

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ  
имени М.В. ЛОМОНОСОВА  
ФИЗИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ

УДК 53.08  
ГРНТИ 291900  
Инв.№

УТВЕРЖДЕНО  
Декан физического факультета  
МГУ, профессор  
\_\_\_\_\_ В.И. Трухин

Промежуточный научно-технический отчет о  
выполнении 1 этапа НИР по направлению  
«Биокаталитические, биосинтетические и биосенсорные технологии», по  
проблеме «Биосенсоры на основе микрокантилеверов и биокаталитические  
рецепторы».

(государственный контракт № П255 от 23 июля 2009 г.)

ЭТАП № 1. «Определение и обоснование оптимального варианта  
направления исследования проблемы: «Биокаталитические,  
биосинтетические и биосенсорные технологии»»

Руководитель работ

/И.В. Яминский/

Москва 2009

## СПИСОК ИСПОЛНИТЕЛЕЙ

### Руководитель проекта:

№ п/п	ФИО	дата рождения	ученая степень, ученое звание	место работы	должность	подпись
1	Яминский Игорь Владимирович	29.04.1954	доктор физико-математических наук, профессор	Физический факультет МГУ	профессор	

### Основные Исполнители проекта:

№ п/п	ФИО	дата рождения	ученая степень, ученое звание	место работы	должность	подпись
1	Дубровин Евгений Владимирович	25.07.1980	к.ф.м.н.	Физический факультет МГУ	Научный сотрудник	
2	Мешков Георгий Борисович	17.06.1981	к.ф.м.н.	Физический факультет МГУ	Научный сотрудник	
3	Меньшиков Евгений Александрович	11.03.1985	Нет	Физический факультет МГУ	Аспирант	
4	Колесов Дмитрий Валерьевич	28.09.1985	Нет	Физический факультет МГУ	Аспирант	
5	Багров Дмитрий Владимирович	02.05.1985	Нет	Физический факультет МГУ	Аспирант	
6	Мухин Дмитрий Сергеевич	26.04.1987	Нет	Физический факультет МГУ	Студент	
7	Ерофеев Александр Сергеевич	03.01.1987	Нет	Физический факультет МГУ	Студент	

**Соисполнители проекта:**

№ п/п	ФИО	дата рождения	ученая степень, ученое звание	место работы	должность	подпись
1	Горелкин Петр Владимирович	21.05.1985	Нет	Химический факультет МГУ	Аспирант	
2	Киселев Глеб Александрович	17.12.1981	К.ф.м.н.	ООО «Академия биосенсоров»	Генеральный директор	
3	Сушко Анна Дмитриевна	25.07.1985	Нет	ООО НПП «Центр перспективных технологий»	Научный сотрудник	

## **СОДЕРЖАНИЕ**

<b>Введение</b> .....	<b>5</b>
<b>1. Аналитический обзор биокаталитических и биосенсорных систем</b> .....	<b>7</b>
<b>1.1. Методы зондовой микроскопии</b> .....	<b>7</b>
1.1.1. Атомно-силовая микроскопия.....	7
1.1.2. Силовая спектроскопия.....	9
1.1.3. Методы, использующие датчики на основе кантилеверов АСМ .....	10
1.1.4. Архитектура кантилеверных датчиков и системы контроля за положением кантилеверов .....	15
1.1.5. Производство и методы очистки кантилеверов .....	21
<b>1.2. Преобразователи биохимических реакций в аналитический сигнал</b> .....	<b>23</b>
1.2.1. Амперометрический анализатор .....	24
1.2.2. Потенциометрический анализатор .....	25
1.2.3. Емкостной иммуносенсор.....	26
1.2.4. Кондуктометрические датчики .....	26
1.2.5. Оптические иммуносенсоры .....	27
1.2.6. Пьезокварцевые иммуносенсоры.....	28
1.2.7. Сравнительный анализ аналитических возможностей различных типов иммуносенсоров .....	30
<b>1.3. Исследования химических и биологических процессов на поверхности кантилевера</b> .....	<b>32</b>
1.3.1. Хемосорбция низкомолекулярных веществ и поверхностные химические реакции .....	32
1.3.2. Кантилеверные сенсоры на основе высокомолекулярных и биополимерных систем .....	39
<b>Выбор и обоснование оптимального варианта направления исследований</b> .....	<b>45</b>
<b>План проведения экспериментальных и теоретических исследований</b> .....	<b>48</b>
<b>Экспериментальная и теоретическая часть</b> .....	<b>49</b>
<b>2.1 Введение</b> .....	<b>49</b>
<b>2.2 Материалы и методы</b> .....	<b>49</b>
2.3.4.2. Материалы и методы.....	50
2.3.4.3. Результаты и обсуждение .....	51
<b>3. Исследование свойств монослоев низкомолекулярных веществ</b> .....	<b>53</b>
<b>3.1. Введение</b> .....	<b>53</b>
<b>3.2. Материалы и методы</b> .....	<b>54</b>
<b>3.3. Результаты и обсуждение</b> .....	<b>55</b>
<b>3.4 Теоретическая оценка пределов чувствительности микрокантилеверной системы</b> 60	
<b>3.5. Выводы</b> .....	<b>61</b>
<b>4. Иммунохимический сенсор на тестовые биополимеры</b> .....	<b>61</b>
4.1. Введение .....	61
4.2. Материалы и методы.....	62
4.2.3. Результаты и обсуждение .....	64
4.2.4. Выводы .....	69
<b>Заключение</b> .....	<b>69</b>
<b>Список источников</b> .....	<b>71</b>
<b>ПРИЛОЖЕНИЕ А</b> .....	<b>82</b>
<b>ПРИЛОЖЕНИЕ Б</b> .....	<b>84</b>
<b>ПРИЛОЖЕНИЕ В</b> .....	<b>94</b>
<b>ПРИЛОЖЕНИЕ Г</b> .....	<b>103</b>
<b>ПРИЛОЖЕНИЕ Д</b> .....	<b>129</b>

## Реферат

## Реферат

Отчет 129 с., 3 ч., 48 рис., 7 табл., 172 источн., 5 прил.

### КАНТИЛЕВЕРЫ , АТОМНО-СИЛОВОЙ , МИКРОСКОП , БИОСЕНСОР , ИММУНОХИМИЧЕСКИЙ , СЕНСОР

В отчете представлены результаты исследований, выполненных по 1 этапу Государственного контракта № П255 "Биосенсоры на основе микрокантилеверов и биокаталитические рецепторы" (шифр "НК-37П") от 23 июля 2009 по направлению "Биокаталитические, биосинтетические и биосенсорные технологии" в рамках мероприятия 1.2.1 "Проведение научных исследований научными группами под руководством докторов наук.", мероприятия 1.2 "Проведение научных исследований научными группами под руководством докторов наук и кандидатов наук" , направления 1 "Стимулирование закрепления молодежи в сфере науки, образования и высоких технологий." федеральной целевой программы "Научные и научно-педагогические кадры инновационной России" на 2009-2013 годы.

Цель работы - Анализ сенсорных систем оценка возможности разработки полнофункциональных устройств на базе микрокантилеверных преобразователей для регистрации сверхмалых количеств вещества, ориентированных на массовое применение в качестве высокочувствительных сенсоров и анализаторов.

Метод химической модификации поверхности; методы зондовой микроскопии; методы, использующие датчики на основе кантилеверов АСМ; методы очистки золотых кантилеверов (1. травление в "царской водке", 2. ультрафиолетовое облучение).метод статистической прививки антител на поверхности с использованием свободных аминогруппметодики ковалентной и физической иммобилизации белков на кремниевой и золотой поверхностях кантилевера

Сканирующий зондовый микроскоп,микромеханические устройства на основе кантилеверов,объекты с известными свойствами.

Аналиический обзор; найден и обоснован оптимальный вариант исследований; разработан план проведения экспериментальных и теоретических исследований

## Список используемых сокращений

АИС – амперометрический иммуносенсор

АПС – аминопропилсилатран

АСМ – атомно-силовой микроскоп

БСА – бычий сывороточный альбумин

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

ИФА – иммуноферментный анализ

КМВ – кварцевое микровзвешивание

КМОП – комплиментарная металло-оксидно-полупроводниковая технология

МЭМС – микроэлектромеханические системы

НЭМС – наноэлектромеханические системы

ПХ – пероксидаза хрена

РИА – радиационный иммунный анализ

РНК – рибонуклеиновая кислота

РЭМ – растровый электронный микроскоп

СЗМ – сканирующий зондовый микроскоп

СТМ – сканирующий тунельный микроскоп

ФСБР – фосфатный солевой буферный раствор

RMS – root mean squared detector (среднеквадратичный детектор)

SAW – surface acoustic waves (поверхностные акустические волны)

SPR – surface plasmon resonance (поверхностный плазмонный резонанс)

IgG – гамма-иммуноглобулин (класс макромолекул антител имеющих «Y»-форму)

## Введение

Одним из активно развивающихся приложений метода химического модифицирования поверхности является разработка химических и биосенсоров – аналитических устройств, включающих взаимодействующий с определяемым веществом рецепторный слой, тесно связанный или интегрированный с физическим преобразователем [1]. Каждый из известных сегодня типов сенсоров (электрохимические, полупроводниковые, оптические, масс-чувствительные и т. д.) обладает своими достоинствами и недостатками, поэтому представляет интерес не только совершенствование рецепторов известных типов, но и разработка новых селективных высокочувствительных сенсорных систем, раскрытие их потенциальных возможностей и преимуществ.

Селективность сенсора определяется наличием на поверхности преобразователя прочно зафиксированного слоя функциональных групп или молекул, способных специфично и, желательно, обратимо взаимодействовать с определяемым веществом – аналитом. Создание такого рецепторного слоя – необходимое, но не достаточное условие эффективности сенсора [2].

В последние десятилетия произошел технологический прорыв в области изготовления кремниевых микроконсолей (кантилеверов) для атомно-силовой микроскопии, позволивший создать чувствительные тепловые, магнитные, масс-сенсоры. Успешное использование кантилеверов для детектирования самых разных физических взаимодействий открывает широкие перспективы создания на их основе принципиально нового класса химических сенсоров – так называемых микромеханических сенсоров, в которых регистрируется изменение поверхностного натяжения на границе рецептор – окружающая среда.

Это позволяет предположить, что микромеханические устройства на основе кантилеверов могут служить не только в качестве средств инструментального экспресс-анализа, но и в качестве инструментов для изучения привитых слоев и физико-химических процессов в приповерхностном слое. Поэтому выявление того, какую информацию о них можно получить с помощью микромеханических устройств на основе кантилеверов, является, несомненно, интересной и актуальной в фундаментальном аспекте задачей.

Для этого необходимо на примере использования различных модификаторов поверхности и адсорбатов выявить основные закономерности возникновения

аналитического сигнала в микромеханических сенсорах и установить степень влияния различных процессов, протекающих в привитых слоях, на поверхностное натяжение.

## ***1. Аналитический обзор биокаталитических и биосенсорных систем***

В обзоре кратко описаны основы методов зондовой микроскопии, в особенности атомно-силовой микроскопии (раздел 1.1.1) и силовой спектроскопии (раздел 1.1.2), и их применения при исследовании свойств биополимерных систем. В разделе 1.1.3 рассматриваются аспекты функционирования современных перспективных микрокантилеверных устройств в качестве высокочувствительных многофункциональных биохимических датчиков. Проанализированы основные факторы, отвечающие за выработку аналитического сигнала микрокантилеверных сенсоров. Представлен спектр применений микромеханических систем и схем регистрации аналитического сигнала (раздел 1.3), при этом особое внимание уделено анализу супрамолекулярных структур рецепторных слоев силовых преобразователей. Для сравнения в обзоре описаны основные характеристики и принципы функционирования распространенных преобразователей биофизических реакций в аналитический сигнал (раздел 1.2).

### **1.1. Методы зондовой микроскопии**

#### **1.1.1. Атомно-силовая микроскопия**

Сканирующая зондовая микроскопия (СЗМ) является сравнительно новым методом исследования объектов с высоким пространственным разрешением. Первым зондовым микроскопом стало изобретение швейцарских ученых Герхарда Биннига и Хайнриха Рорера, предложивших в 1981 г. использовать эффект туннелирования электронов для визуализации атомарной структуры проводящей поверхности графита, в результате чего их изобретение было названо сканирующим туннельным микроскопом (СТМ) [1]. С появлением атомно-силового микроскопа (АСМ) в 1986 г. [2] область применения СЗМ значительно расширилась и АСМ занял прочные лидирующие позиции в исследовании с атомным разрешением свойств непроводящих поверхностей. Метод стал настолько привлекательным, что через пять лет с момента открытия микроскопа уже существовали 22 его основные вариации [3], которые были разработаны для решения широкого спектра задач материаловедения. До сих пор атомно-силовая микроскопия по темпам развития и



информативности получаемых данных существенно опережает альтернативные методы электронной микроскопии и рентгеноструктурного анализа вещества.

Основным функциональным элементом любого сканирующего зондового микроскопа является зонд. В атомно-силовом микроскопе зонд представляет собой гибкую консольную балку, на свободном конце которой находится микроострие. Такая система называется кантилевером, который определяет основные свойства АСМ. В самом простом случае АСМ напоминает обычный граммафон, который осуществляет скольжение иглы по грампластинке и воссоздает ее рельеф в виде модулированного звукового сигнала. В атомно-силовом микроскопе кантилевер построчно сканирует поверхность образца ультратонкой иглой (рис 1.1).

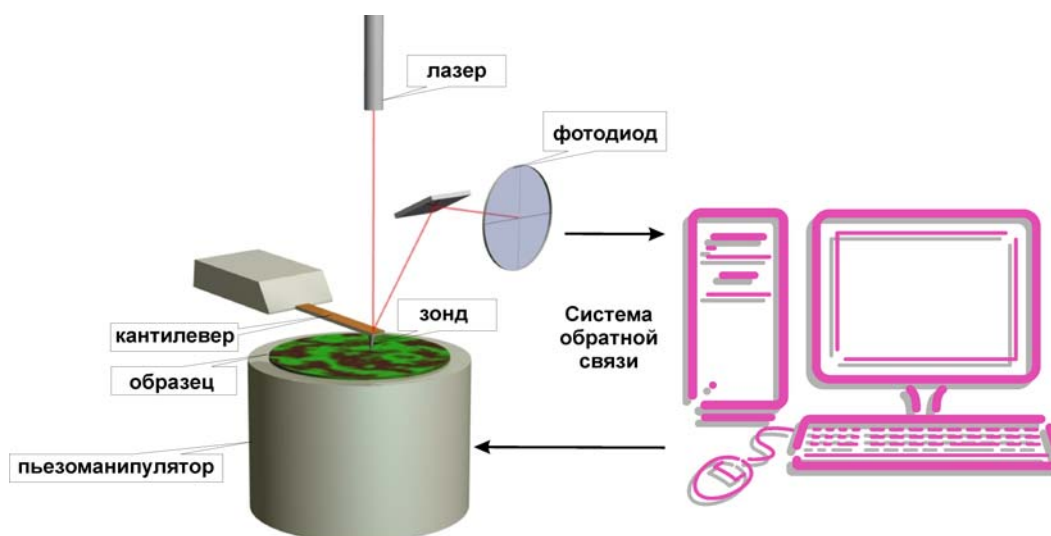


Рис. 1.1. Схема атомно-силового микроскопа.

В результате межатомного взаимодействия острия иглы с поверхностью гибкая балка кантилевера деформируется, что в самом простом случае служит полезным сигналом. Для того чтобы минимизировать изменения силы изгиба кантилевера в процессе сканирования, используют систему обратной связи, благодаря которой образец отводится от острия, если сила превышает определенное значение и, наоборот, в случае уменьшения силы обратная связь с использованием пьезоманипулятора (рис. 1.1) позволяет стабилизировать ее значение. Такой режим сканирования называется режимом постоянной силы. Сигналы отклонения кантилевера и системы обратной связи записываются в цифровом виде в двумерный массив точек, который впоследствии обрабатывается в специализированных графических редакторах. На фоне многочисленных модификаций АСМ, позволяющих измерять адгезионные [113], упругие [114], контактные электрические (кельвин-микроскопия) [115], проводящие [116], электромагнитные [117] и другие свойства поверхности выделяют основные три режима сканирования образцов: контактный, прерывистого контакта и бесконтактный (рис. 1.2.).



Рис. 1.2. Основные режимы сканирования атомно-силового микроскопа.

Метод прерывистого контакта заключается в том, что в кантилере возбуждаются колебания, в частности на его собственной частоте. После того, как кантилер начинает взаимодействовать с поверхностью, у него уменьшаться амплитуда колебаний и происходит смещение резонансной частоты. В зависимости от того, что именно выбирается в качестве полезной информации – изменение амплитуды или частоты физического сигнала возможны два режима работы микроскопа в прерывистом контакте. Описанный режим называется прерывистым контактом (*tapping mode*) и применяется при сканировании объектов с пониженной жесткостью, так как в данной моде исключен фактор адгезионных и капиллярных сил [118], приводящих к искажениям при сканировании биополимеров и бактериальных клеток.

Бесконтактный режим сканирования применяется в атомно-силовой микроскопии при исследовании электростатического или магнитного профиля поверхности [119]. В данном случае процесс сканирования состоит из следующей последовательности: кантилер в контактном режиме сканирования проходит одну строку, при этом микроскоп запоминает рельеф поверхности, затем кантилер начинает двигаться в обратном направлении, находясь на той же строке при сохранении постоянного зазора между кантилером и поверхностью. Во время обратного прохода локальные электромагнитные поля образца оказывают силовое воздействие на намагниченный кантилер [119]. Таким образом, в момент получения искомого профиля поверхности отсутствует межатомное взаимодействие зонда с образцом.

### 1.1.2. Силовая спектроскопия

Одним из приложений АСМ является метод силовой спектроскопии, который позволяет определять силы химических связей в единичных молекулах биополимеров. Основное отличие указанного метода от контактного метода состоит в том, что между иглой зонда и поверхностью образца помещается исследуемый биополимерный комплекс, связанный с поверхностью и острием кантилера через линкеры химическими связями

[120]. При относительном движении поверхности и кантилевера объект начинает деформироваться и силы деформации в каждый момент времени определяются по величине изгиба балки кантилевера (рис. 1.3.) [113].



Рис. 1.3. Схема работы АСМ в режиме силовой спектроскопии.

С помощью метода силовой спектроскопии возможно исследование энергии внутренних молекулярных или межмолекулярных связей, например, между антителом и антигеном [121], двумя белками [122] или молекулами ДНК [123].

### 1.1.3. Методы, использующие датчики на основе кантилеверов АСМ

Широким классом устройств на базе АСМ являются бесконтактные сенсоры, имеющие сходство с микро/наноэлектромеханическими системами (М/НЭМС), прототипом которых можно считать датчики поверхностного натяжения металлических пленок, впервые описанных Стони в 1909 г. [5]. МЭМС являются преобразователями вклада внешнего многофакторного воздействия в механический отклик, принципиально основанными на механическом движении и деформации стержней или мембран различной формы [6]. Благодаря уменьшению собственной массы и жесткости конструкции МЭМС обладают высокой чувствительностью. [124]. Появление атомно-силовой микроскопии существенно стимулировало развитие микромеханических датчиков и перевело проблему МЭМС в разряд более серьезных и профессиональных разработок. С опытом развития технологий МЭМС многим исследователям, работающим в области атомно-силовой микроскопии, стало интуитивно понятно, что кантилевер можно использовать не только в качестве профилометра поверхности, но и как высокочувствительный датчик для измерения различных физико-химических воздействий со стороны внешней среды.

Составными частями любого химического биохимического анализатора являются рецептор, взаимодействующий с определяемым веществом, и детектор (физический преобразователь). Протекание химической реакции с реагентом, иммобилизованным на

поверхности рецептора, сопровождается изменением его физических и физико-химических свойств (оптических, электрических, акустических свойств и др.), а также массы и выделения или поглощения теплоты и излучения. Преобразователь откликается на эти изменения и трансформирует их в величину аналитического сигнала, который может быть представлен в виде числовых данных о содержании анализируемого вещества [7]. В настоящий момент на базе кантилеверов создано множество сенсоров, имеющих в своей основе два принципа регистрации сигнала, поступающего с рецепторного слоя: первый из них сводится к измерению резонансной частоты системы, а второй – к определению ее механических деформаций (рис. 1.4).

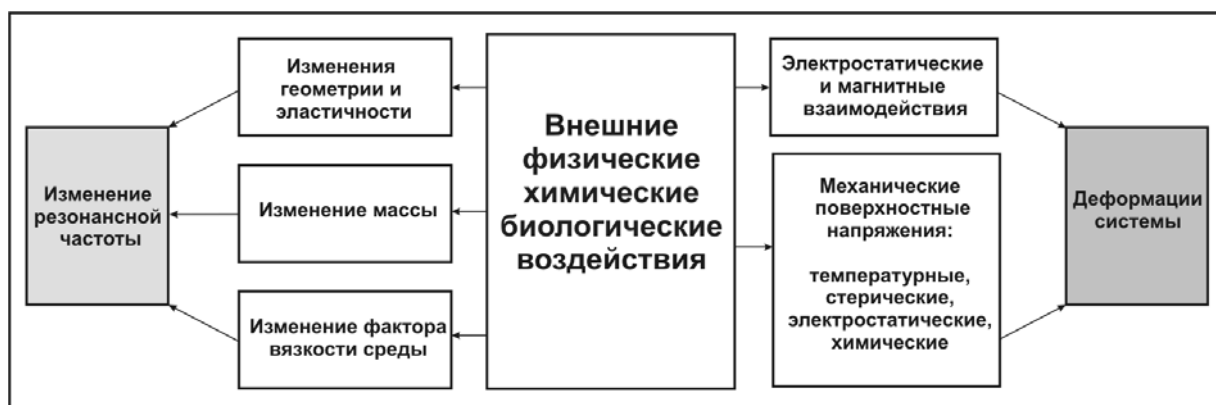


Рис. 1.4. Основные режимы функционирования микрокантилеверных сенсоров.

