

УДК 544.72+681.2

Д.В. Колесов, Г.А. Киселев, А.С. Ерофеев

*ООО «Академия Биосенсоров», 119311, г. Москва, ул. Строителей, 4-5-47;
e-mail: kolesov@nanoscopy.ru*

РАЗРАБОТКА МИКРОМЕХАНИЧЕСКИХ КАНТИЛЕВЕРНЫХ СИСТЕМ ДЛЯ МОЛЕКУЛЯРНОГО АНАЛИЗА*Получена 9 ноября 2011 года**Опубликована 28 ноября 2011 года*

05.11.00 Приборостроение, метрология и информационно-измерительные приборы и системы

Для быстрой и достоверной диагностики заболеваний необходимы методы анализа, позволяющие определять наличие специфических биомаркеров с высокой чувствительностью и в короткие сроки. Использование сенсоров на основе микромеханических кантилеверных систем позволяет проводить многопараметрический мониторинг биосред без использования меток. В статье описана разработка и создание прибора для анализа содержания биологических объектов, таких как отдельные биомакромолекулы, белки, антитела в жидких средах. Использование массива оптических волокон позволило организовать съем данных с 8 микроконсольей одновременно. С использованием разработанного оборудования проведено исследование устойчивости взаимодействия ионов серебра с электроно-донорными группами, иммобилизованными на твердой подложке.

Ключевые слова: биосенсор, межмолекулярное взаимодействие, поверхностное натяжение, кантилевер, молекулярное распознавание

ВВЕДЕНИЕ

В современной медицине существует проблема быстрой и достоверной диагностики заболеваний, отслеживания симптомов до наступления острой фазы. Для решения этой задачи необходима разработка новых методов анализа, позволяющих определять наличие низких концентраций специфических биомаркеров в короткие сроки, с возможностью проведения мониторинга в режиме реального времени. Существующие методы анализа, такие как латеральный иммунохроматографический анализ (ЛИХА) или твердофазный иммуноферментный анализ (ТИФА) предлагают либо

чувствительность, либо скорость анализа и ни один из них не позволяет вести мониторинг в режиме реального времени [1].

Сенсоры на основе микромеханических кантилеверных систем могут стать решением данных задач. При использовании кантилеверов – датчиков, чрезвычайно чувствительных к силовому воздействию, – сенсор может регистрировать малейшее изменение поверхностных сил в результате адсорбции исследуемого вещества на его поверхность. Эти свойства кантилевера обеспечивают чувствительность по определению малых концентраций биологических веществ на уровне 1 нМ и даже ниже [2]. Благодаря высокой частоте и добротности резонансных колебаний кантилевера его можно использовать в качестве измерителя массы адсорбированных веществ с точностью до 10^{-18} г [3]. В случае использования кантилеверов с несколькими консолями, содержащими различные рецепторные слои, можно добиться высокой селективности и проводить комплексный анализ. Целью данной работы является разработка отечественной приборной базы, позволяющей проводить научные исследования в области анализа межмолекулярных сил взаимодействия, а также открывающей перспективы по созданию высокоселективных и чувствительных методов диагностики.

Общие принципы сенсорных устройств

Основной концепцией построения сенсоров является преобразование физической величины, характеризующей взаимодействие аналита с сенсором, в детектируемый полезный сигнал [4]. Для обеспечения селективности используются специальные сенсорные слои, работающие по принципу молекулярного распознавания (Рис.1).

