

ОЦЕНКА ЭЛЕКТРИЧЕСКОЙ ПРОВОДИМОСТИ ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ МЕТОДАМИ СКАНИРУЮЩЕЙ ЗОНДОВОЙ МИКРОСКОПИИ¹

Аннотация.

Актуальность и цели. Физико-химические свойства молекул ДНК, как двухцепочечных природных, так и одноцепочечных синтезированных (олигонуклеотиды), в настоящее время активно изучаются. Появление и развитие относительно новых методов исследования – семейства сканирующих зондовых микроскопов – способствовало активизации работ по изучению наноразмерных объектов вплоть до отдельных молекул. Очевидно, что молекулы ДНК, в том числе и олигонуклеотиды, не явились исключением. Особо интересными и значимыми являются исследования физических свойств молекулы ДНК, а именно электрической проводимости. Такие исследования активно проводятся в последние 15 лет научными группами, работающими в разных странах мира. Однако парадоксально то, что полученные ими экспериментальные данные являются весьма противоречивыми. Несмотря на то, что многие из этих ученых утверждают, что молекула ДНК – это полупроводник либо диэлектрик, существуют данные, говорящие о том, что молекулам ДНК присущи свойства проводника и даже сверхпроводника.

Материалы и методы. С помощью сканирующей туннельной микроскопии (СТМ) можно измерить вольт-амперную характеристику (ВАХ) биомолекулы. Для этого молекулу необходимо расположить между двумя электрическими контактами, одним из которых является проводящий зонд микроскопа, а другим – фрагмент поверхности подложки.

Результаты и выводы. После всех стадий приготовления образца мы перешли к идентификации молекул на поверхности золотой подложки посредством атомно-силовой микроскопии и СТМ. Затем в режиме сканирующей туннельной спектроскопии измеряли ВАХ на тех участках поверхности, где предположительно находились одиночные молекулы ДНК. Сняв измерения в нескольких точках области сканирования, мы получили усредненную ВАХ. По ВАХ определили электрическое сопротивление молекулы $R = 10^8$ Ом, а затем оценили удельное сопротивление молекулы ДНК, которое оказалось примерно равным $\rho = 3,14$ Ом·см.

Ключевые слова: олигонуклеотиды, сканирующая туннельная спектроскопия, поверхность, подложка, идентификация.

Т. И. Шарипов, Р. З. Бахтизин

ASSESSMENT OF THE ELECTRICAL CONDUCTIVITY OF OLIGONUCLEOTIDES BY METHODS OF SCANNING PROBE MICROSCOPY

¹ Работа выполнена при финансовой поддержке Гранта Республики Башкортостан молодым ученым (2019 г.).

© Шарипов Т. И., Бахтизин Р. З., 2019. Данная статья доступна по условиям всемирной лицензии Creative Commons Attribution 4.0 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), которая дает разрешение на неограниченное использование, копирование на любые носители при условии указания авторства, источника и ссылки на лицензию Creative Commons, а также изменений, если таковые имеют место.

Abstract.

The physicochemical properties of DNA molecules, both double-stranded native and single-stranded synthesized (oligonucleotides), are being actively studied. Due to the invention of scanning tunneling (STM) and atomic force microscopes (AFM), it became possible to study various nanoobjects at the molecular and submolecular levels. Obviously, DNA molecules and oligonucleotides are also not an exception.

Particularly interesting and significant are the studies of the physical properties of the DNA molecule, namely, electrical conductivity. Such studies have been actively carried out in the last 15 years by scientific groups working in different countries of the world. But the notable fact is that the experimental results obtained by them are very contradictory. Despite the fact that most of these scientists claim that DNA is a semiconductor or dielectric, there are results of works in which DNA molecules exhibit the properties of a conductor and a superconductor.

It is possible to measure the current-voltage curves of a biomolecule by the STM. For this the molecule must be located between two electrical contacts, one of which is the conducting probe of the microscope, and the other is a fragment of the substrate surface.

