

Е.В. Костюкевич, С.А. Костюкевич

РЕАКЦИОННЫЙ ОТЖИГ КАК СПОСОБ ПАССИВАЦИИ И СТАБИЛИЗАЦИИ ПОВЕРХНОСТЕЙ БИОСЕНСОРОВ

В качестве стабилизирующего и пассивирующего ультратонкого неорганического слоя для золотой чувствительной поверхности ППР-преобразователя предлагается использование мономолекулярного слоя сульфида золота, полученного методом реакционного отжига в атмосфере сероводорода. Исследуются свойства интерфейсного слоя Au_xS_y как функция времени выдержки пленок золота в атмосфере H_2S с помощью атомно-силовой микроскопии (АСМ), измерений поверхностного плазмонного резонанса (ППР) и анализа биомолекулярного взаимодействия (реакция трипсин — соевый ингибитор трипсина (СИТ)). Результаты подтверждают классическую двухшаговую модель формирования фазы сульфида, которая затем трансформируется с помощью реконструкции в плотноупакованный слой сульфида. Адсорбция белков на сульфидный слой осуществляется с сохранением естественного состояния адсорбированных молекул.

Ключевые слова: поверхностный плазмонный резонанс (ППР), реакционный отжиг, сероводород (H_2S), сульфид золота (Au_xS_y).

ВВЕДЕНИЕ

Изучение и использование явления резонансного возбуждения поверхностных электромагнитных волн или поверхностных плазмонов (ПП) на границе раздела сред является неотъемлемой частью физики поверхности [1]. Спектроскопия поверхностных плазмонов позволяет исследовать свойства поверхностей твердых тел с однослойными и многослойными покрытиями при условии соизмеримости толщины слоев с длиной волны оптического излучения, а также приповерхностных областей в различных средах. В 1982—1983 годах появились первые статьи о применении оптической методики поверхностного плазмонного резонанса (ППР) для детектирования газовых и биологических молекул [2, 3]. С тех пор метод ППР изучался, развивался и стал мощным инструментом, позволяющим детектировать и количественно анализировать поверхностные взаимодействия молекул с высокой чувствительностью в реальном масштабе времени без использования каких-либо меток [4].

Поверхностные плазмоны (ПП) — это нормальные моды плотности заряда, существующие на границе раздела между диэлектриком и металлом/полупроводником (в биосенсорах обычно используют тонкие металлические пленки). Резонансное связывание ПП с фотонами света приводит к возбуждению сильной электромагнитной волны, которая распространяется вдоль границы раздела металл/диэлектрик и экспоненциально затухает в направлении оптически менее плотной среды на расстоянии порядка длины волны.

Существование волны плотности заряда определяется диэлектрическими свойствами металла, обычно золота или серебра, и контактирующего с металлом диэлектрического слоя (аналита). Таким образом, биохимический ППР-сенсор является очень чувствительным тонкопленочным рефрактометром, который измеряет изменения коэффициента преломления, вызываемые адсорбцией или взаимодействием молекул на металлической поверхности сенсора.

© Е.В. Костюкевич, С.А. Костюкевич, 2011

Процессы молекулярного взаимодействия протекают в жидкой среде непосредственно на поликристаллической золотой поверхности ППР-преобразователя. В этом случае требование стабильности и воспроизводимости физических параметров чувствительного золотого покрытия является определяющим для получения достоверных и точных количественных результатов. За счет лишь оптимизации технологических условий изготовления собственно золотого покрытия этого достичь не удастся, поскольку адсорбция биомолекул также может приводить к нежелательным оптическим и структурным эффектам металлической поверхности ППР-сенсора. Вместе с тем возможность и скорость проведения реакции, а также отклик ППР-биосенсора существенно зависят от ориентированной иммобилизации биологических молекул в своем естественном, не-деструктивном состоянии. Однако при иммобилизации происходит сильное взаимодействие золота с атомами серы биомолекулы [5]. Это сопровождается заметным изменением физико-химических свойств молекулы и даже полной потерей ее биологической активности.

