

НОВЫЙ ПОДХОД В ФОРМИРОВАНИИ РАВНОМЕРНОГО МАССИВА НАНОЧАСТИЦ НА ПОВЕРХНОСТИ НАНОКАПИЛЛЯРА

А. Д. Оверченко¹✉

С. В. Дубков¹

Д. В. Новиков¹

В. С. Колмогоров²

Л. С. Волкова³

Т. С. Гришин³

П. А. Едельбекова³

¹Национальный исследовательский университет «МИЭТ»

²Национальный Исследовательский Технологический Университет МИСиС

³Институт нанотехнологий микроэлектроники РАН

✉ alexsey7840@mail.ru

Аннотация. Данная работа посвящена разработке нового подхода к формированию массива плазмонных наночастиц Ag на поверхности нанокапилляра. Для формирования массива наночастиц использовался метод вакуум термического испарения с последующим отжигом. Для применения новой методики формирования частиц была разработана специальная платформа, состоящая из подложкодержателя изготовленного на 3D принтере и электродвигателя. Морфология поверхности модифицированных пипеток была исследована с помощью растрового электронного микроскопии. На основе полученных РЭМ изображений была установлено, что разработанная методика позволяет достигнуть равномерный массив наночастиц. Полученные модифицированные нанопипетки исследовались с помощью рамановской спектроскопии. В ходе получения спектров использовался лазер с длиной волны 532 нм. В качестве аналитического вещества использовался родамин в модификации R6G. Был проведен расчёт коэффициента усиления модифицированной пипетки путём сравнения с чистым стеклом при одинаковых значениях мощности лазера и концентрации аналитического вещества родамин R6G. Разработанный подход к модифицированию поверхности нанопипеток позволяет достигнуть высокой воспроизводимости метода и равномерности наночастиц для последующего изготовления SERS-пипеток для мониторинга различных внутриклеточных биомаркеров.

Ключевые слова: нанокапилляр, SERS, Ag-частицы, рамановская спектроскопия

Финансирование:

Введение

Диагностика веществ является неотъемлемой частью любой работы. Это особенно важно в медицинской области, где идентифицируются биомаркеры для выявления различных заболеваний [1]. Обнаружение биомаркеров из одной клетки сегодня представляет собой важную задачу. Низкая концентрация биомаркеров и динамическая природа живых клеток затрудняют анализ внутриклеточного содержимого отдельных клеток с использованием традиционных аналитических методов [2,3]. На данный момент активно изучается использование рамановской спектроскопии с модифицированными капиллярами для анализа биоматериала, поскольку она оказывает минимальное воздействие на исследуемую клетку при ее введении в клетку благодаря наноразмерному выходному отверстию капилляра (10-100 нм) [4]. Капилляр, модифицированный плазмонными металлами, может использоваться для регулирования доставки молекул

/ионов и проведения измерений *in situ* воздействия доставляемых молекул /ионов на живую клетку с помощью рамановской спектроскопии.

На сегодняшний день исследователи достигли не малых успехов в создании массива наночастиц на поверхности. В первые разработку нового сенсора основанного на базе нанокapилляра и использующего эффект ГКР предложил Витол и коллеги в 2009 [16]. Их целью была разработка аналитического подхода к внутриклеточному зондированию, который использует поверхностный анализ. SERS-пипетки успешно использовались для анализа живых клеток *in situ* в режиме реального времени. В клетку раковой опухоли шейки матки (HeLa) вводился водный раствор KCl для наблюдения за клеточным ответом. Авторы успешно продемонстрировали возможность снятия рамановских спектров в ядре клетки, а также смогли зарегистрировали изменения внутри клетки *in situ* с помощью внутриклеточного SERS. Обратная связь, полученная с кончика нанопипетки в клетках, предоставит ценную информацию во время инъекций клеток, хирургии отдельных клеток или для изучения ответных клеточных сигналов *in situ*. SERS-пипетку изготовили из BS-стекла погружая её в коллоидный раствор с частицами Au с размерами порядка 54 нм. В результате авторы достигли 5 кратного усиления с SERS-пипетки. Авторы считают, что такие нанокapилляры могут быть использованы для высокочувствительного химического анализа нанолитровых объемов химических веществ в различных экологических и различных аналитических приложениях.