After passing through all the stages of the sample preparation, we proceeded to identify molecules on the surface of the gold substrate by means of AFM and STM. Then, in the mode of scanning tunneling spectroscopy, the current-voltage curves were measured at those parts of the surface where single DNA molecules were presumably located. After taking measurements at several points on the scanning area, we obtained an average current-voltage curves. According to the current-voltage curves, the electrical resistance of the molecule was determined as $R = 10^8 \Omega$, and then the specific resistance of the DNA molecule was estimated, which turned out to be $\rho = 3.14 \Omega \cdot \text{cm}$.

Keywords: Scanning Tunneling Spectroscopy, oligonucleotides, surface, substrate, identification.

Введение

Дезоксирибонуклеиновая кислота (ДНК) – это биологический полимер, который содержится в ядрах клеток всех живых организмов, кроме того, ДНК является основным составляющим вирусов и бактериофагов. В последние десятилетия молекула ДНК вызывает огромный интерес и активно исследуется в междисциплинарных научных направлениях, особенно на стыке биологии и физики, химии и биологии, физики и химии. Особенно популярна в таких дисциплинах, как нанобиотехнология, биофизика и др.

Биологические микрочипы [1, 2] все более активно внедряются в медицину, растет их эффективность, функциональность и разнообразие. Физико-химические свойства молекул ДНК, как двухцепочечных природных, так и одноцепочечных синтезированных (олигонуклеотиды), в настоящее время активно изучаются. Появление и развитие относительно новых методов исследования – семейства сканирующих зондовых микроскопов – способствовало активизации работ по изучению наноразмерных объектов вплоть до отдельных молекул. Очевидно, что молекулы ДНК (и олигонуклеотиды в том числе) не явились исключением [3, 4].

По нашему мнению, особо интересными и значимыми являются исследования физических свойств молекулы ДНК, а именно электрической проводимости. Такие исследования активно проводятся в последние 15 лет научными группами, работающими в разных странах мира: Чехия, Израиль, США

и др. Однако парадоксально то, что полученные ими экспериментальные данные являются весьма противоречивыми [5–7]. Несмотря на то, что многие из этих ученых утверждают, что молекула ДНК – это диэлектрик либо полупроводник, существуют данные, говорящие о том, что молекулам ДНК присущи свойства проводника и даже сверхпроводника.

С помощью сканирующей туннельной микроскопии (СТМ) можно измерить вольт-амперную характеристику биомолекулы. Для этого молекулу необходимо расположить между двумя электрическими контактами, одним из которых является проводящий зонд микроскопа, а другим – фрагмент поверхности подложки. Поэтому вертикальное расположение и закрепление молекул ДНК на подложке являлось первоначальной целью нашего исследования.

Одним из вариантов прикрепления ДНК к поверхности подложки является наличие химически модифицированной поверхности и адсорбция на нее исследуемых молекул. В качестве подложки было взято золото. Процесс химической модификации состоит в образовании ковалентной связи химически поляризуемых групп тиолов с чистой поверхностью какого-либо металла, в нашем случае золота. Для успешного осуществления адсорбции ДНК необходимым условием является кулоновское взаимодействие молекулы с мономолекулярной пленкой тиолов, ориентированной положительно заряженными функциональными группами в сторону частично отрицательно заряженных молекул ДНК. Исследуемыми объектами служили короткие одноцепочечные молекулы ДНК, т.е. олигонуклеотиды, построенные из 20 звеньев.

1. Метод приготовления золотой подложки

С целью получения подложки из золота мы напыляли золото на атомарно чистый кремний. Выбор золота в качестве напыляемого материала легко объясняется: золото имеет высокую стабильность к радикалам, обладает химической инертностью по отношению к окислительным процессам, имеет высокую степень электрической проводимости; золото не сложно модифицировать самособирающимися монослоями органических алкантиолов. Последние, в свою очередь, будут использованы для физисорбции олигонуклеотидов. Получение пленки золота происходило распылением золота термическим способом на кремниевую пластину с использованием универсального вакуумного поста марки ВУП-4.

2. Нанесение олигонуклеотидов на модифицированную поверхность золота

После получения пленки золота осуществлялась ее модификация для эффективного связывания олигонуклеотидов с поверхностью подложки. Для того чтобы химическая модификация поверхности прошла успешно, необходимо поддерживать строго заданную температуру.

