

PACS numbers: 73.63.Rt, 81.07.Pr, 82.80.Pv, 87.64.Dz, 87.80.Dj, 87.85.jf, 87.85.Qr

Взаимодействие вируса табачной мозаики с наночастицами золота

В. Л. Карбовский, Н. А. Курган, В. Х. Касияненко*,
Л. И. Карбовская

*Институт металлофизики им. Г. В. Курдюмова НАН Украины,
бульв. Акад. Вернадского, 36,
03680, ГСП, Киев-142, Украина*
**Винницький національний технічний університет,
Хмельницьке шоссе, 95,
21021 Винница, Украина*

Методами сканирующей зондовой микроскопии и рентгеновской фотоэлектронной спектроскопии исследованы механизмы взаимодействия вируса табачной мозаики с наночастицами золота. Выявлено упорядочение вирионов на поверхности монокристаллов кремния, которое обусловлено агрегационными процессами коагуляции и коалесценции вирусов. Установлено, что на поверхности вирионов наночастицы золота взаимодействуют с поверхностными лизиновыми и агрининовыми радикалами. Из-за наличия разницы потенциалов происходит прикрепление наночастиц к поверхности вирионов. Взаимодействие вирионов друг с другом характеризуется связями N–C=O.

Методами сканувальної зондової мікроскопії та рентгенівської фотоелектронної спектроскопії досліджено механізми взаємодії вірусу тютюнової мозаїки з наночастинками золота. Виявлено впорядкування віріонів на поверхні монокристалів кремнію, яке обумовлено агрегаційними процесами коагуляції і коалесценції вірусів. Встановлено, що на поверхні віріонів наночастинки золота взаємодіють з поверхневими лізіновими і агрініновими радикалами. Через наявність різниці потенціалів відбувається прикріплення наночастинок до поверхні віріонів. Взаємодія віріонів один з одним характеризується зв'язками N–C=O.

Mechanisms of interaction of a tobacco mosaic virus with the gold nanoparticles are investigated by means of the scanning probe microscopy and X-ray photoelectron spectroscopy methods. The virion ordering on the silicon single-crystalline surface is revealed due to the aggregation processes of coagulation and coalescence of viruses. As established, the gold nanoparticles interact with surface lysine and agrinin radicals on the virion surface. Due to

the presence of potential difference occurs attaching nanoparticles to the surface of virions. The interaction of virions with each other is characterized by bonds N–C=O.

Ключевые слова: сканирующая зондовая микроскопия, вирус табачной мозаики, наночастицы золота, монокристалл кремния.

(Получено 26 сентября 2014 г.)

1. ВВЕДЕНИЕ

Широкий спектр материалов, таких как углеродные нанотрубки [1], блок-сополимеры [2], молекулы ДНК и вирусы [3] может быть использован в качестве шаблонов для получения наночастиц [4]. Сильное взаимодействие между шаблоном и наночастицами приводит к образованию структуры, которая определяется формой матрицы-шаблона. Использование твёрдых матриц, таких как углеродные нанотрубки, позволяет получать жёсткий каркас организующейся структуры, однако не позволяет контролировать межчастичное расстояние и процесс организации.

«Мягкие» темплатные молекулы (такие как синтетические полимеры, белки, молекулы ДНК и вирусы), обладающие определённой химической структурой, имеют множество чётко определённых позиций для присоединения наночастиц. Более того, можно получать иерархически более сложные структуры, используя процессы, происходящие в природных биосистемах.

Лучше всего для нужд нанотехнологий подходят растительные вирусы, поскольку они безопасны для людей и животных, могут быть получены в больших количествах и способны выдерживать различные модификации.

В данной работе приводятся результаты исследования взаимодействия вируса табачной мозаики (ВТМ), который является наиболее перспективным материалом для создания наношаблонов [5], с наночастицами золота. ВТМ имеет очень характерную структуру, напоминающую нанокабель — полые белковые трубки, внутри которых проходит «жила» из РНК. Длина вируса составляет 300 нм, внешний диаметр — 18 нм, внутренний 6 нм. Так как внешняя поверхность вириона состоит из большого количества лизиновых и агрининовых радикалов, то за счёт ван-дер-ваальсового взаимодействия осуществляется связь с наночастицами металлов (в частности, золото, серебро, медь, никель и т.д.) [6]. Помимо этого вирусы имеют ряд других интересных свойств. Например, они могут создавать кристаллы с нужными исследователям оптическими свойствами. А наличие большого количества зарядов на внутренней и внешней поверхностях вирионов позволяет получать наночастицы

материалов с помощью биомиметического метода [7, 8]. Способность вирусов проникать в клетку может быть использована для создания внутриклеточных нанозондов и наносенсоров — для быстрой диагностики вирусных заболеваний.

2. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ МЕТОДИКА

Наночастицы золота получали двумя методами — химическим синтезом и термическим напылением на поверхность монокристалла кремния, что позволило проанализировать поведение вирусов ВТМ при взаимодействии с наночастицами, полученными различными методами.

Получение наночастиц золота методом термического нанесения проводилось напылением золота на поверхность монокристалла кремния Si(111). Кювета из вольфрамовой проволоки с навеской золота находилась на расстоянии $\cong 7$ см от поверхности пластинки монокристалла кремния. Ток через вольфрамовую спираль составлял 5 А на протяжении всего времени напыления.

Наночастицы золота методом химического синтеза были получены при кипячении раствора тетрахлороаурата калия с добавлением раствора цитрата натрия по схеме:



Перемешивание проводилось до появления красного цвета раствора.

В работе использовался раствор вирусов табачной мозаики в воде, концентрацией 200 мг/мл. При комнатной температуре вирусы имеют тенденцию склеиваться между собой, во избежание этого непосредственно перед экспериментом проводилась их обработка в ультразвуковой ванне при частоте ультразвука — 50 кГц, времени воздействия — 30 минут и температуре — 30 градусов Цельсия.

Исследования нанорельефа поверхности вирионов и нанесённого на монокристаллическую поверхность кремния золота проводили методом высокоразрешающей сканирующей туннельной (СТМ) и атомно-силовой микроскопии (АСМ) на приборе JSPM-4610 (Jeol, Япония). Вакуум в камерах туннельного и атомно-силового микроскопа был не ниже 10^{-7} Па. Для исследований использовался кантилевер на основе алмазных усов и вольфрамовое острие радиусом $\cong 5$ нм, что позволило получить снимки поверхности с атомным разрешением. Исследования проводились при комнатной температуре. Поверхностный температурный дрейфт не превышал 0,05 нм/с, что при данных размерах исследуемых областей не влияло на полученные результаты.

Рентгеновские фотоэлектронные спектры основных уровней эле-

ментов были получены на рентгеновском спектрометре фирмы 'Jeol'. Рабочий вакуум во время проведения эксперимента был 10^{-7} Па. Использовался магниевый анод с энергией линии MgK_{α} 1253,6 эВ. Разрешение по энергии составляло 0,1 эВ. Калибровка энергий связи проводилась по $Au4f$ -линии 87,5 эВ. При получении рентгеновских фотоэлектронных спектров с «угловым разрешением», угол φ между нормалью образца и рентгеновским пучком был 0° и $\pm 30^{\circ}$.

3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Первый этап исследований включал в себя анализ морфологии наночастиц золота, полученных химическим синтезом и термическим напылением на поверхность монокристалла кремния. Изображения поверхности золота, полученные методом атомно-силовой микроскопии, свидетельствуют о кластерном механизме формирования нанорельефа поверхности золота при термическом нанесении на поверхность кремния (рис. 1, а).