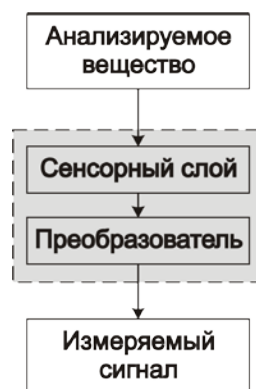


Рис. 1 Принцип действия сенсоров

До конца 1980-х основными типами преобразователей были тепловой, электрохимический, оптический и на основе измерения массы [5,6]. В последние два десятилетия, в связи с развитием микроэлектромеханических систем (МЭМС), появился новый тип преобразователей – механический. Важным этапом в развитии сенсоров на базе МЭМС стало создание технологии массового микропроизводства кантилеверов для сканирующей зондовой микроскопии [7]. В результате сформировалось целое семейство физических, химических и биологических сенсоров, основанных на микрокантилеверной технологии [8-10]. Кантилевер представляет собой закрепленную на чипе одну или несколько тонких пластин (консолей). При создании сенсоров обычно используют несколько консолей. Это позволяет повысить селективность сенсора за счет фильтрации актов неспецифического связывания и дает возможность проводить анализ содержания сразу нескольких аналитов. В основе сенсора лежит преобразование химической энергии взаимодействия аналита и сенсорного слоя в изменение механических характеристик консоли кантилевера, таких как деформация или резонансная частота.

Отдельным важным подвидом сенсоров являются биосенсоры – это сенсорные устройства, в которых наличие и активность молекул определяется с помощью биомолекул [11]. На основе кантилеверов были

созданы очень чувствительные биологические сенсоры с селективными покрытиями для распознавания ДНК [12-14], антигенов [15], белков [16].

Режимы работы

В зависимости от физической величины, изменение которой фиксируется в процессе взаимодействия аналита и сенсорного слоя, различают несколько основных режимов работы микрокантилеверных сенсоров: динамический, статический и биметаллический (Рис.2) [17].

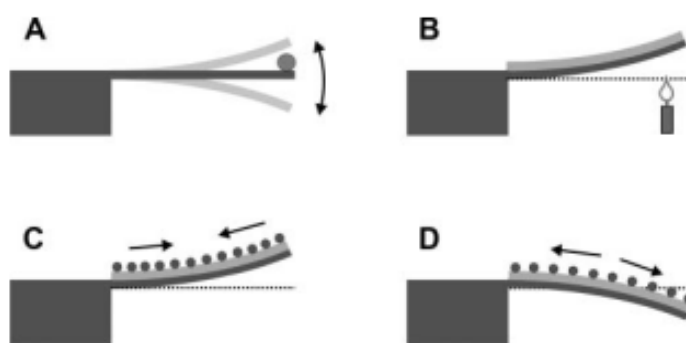


Рис. 2 Режим работы микрокантилеверных сенсоров: (А) динамический; (В) биметаллический; (С, D) статический

Динамический режим. В динамическом (или резонансном) режиме кантилевер возбуждается на частоте, близкой к его резонансной, которая обычно лежит в диапазоне от нескольких кГц до нескольких МГц. Когда дополнительная масса садится на кантилевер, его резонансная частота меняется. Это достаточно очевидно, так как простейшей аппроксимацией кантилевера является гармонический осциллятор с частотой:

$$f = \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{k}{m_{\text{эф}}}},$$

где k – жесткость консоли кантилевера, $m_{\text{эф}}$ – эффективная масса кантилевера. С определенной геометрией кантилевера и в условиях высокого вакуума существует возможность измерять массу одной молекулы [18].

Статический режим. Статический режим измерений является самым распространенным режимом измерений в кантилеверных сенсорах. Процессы, проходящие в иммобилизованном на кантилевере сенсорном слое, вызывают возникновение механического напряжения на поверхности, приводящего к сжатию или растяжению модифицированной стороны кантилевера. При этом, если другая сторона консоли остается ненапряженной, это приводит к возникновению разности сил поверхностного напряжения, обусловленной межмолекулярным взаимодействием в сенсорном слое, и кантилевер изгибается. В зависимости от природы взаимодействия, напряжение может быть положительным или отрицательным, что приводит к изгибу кантилевера в ту или иную сторону. Механизм возникновения поверхностного натяжения до конца не ясен. Существуют различные модели и теории. Одной из самых распространенных формул, позволяющих получить количественные данные о поверхностных силах является формула Стоуни [19]:

$$\Delta\sigma = \frac{Et^2}{3(1-\nu)L^2} \Delta z$$

Она связывает значение разности сил поверхностного напряжения на верхней и нижней сторонах кантилевера и измеряемое перемещение конца консоли через геометрические размеры (L – длина, t – толщина) и параметры материала (E – модуль Юнга, ν – коэффициент Пуассона) кантилевера. Данная формула справедлива в предположении тонкой (по сравнению с кантилевером) пленки и малых отклонений.