Мы взяли 5-тиол-модифицированные олигонуклеотиды в виде раствора и с помощью пипетки переменного объема 6 мкл данного раствора нанесли на подложку из золота. Затем эту подложку поместили в чашку Петри и выдержали там в течение 11 ч при температуре 38–41 °С. Далее субстрат дважды промывали в воде высокой степени чистоты milli-Q, чтобы удалить те молекулы, которые не связались с субстратом. После этого данная подложка

промывалась в растворе 2-меркаптоэтанола с целью повышения доступности иммобилизуемых молекул к комплементарным последовательностям. На последней стадии подложку еще раз помещали в чашку Петри примерно на 80 мин при условии поддержания температуры 38–41 °С.

Раствор исследуемых биомолекул – олигонуклеотидов – в концентрации 1 мкМ подогревали до температуры 80 °С и выдерживали в течение 10 мин при этой температуре для деглобулизации. Сразу после этого каплю 5 мкл данного раствора нанесли на ранее модифицированную подложку; после чего эта подложка в течение 50 мин выдерживалась при температуре 40 °С. Далее подложка промывалась в воде. На последней стадии приготовления подложки она сушилась в атмосфере воздуха при комнатных условиях в течение 30 мин. После этого образец был готов и мы перешли к идентификации молекул на поверхности подложки посредством атомно-силовой микроскопии (АСМ).

3. Идентификация олигонуклеотидов

Для идентификации олигонуклеотидов на поверхности золотой подложки мы просканировали участок подложки: на поверхности исследуемого образца визуализируются некоторые образования (рис. 1, 2), которые, вероятнее всего, и являются олигонуклеотидами. Причем наблюдаются как одиночные олигонуклеотиды, так и агрегаты, полученные объединением нескольких одиночных олигонуклеотидов. Хотелось бы отметить, что олигонуклеотиды расположены на поверхности относительно разреженно, что удобно для последующего спектроскопического исследования.

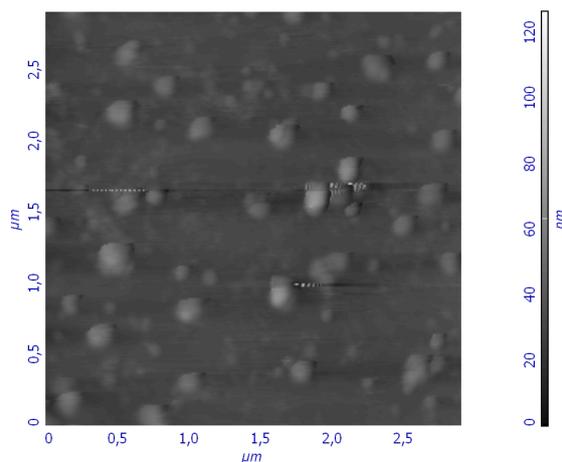


Рис. 1. АСМ-изображение молекул олигонуклеотидов на поверхности золота, представленное в двумерном виде

Коме того, был выполнен профиль сечения (рис. 3) по линии, проходящей как через единичные олигонуклеотиды, так и через агрегаты, полученные объединением нескольких единичных молекул олигонуклеотидов. Воспользовавшись рис. 3, мы попытались оценить длину вертикально ориентированных олигонуклеотидов. Из теории известно, что длина одного звена олигонуклеотида равняется примерно 0,5 нм. Взятые нами молекулы были

20-звенными. Значит, можно подсчитать, что длина молекулы олигонуклеотида $L = 0,5 \times 20 = 10$ нм. Этот расчет с определенной долей погрешности подтверждается полученным нами профилем сечения (рис. 3). Пики, наблюдаемые на рис. 3, высотой более 10 нм предположительно являются агрегатами, состоящими из двух и более молекул, либо чужеродными объектами, адсорбированными на подложку из воздуха.

