

ПРИМЕНЕНИЕ РАДИОТЕХНИКИ И ЭЛЕКТРОНИКИ
В БИОЛОГИИ И МЕДИЦИНЕ

УДК 53.06;57.088;577.1

НАНЕСЕНИЕ И ВИЗУАЛИЗАЦИЯ МОЛЕКУЛ ДНК НА ГРАФЕНЕ,
ПОЛУЧЕННОМ МЕХАНИЧЕСКИМ РАСЩЕПЛЕНИЕМ НА ПОДЛОЖКЕ
С ПОДСЛОЕМ ЭПОКСИДНОГО КЛЕЯ

© 2018 г. А. В. Фролов^{1,2}, Н. А. Баринов³, Д. В. Клинов³, В. В. Коледов¹,
П. В. Лега¹, А. П. Орлов^{1,4}, А. М. Смолович¹ *

¹Институт радиотехники и электроники им. В.А. Котельникова РАН,
Российская Федерация, 125009, Москва, ул. Моховая 11, корп. 7

²Московский физико-технический институт (государственный университет),
Российская Федерация, 141700, Долгопрудный, Московской обл., Институтский пер., 9

³Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины,
Российская Федерация, 119435, Москва, Малая Пироговская, 1а

⁴Институт нанотехнологий микроэлектроники РАН,
Российская Федерация, 115487, Москва, ул. Нагатинская, 16А/11

*E-mail: asmolovich@petersmol.ru

Поступила в редакцию 28.11.2017 г.

Показана возможность контролируемого нанесения ДНК на пленки графена, получаемые механическим расщеплением графита на подложке с подслоем эпоксидного клея. Молекулы ДНК визуализированы с помощью атомно-силового микроскопа.

DOI: 10.1134/S0033849418100108

ВВЕДЕНИЕ

В последнее время наблюдается большой интерес к гибридным структурам ДНК-графен [1–5]. Это связано с возможностью использования подобных структур в качестве биосенсоров, в частности, для медицинской диагностики. Также графен может использоваться как носитель для хранения ДНК, проведения гибридации, адресной сборки и взаимодействия комплементарных цепей [6]. Представляет интерес структурирование графена нанесением на его поверхность металлизированной ДНК, которая по существу является молекулярной проволокой [7, 8]. При нанесении может измениться проводимость как графена, так и самих молекул ДНК. Технология нанесения молекул ДНК на графен или на тонкие слои графита довольно сложна и зависит от способа получения графена.

Недавно авторами [9, 10] предложен метод получения графена путем механического расщепления графита с использованием эпоксидного клея. С одной стороны, метод является простым и нетрудоемким по сравнению с распространенными сейчас методами роста пленок графена [11] или, например, методом, основанным на применении плазмохимического травления [12, 13]. С другой стороны, данный метод позволяет увеличить площадь получаемых пленок, по сравнению с други-

ми методами механического расщепления, в частности, с классическим методом, разработанным Геймом и Новоселовым [14]. Однако основное преимущество данного метода — надежное получение свежесколотой поверхности графена практически идеального качества. С помощью данного метода были получены пленки однослойного графена площадью до 200×200 мкм², а также атомно тонкого графита площадью до 1000×1000 мкм². Квантовые эффекты, обнаруженные на структурах, изготовленных из таких пленок, указывают на высокое качество как этих пленок, так и исходного кристалла [15–19]. Можно предположить, что двумерные кристаллы графена, созданные путем механического расщепления графита с использованием эпоксидного клея вполне могут быть использованы в качестве чувствительного элемента биосенсора. Цель данной работы — разработать технологию нанесения молекул ДНК на образцы графена, полученные новым методом.

1. МЕТОДИКА ЭКСПЕРИМЕНТА

Предложенный авторами метод получения графена [9, 10] заключается в утончении объемных кристаллов графита с помощью адгезионной ленты и является модификацией метода [14]. В

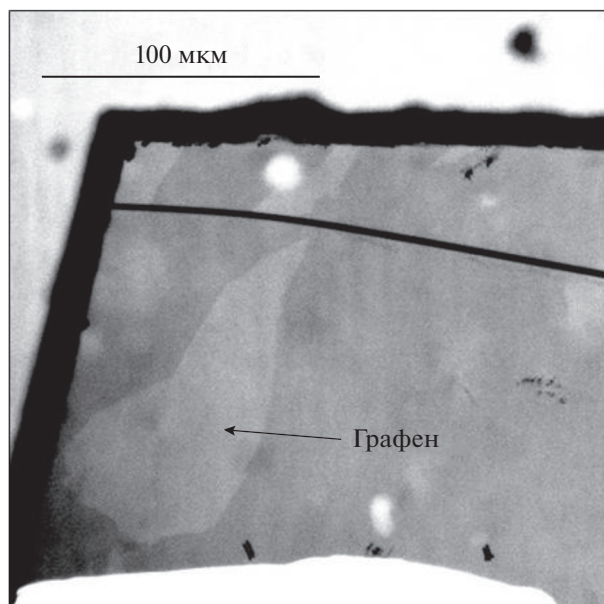


Рис. 1. Изображение чешуек графена в оптическом микроскопе, в режиме “на отражение”.

