



# КАНТИЛЕВЕРНЫЕ БИОСЕНСОРЫ ДЛЯ ОБНАРУЖЕНИЯ ВИРУСОВ И БАКТЕРИЙ

## CANTILEVER BIOSENSORS FOR DETECTION OF VIRUSES AND BACTERIA

УДК 543.07

Д. Колесов<sup>1</sup>, И. Яминский<sup>1,2</sup>, А. Ахметова<sup>1,2</sup>, О. Синицына<sup>1</sup>, Г. Мешков<sup>1</sup> / [yaminsky@nanoscopy.net](mailto:yaminsky@nanoscopy.net)  
D. Kolesov<sup>1</sup>, I. Yaminsky<sup>1,2</sup>, A. Ahmetova<sup>1,2</sup>, O. Sinitsyna<sup>1</sup>, G. Meshkov<sup>1</sup>

Продолжая рассказ о кантилеверных биосенсорах, во второй части статьи (начало см. "Наноиндустрия", 2016, № 4(66), с. 26–35) рассмотрены варианты интеграции кантилеверных сенсоров в состав биоаналитических устройств и соответствующие им области применения, примеры биосенсоров для детекции биомолекул, преимущества и недостатки биосенсоров на основе микрокантилеверов, а также актуальные направления исследований.

The continuation of the article about cantilever biosensors (first part – "Nanoindustry", 2016, No. 4(66) pp. 26–35) considers the integration of cantilever sensors in the composition of bioanalytical devices and the corresponding applications, examples of biosensors for detection of biomolecules, the advantages and disadvantages of biosensors based on microcantilevers, as well as relevant areas of research.

**К**антилеверные биосенсоры являются многообещающей платформой для создания высокочувствительных и селективных сенсорных устройств.

### ВАРИАНТЫ ИНТЕГРАЦИИ В СОСТАВ БИОАНАЛИТИЧЕСКИХ УСТРОЙСТВ

Благодаря своей компактности, кантилеверные сенсоры могут легко встраиваться в состав комплексных биоаналитических устройств. Часто такая интеграция осуществляется в микрофлюидном формате [1]. Микрофлюидный чип позволяет прецизионно управлять маленьким объемом жидкого образца, последовательно обеспечивая стадии пробоподготовки и анализа. Такие комплексные системы называют "система полного микроанализа" или "лаборатория-на-чипе". Кантилеверные сенсоры также могут быть объединены с другими типами сенсоров для проведения более полного анализа. В [2] кантилеверный резонансный сенсор был совмещен с емкостным и калориметрическим датчиками с целью создания газового сенсора для анализа содержащихся

в воздухе летучих органических соединений (рис.1). Полная интеграция микроэлектронных и микромеханических компонентов на одном чипе обеспечивает управление и мониторинг функций датчика, а также повышает его общую производительность благодаря усилению сигнала. Схема также включает аналого-цифровые преобразователи и интерфейс передачи данных на внешний модуль записи.

Кантилеверные сенсоры могут интегрироваться со средствами беспроводной передачи данных для создания полностью автономных устройств. Авторы работы [3] разработали и создали кантилеверный сенсор для определения С-реактивного белка с интегрированным беспроводным модулем. Подобные устройства могут быть прототипами имплантируемых сенсоров (рис.2), которые впервые удалось создать относительно недавно [4]. Так как регенерация биосенсора довольно трудна, имплантируемое устройство было использовано для детекции газов крови, например спиртов. Для этого на обратную сторону кантилевера было нанесено гидрофобное

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

<sup>2</sup> НПП "Центр перспективных технологий" / Advanced Technologies Center.

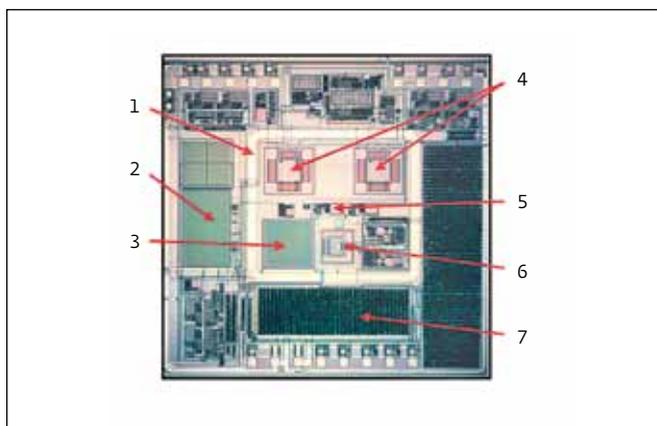


Рис.1. Микрофотография чипа газового микросенсора (размер 7×7 мм) [2]

Fig.1. Micrograph of the chip of gas microsensor (size of 7×7 mm) [2]

покрытие, а золотую сторону модифицировали полимерным тиолированным фторсилоксановым спиртом. Поглощение спирта рецепторным слоем приводит к изгибу кантилевера.

