

УДК 577.323:538.9:621.383:544.72

**СВЕТОИНДУЦИРОВАННАЯ НЕКОВАЛЕНТНАЯ ФИКСАЦИЯ ДНК
И СИНТЕТИЧЕСКИХ ПОЛИИОНОВ НА ПОВЕРХНОСТИ
МОНОКРИСТАЛЛОВ КРЕМНИЯ**

© 2009 И.Л. Волков*, Н.В. Базлов, А.С. Бондаренко, О.Ф. Вывенко, Н.А. Касьяненко

*Санкт-Петербургский государственный университет, физический факультет**Статья поступила 21 июня 2008 г.*

В работе представлен простой способ нековалентной фиксации ДНК и синтетических полиионов на поверхности монокристаллов Si (100) *p*- и *n*-типа. Проведено сравнение различных способов подготовки поверхности для фиксации ДНК. Показано, что конформация макромолекул, зафиксированных на подложке, зависит от наличия двухвалентных противоионов в растворе, а также от зарядовых свойств поверхности и полимера. Проверка и анализ результатов фиксации осуществлены с помощью атомной силовой микроскопии (АСМ).

Ключевые слова: ДНК, полиионы, поверхность кремния, нековалентная фиксация, свет, АСМ.

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время большой интерес вызывает возможность создания наноструктур на основе биологических и синтетических полимеров. В частности, для конструирования сложных трехмерных структур с заданными свойствами могут быть использованы нуклеиновые кислоты [1, 2]. При этом молекула ДНК, благодаря своим уникальным физико-химическим свойствам (комплементарность цепочек, высокая плотность заряда, большая жесткость), рассматривается не столько как биополимер — носитель генетической информации, сколько как удобный материал, применяемый для формирования наноразмерных систем, используемых при решении различных задач, в том числе и в области нанoeлектроники [3, 4]. Способность ДНК и комплексов на ее основе к самоорганизации в водно-солевых растворах, а также возможность управления конформационными переходами на уровне вторичной и третичной структуры макромолекулы путем изменения макропараметров среды могут позволить создавать такие конструкции как молекулярные моторы и нановыключатели [5, 6]. Уникальные зарядовые свойства открывают широкие возможности для создания нанопроволок на основе ДНК [7, 8].

Синтетические и биологические полимеры могут быть использованы и для модификации различных поверхностей при решении широкого спектра задач физики и химии: покрытие полупроводниковых квантовых точек [9], модификация наночастиц [10], создание биодатчиков [11], ячеек памяти [12] и др. Существуют различные способы модификации поверхности, включающие физическую сорбцию, ковалентную фиксацию и электростатическое взаимодействие [13]. Интересно отметить, что в некоторых случаях модификация поверхности гидрированного кремния (H-silicon) с помощью ДНК может быть использована для последующей нековалентной фиксации синтетических полимеров [14]. И наоборот, модификацию поверхности полилизинном применяют для нековалентной фиксации ДНК на стекле [15].

* E-mail: volk.ne@gmail.com

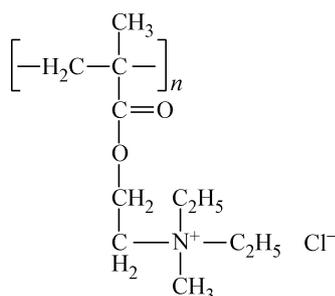


Рис. 1. Структурная формула поликатиона

Модификация поверхности полупроводника полиэлектролитами открывает новые возможности для создания так называемых МОП (металл—оксид—полупроводник) структур. В этом случае синтетический полимер или ДНК фиксируют на искусственно созданном толстом туннельно-непрозрачном слое оксида кремния SiO_2 [16]. Такие химически модифицированные поверхности кремния используют для фиксации ДНК при различных электрофизических измерениях. Показано, что условия фиксации в этом случае в значительной степени определяют электрофизические свойства ДНК [17, 18].

В предлагаемой работе мы исследуем возможность фиксации ДНК и молекул синтетического полииона на поверхности монокристалла кремния с тонким туннельно-прозрачным естественным слоем оксида без дополнительной химической модификации. Проверка и анализ результатов фиксации осуществляется при помощи атомной силовой микроскопии (АСМ).

