

ГРАФЕН-ПОЛУПРОВОДНИКОВЫЕ ТРУБЧАТЫЕ ИГЛЫ ДЛЯ РАБОТЫ С ЖИВЫМИ КЛЕТКАМИ*

Рассмотрена возможность использования нового класса трубчатых игл для прокалывания клеток и введения внутрь клетки биологического материала. Проведены расчеты устойчивости трубчатых (многостенных) игл. Расчеты выполнены для игл, стенки которых сформированы из гибридных структур графен-полупроводник или графена, имеющих острие в виде трапециевидной незамкнутой цилиндрической оболочки. Возможность массового изготовления таких игл и чипов для АСМ существенно расширяет спектр доступных операций как на поверхности, так и внутри живой клетки и открывает перспективу эффективной высокоточной работы с отдельными клетками.

Ключевые слова: графен-полупроводник, трубчатые иглы, живые клетки.

Введение

Стремительно развивающаяся физико-химическая биология предъявляет все более высокие требования к технике, используемой для оценки и изучения различных функций живых клеток и таких молекул, как ДНК, РНК и протеинов. Основным методом наблюдения фенотипических изменений в клетке и выявления отличий в молекулах, представляющих особый интерес для исследователей, является метод прямого введения различных молекул и генов внутрь клетки. К настоящему времени разработано большое количество методов доставки различных молекул или генов к клетке. Ранние разработки включают вирусно-векторные системы [1], полимерные системы [2], липосомные комплексы [3; 4], хитозанные наночастицы [5], электропорацию [6], и микро-впрыскивание [7]. Необходимо отметить, что в каждом конкретном случае необходимо выбирать наиболее пригодный метод с учетом всех его преимуществ и недостатков.

Среди методов воздействия на единичную клетку наиболее важными являются механические микроинъекционные методы, которые позволяют исследователям прецизионно вводить внутрь клетки отдельные молекулы или органеллы на требуемый временной интервал. Современные микрокапилляры делаются из стеклянной трубки, полученной методом вытягивания и механического скалывания [8]. Стеклянные капилляры имеют целый ряд недостатков, связанных с невозможностью их изготовления и с тем, что толщина стенок таких капилляров сравнима с их диаметром, что при прокалывании приводит к значительным нагрузкам на клетки и их разрушению [9; 10].

Необходимо более деликатное и контролируемое воздействие на клетку. В связи с этим в последнее время выполнен ряд работ по исследованию возможности применения для этих целей игл атомно-силового микроскопа [11–14]. Однако результаты исследований свидетельствуют о проблемах на пути прямого использования игл атомно-сило-

* Работа выполнена при финансовой поддержке Федерального агентства по науке и инновациям (государственный контракт № 02.512.11.2218) и РФФИ (грант № 09-02-01390-а).

вого микроскопа. Проблема связана прежде всего с формой и размером стандартных игл. Так, их пирамидальная форма сильно деформирует клетку, что не позволяет проникать в клетку. Другим подходом к решению данной проблемы является использование углеродных нанотрубок [15]. К недостаткам углеродных трубок следует отнести отсутствие прецизионных массовых методов их изготовления, слишком малый диаметр, и невозможность прокачивания через них достаточного количества инжeksiруемого в клетку вещества. Основное использование углеродных трубок связано только с введением в клетку молекул, закрепленных на поверхности трубок.

Известен другой подход к решению задачи инъекции молекул вещества в клетку. Данный подход основан на использовании полупроводниковых трубок, которые формируются прецизионными методами и имеют контролируемые, заданные диаметры от нанометров до микрометров [16–18]. Особенностью таких трубок является высокая воспроизводимость геометрических параметров и высокая механическая прочность. Диаметр полупроводниковых и гибридных трубок можно задавать с прецизионной точностью от 2 нм до 100 мкм. При этом микро- и нанотрубки могут быть сформированы из широкого набора материалов и с помощью литографии размещены в любом заданном месте подложки, которая в дальнейшем может выполнять роль держателя.

Пример использования полупроводниковых трубок микронных диаметров для инъекции вещества в клетку приведен в работах [19; 20].

В настоящей работе представлены результаты расчета и анализа устойчивости полупроводниковых и новых гибридных графен-полупроводниковых и графеновых микро- и нанотрубок при прокалывании клеток. Важно отметить, что использование именно гибридных и графеновых трубчатых игл позволяет решить как проблему деликатного проникновения в клетку, так и проблему инъекции вещества в клетку.

