

**В. Л. Карбівський, В. Х. Касіяненко, Н. А. Курган, В. В. Вишняк,
Н. О. Зуєва, академік НАН України А. П. Шпак**

Поведінка вірусу тютюнової мозаїки на поверхнях золота та оксиду силіцію

Методами зондової мікроскопії та рентгенівської фотоелектронної спектроскопії досліджено поведінку вірусу тютюнової мозаїки (ВТМ) на поверхнях золота та оксиду силіцію. Виявлено механізми взаємодії віріонів ВТМ з поверхнею підкладок різної хімічної природи. Описано основні закономірності формування хімічних зв'язків ВТМ з поверхнею. Встановлено, що внаслідок нанесення ВТМ відбувається хімічна модифікація поверхні, яка зберігається після видалення вірусу. Спостерігаються нанорозмірні заглиблення продовгуватої форми, які відповідають формі віріонів. Взаємодія віріонів з підкладкою відбувається переважно за рахунок зв'язків Si–O–C. Зміна хімічних властивостей підкладки переважно визначається утворенням C–C зв'язків на поверхні. Взаємодію віріонів з підкладкою характеризує C–N зв'язок, подвійний зв'язок C=N наявний лише у складі віріона.

Розвиток нанотехнологій в області біосенсорних систем зумовлює підвищений інтерес до досліджень поведінки різних вірусів на поверхнях твердих тіл та біологічних об'єктів. Отримана інформація має важливе значення для створення новітніх систем швидкої діагностики патогенних вірусів. Традиційні методи детекції вірусів застосовуються з використанням клітинних культур, серологічних методів та методів молекулярної біології. Однак істотним недоліком даних методів є значна тривалість детекції та складність інтерпретації. Тому розробка методів детекції, чутливих до цільових речовин і мікроорганізмів та легких у застосуванні, є необхідною для медичної діагностики, клінічних аналізів і, особливо, для використання у польових умовах. Саме тому створення нанобіосенсорів на основі органічних молекул є перспективним напрямком, завдяки швидкості їхньої роботи, простоті у використанні та можливості проведення неперервного моніторингу. Ключовим моментом у створенні нанобіосенсорів є підбір та діагностика оптичних та електричних властивостей іммобілізаційного носія. Наприклад, селективне зв'язування біомолекул з квантовими точками на основі CdSe супроводжується надзвичайно малими збудженнями поверхні напівпровідника. Подібні особливості забезпечують можливість створення нанобіосенсорів для паралельної та швидкої діагностики наявності декількох антигенів. Останнім часом досить популярним є використання поверхневого плазмонного резонансу для швидкої детекції біомолекул у розчині. В основі цієї методики — перетворення світла на поверхневу хвилю вільних електронів на поверхні плівки металу, нанесеної на оксид кремнію, яка є дуже чутливою до особливостей поверхні (наявність нерівностей або адсорбованих молекул), і за її змінами можна визначати особливості взаємодії досліджуваної речовини з поверхнею. Доволі часто також використовують поверхнево-модифікований мезопористий кремній для створення електронних систем детекції вірусів рослин.

У даній роботі досліджено поведінку вірусу тютюнової мозаїки (ВТМ) на поверхнях золота та оксиду силіцію методами зондової мікроскопії та рентгенівської фотоелектронної спектроскопії.