МЕТОДИКА ЭКСПЕРИМЕНТА

Для приготовления образцов использовали ДНК тимуса телят (Sigma), молекулярная масса которой была определена по значению характеристической вязкости в 0,15 М NaCl ($M = 8 \cdot 10^6$ Да). ДНК растворяли в бидистиллированной воде, а затем досаливали до 0,005 М NaCl. Концентрацию ДНК определяли спектрофотометрически по разнице поглощения ее гидролизированных в 6 % HClO_4 растворов при $\lambda = 270$ и 290 нм с помощью спектрофотометра СФ-56 при $\lambda = 290$ нм. В некоторых случаях для фиксации ДНК в ее раствор вводили MgCl_2 (в конечном растворе $C_{\text{MgCl}_2} = 5 \cdot 10^{-4}$ М, $C_{\text{DNA}} = 2,5 \cdot 10^{-4}$ %).

В качестве положительно заряженного полимера использовали сложный эфир метакриловой кислоты (далее — поликатион), синтезированный в Институте высокомолекулярных соединений РАН. Его структурная формула показана на рис. 1. Молекулярная масса поликатиона $M_{\text{SD}} = 18 \cdot 10^6$ была определена методами седиментации и диффузии в лаборатории С.И. Кленына ИВС РАН. Полимер растворяли в бидистиллированной воде. Концентрацию определяли по навеске. Использовали растворы полимера в водном растворе ($C_{\text{poly}} = 5 \cdot 10^{-6}$ М) с добавлением ионов SO_4^{2-} ($C_{\text{Na}_2\text{SO}_4} = 5 \cdot 10^{-4}$ М) и без них.

Фиксацию полимеров осуществляли на пластины монокристалла кремния *p*- и *n*-типа с ориентацией (100). Концентрация свободных носителей в образцах *p*-типа составляла $p = 3 \cdot 10^{14}$ см⁻³, в образцах *n*-типа $n = 4 \cdot 10^{14}$ см⁻³, размеры образцов 0,3×5×10 мм. Все образцы кремния предварительно протравливали в смеси HF и H₂O в соотношении 1:10 в течение 2 мин при комнатной температуре. Для образования естественного оксида протравленные образцы выдерживали на воздухе около 1,5 ч. Для создания искусственного оксида протравленные образцы помещали в раствор "пираньи" (смесь H₂O₂ и H₂SO₄ в соотношении 1:1) на 20 с при температуре 50 °С, после чего промывали дистиллированной водой. Для фиксации макромолекул на поверхность наносили каплю раствора объемом ~10 мкл. В зависимости от условий эксперимента образец выдерживали 10 мин в темноте или на свету, после чего промывали дистиллированной водой. При фиксации полиионов для освещения образцов использовали светодиод с $\lambda = 630$ и 890 нм. Светодиоды располагались на расстоянии 5 мм над поверхностью капли раствора.

Анализ образцов и контроль фиксации проводили с помощью атомного силового микроскопа NanoScope IVa (Veeco) в режимах прямого сканирования и прерывистого контакта.

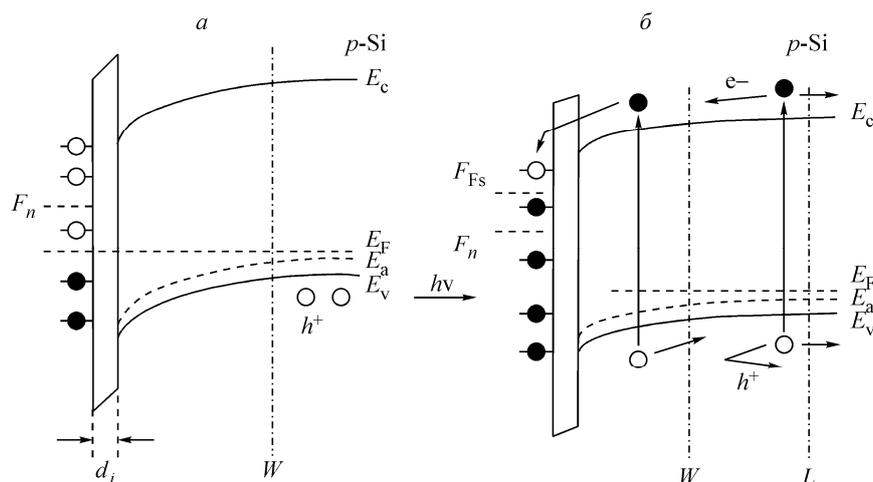


Рис. 2. Зонные диаграммы приповерхностной области кремния *p*-типа проводимости в темноте (*a*) и при освещении светом в собственной области спектра (*б*) при $h\nu > (E_c - E_v)$.