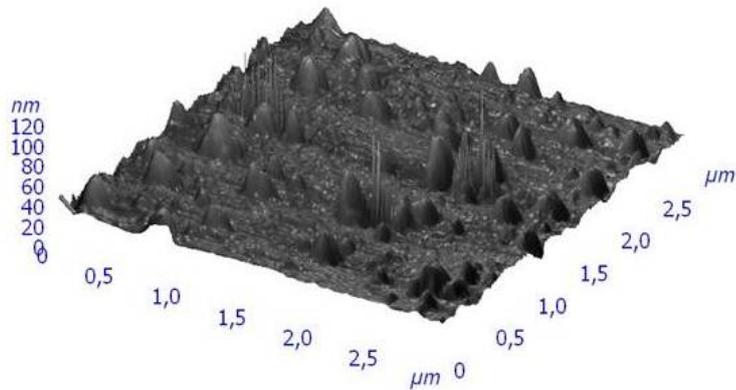


Рис. 2. АСМ-изображение молекул олигонуклеотидов на поверхности золота в трехмерном виде

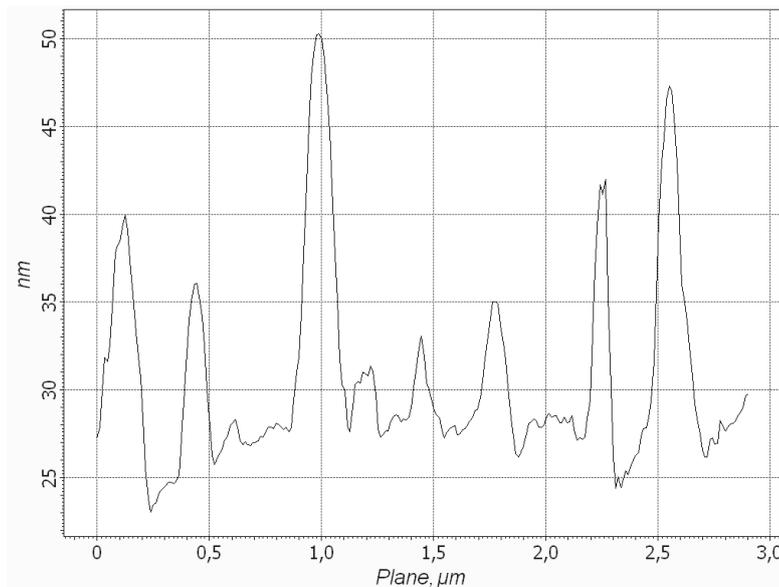


Рис. 3. Профиль сечения олигонуклеотидов и их агрегатов

4. Исследование проводимости молекул ДНК с помощью сканирующей туннельной спектроскопии

С целью измерения вольт-амперных характеристик для начала необходимо получить СТМ-изображение, на котором необходимо четко идентифицировать молекулы ДНК. Как правило, молекулы ДНК на СТМ-изобра-

жениях представляются темными объектами с малыми латеральными размерами. Объясняется это тем, что молекулы ДНК имеют меньшую электропроводность по сравнению с электропроводностью золота.

После получения СТМ-изображений и визуализации молекул ДНК на поверхности субстрата измеряли вольт-амперные характеристики (ВАХ) в режиме сканирующей туннельной спектроскопии на тех участках поверхности, где находились предположительно единичные молекулы ДНК. Выполнив измерения ВАХ во многих точках области сканирования, мы получили результирующую усредненную ВАХ (рис. 4).