В 2015 Фанг и коллеги [5] разработали модифицированную пипетку наделенную двойной функцией как отбора микрообъемов, так и надежным количественным и качественным обнаружением поверхностных органических остатков (ПОО) на овощах. ПОО представляет собой опасное вещество содержащие в себе пестициды. Для модификации использовался композит наночастиц Au-Ag изготовленный химическим методом. Авторы создали массив наночастиц на внутренней поверхности пипетки погружая пипетку в раствор частицами на 30 часов. В результате авторы успешно применили свою пипетку на зелёном перце и огурцах, содержащих ПОО и получили спектры с характеристическими пиками поверхностных органических остатков.

В 2017 Ханиф и коллеги [6] использовали модифицированные пипетки для обнаружения ионов Fe. Они предположили, что активная нанопипетка SERS может обнаружить минимальное количество анализируемых веществ в объемах нанолитра, и действие пипетки может быть точно контролируется имеющимися в продаже микроманипуляторами. На пипетку из BS-стекла с выходным отверстием 100 нм наносили плёнку Au с помощью заранее изготовленного коллоидного раствора. Толщина плёнки полученной плёнки составляла порядка 20-30 нм. Модифицированные пипетки погружались в различных концентрации водного раствора хлорида железа и отдельно в окисленный гемоглобин. После проведенных экспериментов усиление имело значение порядка $1,5 \cdot 10^4$. Авторы утверждают, что они разработали анализ плазменного детектирования на пипетке с выходным отверстием 100 нм. SERS нанопипетки на основе SERS открывают новые возможности для получения более эффективных нанозондов с ионами металлов для обнаружения ионов тяжелых металлов.

В прошлом году Хо и коллеги [7] разработали модифицированную частицами Ag пипетку для совместного использования в рамановской и флуоресцентной спектроскопии. Целью работы являлась детекция внутриклеточного Cu(II) в клетках HeLa (раковые клетки опухоли матки). Переизбыток или дефицит Cu (II) приводит к различным заболеваниям. Перед нанесением частиц обрабатывали в растворе пирании (смесь H₂SO₄ и H₂O₂) в течении 30 минут. После обрабатывали в 10% растворе NaOH в течении 1 часа и проводилась ионизация стекла. Затем промывали дистиллированной воде. Погружаали в чистый этанол 99,9% 15 минут. Затем в другом этаноле растворяли AgNO₃ до конечной концентрации 1 mM (дополнительно добавили изобутиламин) и в этом растворе выдерживали в течении 15 минут. Рамановский спектр получили при 633 нм и мощности 200 мкВатт. В результате нанесения выходное отверстие пипетки было перекрыто. Размер

частиц составлял 45 нм. Авторы успешно подготовили новую двухрежимную систему SERS/флуоресценции, состоящую из нанопипеток, модифицированных Ag наночастицами.

Существующие на сегодня методы изготовления модифицированных капилляров не позволяют получить широкий спектр размера частиц, а также достигнуть высокой воспроизводимости. Данную проблему призвано решить вакуум-термическое испарение. Этот метод в отличие от химического обладает рядом достоинств [8]:

1. позволяет легко контролировать размер частиц;
2. наличие резкой межфазной границы между подложкой и осаждённой плёнкой;
3. является одним из наиболее простых и эффективных методов для формирования металлических наночастиц и
4. хорошая воспроизводимость толщин плёнок.
5. процесс осаждения частиц происходит в течении нескольких секунд и в ходе одного этапа.

Данная работа посвящена разработке методов формирования наночастиц Ag на поверхности нанопипетки. В ходе экспериментов была изучена морфология поверхности пипетки с помощью сканирующей электронной микроскопии, выявлены оптимальные параметры рамановских исследований модифицированной нанопипетки и рассчитан коэффициент усиления полученной активной структуры SERS (surface enhanced raman spectroscopy).

Materials and Methods

В серии экспериментов использовались капилляры из боросиликатного стекла, изготовленные на стеклянной пипетке на основе CO₂-лазера (P2000, SutterInstrument Co.). Длина изготовленных капилляров составляла порядка 45 мм, размер выходного отверстия - порядка 50-70 нм.

Перед процессом осаждения наночастиц капилляры были промыты для удаления загрязнений. Очистку проводили в растворе перекиси аммиака и деионизированной воде при ~50°C с последующей сушкой в парах изопропилового спирта.