Смещение собственной частоты осциллирующей механической системы может произойти в результате изменения ее пространственных размеров вследствие нагрева или изменения модуля Юнга сенсорного слоя, приводящих к изменению жесткости сенсора в целом [8,18]. Прирост или уменьшение собственной массы осциллятора также приводят к смещению резонансной частоты. Данный вид резонансных кантилеверных датчиков является наиболее распространенным. Изменение массы системы может происходить за счет адгезии или химической сорбции (десорбции) исследуемого вещества на поверхность (с поверхности) сенсора [8-10,87,93,111,112]. Для измерения массы выбираются специальные кантилеверы, позволяющие получить высокочастотный отклик на внешний возбуждающий сигнал для обеспечения большей точности измерения массы. Минимальная масса  $\delta M$ , которую можно измерить с помощью кантилевера, выражается следующим образом [124]:

$$\delta M \approx \frac{1}{R} \left( \Delta f \frac{\omega_0}{Q} \right)^2 10^{-\frac{DR}{20}}, \quad (1)$$

где  $\omega_0 = \sqrt{\frac{k}{m_{эфф}}}$  – резонансная частота,  $k$  и  $m_{эфф}$  – жесткость и эффективная масса

осциллятора соответственно;  $R = \frac{\partial \omega_0}{\partial m_{эфф}} = -\frac{\omega_0}{2m_{эфф}}$  – чувствительность системы;

$DR = 10 \log\left(\frac{E_0}{k_B T}\right)$  – динамический диапазон, где  $E_0 = m_{эфф} \omega_0^2 \langle x \rangle^2$  – эффективная энергия резонатора,  $\langle x \rangle$  – среднее отклонение резонатора;  $Q$  – добротность. Из выражения (1) для предела чувствительности следует, что для уменьшения  $\delta M$  требуется увеличение динамического диапазона (минимизация внутренних шумов системы), расширение рабочей полосы частот  $\Delta f$  и увеличение чувствительности, т.е. повышение рабочей частоты резонатора и уменьшение его массы.

Если считать, что величина амплитуды колебания кантилевера много меньше его длины  $l$ , то, используя приближение гармонического осциллятора, частоту собственных колебаний стержня, соответствующую основному колебанию, можно записать в виде [45]

$$f_0 = \frac{1}{2\pi l^2} \sqrt{\frac{E}{\rho}} t, \quad (2)$$

где  $\rho$ ,  $E$  – соответственно плотность и модуль Юнга материала кантилевера,  $t$  – толщина кантилевера. Изменение массы можно представить следующим образом:

$$\Delta m = \frac{k}{2\pi} \left( \frac{1}{(f_0)^2} - \frac{1}{(f)^2} \right), \quad (3)$$

где  $f_0$  и  $f$  – частоты кантилевера до и после присоединения массы на его незакрепленном конце,  $k$  – жесткость кантилевера.

Внешние диссипационные факторы оказывают влияние на амплитудно-частотные характеристики системы [11,124]. В качестве этих факторов могут выступать влажность и вязкость среды [8,14,19], температурные дрейфы и эффекты, связанные с процессами сорбции/десорбции анализируемого вещества на поверхности сенсора. Поэтому важной задачей в разработке чувствительных масс-сенсоров является обеспечение стабильности диссипационных характеристик внешней среды и отсутствия градиентов температуры [6,124].

В микрокантилеверных системах деформации могут быть инициированы действием внешних электростатических, магнитных и гравитационных полей, оказывающих силовое воздействие на рецепторный слой сенсора. Идея создания подобных сенсоров была вызвана стремлением увеличить их чувствительность путем введения дополнительных внешних силовых источников: магнитных доменов, зарядов, массовых элементов, входящих в структуру сенсорного слоя в качестве меток [27], которые используются также и в других методах, например радио-иммуноанализа (РИА)[28] и иммуноферментного анализа (ИФА) [23]. При незначительном количестве связавшихся единиц присоединенные к ним метки усиливают, а в некоторых случаях

непосредственно генерируют сигнал связывания, увеличивая тем самым порог чувствительности метода [27].

Одним из первых сенсоров, имеющим подобие современного кантилевера, который в 1925 г. был описан Тимошенко [12], являлся биметаллический стержень, состоящий из двух скрепленных вместе металлических пластинок с разными коэффициентами теплового расширения. Впервые подобные кантилеверы были применены в 1994 г. в качестве прецизионных термометров для исследования тепловых эффектов во время каталитической реакции  $H_2$  и  $O_2$  в слое воды, образуемом на пленке Pt, напыленной на кантилевер, с точностью изменения температуры до  $10^{-5}K$  [4]. Следует отметить, что в этом случае изгиб пластины, пропорциональный тепловому выходу реакции, был вызван биморфным эффектом в скрепленных слоях Pt и Si, который в настоящее время широко применяется в методах сканирующей тепловой микроскопии для получения карты локального теплового распределения в работающих интегральных микросхемах [50] и в различных датчиках теплового излучения [51, 85].

Величина температурной деформации в биморфной системе прямоугольного кантилевера выражается в следующем виде [6]:

$$\Delta z = \frac{3l^2}{t_1 + t_2} \left[ \frac{\left(1 + \frac{t_1}{t_2}\right)^2}{3\left(1 + \frac{t_1}{t_2}\right)^2 + 3\left(1 + \frac{t_1}{t_2} \frac{E_1}{E_2}\right)\left(\frac{t_1^2}{t_2^2} + \frac{t_1}{t_2} \frac{E_2}{E_1}\right)} \right] (\alpha_1 - \alpha_2)\Delta T, \quad (4)$$

где  $\alpha_1, \alpha_2, \lambda_1, \lambda_2, E_1, E_2$  – температурные коэффициенты расширения, теплопроводности и модули Юнга материалов двухслойного сенсора соответственно,  $t_1$  и  $t_2$  – толщины сенсорных слоев,  $l$  и  $w$  – длина и ширина кантилевера соответственно,  $\Delta T$  – изменение температуры.

Значительное распространение в современных биосенсорных приложениях получили датчики, в которых в качестве материала, инициирующего напряжения в кантилевере, выступают адсорбированные низкомолекулярные вещества (рис. 1.5) [31,33,34,57-59,64,70,75-77,79,82,97,102,106], молекулярные комплексы [78-79], антитела [87-92], ферменты [83, 84], ДНК [93-100], аптамеры [105], белки [80] или набухающие полимерные пленки [6,29,30,32,66-67,82,107-110].

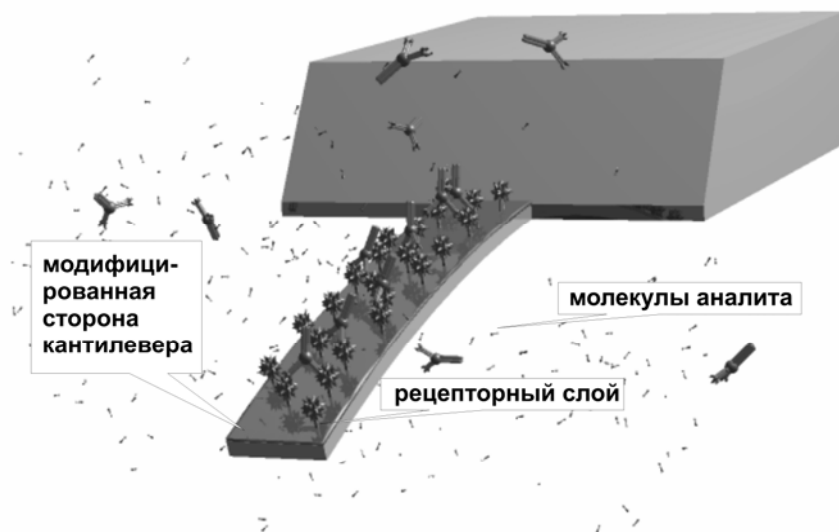


Рис. 1.5. Архитектура силового иммунохимического микрокантилеверного сенсора.

Условием для корректной работы силового микрокантилеверного датчика является специфичность одной из его поверхностей к исследуемому сорбированному веществу [6]. Такой датчик имеет одну плоскость, специфичную к сорбату, в то время как другая остается к нему инертной (Рис. 1.5). Поверхностные силы в молекулярных пленках на твердых подложках могут быть обусловлены электростатическим взаимодействием отдельных молекул [34,76-77,64] или их комплексов [78,106]. Изменение свободной энергии [34], связанное с процессом адсорбции молекул на одну из сторон кантилевера, выражается формулой Шатлворфа [6]:

$$\sigma = \gamma + \left( \frac{\partial \gamma}{\partial \varepsilon} \right), \quad (5)$$

где  $\sigma$  – поверхностное натяжение пленки,  $\gamma$  – свободная энергия поверхности,  $\partial \varepsilon$  – коэффициент изменения площади поверхности  $\partial A / A$ . Учитывая малые деформации балки по отношению к ее линейным размерам, вкладом растяжения поверхности можно пренебречь, тогда изменение свободной энергии тождественно величине поверхностного натяжения [11]. Поверхностные силы в рецепторных слоях, состоящих из низкомолекулярных соединений, могут быть обусловлены также химическими или водородными связями [55,67], ультрафиолетовым [53] и тепловым [35,52] излучениями. В случае биополимерных рецепторных слоев сложность поверхностных эффектов возрастает и требует детальных исследований [92].

Как следствие изменения в сенсорном слое поверхностной энергии  $\gamma$  в нем возникают силы избыточного давления или поверхностного натяжения. В связи с этим,

показатель направления изгиба кантилевера в микромеханических анализаторах является существенным, так как характеризует набор доминирующих факторов, отвечающих за энергетическое состояние системы в целом.

Связь поверхностного натяжения с величиной смещения конца кантилевера, имеющего форму длинной прямоугольной балки, выражается соотношением Стони [5]:

$$\Delta\sigma = \frac{Et^2}{3(1-\nu)l^2} \Delta z, \quad (6)$$

где  $\Delta\sigma$  – разница сил поверхностного натяжения между верхней плоскостью кантилевера с рецепторным покрытием и нижней без специфического покрытия,  $l$  и  $t$  – длина и толщина прямоугольного кантилевера соответственно,  $\nu$  и  $E$  – коэффициент Пуассона и модуль Юнга материала кантилевера соответственно,  $\Delta z$  – величина отклонения кантилевера. Формула (6), которая следует из элементарных соображений, позволяет получить количественную оценку величины напряжений в сенсорном слое, находящемся на поверхности кантилевера.

#### 1.1.4 Архитектура кантилеверных датчиков и системы контроля за положением кантилеверов

Важным элементом кантилеверных преобразователей, определяющим технические характеристики систем анализа, является схема измерения деформаций кантилеверов. Если отражающая поверхность кантилевера не менее чем  $1 \times 1 \text{ мкм}^2$ , то для определения степени его деформаций возможно использование распространенной оптической схемы, имеющейся в большинстве атомно-силовых микроскопов и функционально состоящей из лазера, луч которого направлен на отражающую поверхность кантилевера, и позиционного четырехсегментного фотодиода, на который попадает луч лазера, отраженный от кантилевера (рис. 1.6.).

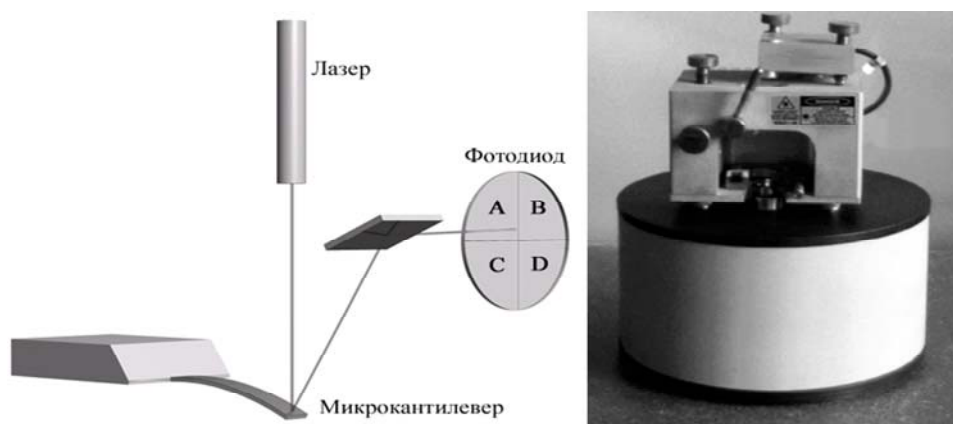


Рис. 1.6. Принципиальная схема оптической системы контроля за положением кантилевера (слева), атомно-силовой микроскоп ФемтоСкан с лазерно-оптической системой регистрации сигнала (справа) [169].



Оптическая система является достаточно простой и наиболее эффективной для большинства сенсорных устройств, так как позволяет определять смещения кантилевера величиной до  $10^{-4}$  Å [6]. Нормированный электрический сигнал смещения по вертикали отраженного лазерного луча, вырабатываемый фотодиодом, можно записать в виде

$$V_{см} = \frac{(V_A + V_B) - (V_C + V_D)}{V_A + V_B + V_C + V_D} \quad (8),$$

где  $V_A$ ,  $V_B$ ,  $V_C$  и  $V_D$  – сигналы от каждой из четырех секций фотодиода.

В общем случае у кантилевера могут быть как нормальные (вертикальные) деформации, так и торсионные, скручивающие балку относительно ее главной оси. Торсионные деформации возможны во время сканирования кантилевером поверхности образца на АСМ в режиме трения [24], в бесконтактных сенсорных системах такие деформации используются крайне редко [25, 125].

Не смотря на свою распространенность, оптический метод имеет ограничения, так как для этого метода необходима прозрачность среды и размеры кантилевера должны быть не меньше, чем длина волны лазерного источника. Кроме того, частотная полоса пропускания фотодетектора в большинстве случаев не превышает 1 МГц [6], что затрудняет его использование совместно с высокочастотными резонансными кантилеверами. При работе с такими кантилеверами применяется метод модуляции интенсивности на быстродействующем точечном фотодетекторе с использованием частичного перекрытия отраженного света непрозрачной полуплоскостью. Метод модуляции интенсивности позволяет увеличить частоту считывания до нескольких гигагерц [37].

К оптическим методам контроля положения зонда относятся интерферометрические [26,72] и дифракционные [49] методы. В дифракционной системе считывания кантилевер имеет вид сложной решетки, при деформациях которой дифракционная картина от света, проходящего через кантилевер, претерпевает изменения. Для обработки информации, поступающей одновременно с большого массива кантилеверов (рис. 1.12) удобно использовать цифровые матрицы [56], видеoinформация с которых обрабатывается программными средствами.

Более современные схемы контроля деформаций находятся внутри самих кантилеверов [38] (рис. 1.7), отдельным типом которых являются кантилеверы со встроенными слоями пьезоэлектрических элементов. Подобные датчики способны передавать информацию о степени собственной деформации в виде электрического сигнала. Пьезокантилевер представляет собой балку из нитрида кремния с нанесенным слоем ZnO [39] или пьезокерамики [40], с наружи которого напыляются электроды для

снятия разности потенциалов, возникающей при пьезоэффекте в результате деформаций кантилевера.

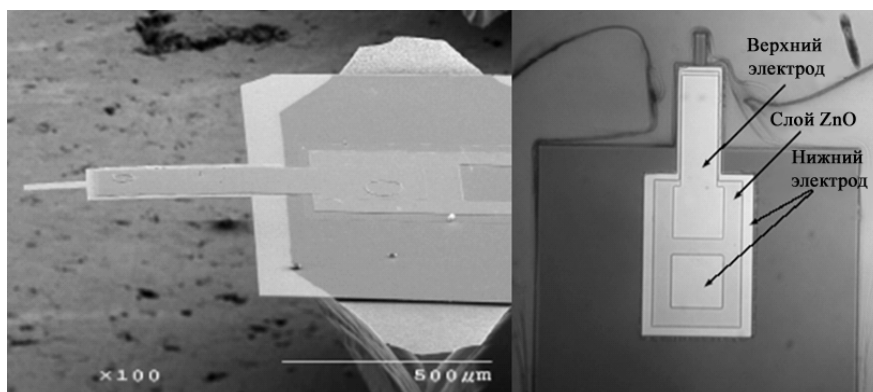


Рис. 1.7. Микрофотография пьезокантилевера [38].

Отметить, что прототипом пьезокантилевера являются кварцевые резонаторы, имеющие аналогичные пьезоэлектрические свойства, которые также применяются в атомно-силовой микроскопии [41]. Преимуществом пьезокантилеверов является компактность системы считывания и низкие тепловые потери, в результате чего такие кантилеверы используются в низкотемпературной микроскопии. К их недостаткам можно отнести вынесенные электрические контакты, не позволяющие работать в проводящих средах. Кроме того, для достижения необходимого электрического отклика, толщина пьезослоя должна, соразмерна толщине балки, что существенно сказывается на механических характеристиках кантилеверов. Для достижения необходимого электрического отклика, толщина пьезослоя должна быть соразмерна толщине балки, что существенно ухудшает механические характеристики кантилеверов и, кроме того, он должен работать в режиме больших амплитуд изгиба, что для сенсоров, основанных на статических деформациях, значительно понижает чувствительность [6].

На настоящий момент перспективными являются пьезорезистивные кантилеверы, вызванного внешними напряжениями. При изгибе такого кантилевера происходит изменение его проводимости [42]. Как правило, пьезорезистивный слой состоит из кремния, допированного ионами бора [62], который находится в определенной области балки кантилевера, чаще ближе к ее основанию.

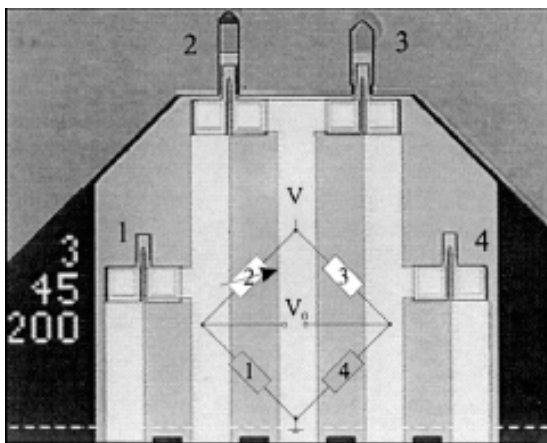


Рис. 1.8. Микрофотография пары пьезорезистивных кантилеверов 2 и 3, включенных в мост Уинстона 1, и 4 – опорные сопротивления моста [43].

Пьезорезистивный кантилевер обычно включают в мост Уинстона (рис. 1.8). Чувствительность к изгибу консоли в данной системе записывается в виде

$$\left(\frac{\Delta R}{R}\right)z^{-1} = K \frac{3\left(l - \frac{1}{2}\lambda\right)t}{2l^3}, (9)$$

где  $K$  является фактором пьезорезистивного кремниевого сопротивления ( $K = 120$ ) [43],  $l$  и  $t$  – длина и толщина кантилевера,  $\lambda$  – длина резистора.

Преимуществом пьезорезистивной системы контроля положения кантилевера является ее компактность. В последние два года в связи с разработкой пьезорезистивного кантилевера, представляющего собой одновременно нагревательный и чувствительный элемент, стал доступен метод микротермогравиметрического анализа вещества, который позволяет построить термограммы с точностью до 1нг потери массы [44]. Недостаток пьезорезистивной системы заключается в том, что сопротивление допированного слоя в значительной степени зависит от температуры. Постоянный ток, проходящий через пьезорезистивный слой, нагревает его, и при контакте с внешней средой возникает градиент температур, приводящий к дрейфам и нередко к неинтерпретируемым результатам [6].

Емкостные датчики на базе кантилевера часто используются в интегрированных чипах, произведенных по комплиментарной металло-оксидно полупроводниковой (КМОП) технологии [45,68]. Проводящий кантилевер помещается рядом с проводником так, чтобы между ними образовался микроскопический зазор. Данная система представляет собой плоский конденсатор, емкость которого зависит от малейших смещений кантилевера обратнопропорционально величине зазора (рис 1.9).

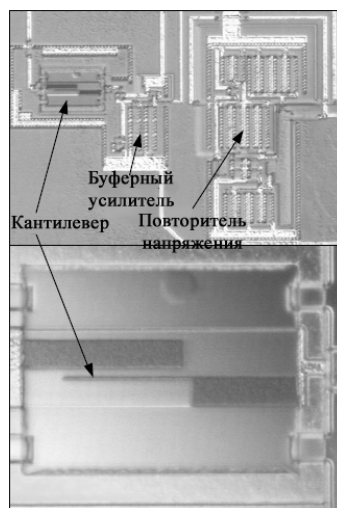


Рис. 1.9. Фотография микроемкостной системы считывания отклонений кантилевера, выполненной по технологии КМОП [45].

Емкостные системы контроля практически не налагают ограничений на величину собственной частоты кантилевера и могут работать на радиочастотах [6]. Недостатком системы является невозможность работы в проводящих средах, кроме того, малейшие изменения величины диэлектрической проницаемости среды влияют на величину считанного сигнала.

Высококчувствительным способом детектирования субнанометровых перемещений является метод электронного туннелирования (рис. 1.10). Система контроля туннельного тока по аналогии с емкостной состоит из проводника и кантилевера, только в данном случае размер зазора между ними сохраняется достаточно малым в соответствии с формулой плотности туннельного тока, справедливой для приближения плоских металлических электродов и вакуумного туннелирования<sup>46</sup>:

$$j_t = \frac{3e^2 k_0}{4\pi h s} U_t e^{-2k_0 s}, \quad (9)$$

где  $e$  – заряд электрона,  $h$  – постоянная Планка,  $s$  – расстояние зонд-образец,  $U_t$  – разность потенциалов на туннельном контакте,  $k_0$  – константа затухания волновых функций электронов в контакте,

$$k_0 = \sqrt{\frac{2m\varphi}{h^2}}, \quad (10)$$

$m$  – масса электрона,  $\varphi$  – эффективная высота потенциального барьера.

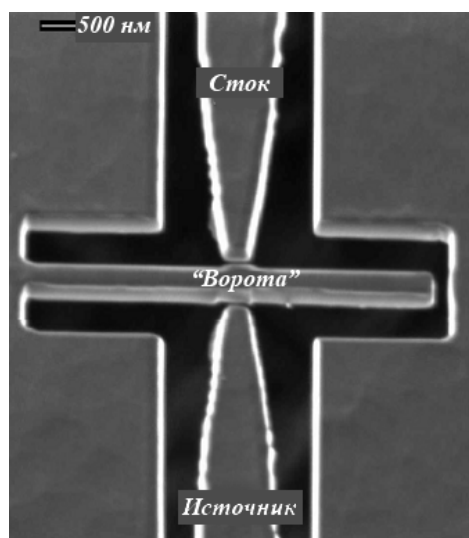


Рис. 1.10. Микрофотография кантилевера с туннельной системой контроля его отклонений [47], помещенного между двумя электродами (источником и стоком).