Решение и обсуждение

Расчет и анализ устойчивости рассматриваемых игл проведен с привлечением методов континуальной теории упругости. На рис. 1, *а* представлена модель такой иглы, стенки которой состоят из двух различных материалов. При прокалывании иглой какой-либо поверхности сила давления на иглу будет направлена вдоль оси Oz , что приводит к необходимости решения задачи об устойчивости незамкнутой цилиндрической пластинки при действии сжимающих усилий вдоль образующей и равномерно распределенных вдоль криволинейных кромок. Решение данной задачи наиболее удобно проводить в криволинейных координатах рис. 1, *б*. Направим ось Ox вдоль образующей, а ось Oy вдоль дуги окружности. Раз-

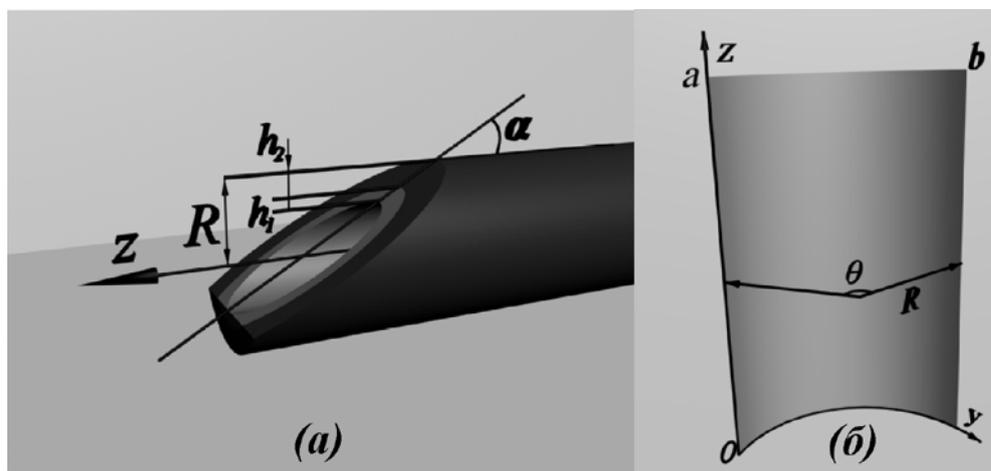


Рис. 1. Модель иглы, стенки которой состоят из двух различных твердотельных материалов (*а*): ось Oz совпадает с цилиндрической осью иглы; R – внешний радиус иглы; h_1 и h_2 – толщины стенок иглы, соответствующие разным материалам; α – угол скоса острия иглы.

Острые иглы в криволинейных координатах (*б*): R – кривизна дуги окружности пластинки; θ – угол раскрытия; a и b – размеры пластинки вдоль соответствующих направлений

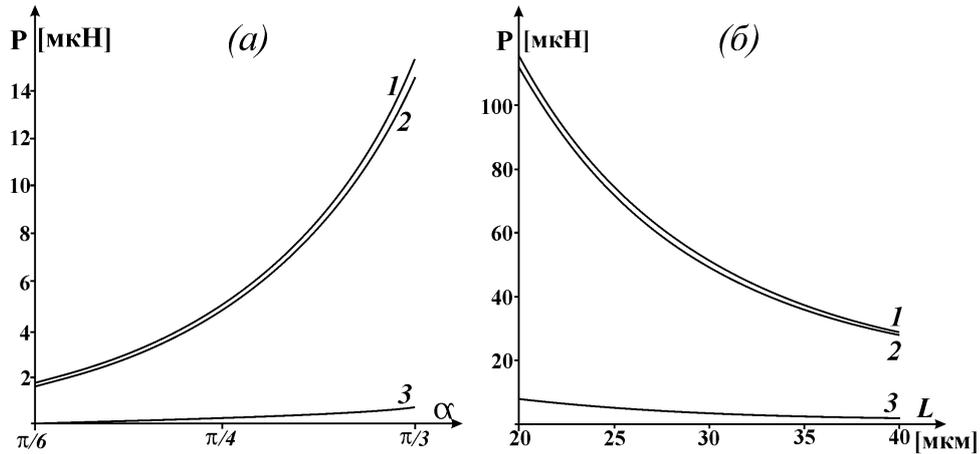


Рис. 2. Графики зависимости: *a* – устойчивости острия иглы длиной 2 мкм от угла раскрытия острия α ; *б* – величины силы, при которой происходит потеря устойчивости трубки от ее длины L . Кривая 1 построена для графен-GaAs-In_{0.2}Ga_{0.8}As иглы; 2 – для GaAs-In_{0.2}Ga_{0.8}As иглы; 3 – для однослойной иглы из графена