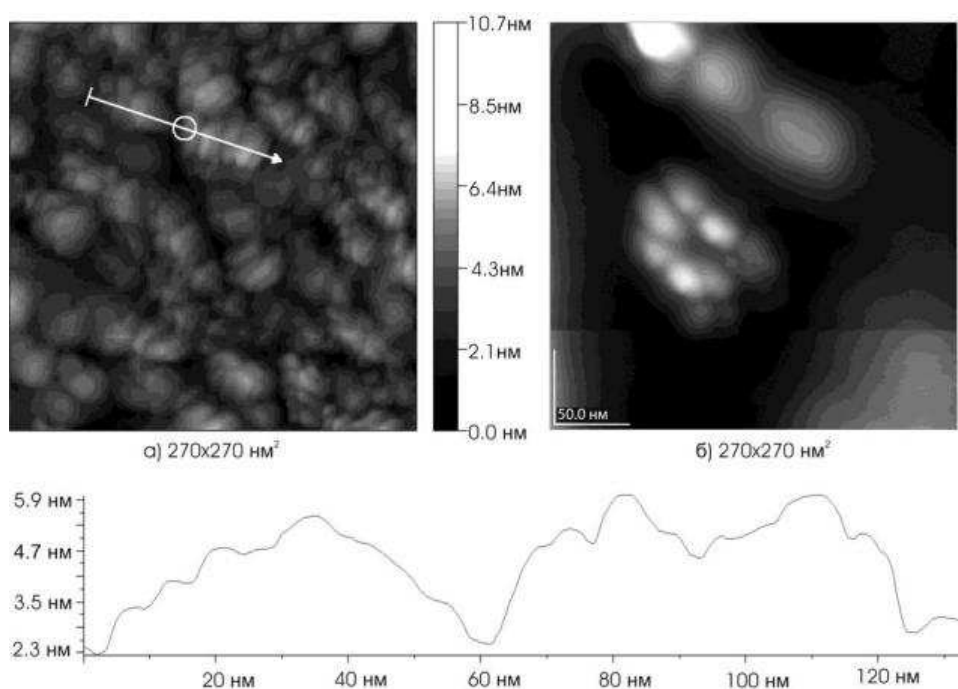


Рис. 1. (а) СТМ-снимок поверхности кремния Si(111) после напыления золота 5 мин (профиль внизу соответствует стрелке); (б) снимок АСМ наночастиц золота на поверхности кремния.

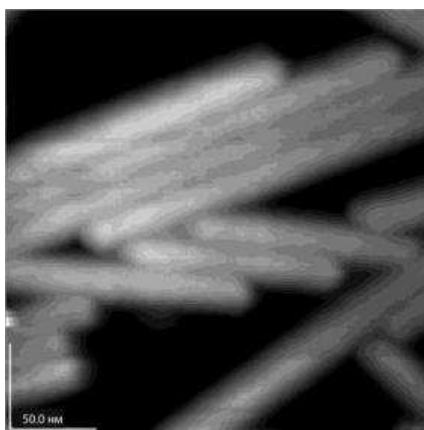


Рис. 2. АСМ-снимки ВТМ на поверхности термически нанесённого золота.

Ландшафт поверхности определяется равномерным нанесением наночастиц золота на поверхность (рис. 1, *а*). Наиболее характерные размеры кластеров составляли $\cong 40$ нм и имели преимущественно сфероидальную форму с незначительными искажениями.

В отличие от термонапыления, при исследовании наночастиц золота, полученных химически, на поверхности наблюдаются одиночные кластеры с размером частиц 15–20 нм (рис. 1, *б*).

После получения подложки с термически нанесёнными наночастицами золота на неё наносился раствор с ВТМ (рис. 2).

Полученные результаты показывают, что вирусы преимущественно располагаются на подложке группами по несколько штук, т.е. отдают предпочтение кластерному упорядочению. Скорее всего, это обусловлено стремлением системы уменьшить поверхностную энергию, что приводит к активации агрегационных процессов: коагуляции и коалесценции вирусов, результатом которых является упорядочение и скопление вирусов.

Нанесение вирусов табачной мозаики (рис. 2) и их удержание на поверхности в течение примерно 24 часов с последующим удалением путём смывания дистиллированной водой, сопровождалось значительными изменениями рельефа поверхности (рис. 3).

Наблюдаются углубления продолговатой формы (рис. 3, *а, б*), профили которых приведены на рис. 3, *в*. Принимая во внимание среднюю глубину углублений $\cong 2$ нм и ширину $\cong 18$ нм, что соответствует диаметру вируса, можно предположить, что наблюдаемые углубления непосредственно связаны с вирионами ВТМ.