### ОБЛАСТИ ПРИМЕНЕНИЯ БИОСЕНСОРОВ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ВАРИАНТА ИНТЕГРАЦИИ

Основным направлением применения биосенсоров является диагностика. Кантилеверные сенсоры позволяют определять белки, являющиеся маркерами различных заболеваний. Например, показана возможность детектирования простатспецифического антигена – маркера заболеваний предстательной железы – на клинически значимом уровне концентраций [5]. В другой работе [6] определялась концентрация миоглобина, являющегося маркером сердечно-сосудистых заболеваний.

**C**antilever biosensors are a promising platform for creation of highly sensitive and selective sensors.

### ALTERNATIVES TO INTEGRATION IN BIOANALYTICAL DEVICES

With its small footprint, cantilever sensors can easily be embedded in the bioanalytical devices. Often this integration is carried out in a microfluidic format [1]. Microfluidic chip allows precise control of small-volume liquid sample, consistently providing sample preparation and

analysis. Such an integrated system is called the "full-microanalysis system" or "lab-on-a-chip". Cantilever sensors can also be combined with other types of sensors for more complete analysis. In [2] cantilever resonant sensor has been combined with capacitive and calorimetric sensors with the aim of creating a gas sensor for the analysis of airborne volatile organic compounds (Fig.1). Full integration of microelectronic and micromechanical components on the same chip provides control and monitoring of sensor functions,



Рис.2. Имплантируемый кантилеверный сенсор для анализа газов крови [4]

Fig.2. Implantable cantilever sensor for blood gas analysis [4]

Многие тесты требуют значительного времени, специально обученного персонала и похода в лабораторию. Компактные и автономные сенсорные устройства на основе микрокантилеверов, интегрированных в микрофлюидные чипы, имеют перспективы для использования в качестве устройств персонализированной диагностики [7]. Время отклика подобных устройств составляет десятки минут. Стационарные приборы могут использоваться в клинических лабораториях в качестве альтернативы или дополнения к стандартным методам диагностики.

Однако диагностика является не единственным применением кантилеверных сенсоров. Основанный на массиве из нескольких кантилеверных датчиков "электронный нос" может применяться для мониторинга окружающей среды.

but also increases its overall performance because of signal gain. The circuit also includes an analog-to-digital converters and interface for data transfer to the external writer.

Cantilever sensors can be integrated with systems for wireless data transfer to create a completely autonomous devices. The authors of [3] have designed and built cantilever sensor for determination of C-reactive protein with the integrated wireless module. Such devices can be the prototypes of the implantable sensors (Fig.2), which have been

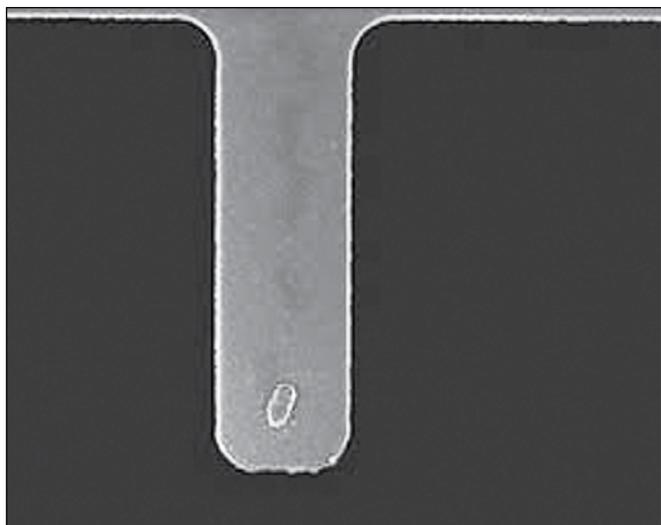


Рис.3. Одиночная бактерия *E.Coli* на поверхности кантилевера [12]

Fig.3. Single *E. Coli* bacterium on the surface of the cantilever [12]

Используя восьмикантилеверный датчик с консолями, покрытыми различными полимерами, авторы [8] показали возможность различать в воздухе "запахи" различных спиртов.

Хотя большинство исследований оперируют данными от одного или нескольких сенсорных кантилеверов, уже показана возможность изготовления тысяч кантилеверов на одном чипе в несколько миллиметров. Компания IBM продемонстрировала размещение 100 кантилеверов на 1 мм<sup>2</sup>. Таким образом, по плотности упаковки сенсорных эле-

ментов кантилеверные датчики приближаются к ДНК-микрочипам. При этом такие чипы не требуют флуоресцентных меток. Основной проблемой остается функционализация такого количества кантилеверов рецепторными молекулами.

### ПРИМЕРЫ БИОСЕНСОРОВ НА ОСНОВЕ МИКРОКАНТИЛЕВЕРОВ ДЛЯ ДЕТЕКЦИИ БИОМОЛЕКУЛ

За время развития кантилеверных биосенсоров продемонстрировано большое количество приложений по детекции различных видов биомолекул: белков [5, 6], нуклеиновых кислот, углеводов [9]. Была показана возможность зарегистрировать единственный нуклеотидный полиморфизм [10].