меры пластинки вдоль соответствующих направлений обозначим как a и b соответственно, и пусть их отношение a/b является целым числом. Толщину пластинки примем равной h . Будем также считать, что поперечные сечения пластинки остаются плоскими и неискаженными. Сделанные допущения существенно упрощают решение задачи устойчивости, приводя к постановке плоской задачи теории упругости.

В качестве дальнейшего упрощения задачи удобно воспользоваться интегральными упругими характеристиками материала пластинки, служащей стенкой рассматриваемой иглы. Это позволяет свести задачу к определению устойчивости полой цилиндрической иглы с однослойной стенкой. Использование сверхтонкого – моноатомного – слоя графита ($\sim 1,5 \text{ \AA}$) в качестве одного из слоев стенки трубчатой иглы дает возможность, считая слои от центральной оси иглы, интегральный модуль упругости представить в простом виде [21]:

$$E = \frac{1}{h} \sum E_i h_i,$$

где h – толщина стенки, очевидно, равна сумме толщин слоев, а интегральный коэффициент Пуассона ν в виде

$$\nu = \frac{1}{Eh} \sum \nu_i E_i h_i.$$

Отдельно рассмотрим случай, когда материалом стенки служит твердый раствор. Для определения упругих постоянных твер-

дого раствора (таких, как SiGe, InGaAs) воспользуемся линейной аппроксимацией:

$$E = (E_2 - E_1)x + E_1.$$

Так, если $E(\text{InAs}) = 51,4 \text{ ГПа}$, $E(\text{GaAs}) = 86 \text{ ГПа}$, то $E(\text{In}_{0.2}\text{Ga}_{0.8}\text{As}) = 58,8 \text{ ГПа}$, и соответственно $\nu(\text{InAs}) = 0,35$, $\nu(\text{GaAs}) = 0,31$, то $\nu(\text{In}_{0.2}\text{Ga}_{0.8}\text{As}) = 0,34$.

Зная, упругие постоянные материала стенки иглы и обозначив за P величину сжимающего давления, направленного вдоль цилиндрической оси Oz , E – модуль Юнга, ν – коэффициент Пуассона,

$$D = \frac{Eh^3}{12(1-\nu^2)}$$

– цилиндрическую жесткость

стенки, σ_x , σ_y и σ_{xy} – продольное, поперечное и касательное напряжение в срединной поверхности, w – отклонение от нейтральной поверхности, запишем общее уравнение равновесия оболочки [22]:

$$\begin{aligned} \frac{D}{h} \nabla^8 w + \frac{E}{R^2} \frac{\partial^4 w}{\partial x^4} + \sigma_x \nabla^4 \left(\frac{\partial^2 w}{\partial x^2} \right) + \\ + \sigma_y \nabla^4 \left(\frac{\partial^2 w}{\partial y^2} \right) + 2\sigma_{xy} \nabla^4 \left(\frac{\partial^2 w}{\partial x \partial y} \right) = 0. \end{aligned} \quad (1)$$

Ввиду сложности решения задачи сделаем нижнюю оценку устойчивости незамкнутой цилиндрической оболочки на изгиб (острие иглы). Самым неустойчивым состоянием оболочки является состояние со свободно опертыми краями [22], в этом случае решение уравнения (1) для оболочки, показанной на рис. 1, б, будем искать в виде

$$w = f \sin\left(\frac{\pi m}{a} x\right) \sin\left(\frac{\pi n}{b} y\right), \quad (2)$$