E_c — дно зоны проводимости, E_v — потолок валентной зоны, E_a — положение уровня мелкой акцепторной примеси, E_F — положение уровня Ферми в нейтральной области полупроводника, F_n — уровень нейтральности поверхностных состояний, E_{Fs} — положение квазиуровня Ферми на поверхности при освещении, W — толщина области пространственного заряда, d_i — толщина окисного слоя, L — диффузионная длина неравновесных электронов

ОБОСНОВАНИЕ МЕТОДИКИ ЭКСПЕРИМЕНТА

Фиксация полиионов из раствора на поверхность твердого тела в значительной степени определяется электростатическими взаимодействиями. Полупроводниковые материалы вследствие высокой проводимости имеют очень малые времена релаксации поверхностных зарядов, что в равновесных условиях снижает вероятность фиксации полиионов. Однако заряд поверхности полупроводника может быть изменен при генерации неравновесных носителей в объеме во время освещения образца светом из собственной области поглощения. Иллюстрация процесса перезарядки поверхностных состояний полупроводникового кристалла под действием света приведена на рис. 2. Предполагается, что образец покрыт тонким туннельно-прозрачным слоем естественного окисла толщиной d_i .

На рис. 2, *a* показана зонная диаграмма приповерхностной области кремния *p*-типа проводимости, соответствующая условиям термодинамического равновесия. Отмечены положения мелкой акцепторной примеси E_a и уровня Ферми E_F . Показан также уровень нейтральности поверхностных центров F_n , соответствующий нулевому суммарному заряду поверхностных состояний, если уровни, расположенные ниже F_n , заполнены, а выше — пусты. Нейтральность системы обуславливается равенством положительного заряда, захваченного на поверхностные состояния и состояния на границе раздела полупроводник—окисел (не показанные на рисунке), и отрицательного некомпенсированного заряда мелкой акцепторной примеси в обедненной области W . Толщина W может быть определена из решения уравнения Пуассона. В общем случае заряд адсорбированных на поверхности окисного слоя ионов также влияет на величину изгиба зон в приповерхностной области.

Освещение образца светом с энергией квантов больше ширины запрещенной зоны приводит к генерации неравновесных электронов и дырок в объеме полупроводника. Зонная диаграмма для неравновесного случая показана на рис. 2, *б*. Дырки отталкиваются электрическим полем от поверхности и не участвуют в перезарядке поверхностных состояний. Электроны затягиваются к поверхности и захватываются на поверхностные уровни, создавая избыточный отрицательный заряд. Для эффективной генерации неравновесных носителей длина волны источника излучения должна соответствовать глубине поглощения света в образце в пределах диффузионной длины неосновных носителей заряда L . При использовании подложки с *n*-типом проводимости избыточный заряд поверхности будет положительным.

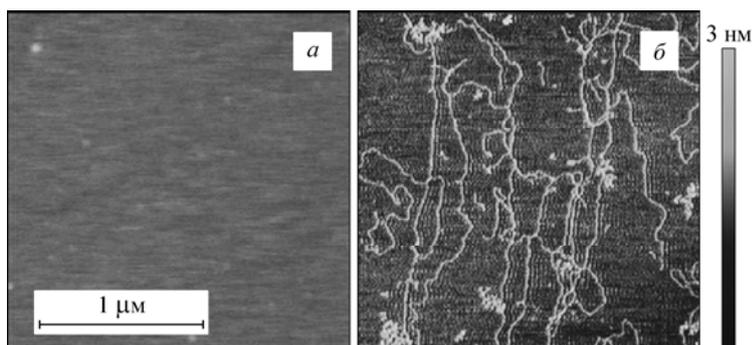


Рис. 3. АСМ изображения поверхности слюды без ДНК (*а*) и после стандартной процедуры фиксации ДНК с MgCl_2 (*б*)

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

На рис. 3, *б* представлены результаты стандартной фиксации ДНК из раствора на отрицательно заряженную поверхность слюды с добавлением ионов магния. Видно, что поверхность слюды без ДНК (см. рис. 3, *а*) после промывки водой не содержит заметных дефектов.

