

УДК 621.382.032.27:621.3.049.774

## МЕТАЛЛИЗАЦИЯ ДНК НА ПОВЕРХНОСТИ

© 2011 А.О. Пучкова\*, П.А. Соколов, Н.А. Касьяненко

*Санкт-Петербургский государственный университет, физический факультет**Статья поступила 7 июня 2011 г.*

Описан метод создания ориентированных в одном направлении ДНК-фибрилл длиной свыше нескольких десятков микрометров на поверхности кремния *n*- и *p*-типа. Предложен новый простой и эффективный способ создания серебряных нанопроволок методом электрохимического восстановления связанных с ДНК ионов серебра с использованием полученных фибрилл в качестве шаблона, в результате которого зафиксированные на поверхности монокристалла кремния *n*-типа молекулы ДНК равномерно покрываются кластерами серебра размером около 30 нм. Предлагаемая процедура металлизации ДНК на поверхности кремния *n*-типа имеет преимущество по сравнению с аналогичным способом для макромолекул, закрепленных на свежесколотой слюде, поверхности стекла и кремния *p*-типа. Кремний *n*-типа является не только подложкой, но и источником электронов для восстановления серебра; отсутствие дополнительного химического компонента — восстановителя — принципиально отличает предлагаемый метод от известных в настоящее время. Получены изображения зафиксированных молекул ДНК и готовых нанопроволок с помощью атомного силового микроскопа.

**Ключевые слова:** фиксация ДНК, нанопроволоки, восстановление серебра, ДНК-шаблоны, нанoeлектроника, нанобиотехнологии, кремний, металлизация ДНК.

## ВВЕДЕНИЕ

Вследствие развития нанотехнологий молекула ДНК, важнейший биополимер, основная функция которого заключается в сохранении и передаче наследственной информации при функционировании живых организмов, все чаще используется в качестве материала для создания наноразмерных устройств [1–3]. Ее уникальные физико-химические свойства (комплементарность цепочек, высокая плотность заряда, большая жесткость) позволяют создавать наноструктуры, способствующие решению различных задач не только в области молекулярной медицины и биологии [4, 5], но и нанoeлектроники [6, 7]. В связи с этим представляет интерес изучение сопряжения макромолекул ДНК с элементами твердотельной электроники. Первым шагом в этом направлении является подбор оптимальных условий фиксации ДНК на поверхности полупроводникового кристалла. Это связано также с поиском новых способов приготовления образцов для атомно-силовых исследований без нарушения биологических свойств биополимеров [8–10]. Формирование различных структур на поверхности кремния может быть полезно для построения наносистем с заданными параметрами.

Применение молекулы ДНК в нанoeлектронике затруднено из-за низких проводящих свойств молекулы (в сухом состоянии ДНК является диэлектриком [11]). Поэтому для увеличения проводимости ДНК при создании нанопроволок ее необходимо металлизировать. Получаемые таким образом структуры называются ДНК-шаблонными нанопроволоками. При этом используют свойство ДНК связывать ионы металлов в растворе. Этим обусловлена возмож-

---

\* E-mail: aopuchkova@mail.ru

ность создания на основе ДНК нанопроволок из различных металлов: золота [13], серебра [14], меди [15], кобальта [16]. Используют также сопряжение ДНК с полупроводниковыми материалами [17, 18]. Наибольший интерес вызывают серебряные нанопроволоки, которые находят применение в качестве контактов в нанoeлектронных устройствах [12], датчиков влажности [19], газовых анализаторов [20]. Несмотря на то что к настоящему времени существует ряд подходов к решению проблемы металлизации ДНК, продолжается поиск методов, позволяющих обеспечить оптимальное качество и конфигурацию нанопроволок. Серебряные ДНК-шаблонные нанопроволоки создаются в процессе восстановления ионов серебра, связанных в растворе с молекулой ДНК. При этом восстановление серебра может идти при помощи химических восстанавливающих агентов [14, 21–23], электрохимическим путем [24, 25], а также под действием света [26].