где m и n – числа полуволн вдоль образующей и по дуге. При нахождении минимального напряжения, при котором пластинка потеряет устойчивость, будем считать, что пластинка в начальной фазе потери устойчивости приобретет форму, при которой на дуге окружности укладывается одна полуволна $n = 1$, а вдоль образующей число полуволн равно $m = a/b$. Подставляя (2) в (1) и решая относительно P для первого критического значения силы внешнего давления, получим:

$$P_0 = 4 \frac{\pi^2 D}{a^2 h} + \frac{b^4 E}{4\pi^2 a^2 R^2}.$$

В данном выражении первый член правой части описывает потерю устойчивости плоской пластинки. Второй член правой части возникает из-за наличия кривизны пластинки в случае незамкнутой оболочки (острие), а для замкнутой оболочки (трубки)

$$P_0 = \frac{2b^2}{Ra^2} \sqrt{\frac{ED}{h}}.$$

Используя полученные соотношения, приведем решение задачи для трех игл диаметром 2 мкм. Стенки гибридных и полупроводниковых игл почти в 100 раз тоньше их диаметра, а стенка графеновой иглы – трубки, в 1 000 раз. Стенки имеют следующую структуру:

- 1) графен-GaAs-In_{0,2}Ga_{0,8}As;
- 2) GaAs-In_{0,2}Ga_{0,8}As;
- 3) графен $E(\text{графен}) = 1$ ТПа,
 $\nu(\text{графен}) = 0,2$.

Толщина слоев $h_{\text{GaAs}} = 15$ нм, $h_{\text{In}_{0,2}\text{Ga}_{0,8}\text{As}} = 9$ нм и $h_{\text{Graphene}} = 0,15$.

На рис. 2, *a* представлены графики зависимости устойчивости острия иглы от угла α . Работы выполнены для острия в виде желоба диаметром 2 мкм и длиной 2 мкм. Хорошо видно также, что устойчивость графенового острия почти на порядок меньше. Из сравнения зависимости 1 и 2 на рис. 2, *a* следует, что, несмотря на высокий модуль Юнга, графен не оказывает сильного влияния на устойчивость острия гибридной графен-полупроводниковой иглы. Рассмотрим теперь часть иглы, которая представляет собой полую трубку с внешним диаметром $D = 2$ мкм. На рис. 2, *б* приведены графики зависимостей устойчивости игл от их длины L . Сравнивая рис. 2, *a* и 2, *б*, легко

заметить, что даже при длине трубки в 40 мкм ($L/D = 20$, $D/h \approx 40$) ее прочность в несколько раз превышает прочность острия. Из этого следует, что при оценке способности иглы без потери формы прокалывать какую-либо поверхность достаточно оценить прочность острия.

В работе [23] мембрану клетки прокалывали призматической кремниевой иглой диаметром 200 нм, при этом проникновение происходило уже при усилии в 0,7 нН, а для иглы диаметром 800 нм проникновение происходило при усилии в 1,9 нН. Отсюда следует, что проникновение в клетку происходит при давлениях порядка 10^{-14} Н/мм². Учитывая, что площадь соприкосновения полупроводниковой трубки с клеткой $4 \cdot 10^4$ нм², мы получаем усилие, при котором происходит проникновение в клетку, равное 0,4 нН. Для графенового острия или для графеновой трубки, площадь соприкосновения которой с клеткой в 1 000 раз меньше, усилие будет равно порядка 1 пН. Эти величины соответственно на 3 и 6 порядков меньше усилий, при которых происходит выпучивание трубки, как это следует из рис. 2. Расчетные данные показывают, что прочность полупроводниковых, гибридных и графеновых трубок и их острий избыточна для проникновения в клетку.

В настоящее время в ИФП СО РАН разработаны чипы для атомно-силового микроскопа, представляющие собой закрепленный на подложке кантилевер, в котором вместо пирамидальной иглы расположена полая трубка. Для оптимизации таких чипов необходима оценка степени чувствительности кантилевера для совершения различных манипуляций внутри клетки. Прокалывание клетки происходит согласно модели, показанной на рис. 3. На этапе *a* кантилевер плоский; *b* – после соприкосновения с поверхностью мембраны клетки по мере роста сопротивления мембраной внешнему давлению будет возрастать степень отклонения кантилевера от плоского состояния; *c* – после прокола сила сопротивления клетки резко спадет и кантилевер вновь примет плоское состояние. Таким образом, на кривых измерения силы АСМ будет присутствовать резкий максимум, символизирующий прохождение иглой мембраны клетки. Кантилеверы АСМ могут состоять из разных материалов и обладать разной чувствительностью, поэтому необходимо точно уметь