Формирование металлических наночастиц осуществляли с использованием вакуумного термического испарения с последующей термообработкой. В качестве испарительного материала для каждого осаждения использовалось серебро массой 9 мг. Рабочее давление в камере составляло около $3 \cdot 10^{-5}$ Торр. Образцы отжигали в вакууме при давлении $3 \cdot 10^{-5}$ Торр при 230°C в течение 30 минут.

Была разработана платформа для формирования массива наночастиц на капилляре с использованием приёма вращения с помощью методом вакуум термического испарения. Подложкодержатель изготавливался методом послойного наплавления. Для создания держателя капилляра использовалась стереолитографическая печать. В качестве движущего элемента применялся коллекторный двигатель коллекторный электромотор размером 25x38мм. Максимальная частота вращений в секунду данного мотора может достигать до 278 об/сек, максимальный ток потребления составляет 0,310 А, номинальная мощность 4,19 Вт.

Для формирования массива наночастиц серебра на капилляре использовался метод вращения, в котором капилляр вращается вокруг своей оси в ходе испарения материала навески. Схематическое представление метода формирования наночастиц на капилляре показано на рисунке 1.

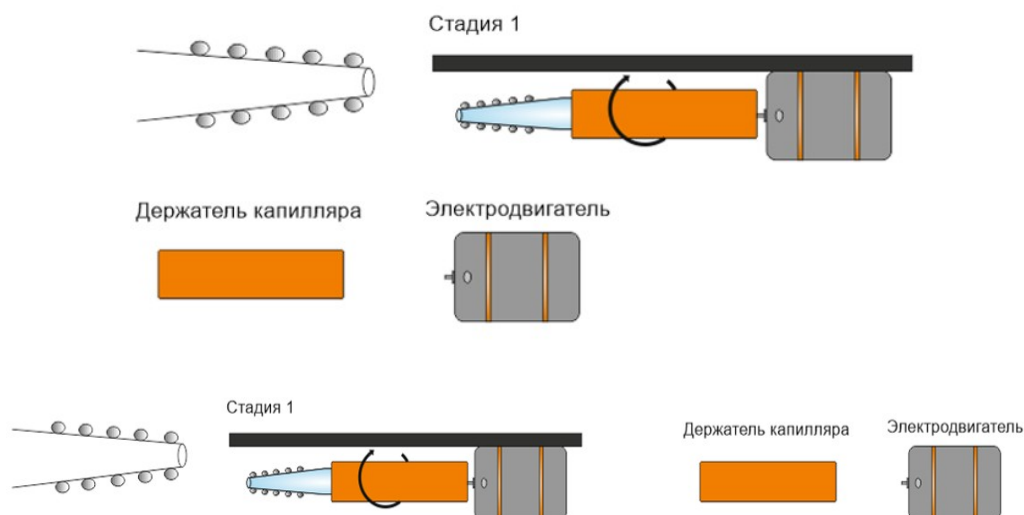


Рисунок 1 – Схематичное представления методики вращения

Для изучения морфологии полученных массивов наночастиц серебра использовали сканирующий электронный микроскоп Helios C4GX. Для получения спектров комбинационного рассеяния света использовался спектрометр комбинационного рассеяния света на базе конфокального микроскопа inVia (Renishaw). Использовался лазер с длиной волны 532 нм и мощностью пояржка 100 МВт согласно документации, 44 МВт согласно измерению выхода линзы и размером пятна 2 мкм. В качестве анализируемого вещества использовали родамин 6G с концентрацией 1 ммоль. Аналит наносили путем погружения в соответствующий раствор аналита на 5 минут с последующей сушкой в течение 10 минут.

Results and Discussion

Анализ морфологии поверхности пипетки с массивами наночастиц серебра показан на рисунке 2. При использовании метода вращения со скоростью вращения 9 об/сек и средний размер частиц составлял ~ 12 нм, а расстояние между ними составляло ~ 7 нм, как показано на рисунке 2 (а). Стоит отметить, что данный образец имеет равномерное распределение наночастиц по поверхности капилляра о чём свидетельствует гистограмма распределения на рисунке 2 (б).