В данной работе предложен относительно простой метод создания серебряных ДНК-шаблонных нанопроволок, где ключевым моментом является использование восстановительных свойств кремния. При этом выполняется металлизация не единичной молекулы ДНК, а массива ориентированных молекул, ДНК-фибрилл, зафиксированных на поверхности кремния. Последнее обеспечивает более равномерное покрытие шаблона серебром.

#### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали ДНК тимуса теленка фирмы "Sigma", молекулярная масса которой  $M = 8 \cdot 10^6$  Да была определена по значению характеристической вязкости в 0,15 М NaCl. Концентрацию ДНК определяли спектрофотометрически по разнице поглощения гидролизованых в 6 % HClO<sub>4</sub> растворов при двух длинах волн (270 и 290 нм). Нативность ДНК контролировали по величине коэффициента молярной экстинкции при 260 нм. ДНК растворяли в бидистиллированной воде, а потом доводили концентрацию соли до 0,005 М NaCl.

В качестве подложек использовали свежесколотую слюду (мусковит), стекло без дополнительной обработки и монокристаллический эпитаксиальный кремний *n*- и *p*-типа проводимости с ориентацией (100) после специальной обработки (травления в течение 1 мин в HF + 10H<sub>2</sub>O с последующим промыванием водой).

При иммобилизации биополимера на подложку использовали раствор ДНК, содержащий, как правило,  $5 \cdot 10^{-4}$  М MgCl<sub>2</sub>. При фиксации на слюду раствор ДНК ( $C_{\text{ДНК}} = 5 \cdot 10^{-5}$  %) выдерживали 1 мин, на кремний и стекло — 10 мин при  $C_{\text{ДНК}} = 2,5 \cdot 10^{-3}$  %. Затем подложки промывали потоком дистиллированной воды. Полученные образцы высушивали в вакууме 25 мин и использовали в качестве шаблонов для создания нанопроволок, которые готовили двумя различными методами.

**Метод А.** Это известный ранее метод восстановления ионов серебра, предварительно связанных в растворе с молекулой ДНК, при помощи химического восстановителя, в данном случае гидрохинона. На образец с зафиксированными молекулами ДНК наносили 10 мкл 0,005 М раствора AgNO<sub>3</sub> и аммиака (рН раствора 9) и после 60 мин выдержки в темноте добавляли 10 мкл 0,002 М раствора гидрохинона. Образец выдерживали в темноте еще 20 мин, затем промывали 10 мл дистиллированной воды и последовательно капали 5 мкл AgNO<sub>3</sub> (в цитратном буферном растворе рН 3) и 5 мкл гидрохинона (водный раствор). Систему выдерживали 10 мин в темноте, после чего промывали 10 мл дистиллированной воды и высушивали.

**Метод Б.** На образец с зафиксированными на нем молекулами ДНК наносили 0,005 М или 0,001 М раствор AgNO<sub>3</sub>. Образец выдерживали в темноте в течение 15, 30 и 60 мин и промывали дистиллированной водой. Далее на образец наносили 0,004 М раствор гидрохинона и после 15 мин выдержки в темноте образец промывали и высушивали.

Эффективность фиксации и металлизации молекул ДНК контролировали с помощью атомного силового микроскопа (АСМ) Nanoscope IVa (Veeco) в режиме прерывистого контакта.

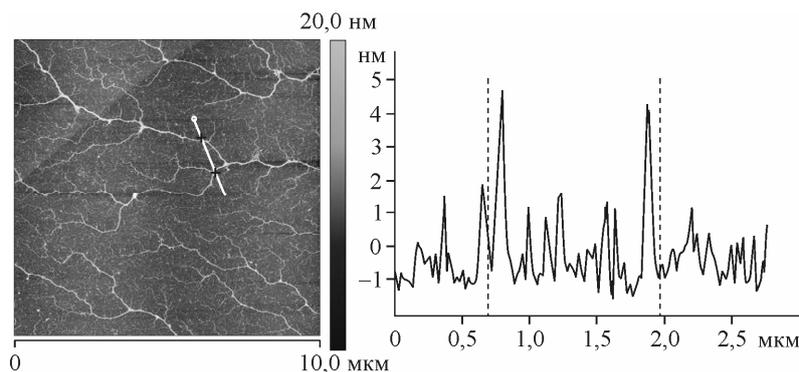


Рис. 1. АСМ изображение поверхности кремния *n*-типа с зафиксированными молекулами ДНК (слева) и соответствующий высотный профиль