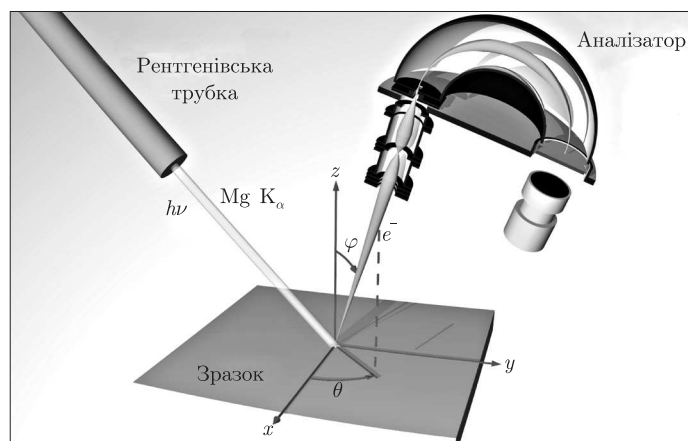


Рис. 1. Схема експерименту

Рентгенівські фотоелектронні спектри остових рівнів елементів були отримані на рентгенівському спектрометрі фірми “JEOL”. Робочий вакуум під час експерименту становив 10^{-7} Па. Використовувалося випромінювання магнієвого аноду з енергією лінії Mg K $_{\alpha}$ 1253,6 еВ. Енергетична роздільна здатність становила 0,1 еВ. Калібрування енергій зв’язку здійснювалось по Au 4f-лінії 87,5 еВ.

При отриманні рентгенівських фотоелектронних спектрів O 1s, C 1s, N 1s и Si 2p з “кутовою роздільною здатністю” кут φ між нормаллю зразка та пучком становив $0^{\circ}, \pm 30^{\circ}$ (рис. 1).

Нанесення золота на поверхню монокристала силіцію Si (111) здійснювалося методом термічного напилення. Кювета з вольфрамового дроту з наважкою золота перебувала на відстані ~ 7 см від поверхні пластинки монокристала силіцію. Струм, що проходив через вольфрамову спіраль, становив 5 А впродовж всього часу напилення. Нанорельєф досліджували методом високороздільної сканувальної тунельної (СТМ) та атомно-силової мікроскопії (АСМ) на приладі JSPM-4610. Вакуум в камерах тунельного та атомно-силового мікроскопа був не нижче 10^{-7} Па. Використовувався кантилевер на основі алмазних вусів та вольфрамове вістря радіусом ~ 5 нм, що дозволило отримати знімки поверхні з атомною роздільною здатністю.

Дослідження проводилися при кімнатній температурі. Температурне поверхневе зміщення не перевищувало 0,05 нм/с, що, за даних розмірів досліджуваних ділянок, не вплинуло на отримані результати.

Зображення поверхні золота, одержані методом атомно-силової мікроскопії, свідчать про кластерний механізм формування нанорельєфу поверхні золота при термічному нанесенні на поверхню силіцію (рис. 2, а). Ландшафт поверхні визначається рівномірним нанесенням наночасток золота на поверхню (рис. 2, а). Найбільш характерні розміри кластерів становили ~ 40 нм та мали переважно сфероїдальну форму з незначними спотвореннями. Нанесення вірусів тютюнової мозаїки (рис. 2, б) та їх утримування на поверхні протягом, приблизно, 24 год з наступним видаленням шляхом змивання дистильованою водою супроводжувалося значними змінами рельєфу поверхні (рис. 3).

Спостерігаються заглиблення продовгастої форми (рис. 3, а, б), профілі яких наведено на рис. 3, в. Походження таких заглиблень нами не встановлено, однак, беручи до уваги середню глибину заглиблень ~ 2 нм та ширину ~ 18 нм, що відповідає діаметру вірусу,