Как указывалось выше, зарядовыми свойствами поверхности кремния можно управлять с помощью света. В случае образцов *p*-типа при освещении поверхность приобретает избыточный отрицательный заряд. Можно полагать, что при этом для фиксации ДНК применима стандартная процедура ее высаживания на слюду. На рис. 4, *а* представлено изображение необработанной поверхности монокристалла кремния *p*-типа. Видно, что используемая в экспериментах поверхность кремния не имеет заметных дефектов. В процессе приготовления образцов для фиксации ДНК использовали поверхность, покрытую слоем естественного или искусственного окисла, подготовленную согласно описанным выше процедурам. АСМ изображения таких образцов свидетельствуют, что поверхность после обработки также существенных дефектов не имеет (см. рис. 4, *б*, *в*).

На рис. 5 показаны АСМ изображения образцов, приготовленных на свету. Видно, что на поверхности кремния с искусственным окислом ДНК не закрепляется как при добавлении ионов магния (*в*), так и без них (*а*). Не наблюдается фиксации ДНК и при использовании образца кремния с естественным окислом, если раствор не содержит ионов магния (*б*), однако добавление MgCl_2 в раствор ДНК приводит к ее надежной фиксации на поверхности кремния *p*-типа при освещении (*г*). Неоднократно проведенные эксперименты показывают, что ДНК может быть зафиксирована на поверхности кремния *p*-типа при следующих условиях: необходимо освещение образца с достаточно тонким (туннельно-прозрачным) слоем окисла и присутствие положительных ионов магния в растворе. Таким образом, естественно полагать, что поверхность кремния *p*-типа при освещении капли раствора в процессе фиксации действительно имеет отрицательный заряд, достаточный для фиксации ДНК. Механизм фиксации макромолекулы на поверхности кремния при этом можно считать аналогичным высаживанию ДНК на поверх-

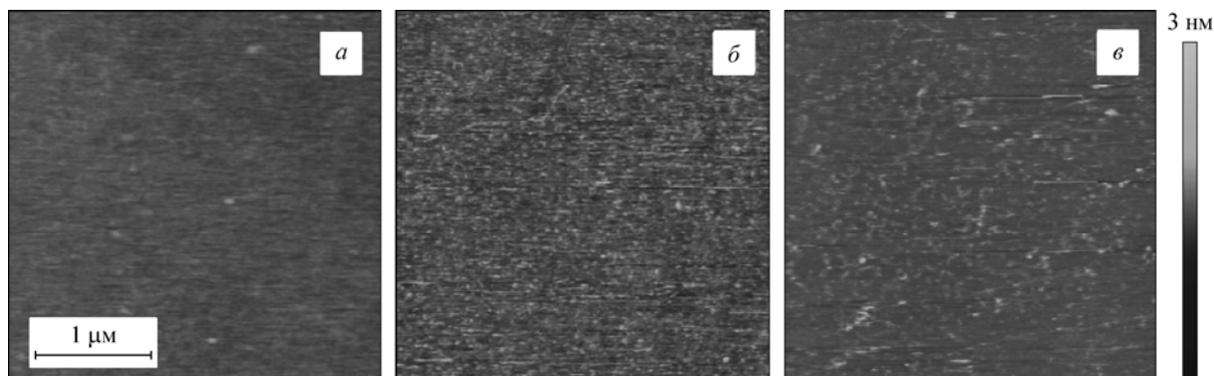
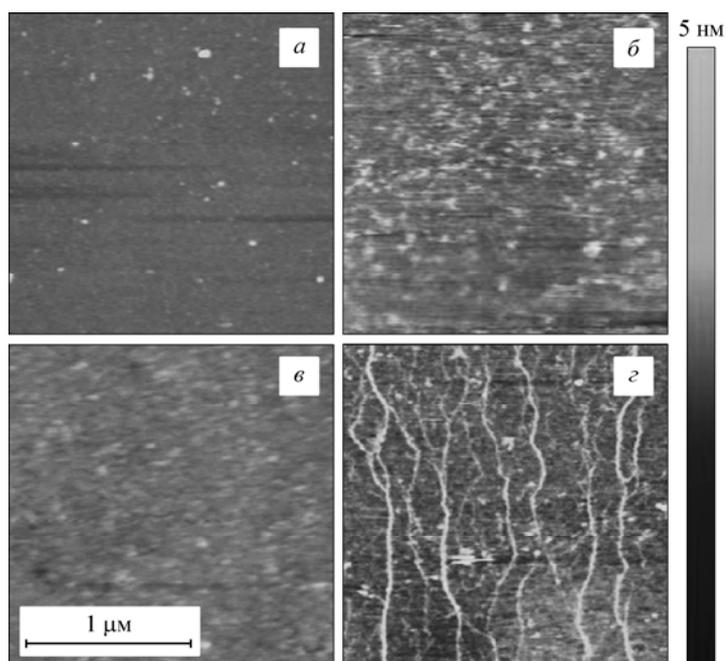


