Глава 4** посвящена изучению биологических микро- и нанообъектов. Изучение воздействия углеродных нанотрубок (УНТ) на биообъекты требует предварительного анализа характеристик этих объектов. Этот этап исследования представляет собой отдельную задачу, выполненную в ходе работы.

В диссертационной работе были исследованы следующие типы биологических объектов: белки, нуклеиновые кислоты, а также более сложные частицы растительных вирусов и бактериальные клетки. Для их изучения были использованы известные подходы для исследования биологических объектов методом АСМ [9, 10], однако, в каждом случае необходимо было их развитие для решения задач диссертационной работы. Требовалось также проанализировать временную стабильность объектов исследования при их анализе методами сканирующей зондовой микроскопии.

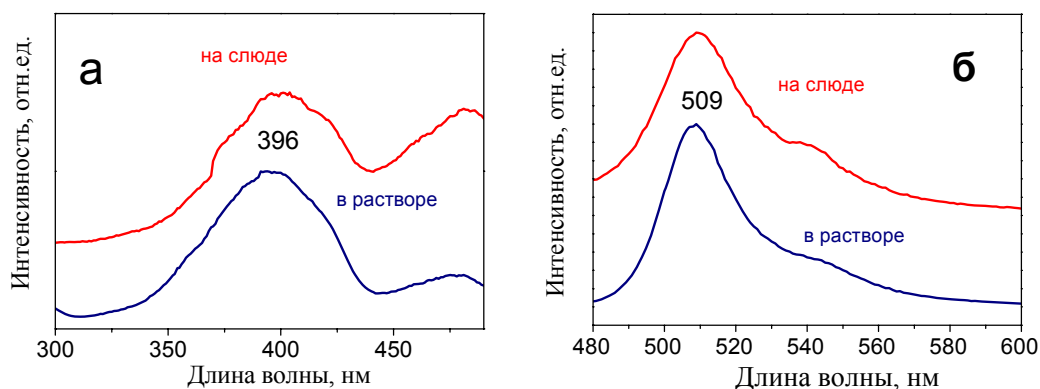
С помощью атомно-силовой микроскопии было изучено поведение *зеленого флуоресцентного белка (GFP)* при высушивании на поверхности слюды. В дальнейшем подобные объекты были использованы для анализа взаимодействия биологических структур с углеродными нанотрубками. В работе также был проведен анализ стабильности люминесцентных свойств этого белка при высушивании.

АСМ исследование показало, что при высушивании на поверхности слюды белок равномерно покрывает поверхность, образуя глобулы высотой от 5 до 25 нм (Рис. 7).

Были зарегистрированы спектры возбуждения и испускания флуоресценции исходного раствора *GFP* и описанного выше образца (Рис. 8). Также были зарегистрированы зависимости интенсивности флуоресценции от времени. В спектрах флуоресценции *GFP* в растворе и в сухой форме значительных различий не наблюдалось. В спектре возбуждения флуоресценции присутствовал один максимум в области 395-400 нм. Максимум испускания флуоресценции в обоих случаях был зарегистрирован на длине волны 509 нм.



**Рис. 7.** Топографическое изображение зеленого флуоресцентного белка, нанесенного на поверхность слюды. Размер изображения 4.5x4.5 мкм.

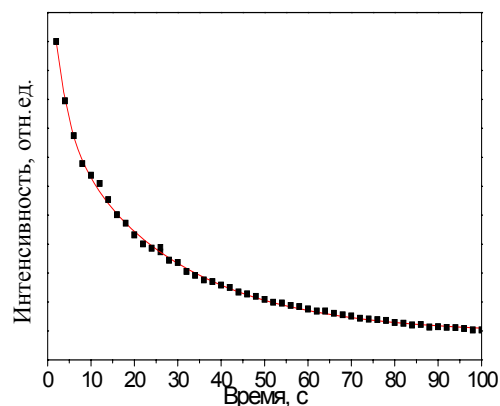


**Рис. 8.** Спектр возбуждения (а) и испускания (б) люминесценции зеленого флуоресцентного белка, нанесенного на поверхность слюды, и в растворе.

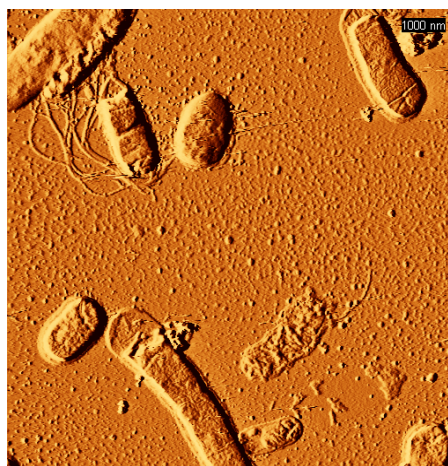
Однако, после высушивания флуоресценция белка стала менее стабильной. Были зарегистрированы зависимости интенсивности испускания флуоресценции от времени (Рис. 9). Для белка, нанесенного на поверхность слюды, интенсивность флуоресценции уменьшалась в 2 раза в течение 10 с, в то время как в растворе за такие времена не происходило сколько-нибудь заметного затухания. Таким образом, можно заключить, что после нанесения на поверхность данный белок теряет стабильность. При исследовании биолюминесцентных объектов вне водной среды необходимо принимать во внимание низкую стабильность люминесценции.