Так как туннельный ток экспоненциально нарастает с уменьшением зазора между кантилевером и проводником, то такая система контроля механических деформаций [48] позволяет измерять смещения кантилевера до значений  $10^{-3} \text{ \AA}$ . При деформациях кантилевера больших 1 нм туннельный эффект пропадает и система контроля перестает работать. Поэтому метод туннельного контроля имеет ограничения, общие для всех электромеханических методов, требующих протекания заряда через элемент механического преобразователя.

В системах кантилеверов, предназначенных для измерения статических деформаций помимо полезных сигналов возникают шумы и дрейфы, связанные с нестабильностью физических параметров среды, в которой находится сенсор, таких как температура, оптическая плотность, рН, гидродинамические флуктуации и др. Только в высокостабильных системах для измерений можно использовать один микромеханический датчик [55]. Для быстрого подвода вещества к поверхности сенсора кантилевер обычно помещают в микрожидкостную проточную систему, которая характеризуется значительными флуктуациями давления и температуры, интерферирующими с аналитическим сигналом и делающие его непригодным для дальнейшей интерпретации. В таких системах используют совмещенную пару консолей, находящихся рядом друг с другом [43,92]. Одна из них выступает в качестве контрольного, на котором отражаются изменения физических условий в процессе цикла измерений (рис. 1.7), а другая измеряет полезный сигнал на фоне шума [6]. Одновременно производится вычитание разности сигналов, поступающих с контрольного и сенсорного кантилеверов. Таким образом выделяется полезный сигнал.

Для расширения функциональности и производительности микрокантилеверных систем используются одномерные и двумерные массивы кантилеверов. Химические

сенсоры на основе нескольких кантилеверов обладают свойствами человеческого носа, в котором имеется несколько рецепторов. Такие кантилеверы модифицированы различными низкомолекулярными веществами или биополимерными пленками, вырабатывающими собственный отклик на изменение физико-химических свойств среды. На рисунке 1.11 представлен массив из восьми кантилеверов, изготовленных в исследовательской лаборатории IBM [63] для создания искусственного носа.

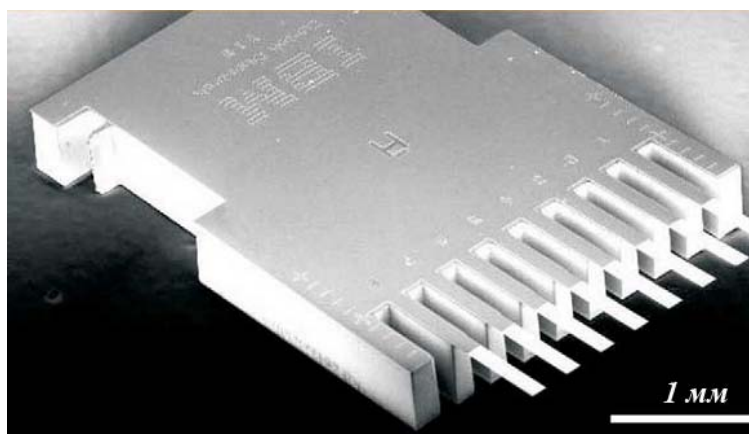


Рис. 1.11. Массив из восьми кремниевых кантилеверов, используемых для сенсорных приложений [63].

Исследования определенных реакций на поверхности кантилевера требуют воспроизводимости и статистического анализа. Проведение высокопропускных проб генного анализа, основанных на гибридизации ДНК на поверхности кантилеверов, было продемонстрировано Мин Ю и др. [56] на двумерном массиве из 500 кантилеверов (рис. 1.12).

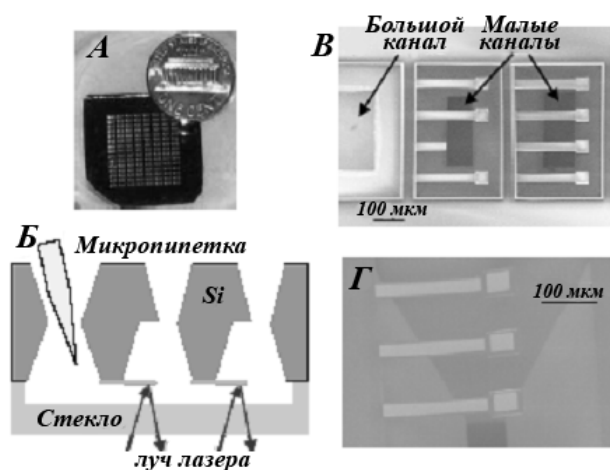


Рис. 1.12. (а) Кремниевый чип, содержащий 500 кантилеверов. (б) Схематическое изображение одного реакционного микроколдца. (в) Фотография с электронного микроскопа реакционной емкости (стрелками отмечены отверстия, большие для поступления раствора и малые для выхода воздуха). (г) Увеличенное изображение кантилеверов, покрытых золотой пленкой.

### 1.1.5. Производство и методы очистки кантилеверов

Процесс изготовления стандартного кремниевого кантилевера для атомно-силового микроскопа, как правило, состоит из четырех этапов [62,74]. Сначала берется заготовка,

имеющая слоистую структуру, – два кремниевых слоя и две разделяющие прослойки SiO<sub>2</sub> (рис. 1.13а). Затем нижняя часть заготовки протравливается до промежуточного слоя SiO<sub>2</sub>, а на верхнюю наносится маска из фоторезиста, защищающая покрытую кремниевую область от последующего травления (рис. 1.13б). Следующий шаг – это травление верхней части подложки с нанесенной маской, в процессе которого кантилевер приобретает свою форму; затем слой фоторезиста сверху и SiO<sub>2</sub> снизу убираются травлением, специфичным для данных веществ (рис. 1.13в). Заключительной стадией является напыление золотой пленки на поверхность кантилевера с определенной стороны (рис. 1.13г).

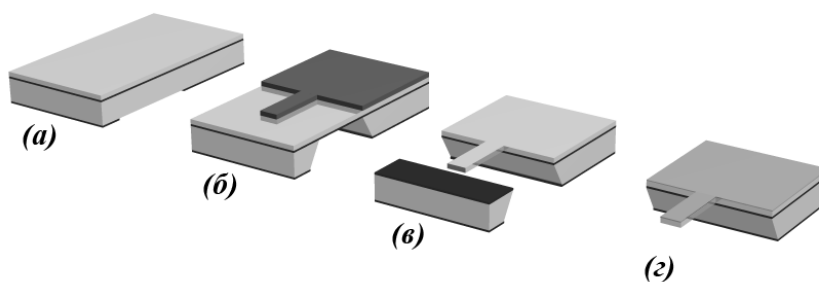


Рис. 1.13. Стадии изготовления микрокантилеверных сенсоров.

Качество самоорганизующихся монослоев, образующихся на поверхности кантилевера, сильно зависит от ее свойств, что было экспериментально подтверждено в работах[57,59], в которых также было показано, что если покрытием кантилевера является слой золота с кристаллами величиной 1 мкм, то поверхностное натяжение самоорганизующейся пленки молекул алканотиолов возрастает в несколько раз по сравнению с натяжением на поверхности поликристаллического золота с размерами гранул порядка нескольких десятков нанометров. Кроме того, в сенсорных приложениях АСМ требование предварительной отчистки кантилевера является необходимым условием для получения воспроизводимых результатов с максимальными показателями величины поверхностного натяжения исследуемых пленок.

В работе А. Галахарда и др. [58,59] рассмотрены два метода отчистки золотой поверхности кантилевера для их последующей модификации алканотиолами. Первый метод – травление золотой поверхности кантилевера в 30%-ом растворе царской водки. Было показано, что после минутного травления поверхность золота, изначально имевшая рельеф 1 нм, покрывается впадинами глубиной в 13 нм. В процессе травления поверхность становится более пористой на масштабе 3 мкм, но нанометровый рельеф сглаживается, и образование слоя алканотиолов происходит в доменах протравленных пор (рис 1.14 б).

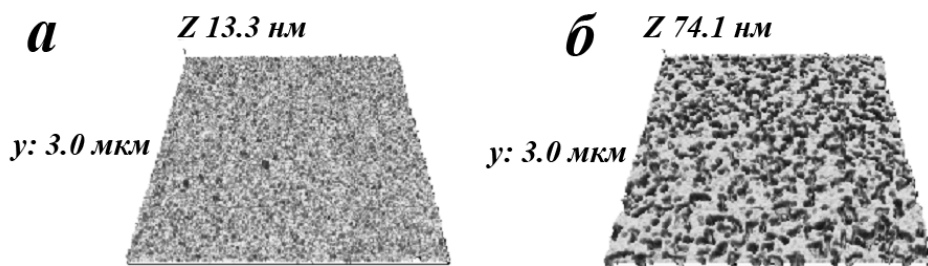


Рис. 1.14. Поверхность поликристаллического золота после напыления (а) и после ее травления в микстуре царской водки в течение 1 минуты (б).

По экспериментальным данным, полученным теми же авторами, поверхностное натяжение алканотиоловой пленки при отчистке золота водным раствором царской водки возрастает в несколько раз. Модели, подтверждающие увеличение поверхностного натяжения и кинетики за счет увеличения количества адсорбционных доменов поверхности, также были приведены другими исследователями [6,57,59]. По сравнению с другими методами отчистки поверхности золота метод травления имеет некоторое преимущество, так как снимает слой золота вместе с адсорбатами, поэтому образовавшийся новый слой является абсолютно чистым и гладким на субмикронных масштабах. Недостаток метода заключается в том, что после незначительного числа циклов отчистки золотой слой на поверхности кантилевера может полностью исчезнуть, кроме того, от цикла к циклу поверхность сильно меняет свои свойства, вследствие чего изотермы сорбции тиолов не воспроизводятся.

Другой вариант отчистки поверхности кантилевера – обработка с помощью плазмы атомарного кислорода или азота. В работе [58], кантилевер помещался в струю плазмы, где его очистка производилась благодаря процессам окисления и ионной бомбардировки адсорбатов. Существует близкий по свойствам, распространенный и доступный метод приготовления поверхности с помощью ультрафиолетового облучения, в котором происходит отчистка поверхности атомарным кислородом, интенсивно окисляющим адсорбаты. В результате процедур обработок поверхности с помощью плазмы, структура поликристаллического слоя золота сохраняется. При этом силы поверхностного натяжения монослойных пленок алканотиолов возрастают незначительно, а в изотермах сорбции пропадает индукционный пик (рис. 1.15) [34], характеризующий десорбцию примесей с поверхности, который в общем случае является артефактом. Следует отметить, что после нескольких циклов описанных процедур обработки кантилевера воспроизводимость данных сохраняется [57].

Наиболее распространенным методом приготовления поверхности кантилевера является окисление [59-61,105] посредством его помещения в водный раствор микстуры



концентрированной серной кислоты и пероксида водорода в соотношении 1:1. Данный метод также не изменяет рельефа поверхности, позволяет производить отчистку кантилевера в неограниченных количествах и является эффективным и наиболее простым в применении.

## **1.2. Преобразователи биохимических реакций в аналитический сигнал**

Возможность создания эффективных микрокантилеверных анализаторов подразумевает рассмотрение основных характеристик их конкурентных аналогов. По типу трансдьюсера различают несколько типов химических иммуносенсоров: электрохимические, оптические, гравиметрические и силовые. Электрохимические преобразователи являются наиболее перспективными по отношению к гравиметрическим и оптическим системам детекции, так как функционально не зависят от различных параметров среды, таких как оптическая плотность, прозрачность и т.д. Электрические трансдьюсеры являются принципиально простыми системами электродов и позволяют в значительной степени миниатюризировать размеры электрохимических сенсорных систем по сравнению с оптическими. Наиболее перспективны в этом отношении печатные (screen-printed) электроды, представляющие собой объединенную на единой подложке электрохимическую ячейку [132].

### **1.2.1. Амперометрический анализатор**

Амперометрический иммуносенсор (АИС) относится к типу электрохимических биосенсоров, измеряемым сигналом в которых является ток окисления или восстановления электроактивных частиц. В нем объединяются преимущества электродных процессов (высокая чувствительность, линейная зависимость сигнала от концентрации, селективность за счет работы при разных потенциалах) и высокая специфичность иммунной реакции [127]. Так как напрямую определять иммунные реакции с помощью АИС не представляется возможным вследствие того, что сами по себе компоненты иммунной реакции чаще всего являются электроинертными, в систему сенсора вводятся ферментные метки. В этом случае трансдьюсер определяет концентрацию продукта ферментативной реакции фермента при расщеплении субстрата. В качестве электроактивных веществ также используются ионы металлов и другие электроактивные соединения.

Наиболее распространенные ферментативные метки, используемые в иммуноанализе при окислении субстрата в присутствии  $H_2O_2$ , – это пероксидаза хрена [128, 130, 131] и щелочная фосфатаза [129, 133], катализирующая реакцию дефосфорилирования различных органических фосфатов, продукт которой определяется амперометрическим методом. Портативная АИС-система была разработана для определения бактерий *Escherichia coli* с использованием антител, маркированных пероксидазой хрена; чувствительность сенсора позволяла определять наличие бактерий с концентрацией 50 клеток/мл за 22 минуты [128]. Сенсор представлял собой мембрану, состоящую из проводящей сетки углеродных волокон, на которой иммобилизовались антитела, специфичные к антигену. При пропускании через иммунофильтрационную сетку бактерии связывались с модифицированными на ней антителами. Для выработки аналитического сигнала связавшиеся клетки маркировались специфичными антителами, конъюгированными с пероксидазой хрена. Данная схема реализации иммунохимического анализа называется слоистой (*sandwich-scheme*). Слоистая схема неконкурентного анализа была реализована в АИС-сенсоре на IgG кролика [129], маркирование которого производилось с помощью анти-IgG, конъюгированного с щелочной фосфатазой. Субстратом для метки являлся дигидрохинон дифосфата, который окислялся до гидрохинона с высвобождением двух электронов. Предел обнаружения сенсора составил 8нг/мл ее при времени инкубации меченого иммуноглобулина кролика порядка одного часа.

Амперометрический иммуносенсор на низкомолекулярное вещество кокаин, был представлен А. Сулейманом [130], электроактивным маркером в нем являлась пероксидаза хрена, конъюгированная с антителами на бензоилэксгонин (часть молекулы кокаина), иммобилизованная на мембране, прикрепленной к  $O_2$ -электроду. В процессе анализа гаптен с предельно низкой концентрацией  $10^{-7}$  М/л ингибировал ферментативную реакцию окисления субстрата за счет создания стерических препятствий для проникновения субстрата к активным центрам фермента.

Амперометрические иммуносенсоры (чаще всего используют сложные системы усиления сигнала, например с помощью ферментативной реакции, что требует дополнительных реагентов) не позволяют непосредственно контролировать протекание иммунологической реакции. Помимо этого амперометрические иммуносенсоры характеризуются более широким разбросом величины погрешности определения, в зависимости от используемой метки и схемы иммуноанализа. Наиболее часто погрешность определения составляет от 2 до 20%, хотя в отдельных случаях может быть и выше.

### 1.2.2. Потенциометрический анализатор

Другим классом электрохимических сенсоров являются потенциометрические сенсоры, измеряемый которыми сигнал, – это потенциал на ионноселективном электроде, изменяющийся в результате действия ионных продуктов реакции. Поверхность рабочего электрода обычно модифицируется для обеспечения селективности сенсора. Разность потенциалов между рабочим и контрольным электродом возникает в том случае, когда между ними перестают течь ионные токи. Как правило, электроды либо модифицированы образцом, либо отделены от образца мембраной и помещены в определенный электролитный раствор [134].

Электрокаталитические свойства редоксных ферментов позволяют использовать их в качестве меток в потенциометрических сенсорах. В качестве ферментного маркера реакции иммунного связывания производных симазина 6-пентилкарбоксил и 6-этилкарбоксил использовалась пероксидаза в комплексе с антигеном. [133]. Антитела электроосадились на серебряном электроде, после чего центры связывания осажденных антител насыщались мечеными молекулами симазина. После ввода анализируемых веществ происходила десорбция меченых антител, с пропорциональным уменьшением электрохимического сигнала. Полный цикл работы сенсора занимал 14 минут при пороговой чувствительности 3 нг/мл. В работе [135] описано применение потенциометрического сенсора для определения человеческого IgG с использованием асимметричной ионоселективной мембраны с иммобилизованными аденозиндезаминазой и IgG. Антитела с конъюгированной щелочной фосфотазой связывались с иммобилизованным IgG, создавая биферментный каталитический слой. В присутствии анализируемого белка конъюгат в соответствии с конкурентным принципом не связывался с мембраной, уменьшая тем самым скорость диффузии продуктов ферментативных реакций.

### 1.2.3 Емкостной иммуносенсор

Принцип функционирования емкостного датчика заключается в измерении диэлектрических свойств органического слоя, нанесенного на один из электродов конденсатора, в результате изменения его толщины и диэлектрических характеристик. В частном случае изменение диэлектрической константы является следствием поверхностной иммунохимической реакции антиген-антитело. Примером емкостного иммуносенсора является датчик для определения гиалуронан-связывающих белков

(структурный компонент внеклеточного матрикса) [136]. Структура емкостного датчика включала золотой электрод с ковалентно-привитыми к нему антителами кролика с помощью самоорганизующихся тиоловых и глутаральдегидных линкеров. Сенсор позволял селективно определять молекулы анализируемого вещества при концентрациях 10-1000 нг/мл.

#### **1.2.4. Кондуктометрические датчики**

Четвертой разновидностью электрохимических сенсоров является кондуктометрические датчики, измеряющие изменения силы тока, проходящего между двумя электродами при постоянном внешнем напряжении. В работе [137] был описан быстрый и высокочувствительный резистивный датчик на кроличий IgG, состоящий из Анти-IgG, встроенного в матрицу электрода, изготовленного из проводящего полимера поли(3,4-этилендиокситиофен). В процессе инкубации антигена с концентрацией  $10^{-10}$  г/мл при подаче постоянного напряжения 0.8 В датчик улучшал свою проводимость с выходом на плато насыщения за предельно короткое время порядка трех минут. Представляется также интересным разработанный Сансбергом и др. [138], анализатор на гербицид атразин. В качестве подложки для иммобилизации антител был выбран проводящий полимер, допированный ионами Г. Гербицид, связанный глюкозооксидазой в процессе анализа контактировал с активными центрами антител на полимерной матрице. Резистивная система считывания начинала функционировать, когда в буферный раствор вводилась глюкоза и лактопероксидаза. При окислении глюкозы вырабатывался пероксид водорода, используемый другим ферментом для изменения свойств допирующей примеси от Г к  $I_3^-$ , отвечающей за качество проводимости полимера. Пороговая чувствительность сенсора составила 25нг/л а время необходимое для анализа – 15 минут.

#### **1.2.5. Оптические иммуносенсоры**

Оптические иммуносенсоры можно разделить на три группы [139]: прямые, не использующие метки для контроля иммунореакции, и непрямые, использующие, как правило, флуоресцентные или электролюминесцентные метки. Третья группа сенсоров осуществляет контроль концентрации окрашенного продукта ферментативных реакций.

Работа хемилюминесцентные сенсоров основана на метках, генерирующих фотоны. Обычно данный вид анализатора работает по конкурентному принципу. Свет, испускаемый связавшейся меткой на границе оптоволокну, передается для усиления на фотоумножитель. Примером такого сенсора является датчик на кокаин и его метаболиты, определяемые в человеческой моче [140]. В данной работе на поверхность скошенных

торцов четырехканального оптоволокна, прививался конъюгат казеина с бензоилэкогином; образовавшийся слой заполнялся антителами мыши (CY5-Ab) с цианиновыми флуоресцентными метками. В процессе инкубации сенсора производными кокаина ингибировалась флуоресценция меченых антител. Диапазон эффективных концентраций определения бензоилэкогина варьировался от 0.75 до 50 нг/мл. Время анализа, включая время протекания процесса регенерации поверхности рецептора на оптоволокне не превосходило 4 минуты. В работе [141] также представлен конкурентный кокаиновый сенсор с иммобилизованными моноклональными антителами на кварцевом оптоволокне. В анализируемый образец добавлялся кокаин с меткой флуоресцеина, и измерялась суммарная интенсивность флуоресценции связывающихся с антителами молекул конъюгата с пороговой концентрационной чувствительностью 15нМ.

К оптическим сенсорам, не использующим метки, относятся датчики поверхностного плазмонного резонанса (*surface plasmon resonance*, SPR), функционирующие благодаря феномену вторичного возбуждения света отраженной волны свободно осциллирующими электронами (плазмонами). При определенном угле падения монохроматического поляризованного света на поверхность металлических проводников наблюдается минимум отражения, возникающего при строго определенном угле падения, названного углом резонанса. Высокочувствительный SPR-сенсор на морфин был предложен в работе [142]. Конъюгат БСА с морфином физически сорбировали на поверхность золотой тонкой пленки. Было показано что при увеличении концентрации антител в растворе, а также происходило линейное увеличение смещения резонансного угла. Добавление морфина в буфер с антителами приводило к конкуренции между связыванием на поверхности и в растворе и к уменьшению эффективной концентрации антител, которая фиксировалась по смещению угла плазмонного резонанса. Чувствительность сенсора к морфину составила порядка 0.1 нг/мл. Аналогичная схема применялась также для определения метамфетамина [143]. Иммуносенсоры на основе поверхностного плазмонного резонанса обычно характеризуются очень низким пределом обнаружения, а также наименьшей погрешностью определений (на уровне 2-8%) во всем диапазоне определяемых концентраций, но имеют более узкий интервал рабочих концентраций и требуют использования дорогостоящего, сложного в эксплуатации оборудования, поэтому они являются менее распространенными, по сравнению с экономичными и достаточно простыми в эксплуатации амперометрическими системами.

Оптические иммуносенсоры, основанные на детектировании неферментных меток являются наиболее распространенными. Как правило, маркерами служат флуоресцентные либо люминесцентные метки, обеспечивающие высокую чувствительность анализа.