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Рассмотрим подробнее процедуру фиксации ДНК на поверхности кремния. Описанная выше методика фиксации биополимера в присутствии ионов магния на подложки из кремния без предварительной химической модификации их поверхности не описана в литературе. Как видно из рис. 1, при такой фиксации ДНК формирует на поверхности кремния разветвленные структуры протяженностью несколько десятков микрометров, высота и ширина которых от 5 и 50 нм (рис. 1, высотный профиль). Последнее указывает на то, что фибриллы состоят из нескольких макромолекул (диаметр одной молекулы ДНК в В-форме составляет 2 нм).

Для выявления роли магния в процессе фиксации были проведены дополнительные эксперименты, которые показали, что фиксация ДНК на протравленные кремниевые подложки может также осуществляться из не содержащего ионы магния раствора (рис. 2, *a*), хотя в этом случае эффективность фиксации существенно ниже. Если же подложки перед нанесением раствора ДНК были предварительно обработаны раствором 5 мМ  $MgCl_2$  (через 10 мин после нанесения капли этого раствора на подложку образец продували воздухом, после этого наносили раствор ДНК без магния и сразу же образец промывали водой), фиксация ДНК проходила более активно (см. рис. 2, *б*). Если раствор  $MgCl_2$  с образца не сдували, а смывали водой перед последующим нанесением ДНК (см. рис. 2, *в*), результат не отличался от фиксации ДНК из растворов, не содержащих магний, без предварительной обработки поверхности  $MgCl_2$  (см. рис. 2, *a*). Это показывает, что ионы магния слабо связаны с подложкой и легко удаляются водой. Таким образом, присутствие ионов магния в растворе ДНК, строго говоря, не является необходимым условием для фиксации биополимера на подложку кремния. Однако присутствие магния в рас-

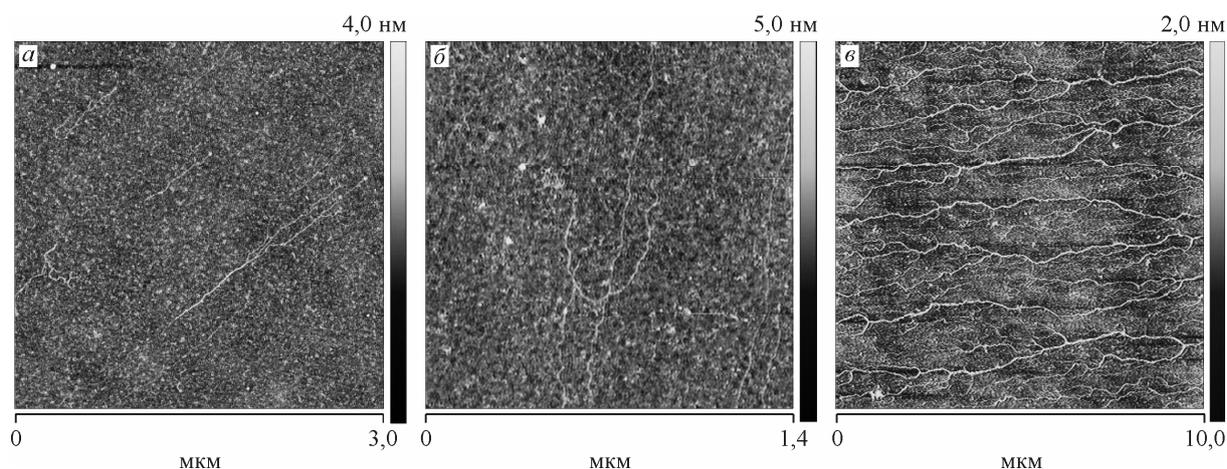
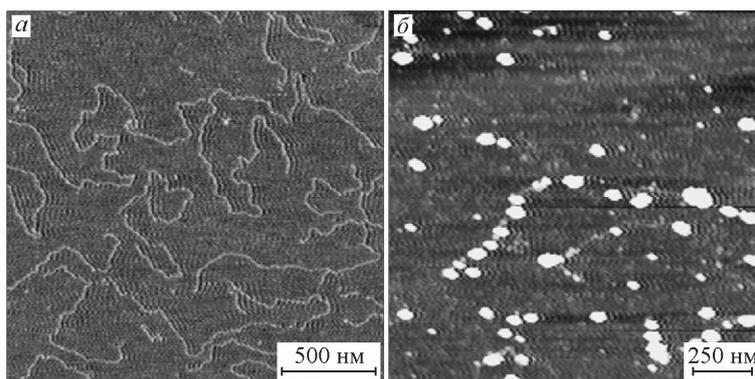