качестве исходных кристаллов были выбраны чешуйки природного графита, так как данный материал содержит монокристаллы большого размера, образует атомарно гладкую поверхность при расслоении и, как было продемонстрировано в ряде работ [20, 21], по качеству превосходит высокоориентированный пиролитический графит (ВОПГ), использованный для отщепления графена в [14]. Для получения на поверхности зеркально гладких областей площадью до 1 мм^2 без складок и микронеровностей, верхние слои кристалла удаляли при помощи адгезионной ленты. Затем кристалл графита приклеивали поверхностью к подложке эпоксидным клеем и утончали с помощью адгезионной ленты до нанометровых толщин. В результате получают атомно тонкие слоистые монокристаллы графита, в том числе однослойный графен, прикрепленные к подложке с помощью клея (рис. 1). Количество графеновых слоев определяли двумя способами. В первом измеряли оптическое пропускание образца в видимом диапазоне, при этом использовали известный факт, что каждому слою графена соответствует $\sim 2.3\%$ поглощения [22]. Для этих измерений образец должен был находиться на прозрачной подложке, например, на стекле. Во втором способе количество графеновых слоев определяли с помощью комбинационного рассеяния света [23].

Для нанесения молекул ДНК на графен использовалась методика, аналогичная использованной в [24–27] для нанесения молекул ДНК на графит. На поверхность графена наносили

100 мкл 0.1% раствора-модификатора графита GM, $(\text{CH}_2)_n(\text{NCH}_2\text{CO})_m-\text{NH}_2$ (фирмы “Нанотюннинг”, Черноголовка, Россия), экспонировали в течение 1 мин, затем GM удаляли в струе сжатого азота и подложку высушивали. Молекулы дуплексной ДНК из бактериофага лямбда (*Escherichia virus Lambda*) в концентрации 1 мкг/мл наносили из раствора 10 ммоль/л Tris-HCl (pH 7.6), 1 ммоль/л EDTA, на поверхность модификатора на 1 мин, затем каплю с растворенной ДНК удаляли струей сжатого азота.

Монослой модификатора представляет собой эпитаксиально кристаллизованные межмолекулярными водородными связями ламеллярные структуры на поверхности графена. Нанесение модификатора необходимо для прикрепления молекул ДНК к поверхности в развернутом виде, так как ДНК слабо взаимодействует с чистым графеном, перекручивается, свертывается и сдвигается при прохождении мениска капли. Если каплю не сдвигать, а высушивать, то примеси, находящиеся в растворе в массовых долях, больших 10^{-6} , выпадут на поверхность шероховатым слоем, сравнимым с толщиной ДНК $\sim 1 \text{ нм}$, что затруднит идентификацию ДНК методом атомно-силовой микроскопии (АСМ).

Контроль процесса нанесения ДНК осуществлялся с помощью АСМ. Рельеф образцов измеряли в полуконтактном резонансном режиме на исследователем комплексе “Интегра Прима” производства NT-MDT с помощью программы управления NOVA 1.1. Применили сверхострые кремниевые кантилеверы высокого разрешения (производство “Нанотюннинг”). Резонансная частота кантилеверов лежит в диапазоне 190...325 кГц, радиус кривизны острия $< 2 \text{ нм}$, а угол при его вершине $< 22^\circ$. Амплитуда свободных колебаний кантилевера в воздухе находилась в пределах 1...10 нм, автоматически поддерживаемую амплитуду колебаний кантилевера в подведенном к поверхности состоянии (параметр SetPoint) устанавливали на уровне 60...70% от амплитуды свободных колебаний кантилевера в воздухе.

Обработку сигнала, перевод его в цифровой вид и формирование изображений проводили с помощью программного обеспечения “NOVA 1.1” (NT-MDT). Результаты измерений представлены в виде двумерных изображений, на которых светлые участки поверхности соответствуют возвышениям рельефа, а темные – углублениям (рис. 2 и 3). Обработку полученных данных проводили с помощью модуля обработки изображений NOVA Image Analysis 2.0.

2. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Изображения молекул ДНК на поверхности графена, полученные с помощью АСМ, показаны

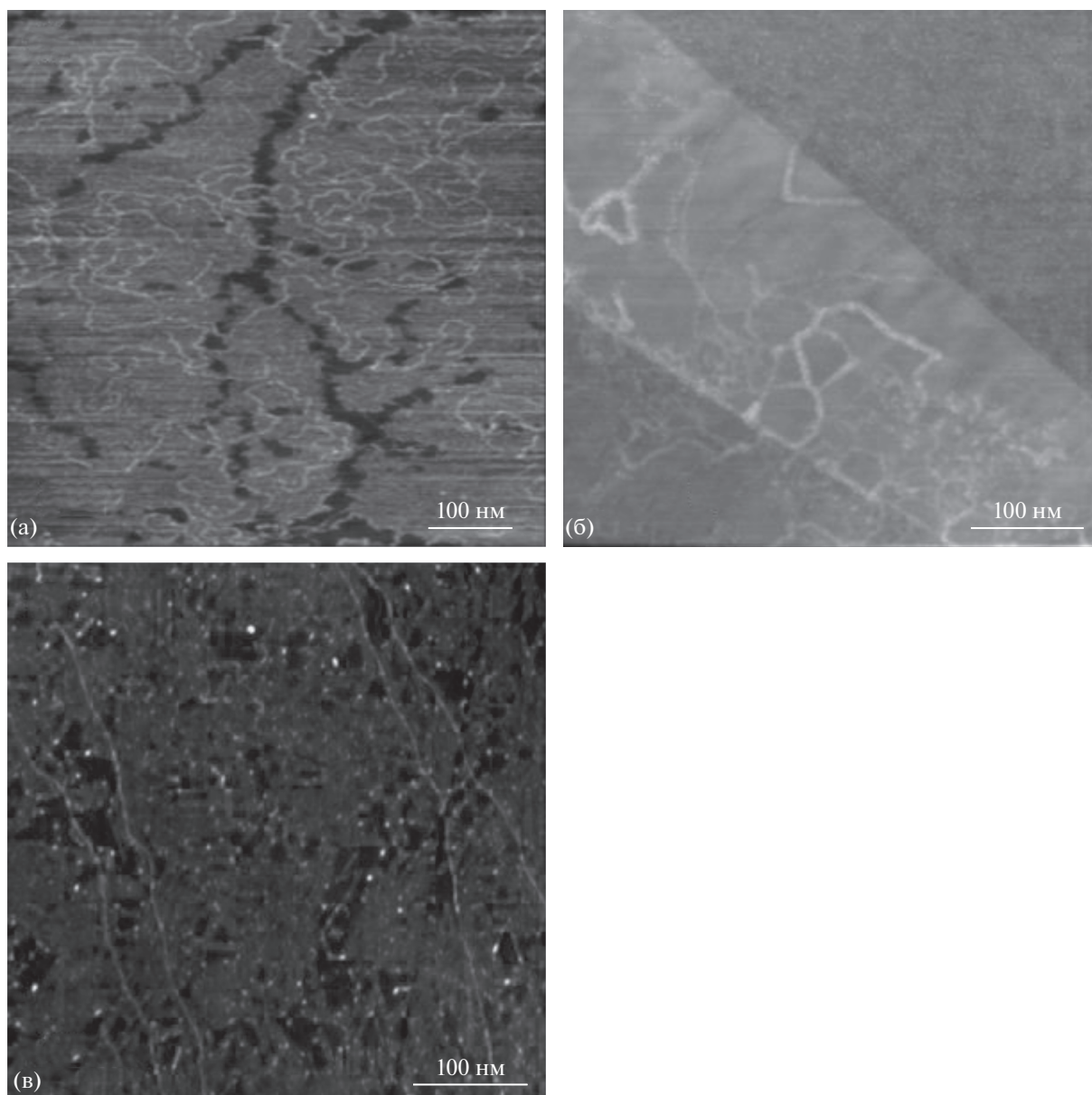


Рис. 2. Изображение молекул ДНК, полученное с помощью АСМ: (а) на поверхности графена со слоем модификатора; (б) на интерфейсе графен–биграфен–подложка (последовательность указана стрелкой) со слоем модификатора; (в) изображение молекул ДНК, нанесенных на образцы графена со слоем модификатора, хранившихся несколько месяцев под форвакуумом.