Оптическое детектирование ферментных меток используется при разработке иммуносенсоров довольно редко [139]. Необходимость длительных, многостадийных операций делает применение данных иммуносенсоров менее выгодным по сравнению с применением традиционного твердофазного иммуоферментного анализа. Наиболее успешными оказались попытки создания методик определения низкомолекулярных соединений. Так, например, в ранее упомянутой работе [170] иммунный комплекс кокаина с мечеными антителами детектируют, измеряя активность фермента спектрофотометрически.

Таким образом, несмотря на ряд преимуществ оптических иммуносенсоров перед электрохимическими (например нечувствительность к электрическим помехам и большую безопасность при исследованиях *in vivo*), они остаются пока менее разработанными, чем другие виды сенсоров.

### 1.2.6. Пьезокварцевые иммуносенсоры

Первыми масс-сенсорами, превзошедшими массовый предел чувствительности 1 нг, стали кварцевые пьезорезонаторы, которые сделались общедоступными 40 лет назад и с тех пор заняли лидирующие позиции во многих областях науки и промышленности. Большинство исследователей при изучении адсорбционных свойств тонких пленок используют метод кварцевого микровзвешивания, с помощью которого определяют массу монослойной пленки молекул с точностью  $10^{-11}$  г, близкой к теоретическому пределу [144]. Кварцевое микровзвешивание (КМВ) является резонансным методом, основанном на использовании масс чувствительных пьезорезонаторов – измерительных автогенераторных устройств, задача которых состоит в преобразовании приращения присоединенной массы в приращение выходной частоты. В пьезокристалле возбуждаются продольные акустические колебания на собственной частоте  $f_p$ . На один из электродов, напыленных на резонатор, наносят изучаемый объект, после чего записывают изменение частоты, которое можно интерпретировать как изменение массы. При внесении в систему внешней массы ее частота изменяется и разность частот  $\Delta f$  до и после адсорбции служит полезным сигналом, позволяющим оценить присоединенную массу  $\Delta m$  с помощью уравнения Зауэрбрея [7]:

$$\Delta f = -\frac{2mf_p^2}{v\rho S}, \quad (11)$$

где  $M$  – масса пьезокристалла,  $v$  – скорость акустической волны в кристалле,  $m$  и  $\rho$  – масса и плотность покрытия,  $S$  – площадь поверхности резонатора.

Более современные устройства, основанные на принципе поверхностных акустических волн (*surface acoustic waves*, SAW) пьезокристалла, практически применяются в смежных областях с методом кварцевого микровзвешивания. Их отличие от сенсоров КМВ состоит в более сложной архитектуре возбуждающих электродов, позволяющих генерировать на пьезокристалле поверхностные ультравысокочастотные волны. Соответственно SAW-сенсоры обладают более высокой чувствительностью [146, 147] в сравнении с датчиками КМВ.

Описанный метод распространен благодаря надежности, разработанности и незаменимости в некоторых случаях, но имеет и недостаток, который заключается в том, что интерпретация результатов (и соответственно применение метода) возможна для структур с известным поверхностным распределением по толщине или же для пленок с постоянной толщиной, таких, как Ленгмюра-Блоджетт. Преимуществом пьезоэлектрических иммуносенсоров является возможность прямого контроля за иммунореакцией, поскольку в случае массивных антител или антигенов отпадает необходимость использования каких-либо меток или добавления дополнительных реагентов. Интересным представляется применение пьезокварцевых резонаторов для прямого определения кокаина [148], в котором конъюгат производных гаптена (кокаина) с помощью тиоловых соединений иммобилизовался на золотой поверхности электрода кварцевого резонатора. Определение производилось конкурентным методом с использованием поликлональных антител овцы. Пороговая чувствительность составила 34 нг/л (100 пМ/л), а время анализа – 15 мин.

Пьезоэлектрические иммуносенсоры вследствие прямого контроля взаимодействия антигенов с антителами предъявляют особенно строгие требования к специфичности антител, поскольку перекрестные реакции приводят к значительным искажениям результатов. Однако при учете неспецифического связывания погрешность определений с помощью пьезоэлектрических иммуносенсоров остается относительно малой – от 3-5 до 10-15%.

Существующие ограничения не снижают интереса к разработке иммуносенсорных устройств и являются скорее стимулами для более интенсивной работы в этой области. Можно отметить, выбор того или иного вида иммуносенсоров практически полностью зависит от конкретной аналитической задачи.

### **1.2.7 Сравнительный анализ аналитических возможностей различных типов иммуносенсоров**

Анализ литературных данных показывает, что в связи с важностью контроля некоторых соединений (лекарственных препаратов, гормонов, наркотических препаратов) для их определения на сегодняшний день предложено несколько иммуносенсоров, отличающихся по принципу детектирования, используемой метке, аналитическим возможностям. Каждый иммуносенсор создается для работы в определенных условиях, наиболее подходящих для решения поставленной проблемы. При этом на первый план выдвигаются различные требования к чувствительности, экспрессности, экономичности и простоте выполнения анализа. Одним из ключевых вопросов при использовании иммуносенсоров является воспроизводимость результатов определения. В зависимости от метода детектирования, области рабочих концентраций погрешность определений может колебаться в широких пределах.

В частности, оптические иммуносенсоры, например на основе поверхностного плазменного резонанса, обычно характеризуются очень низким пределом обнаружения, а также наименьшей погрешностью определений (на уровне 2-8%) во всем диапазоне определяемых концентраций. Однако такие иммуносенсоры имеют более узкий интервал рабочих концентраций и требуют использования дорогостоящего, весьма сложного в эксплуатации оборудования и поэтому менее распространены, по сравнению с экономичными и достаточно простыми в эксплуатации амперометрическими иммуносенсорами. В то же время амперометрические иммуносенсоры, чаще всего, используют сложные системы усиления сигнала, например, с помощью ферментативной реакции, что требует дополнительных реагентов и не позволяет непосредственно контролировать протекание иммунологической реакции. Помимо этого амперометрические иммуносенсоры характеризуются более широким разбросом величины погрешности определения, в зависимости от используемой метки и схемы иммуноанализа. Наиболее часто погрешность определения составляет от 2 до 20%, хотя в отдельных случаях может быть и выше. Пьезоэлектрические иммуносенсоры вследствие прямого контроля взаимодействия антигенов с антителами предъявляют особенно строгие требования к специфичности антител, поскольку любые перекрестные реакции приводят к значительным искажениям результатов. Однако при учете неспецифического связывания погрешность определений с помощью пьезоэлектрических иммуносенсоров относительно невелика и колеблется от 3-5 до 10-15%.

Существующие ограничения не снижают интереса к разработке иммуносенсорных устройств и являются скорее стимулами для более интенсивной работы в этой области. Можно отметить, что на сегодняшний день выбор того или иного вида иммуносенсоров практически полностью зависит от конкретной аналитической задачи, стоящей перед



исследователем. Аналитические возможности различных видов иммуносенсоров и других методов анализа можно сравнить на примере определения наркотических препаратов: морфина и кокаина (табл. 1.1).

Табл. 1.1 Сравнение количественных методов определения кокаина.

Метод	Чувствительность метода, нМ
Масс-спектрометрия вторичных ионов [170, 172]	750
Амперометрический пероксидазный сенсор [171]	100
Твердофазный иммуноферментный анализ [170, 172]	15-30
Оптоволоконный флуоресцентный сенсор [172]	15
Флуоресцентный анализ [172]	3
Высокоэффективная жидкостная хроматография [170, 172]	1,5-5
Амперометрический фосфатазный сенсор [170]	0,5
Капиллярный электрофорез [172]	0,24
Пьезокварцевый сенсор [172]	0,1

Как видно из табл. 1.1 среди сенсорных систем наибольшей чувствительностью обладают пьезокварцевый и амперометрический сенсоры с помощью которых можно определять кокаин в концентрациях, не превышающих 1 нМ. Действительно, прямые методы анализа (например, иммунохимический), основанные на поверхностном плазмонном резонансе или кварцевом микровзвешивании (и подобных приборах) для высокомолекулярных антигенов: белков или полисахаридов, работающие без меток, являются более удобными и экспрессными, так как априори предполагают, что получаемый в результате образования иммунного комплекса аналитический сигнал вырабатывается благодаря приросту массы связавшегося антигена. Однако, при этом изменение массы и плотности рецепторного слоя может происходить за счет

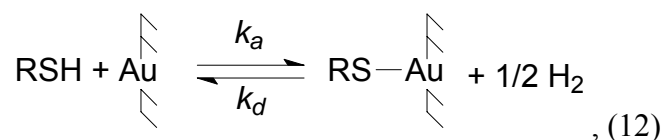
неспецифического связывания посторонних биополимерных объектов, содержащихся в анализируемом растворе. Данные трансдюссеры биосенсоров не могут нивелировать в аналитическом отклике составляющие неспецифического связывания, так как они характеризуют, как правило, прирост массы или плотности слоя. В случае определения фактов связывания анализируемого вещества с помощью измерения латеральных сил, возникающих в белковом слое, степень влияния неспецифического связывания на аналитический сигнал заметно уменьшается благодаря низким энергиям неспецифических связей (относительно специфических) и, следовательно, их незначительному вкладу в поверхностное натяжение рецепторной пленки. В этом плане более перспективными системами могут быть те, которые способны непосредственным образом контролировать изменение свободной энергии в рецепторной пленке. Прототипами таких систем могут быть современные микромеханические датчики, анализ которых представлен ниже.

### 1.3. Исследования химических и биологических процессов на поверхности кантилевера

#### 1.3.1. Хемосорбция низкомолекулярных веществ и поверхностные химические реакции

В сенсорных методах АСМ используются два класса низкомолекулярных модификаторов поверхности: силаны, связывающиеся с кремниевой поверхностью кантилевера, и тиолы – вещества, образующие ковалентную связь собственного атома серы с золотом, которое, как правило, является отражающей поверхностью для большинства кантилеверов.

В случае тиолов – химических соединений, имеющих структуру SH-R, где R – углеводородный радикал хемосорбция описывается реакцией [65]:



где  $k_a$  и  $k_d$  – константы сорбции и десорбции. Результатом реакции является образование монослоя. При нормальных условиях на воздухе и в растворе молекулярная пленка алканотиолов обладает поверхностным натяжением, зависящим от свойств молекул, которое имеет электростатическую, стерическую или иной природу.

История кантилеверных сенсоров, содержащих рецепторные слои, состоящие из монослойных пленок низкомолекулярных веществ, начинается с 1997 г., когда

исследователями IBM впервые были получены кривые изотермической сорбции алканотиолов с  $n = 4, 8, 12$  на поверхности кантилевера, покрытого золотой пленкой (рис. 1.15) [34].

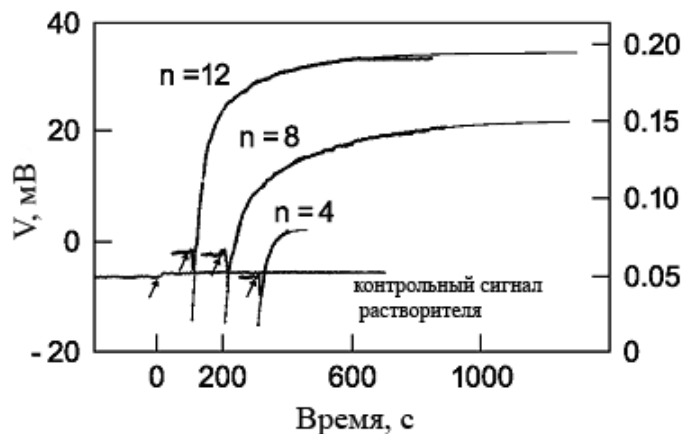


Рис. 1.15. Изотермы сорбции алканотиолов [34] с  $n = 4, 8, 12$  (первый порядок экспоненциальной аппроксимации).

Из рис. 1.15 видно, что данные удовлетворяют уравнению Ленгмюра, которое часто используется для описания кинетики процесса изотермической монослойной хемосорбции тиолов [34,65,71]:

$$\frac{d\theta}{dt} = k_a(1 - \theta)C - k_d\theta, \quad (13)$$

где  $\theta$  – относительное число вакантных позиций для адсорбирующегося вещества,  $k_a$  и  $k_d$  – константы скорости процессов адсорбции и десорбции,  $C$  – концентрация адсорбата в растворе. Решение этого уравнения записывается в виде

$$\theta(t - t_0) = k' [1 - \exp(-k_{\text{сорб}}(t - t_0))], \quad (14)$$

где  $k' = C/(C + [k_d/k_a])$  и общая скорость процесса сорбции  $k_{\text{сорб}} = k_a C + k_d$ .

Различие изотерм (рис. 1.15) проявляется в различных значениях силы поверхностного натяжения при хемосорбции молекул алканотиолов разной длины. Изменение величины поверхностного натяжения, пропорционального длине углеводородных частей молекул, связывается авторами [34] с величиной наведенного дипольного момента молекулы, который зависит от ее длины. Мишель Годен с коллегами [57] использовал молекулы додеканотиола как калибровочный инициатор поверхностного натяжения для проверки качества образовавшегося монослоя на золотых поверхностях, имеющих различный нанорельеф.

В работе [35] было представлено совмещение двух методов исследования монослоев, сводящихся к параллельному измерению толщины образующейся пленки и механических напряжений в ней. Было наглядно показано, что в процессе формирования

монослоя додеканотиолов на поверхности золота пленка имеет несколько стадий самоорганизации. В целом выделяют три фазы образования самоорганизующегося монослоя, которые характеризуются следующим образом [57,69]: лежащая фаза (*striped phase*) (Рис. 1.16 а), фаза начала перекрывания (*intermediate phase*) (Рис. 1.16 б) и фаза полной организации (*standing-up phase*) (рис. 1.16 в).

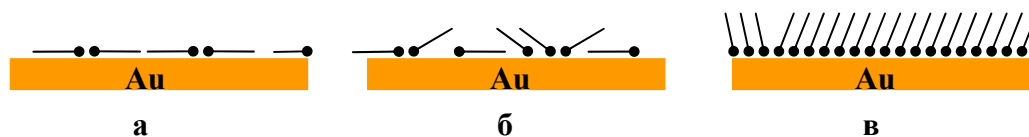


Рис. 1.16 Стадии образования самоорганизующихся монослоев тиоловых молекул на поверхности монокристаллического золота.

В частном случае алканотиолов  $\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_{n-1}-\text{SH}$  угол наклона молекул в заключительной стадии образования монослоя на атомарно гладкой подложке составляет  $30^\circ$  [73]. В общем случае структура пленки является предметом многочисленных исследований. Структуры и свойства пленок обусловлены конкуренцией различных видов сил ван-дер-ваальсового взаимодействия, химических, стерических и электростатических факторов, которые организуют пленку в двумерный кристалл.

Информация, получаемая с микрокантилевой системы о кинетике формирования самоорганизующихся пленок, является в некотором смысле более содержательной, чем получаемая с использованием методов поверхностного плазмонного резонанса [5], кварцевого микровзвешивания [65], эллипсометрии [35] и измерения краевого угла смачивания [6]. Изгиб микрокантилевера несет информацию о развитии латеральных напряжений в пленке на его поверхности, которые могут продолжаться тогда, когда масса и толщина монослоя практически не меняются, например, в случае фазовых переходов, сопровождающихся перестроениями внутри пленки тиолов [35] или белков [80].

В работах [33,76,77] были продемонстрированы принципы функционирования рН-сенсоров на основе микрокантилевых датчиков. Основной причиной, создающей поверхностные силы в монослое, являлось электростатическое отталкивание функциональных групп (аминной или карбоксильной), содержащихся в тиоловых молекулах. При изменении рН среды функциональные группы заряжались или разряжались, изменяя, тем самым, величину поверхностного давления, являющегося причиной изгиба кантилевера. В работе [33] кантилевер, модифицированный  $\omega$ -меркаптогексадекановой кислотой, применялся также в качестве измерителя рН и иономера.

С использованием самоорганизующегося монослоя, состоящего из мономеров алканотиола с ферроценовыми группами (12-ферроценил-1-додекантиол), был произведен контроль окислительно-восстановительной реакции на поверхности кантилевера [64]. При помещении кантилевера в водный раствор перхлорной кислоты ферроценовые группы, находящиеся на поверхности монослоя, начинали окисляться и электростатически отталкиваться друг от друга, генерируя поверхностное давление в пленке, что ведет к изгибу кантилевера в направлении его немодифицированной поверхности (рис. 1.17)

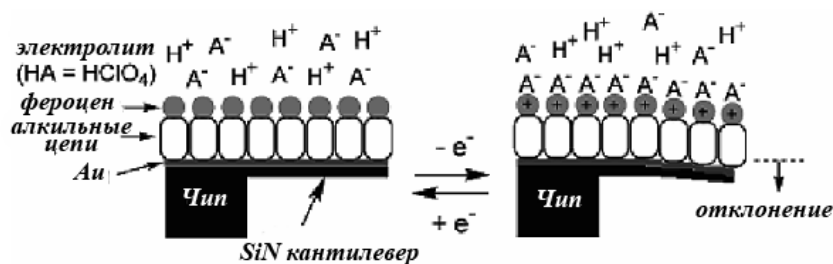


Рис. 1.17. Датчик, производящий контроль окислительно-восстановительной реакции на поверхности кантилевера [64].

Модификация поверхности кантилевера низкомолекулярными соединениями используется в качестве основы для высокочувствительных датчиков на тяжелые металлы. Несколько лет назад был предложен способ функционализации поверхности с использованием молекул краун-эфира, иммобилизованных на монослой декантиолов (рис. 1.18), способных селективно связывать ионы щелочных металлов [78]. При погружении датчика в анализируемый раствор наблюдался изгиб кантилевера, вызванный изменением конформации краун-эфира и зарядовой плотности в рецепторном слое. Пороговая чувствительность данного кантилеверного сенсора к ионам  $\text{Cs}^+$  оказалась равной  $10^{-10}$  М, а к ионам  $\text{K}^+$  и  $\text{Na}^+$  не превосходила  $10^{-7}$  М.

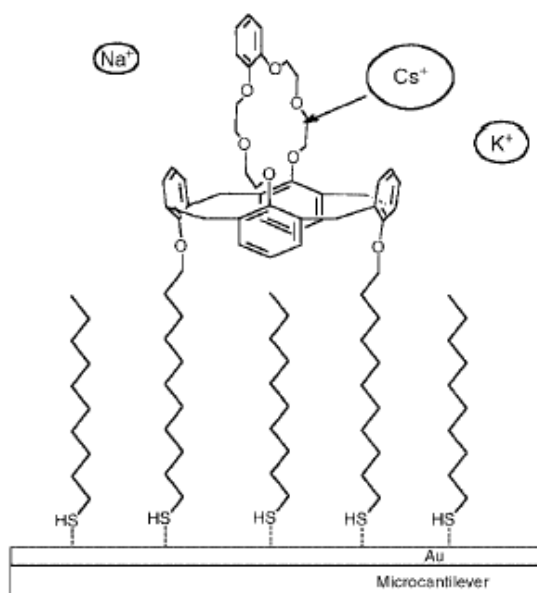


Рис. 1.18. Устройство рецепторного слоя сенсора для определения цезия на основе химически модифицированного кантилевера [78].

Теми же авторами был разработан сенсор на высокотоксичные ионы  $\text{CrO}_4^{2-}$  наномолярной концентрации в водном растворе [79]. Золотая поверхность кантилевера модифицировалась триэтил-12-меркаптододециламоний-бромидом. Ионы оксида хрома сорбировались в областях дислокации отдельно заряженных анионов и связывали две молекулы аммония для восстановления электростатического равновесия. В результате уменьшения поверхностного заряда кантилевер, будучи первоначально изогнутым в направлении кремниевой поверхности, релаксировал в состояние с наименьшей энергией изгиба.

Для создания химических сенсоров успешно используют полимерные пленки [66]. При модификации массива из восьми кантилеверов восьмью типами полимеров, имеющих различные степени растворимости, был реализован химический анализатор широкого спектра.

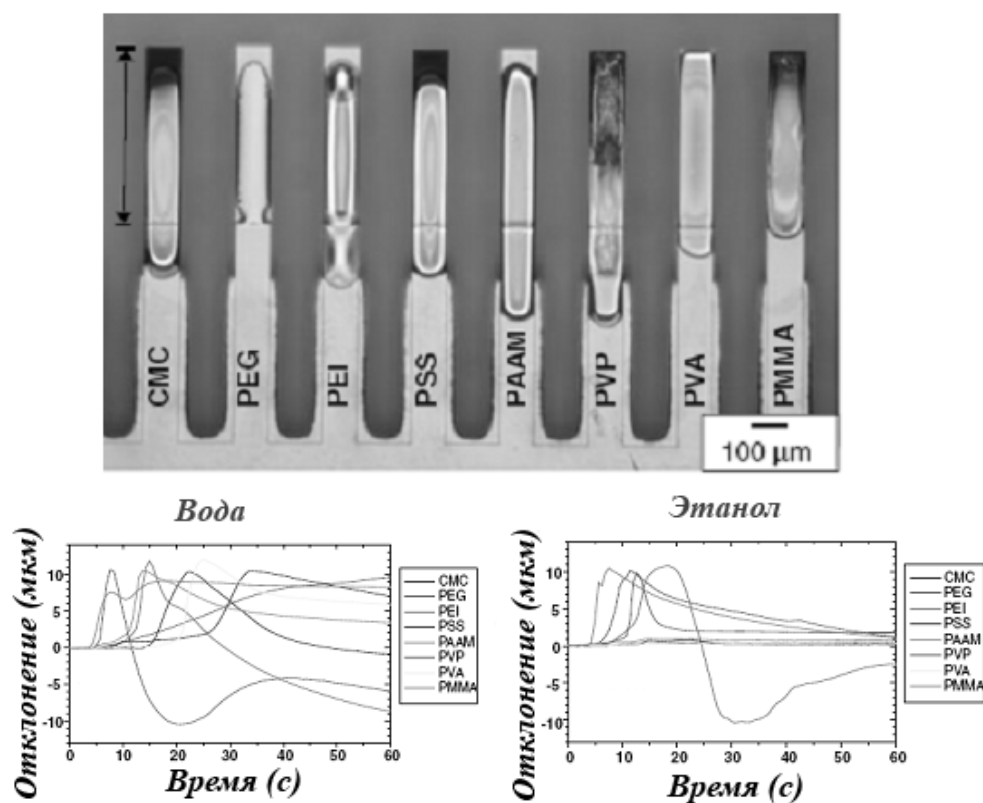


Рис. 1.19. Система кантилеверов, модифицированных пленками различных видов полимеров [66]. Внизу - отклик системы кантилеверов на пары воды и этанола.