Поверхностные наночастицы золота взаимодействуют с лизиновыми и агрининовыми радикалами ВТМ на поверхности вирионов за счёт наличия разности потенциалов. Наличие характерных углублений на поверхности золота после удаления вирионов свиде-

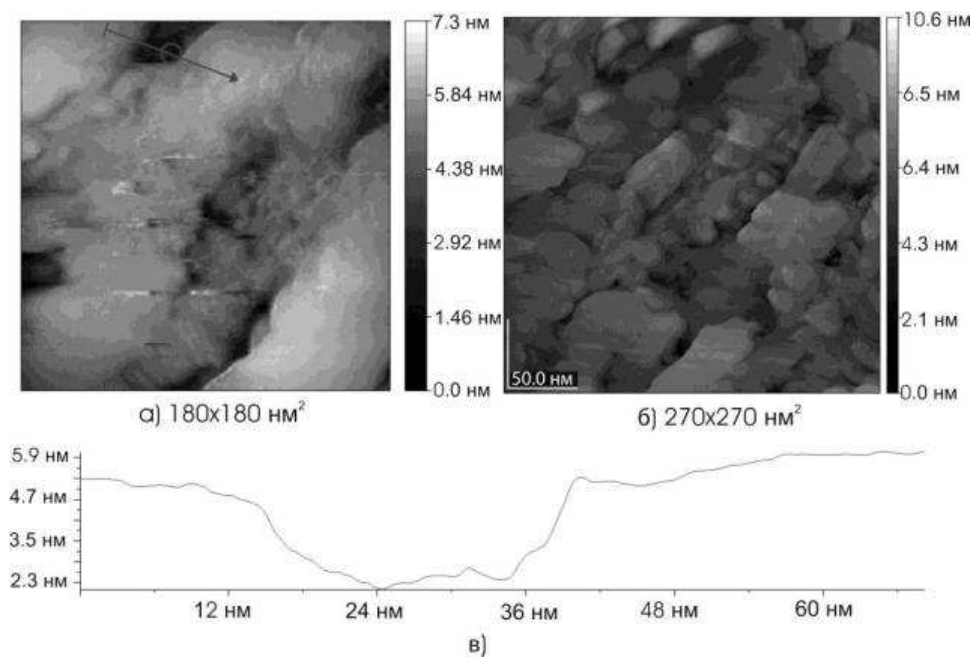


Рис. 3. АСМ-изображение поверхности золота после удаления вирионов ВТМ (профиль соответствует стрелке).

тельствует о высокой химической активности поверхности вирионов, приводящей к химическому вытравливанию золота.

Следующим этапом было исследование взаимодействия ВТМ с наночастицами золота, полученными методами химического синтеза. Было проведено нанесение раствора ВТМ в смеси с коллоид-

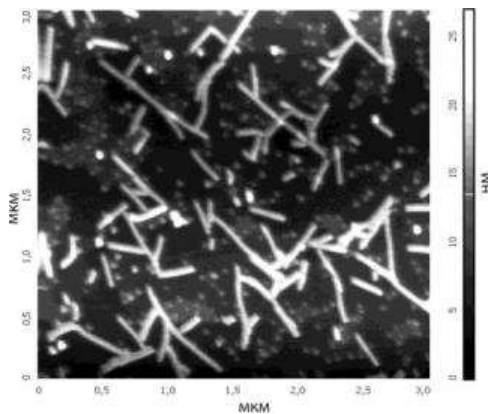


Рис. 4. ВТМ и наночастицы Au на подложке монокристалла кремния.

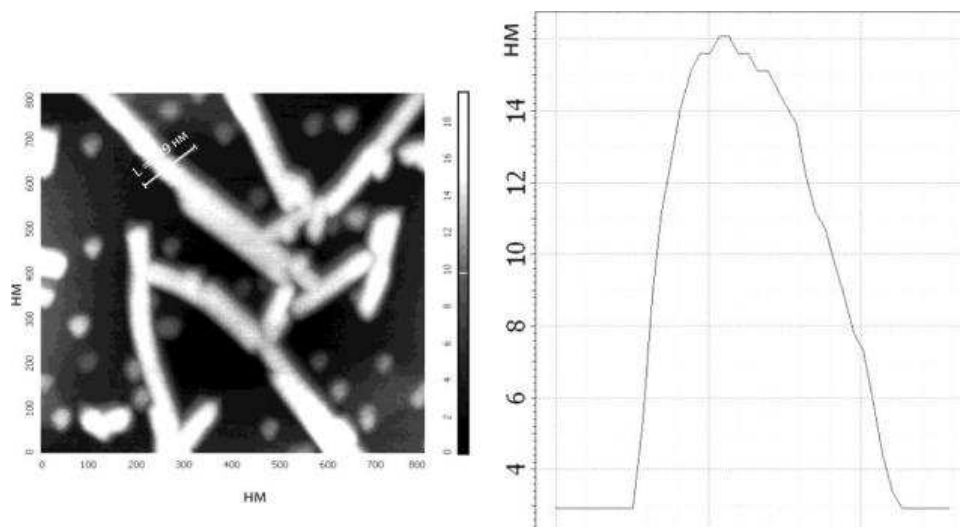


Рис. 5. Профиль высоты вириона ВТМ.