Рис. 4. Поверхность кремния *p*-типа до обработки (*а*), после травления (*б*) и с искусственным окислом (*в*)

Рис. 5. АСМ изображения поверхности кремния *p*-типа. На образцы с искусственным (*a*, *в*) и естественным (*б*, *г*) окислом наносили раствор ДНК, содержащий (*в*, *г*) и не содержащий (*a*, *б*) $MgCl_2$. В процессе приготовления капли раствора ДНК на образце освещали светом



ность свежесколотой слюды. Двухвалентные ионы магния в рассматриваемом случае играют роль мостиков, связывающих отрицательно заряженную ДНК с одноименно заряженной поверхностью. По-видимому, одноименные заряды ДНК и поверхности в этом случае приводят к некоторому "выпрямлению" нитей на подложке.

На рис. 6 представлен вертикальный профиль нитей ДНК, зафиксированных на поверхности кремния *p*-типа. Как следует из рисунка, толщина молекул равна ~ 2 нм, что соответствует одиночной нити на подложке.

Отсутствие фиксации молекул ДНК на поверхности кремния *p*-типа с более толстым слоем окисла (окисленной в "пиранье"), по-видимому, связано с уменьшением эффективности перезарядки поверхностных состояний неравновесными носителями из-за большей толщины окисного слоя и повышенной степени компенсации акцепторной примеси в приповерхностном слое кремния ионами водорода, ведущей к уменьшению величины электрического поля у границы раздела кремний—окисел.

Необходимо заметить, что зафиксированные на кремнии в неравновесных условиях молекулы ДНК оставались прикрепленными к поверхности после многократных внешних воздействий в ходе электрофизических измерений: помещения в вакуум 10^{-4} Торр, циклов нагрева и охлаждения от 300 до 80 К. Представленная на рис. 5, *г* картина сохранялась в течение 6 месяцев без заметных изменений.