На рисунке 1.19 (в нижней части) показана работа сенсора с полимерными рецепторными слоями, в котором основной механизм изгиба кантилеверов был обусловлен набуханием полимерных пленок в различных средах.

При модификации кантилевера гидрогелем, содержащим молекулы краун-эфира, удалось создать сенсор на ионы  $Pb^{2+}$  с чувствительностью  $10^{-6}M$  [109]. Заряженный комплекс краун-эфира, содержащий ионы свинца, приводил к изгибу балки из-за набухания полимерной матрицы. Гидрогели, содержащие соли тетраалкиламмония, также использовались для модификации поверхности кантилеверного сенсора на ионы  $CrO_4^{2-}$ , обладавшего чувствительностью  $10^{-11} M$  к данному веществу в водных растворах [110]. Сопоставляя результаты приведенных работ [79,110], можно говорить о том, что модификация кантилевера набухающими полимерными пленками в некоторых случаях является более перспективной, чем низкомолекулярная прививка рецептора.

В работе [106] был продемонстрирован высокочувствительный сенсор на ионы  $Ca^{2+}$ . Поверхность кантилевера функционализировалась монослоем бис(11-меркаптоундецил) фосфатных молекул, которые при взаимодействии с ионами  $Ca^{2+}$  (с концентрацией в растворе до  $10^{-7}M$ ) образовывали стабильную фосфатную ионную пару. В результате плотность заряда в пленке молекул уменьшалась и кантилевер изгибался в сторону монослоя из-за уменьшения межмолекулярного электростатического

отталкивания. Чувствительность сенсора с данной архитектурой рецептора оказалась равной  $10^{-9}$  М концентрации ионов кальция. В этой же работе рассматривался способ определения ионов  $\text{Ca}^{2+}$  с рецептором, состоящим из молекул 2-(4-меркаптофенокси)-N,N-диэтил-ацетамида. Так же, как и в предыдущем случае, сенсор не показал положительного отклика на другие типы ионов: ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ) при физиологических концентрациях, но чувствительность кантилевера по отношению к ионам  $\text{Ca}^{2+}$  оказалась выше на три порядка. Механизм изгиба кантилевера по мнению авторов [106] имел также электростатическую природу благодаря способности ионов  $\text{Ca}^{2+}$  образовывать комплекс с двумя аминными группами молекул монослоя, при этом ионы других металлов такого комплекса не образовывали.

Сенсор с чувствительностью  $10^{-11}$  М к ионам  $\text{Hg}^{2+}$  был разработан сотрудниками Луизианского технического университета [107]. Селективность анализатора ионов ртути обеспечивалась модификацией золотой поверхности кантилевера с использованием молекул алканотиолов. К ионам других металлов ( $\text{K}^+$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Pb}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ) сенсор оказался практически нечувствительным.

Метилртуть является одной из самых токсичных производных ртути, для обнаружения которой был разработан сенсор на основе пленки, состоящей из молекул 1,6-гександитиола [108]. Взаимодействие ионов  $\text{CH}_3\text{Hg}^+$  с серными группами верхней части монослоя рецептора с образованием ковалентных S–Hg-связей приводило к иммобилизации отталкивающихся групп  $\text{CH}_3\text{Hg}^+$  на поверхности кантилевера и к увеличению поверхностного давления в слое. Сенсор показал чрезвычайно высокую чувствительность на метилртуть, находящуюся в водном растворе при объемной концентрации вплоть до значений  $10^{-16}$  -  $10^{-15}$  М, и при этом практически полную инертность к ионам других тяжелых металлов: ( $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ).

В более прикладных исследованиях кантилеверные системы используются для определения предельно малых концентраций паров взрывчатых веществ [67,70]. Способность определения следов взрывчатки тринитротолуола (тротил) продемонстрировали сенсоры, разработанные П. Датскосом, и др. [67]. Структура рецепторного слоя кантилевера представляла собой тонкие полимерные пленки *трет*-бутилкаликс[6]арена, набухающие при проникновении в них молекул тротила. Скорость отклика полимерного сенсора составила 10 минут, а предел чувствительности при отношении сигнал/шум 3/1 оказался равным  $520 \cdot 10^{-9}$  М. Покрытия кантилевера, состоящие из самоорганизующихся слоев 4-меркаптобензойной кислоты, применялись для разработки сенсора на пластиковую взрывчатку (пентаэритритол тетранитрат, пентрит и гексагидро-1,3,5-триазин, гексоген) [70]. Время полного отклика датчика на



концентрации гексогена  $10\text{-}30 \cdot 10^{-9}$  М составило 25 с. Способность рецепторного слоя связывать молекулы взрывчатки была обусловлена, по мнению авторов работы [70], образующимися водородными связями между нитридными группами молекул взрывчатки и карбоксильными группами молекул 4-меркаптобензойной кислоты.

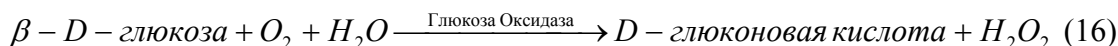
### 1.3.2. Кантилеверные сенсоры на основе высокомолекулярных и биополимерных систем

Сенсорные устройства, в которых рецепторным слоем являются биологические природные соединения, называются биосенсорами. Как правило, в подобных системах используются механизмы молекулярного распознавания «ключ–замок», обеспечивающие естественную селективность к определенным типам веществ. По типу распознавания веществ биологические сенсоры можно разделить на три группы [81]: биокаталитические, аффинные и датчики на основе надмолекулярных структур.

К биокаталитическим сенсорам относятся системы, имеющие схему связывания типа



где  $B$  – биомолекула сенсорного слоя,  $A$  – молекула анализируемого вещества,  $P$  – продукт реакции. При биокаталитическом типе распознавания молекулы рецепторного слоя взаимодействуют с распознаваемым веществом, при этом в результате данной реакции возникает новый продукт, использующийся как часть механизма преобразования биологической реакции в контролируемый отклик. Примером биосенсоров являются датчики на глюкозу, реализованные на базе микромеханических систем [82-85]: на поверхность кантилевера наносится глюкозооксидаза, которая при взаимодействии с глюкозой ее окисляет и образует глюконовую кислоту:



В зависимости от морфологии рецепторного слоя кантилевера результат данной реакции может генерировать аналитический сигнал датчика несколькими способами. Первый способ заключался в создании рецепторного слоя, состоящего из матрицы полиакрилового гидрогеля, в которую были включены молекулы глюкозооксидазы [82]. При взаимодействии фермента с глюкозой происходит образование ионных продуктов (глюконов и протонов) внутри полимерного геля, которые приводят к его набуханию, вызывающему изгиб балки. Во втором случае глюкозооксидаза наносилась на поверхность кантилевера посредством многоуровневой пришивки [83,84]. Во время протекания ферментативной реакции на поверхности кантилевера фермент изменил

конформацию, что привело к изгибу балки. Третий способ контроля ферментативной реакции заключался в измерении ее теплового выхода с помощью биметаллического кантилевера [85], однако чувствительность такой системы оказалась достаточно низкой. Следует отметить, что во всех случаях в рецепторном слое датчика не наблюдалось необратимых изменений, при которых молекулы анализируемого вещества переставали бы реагировать с молекулами биосенсора. После уменьшения концентрации анализируемого вещества кантилевер релаксировал в исходное состояние без дополнительных процедур регенерации. Наиболее чувствительным датчиком определения глюкозы оказался кантилевер с полимерным покрытием [82], позволявший определять глюкозу в 2 мМ растворе объемной концентрации. Описанные анализаторы имели высокую степень селективности к мономерам глюкозы в противоположность к другим сахарам: маннозе, галактозе и фруктозе.

Более распространенным классом биосенсоров с механическими трансдюсерами являются датчики с афинным типом связывания, в которых реакция, происходящая внутри рецепторного слоя, не приводит к появлению новых продуктов, а образует устойчивый комплекс молекул рецептора с молекулами анализируемого вещества, процесс образования которого описывается реакцией:



$B$  – биомолекула сенсорного слоя,  $A$  – молекула анализируемого вещества. Механизм отклика рецепторного слоя напрямую зависит от свойств конечного продукта  $BA$ . К сенсорам с биоафинным типом связывания можно отнести иммунохимические датчики, основанные на взаимодействии антитела с антигеном.

Антиген-антитело-сенсоры на основе микромеханических систем относятся к гетерогенным (твердофазным) методам иммуноанализа [23], которые можно разделить на два класса. Первый класс относится к системам, использующим дополнительные метки, благодаря которым вырабатывается аналитический сигнал связывания, а системы второго класса (*label-free*) способны вырабатывать аналитический сигнал непосредственно при образовании иммунного комплекса. В резонансных микромеханических системах для выработки большего аналитического сигнала обычно используют высокомолекулярные массивные антигены, резко увеличивающие массу рецепторного слоя [87], а в некоторых системах для усиления применяют специальные магнитные метки [27]. Преимущества кантилеверных иммунохимических сенсоров, вырабатывающих отклик непосредственно на процесс связывания очевидны, так как количество стадий анализа сокращается на одну, и появление сигнала происходит напрямую. В работе [88] был предложен способ прямого анализа простатоспецифического антигена с помощью микрокантилеевров.

Чувствительность, достигнутая данной системой, составила 0.2 нг/мл, при скорости анализа около часа. В работе [89] был описан иммунохимический датчик на молекулы 2,4-2,4-дихлорфеноксисукусной кислоты (дефолианта), иммобилизованные на поверхности кантилевера как конъюгат с бычьим сывороточным альбумином. После добавления в систему 5 мг/мл моноклональных антител к данному гербициду кантилевер в течение 3 минут изгибался в сторону рецепторного слоя с силой 24 мН/м, свидетельствуя о том, что антитела инициируют стягивание между молекулами конъюгата. Позднее была опубликована статья [90], в которой описывалось взаимодействие миоглобина, биологического маркера инфаркта миокарда, с антителами к нему, привитыми золотой поверхности кантилевера. Было показано, что при инкубации в растворе гормона происходит изгиб балки, который связывается с сорбцией миоглобина на поверхности и образованием иммунных комплексов. Чувствительность представленного иммуносенсора составила порядка 85нг/мл (физиологическая концентрация), а время отклика – 0,5 ч, т.е. данный анализатор подтвердил клиническую применимость. Другая группа [91], проводя смежные разработки высокочувствительных методов определения биологических маркеров инфаркта миокарда – миоглобина и кератиненазы – в крови человека, установила, что во избежание неспецифического связывания кремневую поверхность кантилевера, свободную от антител, необходимо блокировать молекулами белка, например БСА. Позднее была продемонстрирована селективность моноклональных антител D- и L- $\alpha$ -аминокислот к энантиомерам  $\alpha$ -аминокислот [92]. Исследователями также было показано, что датчик на основе двух кантилеверов, модифицированных антителами к D- и L- изомерам аминокислот, может служить как дискриминатор аминокислотных оптических изомеров и как детектор энантиомерных примесей.

Гибридизация комплиментарных пар олигонуклеотидов является также афинным взаимодействием, которое активно используется в сенсорных биомедицинских технологиях для диагностики наследственных заболеваний, опасных заражений организма, а также для контроля качества продуктов питания, произведенных с помощью технологии генной инженерии [81]. Процессы гибридизации комплиментарных пар ДНК-олигомеров недавно стали исследоваться с применением микромеханических систем [93-100]. Так же, как и в методе иммунного анализа, для анализа ДНК с помощью резонансных кантилеверов используют массовые метки большой массы – золотые наночастицы [93]. В работе [93] для обнаружения олигомера ДНК определенной последовательности комплиментарный ему олигонуклеотид разделяли на две части. Затем одну часть иммобилизовали на золотую поверхность кантилевера, а другую на золотые наночастицы, находящиеся в растворе в виде коллоидной взвеси. После гибридизации

комплементарных нуклеотидов искомой ДНК с нуклеотидами, закрепленными на кантилере, к негибризованному участку искомой молекулы аналогичным способом присоединялся олигонуклеотид с массовой меткой. Датчик оказался восприимчивым к значениям концентрациям в растворе искомой ДНК 0.05 нМ со временем реакции порядка нескольких минут. Более широкое распространение получили силовые кантилеверные сенсоры, фиксирующие изменения сил в рецепторном слое в результате гибридизации ДНК на поверхности сенсора [94]. Одной из первых работ по этой теме явилась статья [34], в которой описывались эксперименты по гибридизации олигомеров ДНК имеющих, 12 пар оснований, и сообщалось, что они создают давление в слое порядка 5 мН/м - на два порядка меньше по отношению к давлению, возникающему в результате хемисорбции низкомолекулярных тиолов на поверхность золота. В работе Марии Рудольф [95] для исследования изотерм сорбции SH модифицированных 25-мерных олигонуклеотидов на золотой поверхности применялся пьезорезистивный кантилевер. Было показано, что монослой ДНК-олигомеров создает поверхностное давление, вызванное межмолекулярными силами отталкивания. Рассчитанное изменение свободной энергии поверхности, связанное с образованием монослоя, составило  $-32.4$  кДж/М, что соответствовало более ранним независимым данным для сорбции нуклеотидов двойной спирали ДНК на поверхность, показавшим изменение свободной энергии равное  $-34.6$  кДж/М [96]. Подробный анализ причин отклонения кантилевера в процессах иммобилизации и гибридизации нуклеотидов ДНК проводился исследователями Калифорнийского университета [97], которыми было экспериментально доказано, что в процессе гибридизации цепей ДНК, привитых на поверхность, с пробными цепями из раствора присутствуют два конкурирующих эффекта. С одной стороны, при гибридизации ДНК и переходе ее в спиралевидную форму сегмент Куна молекулы возрастает от 0.75 нм (два нуклеотида) до 50-80 нм [97], т.е. происходит резкое уменьшение конфигурационной энтропии, в результате которого силы отталкивания между молекулами уменьшаются. С другой стороны, при образовании двойной спирали ДНК из-за увеличения числа фосфатных групп  $PO_4^{3-}$  повышается ее отрицательный заряд, вызывающий силы отталкивания. Доминирование энтропийного или электростатического фактора определялось длиной олигомеров, их плотностью прививки к поверхности на стадии иммобилизации, а также ионной силой раствора, т. е. степенью дебаевской экранировки молекул в процессе гибридизации. Интересно, что авторы распространяют свою гипотезу и на другие типы межмолекулярных взаимодействий, протекающих на поверхности: ДНК-РНК, ДНК-белок, лиганд-белок, в том числе антиген-антитело.

Распространенным типом афинных взаимодействий являются взаимодействия по типу лиганд–рецептор [49,89,97,102,105]. В работе [97] описывается эксперимент взаимодействия биотина, иммобилизованного на поверхности кантилевера с нейтравидином, находящимся в растворе. Экспериментально показано, что взаимодействие биотина с нейтравидином вызывает повышение давления в поверхностном слое рецептора. На основании результатов, представленных в статье [102], следствием которых является независимость силы связывания двух молекул биотина и авидина от конформационных изменений энтропии, авторы [97] высказали предположение, что поверхностная сорбция нейтравидина может сопровождаться только увеличением давления в рецепторном слое, которое подтверждается экспериментом. В работе [89] также было экспериментально подтверждено, что взаимодействие стрептавидина концентрацией (6 мг/мл) с биотином, иммобилизованным на одной из сторон кантилевера, инициирует поверхностное давление, вызывавшее изгиб кантилевера до 50 нм за время порядка 10 минут. Моулин [80] исследовал природу латеральных сил в белковых слоях, возникающих в результате сорбции белков на гидрофильную золотую поверхность кантилевера. Для избежания неспецифического связывания кремниевая поверхность кантилевера блокировалась короткоцепными гидрофобными алкильными молекулами. Было установлено, что при сорбции иммуноглобулина на золотую сторону кантилевера белковая пленка изгибалась датчик в направлении заблокированной поверхности, а при сорбции белка БСА, - в противоположную сторону, что связывалось с гидрофобным и гидрофильным балансом в системе белок–поверхность–растворитель.

Современным и перспективным направлением в развитии избирательных реакций являются аптамеры – нуклеотиды, которые можно искусственно синтезировать такими образом, чтобы они связывали определенное заданное вещество [105]. В работе [105] был представлен анализатор на основе аптамеров, определяющий фермент ДНК-полимеразу. Тестирование степени селективности датчика производилось на продуктах лизиса бактерий *Escherichia coli*. При помещении кантилевера в раствор лизата в системе не наблюдалось никаких изменений, а после добавления 50 пМ (4.7 нг/мл) ДНК-полимеразы был выявлен резкий аналитический сигнал силового отклонения микроконсоли в течение нескольких минут.

Интересными являются также биологические приложения, использующие микрокантилеверные датчики на основе надмолекулярных структур [86, 103, 104]. Карин Г. Феллер [103,104] использовал коммерчески доступные кантилеверы для определения скорости роста бактерий на их поверхности в зависимости от концентрации антибиотика. Кантилеверы предварительно покрывались слоем арагозы и на 10 минут помещались в

растворы, содержащие бактерии *Escherichia coli* XL1-Blue с канамицином – антибиотиком, замедляющим рост бактерий, и без антибиотика. После этого производился мониторинг увеличения массы кантилевера с помощью контроля его резонансной частоты. Оказалось, что на поверхности балки, модифицированной бактериальными клетками из среды без антибиотика, число бактерий в течение часа увеличилось на 8000, а на кантилевере с бактериями, угнетенными антибиотиком, прироста массы не наблюдалось. Рост бактерий происходил на поверхности арагозы в условиях 97%-ной влажности при температуре 37 °С. В процессе деления клеток бактерии брали воду и питательные вещества из поверхностного слоя арагозы, при этом слой постоянно восполнял недостаток воды за счет водяных паров среды, из-за чего масса системы в целом суммарно увеличивалась.

В работе был [86] описан сенсор на базе кантилеверных преобразователей, определявший по смещению резонансной частоты процесс прорастания спор плесневых (*Aspergillus niger*) и дрожжевых (*Saccharomyces cerevisiae*) грибов, иммобилизованных на поверхности посредством иммунохимической реакции. При определенных условиях (27 °С и 97%-ой влажности) споры, вбирая влагу из водяных паров окружения, практически полностью прорастали за 4 часа, что определялось сдвигом резонансной частоты кантилевера  $\Delta f_2$  (Рис. 1.20.).

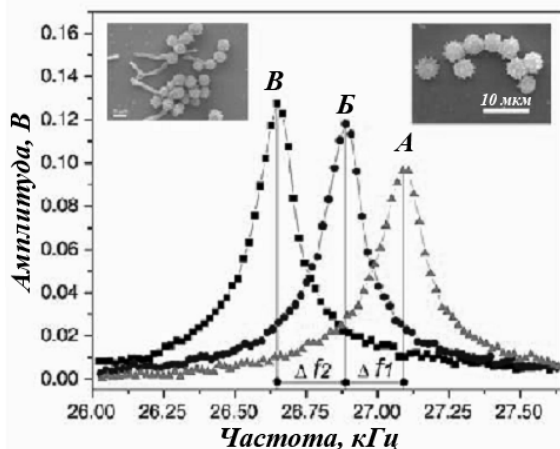


Рис. 1.20. Амплитудно-частотные характеристики кантилевера: (А) до иммобилизации спор, (Б) после иммобилизации и (В) после прорастания спор на поверхности кантилевера.

На данный момент технологии позволяют создавать МЭМС, способные измерять отдельные вирусные частицы с чувствительностью  $10^{-19}$  г/Гц [111] (рис. 1.21а). В работе [112] было экспериментально продемонстрировано измерение массы вируса вакцины оспы 9.5 фг с использованием кантилевера шириной 1.8 мкм и длиной 4 мкм (рис. 1.21б).

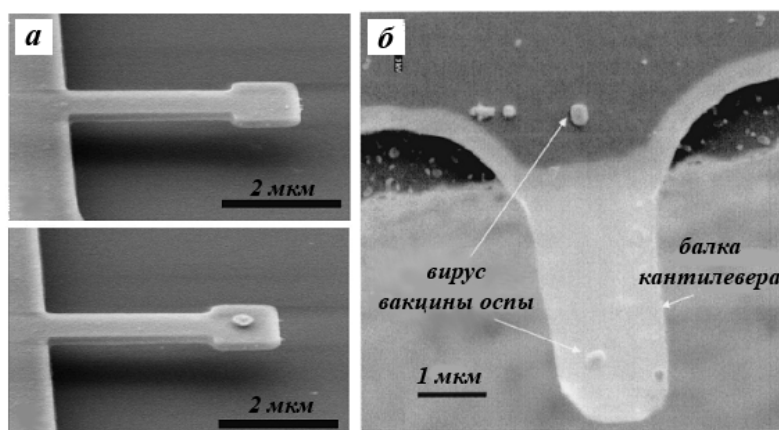


Рис. 1.21. (а) Микрокантилеверы с чувствительностью измерения массы  $10^{-19}$  г/Гц [112], (б) кантилевер, способный измерить массу одной вирусной частицы [111].

За последнее десятилетие произошел критический прорыв в разработке микромеханических сенсорных систем с рекордными показателями чувствительности по массе [111] и количества связавшегося анализируемого вещества [55]. Данные системы используют принципиально новый метод преобразования биохимических реакций в аналитический сигнал через статические деформации, возникающие в результате, тепловых, электростатических и энергетических эффектов внутри рецептного слоя и структур МЭМС. Микрокантилеверные системы, имея широкий спектр операционных режимов: статический, динамический, контроль добротности и амплитуды аналитического сигнала, являются полноценным дополнением их хорошо известных аналогов: электрохимических, оптических и акустических датчиков. Кроме того, комбинации различных схем регистрации аналитического сигнала МЭМС позволяют оптимизировать их работу практически в любой среде [6]: вакууме, газовых и жидких фазах вещества. Микроскопические размеры сенсорных устройств позволяют понизить предел их чувствительности до размеров отдельных бактерий [10] и вирусных частиц [111,112], а также осуществлять мониторинг интенсивности ИК излучения [51] и экзотермических (эндотермических) поверхностных реакций [4,85] с высоким разрешением. МЭМС, совмещенные с интегральными микросхемами в одном чипе по своим размерам не превосходят 1 мм [45,68], такие размеры сенсорных единиц позволяют интегрировать их в 1D [13,31,54,63,66] и 2D [56] массивы высокопроизводительных селективных датчиков, функционирующих по принципу электронного носа, потребность в которых неуклонно возрастает.