Особый интерес представляет разработка сенсоров, чувствительных к биологическим объектам, представляющим опасность для здоровья человека. Патогенные агенты могут быть детектированы с помощью кантилеверных сенсоров как напрямую, так и по анализу их генома, продуктов выделения или токсинов.

Определение наличия целых патогенных клеток часто используется для детекции бактерий. Одним из популярных объектов для обработки метода (в значительной степени благодаря ее наличию в различных образцах еды и воды) является *E.coli*. Эта бактерия может служить индикатором качества воды [11]. Детектирование отдельной клетки *E.coli* было продемонстрировано с помощью кантилеверного сенсора в резонансном режиме [12] (рис.3). Однако в данной работе для повышения чувствительности измерения про-

developed relatively recently [4]. Since regeneration of the biosensor is rather difficult, implantable device was used for detection of blood gases such as alcohols. For this purpose on the back side of the cantilever a hydrophobic coating was applied, and the gold side was modified by the polymer thiolised fluorine-siloxane alcohol. The absorption of alcohol by the receptor layer causes bending of the cantilever.

### APPLICATIONS OF BIOSENSORS DEPENDING ON TYPES OF INTEGRATION

The main area of application of biosensors is the diagnosis. Cantilever

sensors allow to identify proteins that are markers of various diseases. For example, the possibility of detection of prostate-specific antigen, a marker of prostate cancer, in clinically significant concentrations was shown [5]. In another project [6] the concentration of myoglobin, which is a marker of cardiovascular diseases, was determined. Many tests require considerable time, specially trained staff and a work in the laboratory. Compact and Autonomous sensor devices based on microcantilevers integrated into microfluidic chips have prospects for use as a personalized diagnostic devices [7]. The response time of such devices is tens

of minutes. Stationary devices can be used in clinical laboratories as an alternative or supplement to standard diagnostic methods.

However, diagnosis is not the only application of cantilever sensors. "Electronic nose" based on arrays of cantilever sensors can be used for environmental monitoring. Using an eight-cantilever sensor with cantilevers coated with different polymers, the authors of [8] showed the possibility to distinguish in the air "smells" of different alcohols.

Although most studies use the data from one or more sensor cantilevers, the possibility to produce thousands of cantilevers on a single

водились в вакууме и требовалась стадия сушки. Данное ограничение может быть преодолено благодаря применению кантилеверов с внутренним каналом, который может работать в вакууме, при этом анализируя жидкость в канале [13]. В другой работе пьезоэлектрический кантилевер миллиметрового размера был использован для определения *E.coli* в буферном растворе с пределом обнаружения 700 клеток/мл [14]. Он позволял вести измерения непосредственно в жидкости с получением данных практически в режиме реального времени.

Использование статического режима показало значительно худший предел обнаружения около  $10^6$  КОЕ/мл [15]. Видимо связывание таких больших объектов как бактерии не создает на поверхности равномерного поверхностного напряжения. Для бактерии *S.Typhimurium* кантилевер в резонансном режиме показал предел обнаружения на уровне  $5 \cdot 10^3$  клеток/мл [16], а в режиме измерения поверхностного напряжения –  $10^6$  КОЕ/мл [17]. Кэмпбелл и соавторы использовали кантилевер, модифицированный поликлональными антителами к бактерии *B. Anthracis*, для измерения в потоке и показали чувствительность в 300 спор/мл [18]. В другом исследовании [19] с использованием кантилеверного сенсора было зарегистрировано 50 спор в воде.

В последние несколько лет популярным стало создание биосенсоров для детектирования вирусов в окружающей среде. Гепатит является одним из самых опасных вирусных заболеваний в мире. Тимурдоган с соавторами [20] использовали канти-

леверный биосенсор для определения вирусов гепатита А и С в бычьей сыворотке. Антитела к гепатитам А и С были иммобилизованы на разных кантилеверах, предел обнаружения составил 0,1 нг/мл (1,6 пМ). Гупта в работе [21] показал, что чувствительности кантилевера по измерению массы достаточно, чтобы взвесить отдельный вирус коровьей оспы, однако он не использовал специфичного сенсорного слоя.

В работе [22] было показано детектирование в статическом режиме вируса утиного гриппа А с помощью кантилевера, модифицированного синтетически гликополимером, содержащим остатки силловых кислот. Авторы полагают, что слой полимера на поверхности кантилевера создавал матрикс, который усиливал поверхностное натяжение за счет дополнительного взаимодействия с вирусными частицами. Предел обнаружения в данной системе составил  $10^6$  вирионов/мл.

Пьезоэлектрический кантилеверный сенсор, работающий в резонансном режиме, был использован для детектирования хеликазы вируса гепатита С с концентрацией 100 пг/мл [23]. Хеликаза является ферментом, отвечающим за развертывание вирусной РНК и специфична для данного вируса. В качестве рецептора были использованы РНК аптамеры – короткие последовательности нуклеотидов, способные специфически связывать антиген (белок). Их можно легко синтезировать, и они более стабильны при хранении, чем антитела.

