

МИКРОКАНТИЛЕВЕРЫ КАК ПРЕОБРАЗОВАТЕЛИ ПОВЕРХНОСТНОГО НАТЯЖЕНИЯ

Силы, возникающие в пленках на фазовых границах сред, играют в современном материаловедении важную роль. Погоня за улучшением электромеханических свойств защитных покрытий, рецепторных пленок или искусственных мембран заставляет придумывать все более и более изощренные способы создания их микро- и субнанометровых текстур. Задача осложняется тем, что известные методы измерения латеральных напряжений, от которых зависят физико-химические свойства тонких пленок, являются косвенными, и не могут дать точной информации о динамике изменения сил в субмикронных слоях на твердофазных поверхностях. Для решения этой проблемы разработан специальный метод, использующий микрокантилеверные технологии.

Микрокантилеверные анализаторы – высокочувствительные твердофазные преобразователи поверхностных биохимических реакций в аналитический сигнал. Первые работы 90-х годов прошлого века продемонстрировали принципиальную возможность применения атомно-силовых микроскопов (АСМ) в качестве основы для прямых сенсорных систем. С появлением стандартизованных коммерчески доступных кантилеверов проводимые на базе микроэлектромеханических систем (МЭМС) эксперименты перестали быть технологически труднодоступной экзотикой, а открытие новых возможностей АСМ стимулировало ряд фундаментальных научных разработок в области химии поверхностных реакций и молекулярной биологии.

На данный момент устройства с микромеханическими преобразователями зарекомендовали себя в качестве полноценного научного инструмента для исследований межмолекулярных взаимодействий в монослойных пленках адсорбированных низкомолекулярных веществ [1], молекулярных комплексов [2], антител [3], ферментов [4], ДНК, аптамеров [5], белков [6], набухающих полимерных пленок [7]. Кантилеверы стали применяться и в чисто прикладных задачах – клини-

ческая диагностика [8], контроль концентраций гербицидов [9], обнаружение ядовитых [10] и взрывчатых веществ [11].

Для обеспечения работы силового микроконсольного сенсора необходимо одну из его поверхностей сделать специфичной к исследуемому сорбируемому веществу [12], при этом, как правило, кантилеверный сенсор имеет одну плоскость, специфичную к сорбату, а другая остается к нему инертной (рис.1).

Методика использования микрокантилеверных преобразователей заключается в том, что при связывании определяемого вещества с рецептором на поверхности кантилевера происходит его статическая деформация (рис.2), при этом величина изгиба кантилевера прецизионно определяется с помощью лазерно-оптической системы. В результате изменения в сенсорном слое поверхностной энергии в нем возникают силы избыточного давления или поверхностного натяжения. В связи с этим показатель направления изгиба кантилевера в микромеханических анализаторах является существенным, поскольку характеризует набор доминирующих факторов, отвечающих за энергетическое состояние системы [1].

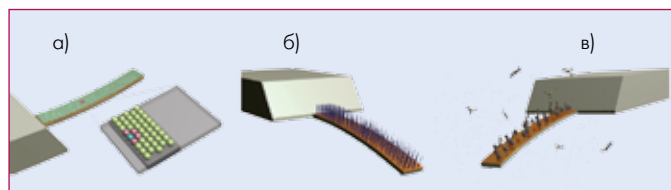


Рис.1 Микрокантилеверные датчики: а) микроконсоль с белковым рецепторным слоем, б) микроконсоль с низкомолекулярным рецептором, в) архитектура силового иммунохимического микрокантилеверного сенсора

