БИОСЕНСОР ДЛЯ ОБНАРУЖЕНИЯ ВИРУСОВ И БАКТЕРИЙ В ЖИДКОСТЯХ

BIOSENSOR FOR DETECTION OF VIRUSES AND BACTERIA IN LIQUIDS

УДК 543.07, ВАК 05.11.13, DOI:10.22184/1993-8578.2016.70.8.68.73

А.Ахметова^{1,2}, Н.Гутник¹, Г.Мешков¹, И.Назаров², О.Синицына¹, И.Яминский^{1,2} / yaminsky@nanoscopy.ru
A.Akhmetova^{1,2}, N.Gutnik¹, G.Meshkov¹, I.Nazarov², O.Sinitsyna¹, I.Yaminsky^{1,2}

Раннее обнаружение вирусов и бактерий позволяет существенно снизить риск инфекционных заболеваний. Эта актуальная, социально значимая задача достаточно сложна и требует инновационных решений [1–4]. В настоящей статье приведено описание разработки компактного и недорогого биосенсора, предназначенного для использования в медицинской диагностике.

Early detection of viruses and bacteria can significantly reduce the risk of infectious diseases. This topical, socially relevant task is complex and requires innovative solutions [1–4]. This paper describes the development of a compact and inexpensive biosensor intended for use in medical diagnostics.

Блок-схема биосенсора приведена на рис.1. Биочип представляет собой миниатюрный пьезокерамический диск с сенсорными слоями на противоположных сторонах. При присоединении биологического агента к сенсорной поверхности биочипа происходит изменение резонансной частоты механических колебаний диска.

В результате взаимодействия патогенов с рецепторным слоем эффективная масса и жесткость биочипа будут изменяться, что может быть зарегистрировано по сдвигу резонансной частоты кантилевера:

$$\Delta f = \frac{1}{2} f_n \left(\frac{\Delta k}{k} - \frac{\Delta m}{m} \right), \quad (1)$$

где Δf , Δk , Δm – изменения резонансной частоты, жесткости и массы биочипа, а f_n , k и m – первоначальные значения этих параметров.

Рассмотрим случай обнаружения бактериальной клетки *Escherichia coli*. Длина бактерий составляет 2–6 мкм, а диаметр – около 1 мкм. При средней длине в 4 мкм масса бактерии равна около $3,1 \cdot 10^{-12}$ г. Биочип диаметром 3 мм и толщиной 0,1 мм из пьезокерамики ЦТС-19 имеет объем

$0,7 \cdot 10^{-3}$ см³, а его масса при плотности материала 7,5 г/см³ составляет $5,3 \cdot 10^{-3}$ г. Прикрепление одной бактериальной клетки приводит к относительному изменению резонансной частоты на величину:

$$\Delta f / f_n = -\frac{1}{2} \frac{\Delta m}{m} = -3,0 \cdot 10^{-10}. \quad (2)$$

Согласно соотношению (2), относительная стабильность частоты генератора возбуждающих колебаний должна быть на уровне 10^{-10} .

Общий вид проточной ячейки с размещенным в ней пьезокерамическим биочипом представлен на рис.2. Для циркуляции жидкости, содержащей детектируемые патогены, используются перистальтический насос и соединительные трубки. Проточная жидкостная ячейка и соединительные трубки составляют герметичную камеру с циркулирующей биологической жидкостью. Соединительные трубки и проточная жидкостная ячейка выполнены из недорогих инертных материалов (силиконовой резины и полиэтилена соответственно) и могут быть расходными элементами одноразового использования.

¹ МГУ им. М.В.Ломоносова / Lomonosov Moscow State University.

² НПП "Центр перспективных технологий" / Advanced Technologies Center.

Погрешность измерения частоты пьезоэлектрического биочипа Δf , обусловленная электронными шумами измерительной схемы, нестабильностью пьезокерамики и другими возможными факторами, ограничивает чувствительность метода. Для оценки уровня собственных шумов измерительной схемы биосенсора использовался пьезокерамический резонатор ZТВ с резонансной частотой 1 МГц.