Рис. 2. АСМ изображения поверхности кремния *n*-типа с зафиксированными молекулами ДНК (описание *a*, *б* и *в* дано в тексте)

Рис. 3. АСМ изображения молекул ДНК, зафиксированных на поверхности слюды: свободная ДНК (а) и ДНК после процесса металлизации по методу А (б)



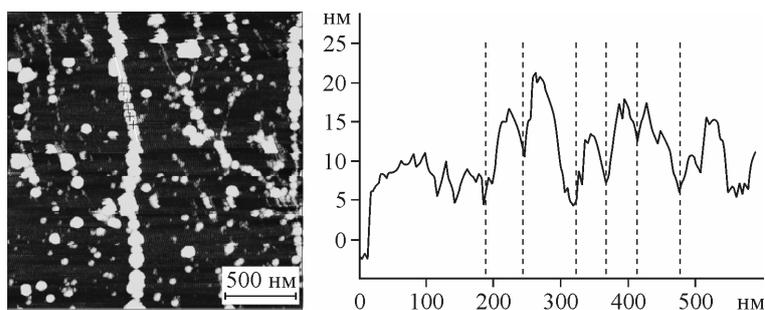
творе (или на поверхности кремния) обеспечивает более высокую концентрацию ДНК при ее иммобилизации.

Можно предположить, что роль ионов магния в процессе фиксации ДНК на поверхности кремния сводится к следующему. Ионы магния в водном растворе всегда гидратированы [28, 29], поэтому можно ожидать, что они через свою гидратную оболочку связываются с силанольными группами на поверхности кремния [30, 31]. Заряда иона при этом достаточно, чтобы электростатически связываться и с фосфатными группами молекулы ДНК [32], что и способствует закреплению макромолекулы на поверхности. Вероятно, сила сцепления макромолекул с подложкой и относительная гидрофобность поверхности кремния влияют на вид формируемых структур. Указанные выше причины влияют и на способность макромолекул вытягиваться под действием потока при промывании образцов, и на процесс формирования фибрилл. Фиксация ДНК на кремниевую поверхность показывает, что не только электростатические взаимодействия играют решающую роль в процессе закрепления ДНК. Можно предположить, что в отсутствие ионов магния реализуется механизм фиксации, при котором фосфатные группы ДНК непосредственно взаимодействуют с силанольными группами на поверхности кремния [27].

После иммобилизации биополимера на поверхности слюды (рис. 3, а) и проведения процедуры металлизации по методу А макромолекулы покрываются кластерами серебра (см. рис. 3, б), но это покрытие неплотное, между кластерами имеются значительные зазоры. Аналогичные результаты были получены и при фиксации ДНК на поверхность стекла.

Для металлизации ДНК на поверхности кремния использовали другой способ металлизации (метод Б) и образцы кремния *n*-типа с зафиксированными в виде фибрилл молекулами ДНК. В этом случае после проведения процедуры металлизации поверхность фибрилл равномерно покрывалась кластерами восстановленного серебра (рис. 4). Из рисунка видно, что кластеры плотно расположены на шаблоне и имеют примерно одинаковый размер. Высота и поперечные размеры нанопроволоки (см. рис. 4, справа) позволяют оценить размеры таких кластеров:  $(30 \pm 10)$  нм. С учетом обычного для метода АСМ некоторого занижения реальной высоты объектов и уширения их поперечных размеров из-за конечных размеров зонда эта оценка представляется правдоподобной, тем более что визуально видны однородные кластеры серебра.