Одна из не имеющих альтернативных аналогов особенностей кантилевера – способность непосредственного измерения натяжения в пленках, помещенных на одну из его сторон. В этом случае степень влияния неспецифического связывания на аналитический сигнал заметно уменьшается, что объясняется низкими энергиями неспецифических связей, соответственно, и их незначительным вкладом в поверхностное натяжение рецепторной пленки [13]. Благодаря этому информация о состоянии исследуемых пленок уникальна и, вообще говоря, отличается от той, которую позволяет получить применение распространенных методов анализа массы, оптических и электрических свойств тонкослойных структур. Уникальность информации в том, что она непосредственно характеризует энергию межмолекулярных взаимодействий внутри пленки, преобразующуюся в статический изгиб кантилевера (энергию аналитического сигнала). В свою очередь поверхностные силы в молекулярных пленках на твердых подложках могут быть обусловлены гидрофобными, стерическими или электростатическими взаимодействиями в пленке отдельных молекул или их комплексов [2].

С помощью микрокантилеверов была решена задача определения кинетики агрегации лизоцима вблизи различных поверхностей [6]. Белок с концентрацией 1 мг/мл иммобилизовался с помощью метода химической прививки из ацетатного буфера (рН = 4,5) на поверхности кантилевера, покрытой золотой пленкой. Тем же образом лизоцим хими-

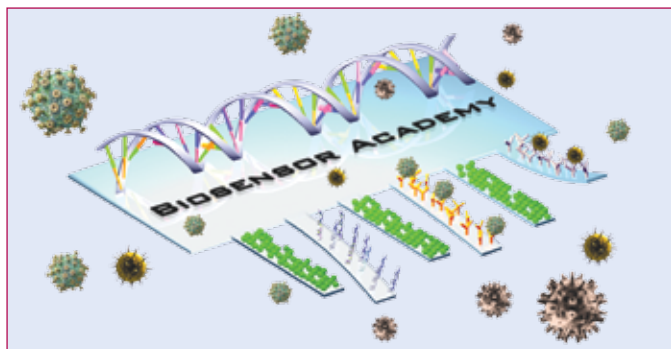


Рис.2 Массив микроконсольей, имеющих индивидуальные рецепторные слои. Каждая микроконсоль отклоняется в соответствии с величиной изменения поверхностной энергии рецептора. Отклонения фиксируются с помощью лазерно-оптического датчика наноперемещений, заимствованного из АСМ

чески прививался к гидрофильной кремниевой поверхности кантилевера, покрытая золотом сторона которого оставалась немодифицированной. По АСМ данным время агрегации соседних молекул ковалентно иммобилизованного монослоя лизоцима на золоте при комнатной температуре и рН = 3,0 составляет 14 ч. В результате в монослое возникает плотная сетка фибриллярных образований (рис.4в). При этом известно, что агрегация белка в объеме в тех же условиях происходит при более высокой температуре ($\approx 57^\circ\text{C}$).

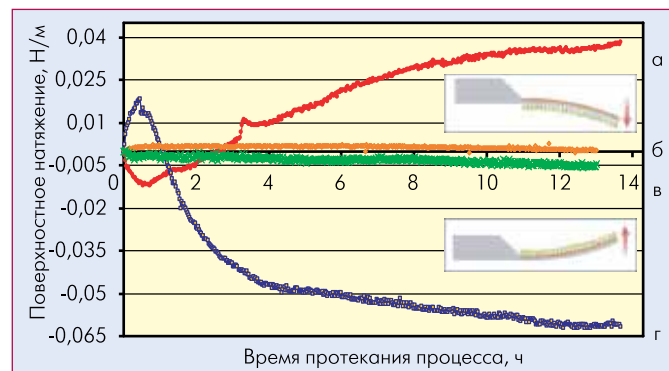


Рис.3 Зависимость от времени поверхностного натяжения пленки лизоцима: а) на кремниевой, г) на золотой поверхностях кантилевера; б), в) результаты двух контрольных экспериментов, единственное отличие которых заключается в отсутствии этапа обработки кантилевера лизоцимом (для золотой и кремниевой поверхностей кантилевера)

Было показано [6], что кинетический коэффициент развития латеральных напряжений в монослое лизоцима на модифицированной гидрофобной (золотой) поверхности в 4,6 раза выше, чем на модифицированной гидрофильной (кремниевой) поверхности (рис.3), что коррелирует с АСМ данными, согласно которым среднее количество фибрилл на указанных подложках различается в 5 раз (рис.4). Таким образом, установлено, что скорости роста фибрилл пропорциональны скоростям развития сил агрегации молекул лизоцима на поверхностях с различными свойствами.