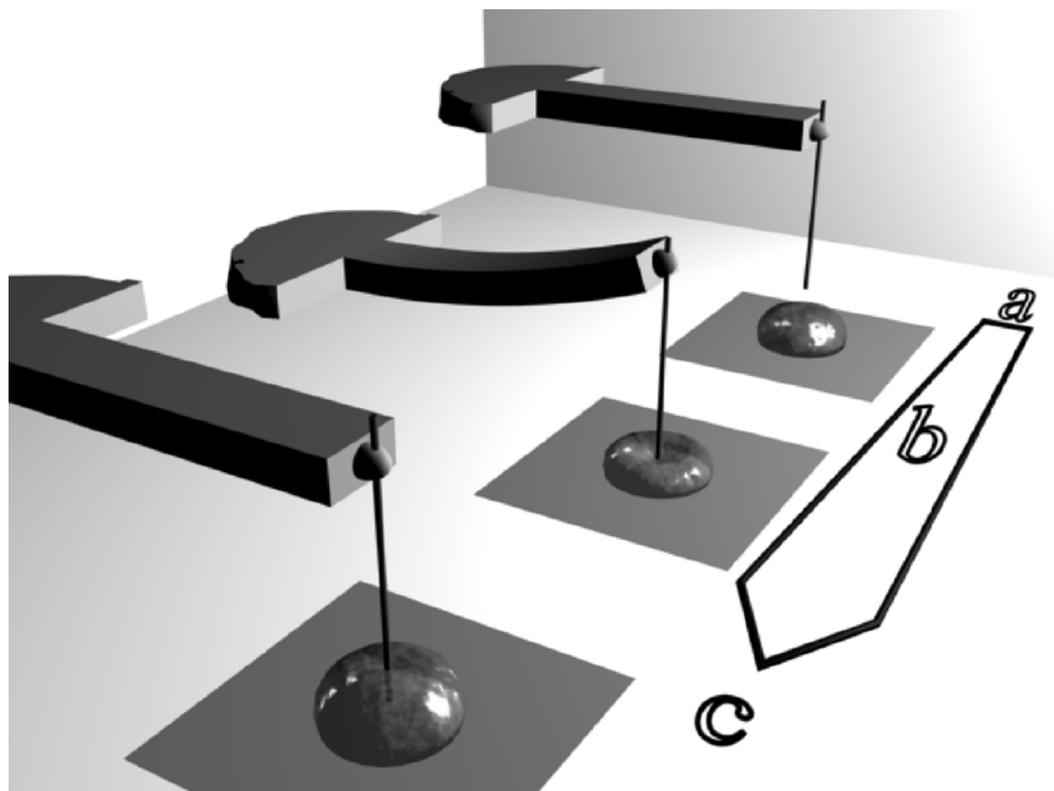


Рис. 3. Этапы прокалывания клетки иглой, прикрепленной к кантилеверу АСМ

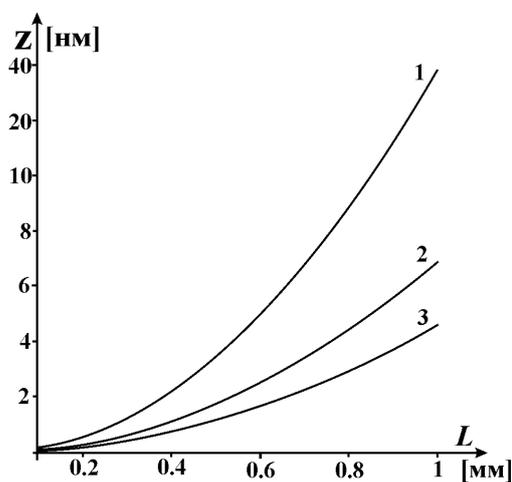


Рис. 4. Графики отклонения кантилевера от плоского состояния в зависимости от длины кантилевера при силе давления иглы в 1 нН

подбирать кантилевер согласно требованиям текущих исследований. Для оценки требуемых характеристик кантилевера проведем решение следующей задачи.