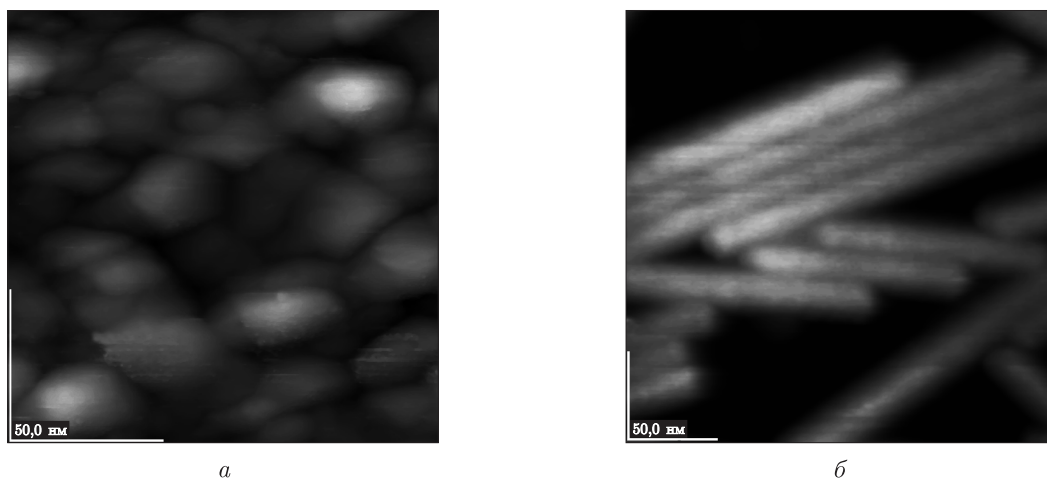


Рис. 2. САСМ зображення: *a* — поверхні золота, термічно нанесеного на поверхню Si (111) ($144 \times 144 \text{ nm}^2$); *б* — ВТМ на поверхні золота

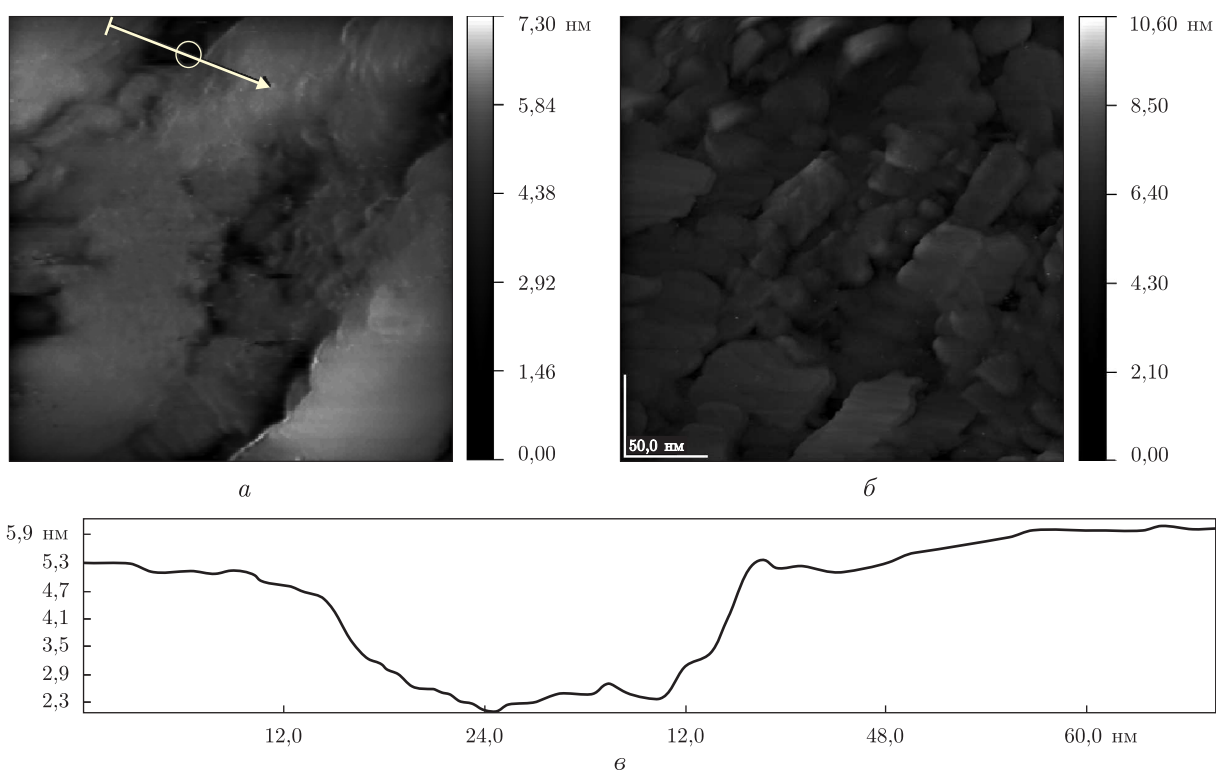


Рис. 3. САСМ зображення поверхні золота після видалення віріонів ВТМ (стрілка позначає область, профіль якої наводиться)

можна припустити, що вони безпосередньо пов'язані з капсидами ВТМ. Отриманий результат є дуже важливим, зважаючи на низьку пасивацію золота, і тому вимагає додаткових досліджень.