Другим вариантом детектирования патогенных агентов является определение наличия их

chip of few millimeters is already shown. IBM has demonstrated the location of the 100 cantilevers on  $1 \text{ mm}^2$ . Thus, by packing density of sensor elements, cantilever sensors are close to the DNA microchips. However, these chips do not require fluorescent markers. The main problem is the functionalization of such number of cantilevers with receptor molecules.

#### EXAMPLES OF BIOSENSORS BASED ON MICROCANTILEVERS FOR DETECTION OF BIOMOLECULES

During the development of cantilever biosensors a large number of applications for detecting various

types of biomolecules (proteins [5, 6], nucleic acids, carbohydrates [9]) was demonstrated. The possibility to register single nucleotide polymorphism [10] was shown.

The development of sensors for biological objects that are dangerous for human health is of particular interest. Pathogenic agents can be detected using cantilever sensors, both directly and by analysis of their genome, waste products or toxins.

Determination of the presence of whole pathogenic cells is often used for the detection of bacteria. One of the most popular objects for testing of methods (largely thanks to its presence in various samples

of food and water) is *E.coli*. This bacterium may serve as an indicator of water quality [11]. The detection of individual *E. coli* cell was demonstrated using the cantilever sensor in a resonant mode [12] (Fig.3). However, in this project, for sensitivity increase measurements were carried out in vacuum and required stage of drying. This limitation can be overcome through the use of cantilevers with an internal channel that can work in a vacuum, wherein analyzing the fluid in the canal [13]. In another study, the piezoelectric cantilever of millimeter size was used to determine *E.coli* in a buffer solution with a



нуклеиновых кислот в образце. В отличие от крупных объектов, ДНК и РНК не обладают значительной массой, но было показано, что связывание нуклеиновых кислот с комплементарными молекулами на поверхности кантилевера вызывает значительное поверхностное напряжение. Было продемонстрировано детектирование неамплифицированной матричной РНК в общей массе РНК клетки с пределом обнаружения 10 пмоль. С использованием микрокантилеверного сенсора и усиления с помощью кремниевых наночастиц удалось достичь определения ДНК вируса гепатита В на фемтомольном уровне [24]. Фрагмент ДНК вируса длиной 243 нуклеотида был детектирован с помощью зонда на уровне пикомолей. Дальнейшее увеличение чувствительности до фемтомолей было получено за счет гибридизации со вторым зондом, содержащим наночастицу.

В работе [25] описано детектирование производящей токсины цианобактерии *M. aeruginosa* по видоспецифичному участку гена 16S рибосомальной РНК на уровне концентрации 50 клеток/мл. Для этого на кантилевере были иммобилизованы ДНК олигонуклеотиды, содержащие 27 оснований, комплементарные к искомого участка генома. Сенсор фиксировал сдвиг резонансной частоты кантилевера, вызванный гибридизацией молекул комплементарных ДНК, пропорциональный концентрации бактерий в растворе. Достоверность гибридизации была подтверждена флуоресцентными измере-

ниями и вторичной гибридизацией ДНК-зондов с пришитой наночастицей золота.

Пьезорезистивный кантилеверный сенсор был применен [26] для регистрации стафилококкового энтеротоксина Б с концентрацией 1 нмоль с использованием тиомодифицированных аптамеров в качестве рецепторов. Данный токсин может выделяться некоторыми видами стафилококка. Также был детектирован рицин в концентрации 0,14 и 0,28 нмоль. В качестве рецептора использовались меченые биотином поликлональные антитела. Рицин является чрезвычайно ядовитым токсином растительного происхождения.

### **ЭКОНОМИЧЕСКАЯ ЦЕЛЕСОБРАЗНОСТЬ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МИКРОКАНТИЛЕВЕРОВ В КАЧЕСТВЕ БИОСЕНСОРНЫХ УСТРОЙСТВ**

Основным измерительным элементом в кантилеверном сенсоре является кремниевый датчик. Технологии микрообработки кремния хорошо изучены благодаря применению в микроэлектронике. Это делает их доступными и недорогими. По данным Yole Development, микрообработка 1 см<sup>2</sup> кремния обходится производителям в 0,165 долл. США. На одном квадратном сантиметре кремниевой подложки может свободно уместиться более 10 кантилеверных датчиков. Выполнен ряд работ, нацеленных на разработку экономичных методик производства кантилеверных датчиков [27, 28]. В результате были созданы методики, позволяющие изготавливать

detection limit of 700 cells/ml [14]. It allows to measure directly in the liquid with data receiving in near real time.