Определение резонансной частоты колебаний биочипа проводилось следующим образом. С помощью цифрового синтезатора частоты с использованием микросхемы AD7008 (Analog Devices) и прецизионного усилителя входного сигнала осуществлялась запись амплитудно-частотной характеристики пьезокерамического резонатора (рис.3). При построении амплитудно-частотной характеристики проводилось 512 измерений в выбранном диапазоне частот. Для повышения точности можно последовательно снимать несколько характеристик. Резонансная частота вычислялась по методу определения "центра масс":

$$f_{\text{среднее}} = \frac{\sum_{i=1}^N A_i f_i}{A_1 + A_2 + \dots + A_N}.$$

Такой метод дает существенно большую точность при наличии реальных шумов, чем простой поиск максимума на кривой.

На рис.4 представлены данные обработки 512 резонансных кривых, каждая из которых была построена по 512 точкам. Соответственно, общее число проведенных отсчетов (отдельных измерений) – 262144.

A block diagram of the biosensor is shown in Fig.1. The biochip represents a miniature piezoceramic disk with sensory layers on the opposite sides. The attaching of the biological agent to sensor surface of the biochip changes the resonant frequency of mechanical oscillations of the disk.

The interaction of pathogens with the receptor layer leads to a change in the effective mass and stiffness of a biochip that can be registered by shift of the resonance frequency of the cantilever:

$$\Delta f = \frac{1}{2} f_n \left(\frac{\Delta k}{k} - \frac{\Delta m}{m} \right), \quad (1)$$

where Δf , Δk , Δm are changes of the resonance frequency, stiffness and mass of the biochip, and f_n , k and m are the initial values of these parameters.

Let's consider the detection of bacterial cell of *Escherichia coli*. Length of bacteria is of about 2–6 μm and a diameter – of about 1 μm . With an average length of 4 μm the mass of bacteria is equal to about $3.1 \cdot 10^{-12}$ g. The biochip

with a diameter of 3 mm and a thickness of 0.1 mm is made of piezoelectric ceramics ЦТС-19. It has a volume of $0.7 \cdot 10^{-3} \text{ cm}^3$ and weight of $5.3 \cdot 10^{-3} \text{ g}$ (the density of material is 7.5 g/cm^3). Attachment of a single bacterial cell leads to a relative change in the resonant frequency by the value:

$$\Delta f / f_n = -\frac{1}{2} \frac{\Delta m}{m} = -3,0 \cdot 10^{-10} \quad (2)$$

According to relation (2), the relative frequency stability of

Рис.1. Блок-схема биосенсора включает проточную ячейку с биочипом, перистальтический насос, блок управления. Обработка данных проводится на персональном компьютере с использованием оригинального программного обеспечения. Для поддержания заданной постоянной температуры в проточной ячейке может быть установлен терморезистор, который служит одновременно для измерения температуры и нагрева жидкости

Fig.1. Block diagram of biosensor includes flow cell with biochip, peristaltic pump and control unit. Data processing is performed on personal computer using original software. To maintain desired constant temperature, in flow-through cell can be mounted thermistor, which serves simultaneously for measuring temperature and heating fluid

Рис.2. Общий вид проточной жидкостной ячейки биосенсора с установленными биочипами

Fig.2. General view of flow-through liquid cell of biosensor with installed biochips

Рис.3. Амплитудно-частотная характеристика пьезокерамического резонатора

Fig.3. Amplitude-frequency characteristic of piezoceramic resonator

Среднеквадратичная погрешность в определении резонансной частоты биочипа при использовании линейного усреднения по пяти последовательным измерениям составила 1,8 Гц, что соответствует среднеквадратичному отклонению экспериментальной кривой (черная линия) на рис.4 от среднего значения. В нашем случае погрешность определения массы биочипа, рассчитанная по формуле 2, составляет $\Delta m = 6 \cdot 10^{-10}$ г, что примерно соответствует массе двухсот бактерий *E.coli*.

В блоке управления биосенсора используются электронные платы цифрового синтезатора частот,

the drive-pulse generator should be at the level of 10^{-10} .