Для проведения дальнейших экспериментов по воздействию углеродных наноструктур на биологические объекты был использован биолюминесцентный бактериальный сенсор. В данной работе был использован биосенсор на основе генно-инженерного штамма *Escherichia coli* K12 TGI, несущего lux-оперон.

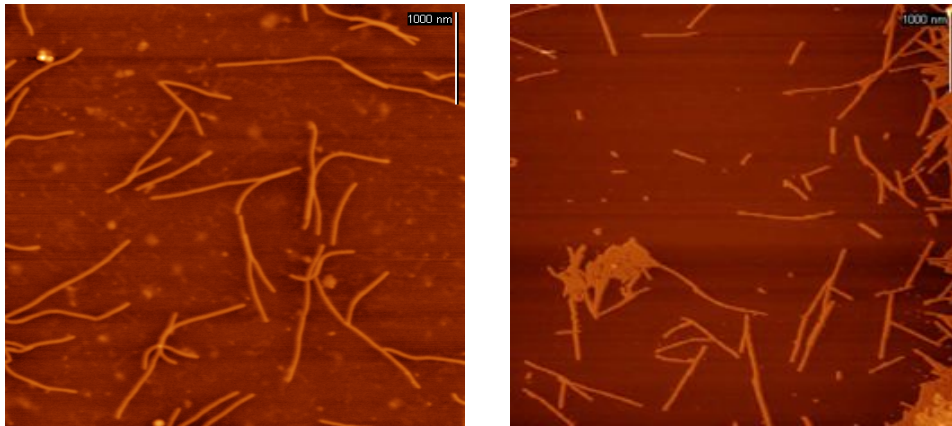
Исходный биосенсор был охарактеризован с помощью атомно-силовой микроскопии. Анализ АСМ изображений (Рис.10) показал, что популяция исходной суспензии бактерий была достаточно гетерогенна по размерам и морфологии и содержала около 95% морфологически полноценных клеток.



**Рис. 9.** Затухание сигнала люминесценции зеленого флуоресцентного белка нанесенного на поверхность слюды.



**Рис.10.** АСМ изображения биосенсора, состоящего из бактерий *Escherichia coli* на разных стадиях деления и развития

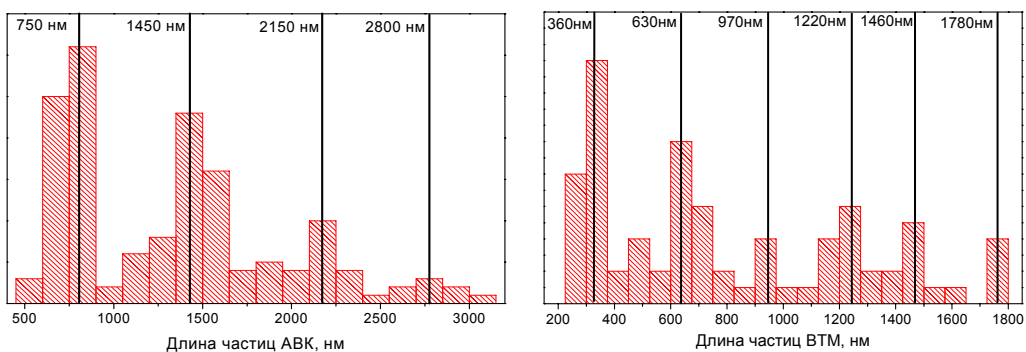


**Рис. 11.** АСМ изображения частиц А вируса картофеля(слева) и табачной мозаики (справа), нанесенных на поверхность слюды.

Значительные различия в морфологии бактерий являются следствием того, что клетки находятся на разных стадиях деления и развития. В случае гибели и разрушения бактериальной клеточной стенки происходит значительное уплощение бактериальной клетки: средняя толщина полноценной бактерии составляет 200-330 нм, в то время как толщина разрушенной клетки не превышает 80 нм.

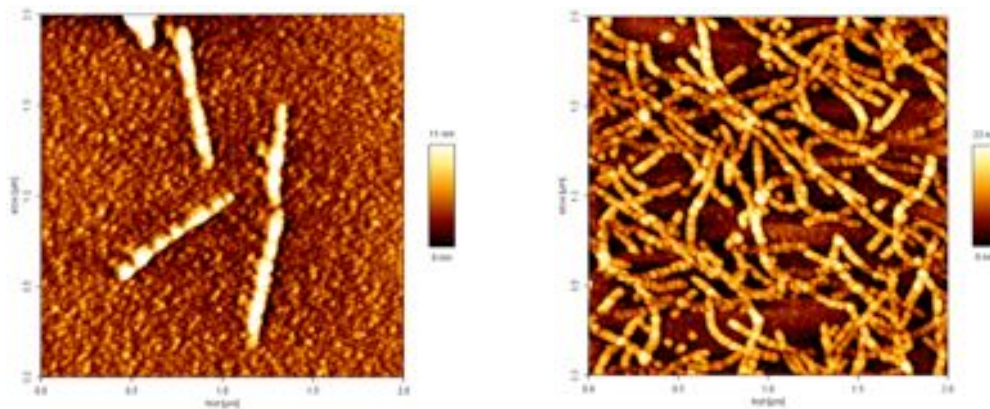
В работе было исследовано три вида нитевидных растительных вирусов: два типа вирусов картофеля А и Х (АВК и ХВК), а также вирус табачной мозаики (ВТМ). Была проанализирована стабильность данных вирусов при их нанесении на поверхность слюды для получения АСМ изображений и в процессе сканирования. Для А и Х вирусов картофеля был исследован процесс их взаимодействия с белками С1 и 25К соответственно.

