

УДК 531.384

Н.Ю. ГЕТМАНЕНКО

*Харьковский национальный университет радиоэлектроники, Украина***СЕНСОРНОЕ УСТРОЙСТВО НА ОСНОВЕ КАНТИЛЕВЕРНЫХ СИСТЕМ АТОМНО-СИЛОВОГО МИКРОСКОПА ДЛЯ ОБНАРУЖЕНИЯ ВИРУСА VARICELLA ZOSTER ШТАММА ОКА**

Предложен новый вид сенсорного устройства для регистрации антител человека в растворе. Сенсорное устройство реализовано на базе атомно-силового микроскопа (АСМ). Принцип работы устройства основан на зависимости частоты собственных колебаний консольной балки (кантилевера) от ее массы. Преимуществом данного устройства является высокая чувствительность, устройство реагирует на изменение массы в единицы пикограмм. Приведены результаты работы устройства при обнаружении вируса ветряной оспы Varicella Zoster штамма Ока. Рассмотрен метод иммобилизации антител человека на поверхность кремниевых кантилеверов.

Ключевые слова: атомно-силовой микроскоп, кантилевер, сенсор, Varicella Zoster штамм Ока.

Введение

Следуя тенденциям полупроводниковой электроники, механические устройства стремительно уменьшают свои размеры и сейчас уже находятся в субмикронной области. Разработанные наномеханические структуры обладают чрезвычайно высокой резонансной частотой собственных колебаний и низкой массой. Дополнительным и важным свойством этих устройств является высокая добротность (Q). Она в настоящее время находится в диапазоне $Q \approx 10^3 - 10^5$, что значительно выше, чем у электрических колебательных контуров. Этот уникальный набор свойств делает возможным фиксировать с высокой чувствительностью изменение массы при высоких резонансных частотах, что открывает новые области сенсорного применения.

Одной из таких областей является разработка сенсорных устройств, позволяющих определять возбудителей опасных вирусных и инфекционных заболеваний человека.

В настоящее время исследователями ведутся работы по созданию сенсорных устройств на основе кантилеверов на таких возбудителях инфекционных заболеваний как *Aspergillus niger* Spores [1], *Escherichia coli* [2].

Принцип работы сенсорного устройства основан на изменении частоты собственных колебаний кантилевера под действием присоединенной массы [3]. При разработке подобных устройств особое внимание следует уделить формированию акцепторного слоя сенсора. В работе [4] предложен метод иммобилизации антител на поверхность кремниевых кантилеверов.

Несмотря на большое количество научных публикаций в мире в области сенсоров на основе кантилеверов, в отечественных публикациях данная тематика практически не раскрыта. Очевидно, что работы в данной области имеют высокую научную ценность для отечественной науки, т.к. данные устройства позволяют не только детектировать различные вещества, но и в режиме реального времени наблюдать процессы формирования слоев детектируемого вещества на поверхности кантилевера. В данной работе в качестве анализируемого вещества выступает вирус ветряной оспы *Varicella Zoster* штамм Ока. Динамические исследования резонансных частот собственных колебаний кантилеверов с иммобилизованными на их поверхности специфическими антителами при образовании специфического комплекса антиген-антитело дают новые данные о протекании процессов формирования специфического иммунного комплекса и о влиянии на их образование внешних факторов.

Поэтому актуальной научной проблемой является развитие методов образования акцепторных слоев на поверхности кантилеверов на заданные аналиты и разработки сенсорных устройств на основе модифицированных кантилеверов.

Постановка задачи исследования

Целью данной работы является создание опытного образца сенсора на основе стандартных промышленных кантилеверов. Для достижения поставленной цели в данной работе были решены следующие задачи: был сформирован акцепторный селективный слой на рабочей поверхности кантилевера, путем иммобилизации на поверхности кремния

специфических антител к вирусу Varicella Zoster, исследовано поведение сенсора в присутствии аналита и в буферной среде без аналита, исследован отклик сенсора на присутствие аналита во временном интервале.