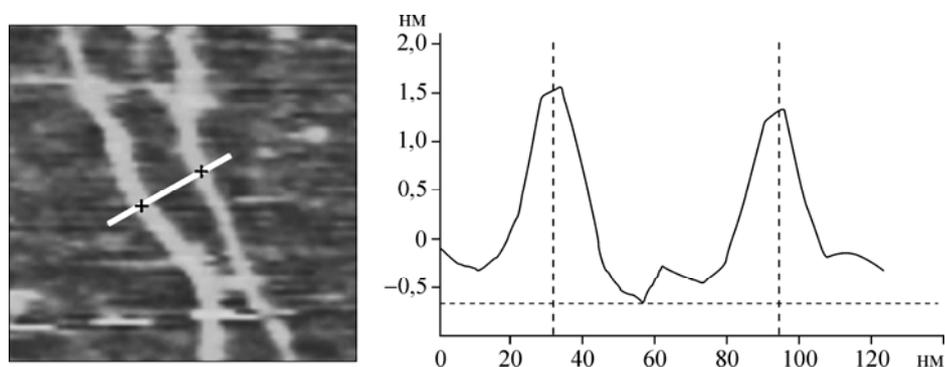


Рис. 6. АСМ изображение ДНК на поверхности кремния *p*-типа и его анализ

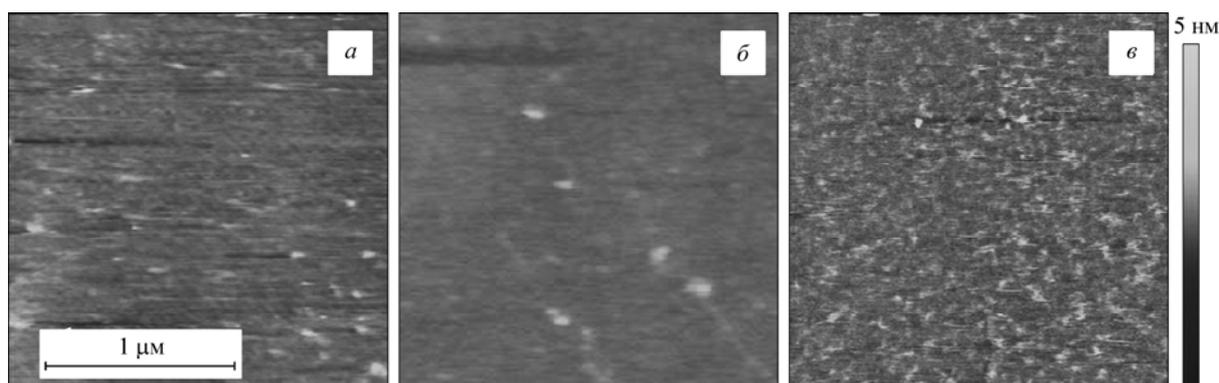


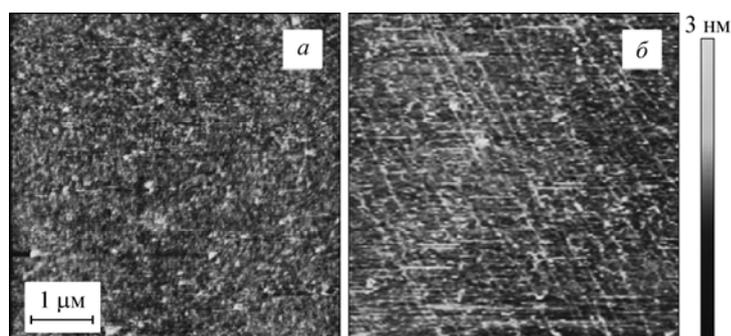
Рис. 7. АСМ изображения поверхности кремния *p*-типа. На образцы с искусственным (*б*) и естественным (*а*, *в*) окислом наносили раствор ДНК, содержащий (*б*, *в*) и не содержащий (*а*) MgCl_2 . Образцы готовили в темноте

На рис. 7 показаны АСМ изображения образцов кремния *p*-типа, для которых процесс осаждения ДНК осуществлялся в темноте. Полученные результаты свидетельствуют о том, что в этом случае, как и ожидалось, мы не наблюдаем фиксации ДНК ни на поверхности кремния с естественным окислом (*а*, *в*), ни на окисленной поверхности (*б*). Наличие или отсутствие MgCl_2 также не играет роли. Этот эксперимент показывает, что освещение образца в процессе фиксации ДНК играет ключевую роль при использовании кремния *p*-типа.

На основании рассуждений, приведенных выше, можно полагать, что условия высаживания ДНК на кристалл кремния *n*-типа будут иными. В этом случае можно ожидать, что освещение будет индуцировать избыточный положительный заряд на поверхности. Присутствие противоионов натрия в растворе экранирует заряд ДНК и препятствует ее электростатическому притяжению к положительно заряженной поверхности. Действительно, при использовании кремния *n*-типа мы не наблюдаем фиксации ДНК при освещении, тогда как после процесса фиксации в темноте в присутствии ионов магния мы видим закрепленную на поверхности *n*-кремния ДНК (рис. 8). Вместе с тем, даже незначительное попадание света на образец нивелирует этот результат. Как и в случае кремния *p*-типа, толстый окисный слой не позволяет зафиксировать макромолекулы.

Интересно сравнить рассмотренные данные с результатом фиксации на аналогичных поверхностях противоположно заряженного полимера. Как и ожидалось, в случае использования кремния *n*-типа для фиксации поликатиона на свету, когда поверхность и полимер одноименно заряжены, добавление двухвалентных противоионов SO_4^{2-} обеспечивает фиксацию макромолекул (рис. 9, *б*). В этом эксперименте мы использовали также и другой источник света — ИК светодиод. Его интенсивность больше, что обеспечивает лучшую перезарядку поверхности и фиксацию, при которой полимерные клубки хорошо расправляются, четко различимы отдельные нити (см. рис. 9, *в*).

На рис. 9, *а* показаны АСМ изображения образца, приготовленного на поверхности крем-



ния *n*-типа в темноте (в растворе поликатиона также присутствуют двухвалентные ионы). Мы наблюдаем фиксацию молекул полимера на подложке, однако при этом образуются

Рис. 8. АСМ изображения поверхности кремния *n*-типа после нанесения раствора ДНК, содержащего MgCl_2 . Образцы готовили при освещении (*а*) и в темноте (*б*)