Анализ топографических изображений частиц вирусов картофеля и табачной мозаики (Рис. 11) показал, что частицы А и Х вирусов имеют схожую структуру и лишь незначительное отличие в размерах. По результатам АСМ исследования средняя длина частиц АВК составляет  $700 \pm 50$  нм (Рис.12), диаметр  $10 \pm 2$  нм; частицы ХВК немного короче – их длина  $\sim 500$  нм и диаметр  $12 \pm 2$  нм. Частицы вируса имеют гладкую нитеобразную форму. Зачастую частицы вирусов картофеля образуют цепочки, состоящие из двух-четырех частиц.

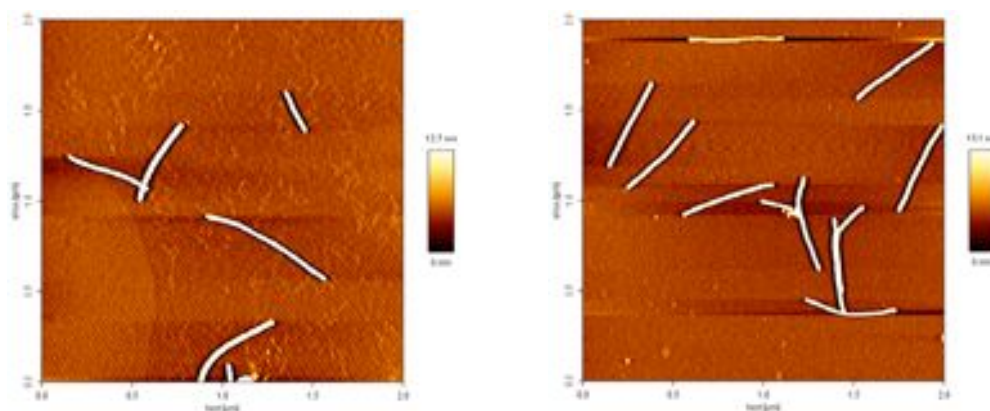


**Рис.12.** Гистограммы распределения частиц А вируса картофеля(слева) и вируса табачной мозаики (справа) по длинам.





*Рис.13. АСМ изображения дестабилизированных частиц А и Х вируса картофеля.*



*Рис. 14. АСМ изображение частиц А и Х вируса картофеля после стабилизации белками CI и 25К, соответственно.*

Частицы вируса табачной мозаики имеют меньшую длину  $360 \pm 50$  нм и несколько больший диаметр  $\sim 16$  нм. В результате АСМ исследования было сделано заключение, что они в большей степени, чем вирусы картофеля склонны к образованию цепочек. Одиночные частицы составляют лишь малую часть из всех наблюдаемых на поверхности. При этом количество вирусов в одной цепочке может достигать 6-8 штук. На *Рис. 12* представлено распределение по длинам наблюдаемых частиц вирусов обоих типов.

Для проведения экспериментов по наблюдению с помощью атомно-силового микроскопа частицы вирусов были нанесены на поверхность слюды из водной среды. В результате наблюдений было установлено, что такие условия не влияют на стабильность частиц. Кроме того, были подобраны такие условия сканирования, при которых не происходит разрушение образца из-за давления со стороны зонда атомно-силового микроскопа.

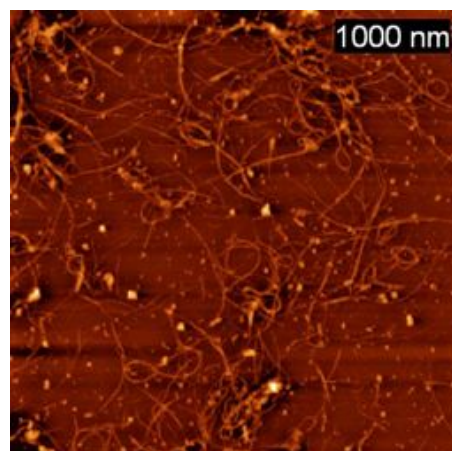
В некоторых случаях, очевидно, под влиянием внешних факторов, таких как условия выделения и хранения, частицы вирусов картофеля теряли стабильность. Методом атомно-силовой микроскопии были обнаружены частицы, имеющие структуру «бусины на нити» (*Рис.13*). Средняя шероховатость вдоль такой частицы составляла 1,1 нм. Наличие таких структур может свидетельствовать о дезорганизации белков оболочки и нестабильности частиц. Таким образом, были зарегистрированы характерные изображения нестабильных

вирусных частиц, которые в дальнейшем использовались для оценки влияния углеродных наноструктур на частицы вирусов.