ным раствором наночастиц на поверхность монокристалла кремния. Смешивание веществ проводилось при комнатной температуре за сутки до нанесения. Как видно на рис. 4, вирусы всё так же предпочитают кластерное расположение, как и в случае нанесения на термически напылённое золото. При этом наночастицы золота, располагаясь вблизи вирусов, находятся предпочтительно у их концов (рис. 4, 5), реже — по краям от вирусов. Наночастиц золота по длине вирионов почти не наблюдалось. Наночастиц, находящихся рядом с вирионами, в среднем больше, чем отдельно расположенных. Наблюдаются области, непокрытые вирусами, которые остаются почти свободными от наночастиц (рис. 5).

Данная картина расположения наночастиц и вирионов свидетельствует о наличии взаимодействия между частицами золота и вирусами. Скорее всего, механизм взаимодействия обусловлен теми же процессами, что и при термически полученном золоте.

Для выяснения влияния кремниевой подложки на взаимодействие ВТМ с наночастицами Au были получены рентгеновские фотоэлектронные спектры C1s образца с нанесёнными вирусами (рис. 6). Спектры углерода показали различную интенсивность двух основных особенностей для различных углов выхода фотоэлектронов. Основные пики спектров (рис. 6, спектр 1) в области 286,0 эВ характеризуют взаимодействия C–O и C–N; этот факт подтверждается данными работ [9, 10, 11], тогда как низкоэнергетическая особенность (около 284,0 эВ) отражает взаимодействия C–C и C–H (рис. 6, спектры 4–6), которые являются характерными для интерфазы, однако имеют на порядок большую интенсивность, чем сигнал от

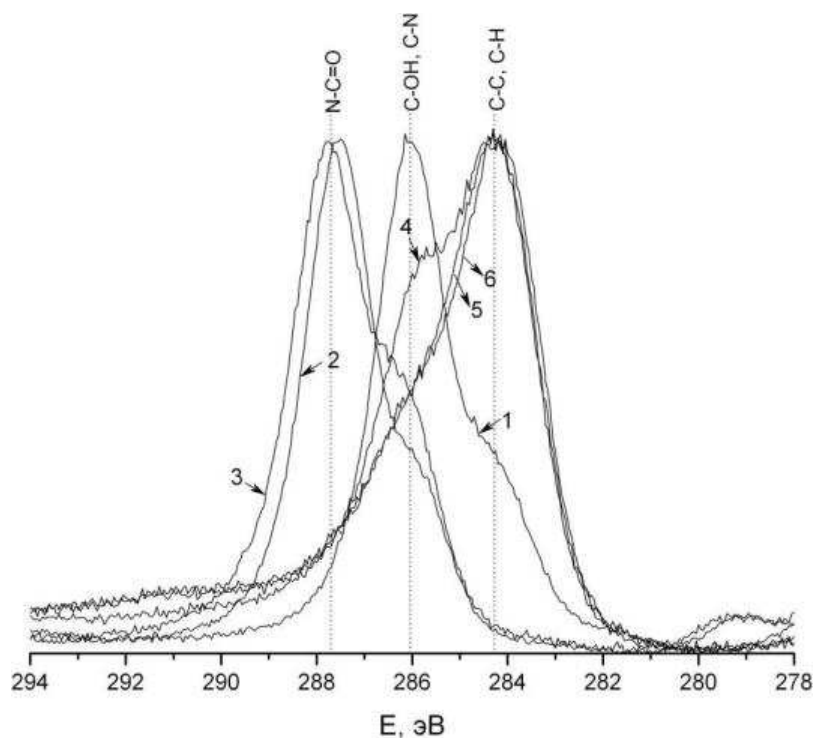


Рис. 6. Рентгеновские фотоэлектронные $C1s$ спектры ВТМ на подложке SiO_2 : 1 — $\varphi = 0^\circ$; 2 — $\varphi = +30^\circ$; 3 — $\varphi = -30^\circ$; 4 — травление образца (1 кВ, 20 мА, 5 мин), $\varphi = 0^\circ$; 5 — травление образца (1 кВ, 20 мА, 5 мин), $j = 0^\circ$; 6 — $\varphi = +30^\circ$. φ — угол между нормалью образца и пучком, который подлежал детектированию.