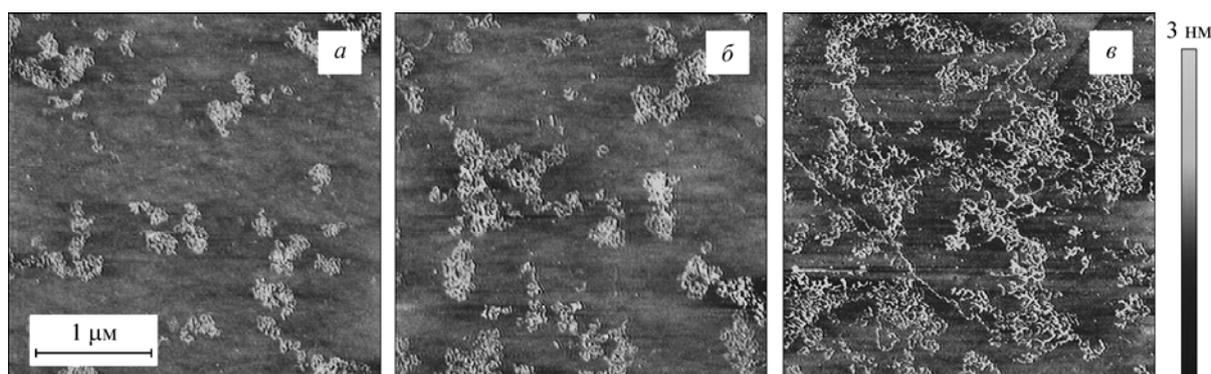


Рис. 9. АСМ изображения поверхности кремния *n*-типа после нанесения раствора поликатиона, содержащего Na_2SO_4 . Образцы готовили в темноте (*a*), при освещении светом $\lambda = 630$ нм (*б*) и более интенсивным источником света $\lambda = 890$ нм (*в*)

достаточно компактные структуры: отдельные нити полимера не различимы. Размеры структур на поверхности несколько меньше невозмущенных размеров молекулярных клубков в растворе, что может быть связано с использованием двухвалентных противоионов.

На основании полученных результатов можно заключить, что конформация данного заряженного полимера на поверхности после фиксации зависит от способа приготовления образцов. Мы видим, что на отрицательно заряженной поверхности кремния *n*-типа без освещения поликатион образует компактные клубки, сжатые за счет контрионов SO_4^{2-} . Модель их фиксации схематически показана на рис. 10, *б*. Однако картина, наблюдаемая на поверхности кристалла *n*-типа, который подвергался освещению более интенсивным ИК светодиодом, существенно иная: полимерный кубок разворачивается и расправляется на одноименно заряженной поверхности, а двухвалентные контрионы являются мостиками, связывающими полимер и подложку. В этом случае способ фиксации поликатиона можно считать аналогичным способу фиксации ДНК на отрицательно заряженной поверхности кремния или слюды с точностью до изменения знаков заряда полимера, подложки и контрионов на противоположные (см. рис. 10, *а*).

Как видно, двухвалентные контрионы играют значимую роль в процессе нековалентной фиксации полиионов на заряженную поверхность. На рис. 11, *а* показаны АСМ изображения

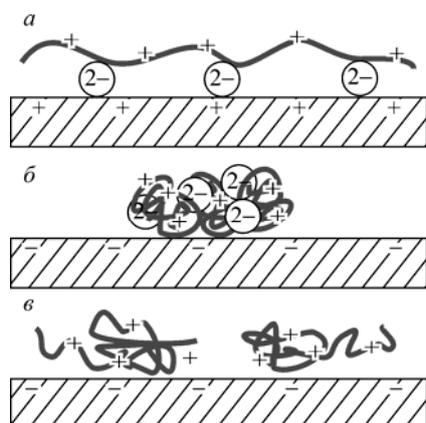


Рис. 10. Модели фиксации полиионов на заряженную поверхность. Одноименно (*а*) и разноименно (*б*) заряженные полимер и подложка с противоионами, разноименно заряженные полимер и подложка без противоионов (*в*)

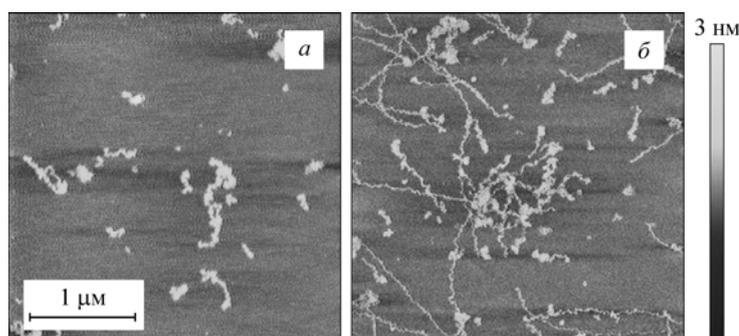


Рис. 11. АСМ изображения поликатионов на поверхности слюды с добавлением Na_2SO_4 в раствор (*а*) и без него (*б*)