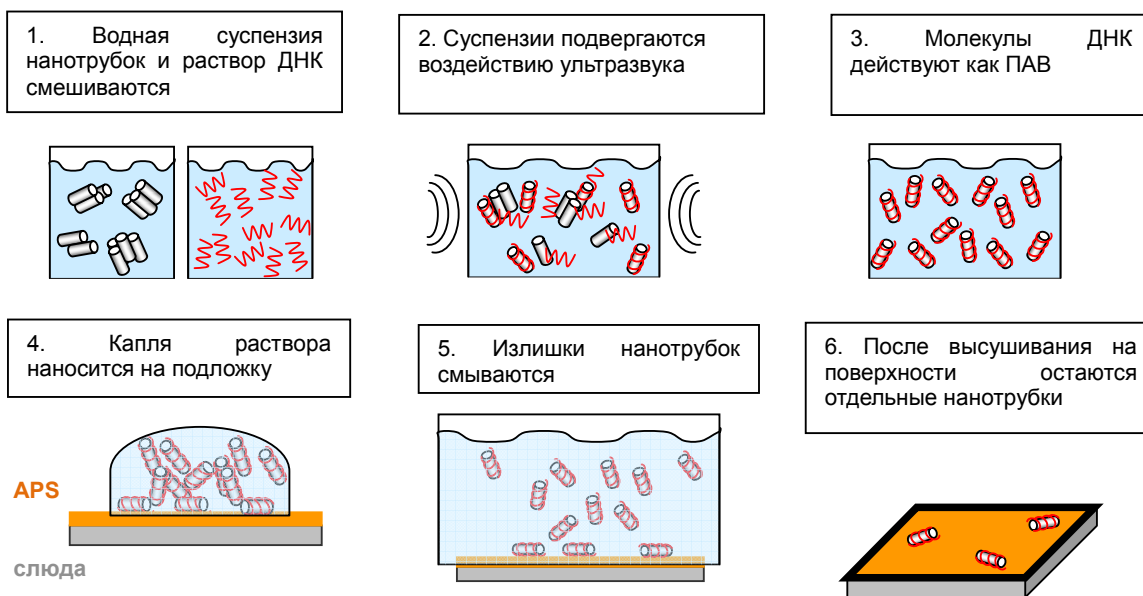
С помощью АСМ было показано, что такие частицы А и Х вирусов картофеля могут быть стабилизированы при взаимодействии с белками С1 и 25К, соответственно В результате добавления соответствующих белков вирусные частицы становились более стабильными. Отдельные белки оболочки плотнее прилегали друг к другу, что приводило к формированию гладкой нитевидной структуры (Рис.14). В то же время добавление этих белков к стабильным частицам не влияло на их структуру.

**Глава 5** посвящена изучению взаимодействия наночастиц с биологическими объектами. Было исследовано взаимодействие углеродных нанотрубок с молекулами ДНК, частицами растительных вирусов (вируса табачной мозаики) и бактериальных клеток (*Escherichia coli*).

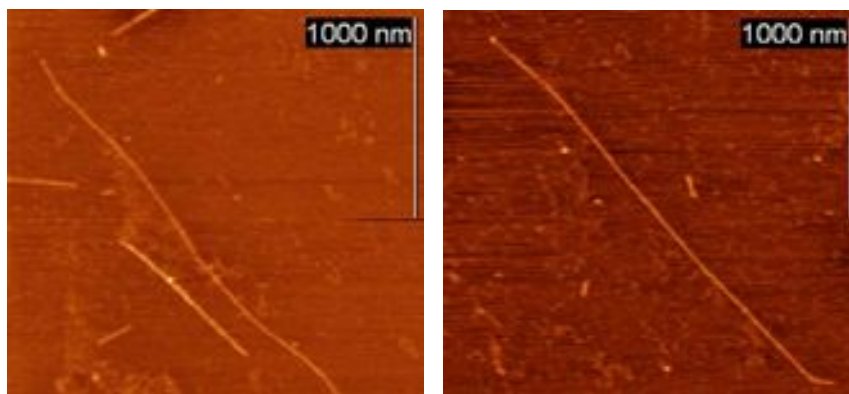
Было установлено, что при взаимодействии с молекулами ДНК происходит образование гибридных частиц – углеродная нанотрубка/ДНК. В экспериментах были использованы молекулы синтетической одноцепочечной ДНК, состоящей из мономеров аденина (poly A) и очищенных одностенных углеродных нанотрубок, полученных методом лазерной абляции. При синтезе ОУН формируют пучки, состоящие из множества нанотрубок. Такие пучки могут быть разделены на отдельные нанотрубки с помощью мощного ультразвукового воздействия. Однако, после окончания



*Рис.15. АСМ изображение пучков одностенных углеродных нанотрубок, сформированных после ультразвуковой обработки.*



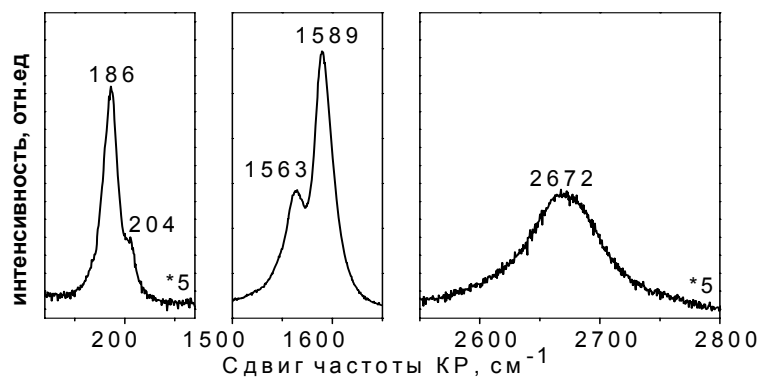
*Рис.16. Приготовление образцов, содержащих отдельные ОУН.*