Рассмотренные выше проблемы обуславливают необходимость применения переходных слоев для золотой рабочей поверхности биохимического оптоэлектронного преобразователя, стабилизирующих его характеристики и имеющих свойства, характерные для биологических мембран. При этом для обеспечения максимальной чувствительности преобразователя толщина переходного слоя должна быть намного меньше глубины проникновения волны поверхностного плазмона во внешнюю среду (100—200 нм для излучения в видимой области спектра).

Как известно, стабилизация параметров и пассивация поверхности поликристаллических пленок золота, полученных методом термического испарения в вакууме, могут быть инициированы не только термическим, но и реакционным отжигом, например выдержкой пленок в водном 0,5 М растворе H_2SO_4 , содержащем KCl в течение 24 ч [6]. В этом случае реконструкция поверхности происходит в результате адсорбции инородных частиц, значительно увеличивающих подвижность атомов металла, что приводит к упорядочению структуры и снижению поверхностной шероховатости золотых пленок.

Данная работа посвящена исследованию процесса реакционного отжига золотой поверхности ППР-преобразователя в парах сероводорода в целях формирования ультратонкого неорганического переходного слоя, обеспечивающего оптимальные условия для иммобилизации активных биологических молекул при сохранении высокой чувствительности и стабильности работы ППР-биосенсоров.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Технология изготовления образцов. Известно, что сульфиды благородных металлов являются кинетически и термодинамически стабильными химическими соединениями, реакционная способность которых по сравнению с биологическими молекулами пренебрежимо мала [7]. Вместе с тем адсорбция серы увеличивает подвижность поверхностных атомов металла, что приводит к упорядочению поверхностной структуры и снижению шероховатости, т.е. реконструкции металлической поверхности. Поэтому для биосенсорного применения интерес представляют исследования реакционного отжига золотой поверхности ППР-преобразователя в атмосфере сероводорода с формированием стабилизирующего и пассивирующего ультратонкого неорганического слоя сульфида золота.

Реакционному отжигу подвергали чувствительные элементы ППР-биосенсора. Для их изготовления использовали пластиковые подложки (оптический поликарбонат с показателем преломления $n = 1,58$), на которые наносили пленки золота (45 нм) с подслоем хрома (~ 1 нм) методом термического испарения в вакууме.

Слой двумерного мономолекулярного сульфида золота формировали путем обработки золотой поликристаллической поверхности в насыщенных парах сероводорода (получали, добавляя разбавленную соляную кислоту к сульфиду железа) при комнатной температуре и атмосферном давлении в течение заданного времени (5, 10, 15, 20 и 25 ч).

АСМ-исследования. Особенности топографии золотых поверхностей в зависимости от времени обработки в атмосфере H_2S анализировали с помощью атомно-силовой микроскопии. АСМ-изображения необработанных золотых покрытий свидетельствуют, что поверхность не является атомарно гладкой, диаметр зерен находится в диапазоне от 20 до 30 нм. Шероховатость поверхности характеризуется максимальным изменением высоты 2,5 нм и значением среднеквадратической шероховатости $\sim 0,84$ нм для диапазона сканирования 500 нм. Характерные особенности поверхностных структур при 5- и 10-часовой обработке — наличие мелкомасштабной шероховатости, покрывающей практически всю поверхность отдельных кристаллитов, и отсутствие поверхностных структур, средний размер которых бы превышал размер, свойственный необработанной поверхности золота.

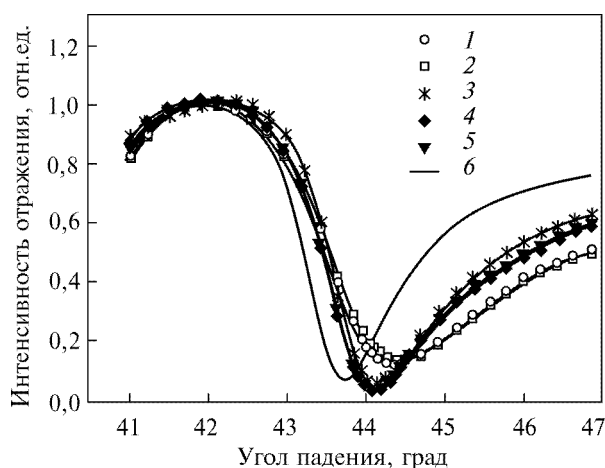
Увеличение времени экспонирования до 15 ч существенно изменяет рассмотренную выше картину на поверхности. Прежде всего, необходимо отметить значительное уменьшение мелкомасштабной шероховатости — профиль поверхности может быть описан монотонно-гладкими кривыми со значительным вкладом квазиплоских участков (до ~ 50 нм). Такая картина свидетельствует о согласованном протекании процессов реконструкции поверхности, по крайней мере, в масштабах одного или нескольких кристаллитов. С увеличением времени экспонирования до 20—25 ч происходит дальнейшее уменьшение среднеквадратичной шероховатости (до $\sim 0,5$ — $0,6$ нм) и увеличение среднего размера областей коррелированной реконструкции вплоть до макроскопических.