Наступним етапом роботи було дослідження поведінки віріонів ВТМ на поверхні кварцу. Після 16 хв іонного травлення в атмосфері аргону за напруги 3 кВ та струму 30 мА

були отримані рентгенівські фотоелектронні спектри пластинки оксиду силіцію. Спектри карбону засвідчили перерозподіл інтенсивностей двох основних особливостей для різних кутів виходу фотоелектронів. Пік на 281,9 еВ характеризує взаємодію карбону з силіцієм та, можливо, часткову взаємодію з нітрогеном, який присутній в зразку, що підтверджується даними роботи [1]. Другий пік на 284,1 еВ відображає взаємодії С–С і С–Н в пасивуючому шарі зразка або, можливо, в об'ємній матриці, цей факт підтверджується даними робіт [1–4]. Зменшення інтенсивності першого та збільшення інтенсивності другого піку пов'язане з глибиною виходу фотоелектронів, яка при зміні кута до 30° стає більшою для шару, що пасивується (рис. 4).

Спектри O 1s не змінюють свого положення при зміні кута виходу фотоелектронів (див. рис. 4). Збільшується лише інтенсивність спектра, що пов'язано з більшою часткою оксигену в поверхневому шарі. Положення піку $\sim 532,3$ еВ відповідає сполуці SiO₂. Незначна кількість нітрогену в зразку, судячи зі спектра N 1s, відповідає енергетичному положенню нітрогену в N–Si–С зв'язку, що підтверджується даними роботи [1]. Інтенсивність спектрів відображає їхню незначну частку в складі зразка. Спектри силіцію відповідають положенню в оксиді силіцію та не залежать від кута виходу фотоелектронів.

Після нанесення вірусів на підготовлену таким чином поверхню оксиду силіцію форма спектрів карбону не зазнає значних змін залежно від кута реєстрації фотоелектронів. Спостерігається незначний відносний перерозподіл інтенсивності особливостей, які спостерігаються. Даний факт свідчить про те, що товщина нанесеного шару більше глибини виходу фотоелектронів карбону. Основні піки спектрів (див. рис. 4, спектри 3–5) біля 286,0 еВ характеризують взаємодії С–О і С–N, цей факт підтверджується даними робіт [5–7], тоді як низькоенергетична особливість (біля 284,0 еВ) відображає взаємодії С–С і С–Н, які є характерними для інтерфазу, однак мають на порядок більшу інтенсивність, ніж сигнал від підкладки після іонного травлення. Відповідно, прояв цієї особливості пов'язаний з віріонами, які нанесені на поверхню. Гранично слабкий сигнал Si 2p також характеризує майже повну ізоляцію інтерфазу зразка для виходу фотоелектронів. Зміщення енергії зв'язку Si 2p в ділянку низьких енергій $\sim 0,9$ еВ свідчить про надходження додаткової електронної густини до атомів силіцію, яке, швидше за все, пов'язано з утворенням зв'язків Si–C–O, що корелює з даними роботи [8]. Для кута -30° спостерігається незначне відхилення співвідношення інтенсивностей двох особливостей. При такому значенні кута зростає внесок поверхневих атомів у форму спектра. Тому більш чітко проявляються С–С та С–Н зв'язки віріонів з матрицею. Більш чітко це можна побачити на спектрах оксигену. При кутах 0° та -30° спостерігається значне зростання інтенсивності особливості на 529,0 еВ, яка відповідає зв'язку O–C, тоді як при куті $+30^\circ$, за якого зростає глибина виходу, особливість на 529,0 еВ не проявляється. Це може бути пояснене тим, що за такої геометрії експерименту фотоелектрони, що відображають зв'язок віріонів з матрицею, не можуть пройти через віріон та проявитися на спектрі. Таким чином, особливість на 529,0 еВ відображає зв'язок віріону із зразком (зв'язок Si–O–C).