Рис. 4. Молекулы ДНК, собранные в фибриллы на поверхности кремния после процесса металлизации по методу Б. АСМ изображение



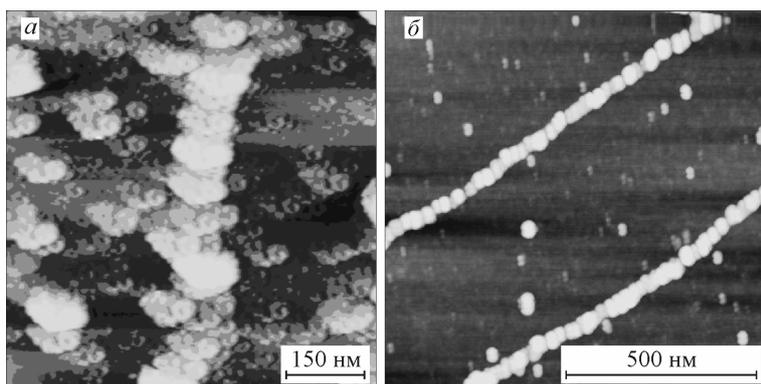


Рис. 5. АСМ изображение ДНК на поверхности кремния *n*-типа после выдержки с раствором  $\text{AgNO}_3$  в течение 15 мин (до обработки гидрохиноном) (а) и после проведения полного процесса металлизации по методу Б (б)

Принципиальным отличием этого метода от метода А является отсутствие химических восстановителей, так как здесь восстанавливает серебро сама кремниевая подложка *n*-типа. Наличие или отсутствие гидрохинона в методе не является решающим. К моменту нанесения на подложку кремния *n*-типа с зафиксированными молекулами ДНК гидрохинона ионов  $\text{Ag}^+$  там уже нет, так как перед этим образец промывают большим количеством воды (в отличие от метода А, когда раствор гидрохинона добавляют непосредственно в каплю  $\text{AgNO}_3$ , нанесенную на поверхность с зафиксированными макромолекулами для восстановления серебра). Подчеркнем еще раз, что поверхность фибрилл в методе Б покрывали восстановленным серебром и до обработки образца гидрохиноном (рис. 5, а).

На наш взгляд, механизм металлизации ДНК в этом случае может быть описан следующим образом. Ионы  $\text{Ag}^+$  связываются с отрицательно заряженными молекулами ДНК в растворе. Так как поверхность кремния *n*-типа, на которую фиксированы молекулы ДНК, является полупроводником с основными носителями заряда электронами, то восстановление серебра идет за счет туннелирования электронов через ДНК из кремния. Таким образом, в данном случае процесс восстановления серебра носит электрохимический характер. Добавление же гидрохинона ведет к повышению качества нанопроволок, а именно: уменьшает размер кластеров, делает их более однородными, а подложка очищается от лишнего серебра. Таким образом, восстановленное серебро селективно покрывает только фибриллы молекул ДНК равномерным слоем кластеров (см. рис. 4 и 5, б).

Подчеркнем, что размер кластеров оставался постоянным при варьировании времени выдержки образца с каплей раствора 0,005 М  $\text{AgNO}_3$  от 15 мин (рис. 6) до 1 ч (см. рис. 4 или 5, б). Кроме того, концентрация  $\text{AgNO}_3$  не влияла на размер и плотность посадки кластеров (в эксперименте использовали концентрацию 0,001 М (рис. 7) и 0,005 М (см. рис. 4 или 5, б) при выдержке образцов с этими растворами в течение 1 ч).

Как видно из приведенных изображений, металлизация на ДНК-фибриллах идет лучше (покрытие плотней и равномерней), чем на единичных молекулах. Причем чем больше макромолекул в связке, тем лучше качество получаемых нанопроволок. Это связано, по-видимому, с повышением плотности заряда и увеличением мест посадки для серебра на поверхности ДНК-фибрилл по сравнению с единичной макромолекулой.