поликатиона на поверхности слюды (в растворе присутствовали ионы SO_4^{2-}). Мы видим достаточно компактные структуры. При фиксации на слюде из раствора той же концентрации без двухвалентных контрионов поликатион не компактизуется или компактизуется меньше (см. рис. 11, б). Модель посадки полимера на подложку для этого случая схематически показана на рис. 10, в.

Таким образом, в настоящей работе показана возможность управления фиксацией молекул заряженных полимеров на поверхности монокристаллов кремния с помощью освещения образцов. Сформулированы условия для нековалентной фиксации ДНК и синтетического полимера на поверхности монокристалла кремния *p*- и *n*-типа. Фиксация ДНК на поверхность кремния *p*-типа реализуется из раствора, содержащего ионы магния, при освещении образца светом в собственной области спектра поглощения подложки. При этом слой окисла на поверхности кремния должен быть достаточно тонким (необходимо использовать кремний с естественным слоем окисла). Фиксация положительного полимера на поверхность кремния *n*-типа реализуется из раствора, содержащего ионы SO_4^{2-} , при освещении образца. Показано, что как зарядовые свойства полимера, так и зарядовые свойства поверхности определяют конформацию макромолекул на подложке после фиксации.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Seeman N.C. // *Curr. Opin. Struct. Biol.* – 1996. – **6**, N 4. – P. 519 – 526.
2. Goodman R.P., Schaap I.A.T., Tardin C.F. et al. // *Science.* – 2005. – **310**, N 5754. – P. 1661 – 1665.
3. Ben-Jacob E., Hermon Z., Caspi S. // *Phys. Lett. A.* – 1999. – **263**, N 3. – P. 199 – 202.
4. Ongaro A., Griffin F., Nagle L. et al. // *Adv. Mater.* – 2004. – **16**, N 20. – P. 1799 – 1803.
5. Mountford C.P., Buck A.H., Campbell C.J. et al. // *J. Phys. Chem. B.* – 2008. – **112(8)**. – P. 2439 – 2444.
6. Kanatani K., Ochi Y., Okamoto A., Saito L. // *Nucl. Acids Res.* – 2003. – N 3. – P. 161 – 162.
7. Park S-H., Barish R., Li H. et al. // *Nano Lett.* – 2005. – **5**, N 4. – P. 693 – 696.
8. Hainfeld J.F., Furuya F.R., Powell R.D., Liu W. // *Microscopy and Microanalysis.* – 2001. – **7**. – P. 1034 – 1035.
9. Ballou B., Lagerholm B.C., Ernst L.A. et al. // *Bioconjug. Chem.* – 2004. – **15(1)**. – P. 79 – 86.
10. Burke N.A.D., Stover H.D.H., Dawson F.P. et al. // *Magnetics, IEEE Transactions.* – 2001. – **37**, N 4. – P. 2660 – 2662.
11. de Abreu F.C., de Paula F.S., Ferreira D.C.M. et al. // *Sensors.* – 2008. – **8**. – P. 1519 – 1538.
12. Song W., Sun T., Song Y. et al. // *Talanta.* – 2005. – **67**. – P. 543 – 547.
13. Tully D.C., Trimble A.R., Frechet J.M.J. et al. // *Chem. Mater.* – 1999. – **11**. – P. 2892.
14. Pike A.R., Patole S.N., Murray N.C. et al. // *Adv. Mater.* – 2003. – **15**, N 3. – P. 254 – 257.
15. Schena M., Shalon D., Davis R.W., Brown P.O. // *Science.* – 1995. – **270**. – P. 467 – 470.
16. Lobert P.E., Bourgeois D., Pampin R. et al. // *Sensors and Actuators.* – 2003. – **B92**. – P. 90 – 97.
17. Kasumov A.Yu., Klinov D.V., Roche P.-E. et al. // *Appl. Phys. Lett.* – 2004. – **84**, N 6. – P. 1007 – 1009.
18. Heim T., Deresmes D., Vuillaume D. // *J. Appl. Phys.* – 2004. – **96**, N 5. – P. 2927 – 2936.