The use of static mode showed significantly worse detection limit of about 10<sup>6</sup> CFU/ml [15]. Apparently the binding of such large objects as the bacteria does not create a uniform surface tension. For the *S. Typhimurium* bacteria the cantilever in resonance mode showed a detection limit at the level of 5·10<sup>3</sup> cells/ml [16], and in the mode of measuring of surface tension – 10<sup>6</sup> CFU/ml [17]. Campbell and co-authors used a cantilever modified with polyclonal antibodies

against *B. Anthracis* bacteria for measuring in the flow and have shown a sensitivity of 300 spores/ml [18]. In another study [19] with the use of cantilever sensor it has been registered 50 spores in water.

In the last few years the creation of biosensors for the detection of viruses in the environment became popular. Hepatitis is one of the most dangerous diseases in the world. Timurdogan and co-authors [20] used a cantilever biosensor to identify viruses of hepatitis A and C in bovine serum. Antibodies to hepatitis A and C were immobilized on different cantilevers, the detection limit was 0.1 ng/ml (1.6 pmole). Gupta in

[21] showed that the sensitivity of the cantilever to measure the mass is enough to weigh single vaccinia virus, but he did not use a specific sensor layer.

In paper [22] it is shown the detection in the static mode of duck influenza A virus with a cantilever modified with synthetically glycopolymer containing residues of sialic acids. The authors suggest that the polymer layer on the surface of the cantilever created a matrix that increased surface tension due to the additional interaction with viral particles. The limit of detection in this system amounted to 10<sup>6</sup> virions/ml.

кантилеверные сенсоры высокого качества с минимальными затратами.

### КОММЕРЧЕСКИ ДОСТУПНЫЕ КОМПОНЕНТЫ И МОДУЛИ ДЛЯ БИОСЕНСОРОВ НА ОСНОВЕ МИКРОКАНТИЛЕВЕРОВ

В настоящее время несколько компаний продают коммерческие кантилеверы для разработки сенсорных устройств [29, 30] (рис.4). На рынке также представлены готовые установки для проведения экспериментов по изучению взаимодействий на поверхности кантилеверов, которые могут служить основой для создания сенсора. Большинство элементов биосенсорного устройства, такие как источники лазерного излучения, фотодетекторы, электронные компоненты также коммерчески доступны.

Ниже приведен список основных производителей кантилеверов:

- NanoAndMore ([www.nanoandmore.com](http://www.nanoandmore.com));
- Bruker ([bruker.afm.probes.com](http://bruker.afm.probes.com));
- Olympus ([probe.olympus-global.com](http://probe.olympus-global.com));
- NanoScience Instruments ([www.nanoscience.com](http://www.nanoscience.com)).

### ПРЕИМУЩЕСТВА И НЕДОСТАТКИ БИОСЕНСОРОВ НА ОСНОВЕ МИКРОКАНТИЛЕВЕРОВ

Одним из основных преимуществ кантилеверных сенсоров является то, что они обеспечивают прямой анализ, не требуя введения дополнительных меток. Это позволяет максимально упростить процедуру пробоподготовки и вести непрерывный мониторинг в режиме реального времени.

The piezoelectric cantilever sensor operating in resonant mode, was used to detect helicase of hepatitis C virus with a concentration of 100 pg/ml [23]. Helicase is the enzyme responsible for the deployment of viral RNA and is specific to this virus. RNA aptamers, a short sequences of nucleotides, which are able to specifically bind the antigen (protein), were used as receptor. They can be easily synthesized, and they are more stable in storage than antibodies.

Another option for the detection of pathogenic agents is the detection of their nucleic acids in the sample. Unlike large objects, DNA and RNA

does not have substantial mass, but it has been shown that the binding of nucleic acids with complementary molecules on the surface of the cantilever causes a large surface stress. It was demonstrated detection of not amplified template-RNA in the total mass of RNA of the cell with a detection limit of 10 pmole. With the use of microcantilever sensor and gain by means of silicon nanoparticles it was succeeded to achieve detection of DNA of the hepatitis b virus at femtomolar level [24]. The DNA fragment of the virus with a length of 243 nucleotide was detected using a probe at the level of picomoles. A further increase in sensitivity to femtomoles was

achieved by hybridization with a second probe containing a nanoparticle.

Paper [25] describes the detection of toxins producing *M.aeruginosa* cyanobacteria by the specific section of the 16S gene of ribosomal RNA at the level of a concentration of 50 cells/ml. For this purpose, DNA oligonucleotides containing 27 bases that are complementary to the desired region of the genome, was immobilized on the cantilever. The sensor registered the shift of the resonance frequency of the cantilever caused by the hybridization of complementary DNA molecules that is proportional to the concentration of bacteria in solution. The

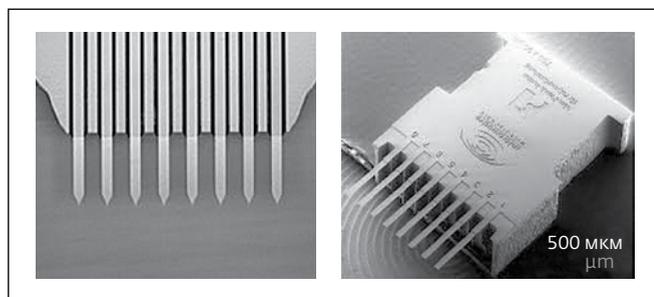


Рис.4. Микрофотографии коммерчески доступных кантилеверов для создания сенсоров: слева – ArrowTL8Au (Nanoworld, Швейцария) [29], справа – Octosensis Chip (Micromotive, Германия) [33]