Исследование ППР-резонансных кривых. Рассмотренные выше структурные особенности формирования сульфидного слоя на поверхности поликристаллического золота должны влиять и на генерацию поверхностных поляритонов в этих системах, так как электрическое поле плазмона локализовано со стороны металла на расстоянии нескольких постоянных решетки. Учитывая, что шероховатость поверхности и неоднородность диэлектрических параметров переходного слоя вносят вклад в эффективные значения оптических констант на границе раздела, можно ожидать как образования на поверхности пленки нового химического соединения — сульфида золота, так и реконструкции приповерхностного слоя металла. Эти эффекты должны приводить к существенным изменениям резонансных ППР-кривых.

Спектроскопия поверхностных плазмонов на воздухе проведена в конфигурации Кречмана с использованием He-Ne-лазера ($\lambda = 632,8$ нм) в качестве источника света, гониометра Г-5М, стеклянной призмы (угол 45° , $n = 1,6$) и фотодиода ФД 263. Для осуществления оптического контакта между призмой и металлической пленкой, нанесенной на пластиковую подложку, в качестве иммерсионной жидкости применяли полифениловый эфир ($n = 1,6$).

Резонансные ППР-кривые на воздухе для образцов, без обработки и подвергнутых реакционному отжигу в парах сероводорода в течение 5, 10,

Рис. 1. Резонансные ППР-кривые для золотых пленок, без обработки (6) и подвергнутых реакционному отжигу в парах сероводорода в течение некоторого времени, ч: 1 — 5; 2 — 10; 3 — 15; 4 — 20; 5 — 25



15, 20 и 25 ч, представлены на рис. 1. Реакционный отжиг в течение первых 10 ч приводит к смещению ППР-кривой в область больших углов, уширению и увеличению интенсивности отражения в минимуме. Такие изменения свидетельствуют о формировании на поверхности неоднородного диэлектрического слоя.

Увеличение времени обработки свыше 15 ч приводит к смещению ППР-кривой в сторону меньших углов, уменьшению полуширины и уменьшению интенсивности отражения в минимуме. Кроме того, на этих образцах значительно уменьшается дрейф минимума ППР-кривой в водных растворах и составляет единицы угловых секунд (не представлено). Эти факты свидетельствуют о формировании сплошного нерастворимого слоя сульфида, сопровождающегося реконструкцией поверхности поликристаллического золотого покрытия и обеспечивающего его химическую пассивацию.

Полученные результаты согласуются с литературными данными относительно взаимодействия H_2S с монокристаллами золота и подтверждают наличие двух фаз в процессе формирования сульфида золота от времени реакции: первоначальное зарождение рассредоточенной фазы серы на поверхности золота, которая затем трансформируется в плотноупакованный слой сульфида, что сопровождается реконструкцией золотой поверхности [8, 9]. В частности, при исследовании реакционного отжига для монокристаллов золота установлены следующие факты: формирование полного монослоя сульфида характеризуется количеством серы $0,39 \text{ нг/мм}^2$; двумерный адсорбированный сульфид стабилен в вакууме до $250 \text{ }^\circ\text{C}$; низкая температура сублимации свидетельствует о том, что поверхностное соединение существует в виде Au_xS_y ; минимальное расстояние между атомами серы в сформированном поверхностном монослое $d(S-S)$ составляет $3,64 \text{ \AA}$, а теплота адсорбции серы — 86 ккал/моль .