Найбільший ефект спостерігається на спектрах нітрогену (див. рис. 4). Особливості на 399,4 еВ та 395,9 еВ відображають C=N та C–N зв'язки, відповідно, що підтверджується даними роботи [6]. Енергетична невідповідність цих особливостей особливостям спектрів підкладки після травлення свідчить про те, що дані особливості характеризують в основному зв'язки всередині віріонів і майже не відображають станів нітрогену у підкладці. Їхня гранично низька інтенсивність свідчить про їхню низьку частку у складі вірусного білка (табл. 1). Характерна кутова залежність піка на 395,9 еВ характеризує C–N зв'язки

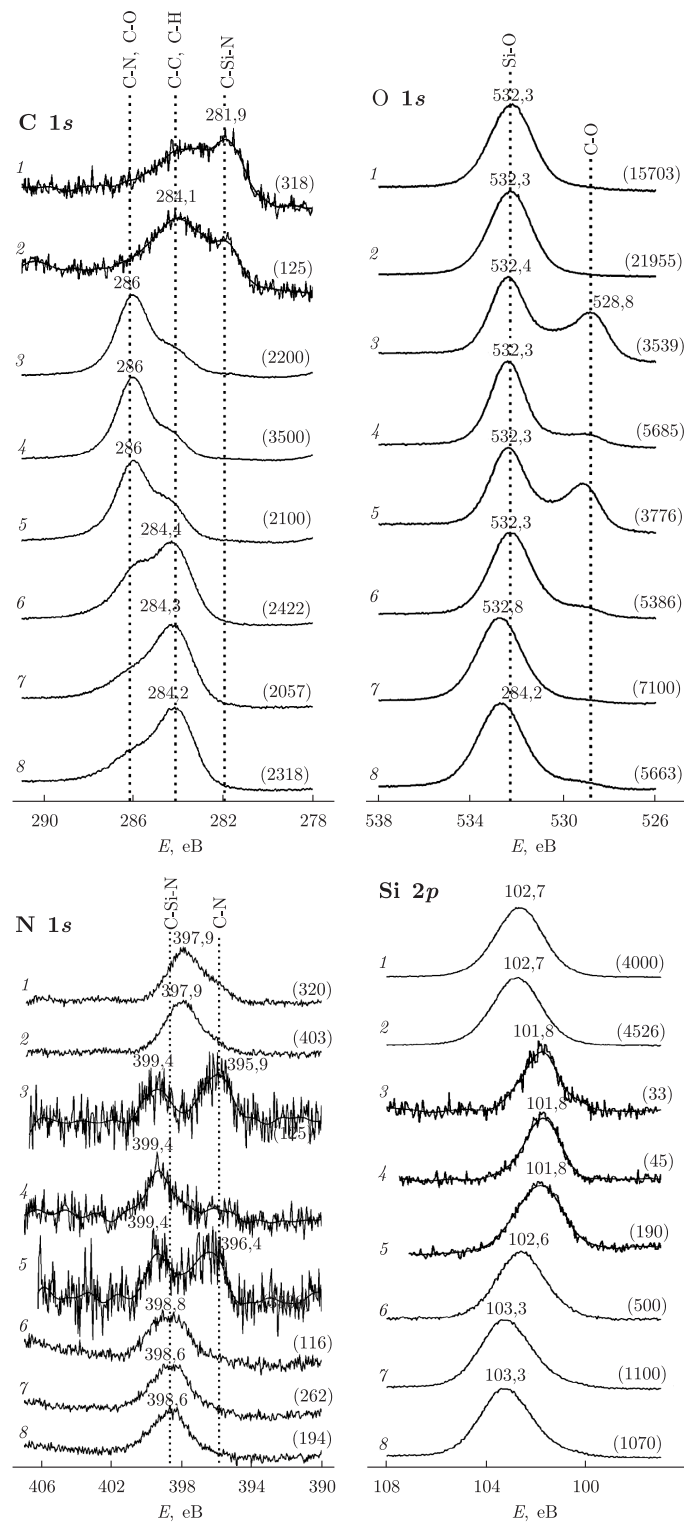


Рис. 4. Рентгеніські фотоелектронні спектри: 1 – пластина SiO₂ після травлення (3 кВ; 30 мА; 16 хв), $\varphi = 0^\circ$; 2 – $\varphi = +30^\circ$; 3 – на протравлену пластину SiO₂ нанесли ВТМ, $\varphi = 0^\circ$; 4 – $\varphi = +30^\circ$; 5 – $\varphi = -30^\circ$; 6 – травлення зразка (1 кВ; 20 мА; 5 хв), $\varphi = 0^\circ$; 7 – травлення зразка (1 кВ; 20 мА; 5 хв), $\varphi = 0^\circ$; 8 – $\varphi = +30^\circ$, де φ – кут між нормаллю зразка та пучком, який підлягав детекції

Таблиця 1. Атомні частки елементів у капсиді, геномі (РНК) та віріоні ВТМ

Частки елементів, % (ат.)	Капсид, %	Геном (РНК), %	Віріон, %
$\omega(\text{C})$	31,52	26,46	31,41
$\omega(\text{H})$	49,80	38,06	49,24
$\omega(\text{N})$	8,77	10,54	8,88
$\omega(\text{O})$	9,87	22,17	10,31
$\omega(\text{S})$	0,04	—	0,04
$\omega(\text{P})$	—	2,77	0,12

з підкладинкою, тоді як особливість на 399,4 еВ не залежить від кута, оскільки подвійний зв'язок С=N наявний лише у складі віріона, що підтверджується даними робіт [1, 9].