Пусть игла крепится к горизонтальному, прямоугольному кантилеверу, как показано

на рис. 3. Тогда изгиб кантилевера сосредоточенной силой, приложенной к незакрепленному концу, описывается формулой [24]:

$$\frac{d^2z}{dx^2} = 12 \frac{P(A-x)}{E(4A^2 + B^2 + C^2)}, \quad (3)$$

где z – величина отклонения кантилевера от горизонтали в точке x . Ось $0x$ проходит сквозь центр кантилевера от закрепленного (на рис. 4 – левый край) к свободному краю, на котором игла давит на поверхность клетки; P – сила, с которой игла давит на поверхность клетки; A – длина, B – ширина, C – толщина кантилевера; E – модуль упругости кантилевера. Считая, что закрепленный конец кантилевера всегда остается плоским и интегрируя (3), получаем выражение, описывающие форму искривленного кантилевера:

$$z = 12 \frac{P}{E(4A^2 + B^2 + C^2)} \left(\frac{1}{2} Ax^2 - \frac{1}{6} x^3 \right).$$

На рис. 4 приведены величины отклонений кантилеверов различной длины от плоского состояния, при силе давления иглы в 1 нН, достаточной для проникновения в клетку описанных выше трубок с диаметром

2 мкм. Хорошо видно, что даже для небольших длин кантилеверов (200–400 мкм) отклонения превышают величину в 1 нм, легко регистрируемую даже простейшим атомно-силовым микроскопом. Массовое изготовление чипов кантилеверов с трубками заданных диаметров, имеющих атомно тонкие острия и позволяющих контролируемо проникать в клетку, открывают новые возможности работы с живыми клетками.

Расчеты выполнены для кантилевера из негативного фоторезиста марки Su-8, имеющего ширину $B = 80$ мкм и толщину $C = 1$ мкм (зависимость 1), 2 мкм (зависимость 2) и 3 мкм (зависимость 3).

Выводы

Показано, что новые трубчатые иглы (графен-полупроводниковые, графеновые), имеющие острие в виде трапецевидной незамкнутой цилиндрической оболочки, сохраняют устойчивость при осевых усилиях, превышающих усилия для проникновения в клетку на 3 и 6 порядков соответственно.

Показано, что использование кантилеверов с трубчатыми иглами, имеющими атомно тонкие острия, позволяет контролируемо проникать в клетку, что открывает новые возможности работы с живыми клетками.

Список литературы

1. Kasparov S., Teschemacher A. G., Hwang D. Y., Kim K. S., Lonergan T., Paton J. F. Viral Vectors as Tools for Studies of Central Cardiovascular Control // *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 2004. Vol. 84 (2–3). P. 251–277.
2. Suzuki M., Takayanagi A., Shimizu N. Targeted Gene Delivery Using Humanized Single-Chain Antibody with Negatively Charged Oligopeptide Tail // *Cancer Sci.* 2004. Vol. 95 (5). P. 424–429.
3. Hattori Y., Kawakami S., Suzuki S., Yamashita F., Hashida M. Enhancement of Immune Responses by DNA Vaccination through Targeted Gene Delivery Using Mannosylated Cationic Liposome Formulations Following Intravenous Administration in Mice // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2004. Vol. 317 (4). P. 992–999.
4. Torchilin V. P., Levchenko T. S., Rammo-han R., Volodina N., Papahadjopoulos-Sternberg B., D'Souza G. G. M. Cell Transfection in vitro and in vivo with Nontoxic TAT Peptide-

Liposome-DNA Complexes // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2003. Vol. 100 (4). P. 1972–1977.

5. Corsi K., Chellat F., Yahia L., Fernandes J. C. Mesenchymal Stem Cells, MG63 and HEK293 Transfection Using Chitosan-DNA Nanoparticles // *Biomaterials.* 2003. Vol. 24 (7). P. 1255–1264.

6. DeBruin K. A., Krassowska W. Modeling Electroporation in a Single Cell. II: Effects of Ionic Concentrations // *Biophys. J.* 1999. Vol. 77 (3). P. 1225–1233.

7. Tsulaia T. V., Prokopishyn N. L., Yao A., Carsrud N. D., Caroua M. C., Brown D. B., Davis B. R., Yannariello-Brown J. Glass Needle-Mediated Microinjection of Macromolecules and Transgenes into Primary Human Mesenchymal Stem Cells // *J. Biomed. Sci.* 2003. Vol. 10. P. 328–336.

8. Knoblauch M., Hibberd J. M., Gray J. C., Bel A. J. van. A Galinstan Expansion Femtosyringe for Microinjection of Eukaryotic Organelles and Prokaryotes // *Nat. Biotechnol.* 1999. Vol. 17. P. 906–909.