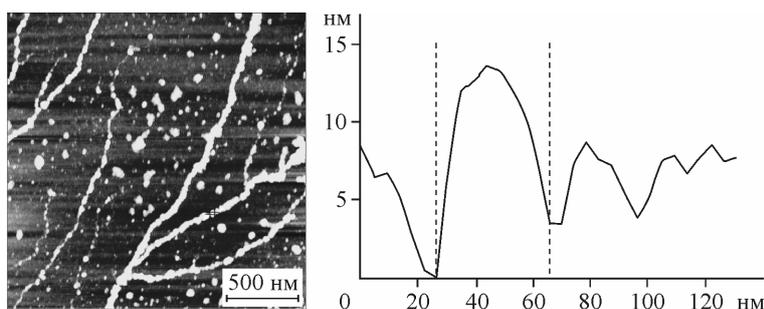
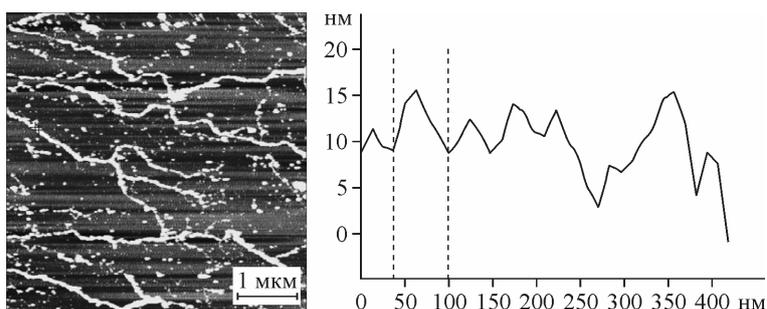


Рис. 6. Молекулы ДНК, собранные в фибриллы на поверхности кремния *n*-типа, после процесса металлизации по методу Б (выдерживание в растворе 0,005 М  $\text{AgNO}_3$  в течение 15 мин). АСМ изображение

Рис. 7. Молекулы ДНК, собранные в фибриллы на поверхности кремния *n*-типа, после процесса металлизации по методу Б (выдерживание в растворе 0,001 М AgNO<sub>3</sub> в течение 1 ч). АСМ изображение



Еще одним доказательством того, что восстановителем серебра в методе Б служит именно кремниевая подложка, является тот факт, что этот процесс не идет на непроводящих подложках. Не наблюдалось формирование кластеров серебра на молекулах ДНК, высаженных на слюдяные (рис. 8) и стеклянные подложки (рис. 9).

Металлизация фибрилл ДНК по методу Б на поверхности кремния *p*-типа (рис. 10, *a*) протекает значительно хуже (см. рис. 10, *б*). При этом образец выдерживали с 0,005 М раствором AgNO<sub>3</sub> в течение 1 ч. Ухудшение металлизации, скорее всего, связано с тем, что для кремния *p*-типа основными носителями заряда являются дырки, а концентрация электронов гораздо меньше. Таким образом, восстановительная способность у кремния *p*-типа ниже, чем у кремния *n*-типа. Однако при облучении кремния *p*-типа светом в инфракрасном диапазоне (длина волны 890 нм), приводящем к генерации дополнительных электрон-дырочных пар, металлизация значительно улучшается (см. рис. 10, *в*).

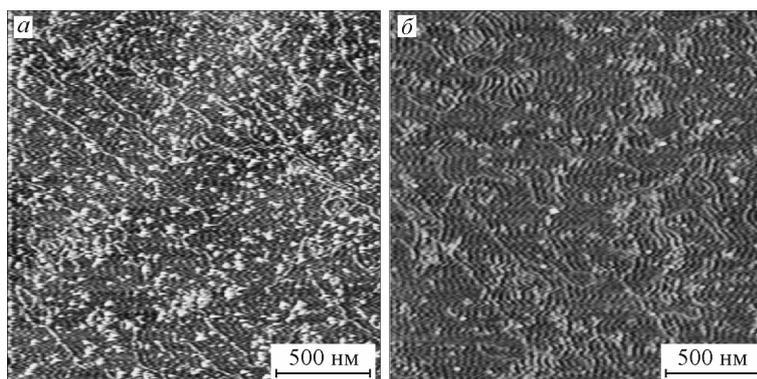


Рис. 8. ДНК, высаженная на поверхность свежесколотой слюды (*a*); после процесса металлизации по методу Б (*б*). АСМ изображение