Таким образом, можно заключить, что будущее развитие нанотехнологических биосенсоров, способных измерять массу отдельных вирусных частиц и ничтожные напряжения в молекулярных пленках опирается на микрокантилеверные системы, уже на данный момент демонстрирующие непревзойденную чувствительность и простоту методов прямого анализа. Основанные на методе связывания анализируемого вещества с

рецепторным слоем, микрокантилеверные системы открывают новые направления в исследовании межмолекулярных взаимодействий в биополимерных пленках.

## **Выбор и обоснование оптимального варианта направления исследований**

По данным обзора касающимся применения микрокантилеверов в качестве датчиков, можно сделать вывод, что за последнее десятилетие произошел критический прорыв в разработке микромеханических сенсорных систем с рекордными показателями масс чувствительности и количества связавшегося аналита. Данные системы используют принципиально новый метод преобразования биохимических реакций в аналитический сигнал через статические деформации, возникающие в результате, тепловых, электростатических и энергетических эффектов внутри рецептного слоя и структур самих МЭМС. Микрокантилеверные системы, имея широкий спектр операционных режимов: статический, динамический, контроль добротности и амплитуды аналитического сигнала, являются полноценным дополнением их хорошо известных аналогов: электрохимических, оптических, и акустических датчиков. Кроме того, комбинации различных схем регистрации аналитического сигнала МЭМС позволяют оптимизировать их работу практически в любой среде: вакууме, газовых и жидких фазах вещества. Микроскопические размеры масс сенсорных устройств позволяют понизить предел их чувствительности до массы отдельных бактерий и вирусных частиц, а также осуществлять мониторинг интенсивности ИК излучения и экзотермических (эндотермических) поверхностных реакций с высоким разрешением. МЭМС, совмещенные с интегральными микросхемами в одном чипе по своим размерам не превосходят 1 мм, такие размеры сенсорных единиц позволяют интегрировать их в 1D и 2D массивы высокопроизводительных селективных датчиков функционирующих по принципу электронного носа, потребность в которых неуклонно возрастает.

Сейчас в России и за рубежом ведутся активные исследования в области создания "электронного носа" и "электронного языка" – искусственных измерительных систем,



действующих подобно органам человека – носу и языку. Актуальна задача создания экстренной прикроватной диагностики пациентов, которую затруднительно реализовать без непрерывного контроля веществ в средах, содержащих посторонние примеси. Примерами устройств, с помощью которых можно организовать такой контроль, могут служить кварцевые микровесы или системы поверхностного плазмонного резонанса, однако остается нерешенной проблема неспецифического связывания в случае их использования для анализа веществ в многокомпонентных средах.

Существенная, не имеющая альтернативных аналогов особенность кантилевера – способность прямого измерения натяжения в пленках, помещенных на одну из его сторон. В этом случае степень влияния неспецифического связывания на аналитический сигнал вследствие низких энергий неспецифических связей и, следовательно, их незначительного вклада в поверхностное натяжение рецепторной пленки, заметно уменьшается [10].

Благодаря этому получаемая о состоянии исследуемых объектов информация оказывается уникальной и, вообще говоря, отличается от той, которую дают распространенные методы анализа массы, оптических и электрических свойств пленок.

Уникальность информации состоит в том, что она непосредственно характеризует энергию межмолекулярных взаимодействий внутри пленки, преобразующуюся в статический изгиб кантилевера (энергию аналитического сигнала). Поверхностные силы в молекулярных пленках на твердых подложках могут быть обусловлены электростатическим взаимодействием отдельных молекул или их комплексов. Поэтому кантилеверы можно выделить в качестве нового класса прямых преобразователей биохимических веществ, имеющих особые перспективы в областях где требуется непрерывный контроль биохимических агентов в жидкости. Частным случаем применения микрокантилеверов может быть, осуществление контроля уровня лекарственных препаратов в физиологических жидкостях человека в экстренной прикроватной диагностики.

На базе кантилеверов возможно создание широчайшего набора различных по своей архитектуре датчиков, одной из конструктивной частей которых является рецептор. На данный момент, рассмотренные в обзоре примеры применения кантилеверов за некоторыми исключениями носят несколько иллюстративный характер, что связано, скорее всего, с новизной метода и отсутствием полноты понимания принципов формирования поверхностного натяжения в рецепторных пленках. В связи с этим было предложено провести дополнительные эксперименты, для и испытания разработанной в рамках НИР лабораторной установки и получения новых данных о принципах формирования рецепторов микрокантилеверных датчиков.

## План проведения экспериментальных и теоретических исследований

<b>Детализированный План выполнения поисковых научно-исследовательских работ (ИСПОЛНЕНИЯ ГОСУДАРСТВЕННОГО КОНТРАКТА)</b>			
<b>Номер этапа НИР</b>	<b>Действия Исполнителя при выполнении отдельного вида работ (в соответствии со столбцом 3 Формы 3), изложенные в хронологическом порядке</b>	<b>Дата начала действия</b>	<b>Дата завершения действия</b>
<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>
<b>I</b>	1. Разработка экспериментального образца системы регистрации сверхмалых отклонений кантилеверных датчиков позволяющий проводить мультиплексный анализ газовой или жидкофазной пробы	23.09.2009	15.09.2009
	2. Разработка оптимальной экспериментальной методики контроля натяжения биологических мембран на твердой поверхности, исследования кооперативных взаимодействий в биополимерных пленках	16.09.2009	01.11.2009
	3. Теоретическая оценка пределов чувствительности методов контроля натяжения тонких пленок на твердой поверхности	02.11.2009	25.11.2009
<b>II</b>	1. Создание методик и протоколов подготовки поверхности микрокантилеверов для базовой модификации биополимерными и биокаталитическими слоями.	26.11.2009	01.04.2010
	2. Разработка высокочувствительных кантилеверных сенсоров с оптимизированной отражающей способностью.	02.04.2010	01.07.2010
	3. Создание оптимизированных биокаталитических рецепторов для микрокантилеверных преобразователей применительно к задачам контроля латеральных напряжений внутри тонких биорецепторных пленок	02.07.2010	25.10.2010
<b>III</b>	1. Обобщение и оценка результатов исследований биосенсорных систем на основе микрокантилеверных датчиков по сравнению с альтернативными биосенсорными системами.	26.10.2010	01.05.2011
	2. Разработка и создание прототипа микрокантилеверного биосенсора прямого действия (label-free) на конкретные тестовые высокомолекулярные белки (тромбин, пероксидаза хрена и др.)	02.05.2011	19.08.2011

# Экспериментальная часть

## 2.1 Введение

Методическая часть НИР посвящена разработке и конструкторской сборке научного прибора на основе атомно-силового микроскопа, предназначенного для исследования физико-химических свойств тонких пленок и микрообъектов, помещенных на поверхность кантилевера. В цель работы входило проведение калибровки и тестирования устройства с использованием инструментария зондовой микроскопии и объектов, имеющих хорошо изученные свойства.

## 2.2 Материалы и методы

Как упоминалось в разделе 1.1.4, для получения информации о величине смещения кантилевера необходима специальная система считывания, обеспечивающая перевод реальных значений отклонений кантилевера в сигнал электрического тока. С этой целью использовалась лазерно-оптическая система, по техническим параметрам наиболее подходящая для реализации задач настоящей работы, заимствованная из атомно-силового микроскопа ФемтоСкан [169]. Прибор представляет собой головную часть АСМ ФемтоСкан в совмещении со специально разработанной нами газовой-жидкостной камерой.

Разработанное устройство (рис. 2.2) обеспечивает измерение величины статического изгиба кантилевера:

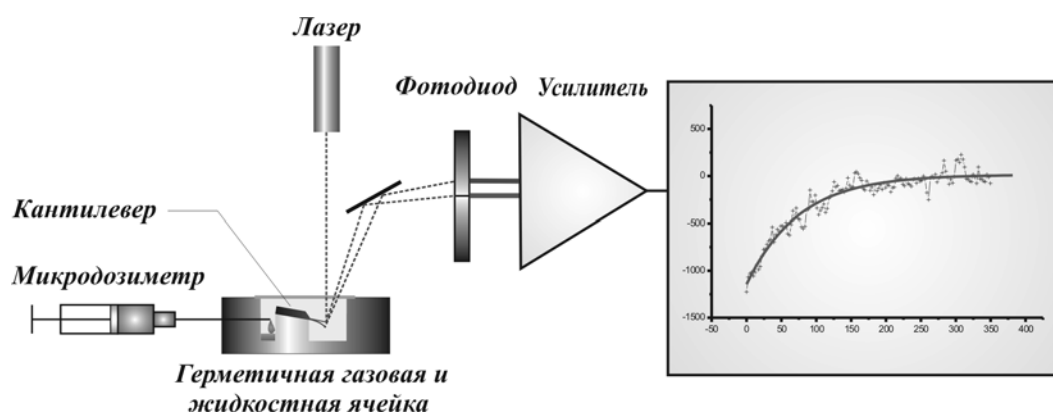


Рис. 2.1. Схема технической реализации определения статических отклонений кантилевера.

Отклонения кантилевера, фиксируемые с помощью системы лазер-фотодиод, преобразуются в сигнал постоянного электрического тока, который поступает на усилитель. На выходе усилителя аналоговый сигнал преобразуется в цифровой код и обрабатывается программными средствами «ФемтоСкан Биолайн» [202].

Герметичная камера с прозрачным окном, созданная в рамках НИР, предназначена для обеспечения функционирования кантилевера в сильных растворителях, кислотах и основаниях. Материалом камеры и держателя кантилевера является тефлон. В качестве прозрачного окна использовалось стандартное покровное стекло, которое с помощью круглой металлической пластинки с concentрическим отверстием в центре впрессовывалось в тефлон и закреплялось на нем болтами (рис. 2.3).

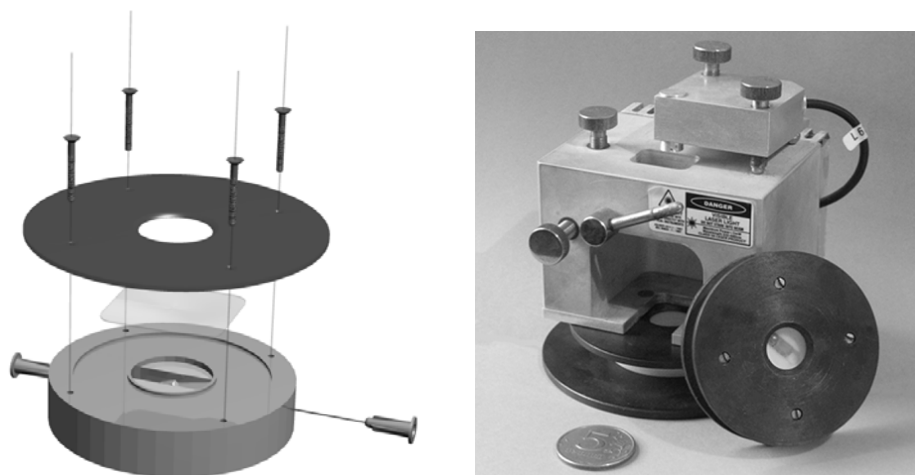


Рис. 2.2. Сборка жидкостной ячейки, содержащей кантилевер (слева), универсальная микрокантилеверная сенсорная система [16] (справа).

#### 2.3.4.2. Материалы и методы

В калибровочном эксперименте использовались кантилеверы CSG01 (Государственный научно-исследовательский институт физических проблем им. Ф.В.Лукина, НИИФП), которые в настоящей работе использовались во всех экспериментах, использующих статический режим измерения сил в пленках. Характеристики кантилевера CSG01 представлены в табл. 2.5.

Таблица 2.3. Изображение кантилевера CSG01 и его параметры.



Параметры кантилевера	
Толщина, нм	2,0
Ширина, нм	35
Длина, нм	350
Жесткость, Н/м	0,03

Калибровка производилась с использованием атомно-силового микроскопа ФемтоСкан [169]. Схема калибровочного эксперимента представлена на рис. 2.12. Основной целью эксперимента являлось определение степени отклика фотодетектирующей системы устройства на калибровочное смещение зонда в зависимости от интенсивности лазерного пучка, отраженного от кантилевера, как показано на рис. 2.4. Наноперемещения кантилевера осуществлялись с помощью пьезосканера (пьезотрубки) атомно-силового микроскопа, калиброванного на специальных тестовых решетках. В качестве образца, использовалась жесткая кремниевая пластина для исключения эффекта продавливания подложки иглой кантилевера, который в этом случае занижал бы величину собственных деформаций относительно величины вертикальных смещений пластинки. Оптический путь отраженного пучка (80 мм) от кантилевера, когда он находится в камере (см. рис. 2.2), был сохранен в настоящем эксперименте с точностью до 0,3 мм для обеспечения одинакового коэффициента усиления системы.

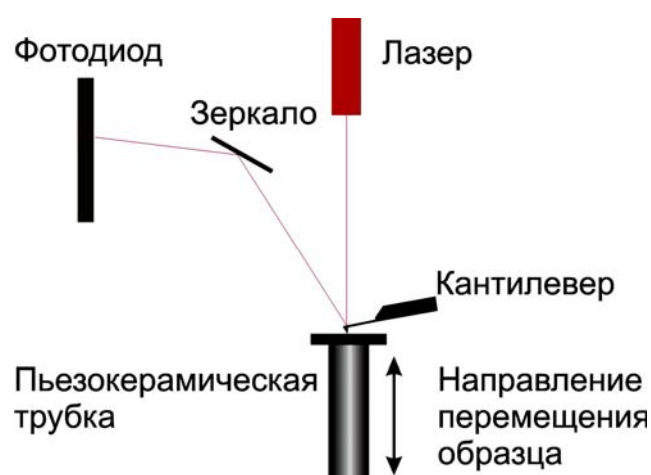


Рис. 2.4. Схема калибровки оптической системы считывания наноперемещений кантилевера.

### 2.3.4.3. Результаты и обсуждение

Кривая, содержащая экспериментальные точки коэффициента преобразования (отклика с фотодиода в милливольтках)/(реальное смещение кантилевера в нанометрах) в зависимости от интенсивности проходящего лазерного пучка на фотодиод (рис. 2.5), хорошо аппроксимировалась линейной зависимостью.

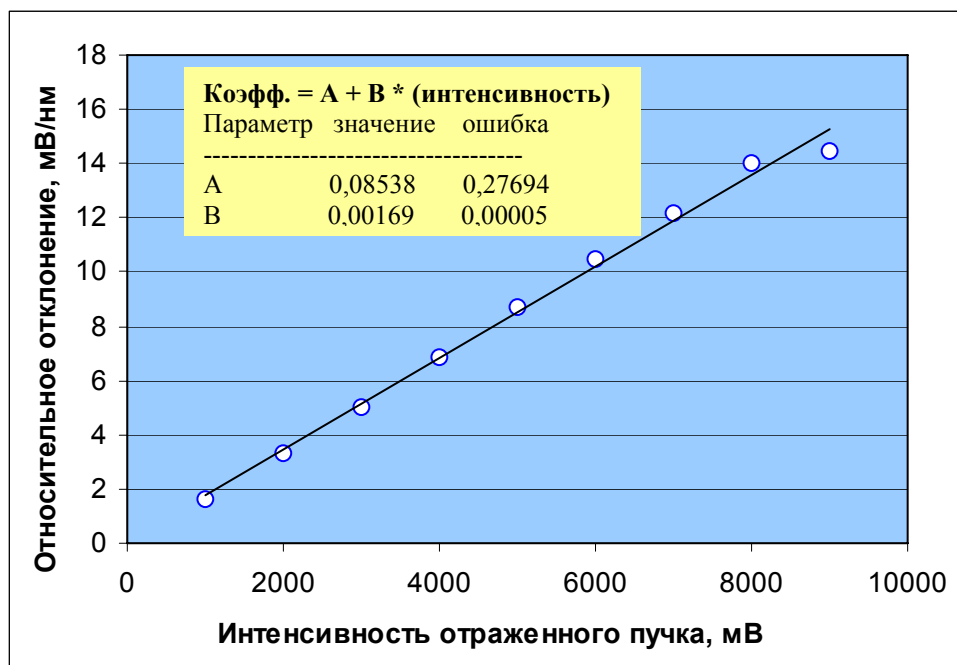


Рис. 2.5. Зависимость коэффициента преобразования (отклик с фотодиода в мВ)/(смещение кантилевера CSG01 в нм) от интенсивности проходящего лазерного пучка на фотодиод.

Необходимость калибровки оптической системы была вызвана тем, что коэффициент преобразования отклика фотодиода в реальное смещение кантилевера используется в расчете сил натяжения пленок (см. формула (6)), находящихся на поверхности сенсора. Кроме того, во время проведения экспериментов интенсивность отраженного пучка может изменяться в связи с изменениями отражающих свойств поверхности кантилевера (рецепторного слоя) и оптических свойств среды.

Все измерения, проводимые с применением оптической системы считывания сигнала отклонения кантилевера, предусматривали синхронное снятие массивов информации (одинаковой длины) о положении отраженного пучка на фотодиоде  $Def[mB]$  и его интенсивности  $Int(mB)$ , поэтому вычисление массива данных о реальном смещении кантилевера  $Def[нм]$  производилось по следующей имперической схеме:

$$Def[нм]_i = Def[mB]_i / (0,00169 Int[mB]_i) \pm Def[mB]_i / (0,28 + 0,00005 Int[mB]_i),$$

где  $i$  – индекс строки массива данных, численные коэффициенты выбраны из графика на рис. 2.13, из которого также видно, что при значениях интенсивности более 8000 мВ

происходит отклонение от линейной зависимости, что связывается с током насыщения фотодиода.

### **3. Исследование свойств монослоев низкомолекулярных веществ**

#### **3.1. Введение**

Знания о кинетике формирования самоорганизующихся монослойных пленок различных сурфактантов являются важными для создания микрокантилеверных химических сенсоров [55]. Межмолекулярные силы в пленках, выращенных на одной стороне кантилевера, вызывают его микроскопические деформации. Данный эффект, начиная с 1997 г. [34], используется исследователями при разработке сенсорных устройств адаптированных для работы в газах и жидкостях с высокой чувствительностью к фемтомолярным концентрациям анализируемого вещества в среде (до  $10^{-15}$ М [108]).

Особый интерес представляют самоорганизующиеся монослои тиоловых соединений, обладающих способностью к образованию комплексов с ионами металлов [151-155,78,106,107]. Подобные самоорганизующиеся пленки могут применяться как «металлизированные» поверхности, обладающие каталитическими свойствами [151-155], ионоселективные электроды [156] и высокочувствительные рецепторы ионов металлов [78,106,107].

Задачей настоящей работы было применить сенсорный метод атомно-силовой микроскопии с использованием разработанной микрокантилеверной системы (см. раздел 2.2.) к исследованию свойств монослоев низкомолекулярных веществ и поверхностных химических реакций, а именно:

- провести контроль формирования на поверхности кантилевера самоорганизующегося рецепторного слоя молекул бис-4-(2-пиридилметиленаминофенил)дисульфида, способных образовывать хелатный комплекс с ионами двух валентных металлов:  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ .

- определить основные механизмы, инициирующие аналитический сигнал деформаций микрокантилеверного преобразователя при комплексации ионов в рецепторном слое;
- установить предельные концентрации обнаружения ионов кобальта в водном растворе и степень селективности рецепторного слоя по отношению к ионам никеля и меди;
- показать обратимость реакции образование–разрушение хелатноно комплекса;
- рассмотреть свойства стандартных сурфактантов: тиофенола, 4-аминотиофенола и гексантиола, и с их помощью охарактеризовать молекулы бис-4-(2-пиридилметиленаминофенил)дисульфида.

## 3.2. Материалы и методы

Эксперименты проводились на универсальной измерительной системе (см. раздел 2.2.) с использованием кантилеверов CSG01 (Государственный научно-исследовательский институт физических проблем им. Ф.В.Лукина, НИИФП), одна сторона которых была покрыта золотой пленкой (характеристики CSG01 представлены в табл. 2.5.)

Для формирования рецепторного слоя химического анализатора ионов двухвалентных металлов был использован бис-4-(2-пиридилметиленаминофенил)дисульфид (далее везде в настоящем разделе – лиганд). Схема синтеза лиганда подробно описана в [156].

Перед началом модификации золотой поверхности кантилевера в растворе лиганда производилась ее очистка посредством инкубации кантилевера в 30%-ом водном растворе микстуры серной кислоты и перекиси водорода в соотношении 1:1 [156, 59-61,105]. После процедуры очистки кантилевер погружался последовательно в бидистиллированную воду и чистый этанол (растворитель лиганда) на время ~5 мин. По окончании периода установления равновесия в системе (~1ч.), кантилевер помещался в  $10^{-3}$  М раствор лиганда и извлекался из него после выхода аналитического сигнала на насыщение – приблизительно через 12 час инкубации (см. рис. 3.2). Затем кантилевер с поверхностью, модифицированной лигандом, помещался в водный раствор солей двухвалентных металлов  $MX_2 \cdot 6H_2O$  (M – Co, Cu, Ni; X – ClO<sub>4</sub>), процесс приготовления которых описан в [156]. Схема химических реакций лиганда с золотой подложкой и обратимого образования хелатного металлокомплекса на основе ионов  $Co^{2+}$  представлена на рис. 3.1.