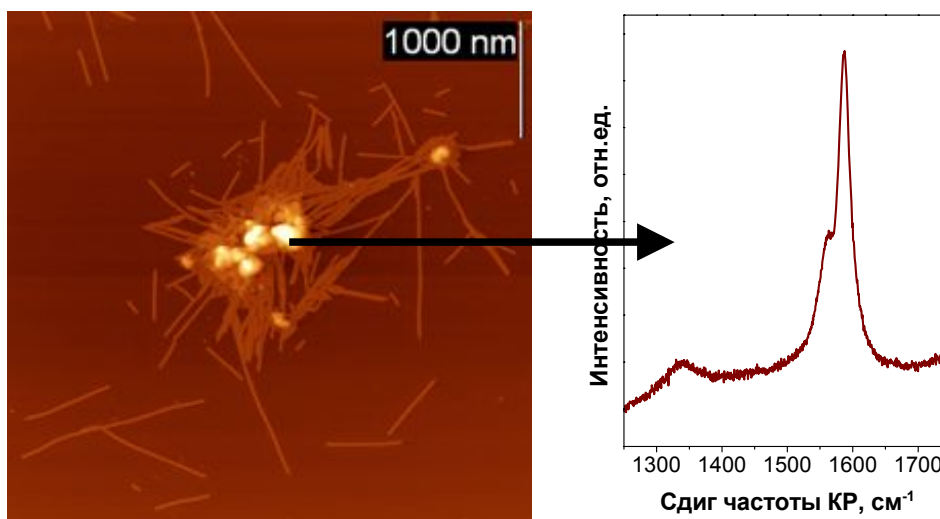
**Рис.17.** АСМ изображения разделенных ОУН, нанесенных на поверхность слюды, обработанную АПС.

действия ультразвука ОУНТ стремятся вновь сформировать пучки, поскольку такое состояние является энергетически более выгодным. На *Рис.15* представлены АСМ изображения пучков ОУНТ, сформированных после ультразвуковой обработки. Толщина пучков достигает 200 нм, т.е. в таких пучках содержится более 100 нанотубок. Для удержания нанотрубок в изолированном состоянии используют различные поверхностно-активные вещества (ПАВ) [11, 12].

В данной работе была разработана методика получения комплексных частиц ОУНТ/ДНК. На *Рис. 16* схематически представлены этапы этого процесса. С помощью ультразвукового воздействия пучки нанотрубок были разделены. Благодаря своей структуре, молекулы ДНК, добавленные в суспензию нанотрубок, действовали подобно ПАВ, обвивались вокруг отдельных из них, не давая им вновь образовать пучки. Полученные таким образом гибридные структуры были исследованы методом атомно-силовой микроскопии (*Рис.17*). Для этого была разработана специальная процедура нанесения единичных разделенных частиц ОУНТ/ДНК на поверхность слюды, на которой наблюдались объекты длиной до нескольких мкм и диаметром 0,7-2 нм, что соответствует параметрам индивидуальных ОУНТ, синтезируемых методом дугового разряда. При варьировании силы воздействия зонда атомно-силового микроскопа удалось продемонстрировать, что данные объекты состоят из двух компонент. Верхний более мягкий слой, являющийся вероятно ДНК, может быть удален в процессе сканирования. Приготовленные образцы были также охарактеризованы методом



**Рис.18.** Спектр КР от комплексов ОУНТ-ДНК..



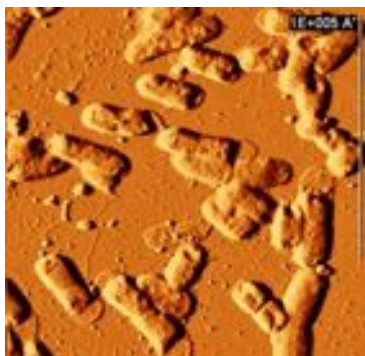
*Рис.19. АСМ изображение частиц вируса табачной мозаики, сгруппировавшихся вокруг скопления углеродных нанотрубок.*

комбинационного рассеяния света. Полученные спектры (Рис. 18) являются характерными спектрами для нанотрубочного материала, таким образом, было показано, что протяженные объекты, наблюдаемые на поверхности слюды, являются одностенными углеродными нанотрубками.

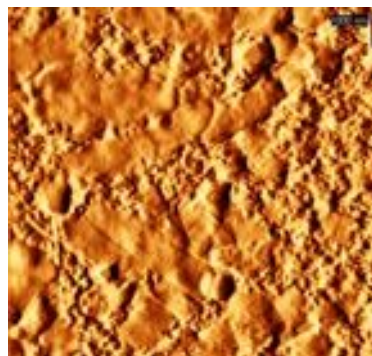
На следующем этапе работы было проанализировано влияние углеродных нанотрубок на более сложные биологические объекты – нитевидные растительные вирусы. В этих экспериментах применялись уже исследованные и охарактеризованные вирусы табачной мозаики (ВТМ). Как уже отмечалось ранее, частицы данного вируса состоят из нуклеотида (в данном случае РНК) и белковой оболочки.