Исследование кинетики биомолекулярного взаимодействия на пассивированной поверхности. Степень инертности модифицированной в атмосфере сероводорода золотой поверхности относительно биологических молекул оценена из ППР-исследований взаимодействия модельной специфической пары соевый ингибитор трипсина (СИТ) — трипсин (молекулярная масса $23\ 000$, размер $\sim 2 \text{ нм}$). Взаимодействие белков-ингибиторов с ферментами базируется на высокой степени комплиментарности реагирующих поверхностей молекул, что обеспечивает большое количество взаимодействий, обусловленных водородными связями и гидрофобными контактами [10, 11]. Таким образом, можно полагать, что эффективность образования комплекса фермент—ингибитор в значитель-

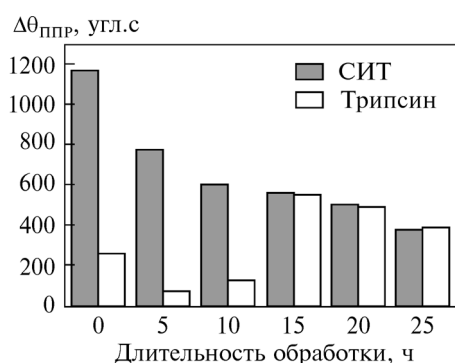


Рис. 2. Значения сдвига резонансного угла в насыщении для адсорбции СИТ и последующего взаимодействия с ним трипсина на необработанную поверхность и экспонированные с различным временем в атмосфере сероводорода поверхности золота

нуть, что простой и устойчивый к разрушающим воздействиям (например, изменения pH, обработка в концентрированных растворах мочевины или гуанидинхлорида) белок СИТ (молекулярная масса 21 500, размер ~ 2 нм) [12] денатурирует на поверхности металлов, в частности золота.

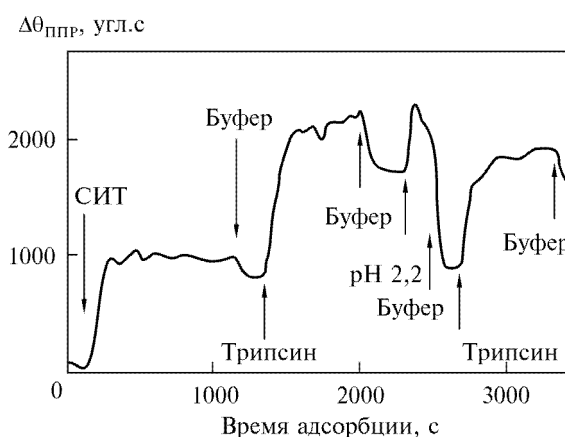
В качестве инструмента для исследований использовали автоматизированный одноканальный прибор BIOSUPLAR-201, разработанный в Институте физики полупроводников НАНУ совместно с Mivitec GmbH-Analytical μ -Systems (www.micro-systems.de) [13]. Прибор обеспечивает измерение полной ППР-кривой в угловой конфигурации по схеме Кречмана с механической разверткой угла падения в пределах 18° на воздухе (12° в стекле) и точностью 5', а также возможностью абсолютной калибровки по углу. Возбуждение поверхностных плазмонов (ПП) в тонкой пленке золота осуществляется с помощью лазерного луча *p*-поляризованного света ($\lambda = 670$ нм) и стеклянной призмы (базовый угол 65°, базовая грань 20×20 мм).

Для формирования био пленки СИТ на исследуемых подложках проведены типичные адсорбционные измерения. Буфер (фосфатный буфер с pH 7,2, содержащий 0,15 М NaCl) протекал через ячейку и затем замещался раствором СИТ в буфере с концентрацией 200 мкг/мл. После того как отклик сенсора достигал равновесного состояния без потока, буфер снова замещал раствор СИТ. Далее процедуру повторяли с инжектированием порции раствора трипсина в буфере при концентрации 200 мкг/мл. На рис. 2 показаны сдвиги резонансного угла в насыщении (по данным кинетических измерений) для адсорбции СИТ и последующего взаимодействия с ним трипсина на необработанную поверхность и экспонированные с различным временем в атмосфере сероводорода поверхности золота.