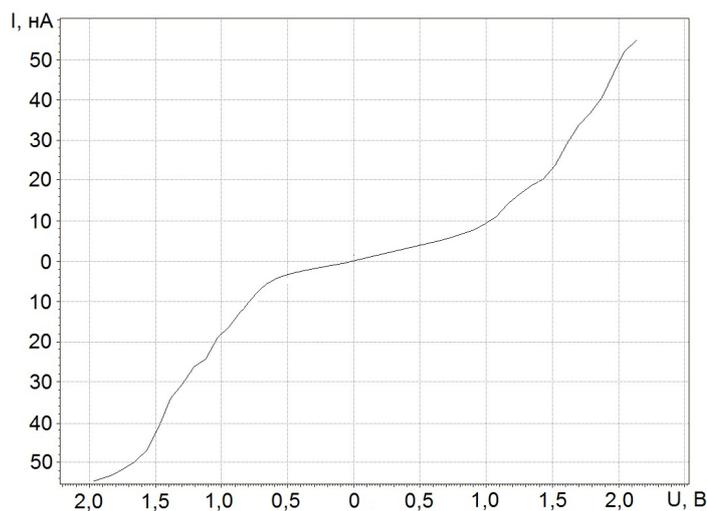


Рис. 4. Усредненная ВАХ молекул ДНК

На следующем этапе мы сравнили полученные нами аппроксимированные кривые ВАХ олигонуклеотидов с кривыми ВАХ проводника, полупроводника и диэлектрика и заключили, что наши кривые аппроксимации наиболее похожи на кривые вольт-амперных характеристик полупроводников. Исходя из полученных данных, оценили, что электрическое сопротивление отдельной молекулы примерно равно $R = 10^8$ Ом. Оценочно рассчитаем удельное сопротивление молекулы ДНК. Для этого представим ее в виде нанопровода. Возьмем диаметр нашей молекулы равным приблизительно $d = 1$ нм. В таком случае площадь поперечного сечения молекулы будет равна $S = \pi r^2 = 3,14 \text{ нм}^2$. Поскольку исследуемая молекула состоит из 20 нуклеотидов, то ее длина приблизительно равна $L = 10$ нм. Подставив известные значения величин в формулу, найдем ρ :

$$\rho = SR / L = 3,14 \times 10^{-18} \cdot 10^8 / 10^{-8} = 3,14 \text{ Ом} \cdot \text{см}.$$

Электрическое сопротивление R молекулы олигонуклеотида довольно таки велико, однако принимая во внимание малую площадь поперечного сечения молекулы, количественное значение величины удельного сопротивления по порядку оказалось таким, как у типичных полупроводников с большой шириной запрещенной зоны.

Заключение

Как результат проделанной работы была освоена методика препарирования проводящего субстрата, а также его модификация с целью дальнейшей иммобилизации олигонуклеотидов на этом субстрате. Кроме того, получены результаты экспериментального изучения электропроводности, рассчитано удельное электрическое сопротивление отдельных молекул олигонуклеотидов. В пользу достоверности полученных данных говорит тот факт, что на каждом этапе исследования проводился контроль образца с помощью СТМ и АСМ. Результаты, полученные в ходе выполнения работы, согласуются с результатами экспериментальных и теоретических исследований других ученых.

Библиографический список

1. Manual manufacturing of oligonucleotide, DNA and protein microchips / D. Guschin, G. Yershov, A. Zaslavsky, A. Gemmell, V. Shick, D. Proudnikov, P. Arenkov, A. Mirzabekov // *Anal. Biochem.* – 1997. – Vol. 250. – P. 203–211.
2. **Гарафутдинов, Р. Р.** Атомно-силовая микроскопия в исследовании биологических объектов: от биомолекул до живых организмов / Р. Р. Гарафутдинов, И. М. Сахаутдинов, Т. Р. Ясаков, Т. И. Шарипов // *Актуальные проблемы микро- и наноэлектроники* : сб. тез. докладов V Всерос. науч. молодежной конф. с междунар. участием (г. Уфа, 28–31 мая 2018 г.) / отв. ред. Р. З. Бахтизин. – Уфа : РИЦ БашГУ, 2018. – С. 100.
3. AFM observations of self-assembled lambda DNA network on silanized mica / Zhanwen Xiao, Mingxiang Xu, Keisuke Sagisaka, Daisuke Fujita // *Thin Solid Films.* – 2003. – August. – P. 114–117.
4. **Sharipov, T. I.** The estimation of quantitative parameters of oligonucleotides immobilization on mica surface / T. I. Sharipov, R. Z. Bakhtizin // *IOP Conf. Series : Materials Science and Engineering.* – 2017. – Vol. 195. – P. 012002. – DOI 10.1088/1757-899X/195/1/012002
5. **Новик, Н. В.** Возможности применения молекулы ДНК в качестве переключающего элемента / Н. В. Новик, Ю. А. Берашевич, В. Е. Борисенко // *Доклады Белорусского государственного университета информатики и радиоэлектроники.* – 2003. – Т. 1, № 2. – С. 20–28.
6. **Porath, D.** Charge Transport in DNA-based Devices / Danny Porath, Rosa Di Felice and Gianurelio Cuniberti // *Topics in Current Chemistry* / ed. Gary Shuster. – 2004. – Vol. 237. – P. 183–228.
7. Conductivity of natural and modified DNA measured by scanning tunneling microscopy. The effect of sequence, charge and stacking / I. Kratochvílová, K. Král, M. Bunčák, A. Víšková, S. Nešpůrek, A. Kochalska, T. Todorciuc, M. Weiter, B. Schneider // *Biophysical Chemistry.* – 2008. – Vol. 138. – P. 3–10.