Перше іонне травлення нанесених вірусів за напруги 1 кВ та струму 20 мА протягом 5 хв призвело до суттєвих змін структури спектрів. Відбувається перерозподіл інтенсивності між особливостями спектра карбону (див. рис. 4, спектр *b*). Особливість на 284,4 еВ, що відображає С–С та С–Н зв'язки, стає інтенсивнішою, ніж особливість на 286,0 еВ, що характеризує зв'язки типу С–О та С–N, цей факт підтверджується даними робіт [3, 4]. Слід вважати, що відбувається часткове руйнування білка, і тому піки, що характеризують зв'язок віріонів з матрицею, спостерігаються більш чітко.

Для спектра N 1s спостерігається лише один пік, інтенсивність якого дещо збільшується. Його енергетична локалізація не дозволяє однозначно вказати тип зв'язку, якому він відповідає. Швидше за все, це зв'язки С–Si–N, які зазнали суттєвої модифікації внаслідок нанесення вірусу. У той же час, енергетичне положення піка силіцію у спектрі відображає майже початкову ситуацію до моменту нанесення вірусу за винятком інтенсивності піка, яка майже у вісім разів менша від початкової за рахунок проходження фотоелектронів через віріон. Таке положення піка зумовлене тим, що кремній бере малу участь у модифікації поверхні.

Менш за все змінюється спектр кисню, зберігаючи як інтенсивність, так і положення головного максимуму, що характерні для випадку (рис. 4, спектр *4*).

Друге іонне травлення в режимі 1 кВ/20 мА протягом 5 хв призводить до переважання особливості біля 284,3 еВ на спектрі карбону, яка характеризує зв'язки С–С та С–Н. Особливість, яка відповідає за взаємодію С–О та С–N, є мало вираженою для різних кутів виходу, що свідчить про те, що відбулося значне руйнування зв'язків у віріоні та на поверхні зберігається плівка, якій властиві зв'язки між атомами карбону.

При цьому спектри нітрогену мало модифікуються; відбувається лише зростання інтенсивності до початкового значення, отриманого для підкладинки. Енергетичне положення максимуму цього спектра дозволяє зробити висновок про те, що відбулася значна модифікація поверхні. Спектри силіцію та кисню демонструють стан, близький до SiO₂.