Fig.4. Micrograph of commercially available cantilevers for sensors: left – ArrowTL8Au (Nanoworld, Switzerland) [29], right – Octosensis Chip (Micromotive, Germany) [33]

Несмотря на то что кантилеверные сенсоры могут напрямую измерять взаимодействие между антителами и антигенами или гибридизацию ДНК, их чувствительность зачастую недостаточна для практического применения [31]. Разработаны способы усиления сигнала, такие как использование наночастиц [24] или создание специального матрикса на поверхности кантилевера [22]. Важным лимитирующим фактором для достижения максимальной чувствительности является неспецифическое связывание. Кантилеверные сенсоры, работающие в статическом режиме, имеют высокую степень защиты от неспецифического связывания, так как энергия неспецифического взаи-



модействия вносит лишь небольшой вклад в изгиб кантилевера. Сенсоры, работающие в резонансном режиме, напротив реагируют на любую присоединенную массу.

Еще одним минусом является большая подверженность кантилеверов (особенно в статическом режиме) внешнему воздействию, например изменению температуры, флуктуациям потока жидкости, сейсмическим шумам, что ведет к увеличению погрешности измерений. Сенсоры, работающие в резонансном режиме, более устойчивы к подобным факторам, однако в жидкости добротность резонансных изгибных колебаний сильно падает, что также ведет к уменьшению чувствительности. Избежать этого возможно, используя для измерений продольные моды колебаний [32].

### АКТУАЛЬНЫЕ НАПРАВЛЕНИЯ ИССЛЕДОВАНИЙ

Кантилеверные биосенсоры являются многообещающей платформой для создания высокочувствительных и селективных сенсорных устройств. При этом существует ряд критических факторов, определяющих развитие данной технологии.

Важнейшим направлением исследований для создания сенсоров на основе микрокантилеверов является поверхностная химия. От качества рецепторного слоя зависят работоспособность и характеристики всего сенсора. Не существует универсальных способов модификации кантилеверов. Для каждого конкретного сенсорного приложения нужно разрабатывать отдельную методику, обеспе-

чивающую наилучшие результаты. Таким образом, разработка протоколов создания рецепторных слоев и их исследование являются ключевыми задачами для успешного создания сенсора.

Другое важнейшее направление – поиск новых материалов. Как было показано, характеристики материала существенно влияют на чувствительность датчика, и, используя новые функциональные материалы, можно добиться существенного увеличения чувствительности системы регистрации. Широкие перспективы открывает применение полимерных материалов. Однако технологии изготовления микроэлектромеханических систем из них отработаны не так хорошо, как для кремния и его соединений.

Конечной целью совершенствования технологий кантилеверных сенсоров должно служить достижение чувствительности, позволяющей детектировать единичную молекулу вещества при сохранении селективности.

*Исследование выполнено при финансовой поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации (проект 02.G25.31.0135).*

### ЛИТЕРАТУРА

1. Ricciardi C., Canavese G., Castagna R., Ferrante I., Ricci A., Marasso S.L., Napione L., Bussolino F. Integration of microfluidic and cantilever technology for biosensing application in liquid environment // Biosens Bioelectron. 2010, Dec. 15; 26(4): 1565-70.

reliability of the hybridization was confirmed by fluorescence measurements and by secondary hybridization of DNA probes with attached gold nanoparticle.

Piezoresistive cantilever sensor was used [26] for registration of staphylococcal enterotoxin B with a concentration of 1 nmole using thio-modified aptamers as receptors. This toxin can be released by some types of staphylococcus. Ricin in a concentration of 0.14 nmol and 0.28 nmol was also detected. Labeled with biotin polyclonal antibodies were used as the receptor. Ricin is extremely poisonous toxin of plant origin.

### ECONOMIC FEASIBILITY OF USE OF MICROCANTILEVERS AS BIOSENSOR DEVICES

The basic measuring element in a cantilever sensor is a silicon sensor. The microprocessing of silicon is well studied for its use in microelectronics. This makes it accessible and affordable. According to Yole Development, the cost of microprocessing of 1 cm<sup>2</sup> of silicon is \$ 0.165. One square centimeter of a silicon substrate can easily accommodate more than 10 cantilever sensors. A number of researches aimed at the development of economical methods of production of cantilever sensors is executed [27, 28]. The results were the

techniques allowing to produce cantilever sensors with high quality and minimal costs.