Материалы, оборудования и метод

В работе использовались кантилеверы серии NSC35 производства «Mikromash» (рис. 1). Характеристики кантилеверов приведены в табл. 1. Работа проводилась с балкой В.

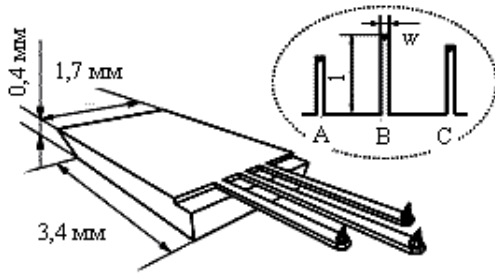


Рис. 1. Схематическое изображение кремниевого чипа с тремя кантилеверами производства «Mikromash» серии NSC35

В качестве измерительного устройства использовался атомно-силовой микроскоп (АСМ) NT-206 производства ОДО «Микротестмашины» (г. Гомель, Беларусь). Возбуждение колебаний производилось

пьезокварцевым генератором, входящим в состав АСМ. Измерение частоты проводилось с помощью оптической системы (рис. 2).

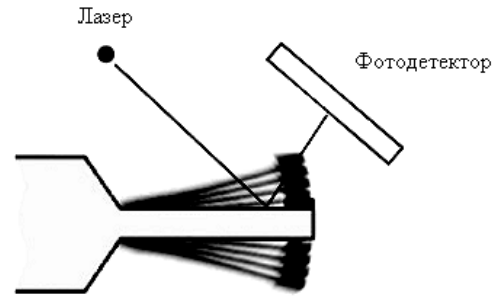


Рис. 2. Схема измерения частоты собственных колебаний кантилевера

При модификации кремниевых кантилеверов использовались следующие материалы: 3-аминопропилтриэтоксисилан АПТЭС Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Buchs, Switzerland), глутаровый альдегид Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Buchs, Switzerland), бидистиллированная вода, абсолютированный этанол ГП «Завод химических реактивов» (г. Харьков, Украина), препарат «зостевир», содержащий специфические антитела к вирусу Varicella Zoster, вакцина «окавакс», содержащая живой аттенуированный вирус Varicella zoster штамм Ока.

Модификация поверхности кремниевого кантилевера проходила в три этапа (рис. 3) [4]:

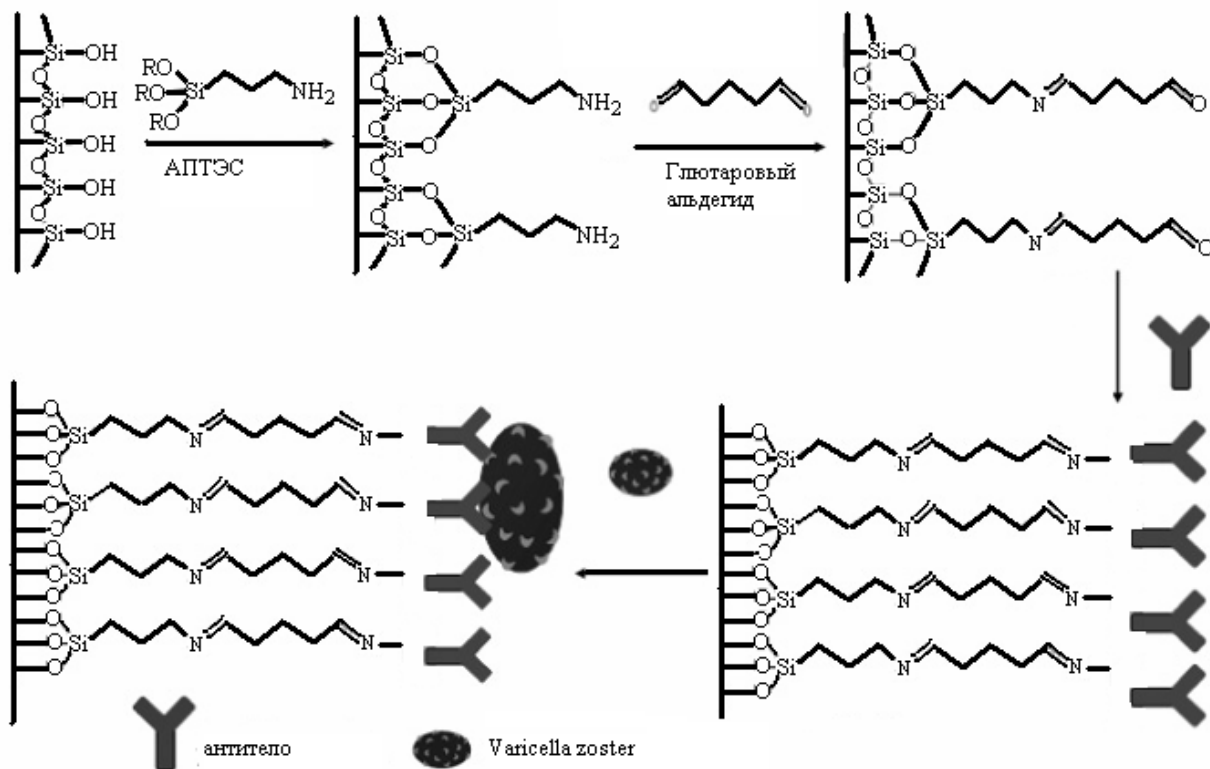


Рис. 3. Схема функционализации кантилевера

Таблица 1
 Параметры кантилеверов серии NSC35

NSC35		A	B	C
Резонансная частота, кГц	min	165	240	120
	типовая	210	315	150
	max	240	405	190
Коэффициент упругости, Н/м	min	3,5	6,5	2,5
	типовой	7,5	14	4,5
	max	12,5	27,5	8,5
Длина, $l \pm 5$, мкм		110	90	130
Ширина, $w \pm 3$, мкм		35	35	35
Высота, мкм	min	1,7	1,7	1,7
	типовая	2,0	2,0	2,0
	max	2,3	2,3	2,3

- а) очистка поверхности кантилевера;
- б) модификация поверхности путем силанизации кремния с помощью АПТЭС;
- в) иммобилизация антител на модифицированной поверхности кремния.

Экспериментальные исследования

Очистка кантилеверов проводилась в растворе хромовой смеси в течении 10 мин., затем образец промывался в бидистиллированной воде и высушивался. После чего проводили силанизацию поверхности кремния в 0,1% растворе АПТЭС в абсолютном этаноле. Результат силанизации контролировался с помощью исследования морфологии поверхности кремния до и после силанизации (рис. 4), а также измерением резонансных частот кантилевера до и после силанизации (рис. 5).