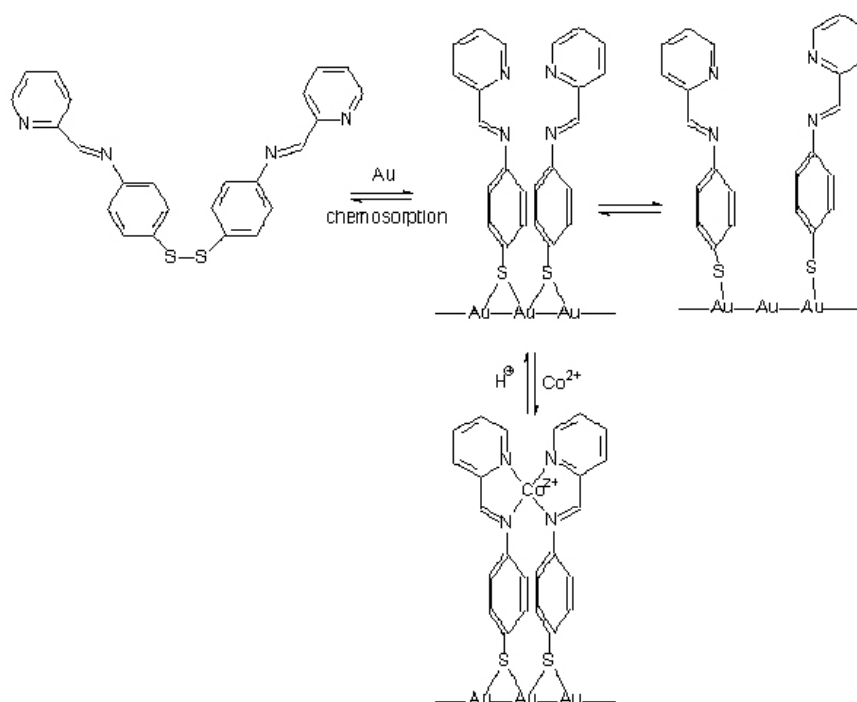


Рис. 3.1. Схема химической реакции бис-4-(2-пиридилметиленаминофенил)дисульфида с золотой подложкой (в верхней части рисунка) и схема реакции обратимого образования металлокомплекса (в нижней части рисунка).

Обратимое разрушение образовавшихся металлокомплексов в слое молекул лиганда, производилось посредством инкубации сенсора в водном  $10^{-2}$  М растворе соляной кислоты в течение 1 часа. Для косвенного анализа свойств лиганда использовались стандартные модификаторы: тиофенол, 4-аминотиофенол и гексантиол.

### 3.3. Результаты и обсуждение

Хемосорбция лиганда на золотой стороне кантилевера сопровождалась изгибом балки в сторону растущего монослоя (рис. 3.2), т.е. наблюдался эффект поверхностного натяжения. Данные по изменению угла смачивания капли воды на золотой подложке в зависимости от времени ее инкубации в растворе ( $10^{-3}$  М) лиганда (табл. 3.1.) соответствуют результатам, полученным с помощью микрокантилеверной системы (рис. 3.2.), которые говорят о том, что за 8 – 10 часов на золотой поверхности из раствора лиганда образуется максимально упакованный слой молекул.

Таблица 3.1. Зависимость изменения краевого угла смачивания капли воды на золотой подложке модифицированной бис-4-(2-пиридилметиленаминофенил)дисульфидом в этаноле от времени инкубации в растворе ( $10^{-3}$  М) этанола [156].

Время инкубации золотой подложки в $10^{-3}$ М растворе лиганда в этаноле	$\theta$ , угол смачивания
---	----------------------------

0 (чистая поверхность золота)	65
5 мин	45
15 мин	47
40 мин	52
5 ч	59
10 ч	59
17 ч	59

Данные изменения краевого угла смачивания подтверждают, что с увеличением времени образования слоя гидрофобность поверхности возрастала [156]. Незначительное несоответствие кинетических характеристик кривых (рис. 3.2) объясняется различием методов получения аналитического сигнала о состоянии упаковки слоя. По завершению образования тиоловой пленки гидрофобность, толщина и средняя плотность ее упаковки могут оставаться практически постоянными, тогда как силы, увеличивающиеся в соответствии с уровнем оптимизации слоя, могут продолжать изменяться [35].

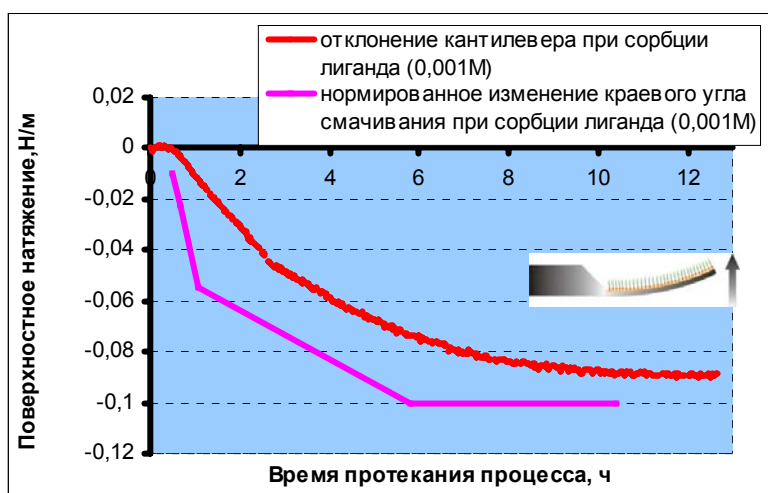


Рис. 3.2. Хемосорбция лиганда ( $10^{-3}$  М) из метанола на золотую поверхность: данные изгиба кантилевера (верхняя кривая); нормированное изменение краевого угла смачивания капли воды на золотой подложке, модифицированной лигандом, с течением времени (нижняя кривая) [6]. Направление изгиба кантилевера показано на вставке.

Результаты, представленные на рис. 3.2, подтверждающие, что кантилевер изгибается в сторону хемосорбированного монослоя, можно объяснить меньшей полярностью молекул лиганда по сравнению с полярностью к молекулам растворителя (этанола), т.е. в данной системе молекулам рецепторного слоя выгодней располагаться в непосредственной близости друг к другу, инициируя эффективное поверхностное натяжение. Предположение о влиянии растворителя на знак сил в монослойной пленке можно подтвердить, рассмотрев хемосорбцию из метанола более простых модификаторов: тиофенола и гексантиола на золотой поверхности кантилевера (рис. 3.3).

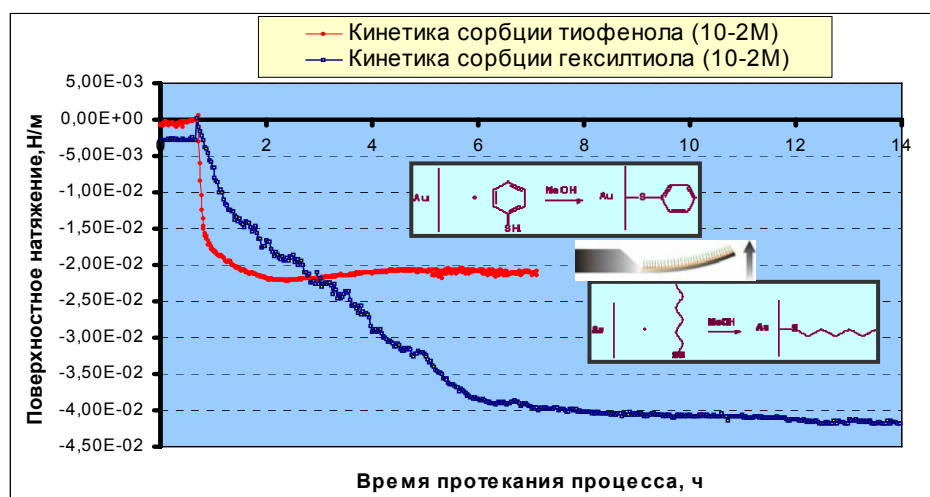


Рис. 3.3. Экспериментальные данные кинетики изгиба кантилевера при химической сорбции на одной из его поверхностей, покрытой золотом, тиофенола и гексантиола, растворенных в метаноле с концентрацией  $10^{-2}$  М.

Известно, что молекулы гексантиола на воздухе изгибают кантилевер в сторону немодифицированной поверхности [34], но, как видно из рис. 3.3, в метаноле кантилевер изгибается в сторону монослоя, что говорит о том, что растворитель определяет знак сил в слое. Различие в амплитуде изгиба и кинетике хемосорбции тиофенола и гексантиола (см. рис. 3.3) объясняется индивидуальными свойствами мономерных составляющих пленки. Ульман [157] в сравнительном анализе упаковки монослойных пленок из тиофенолов и алканотиолов показал, что слой из молекул тиофенола имеет менее плотную структуру, чем из молекул алканотиолов и что организация молекул меркаптофенолов с образованием поверхностного натяжения в монослое вызвана также  $\pi$ - $\pi$  связями между фенольными кольцами. Ульман также установил, что увеличение степени организации слоя тиофенолов связано с увеличением линейных размеров мономера пленки (например, молекула лиганда «больше» молекулы тиофенола). Вместе с тем, нами было получено, что молекулы 4-аминотиофенола изгибают кантилевер в сторону не модифицированной плоскости (рис. 4.7), что связывается с положительным зарядом протонированных аминогрупп  $-\text{NH}_3^+$  на фенольном кольце [76, 77], инициирующих электростатическое отталкивание. Исходя из вышесказанного, можно заключить, что организация молекул сурфактантов зависит во многом от электростатических факторов, которые в данном случае определяют знак сил в пленке [34, 55,67].

При помещении кантилевера в водный раствор, содержащий ионы  $\text{Co}^{2+}$ , наблюдался его значительный изгиб в сторону немодифицированной кремниевой поверхности (рис. 3.4). Данное поведение системы обуславливалось увеличением зарядовой плотности рецепторного слоя за счет привнесения ионов атомов двухвалентных металлов, которые вместе с молекулами лиганда, иммобилизованными на золотой

поверхности, образуют хелатные комплексы (рис. 3.1). После инкубации кантилевера в водном растворе соляной кислоты ( $10^{-2}$  М) наблюдалась его релаксация в исходное состояние, в котором он находился до момента помещения в раствор соли (рис. 3.4). Таким образом, с помощью метода измерения силового изгиба кантилевера была подтверждена обратимость реакции образования металлокомплекса (рис. 3.1). Повторное помещение кантилевера в раствор соли вызывало отклик системы, аналогичный наблюдавшемуся в предыдущем цикле эксперимента (рис. 3.4).

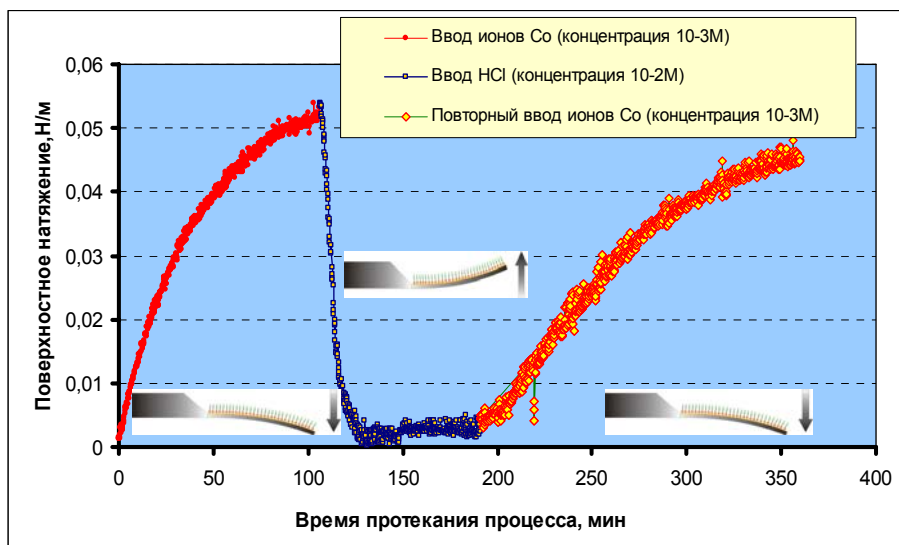


Рис. 3.4. Кинетика изгиба кантилевера при последовательной инкубации в водных растворах:  $\text{Co}(\text{ClO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (цикл 1 концентрация  $10^{-3}\text{M}$ ),  $\text{HCl}$ ,  $\text{Co}(\text{ClO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (цикл 2 концентрация  $10^{-3}\text{M}$ ).

С понижением концентрации ионов кобальта в растворе величина деформации кантилевера уменьшалась, а при концентрации  $10^{-7}\text{M}$  соотношение сигнал/шум составляло  $2,3 \pm 0,1$ , что близко минимальному фильтруемому сигналу. Таким образом, можно заключить, что предельная концентрация обнаружения ионов кобальта в воде для описанной системы составляла порядка  $10^{-7}\text{M}$ .

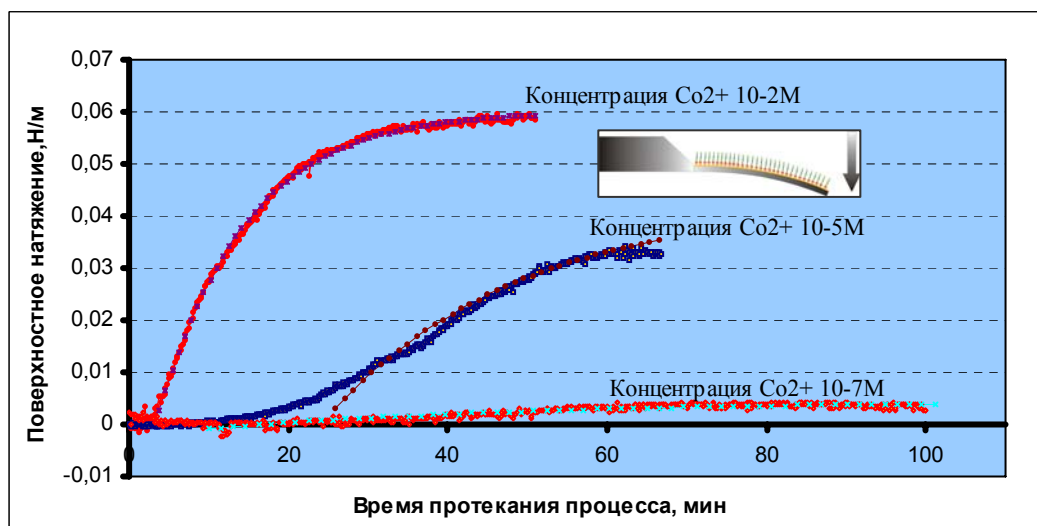


Рис. 3.5. Кинетики изгиба кантилевера при помещении его в водные растворы  $\text{Co}(\text{ClO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  с концентрациями:  $10^{-2}\text{M}$ ,  $10^{-5}\text{M}$ ,  $10^{-7}\text{M}$ .

Конкурирующим фактором для сил электростатического отталкивания являются конформационные изменения молекул при образовании металлокомплексов. В случае ионов  $\text{Co}^{2+}$  проявляется явное доминирование электростатических сил отталкивания, создающих в слое избыточное давление. Показаны отклики кантилевера на первичный цикл инкубации в водном растворе ( $10^{-3}\text{M}$ ) солей двухвалентных металлов  $\text{MX}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (где  $M - \text{Co}, \text{Cu}, \text{Ni}$ ;  $X - \text{ClO}_4$ ). Наибольший силовой отклик соответствует нахождению кантилевера в водном растворе соли кобальта, а наименьший – в растворе соли меди. По данным электронной спектроскопии комплексов бис-4-(2-пиридилметиленаминофенил)дисульфида с ионами металлов [156] было показано, что комплексы с никелем имеют форму плоского квадрата, комплексы с кобальтом – тетраэдральную форму, а форма комплекса с медью не может быть определена однозначно на основе электронного спектра. Таким образом, можно заключить, что степень отклика кантилевера при комплексообразовании непосредственно зависит также от формы комплекса, определяемого величиной энергии, затраченной на его образование.

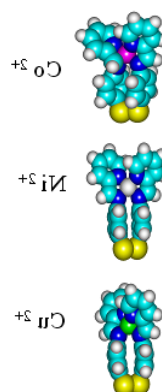
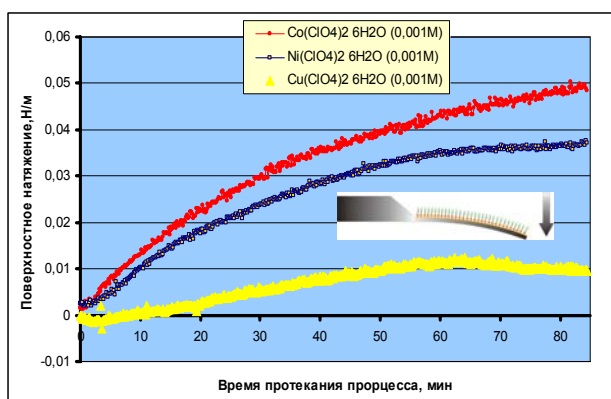


Рис. 3.6. Кинетика изгиба кантилевера при инкубации в водных растворах:  $\text{MX}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  ( $M - \text{Co}, \text{Cu}, \text{Ni}$ ;  $X - \text{ClO}_4$ ) (цикл 1, концентрация  $10^{-3}\text{M}$ ). Формы. В правой части рисунка изображены соответствующие формы комплексов.

### 3.4 Теоретическая оценка пределов чувствительности микрокантилеверной системы

Теоретическая оценка пределов чувствительности микрокантилеверной системы проводилась с допущением того, что система обладает фундаментальным броуновским шумом. Считалось, что разрешающая способность кантилеверных датчиков ограничивалась величиной броуновского шума кантилевера.

Диапазон механических шумовых колебаний шума кантилевера выражается следующей формулой.

$$\Delta x = \sqrt{\frac{k_b T}{k}},$$
 где  $x$  – среднее значение отклонения кантилевера,  $T$  – температура,  $k_b$  –

константа Больцмана,  $k$  – жесткость кантилевера.

Расчет производился для кантилеверов  $\mu\text{pC01}$  (НИИФП им.Ф.В. Лукина), которые использовались в системе измерения поверхностного натяжения. Для них  $\Delta x = 3,7 \text{ \AA}$ .

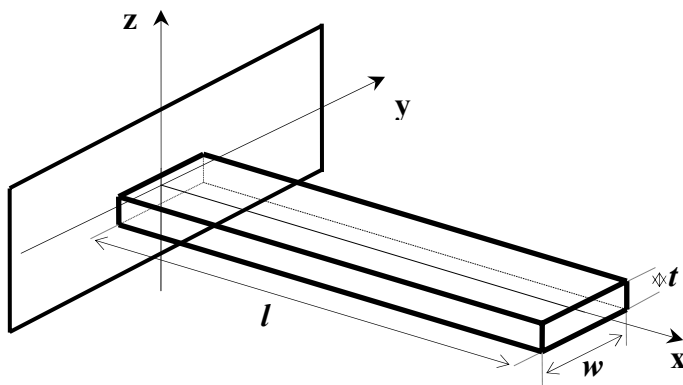


Рис. 3.7. Параметры балки

Связь поверхностного натяжения с величиной смещения конца кантилевера, имеющего форму длинной прямоугольной балки, выражается соотношением Стони:

$$\Delta\sigma = \frac{4kl}{3(1-\nu)wt} \Delta x,$$

где  $\Delta\sigma$  – разница сил поверхностного натяжения между верхней плоскостью кантилевера с рецепторным покрытием и нижней без специфического покрытия,  $l$  и  $t$  – длина и толщина прямоугольного кантилевера соответственно,  $\nu$  – коэффициент Пуассона,  $\Delta x$  – величина отклонения незакрепленного конца кантилевера,  $w$  и  $t$  – соответственно ширина и толщина балки. Подставляя значения тепловых флуктуаций  $\Delta x$  в формулу Стони и учитывая характеристики кантилевера frC01, получим предельное значение, поверхностного натяжения пленки, которое можно измерить с помощью данного кантилевера,  $\Delta\sigma = 0,0002$  Н/м.

### 3.5. Выводы

Применение метода измерения сил в тонких пленках с помощью кантилевера атомно-силового микроскопа в самоорганизующихся монослоях тиолов позволило получить данные о кинетиках развития сил в пленке бис-4-(2-пиридилметиленаминофенил)дисульфида (лиганда), иммобилизованного на поверхности кантилевера, а также при образовании и разрушении хелатного комплекса молекул лиганда с ионами двухвалентных металлов:  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ . Экспериментально установлен предел чувствительности химического датчика на ионы  $\text{Co}^{2+}$  -  $10^{-7}$  М/л. Доказан факт влияния растворителя на знак сил в слое алканотиолов на золоте и экспериментально подтверждено, что растворитель (MeOH) увеличивает силу гидрофобного взаимодействия, превышающую силы электростатического отталкивания [34] между молекулами лиганда на золотой поверхности.

## 4. Иммунохимический сенсор на тестовые биополимеры

### 4.1. Введение

Методы иммунного анализа, основанные на поверхностном плазмонном резонансе и кварцевом микровзвешивании для высокомолекулярных антигенов: белков или полисахаридов, работающие без меток [160,161], являются более удобными и экспрессными, так как априори предполагают, что получаемый в результате образования иммунного комплекса аналитический сигнал вырабатывается благодаря приросту массы связавшегося антигена. При этом в некоторых случаях изменение массы рецепторного слоя может происходить за счет неспецифического связывания посторонних

биополимерных объектов, содержащихся в анализируемом растворе [162]. Данные трансдьюсеры биосенсоров не могут нивелировать в аналитическом отклике составляющие неспецифического связывания, так как они характеризуют прирост массы слоя.

В случае определения фактов связывания анализируемого вещества с помощью измерения сил, генерируемых в белковом слое, степень влияния неспецифического связывания на аналитический сигнал заметно уменьшается [162] благодаря низким энергиям неспецифических связей и, следовательно, их незначительному вкладу в поверхностное натяжение рецепторной пленки.

Одной из основных задач работы являлось определение возможности проведения прямого анализа с помощью микрокантилеверных систем, а точнее, экспериментальное определение степени латеральных напряжений в монослойной пленке антител при связывании с классическим белком – пероксидазой хрена (ПХ). Также предполагалось сопоставить эффективность методов физической иммобилизации с помощью белка А [86, 163] и статистической ковалентной прививки [158] антител на поверхности кантилевера.

В качестве модельного белка (антигена) был взят фермент ПХ, широко использующийся в иммуноферментном анализе в качестве, электрохимической и оптической метки.

## **4.2. Материалы и методы**

### **Метод односторонней модификации кантилевера**

### **Метод односторонней модификации кантилевера**

Для химической обработки только одной из сторон кантилевера был разработан метод, в котором кантилевер помещался над раствором модифицирующего вещества таким образом, чтобы одна из его сторон соприкасалась с раствором, а другая оставалась на воздухе. Практически кантилевер помещался на каплю жидкости и плавал по ее поверхности за счет сил поверхностного натяжения молекул растворителя (воды).