Биметаллический режим. Часто кантилеверы покрыты тонким слоем металла, коэффициент теплового расширения которого отличается от коэффициента кремния. Такие кантилеверы изгибаются при изменении температуры и могут служить биметаллическими сенсорами. Выделение или поглощение тепла может происходить в результате реакции взаимодействия

аналита и сенсорного слоя. Связь отклонения кантилевера и изменения температуры дается формулой, опубликованной в статье Тимошенко [20]. При оптимизации установки возможно проводить измерения изменений температуры менее 10^{-5} К и калометрические измерения с чувствительностью до 10^{-15} Дж [21].

Применение биосенсоров

Первые применения кантилеверных сенсоров для биологических систем были опубликованы в 1996 году с использованием одного кантилевера [17]. Впервые применение биосенсоров на основе массива кантилеверов было продемонстрировано в 2000 году для определения несовпадения одного основания между сенсорной и анализируемой молекулами ДНК [22]. Вскоре за этим последовали более детальные эксперименты, показывающие зависимость изгиба кантилевера от длины цепи, плотности пришивки и ориентации молекул ДНК и одновременно демонстрирующие возможность параллельного детектирования разных последовательностей в среде с большим количеством неспецифичных веществ [23, 24]. Наиболее впечатляющим экспериментом с нуклеиновыми кислотами является определение неамплифицированной РНК в общей массе РНК клетки с пределом концентрацией в 10 пМ [25].

Применение кантилеверных биосенсоров для определения белков было показано на примерах антигенов рака простаты [26], определения глюкозы с помощью фермента глюкоза-оксидазы [27], для определения кардио-биомаркеров на основе белков [28]. Используя одноцепочечные фрагменты антител, иммобилизованных на поверхности кантилевера, можно определять концентрации пептидов вплоть до наномолярных [29]. Применение аптамеров может снизить этот предел до 1 пМ [30].

КОНСТРУКЦИЯ ПРИБОРА

Нашей задачей была разработка отечественного прибора, позволяющего проводить регистрацию аналитов по изменению механических свойств микрокантилеверного чипа: резонансной частоты и статического изгиба. Для того чтобы определять одновременно несколько типов аналитов или производить одновременный съем сигнала сразу с нескольких однотипных образцов, тем самым повышая достоверность результатов, необходимо использовать кантилеверный чип с восемью консолями. Расстояние между консолями определяет параметры лазерно-оптической системы, как правило, в коммерчески доступных многоконсольных кантилеверах расстояние между ними составляет 250 мкм, это своего рода негласный стандарт, выбранный несколькими мировыми производителями микроконсолей. Для освещения кантилеверных консолей необходимо позиционировать лазерные рефлексы с диаметром менее 100 мкм (ширина консоли) на расстояние 250 мкм друг от друга. Предложенное нами решение заключается в использовании торцевых частей оптических волокон (ОВ) с внешним диаметром 120 мкм, в которые введено излучение лазера (LaserEx, Австралия). Волокна собираются в массив с расстоянием между сердцевинами 250 мкм (Рис. 3). Три зеркала и две собирающие линзы (Thorlabs, США) с фокусным расстоянием 60 мм передают изображение торцов оптоволокон на консоли кантилевера. Выбор фокусного расстояния обусловлен угловой апертурой ОВ 14 градусов, а также размерами фотодиода (Hamamatsu, Япония).