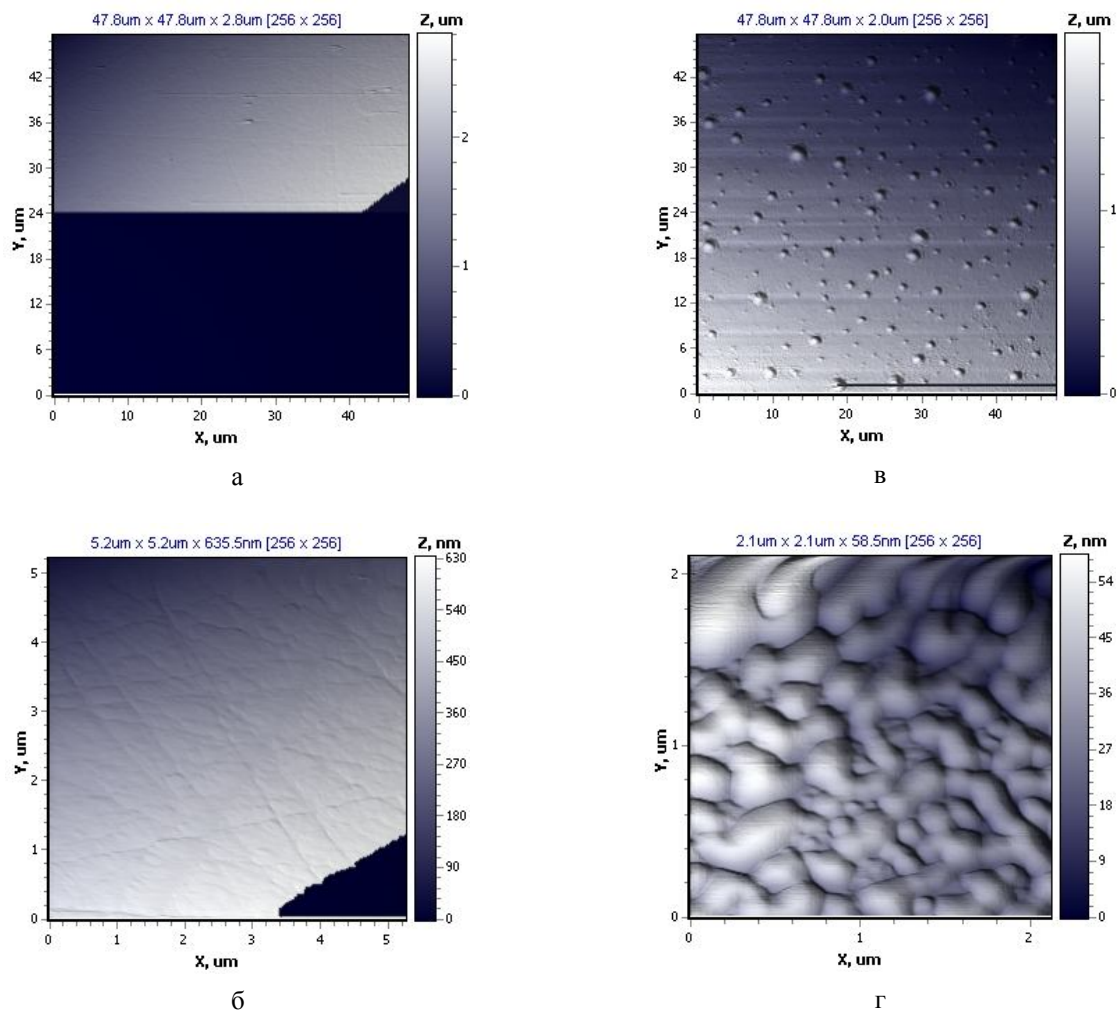


Рис. 4. АСМ сканирование поверхности кремния:
 а – отчищенная поверхность кремния до силанизации (47,8мкм*47,8мкм);
 б – отчищенная поверхность кремния до силанизации (5,2мкм*5,2мкм);
 в – силанизованная поверхность кремния (47,8мкм*47,8мкм);
 г – силанизованная поверхность кремния (2,1мкм*2,1мкм)

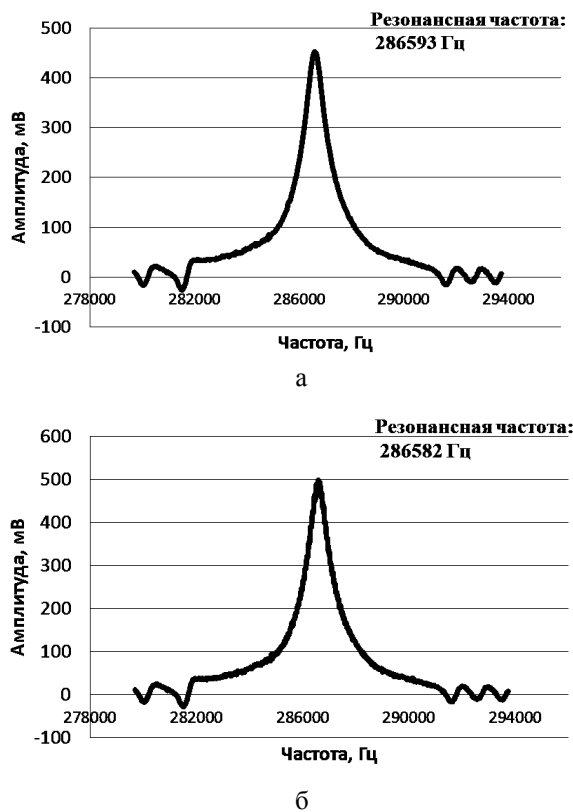


Рис. 5. Величина резонансной частоты собственных колебаний кантилевера серии NSC35: а – до силанизации; б – после силанизации