### COMMERCIALLY AVAILABLE COMPONENTS AND MODULES FOR BIOSENSORS BASED ON MICROCANTILEVERS

Currently, several companies sell commercial cantilevers for the development of sensor devices [29, 30] (Fig.4). Devices that are ready for experiments to study interactions on the surface of the cantilever, which can be used as the basis for sensors, are also presented on the market. Most of the elements of biosensor devices, such as laser sources,

2. Hagleitner C., Hierlemann A., Lange D., Kummer A., Kerness N., Brand O., Balthes H. Smart single-chip gas sensor microsystem // *Nature* 414, 293–296.
3. Chen C.H., Hwang R.Z. et al. *IEEE Trans. Biomed. Eng.*, 2009, vol. 56, No. 2, pp. 462–470.
4. Cheney C.P. et al. In vivo wireless ethanol vapor detection in the Wistar rat // *Sensors and Actuators B*, 138 (2009), p. 264.
5. Wu G., Datar R.H., Hansen K.M., Thundat T., Cote R.J., Majumdar A. Bioassay of prostate-specific antigen (PSA) using microcantilevers // *Nat. Biotechnol.*, 2001, 19, 856–860.
6. Arntz Y., Seelig J.D., Lang H.P., Zhang J., Hunziker P., Ramseyer J.P., Meyer E., Hegner M., Gerber C. Label-free protein assay based on a nanomechanical cantilever array // *Nanotechnology*, 14. 2003. 86–90.
7. Vasan A.S., Mahadeo D.M., Doraiswami R., Huang Y., Pecht M. Point-of-care biosensor system // *Front Biosci (Schol Ed)*, 2013, 5, 39–71.
8. Baller M.K., Lang H.P., Fritz J., Gerber Ch., Gimzewski J.K., Drechsler U., Rothuizen H., Despont M., Vettiger P., Battiston F.M. et al. A cantilever array-based artificial nose // *Ultramicroscopy* 2000, 82, 1–9.
9. Chen G.Y., Thundat T., Wachter E.A., Warmack R.J. Adsorption-induced surface stress and its effects on resonance frequency of microcantilevers // *J. Appl. Phys.*, 77. 1995. 3618–22.
10. Hansen K.M., Ji H.F., Wu G., Datar R., Cote R., Majumdar A., Thundat T. Cantilever-based optical deflection assay for discrimination of DNA single-nucleotide mismatches // *Anal. Chem.*, 73. 2001. 1567–71.
11. Edberg S.C., Rice E.W., Karlin R.J., Allen M.J. *Escherichia coli*: the best biological drinking water indicator for public health protection // *J Appl Microbiol* 88. 2000. 106S–116S.
12. Ilic B., Czaplewski D., Zalalutdinov M., Craighead H.G., Neuzil P., Campagnolo C., Batt C. Single cell detection with micromechanical oscillators // *J Vac Sci Technol B* 19. 2001. 2825–2828.
13. Burg T.P., Godin M., Knudsen S.M. et al. Weighing of biomolecules, single cells and single nanoparticles in fluid // *Nature* 446. 2007. 1066–1069.
14. Campbell G.A., Mutharasan R. Detection of pathogen *Escherichia coli* O157:H7 using self-excited PZT-glass microcantilevers // *Biosens Bioelectron* 21. 2005. 462–473.
15. Zhang J., Ji H.F. An anti-*E.coli* O157: H7 antibody-immobilized microcantilever for the detection of *Escherichia coli* (*E.coli*) // *Anal Sci* 20. 2004. 585–587.
16. Zhu Q., Shih W.Y., Shih W.H. Real-time, label-free, allelectrical detection of *Salmonella typhimurium* using lead titanate zirconate/gold-coated glass cantilevers at any relative humidity // *Sens Actuators B Chem* 125. 2007. 379–388.
17. Weeks B.L., Camarero J., Noy A., Miller A.E., Stanker L., De Yoreo J.J. A microcantilever-based pathogen detector // *Scanning* 25. 2003. 297–299.
18. Campbell G.A., Mutharasan R. Piezoelectric-

photo-detectors, the electronic components are also commercially available.

The following is a list of the major manufacturers of cantilevers:

- NanoAndMore ([www.nanoandmore.com](http://www.nanoandmore.com));
- Bruker ([bruker.afm.probes.com](http://bruker.afm.probes.com));
- Olympus ([probe.olympus-global.com](http://probe.olympus-global.com));
- NanoScience Instruments ([www.nanoscience.com](http://www.nanoscience.com)).

#### ADVANTAGES AND DISADVANTAGES OF BIOSENSORS BASED ON MICROCANTILEVERS

One of the main advantages of cantilever sensors is that they allow direct

analysis without use of additional marks. This allows to simplify the procedure of sample preparation and to conduct continuous monitoring in real-time.

Despite the fact that the cantilever sensors can directly measure the interaction between antibodies and antigens or hybridization of DNA, their sensitivity is often insufficient for practical applications [31]. Methods of signal amplification, such as using nanoparticles [24] or the creation of a special matrix on the surface of the cantilever [22] are developed. An important limiting factor for maximum sensitivity is non-specific binding.