Для расчета силы взаимодействия между двумя соседними молекулами лизоцима в монослойной пленке было принято, что белковые глобулы в ней образуют гексагональную упаковку, при этом каждая молекула одновременно и в равной степени взаимодействует еще с другими пятью соседними.

Полученное значение силы взаимодействия составило 113 ± 24 пН, что близко к значению силы ($F_{T4} = 64 \pm 16$ пН), которую необходимо приложить к агрегату из нескольких мономеров лизоцима T4, чтобы разорвать связь между 21 и 124 остатками одного мономера.

Частным примером использования кантилеверов может служить модельный датчик на тестовый белок пероксидазу хрена (ПХ) после помещения кантилевера в содержащий ПХ фосфатный солевой буферный раствор (ФСБР) с рН = 7,0, кантилевер со специфическими антителами IgG, физически

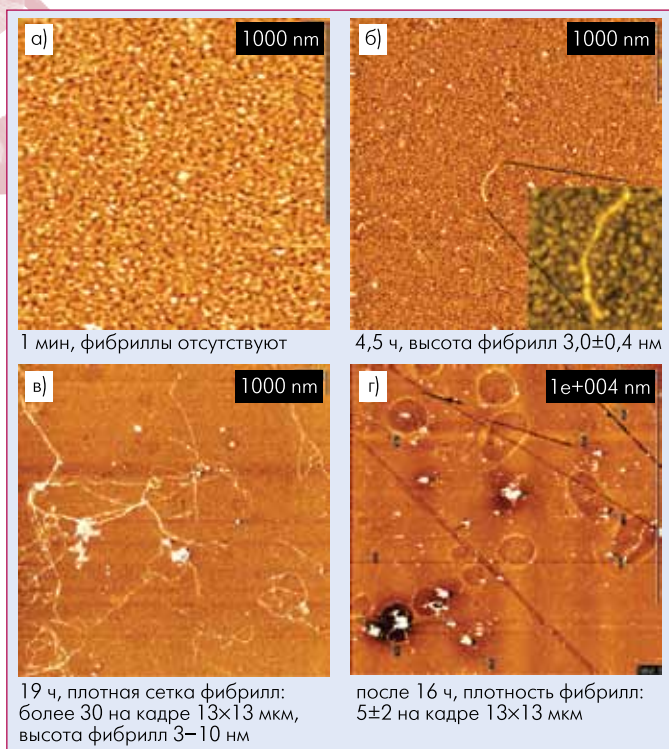


Рис.4 Изменение формы агрегатов лизоцима в различные моменты времени нахождения монослоя в буфере (рН = 3,0) при химической иммобилизации белка: а, б, в – на гидрофобной поверхности золота; г – на гидрофильной отрицательно заряженной поверхности слюды (кремния)

иммобилизованными на поверхности, начал деформироваться в сторону рецепторного слоя (рис.5).

К другим белкам – овальбумину и бычьему сывороточному альбумину, выполнявшим роль контрольных мишеней, – кантилевер был полностью невосприимчив.