General view of a flow-through cell with the piezoceramic biochip placed in it is shown in Fig.2. Peristaltic pump and connecting tubes are used for circulation of the fluid containing the detected pathogens. Flow-through liquid cell and the connecting tubes form a hermetically sealed chamber with the circulating biological fluid. Connecting tubes and flow-through liquid cell are made of cheap and inert materials (silicone rubber and polyethylene,

respectively) and can be a consumable one-time use items.

The frequency measurement error Δf of the piezoelectric biochip, which is caused by electronic noise of the measuring circuit, instability of piezoceramics and other factors, limits the sensitivity of the method. The ZTB piezoelectric ceramic resonator with a resonant frequency of 1 MHz was used to assess the self-noise level of the measuring system of the biosensor.

Determining the resonant frequency of oscillation of the

biochip was conducted in the following way. Using a digital frequency synthesizer with AD7008 chip (Analog Devices) and precision input amplifier, the amplitude-frequency characteristic of the piezoelectric resonator was registered (Fig.3). For determination of the amplitude-frequency characteristic 512 measurements in the selected frequency range were carried out. To improve accuracy it is possible to consecutively measure several characteristics. The resonant frequency was calculated according to the method of determining the "center of mass":

прецизионного усилителя входного сигнала, интерфейса для связи с компьютерным блоком, термостата проточной жидкостной ячейки, ЦАП-АЦП, стабилизированного питания. На рис.5 приведены основные платы макета биосенсора и его корпус.

Существенным фактором является симметричность конструкции биосенсора. Пластина биочипа обладает геометрической симметрией, однако электрическая схема подачи напряжения несимметрична, поскольку на противоположные стороны подаются напряжения различной полярности. Вследствие этого структура приповерхностного двойного электропроводящего слоя вблизи противоположных сторон биочипа существенно различна, что может влиять как на рецепторный слой, так и на свойства адсорбируемой пленки из биологических агентов. Для достижения полной симметрии электрической схемы предложено оригинальное решение [5] с использованием составного пьезокерамического биочипа (рис.6).

В биочипе указанной конструкции электрическое напряжение можно подавать только на внутренние электроды, а наружные электроды заземляются или имеют потенциал раствора. В этом случае достигается симметрия в геометрии биочипа, в подаче электрических напряжений, и, как следствие, полная симметрия двойных приповерхностных электропроводящих слоев.

Проведенные расчеты и оценки показывают, что технические параметры цифрового синте-

Рис.4. Измерение резонансной частоты механических колебаний биочипа. Общее число измерений – 512. Значения измеренной резонансной частоты отображены синими точками. Аппроксимация значений резонансной частоты с использованием фильтра линейного усреднения по пяти последовательным значениям показано черной линией. Время записи резонансных кривых – 5,120 с

Fig.4. Measuring resonant frequency of mechanical oscillations of biochip. Total number of measurements is 512. Measured resonant frequencies are shown as blue dots. Approximation of resonant frequency using linear averaging filter over five consecutive values is shown by black line. Time of recording resonance curves is 5,120 s

$$f_{\text{average}} = \frac{\sum_{i=1}^N A_i f_i}{A_1 + A_2 + \dots + A_N}.$$

This method provides much greater accuracy in the presence of real noises than the simple search for the maximum on the curve.

Fig.4 shows the results of processing of 512 resonance curves, each of which was drawn using 512 points. Thus, the total number of individual measurements is 262, 144.

Mean square error in determining the resonant frequency of the biochip in case of linear

averaging of five consecutive measurements was 1.8 Hz, which corresponds to the standard deviation of experimental curve (black line in Fig.4) from the average value. In our case, the error in determining the mass of a biochip, calculated by the formula 2 is $\Delta m = 6 \cdot 10^{-10}$ g, which is approximately equal to the mass of two hundred E. coli bacteria.

The control unit of the biosensor consists of electronic boards of digital frequency synthesizer, precision input amplifier, interface for communication with

computer, thermostat of flow-through liquid cell, DAC-ADC, voltage stabilizer. Fig.5 shows the boards of the prototype of biosensor and its case.