на рис. 2. Как видно, описанная выше методика позволяет получать довольно равномерное распределение ДНК по поверхности графена. Молекула ДНК образует прочные связи с модифицированным графеном, что позволяет ей покрывать даже небольшие области, в которых модификатор отсутствует (измеряя профиль высоты таких областей (на рис. 2а области темного цвета), была оценена толщина слоя модификатора, ≈ 0.7 нм). Также молекулы ДНК успешно наносятся на интерфейсы с разным количеством слоев типа графен-биграфен (рис. 2б). На поверхности эпоксид-

ного клея, не покрытой графитом или графеном, молекул ДНК обнаружено не было (см. рис. 2б, область в правом верхнем углу).

Как показала практика, очень важно наносить модификатор на графен непосредственно после расщепления: длительный контакт поверхности графена с воздухом приводит к ее загрязнению, в результате по прошествии небольшого времени модификатор на нее практически не садится. В то же время поверхность графита с нанесенным на нее модификатором более устойчива к воздействию воздуха — имелся опыт успешного нанесе-

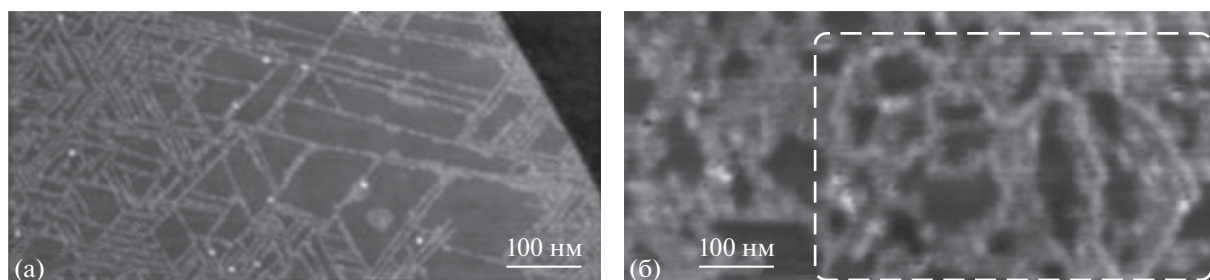


Рис. 3. Изображение участков графена, сформированных на подложке из Si/SiO₂ методом Гейма и Новоселова [11], полученное с помощью АСМ: а) после нанесения слоя модификатора, осажденного в виде не прилегающих друг к другу ламелей, что свидетельствует о загрязненности поверхности графена; б) изображение одиночных молекул ДНК (выделено рамкой).

ния ДНК на образец графена, хранившийся после нанесения модификатора под форвакуумом в течение трех месяцев (рис. 2в). Здесь из-за слабого сцепления с модификатором молекулы ДНК вытянуты в направлении сдувания капли. Чтобы добиться лучшего сцепления ДНК с модификатором, капля с растворенной ДНК удерживалась на образце в течение большего времени (2...3 мин). Однако, как побочный результат, вместе с ДНК на поверхность высаживались примеси (видны на поверхности графена как шарики диаметром несколько нанометров, см. рис. 2в).

Для сравнения эффективности нового метода и традиционного, были осуществлены попытки нанести модификатор и молекулы ДНК на графен, полученный классическим методом [14] на подложке высоколегированного кремния с 300-нанометровым слоем SiO₂. Уже на стадии нанесения модификатора возникли проблемы: модификатор плохо покрывает поверхность графена, осаждаясь в виде не прилегающих друг к другу ламелл, ориентированных вдоль кристаллических направлений в графене (рис. 3а). Предположительно, это происходит из-за того, что на подложке есть разводы клея от адгезионной ленты. Замечена закономерность — чем дальше чешуйка располагается от разводов клея, тем больше вероятность, что модификатор хорошо лег и на нем есть ДНК. На таких удаленных от клея участках были обнаружены одиночные молекулы ДНК, осевшие на графен (рис. 3б). Растворение клея от адгезионной ленты не привело к значительному улучшению результатов — на поверхности графена все равно остался тонкий слой загрязнений, который приводил к проблемам при нанесении модификатора.

Также были осуществлены попытки измерить транспортные характеристики графена до и после нанесения ДНК. После нанесения ДНК проводимость графена действительно изменялась, но, по нашим предположениям, главным образом это было связано с изменением положения уровня Ферми относительно точки Дирака [28]. Проблема была в том, что поверхность графена очень