подложки после ионного травления. Соответственно, проявление этой особенности связано с наличием вирионов, которые нанесены на поверхность. На наличие взаимодействия между вирионами указывает и сдвиг интенсивности, характеризующей взаимодействие $C-O$ и $C-N$ в область больших энергий при изменении угла наклона образца до $\pm 30^\circ$, что связано с увеличением вклада поверхностных атомов в форму спектра и отображает взаимодействие $N-C=O$, характеризующее связь вирионов друг с другом (рис. 6, спектры 2–3).

Поверхность вирионов, как указывалось выше, имеет не скомпенсированный электрический заряд. При этом поверхность монокристалла кремния не заряжена, следовательно, исключается кулоновское взаимодействие. Так как кремний не создаёт химических связей ни с одной из аминокислот, составляющих ВТМ, химическое взаимодействие также исключается, потому наиболее вероятными причинами адсорбции вирионов на $Si(111)$ есть ван-дер-

ваальсовы силы и водородные связи. На поверхности вирионов находятся гидроксильные и карбоксильные группы, входящие в состав аминокислот. Поэтому вполне вероятно, что за счёт создания водородных связей между ними и поверхностью Si и обеспечивается адсорбция вирусов.

4. ВЫВОДЫ

Установлено, что вирионы ВТМ предпочитают кластерное упорядочение на поверхности монокристалла Si(111). Упорядочение вирусов обусловлено стремлением системы уменьшить поверхностную энергию, что приводит к активации агрегационных процессов: коагуляции и коалесценции вирусов, результатом которых является упорядочение и скопление вирусов.

Установлено, что в результате взаимодействия вирионов ВТМ с поверхностью золота, полученного методом термического нанесения, происходит химическая модификация поверхности золота на глубину около 3 нм. Поверхностные наночастицы золота взаимодействуют с поверхностными лизиновыми и агрининовыми радикалами ВТМ из-за разницы потенциалов, что приводит к прикреплению наночастиц на поверхности вирусов.

Наиболее вероятными механизмами адсорбции вирионов ВТМ на монокристаллическую поверхность Si(111) является наличие вандер-ваальсовых сил и водородных связей. Связь вирионов друг с другом характеризует наличие химического взаимодействия N–C=O.

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА—REFERENCES

1. M. A. Correa-Duarte, J. Perez-Juste, A. Sanchez-Iglesias, M. Giersig, and L. M. Liz-Marzan, *J. Angew. Chem. Int. Ed.*, **44**: 4375 (2005).
2. H. Wang, W. Lin, K. P. Fritz, G. D. Scholes, and M. A. Winnik, *J. Am. Chem. Soc.*, **129**: 12924 (2007).
3. *Encyclopedia of Virology. Five-Volume Set* (Eds. B. W. J. Mahy and M. H. V. van Regenmortel) (San Diego, CA: Academic Press: 2008), p. 3234.
4. Z. Y. Tang and N. A. Kotov, *J. Adv. Mater.*, **17**: 951 (2005).
5. M. Sarikaya, C. Tamerler, and A. Jen, *J. Nature Materials*, **2**: 577 (2003).
6. E. Dujardin, C. Peet, G. Stubbs, J. N. Culver, and S. Mann, *J. Nano Letters*, **3**: 413 (2003).
7. S. Zhang, *J. Nature Biotechnology*, **2**: 1171 (2003).
8. *Dekker Encyclopedia of Nanoscience and Nanotechnology* (Eds. J. A. Schwarz, C. I. Contescu, and K. Putyera) (London: Taylor&Francis: 2004), p. 148.
9. S. Majumder, *J. Applied Surface Science*, **256**: 438 (2009).
10. Jing Ni, Weidong Wu, Xin Ju, Xiangdong Yang, Zhimei Chen, and Yongjian Tang, *J. Thin Solid Films*, **516**: 7422 (2008).
11. K. Funato, N. Shirahata, and Y. Miura, *J. Thin Solid Films*, **518**: 699 (2009).