References

1. Guschin D., Yershov G., Zaslavsky A., Gemmell A., Shick V., Proudnikov D., Arenkov P., Mirzabekov A. *Anal. Biochem.* 1997, vol. 250, pp. 203–211.
2. Garafutdinov R. R., Sakhautdinov I. M., Yasakov T. R., Sharipov T. I. *Aktual'nye problemy mikro- i nanoelektroniki: sb. tez. докладov V Vseros. nauch. molodezhnoy konf. s mezhdunar. uchastiem (g. Ufa, 28–31 maya 2018 g.)* [Actual problems of micro- and nanoelectronics: proceedings of V All-Russian scientific youth conference with international participation (Ufa, 28-31st of May, 2018)]. Ufa: RITs BashGU, 2018, p. 100. [In Russian]

3. Zhan-wen Xiao, Mingxiang Xu, Keisuke Sagisaka, Daisuke Fujita *Thin Solid Films*. 2003, August, pp. 114–117.
4. Sharipov T. I., Bakhtizin R. Z. *IOP Conf. Series: Materials Science and Engineering*. 2017, vol. 195, pp. 012002. DOI 10.1088/1757-899X/195/1/012002
5. Novik N. V., Berashevich Yu. A., Borisenko V. E. *Doklady Belorusskogo gosudarstvennogo universiteta informatiki i radioelektroniki. T. 1, 2* [Proceedings of Belorussian State University of Informatics and Radioelectronics]. Minsk: Uchrezhdenie obrazovaniya «BGUIR», 2003, pp. 20–28. [In Russian]
6. Porath D., Di Felice R. and Gianarelio Cuniberti *Topics in Current Chemistry*. Springer Verlag. 2004, vol. 237, pp. 183–228.
7. Kratochvílová I., Král K., Bunčec M., Víšková A., Nešpůrek S., Kochalska A., Todorciuc T., Weiter M., Schneider B. *Biophysical Chemistry*. 2008, vol. 138, pp. 3–10.

Шарипов Талгат Ишмухамедович

кандидат физико-математических наук,
доцент, кафедра физической электроники
и нанофизики, Башкирский
государственный университет (Россия,
г. Уфа, ул. Заки Валиди, 32)

E-mail: Sha-t@yandex.ru

Sharipov Talgat Ishmukhamedovich

Candidate of physical and mathematical
sciences, associate professor,
sub-department of physical electronics
and nanophysics, Bashkir State University
(32 Zaki Validi street, Ufa, Russia)

Бахтизин Рауф Загидович

доктор физико-математических наук,
профессор, заведующий кафедрой
физической электроники и нанофизики,
Башкирский государственный
университет (Россия, г. Уфа,
ул. Заки Валиди, 32)

E-mail: raouf@bsunet.ru

Bakhtizin Rauf Zagidovich

Doctor of physical and mathematical
sciences, professor, head of the sub-
department of physical electronics
and nanophysics, Bashkir State University
(32 Zaki Validi street, Ufa, Russia)

Образец цитирования:

Шарипов, Т. И. Оценка электрической проводимости олигонуклеотидов методами сканирующей зондовой микроскопии / Т. И. Шарипов, Р. З. Бахтизин // Известия высших учебных заведений. Поволжский регион. Физико-математические науки. – 2018. – № 1 (45). – С. 115–122. – DOI 10.21685/2072-3040-2019-1-10.