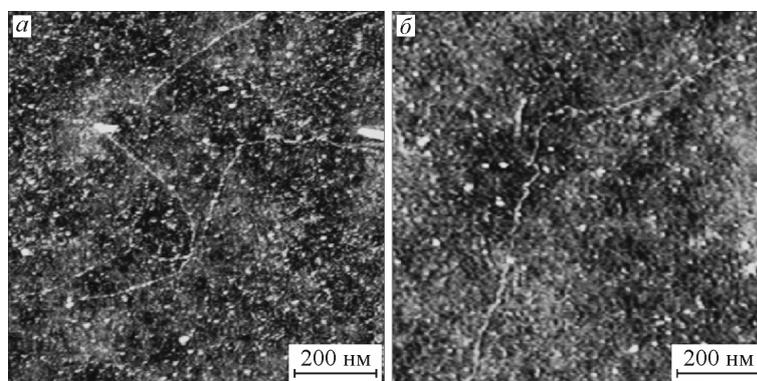


Рис. 9. ДНК, высаженная на поверхность стекла (*a*); после процесса металлизации по методу Б (*б*). АСМ изображение

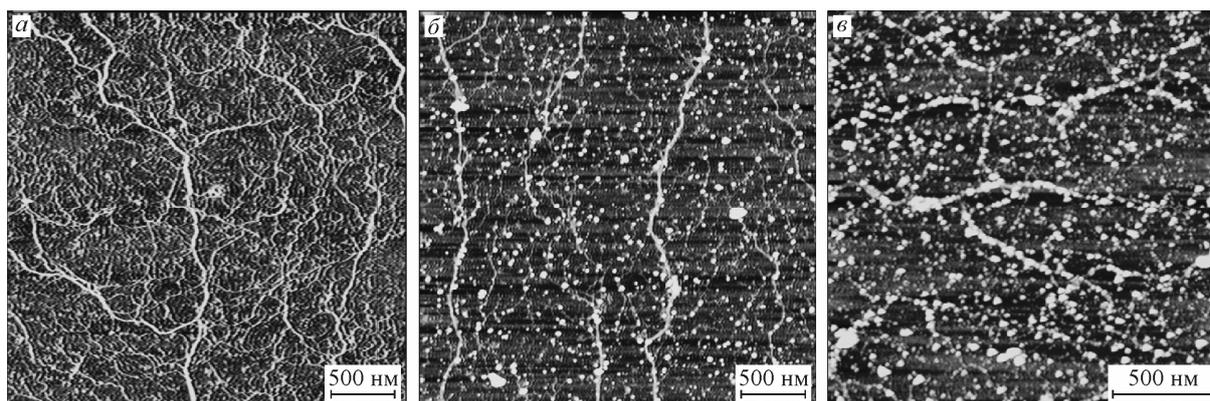


Рис. 10. Молекулы ДНК, высаженные на поверхность кремния *p*-типа: ДНК-фибриллы (а), они же после процесса металлизации серебром по методу Б (б) и после облучения инфракрасным светом (в). АСМ изображение