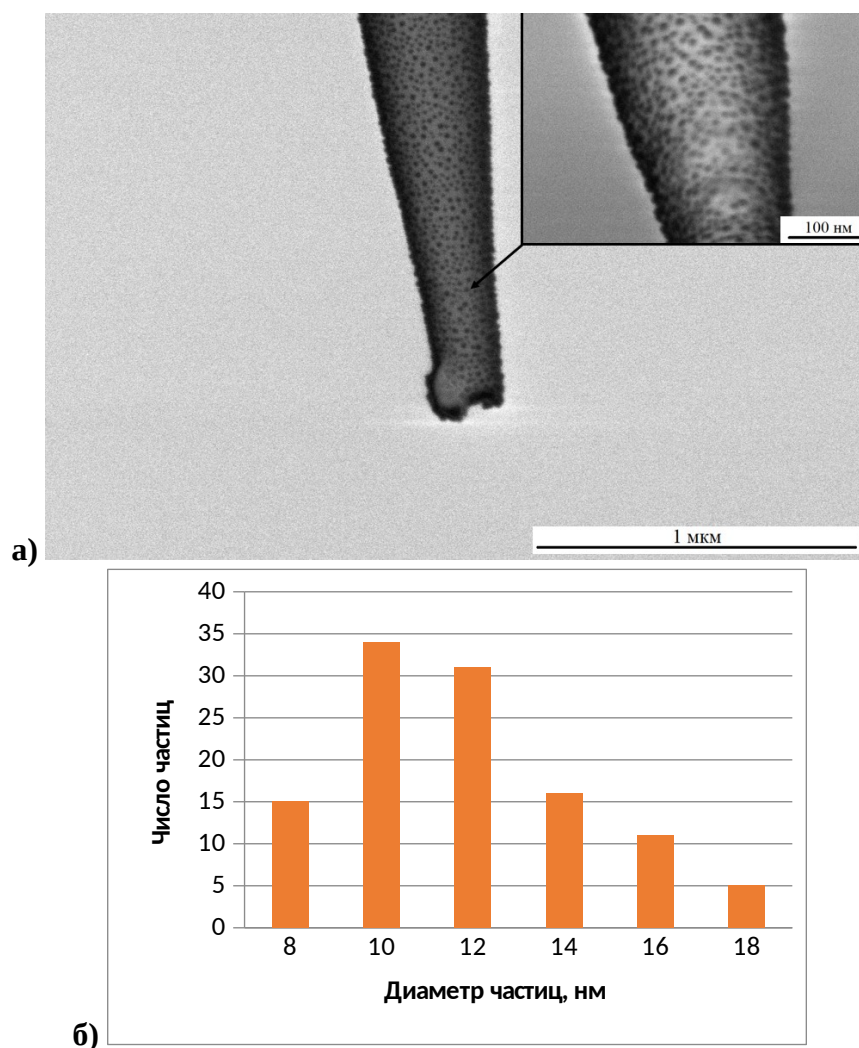


Рисунок 2 – (а) РЭМ-изображения капилляра №5,
(б) гистограмма распределения размера частиц для капилляра №5

На рисунке 3 приведен спектр комбинационного рассеяния света для капилляра. Как можно видеть из рисунка 3 присутствуют следующие характеристические моды R6G: 300 см^{-1} , 604 см^{-1} , 661 см^{-1} , 761 см^{-1} , 917 см^{-1} , 1127 см^{-1} , 1183 см^{-1} , 1303 см^{-1} , 1356 см^{-1} , 1504 см^{-1} , 1571 см^{-1} , 1647 см^{-1} . Средняя интенсивность спектров составила порядка 8000 отн.ед.