Строгое выражение зависимости резонансной частоты собственных колебаний кантилевера от массы представлено в [4]. Учитывая то, что в нашем исследовании используются препараты, полученные из сыворотки крови, которые не являются чистыми (в своем составе могут иметь различные группы иммуноглобулинов), для расчета изменения массы можно использовать приближенное выражение:

$$m = \left(\frac{33}{140} \right)^2 \frac{k}{\omega^2}.$$

Исходя из полученных данных можно говорить, что прирост массы после силанизации составил $1,406 \cdot 10^9$ мкг.

На следующем этапе силанизированный кантилевер помещался в раствор специфических к вирусу *Varicella zoster* антител. Измерение резонансной частоты проводили через интервалы времени 1ч, 2ч, 4ч, 24ч. Отклонение резонансной частоты обнаружено не было.

На завершающемся этапе кантилевер с иммобилизованными на его поверхности антителами помещался в бидистиллированную воду. Измерение резонансной частоты проводили через интервалы времени 1ч, 2ч, 4ч, 24ч. Отклонение резонансной частоты обнаружено не было. Затем кантилевер погружался в раствор содержащий вирус *Varicella*

zoster. Измерение резонансной частоты проводили через интервалы времени 1ч, 2ч, 4ч, 8ч, 12ч, 24ч. Результаты исследования представлены ниже (рис. 6).

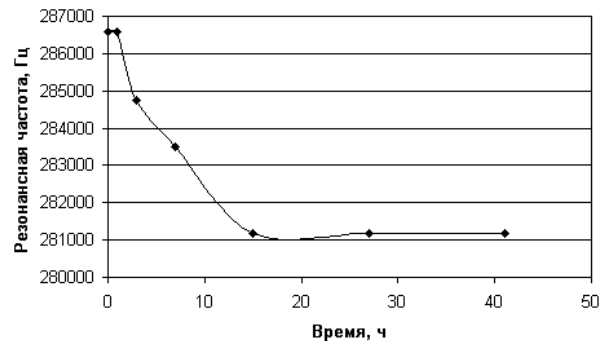


Рис. 6. Зависимость частотного отклика системы на присутствие вируса *Varicella zoster* от времени

Выводы

Анализируя данные (рис.4, 5) можно сделать вывод о том, что этап силанизации поверхности кремния выполнен успешно.

Отсутствие отклика системы при иммобилизации на поверхности сенсора антител, объясняется ультрамалой массой иммуноглобулинов, которая не превышает 150 кДа . В связи с этим становится актуальным вопрос повышения чувствительности сенсорной системы, которая напрямую связана с резонансной частотой собственных колебаний кантилеверов.

Анализируя данные (рис.6) можно сделать вывод о том, что на поверхности сенсора протекает процесс образования специфического комплекса антиген-антитело, сопровождающегося изменением массы резонирующей системы. Таким образом, данное устройство является сенсором на вирус ветряной оспы *Varicella Zoster*. Наличие участка насыщения на графике можно объяснить одним из двух факторов: насыщением свободных аминогрупп на поверхности кантилевера, количеством вируса в препарате меньшим, чем число аминогрупп на поверхности кантилевера.

Таким образом, была продемонстрирована работа сенсора на основе кантилеверов АСМ на вирус *Varicella Zoster*. Однако исследования проводились с препаратами полученными из сыворотки крови, которые не являются чистыми, что приводит к неоднозначной количественной интерпретации результатов. Исследование процесса образования комплекса антиген-антитело, при использовании чистых моноклональных иммуноглобулинов, в зависимости от внешних условий, является актуальной задачей, решение которой позволит получить дополнительные сведения и процессах образования специфических комплексов иммунной системы человека.