Было изучено влияние углеродных нанотрубок на стабильность вирусных частиц. Для этого водные суспензии нанотрубок, прошедших ультразвуковую обработку, и ВТМ смешивались. Было разработано несколько методик, позволяющих поддерживать равномерную концентрацию ОУНТ и ВТМ в суспензии в период инкубации, который составлял до 14 суток. Однако, во всех случаях форма и размеры вирусных частиц оставались неизменными, и лишь происходило формирование достаточно крупных скоплений частиц ВТМ вокруг агломератов нанотрубок, что было подтверждено с помощью спектроскопии комбинационного рассеяния света. (Рис. 19). В спектрах, полученных от центральной части скоплений вирусов наблюдался интенсивный сигнал, характерный для нанотрубочного материала. Как было показано ранее, слипание отдельных частиц типично для вируса табачной мозаики. Таким образом, при введении углеродных нанотрубок в суспензию ВТМ значительных изменений стабильности, морфологии и поведения вирусных частиц не происходит.

На заключительном этапе работы было проведено исследование влияния одностенных углеродных нанотрубок на живые бактериальные клетки. С помощью атомно-силовой микроскопии были изучены выживаемость и изменение морфологии бактериальных клеток в динамике действия ОУНТ (в течение 14-ти суток). Было проанализировано действие одностенных углеродных нанотрубок на клетки генно-инженерного штамма *Escherichia coli* K12 TG1, имеющего светящийся фенотип, обеспеченный клонированием в него *lux-оперона* из



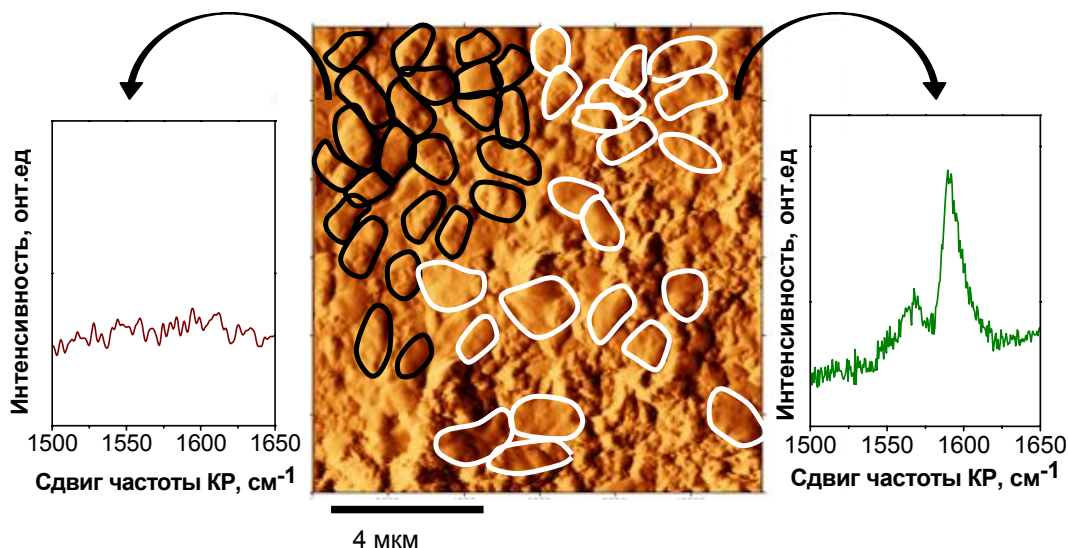
**Рис.20.** АСМ изображение бактериальных клеток *E. coli*, не взаимодействовавших с углеродными нанотрубками



**Рис.21.** АСМ изображение бактериальных клеток *E. coli* после взаимодействия с углеродными нанотрубками.

природных люминесцентных морских бактерий *Photobacterium leiognathi* [13]. Этот штамм в настоящее время широко используется в России в качестве биосенсора тест-системы “Эколюм” для экспресс-оценки токсичности различных химических веществ, их смесей и физических факторов и был отдельно исследован в данной работе, как уже было описано ранее.

Бактериальные клетки инкубировались в течение 14 суток в водной суспензии углеродных нанотрубок а также в водном растворе. Ежедневно из обоих образцов отбирались пробы. На *Рис.20* представлено типичное изображение исследуемых бактерий, которые не подвергались воздействию ОУНТ. Как было описано в Главе 4, бактериальные клетки имеют характерную для бактерий вытянутую форму (длина 2-2,5 мкм, ширина ~1 мкм), их высота составляет  $250 \pm 50$  нм. С помощью атомно-силовой микроскопии было зарегистрировано изменение



**Рис.22.** АСМ изображение бактериальных клеток на границе области, покрытой нанотрубочным материалом. Приведенные спектры комбинационного рассеяния света подтверждают наличие такой области. Белым цветом обозначены бактерии, имеющие непосредственный контакт с ОУНТ и вследствие этого разрушенные. Черным цветом обозначены бактерии, не имеющие непосредственного контакта с нанотрубками и сохранившие свою морфологию.

морфологии бактериальных клеток в областях, покрытых нанотрубками (*Рис.21*). Уже на четвертый день эксперимента стали заметны изменения в структуре бактерий. Из *Рис.21* видно, что клетки значительно уплощены по сравнению с живыми и отличаются латеральными размерами: их высота не превышает 70 нм.