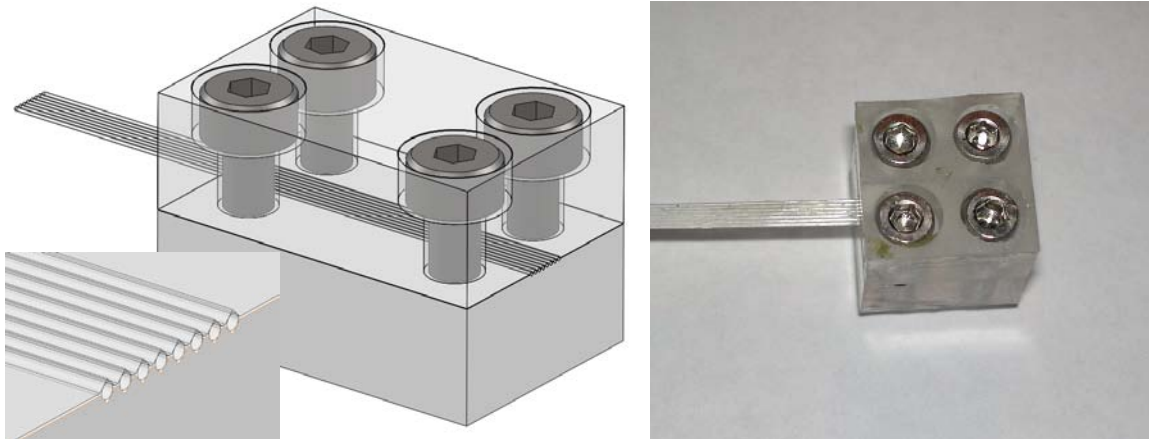


Рис. 3. Массив оптических волокон: модель (слева) и фотография (справа)

На рисунке 4 показано схематическое изображение механико-оптической части разработанной системы, которая состоит из следующих основных компонентов:

1. ОВ (оптоволоконный) массив;
2. система линз;
3. микрочип с 8 микроконсолями (массив кантилеверов);
4. многосекционный фотодиод.

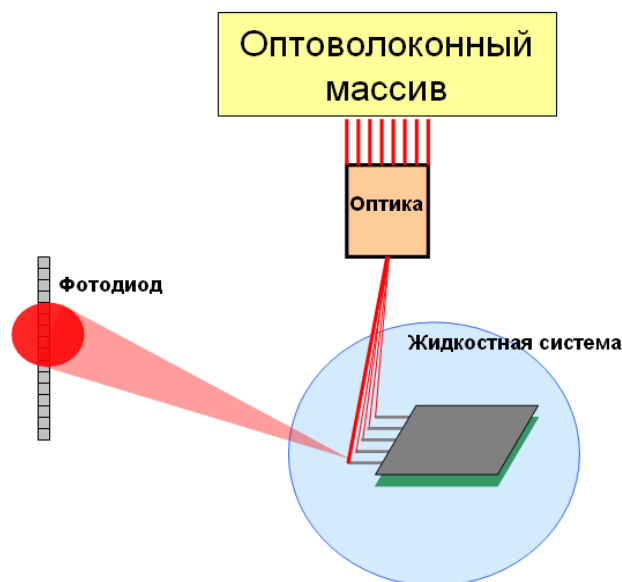


Рис. 4. Схематическое изображение механической части микромеханической кантилеверной системы

Для визуальной настройки лазерного излучения на кантилеверы в приборе имеется система видеонаблюдения. Оптическое увеличение системы составляет 2. Использование цифровой КМОП матрицы (ЭВС, Россия) позволяет довести суммарное увеличение до более чем 30 раз (в зависимости от используемого экрана компьютера). Такое увеличение является оптимальным для наблюдения за кантилеверами, т.к. длина кантилерных консолей равна 500 мкм, а в поле наблюдения должны попадать одновременно не менее восьми кантилеверов расположенных на расстоянии 250 мкм.

Жидкостная система прибора изготовлена из полимерного материала политетрафторэтилена, что позволяет производить измерения в большинстве биологических жидкостей. Особая конструкция ячейки позволяет избежать образования пузырей в рабочей камере прибора и обеспечивает равномерный приток исследуемой жидкости к кантилеверным датчикам. Жидкостная система может быть подключена к помпе или перистальтическому насосу для обеспечения автоматического ввода или циркуляции образца. Объем рабочей камеры составляет менее 200 мкл.

Описанная система была спроектирована и изготовлена. Фотография прибора представлена на рисунке 5. Параметры прибора приведены в таблице 1.