чувствительна к взаимодействию с окружающей средой, и поэтому положение уровня Ферми могло сместиться в результате не только нанесения ДНК, но и взаимодействия поверхности графена с воздухом и осажденными примесями (см. рис. 2в).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, в работе продемонстрирована лабораторная технология нанесения молекул ДНК на графен, полученный механическим расщеплением природного графита с использованием эпоксидного клея. Технология включала предварительное нанесение слоя модификатора на свежеприготовленный графен. Молекулы ДНК наносили поверх модификатора. Контроль всех этапов проводили с помощью АСМ. Сравнение показало, что нанесение молекул ДНК на образцы графена с использованием данной технологии имеет преимущества по качеству и технологичности по сравнению с другими способами. Результаты работы могут найти применение при создании новых типов нанoeлектронных сенсоров биомедицинского назначения.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 17-19-01748).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Lin C.-T., Loan P.T.K., Chen T.-Y. et al. // Adv. Funct. Mater.* 2013. V. 23. P. 2301.
2. *Banerjee S., Wilson J., Shim J. et al. // Adv. Funct. Mater.* 2015. V. 25. № 6. P. 936.
3. *Brown E.R., Zhang W.D., Viveros L. et al. // Sensing and Bio-Sensing Research.* 2015. V. 5. P. 19.
4. *Akca S., Foroughi A., Frochtzwaig D. et al. // PLoS One.* 2011. V. 6. № 4. P. e18442.
5. *Iramnaaz I., Xing Y., Xue K. et al. // Electronic Components and Technology Conf.* 2011. N.Y.: IEEE, 2011. P. 1030.
6. *Rasheed P.A., Sandhyarani N. // Biosens Bioelectron.* 2017. V. 97. P. 226.

7. *Eidelshtein G., Fardian-Melamed N., Gutkin V. et al.* // Adv. Mater. 2016. V. 28. № 24. P. 4839.
8. *Jin Z., Sun W., Ke Y. et al.* // Nat. Commun. 2013. V. 4. P. 1663.
9. *Фролов А.В., Латышев Ю.И., Смолович А.М., Орлов А.П.* // Нелинейный мир. 2013. Т. 2. С. 138.
10. *Латышев Ю.И., Быков В.А., Фролов А.В., Орлов А.П.* // Пат. на изобретение РФ № 2494037. Б.И. 2013. № 27.
11. *Li F., Wang D., Du H. et al.* // RSC Advances. 2017. V. 7. № 26. P. 15644.
12. *Латышев Ю.И., Орлов А.П., Песков В.В. и др.* // ДАН. 2012. Т. 442. № 2. С. 1.
13. *Быков В.А., Латышев Ю.И., Латышев А.Ю. и др.* // Патент на изобретение РФ № 2413330. Б.И. 2011. № 6.
14. *Novoselov K.S., Geim A.K., Morozov S.V. et al.* // Science. 2004. V. 306. P. 666.
15. *Латышев Ю.И., Латышев А.Ю., Орлов А.П. и др.* // Письма в ЖЭТФ. 2009. Т. 90. № 6. С. 526.
16. *Латышев Ю.И., Орлов А.П.* // Письма в ЖЭТФ. 2011. Т. 94. № 6. С. 517.
17. *Latyshev Yu.I., Orlov A.P., Volkov V.A. et al.* // Sci. Reports. 2014. V. 4. P. 7578.
18. *Latyshev Y., Smolovich A., Orlov A. et al.* // Nanoscience and Nanoengineering. 2015. V. 3. № 2. P. 13.
19. *Latyshev Yu.I., Orlov A.P., Shustin E.G. et al.* // J. Phys.: Conf. Ser. 2010. V. 248. № 1. P. 012001.
20. *Faugeras C., Amado M., Kossacki P. et al.* // Phys. Rev. Lett. 2011. V. 107. № 3. P. 036807.
21. *Kuhne M., Faugeras C., Kossacki P. et al.* // Phys. Rev. B. 2012. V. 85. P. 195406.
22. *Nair R.R., Blake P., Grigorenko A.N. et al.* // Science. 2008. V. 320 (5881). P. 1308
23. *Ferrari A.C., Meyer J.C., Scardaci V. et al.* // Phys. Rev. Lett. 2006. V. 97. № 18. P. 187401.
24. *Клинов Д.В., Мартынкина Л.П., Юрченко В.Ю.* // Биоорг. химия. 2003. Т. 29. № 4. С. 397.
25. *Klinov D., Dwir B., Kapon E. et al.* // AIP Conf. Proc. 2007. V. 859. № 1. P. 99.
26. *Adamcik J., Klinov D.V., Witz G. et al.* // FEBS Lett. 2006. V. 580. № 24. P. 5671.
27. *Rechendorff K., Witz G., Adamcik J. et al.* // J. Chem. Phys. 2009. V. 131. № 9. P. 09B604.
28. *Novoselov K.S., Geim A.K., Morozov S.V. et al.* // Nature. 2005. V. 438. № 7065. P. 197.