Как и в случае с вирусными частицами, нанотрубочный материал неравномерно покрывал поверхность. Однако, в данных образцах нанотрубки покрывали обширные области поверхности, а не формировали агломераты. С помощью спектроскопии КРС было выявлено значительное количество таких областей. На *Рис. 22* представлено изображение бактерий, находящихся на границе между слоем нанотрубок и поверхностью слюды. Как видно из рисунка, бактерии, находящиеся в области, покрытой ОУНТ имеют различную форму и малую высоту в то время как бактерии, не имеющие прямого контакта с нанотрубками, остаются в исходном состоянии и сохраняют характерную для бактерий форму.

Таким образом, было выявлено, что разрушение бактерий происходит при непосредственном контакте бактериальных клеток с ОУНТ. Это позволяет заключить, что их гибель, возможно, связана с разрушением бактериальной клеточной стенки и нарушением мембраны под действием ОУНТ. Такой механизм разрушения подтверждается также и результатами исследования вирусных частиц. Вирусные частицы состоят лишь из нуклеотида и белка оболочки. Такая структура, очевидно, является более устойчивой к механическим воздействиям и, в частности, воздействию нанотрубок. В то же время более сложная структура бактериальных клеток делает их более уязвимыми к действию внешних воздействий.

Изменение структуры бактериальных клеток было также подтверждено с помощью наблюдения изменений интенсивности биолюминесценции, репродуктивной способности и обменных процессов в образце.

## **В диссертационной работе получены следующие основные результаты:**

1. Развита метод формирования одно- и многослойных кластеров графена на различных подложках (Si с тонким покрытием SiO<sub>2</sub>, ZnS, ZrO<sub>2</sub>). Впервые на основе статистического исследования методом атомно-силовой микроскопии обнаружен дискретный характер распределения толщины графеновых кластеров. В полученном распределении зарегистрирован набор максимумов, отстоящих друг от друга на величину, соответствующую межслоевому расстоянию в графите (~0.34 нм), и соответствующих 1, 2, 3, и т.д. слоям графена.
2. Оценки числа графеновых слоев, полученные из анализа АСМ изображений, были подтверждены данными комбинационного рассеяния света. Была проведена идентификация уникальной формы полосы двухфонового комбинационного рассеяния света с максимумом вблизи 2700 см<sup>-1</sup> для кластеров с различным числом графеновых слоев, определяемой особенностями их электронной структуры. Зарегистрировано изменение формы этой полосы при различных длинах волн возбуждающего излучения.
3. С помощью атомно-силовой микроскопии обнаружено, что происходит стабилизация А, Х вирусов картофеля при взаимодействии с белками С1 и 25К соответственно. Установлено, что нанесение вирусных частиц на поверхность слюды не влияет на их стабильность. Анализ стабильности нитевидных растительных вирусов при контакте одностенными углеродными нанотрубками показал, что частицы вирусов не теряют свою стабильность и лишь образуют достаточно крупные скопления вокруг агрегатов ОУНТ.
4. Разработана методика получения и АСМ-визуализации комплексов одностенная углеродная нанотрубка/ДНК. Методом комбинационного рассеяния света установлено, что при формировании комплекса ОУНТ/ДНК не происходит изменений геометрии и электронной структуры углеродных нанотрубок.
5. Впервые проведено исследование стабильности бактериального биолюминесцентного сенсора в присутствии одностенных углеродных нанотрубок. С помощью АСМ обнаружено, что непосредственный контакт живых бактериальных клеток с одностенными углеродными нанотрубками приводит к механическому нарушению клеточной стенки и мембраны и разрушению бактерий.

## Список цитированной литературы

1. C. Bussy, J. Cambedouzou, S. Lanone, et al., "Carbon Nanotubes in Macrophages: Imaging and Chemical Analysis by X-ray Fluorescence Microscopy", *Nano Lett.* 8 (2008) 2659.
2. A.A. Shvedova, V. Castranova, E.R. Kisin, et al., "Exposure to carbon nanotube material: Assessment of nanotube cytotoxicity using human keratinocyte cells", *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A* 66 (2003) 1909.
3. M.S. Dresselhaus, G. Dresselhaus, P.C. Eklund, *Science of Fullerenes and Carbon Nanotubes: Academic Press, New York, 1996, 919 p.*
4. M. Lazzeri, S. Piscanec, F. Mauri et al., "Phonon Linewidths and Electron Phonon Coupling in Nanotubes", *Phys. Rev. B* 73 (2006) 155426.
5. K.S. Novoselov, A.K. Geim, S.V. Morozov et al., "Electric Field Effect in Atomically Thin Carbon Films", *Science* 306 (2004) 666.
6. D. Graf, F. Molitor, K. Ensslin et al. "Resolved Raman Spectroscopy of Single- and Few-Layer Graphene", *Nano Letters* 7 (2007) 238.
7. A.C. Ferrari, J.C. Meyer, V. Scardaci, et al., "Raman spectrum of Graphene and graphene layers", *Phys. Rev. Lett.* 97 (2006) 187401.
8. C. Thomsen, S. Reich, "Double Resonant Raman Scattering in Graphite", *Phys. Rev. Lett.* 85 (2000) 5214.
9. O.I. Kiselyova, I.V. Yaminsky, "Atomic force microscopy of protein complexes" in "Atomic Force Microscopy: Biomedical Methods and Applications", (*Methods in Molecular Biology, vol. 242*), Ed. by P.C. Braga, D. Ricci. Humana Press, 2003, 217.
10. Сканирующая зондовая микроскопия биополимеров, М, *Научный мир* 1997 под ред. Яминского И.В., 88 с.
11. W. Wenseleers, I.I. Vlasov, E. Goovaerts, et.al. "Efficient Isolation and Solubilization of Pristine Single Wall Nanotubes in Bile Salt Micelles", *Advanced Functional Materials* 14 (2004) 1105.
12. M. Zheng, A. Jagota, M.S. Strano, "Structure-Based Carbon Nanotube Sorting by Sequence-Dependent DNA Assembly", *Science* 302 (2003) 1545.
13. М.М. Mazhul', G.B. Zavi'l'gel'skii, A.P. Zarubina, et al., "Escherichia coli FMN reductase and its effect on the activity of luciferase from the marine bacterium *Vibrio fischeri*", *Microbiology* 68 (1999) 119.