Благодаря плодотворному сотрудничеству ООО "Академия биосенсоров" с Национальным центром микроэлектроники в Барселоне (работа поддержана Федеральным агентством по науке и инновациям) создан универсальный прибор – измеритель натяжения пленок на поверхности кантилевера, позволяющий использовать одновременно до шести микромеханических датчиков (рис.6). На основе представленной приборной базы возможна разработка твердофазных анализаторов (*label-free*, т.е. не использующие меток) для определения с высокой точностью биологических или химических агентов

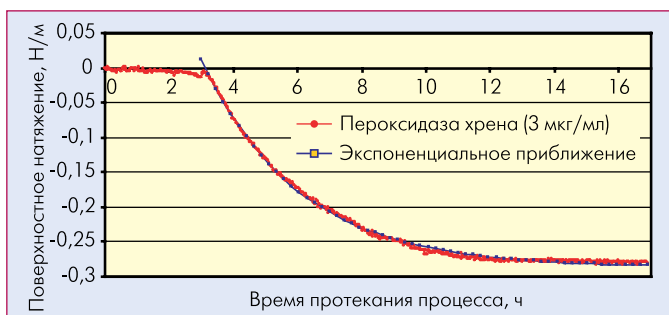


Рис.5 Кинетика изгиба кантилевера с физически иммобилизованным рецепторным слоем при введении раствора ПХ с концентрацией 3 мкг/мл



Рис.6 Биохимический анализатор на основе микрокантилеверных преобразователей

в жидких и газовых средах (принципы метода схожи с кварцевым микровзвешиванием и поверхностным плазмонным резонансом).

При использовании массива кантилеверов, модифицированных различными рецепторными слоями, прибор позволяет проводить анализ одной пробы одновременно на содержание в ней нескольких веществ. В перспективе управление прибором можно осуществлять через Интернет или локальную сеть, что позволит удаленно проводить анализ в режиме реального времени.

Работа выполнена при поддержке ФАНИ 02.512.11.2279, 02.513.11.3448, ФСРМФП НТС 6331р/4994, NATO CBN. NR.NRSFP 983204.

ЛИТЕРАТУРА

1. Yaminsky I., Gorelkin P., Kiselev G. – Japanese Journal of Applied Physics, 2006, vol.45, №.3B, p.2316–2318.
2. Ji H.-F., Thundat T., Dabestani R., Brown G.M., Britt P.F., Bonnesen P.V. – Anal. Chem., 2001, vol.73, Neo.7, p.1572–1576.
3. Grogan C., Raiteri R., O'Connor G.M., Glynn T.J., Cunningham V., Kane M., Charlton M., Leech D. – Biosensors & Bioelectronics, 2002, vol.17, p.201–207.
4. Yan X., Xu X.K., Ji H.-F. – Anal. Chem., 2005, vol.77, №.19, p.6197–6204.
5. Savran C.A., Knudsen S.M., Ellington A.D., Manalis S.R. – Anal. Chem., 2004, vol.76, №.11, p.3194–3198.
6. Украинцев Е.В., Киселев Г.А., Кудринский А.А., Лисичкин Г.В., Яминский И.В. – Высокомолекулярные соединения, 2007, т. 49, № 1, с.125–129.
7. Toda M., Itakura A.N., Beuscher K., Graf K., Berger R. – e-J. Surf. Sci. Nanotech., 2006, vol.4, p.96–99.
8. Arntz Y., Seelig J.D., Lang H.P., Zhang J., Hunziker P., Ramseyer J.P., Meyer E., Hegner M., Gerber Ch. – Nanotechnology, 2003, 14, 86.
9. Raiteri R., Grattarola M., Butt H.-J., Skladal P. – Sensors and Actuators, 2000, B, 79, 115.
10. Ji H.-F., Zhang Y., Purushotham V.V., Kondu S., Ramachandran B., Thundat T., Haynie D.T. – Analyst, 2005, 130, 1577.
11. Datskos P.G., Lavrik N.V., Sepaniak M.J. – Sensor Lett., 2003, 1, (1), 25.
12. Lavrik N.V., Sepaniak M.J., Datskos P.G. – Rev. of Sci. Ins., 2004, vol.75, №.7, p.2229–2253
13. Braun T., Ghatkesar Krishna M., Backmann N., Lang H.P., Gerber C., Hegner M. Nanomechanical Biosensors for Membrane Proteins – International Conference on Nanoscience and Technology 2006, Switzerland, Basel, – 2006.