Рис. 5. Прибор для определения аналитов с помощью микромеханической катилеверных датчиков

Управление прибором и обработка результатов производится с помощью специализированного программного обеспечения, разработанного в среде программирования LabView (National Instruments, США). Программа позволяет переключать режимы измерений, управлять работой лазерных модулей, входящих в состав прибора, производить настройку прибора с помощью системы видеонаблюдения, задавать параметры измерений, записывать и обрабатывать экспериментальные данные.

Таблица 1. Характеристики прибора для определения аналитов с помощью микромеханической кантилеверных датчиков

<i>Параметр</i>	<i>Значение</i>
Количество каналов съема данных	8
Режимы работы	Статический, динамический
Увеличение системы видеонаблюдения	не менее 30 раз
Точность термостатирования ячейки	1 °С
Чувствительность определения положения кантилевера	менее 3 нм
Чувствительность определения латеральных напряжений в слое, сформированном на поверхности кантилевера	менее 10^{-3} Н/м
Чувствительность определения массы	менее 0,01 нг

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ

Прибор был использован для изучения взаимодействия ионов серебра с электроно-донорными группами. Серебро образует координационные соединения с тио- и аминогруппами. Это свойство используется в аналитической химии для определения наличия серебра в растворе [31]. Мы исследовали устойчивость взаимодействия ионов металла с электроно-донорными группами, иммобилизованными на твердой подложке. В работе использовались два кантилевера CSG01 (НТ-МДТ, Россия), один из которых использовался в качестве реперного. Одна из сторон кантилеверов была покрыта тонким слоем золота. Вначале кантилеверы выдерживались под ультрафиолетом в течение 10-15 минут, промывались водой и спиртом для удаления органического налета. Затем оба кантилевера помещались в 2-тиоэтанол на не менее чем 8 часов для пассивирования золотой поверхности. Затем кантилеверы промывались водой. Один из кантилеверов

дополнительно промывался толуолом и выдерживался в однопроцентном растворе 3-аминопропилтриэтоксисилана или 3-тиопропилтриэтоксисилана в течение 40 минут. Далее кантилеверы прочно закреплялись в герметичной ячейке прибора, которая заполнялась водой. После получения устойчивой разности в отклонениях кантилеверов, в ячейку закачивался раствор нитрата серебра концентрацией 10^{-3} М. На рисунке 6 приведены графики зависимости латеральных напряжений, возникающих в сенсорном слое на поверхности кантилевера в результате образования комплексов от времени. Суммарное изменение поверхностного напряжения для тиольной группы и аминогруппы составило 0,012 Н/м и 0,002 Н/м соответственно. Это означает, что ионы серебра сильнее связываются с тиогруппами, чем аминогруппами. Согласно литературе, константа стабильности комплекса серебра с аминогруппами составляет $\lg\beta_2=7,68$, а константа диссоциации соединения серебра с серой составляет $\lg K=-24,05$, что соответствует результатам эксперимента.