Чтобы описать рассмотренные процессы взаимодействия, из кинетических ППР-кривых адсорбции-взаимодействия (СИТ—трипсин) рассчитали [14] количество каждого вещества Γ (поверхностная концентрация), принимающего участие в этом процессе, для всех исследуемых образцов. Предельно допустимые поверхностные концентрации рассчитаны по известным размерам и молекулярным массам исследуемых молекул [11—13]. Для необработанной поверхности золота значение адсорбированного СИТ составило 1,5 нг/мм², что значительно ниже предельно допустимого (5 нг/мм²), а отклик на взаимодействие с трипсином практически отсутствовал (250'' или 0,25 нг/мм²). Такие данные можно интерпретировать разворачиванием белка при адсорбции с нарушением нативного молекулярного состояния, при котором теряется способность к специфическому связыванию.

Максимальное количество адсорбированного СИТ на поверхность золота, обработанного в парах сероводорода, существенно меньше, чем для

Рис. 3. Сенсограмма адсорбции СИТ и его специфического связывания с трипсином (проведена два раза последовательно), характерная для золотой поверхности, подвергнутой реакционному отжигу в атмосфере H_2S более 15 ч



немодифицированного образца и уменьшается с течением времени для образцов, полученных в пределах формирования первой фазы сульфида ($0,9$ и $0,7$ $нг/мм^2$ соответственно для 5 и 10 ч), а затем практически не изменяется ($0,5$ $нг/мм^2$). Взаимодействие трипсина с СИТ на золотых поверхностях, модифицированных сероводородом, в пределах первой фазы свидетельствует о малом вкладе специфического взаимодействия в этом случае: количество связанного трипсина составляет 20 — 30 % адсорбированного количества СИТ.

Для времен обработки, соответствующих второй фазе формирования сульфидного слоя (15 , 20 и 25 ч), адсорбционный процесс хорошо описывается классической моделью Ленгмюра, количество специфически связанного с СИТ трипсина происходит в соотношении $1:1$ ($0,5$ и $0,5$ $нг/мм^2$), небольшая неспецифическая составляющая смывается буфером, что указывает на формирование несплошного слоя СИТ в нативной конформации на модифицированной сульфидом поверхности золота.

Сенсограмма адсорбции СИТ и его специфического связывания с трипсином, характерная для золотой поверхности, подвергнутой реакционному отжигу в атмосфере H_2S более 15 ч, представлена на рис. 3.

Реакция связывания проведена два раза с использованием детергента (буфера рН $2,2$) для разрыва специфической связи комплекса. Обратимость реакции СИТ—трипсин указывает на специфический характер взаимодействия этих молекул, что, в свою очередь, свидетельствует о биологической активности и нативной конформации обеих молекул на поверхности золота, модифицированной сульфидом.

ВЫВОДЫ

Процедура иммобилизации чувствительного материала биологического происхождения на золотой поверхности ППП-преобразователя является существенным моментом для получения достоверных результатов и эффективной работы биосенсора. Для нативной иммобилизации рецепторных центров в работе предложен простой способ формирования защитного слоя двумерного мономолекулярного сульфида золота (Au_xS_y) вследствие реакционного отжига пленок золота в атмосфере сероводорода (H_2S).

Исследования механизма формирования монослоя Au_xS_y на поверхности поликристаллической золотой пленки в зависимости от времени

обработки в атмосфере сероводорода проведены с использованием методов атомно-силовой микроскопии и спектроскопии поверхностных плазмонов на воздухе. Показано, что процесс начинается с зарождения рассредоточенной фазы серы (5 и 10 ч), а затем трансформируется в плотноупакованный монослой сульфида (свыше 15 ч), сопровождающийся реконструкцией золотой поверхности и стабилизацией характеристик преобразователя. Полученные результаты согласуются с литературными данными по взаимодействию H_2S с монокристаллами золота.

На модифицированной в атмосфере H_2S золотой поверхности проведены ППР-исследования кинетики адсорбции и взаимодействия модельной специфической пары соевый ингибитор трипсина—трипсин. Продемонстрировано, что в результате реакционного отжига чувствительной поверхности преобразователя в атмосфере сероводорода свыше 15 ч формируется ультратонкий переходный слой сульфида золота, обладающий недеструктивными свойствами относительно биологически активных молекул. Технология реакционного отжига золотой поверхности является простой, хорошо совмещается с методами изготовления чувствительных элементов ППР-биосенсоров и ее можно широкомаштабно применять.