Cantilever sensors operating in the static mode, have a high degree of protection against non-specific binding, since the energy of nonspecific interaction makes only a small contribution to the bending of the cantilever. Sensors operating in the resonance mode, on the contrary react to any attached mass.

Another disadvantage is the high susceptibility of the cantilever (especially in static mode) to external influences, e.g. temperature variations, fluctuations of the fluid flow, seismic noise, which leads to increased measurement errors. Sensors operating in the resonant mode, are more resistant to such



- excited millimeter-sized cantilever (PEMC) sensors detect *Bacillus anthracis* at 300 spores/mL // *Biosens Bioelectron* 21. 2006. 1684–1692.
19. Davila A.P., Jang J., Gupta A.K., Walter T., Aronson A., Bashir R. Microresonator mass sensors for detection of *Bacillus anthracis* Sterne spores in air and water // *Biosens Bioelectron* 22. 2007. 3028–3035.
  20. Timurdogan E., Alaca B.E., Kavakli I.H., Urey H. MEMS biosensor for detection of Hepatitis A and C viruses in serum // *Biosens Bioelectron*, 2011, 28, 189–194.
  21. Gupta A., Akin D., Bashir R. Single virus particle mass detection using microresonators with nanoscale thickness // *Appl Phys Lett*. 2004. 84. 1976–1978.
  22. 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 // *The Analyst*. 2015. 140. 17. pp. 6131–6137.
  23. Hwang K.S., Lee S.M., Eom K., Lee J.H., Lee Y.S., Park J.H., Yoon D.S., Kim T.S. Nanomechanical microcantilever operated in vibration modes with use of RNA aptamer as receptor molecules for label-free detection of HCV helicase // *Biosens Bioelectron*. 2007 Nov 30. 23(4). 459–65.
  24. Cha B.H., Lee S.M., Park J.C. et al. Detection of Hepatitis B Virus (HBV) DNA at femtomolar concentrations using a silica nanoparticle-enhanced microcantilever sensor // *Biosens Bioelectron*. 2009. 25. 130–135.
  25. Johnson B.N., Mutharasan R. A cantilever biosensor-based assay for toxin-producing cyanobacteria *Microcystis aeruginosa* using 16S rRNA // *Environ Sci Technol*. 2013. 47(21). 12333–12341.
  26. Rui Zhao, Jianlin Zhang, Jiancheng Yang, Yongzheng Wen, Xiaomei Yu. Multi-target toxin detections based on piezoresistive microcantilevers // 17th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences. 27–31 October 2013, Freiburg, Germany.
  27. Clausen I., Moe S.T., Vogl A. Design and processing of a cost-effective piezoresistive MEMS cantilever sensor for medical and biomedical use // *Journal of Micromechanics and Microengineering*. Vol. 22. No 7. 074008.
  28. Faegh S., Jalili N., Yavuzcetin O., Nagesha D., Kumar R., Sridhar S. A cost-effective self-sensing biosensor for detection of biological species at ultralow concentrations // *Journal of Applied Physics*. 2013. 113. 224905.
  29. <http://www.nanoworld.com>
  30. <http://www.micromotive.de>
  31. Sen Xu. Electromechanical biosensors for pathogen detection // *Microchim Acta*. 2012. 178. 245–260.
  32. Shuh W.Y., Zhu Q., Shih W.-H. Length and thickness dependence of longitudinal flexural resonance frequency shifts of a piezoelectric microcantilever sensor due to Young's modulus change // *J. Appl. Phys.*, 2008. 104. 074503.
  33. Bumbu G.G., Wolkenhauer M., Kircher G., Gutmann J.S., Berger R. Micromechanical cantilever technique: a tool for investigating the swelling of polymer brushes // *Langmuir*, 2007. 23. 4. 2203–2207.

factors, however, in liquids quality factor of the resonant flexural vibrations strongly decreases, which also leads to a reduction of sensitivity. To avoid this, it is possible to use the measurements of the longitudinal vibration modes [32].

#### CURRENT AREAS OF RESEARCH

Cantilever biosensors are a promising platform for highly sensitive and selective sensor devices. However, there are some critical factors that determine the development of this technology.

The most important area of research to create sensors based on microcantilevers is surface

chemistry. The quality of the receptor layer determines the performance and the characteristics of the entire sensor. There are no universal methods of modification of the cantilever. Each specific applications needs in development of a special methodology that provides the best results. Thus, the development of protocols for the creation of receptor layers, and their study is key to the successful creation of the sensor.

Another important area is the search for new materials. As shown, the characteristics of the material significantly affect the sensitivity of the sensor, and using new functional materials, it is possible to

significantly increase the sensitivity of the registration system. The use of polymeric materials opens broad prospects. However, the manufacturing of microelectromechanical systems on basis of them is worked out not so well, as for silicon and its compounds.

The ultimate goal of improving the technology of cantilever sensors would be the achievement of sensitivity, allowing to detect a single molecule of a substance while maintaining selectivity. ■

*The study was performed with the financial support of the Ministry of education and science of Russian Federation (project 02.G25.31.0135).*