The symmetry of the design of the biosensor is a significant factor. The plate of the biochip has the geometric symmetry, however, the voltage supply circuit is asymmetric, because voltage of different polarity is supplied to the opposite sides. As a result, the structure of the surface dual conductive layer in close proximity to opposite sides of the biochip is substantially

Рис.5. Основные платы (слева) и корпус биосенсора с установленным блоком прецизионного питания (справа)
 Fig.5. Boards (on left) and case of biosensor with precision power supply unit (on right)

затора частот (точность задания частоты 0,001 Гц за счет использования 32-битового управления) позволяют достичь чувствительности, необходимой для регистрации с помощью прецизионного усилителя входного сигнала при следующих минимальных концентрациях биологических агентов:

- для вирусов гриппа А в жидкости – 10^4 вирусов/мл;
- для бактерий E.coli в жидкости – 10^2 бактерий/мл.

Для дальнейшего увеличения чувствительности биосенсора до уровня единичных патогенов необхо-

димо использовать биочипы существенно меньших размеров – с толщиной и диаметром микронных размеров. Изготовление такого биочипа является технологически сложным, но при наличии соответствующей производственной базы реализуемым процессом.

НИОКТР выполняется в МГУ им. М.В.Ломоносова при финансовой поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации (проект 02.G25.31.0135).

different, which may affect both the receptor layer and the properties of adsorbed films of biological agents. To achieve the full symmetry of the electric circuit an original solution [5] using the composite piezoceramic biochip is proposed (Fig.6).

In the specified design of the biochip, voltage can be fed only to the inner electrodes, and outer electrodes are grounded or have a potential of solution. In this case, the symmetry is achieved in the geometry of the biochip and in the voltages supply. As a result, the near-surface

dual conductive layers are fully symmetric.

The calculations and estimates show that the technical parameters of the digital frequency synthesizer (accuracy of frequency setting is 0.001 Hz thanks to use of a 32-bit control) allow to reach the sensitivity required to register by a precision input amplifier at the following minimum concentrations of biological agents:

- 10^4 virus/ml for influenza A viruses in a fluid;
- 10^2 bacteria/ml for E. coli bacteria in a fluid.

To further increase the sensitivity of the biosensor up to the level of single pathogens, it is necessary to use the biochip of substantially smaller size: with thickness and diameter of micron size. The manufacturing of such a biochip is challenging, but with adequate production base, technically implementable process. ■

R&D is performed in the Lomonosov Moscow State University with financial support of the Ministry of education and science of the Russian Federation (project 02.G25.31.0135).

Рис.6. Структура биочипа для обеспечения геометрической симметрии и симметрии электрической схемы: 1, 3, 4, 6 – электропроводящие слои (золото, серебро, медь); 2, 5 – слои пьезокерамики (ЦТС-19, ЦТС-21, ЦТС-36); 7, 8 – рецепторные слои

Fig.6. Structure of biochip to provide geometrical symmetry and symmetry of electric circuit: 1, 3, 4, 6 – conductive layers (gold, silver, copper); 2, 5 – layers of piezoelectric ceramics; 7, 8 – receptor layers

ЛИТЕРАТУРА

1. Gorelkin P.V., Erofeev A.S., Kiselev G.A., Kolesov D.V., Dubrovin E.V. Yaminsky I.V. Synthetic sialylglycopolymer receptor for virus detection using cantilever-based sensors // Analyst. 2015. 140. 6131-6137.
2. Колесов Д., Яминский И., Ахметова А., Сеницына О., Мешков Г. Кантилеверные биосенсоры для обнаружения вирусов и бактерий // Наноиндустрия. 2016. №5 (67). С. 26-34.
3. Колесов Д., Яминский И., Ахметова А., Сеницына О., Мешков Г. Кантилеверные биосенсоры для обнаружения вирусов и бактерий // Наноиндустрия. 2016. № 4 (67). С. 26-35.
4. Киселев Г., Горелкин П., Ерофеев А., Колесов Д., Яминский И. Детекция вирусов с помощью пьезоэлектрических кантилеверов // Наноиндустрия. 2015. № 4 (58). С. 62-67.
5. Ахметова А.И., Мешков Г.Б., Назаров И.А., Сагитова А.В., Яминский И.В. Биосенсорное устройство для обнаружения биологических микро- и нанообъектов. Заявка на патент на изобретение. Заявка № 2016141844 от 25.10.2016.