E.V. Kostyukevych, S.A. Kostyukevych

REACTION ANNEALING AS A WAY TO PASSIVATE AND STABILIZE BIOSENSOR SURFACES

The use of a monomolecular layer of gold sulfide prepared by the method of reaction annealing in hydrogen sulfide atmosphere is proposed as a stabilizing and passivating ultra-thin non-organic layer on the gold sensitive surface of SPR transducer. Properties of the interface Au_xS_y layer are investigated as a function of time exposure for gold films in H_2S atmosphere with the help of atomic-force microscopy, measurements of surface plasmon resonance and analysis of bio-molecular interaction (reaction tripsine — soya tripsine inhibitor). The obtained results confirm the classic two-step model for sulfide phase formation, this phase being transformed via reconstruction to a dense packed sulfide layer. The adsorption of proteins on this sulfide layer takes place with conservation of the natural state inherent in the adsorbed molecules.

Keywords: surface plasmon resonance (SPR), reaction annealing, hydrogen sulfide (H_2S), gold sulfide (Au_xS_y).

1. *Поверхностные поляритоны* / Под ред. В.М. Аграновича, Д.Л. Милса. — М.: Наука, 1985. — 525 с.
2. Nylander C., Liedberg B., Lind T. Gas detection by means of surface plasmon resonance // *Sensors and Actuators*. — 1982. — 3. — P. 79–88.
3. Liedberg B., Nylander C., Lundstrom I. Surface plasmon resonance for gas detection and biosensing // *Ibid.* — 1983. — 4. — P. 299–304.
4. *Surface plasmon resonance-based sensors* / Ed. by J. Homola. — Berlin; Heidelberg: Springer, 2006. — 251 p.
5. *Self-assembled monolayers from organosulfur compounds: a comparison between sulfides, disulfides and thiols* / Ch. Jung, O. Dannenberger, Y. Xu et al. // *Langmuir*. — 1998. — 14. — P. 1103–1107.
6. *Decrease in the roughness of vapor-deposited gold surfaces induced by surface mobility* / J.L. Zubimendi, M.E. Vela, R.C. Salvarezza et al. // *Ibid.* — 1996. — 12. — P. 12–18.
7. *Фримантл М. Химия в действии*. — М.: Мир, 1991. — 620 с.
8. Kotelitz M., Oudar J. Etude thermodynamique et structurale de l'adsorption dans le systeme or-soufre // *Surf. Sci.* — 1971. — 27. — P. 176–190.
9. Kotelitz M., Domange J.L., Oudar J. Etude par la diffraction des electrons lents et la spectroscopie Auger de l'adsorption du soufre sur l'or // *Ibid.* — 1973. — 34. — P. 431–449.

10. *Frattali V., Steiner R.F.* Separation and some properties of three inhibitors from commercial crude soybean trypsin inhibitor // *Biochemistry*. — 1968. — **7(2)**. — P. 521—529.
11. *Веремеенко К.Н.* Протеолитические ферменты поджелудочной железы и их применение в клинике. — Киев: Здоровье, 1967. — С. 5—46.
12. *Kunitz M.* Crystalline soybean trypsin inhibitor // *J. Gen. Physiol.* — 1947. — **30**. — P. 291—310.
13. *Пат. 46018 Україна, МПК⁷ G 01N 21/55.* Спосіб детектування та визначення концентрації біомолекул та молекулярних комплексів та пристрій для його здійснення / Ю.М. Ширшов, Є.Ф. Венгер, А.В. Прохорович та ін. — Заявл. 22.10.1997; Опубл. 15.05.2002; Бюл. № 5.
14. *Optical biosensors based on the surface plasmon resonance phenomenon: optimization of the metal layer parameters* / В.А. Snopok, Е.V. Kostyukevich, S.I. Lysenko et al. // *Semiconductor Phys., Quant. Electron. and Optoelectron.* — 2001. — **4**, N 1. — P. 56—69.

Институт физики полупроводников
им. В.Е. Лашкарева
НАН Украины
Проспект Науки, 41
03028 Киев

Получено 15.03.2011