## Основное содержание диссертации опубликовано в следующих работах

1. **Е.А. Obraztsova**, A.V. Osadchy, E.D. Obraztsova, S. Lefrant, I.V. Yaminsky, "Statistical Analysis of Atomic Force Microscopy and Raman Spectroscopy Data for Estimation of Graphene Layer Numbers", *Physica Status Solidi (b)* 245 (2008) 2055-2059.
2. **Е.А. Образцова**, Е.П. Лукашев, А.П. Зарубина, Д. Багров, И.В. Яминский, "Анализ действия одностенных углеродных нанотрубок на бактериальные клетки с помощью атомно-силовой микроскопии", *Сборник тезисов 2-ой международной конференции Современные достижения бионаноскопии, Москва (Россия), 17-19 июня 2008, с. 29.*
3. **Е.А. Образцова**, Н.О. Калинина, М.Е. Тальянский, Р. Габренайте-Верховская, К. Макинен, И.В. Яминский "Атомно-силовая микроскопия А вируса картофеля", *Коллоидный журнал*, 2008, т. 70, No. 2, с. 199-201.



4. А.Н. Образцов, **Е.А. Образцова**, А.А. Золотухин, Н.А. Тюрнина, “Эффект двойного резонанса при комбинационном рассеянии света в нанографитных пленках”, *ЖЭТФ*, 2008, т. 133, No. 3, с. 654-662.
5. **Е.А. Obratsova**, A.V. Osadchy, E.D. Obratsova, S. Lefrant, I.V. Yaminsky, “Statistical Analysis of Atomic Force Microscopy and Raman Spectroscopy Data for Estimation of Graphene Layers Number”, *Book of abstracts of the XXII<sup>nd</sup> International Winterschool on Electronic Properties of Novel Materials, Kirchberg (Austria), 1-8 March, 2008, p. 147.*
6. A.N. Obratsov, A.V. Tyurnina, **Е.А. Obratsova**, A.A. Zolotukhin, B. Liu, K.-C. Chin, A.T.S. Wee “Raman scattering characterization of CVD graphite films”, *Carbon 46 (2008) 963-968.*
7. **Е.А. Obratsova**, E.V. Dubrovin, I.V. Yaminsky, G. Louarn, S. Lefrant “Fabrication and AFM characterization of DNA – single-wall carbon nanotubes hybrid”, *Book of abstracts of the 3<sup>rd</sup> STIPOMAT conference, Les Diableretz (Switzerland), 14-17 October, 2007, p.135.*
8. **Е.А. Образцова**, И.В. Яминский, С. Лефран, Г. Луарн, “Исследование одно- и двухслойного графена методами оптической спектроскопии и микроскопии высокого разрешения”, *Сборник тезисов 1-ой международной конференции Современные достижения бионаноскопии, Москва, 11-17 июня 2007, с. 46.*
9. A.N. Obratsov, **Е.А. Obratsova**, A.V. Tyurnina, A.A. Zolotukhin “Chemical vapor deposition of thin graphite films of nanometer thickness”, *Carbon 45 (2007) 2017-2021.*
10. **Е.А. Obratsova**, S. Lefrant, G. Luarn , I.V. Yaminskii “Raman spectroscopy of one- and two-layer graphene”, *Proc. of GDRE Nano-E topical meeting on optical properties of carbon nanotubes, Paris (France), 25 May, 2007, p. 11.*
11. **Е.А. Obratsova**, E.V. Dubrovin, I.V. Yaminsky, G. Louarn, S. Lefrant, “Fabrication and AFM characterization of DNA-separated single-wall carbon nanotubes”, *Proc. of GDRE-06, Obernai (France), 16-19 October, 2006, p. 37.*
12. I.V. Yaminsky, **Е.А. Obratsova**, “Protein Imaging: Scanning Probe Microscopy”, in book “Protein Structures: Methods in Protein Structure and Stability Analysis”, *Nova Science Publishers, 2006, p. 199-218.*
13. **Е.А. Obratsova**, I.V. Yaminsky, V.N. Lazarev, “Fluorescent Properties of Green Fluorescent Protein in Water Solution and in Dry Conditions”, *Proc. of Summer school Nanobio, Cargese (France), 19-29 July, 2006, p. 21.*
14. S.N. Bokova, A.I. Chernov, T.V. Kononenko, G.M. Mikheev, **Е.А. Obratsova**, Yu.P. Svirko, A.A. Zolotukhin “Optical characterization of pristine and laser-treated nanostructured graphite films”, *Book of Abstracts of 20th General Conference of the Condensed Matter Division of European Physical Society, Prague (Czech Republic), 19-20 July, 2004, p. 13.*