9. Bird M. M., Lopez-Lluch G., Ridley A. J., Segal W. Effects of Microinjected Small GTPases on the Actin Cytoskeleton of Human Neutrophils // *J. Anat.* 2003. Vol. 203. P. 379–389.

10. Ito K., Otake S., Hirabayashi M., Hoshi S., Ueda M. Cryopreservation of in vitro-derived Bovine Blastocysts Microinjected with Foreign DNA at the Pronuclear Stage // *Theriogenology* 1998. Vol. 50. P. 1093–1100.

11. Fotiadis D., Scheuring S., Muller S. A., Engel A., Muller D. J. Imaging and Manipulation of Biological Structures with the AFM // *Micron.* 2002. Vol. 33. P. 385–397.

12. Wojcikiewicz E. P., Zhang X., Moy V. T. Force and Compliance Measurements on Living Cells Using Atomic Force Microscopy (AFM) // *Biol. Proc.* 2004. Online 6. P. 1–9.

13. Hategan A., Law R., Kahn S., Discher D. E. Adhesively-Tensed Cell Membranes: Lysis Kinetics and Atomic Force Microscopy Probing // *Biophys. J.* 2003. Vol. 85. P. 2746–2759.

14. Obataya I., Nakamura Ch., Han S. W., Nakamura N., Miyake J. Mechanical Sensing of the Penetration of Various Nanoneedles into a Living Cell Using Atomic Force Microscopy // *Biosensors and Bioelectronics.* 2005. Vol. 20. P. 1652–1655.

15. Chen X., Kis A., Zettl A., Bertozzi C. R. A Cell Nanoinjector Based on Carbon Nano-

tubes // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2007. Vol. 104 (20). P. 8218–8222.

16. Prinz V. Ya., Seleznev V. A., Gutakovskiy A. K., Chehovskiy A. V., Preobrazhenskii V. V., Putyato M. A., Gavrilova T. A. Free-Standing and Overgrown InGaAs/GaAs Nanotubes, Nanohelices and Their Arrays // Physica E. 2000. Vol. 6. P. 828.

17. Prinz V. Ya., Grützmacher D., Beyer A., David C., Ketterer B., Deckardt E. A New Technique for Fabricating Three-Dimensional Micro- and Nanostructures of Various Shapes // Nanotechnology. 2001. Vol. 12. P. 399–402.

18. Prinz V. Ya. A New Concept in Fabricating Building Blocks for Nanoelectronic and Nanomechanic Devices // Microelectron. Eng. 2003. Vol. 69. P. 466.

19. Prinz A. V., Prinz V. Ya., Seleznev V. A. Semiconductor Micro- and Nanoneedles for Microinjections and Ink-Jet Printing // Microelectronic Engineering. 2003. Vol. 67–68. P. 782–788.

20. Prinz A. V., Prinz V. Ya. Application of Semiconductor Micro- and Nanotubes in Biology // Surface Science. 2003. Vol. 532–535. P. 911–915.

21. Timoshenko S. P., Goodier J. N. Theory of Elasticity. N. Y.: McGraw-Hill Book Company, Inc. 1970.

22. Timoshenko S. P., Woinowsky-Krieger S. Theory of Plates and Shells. N. Y.: McGraw-Hill Book Company, Inc. 1959.

23. Han S. W., Nakamura Ch., Obataya I., Nakamura N., Miyake J. Gene Expression Using an Ultrathin Needle Enabling Accurate Displacement and Low Invasiveness // Biochemical and Biophysical Research Communications. 2005. Vol. 332. P. 633–639.

24. Ландау Л. Д., Лифшиц Е. М. Теоретическая физика. М.: «Наука», 1987. Т. 7.

Материал поступил в редколлегию

A. V. Kopylov, V. Ya. Prinz

GRAPHENE-SEMICONDUCTOR TUBULAR NEEDLES FOR OPERATIONS OF LIVING CELLS

The possibility of application of the novel class of tubular needles for piercing cells and injecting biological material inside the cell is considered. Stability calculations of tubular (multiwall) needles were made. Calculations were made for the needles with walls formed from hybrid graphene-semiconductor or graphene structures and spires shaped as trapeziform open cylindrical shells. The possibility of mass fabrication of such needles and chips for AFM significantly broadens the range of available operations on the surface and inside the living cell and opens prospects of effective high-precision manipulations with individual cells.

Keywords: graphene-semiconductor, tubular needles, living cells.