Таким образом, оптимальный способ получения ДНК-шаблонных нанопроволок заключается в использовании ДНК-фибрилл, зафиксированных на поверхности кремния *n*-типа, при использовании метода Б для металлизации.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Seeman N.C. // *Current Opinion in Structural Biology*. – 1996. – 6, N 4. – P. 519 – 526.
2. Alivisatos P., Johnsson K., Peng X. et al. // *Nature*. – 1996. – 382. – P. 609 – 611.
3. Goodman R.P., Schaap I.A.T., Tardin C.F. et al. // *Science*. – 2005. – 310, N 5754. – P. 1661 – 1665.
4. Li Z. et al. // *Nano Lett.* – 2004. – 4. – P. 245 – 247.
5. Lee L. // *Annals of Biomedical Engineering*. – 2006. – 34. – P. 75 – 88.
6. Ben-Jacob E., Hermon Z., Caspi S. // *Phys. Lett. (A)*. – 1999. – 263, N 3. – P. 199 – 202.
7. Patwardhan J.P., Dwyer C., Lebeck A.R. et al. // *In Foundations of Nanoscience: Self-Assembled Architectures and Devices*. – 2004. – P. 344 – 358.
8. Allison D.P., Bottomley L.A., Thundat T. et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 1992. – 89, N 21. – P. 10129 – 10133.
9. Bezanilla M., Manne S., Laney D. E. et al. // *Langmuir*. – 1995. – 11. – P. 655 – 659.
10. Braun E., Eichen Y., Sivan U. et al. // *Nature*. – 1998. – 391. – P. 775.
11. Storm A., Noort J., Vries S. et al. // *Appl. Phys. Lett.* – 2001. – 79. – P. 3881 – 3883.
12. Keren K., Rotem S. Berman, Buchstab E. et al. // *Science*. – 2003. – 302. – P. 1380 – 1382.
13. Satti A., Aherne D., Fitzmaurice D. // *Chem. Mater.* – 2007. – 19, N 7. – P. 1543.
14. Braun E., Eichen Y., Sivan U. et al. // *Nature*. – 1998. – 391, N 19. – P. 775.
15. Monson C.F., Woolley A.T. // *Nano Lett.* – 2003. – 3, N 3. – P. 359.
16. Gu Q., Cheng C.D., Haynie D.T. et al. // *Nanotechnology*. – 2005. – 16, N 8. – P. 1358.
17. Dittmer W.U., Simmel F.C. // *Appl. Phys. Lett.* – 2004. – 85, N 4. – P. 633.
18. Dong L.Q., Hollis T., Connolly B.A. et al. // *Adv. Mater.* – 2007. – 19. – P. 1748.
19. Lu J., Yang L., Xie A. et al. // *Biophys. Chem.* – 2009. – 145. – P. 91 – 97.
20. Zhao K., Chang Q., Chen X. et al. // *Materials Science and Engineering*. – 2009. – 29. – P. 1191 – 1195.
21. Farha Al-Said S.A., Hassanien R., Hannant J. et al. // *Electrochem. Commun.* – 2009. – 11. – P. 550 – 553.
22. Zinchenko A.A., Baigl D. et al. // *Biomacromol.* – 2008. – 9, N 7. – P. 1981 – 1987.
23. Gabriel Shemer et al. // *J. Amer. Chem. Soc.* – 2006. – 128. – P. 11006 – 11007.
24. Cui S. et al. // *Materials and Design*. – 2007. – 28, N 2. – P. 722 – 725.
25. Monika Fischler et al. // *Small*. – 2007. – 3, N 6. – P. 1049 – 1055.
26. Lu J. et al. // *Biophys. Chem.* – 2009. – 145, N 2-3. – P. 91 – 7.
27. Mao Y., Daniel L.N., Whittaker N. et al. // *Environmental Health Perspectives*. – 1994. – 102. – P. 165 – 171.
28. Lighthstone F.C., Schwegler E., Hoodet R.Q. et al. // *Chem. Phys. Lett.* – 2001. – 343. – P. 549 – 555.
29. Sines C.C., McFail-Isom L., Shelley B. et al. // *J. Amer. Chem. Soc.* – 2000. – 122. – P. 11048 – 11056.
30. Takahashi Naoko et al. // *R&D Review of Toyota CRDL*. – 2003. – 41, N 1.
31. Kiselev A.V., Lygin V.I. *IR Spectra of Surface Compounds and Adsorbed Substances*. – М.: Nauka, 1972.
32. Anastassopoulou J. et al. // *J. Mol. Struct.* – 2003. – 651-653. – P. 19 – 26.