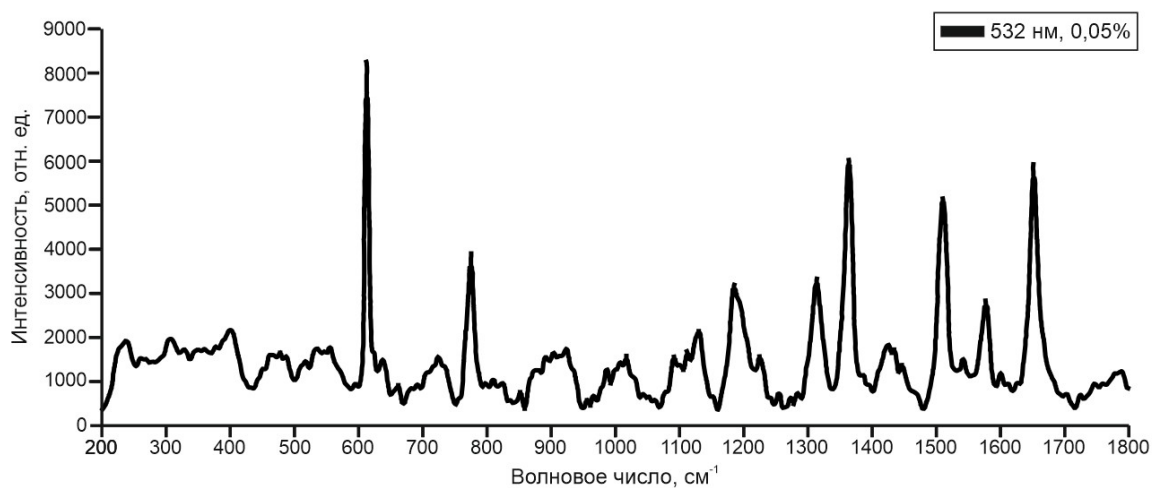


Рисунок 3 – спектр комбинационного рассеяния света для капилляра, изготовленного по методике вращения при 532 нм и мощности лазера 0,05% при исследовании концентрации R6G 1 ммоль

На основе спектра был рассчитан коэффициент усиления пипетки SERS [9]. Рассчитанный коэффициент усиления модифицированной пипетки составил $\sim 10^3$.

Conclusion

В данной работе был разработан новый подход к формированию активного слоя SERS на основе массива наночастиц серебра на поверхности пипетки методом вакуумного термического испарения с последующим отжигом. Изучение морфологии модифицированной поверхности пипетки методом растровой электронной микроскопии показало, что при использовании методики вращения образовался массив наночастиц серебра размером около 16 нм. При использовании 0,05% мощности лазера, в спектре комбинационного рассеяния присутствуют моды R6G. Рассчитанный коэффициент усиления модифицированной пипетки составил $\sim 10^3$.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Maruvada P., Wang W., Wagner P.D., Srivastava S., Biomarkers in molecular medicine: cancer detection and diagnosis, BioTechniques. 4 (38) (2005) 9-15.
2. Dittrich P., Jakubowski N., Current trends in single cell analysis, Analytical and Bioanalytical Chemistry. 27 (406) (2014) 6957-6961.
3. Yuan G., Cai L., Elowitz M., Enver T., Fan G., Guo G., Irizarry R., Kharchenko P., Kim J., Orkim S., Quackenbush J., Saadatpour A., Schroeder T., Shvidasani R., Tirosh I., Challenges and emerging directions in single-cell analysis, Genome biology 18 (84) (2017) 1-8.
4. Bulbul G., Chaves G., Olivier J., Ozel R. E., Pourmand N., Nanopipettes as monitoring probes for the single living cell: state of the art and future directions in molecular biology, Cells 6 (7) (2018) 55.
5. Fang W. et al. Portable SERS-enabled micropipettes for microarea sampling and reliably quantitative detection of surface organic residues //Analytical chemistry. – 2015. – Т. 87. – №. 18. – С. 9217-9224.
6. Hanif S. et al. Organic cyanide decorated sers active nanopipettes for quantitative detection of hemeproteins and Fe^{3+} in single cells //Analytical chemistry. – 2017. – Т. 89. – №. 4. – С. 2522-2530.11. Yang D., Liu G., Li H., Liu A., Guo J., Shan Y., Wang Z., He J., The fabrication of a gold nanoelectrode–nanopore nanopipette for dopamine enrichment and multimode detection, Analyst 3 (145) (2020): 1047-1055.
7. Ho V. T. T. X. et al. Coumarin–lipoic acid conjugates on silver nanoparticle-supported nanopipettes for in situ dual-mode monitoring of intracellular Cu (II) and potential chemodynamic therapy applications //Sensors and Actuators B: Chemical. – 2021. – Т. 344. – С. 130271.

8. Акуленок М. В. Введение в процессы интегральной микро- и нанотехнологий: учебное пособие для вузов. Том 2 / М. В. Акуленок, В.М. Андреев, Д. Г. Громов – М.: БИНОМ. Лаборатория знаний. – 2011. – 252с.

9. Kosuda K. M., Bingham J. M., Wustholz K. L., Van Duyne R. P., Nanostructures and surfaceenhanced Raman spectroscopy, Handbook of Nanoscale Optics and Electronics. 309 (2010).