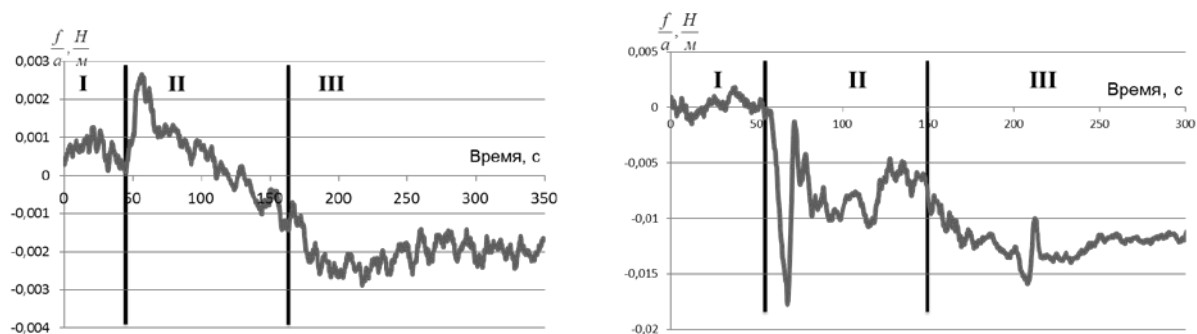


Рис. 6. Развитие латеральных напряжений в сенсорном слое на поверхности кантилевера в процессе образования комплексов Ag^+ с 3-аминопропилтриэтоксисиланом (слева) и 3-тиопропилтриэтоксисиланом(справа) от времени. I – область стабилизации кантилеверов в воде; II – область ввода в ячейку нитрата серебра; III – область стабилизации кантилеверов в растворе нитрата серебра

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разработан и создан прибор для анализа содержания биологических объектов, таких как отдельные биомакромолекулы, белки, антитела, в жидких средах. Использование массива оптических волокон позволило

организовать съём данных с 8 микроконсолей одновременно. Прибор может быть использован как для лабораторной диагностики в качестве биосенсора, так и для научных исследований межмолекулярных взаимодействий в монослоях биомолекул, иммобилизованных на твердой подложке. Показано, что стабильность соединения серебра с серой выше, чем координационного комплекса иона серебра с аминогруппой.

Работа выполнена при поддержке ФЦП «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2007 – 2013 годы» ГК №16.513.11.3021.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. J.L. Arlett, E.B. Myers, M.L. Roukes. Comparative advantages of mechanical biosensors // *Nature Nanotechnology*. 2011. Vol. 6. P. 203–215.
2. N.V. Lavrik, M.J. Sepaniak, P.G. Datskos. Cantilever transducers as a platform for chemical and biological sensors // *Rev. of Sci. Ins.* 2004. Vol. 75. P. 2229-2253.
3. Li M., Tang H.X., Roukes M.L. Ultra-sensitive NEMS-based cantilevers for sensing, scanned probe and very high-frequency applications // *Nature Nanotechnology* 2007. Vol. 2. P. 114.
4. J. Janata, *Principles of Chemical Sensors* // Plenum. New York. 1989.
5. J. Janata, M. Josowicz, and D. M. Devaney, *Chemical sensors* // *Anal. Chem.*. 1994. Vol. 66. P. R207.
6. J. Janata, *Chemical sensors* // *Anal. Chem.*. 1990. Vol. 62. P. 33R.
7. G. Binnig, C. F. Quate, and C. Gerber, *Atomic force microscope* // *Phys. Rev. Lett.*. 1986. Vol. 56. P. 930.
8. E. A. Wachter and T. Thundat, *Micromechanical sensors for chemical and physical measurements* // *Rev. Sci. Instrum.*. 1995. Vol. 66. P. 3662.
9. P. G. Datskos, M. J. Sepaniak, C. A. Tipple, and N. Lavrik, *Photomechanical chemical microsensors* // *Sens. Actuators B*. 2001. Vol. 76. P. 393.

10. A. M. Moulin, S. J. O'Shea, and M. E. Welland, Microcantilever-based biosensors // *Ultramicroscopy*. 2000. Vol. 82. P. 23.
11. Fritz J., Cantilever biosensors // *Analyst*. 2008. Vol. 133, P. 855–863.
12. Park K., Daniel J.J., Sturgis I.J., Leeyy J., Robinsonzz J.P., Rashid M.T., Living cantilever arrays' for characterization of mass of single live cells in fluids // *Lab Chip*. 2008. Vol. 8. P. 1034-1041.
13. Lang H.P., Hegner M., Gerber C. Cantilever array sensors // *Materials Today*. 2005. Vol. 8 (4). P.30.
14. Marie, R.; Jensenius, H.; Thaysen, J.; Christensen, C. B.; Biosen, A. Adsorption kinetics and mechanical properties of thiol-modified DNA-oligos on gold investigated by microcantilever sensors // *Ultramicroscopy*. 2002. Vol. 91. P. 29–36.
15. Lee J.H., Hwang K.S., Park J., Yoon K.H., Yoon D.S., Kim T.S., Immunoassay of prostate-specific antigen (PSA) using resonant frequency shift of piezoelectric nanomechanical microcantilever // *Biosensors and Bioelectronics*. 2005. Vol. 20 (10). P. 2157.
16. Shu, W.; Laurenson, S.; Knowles, T. P. J.; Ferrigno, P. K.; Seshia, A. A. Highly specific label-free protein detection from lysed cells using internally referenced microcantilever sensors // *Biosens. Bioelectron.* 2008. Vol. 24. P. 233–237.
17. Butt H.-J. A Sensitive Method to Measure Changes in the Surface Stress of Solids // *J. Colloid Interface Sci.* – 1996. Vol. 180. P. 251-260.
18. J. Yang, T. Ono and M. Esashi, Mechanical behavior of ultrathin microcantilever // *Sens. Actuators, A*. 2000. Vol. 82. P. 102–107.
19. Stoney, G. G. The Tension of Metallic Films Deposited by Electrolysis // *Proc. R. Soc. (London)* – 1909. Vol. 82. P. 172–175.
20. Timoshenko S. Analysis of Bi-metal Thermostats, // *J. Opt. Soc. Am.* 1925. Vol. 11. P. 233–255.