Таким чином, внаслідок нанесення ВТМ відбувається хімічна модифікація поверхні, яка зберігається після видалення вірусу. Спостерігаються нанорозмірні заглиблення продовгуватої форми, які відповідають формі віріонів. Взаємодія віріонів з підкладинкою відбувається, головним чином, за рахунок зв'язків Si–O–C. Зміна хімічних властивостей підкладинки визначається, переважно, утворенням С–С зв'язків на поверхні. Взаємодію віріонів з підкладинкою характеризує С–N зв'язок, подвійний зв'язок С=N наявний лише у складі віріону.

1. Hao-Wen G., Zhu L., Zhang L. et al. Influence of NH₃ plasma treatment on chemical bonding and water adsorption of low-*k* SiCOH film // J. Microelectronic Engineering. – 2008. – **85**. – P. 2114–2117.

2. *Chi-Ying L., Harbers G., Grainger D. et al.* Fluorescence, XPS and ToF-SIMS Surface Chemical State Image Analysis of DNA Microarrays // *J. Am. Chem. Soc.* – 2007. – **129** (30). – P. 9429–9438.
3. *Antonino S., Venera A., Filippo G. et al.* Layer uniformity in glucose oxidase immobilization on SiO₂ surfaces // *Appl. Surface Science.* – 2007. – **253**(23). – P. 9116–9123.
4. *Polzonetti G., Battocchio C., Dettin M. et al.* Self-assembling peptides: a combined XPS and NEXAFS investigation on the structure of two dipeptides Ala-Glu, Ala-Lys // *Materials Science and Engineering.* – 2008. – **28**(2). – P. 309–315.
5. *Majumder S., Priyadarshini M., Subudhi U. et al.* X-ray photoelectron spectroscopic investigations of modifications in plasmid DNA after interaction with Hg nanoparticlec // *J. Applied Surface Science.* – 2009. – **256**(2). – P. 438–442.
6. *Jing N., Weidong W., Xin J. et al.* Bonding structure of α -CN_x: H films obtained in methane-nitrogen system and its influence on hardness // *Thin Solid Films.* – 2008. – **516**(21). – P. 7422–7426.
7. *Koji F., Naoto S., Yoshiko M.* α -Man monolayer formation via Si–C bond formation and protein recognition // *Ibid.* – 2009. – **518**(2). – P. 699–702.
8. *Shou-Yong J., Heon-Ju L., Chi K.* Chemical Bond Structure on Si–O–C Composite Films with a Low Dielectric Constant Deposited by Using Inductively Coupled Plasma Chemical Vapor Deposition // *J. Korean Phys. Society.* – 2002. – **41**(5). – P. 769–773.
9. *Sakandar R.* Quantum Dot Encoded Magnetic Beads for Multiplexed Fluorescence Biosensing // *University of Glasgow Theses Service, PhD thesis.* – Glasgow: University of Glasgow, 2010.

*Інститут металофізики ім. Г. В. Курдюмова
НАН України, Київ*

Надійшло до редакції 23.06.2010

**V. L. Karbivsky, V. H. Kasiyanenko, N. A. Kurgan, V. V. Vishnyak,
N. O. Zueva, Academician of the NAS of Ukraine A. P. Shpak**

Behavior of tobacco mosaic virus on Au and SiO₂ surfaces

We used probe microscopy and X-ray photoelectron spectroscopy to study the interaction of tobacco mosaic (TMV) virions with Au and SiO₂ surfaces. Mechanisms of TMV virions interaction with the surface of substrates and formation of chemical bonds between a TMV virion and the surface are determined. It is found that a chemical modification of the surface which remained after the TMV removal occurs due to the TMV deposition. Nano-sized cavities of prolate form which correspond to the shape of virions are observed. Virion interaction with the substrate occurs predominantly at the expense of Si–O–C bonds. The change of chemical properties of the substrate is mainly determined by the formation of C–C bonds on its surface. The virion-substrate interaction is characterized by the C–N bond, and the C=N bond is present only in virions.