Литература

1. Campbell, G.A. A method of measuring *Escherichia coli* 0157:H7 at 1 cell/mL in 1 liter sample using antibody functionalized piezoelectric-excited millimeter-sized cantilever sensor [Text] / G.A. Campbell, R. Mutharasan // *Environ Science Technoogy*. – 2007. – V.41, № 5. – P. 74 – 81.

2. Nugaeva, N. An antibody-sensitized microfabricated cantilever for the growth detection of *Aspergillus niger* spores [Text] / N. Nugaeva // *Microsc. Microanal.* – 2007. – V. 13. – P. 13 – 17.

3. Гетманенко, Н.Ю. Использование принципа атомно-силовой микроскопии при разработке био-

сенсоров [Текст] / Н.Ю. Гетманенко // *Системы обработки информации*. – 2011. – Т. 94, № 4. – С. 218 – 221.

4. Wasserman, S.R. Structure and reactivity of alkylsiloxane monolayers formed by reaction of alkyltrichlorosilanes on silicon substrates [Text] / S.R. Wasserman, Y.-T. Tao, G.M. Whitesides // *Langmuir*. – 1989. – V. 5. – P. 1074 – 1087.

5. Ekinci, K.L. Ultimate limits to inertial mass sensing based upon nanoelectromechanical systems [Text] / K.L. Ekinci, Y.T. Yang, M.L. Roukes // *Journal of applied physics*. – 2004. – V. 95, № 5. – P. 2682 – 2689.

Поступила в редакцию 6.09.2011

Рецензент: д-р физ.-мат. наук, проф., проф. каф. биомедицинских электронных устройств и систем Н.Н. Рожицкий, Харьковский национальный университет радиоэлектроники, Харьков.

СЕНСОРНИЙ ПРИСТРІЙ НА ОСНОВІ КАНТІЛЕВЕРНИХ СИСТЕМ АТОМНО-СИЛОВОГО МІКРОСКОПА ДЛЯ ВИЯВЛЕННЯ ВІРУСУ VARICELLA ZOSTER ШТАМА ОКА

М.Ю. Гетманенко

Запропоновано новий вид сенсорного пристрою для реєстрації антитіл людини в розчині. Сенсорний пристрій реалізовано на базі атомно-силового мікроскопа (АСМ). Принцип роботи пристрою заснований на залежності частоти власних коливань консольної балки (кантилевера) від її маси. Перевагою даного пристрою є висока чутливість, пристрій реагує на зміни маси в одиниці пікограм. Наведені результати роботи пристрою при виявленні вірусу вітряної віспи Varicella Zoster штаму Ока. Розглянуто метод іммобілізації антитіл людини на поверхню кремнієвих кантилеверів.

Ключові слова: атомно-силовий мікроскоп, кантилевер, сенсор, Varicella Zoster штаму Ока.

SENSOR UNIT ON THE BASE OF CANTILEVER SYSTEMS OF AN ATOMIC-FORCE MICROSCOPE FOR DETECTION VARICELLA ZOSTER VIRUS STRAIN OKA

N.Y. Getmanenko

The new type of sensory unit for registration of human antibodies in solution is offered. The sensory unit is implemented on the base of atomic-force microscope (AFM). Principle of work of this unit is based on relation of oscillation frequency of cantilever and its mass. The main advantage of this device is high sensitivity, it reacts on change of mass in picogrammes. The results of detection of Varicella Zoster virus strain Oka by the sensory unit are given. The method of immobilization of human antibodies on the surface of silicic cantilevers is considered.

Key words: atomic-force microscope, cantilever, sensor, Varicella Zoster strain Oka.

Гетманенко Николай Юрьевич – аспирант каф. биомедицинских электронных устройств и систем, Харьковский национальный университет радиоэлектроники, Харьков, e-mail: getmanenko@gala.net.