21. Ziegler C., Cantilever-based biosensors // *Anal. Bioanal. Chem.*. 2004. Vol. 379. P. 946-959.
22. Fritz J., Baller M. K., Lang H. P., Rothuizen H., Vettiger P., Meyer E., Guntherodt H. J., Gimzewski J. K. Translating Biomolecular Recognition into Nanomechanics// *Science*. 2000. Vol. 288. P. 316-318.
23. Hansen K., Ji H., Wu G. H., Datar R., Cote R., Majumdar A. Effect of single nucleotide polymorphisms (SNPs) on Nanomechanical Motion // *Anal. Chem.* 2001. Vol. 73. P. 1567-1571.
24. McKendry R., Zhang J. Y., Arntz Y., Strunz T., Hegner M., Lang H.P., Baller M. K., Certa U., Meyer E., Guntherodt H. J., Gerber C. Multiple label-free biodetection and quantitative DNA-binding assays on a nanomechanical cantilever array // *Proc. Nat.Acad. Sci. U.S.A.* – 2002. Vol. 99. P. 9783-9788.
25. Zhang, H. P. Lang, F. Huber, A. Bietsch, W. Grange, U. Certa, R. McKendry, H.-J. Guntherodt, M. Hegner and C. Gerber, Rapid and label-free nanomechanical detection of biomarker transcripts in human RNA // *Nat. Nanotechnol.*, 2006. Vol. 1. P. 214–220.
26. Wu G.H., Datar R., Hansen K., Thundat T., Cote R., Majumdar A. Bioassay of prostate-specific antigen (PSA) using microcantilevers // *Nat. Biotechnol.* 2001. Vol. 19. P. 856-860.
27. X. Yan, X. K. Xu, and H.-F. Ji. Glucose Oxidase Multilayer Modified Microcantilever for Glucose Measurement // *Anal. Chem.* 2005. Vol. 77(19). P. 6197-6204.
28. Y. Arntz, J. D. Seelig, H. P. Lang, J. Zhang, P. Hunziker, J. P. Ramseyer, E. Meyer, M. Hegner and C. Gerber, Label-free protein assay based on a nanomechanical cantilever array // *Nanotechnology*. 2003. Vol. 14. P. 86–90.

29. Backmann, N.; Zahnd, C.; Huber, F.; Bietsch, A.; Pluckthun, A.; Lang, H.-P.; Guntherodt, H.-J.; Hegner, M.; Gerber, C. A label-free immunosensor array using single-chain antibody fragments // PNAS. 2005. Vol. 102. P. 14587– 14592.
30. C.A. Savran, S.M. Knudsen, A.D. Ellington, S.R. Manalis. Micromechanical detection of proteins using aptamer-based receptor molecules // Anal Chem. 2004. Vol. 76, No.11. P.3194–3198.
31. И.В. Пятницкий, В.В. Сухан. Аналитическая химия серебра. М.: Наука. 1975. 264 с.