### **Блокировка кремниевой поверхности кантилевера**

Кантилевер по своей топологии имеет две поверхности: покрытую субмикронной пленкой золота и непокрытую кремниевую. При помещении кантилевера в анализируемый раствор его поверхность становится не защищенной от неспецифической



сорбции анализируемого белка [164, 165]. Для исключения неспецифического связывания поверхность кантилевера, не имеющая рецепторного слоя, блокировалась химически иммобилизованным БСА (метод ковалентной иммобилизации белков, описан в разделе 4.1.2).

#### Физическая иммобилизация IgG с использованием белка А

Иммобилизация антител на поверхность кантилевера, покрытую золотом, производилась с помощью белка А из клеточной стенки бактерий стафилокока (предоставлен сотрудниками кафедры энзимологии химического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова). Белок концентрацией 100 мкг/мл был сорбирован на золотую поверхность кантилевера *методом односторонней модификации* из дистиллированной воды в течение часа [126] для образования максимально упакованного слоя (рис. 4.19 а). Так как белок А способен афинно связывать антитела IgG через комплиментарные сайты по принципу связывания антигена антителом [86, 163], то завершающей стадией подготовки рецепторного покрытия было нанесение IgG кролика, специфичного к ПХ (объекты исследования предоставлены сотрудниками кафедры энзимологии химического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова), с концентрацией 100 мкг/мл из фосфатного солевого буферного раствора (ФСБР) с рН = 7,0 в течение суток (рис. 4.19 б). В дальнейшем кантилевер помещался в ФСБР с рН = 7,0 и в последствии подвергался воздействию анализируемого белка (рис. 4.19 в).

#### Химическая иммобилизация IgG с использованием белка А

Химическая иммобилизация антител к пероксидазе хрена (с концентрацией 100 мкг/мл) на золотой поверхности производилась из ФСБР с рН = 7,0.

В результате химической и физической модификации кантилевера были получены сенсоры со следующей архитектурой рецепторных слоев (рис. 4.1).

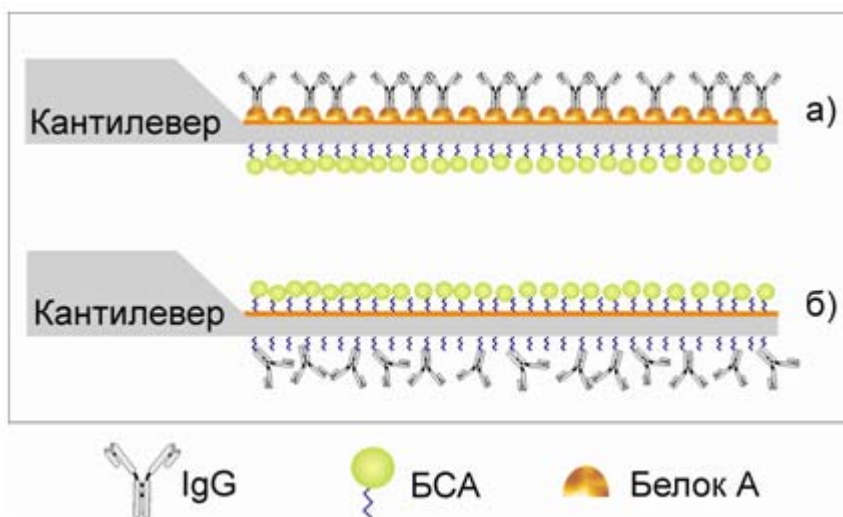


Рис. 4.1. Архитектура сенсорного слоя микрокантилеверного сенсора (на пероксидазу хрена): (а) при иммобилизации IgG с помощью белка А, (б) при ковалентной иммобилизации антител.

### 4.2.3. Результаты и обсуждение

#### Физическая иммобилизация иммуноглобулина (IgG) с использованием белка

А

После добавления пероксидазы хрена в ФСБР (рН = 7,0) кантилевер с физически иммобилизованным рецепторным слоем начинал деформироваться в сторону рецепторного слоя (кинетика изгиба приведена на рис. 4.2).

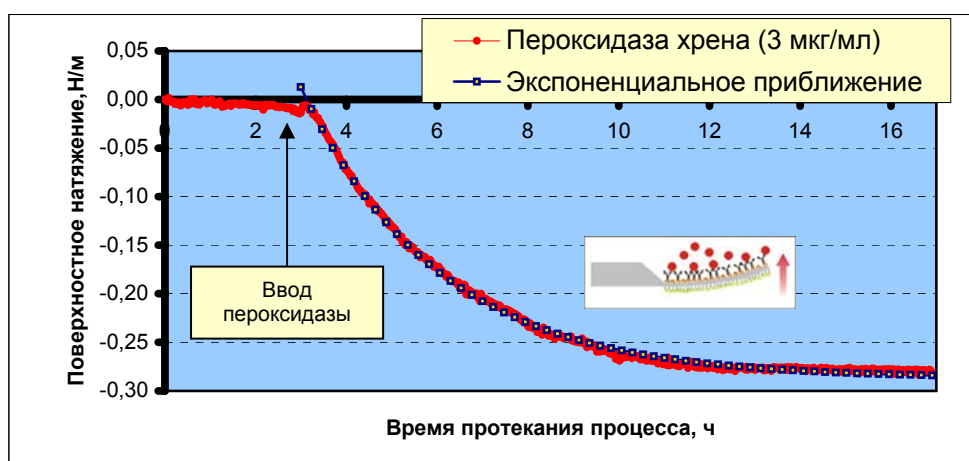


Рис. 4.2. Кинетика изгиба кантилевера с физически иммобилизованным рецепторным слоем при введении раствора ПХ с концентрацией 3 мкг/мл.

Абсолютное значение силы латеральных напряжений, изгибавших кантилевер составило 0,3 Н/м, а скорость сорбции (формула (14) гл. 1)  $k_{сорб} = 0,33 \pm 0,01 \text{ ч}^{-1}$ . После регенерации сенсора в глициновом буфере (рН = 3,0) [142, 143] и повторной постадийной иммобилизации антител его чувствительность к ПХ понизилась более чем в четыре раза (рис. 4.3), скорость увеличилась пропорционально логарифму концентрации  $k_{сорб} = 1,32 \pm 0,05 \text{ ч}^{-1}$ , которая в данном случае не зависела от качеств рецепторного слоя.

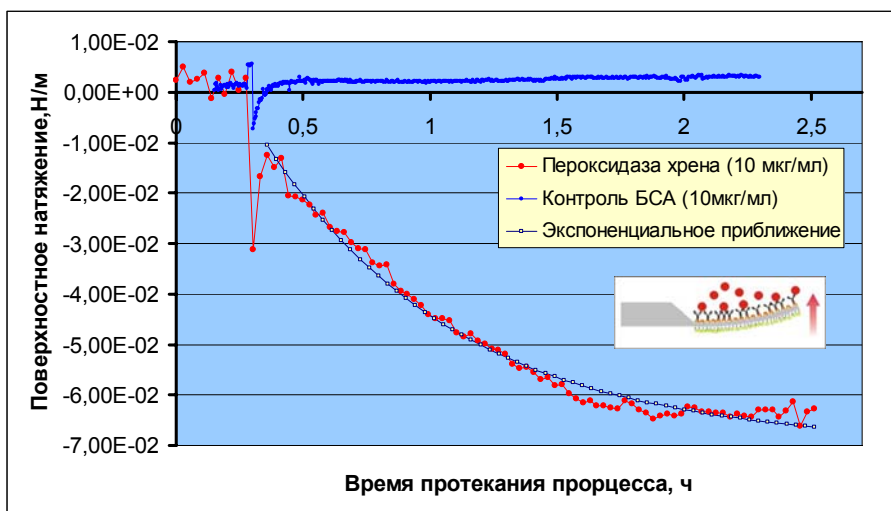


Рис. 4.3. Кинетика изгиба кантилевера с физически иммобилизированным рецепторным слоем после цикла его регенерации в глициновом буфере (pH = 3,0) при введении раствора ПХ с концентрацией 10 мкг/мл. В верхней части рисунка приведен контрольный сигнал системы на белок БСА.

С помощью атомно-силового микроскопа был произведен контроль свойств поверхности рецепторного слоя кантилевера на стадиях подготовки и функционирования сенсора. На рис. 4.4 показаны изменения параметров шероховатости поверхностей [168] в результате появления на ней новых белковых комплексов:

$$R_a = \frac{1}{N} \sum_{n=1}^N |r_n|, R_q = \frac{1}{N} \sum_{n=1}^N r_n^2, R_{sk} = \frac{1}{NR_q^3} \sum_{n=1}^N r_n^3,$$

где  $R_{max}$  – максимальный профиль поверхности, а  $R_a$ ,  $R_q$ ,  $R_{sk}$  – средняя и среднеквадратичные шероховатости и параметр симметрии соответственно,  $r_n$  – высоты точек массива изображения,  $N$  – число точек. Исходя из данных, полученных с помощью АСМ, можно сделать вывод, что на поверхности образуются специфические иммунные пары антител с ферментом ПХ, которые изменяют рельеф рецепторного слоя с увеличением параметров шероховатости, т.е. на поверхности появляются качественно новые объекты, очевидно, влияющие на развитие сил в сенсорном слое.

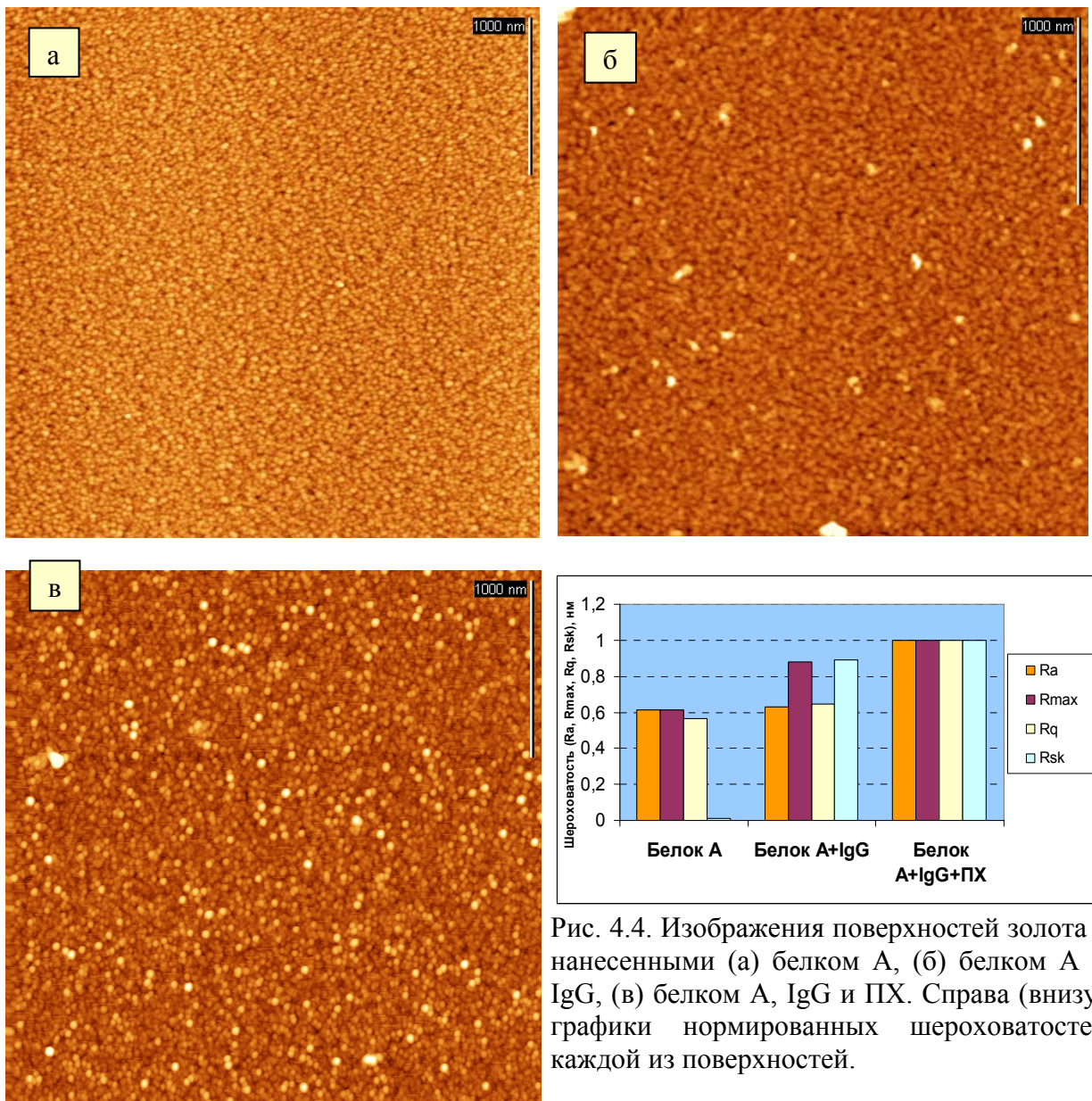


Рис. 4.4. Изображения поверхностей золота с нанесенными (а) белком А, (б) белком А и IgG, (в) белком А, IgG и ПХ. Справа (внизу) графики нормированных шероховатостей каждой из поверхностей.

### Химическая иммобилизация IgG на поверхности кантилевера

При высоком уровне воспроизводимости после нескольких циклов регенерации кантилевер с ковалентно иммобилизованными антителами (см. рис.4.1б) показал чувствительность в полтора раза меньшую, чем в случае иммобилизации антител с помощью белка А.

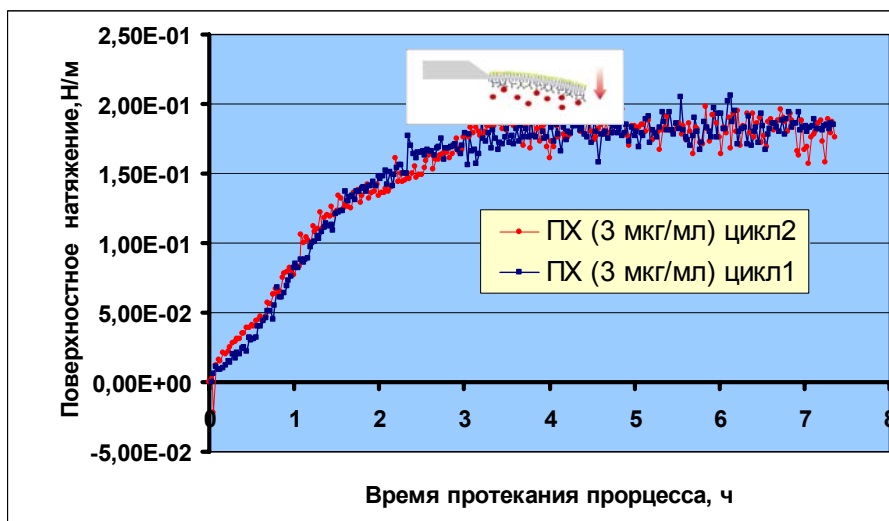


Рис. 4.5. Кинетика изгиба кантилевера с ковалентно иммобилизованным рецепторным слоем при  $N$ -ом и  $(N+1)$ -ом циклах регенерации в глициновом буфере ( $pH = 3,0$ ) при введении раствора ПХ с концентрацией 3 мкг/мл. Контрольные белки БСА и овальбумин с концентрациями 1 мг/мл. Нулевой уровень отклонений кантилевера сигналов контрольных белков для наглядности смещен в сторону отрицательных значений.

Блокировка поверхности сенсора, не являющейся рецепторным слоем, обеспечила невосприимчивость анализатора к внешним неспецифическим воздействиям контрольных белков: БСА и овальбумина при высоких концентрациях (рис. 4.6).

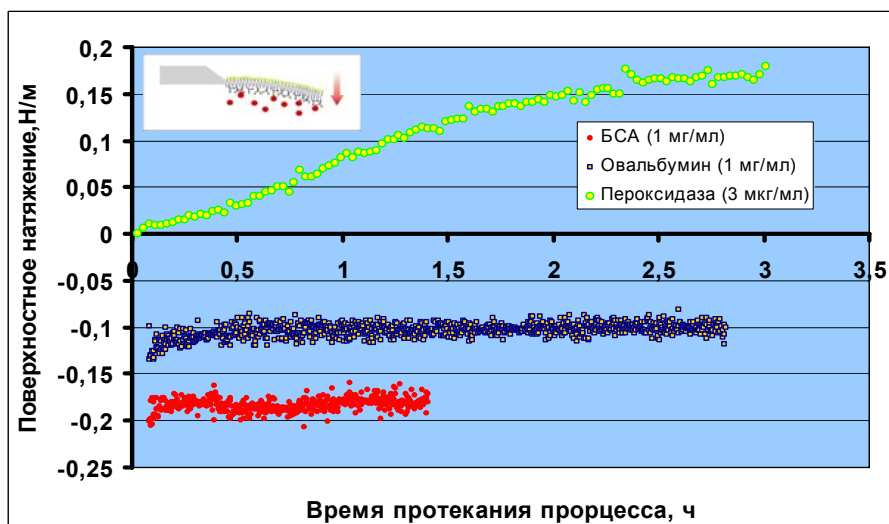


Рис. 4.6. Кинетика деформаций кантилевера с ковалентно иммобилизованным рецепторным слоем при введении раствора ПХ с концентрацией 3 мкг/мл (68 нМоль) и контрольных белков: БСА и овальбумина с концентрациями 1 мг/мл. Нулевой уровень отклонений кантилевера сигналов контрольных белков для наглядности смещен в область отрицательных значений.

Сопоставляя результаты контроля иммунохимических реакций на поверхности кантилевера (табл. 4.1) можно легко увидеть, что в результате физической иммобилизации антител на поверхности кантилевера силы, возникающие в монослое антител, в полтора раза больше, чем при химической прививке. Это связывается с увеличенной

мобильностью молекул IgG на поверхности в комплексе с белком А и детерминированностью их посадки на поверхности [86], в результате чего конформационные изменения молекул IgG при образовании иммунной пары могут быть гораздо большими, чем при случайной химической иммобилизации антител [167]. Известно, что в непосредственной близости к поверхности многие белковые молекулы из-за частичной денатурации могут в значительной степени изменить свою конформацию [166], кроме того, при афинном типе связывания антитела с антигеном химическая прививка не позволяет молекулам антител естественным образом изменять пространственную структуру, т.е. константа связывания антител может уменьшиться [145].

Таблица 4.1. Сравнение характеристик рецепторных слоев молекул IgG, закрепленных на поверхности с помощью методов физической и химической иммобилизации.

Параметры анализатора Метод иммобилизации	Чувствительность (максимальная сила изгиба при одинаковых концентрациях 3 мкг/мл за время работы анализатора), Н/м.	Воспроизводимость после регенерации (отношение сил изгиба кантилевера до и после его регенерации)	Невосприимчивость к БСА и овалбумину	Скорость работы сенсора при одинаковых концентрациях ПХ (ч <sup>-1</sup> )
Физическая прививка	0,28± 0,03	0,23±0,001	БСА – есть Овальбумин – данных нет	0,33±0,01
Химическая прививка	0,18± 0,02	0,89±0,04	БСА – есть Овальбумин – есть	0,77±0,03

Помимо недостатков химическая иммобилизация показала ряд преимуществ, связанных с более высокой концентрацией антител на поверхности, обеспеченной методом иммобилизации, таких как повышенная скорость определения пероксидазы и высокая степень воспроизводимости результатов после физического разрушения иммунного комплекса с помощью глицинового буфера (pH = 3,0) [142, 143]. Высокая степень воспроизводимости по максимальной силе аналитического сигнала (чувствительности) связана, видимо, с отсутствием сложных белковых комплексов, за исключением образовавшихся иммунных пар, в рецепторном слое, которые в кислой среде глицинового буфера могут необратимо агрегировать [166], в результате чего константа связывания антител может также значительно понизиться. В обоих случаях было обнаружено, что связавшиеся молекулы фермента повышают поверхностное натяжение рецепторной пленки, поэтому кантилевер изгибается в сторону иммобилизованного слоя антител. Аналогичные результаты [92, 164] объяснялись изменением электростатического заряда и полярности (гидрофобного баланса)

образующихся иммунных комплексов. Предполагается также, что ослабления латеральных сил в биополимерной пленке могут быть связаны с эффектом уменьшения конформационной энтропии комплекса [97], обусловленным увеличением компактности или «жесткости» иммунной пары. В более общей форме генезис поверхностного натяжения в белковых пленках связывается с реорганизацией ее субъединиц, стремящихся минимизировать свободную энергию системы в целом [88].

#### **4.2.4. Выводы**

Реализованные микрокантилеверные анализаторы на основе модельной иммунной пары пероксидаза хрена и IgG показали высокую чувствительность на уровне нескольких наномолей ПХ в одном литре буферного раствора, а также невосприимчивость к стандартным неспецифическим белкам: овалбумин и БСА. Скорость прямого анализа при наномолярных концентрациях анализируемого вещества достигла порядка 30 минут (рис. 4.22).

Физическая прививка антител на поверхности сенсора с помощью стандартного иммобилизатора – белка А – показала невозможность многократного использования сенсора из-за необратимых процессов, протекающих в рецепторном слое, при его искусственной регенерации с использованием кислого глициинового буфера. Напротив, метод статистической прививки антител на поверхности с использованием свободных аминогрупп оказался более эффективным и воспроизводимым вследствие повышения плотности антител на поверхности и защищенности их центров связывания от необратимых агрегаций в белковых комплексах при низких рН. Тем не менее, химическая прививка антител за их аминогруппы обнаружила ряд недостатков, таких как возможная энтропийная бедность привитых молекул [88] и блокировка их активных центров, что в 1,5 раза понижало чувствительность системы.

Исходя из полученных результатов, можно заключить, что дальнейшие разработки методов иммобилизации антител для рецепторных слоев силовых микромеханических датчиков подразумевают создание способов однозначной иммобилизации молекул на поверхности для устранения возможности химического блокирования сайтов распознавания и для повышения устойчивости рецептора к циклам регенерации в кислых средах.

#### **Заключение**

По итогам НИР сделан обзор микрокантилеверных датчиков биополимерных соединений. Установлены основные особенности, относящиеся к архитектуре

рецепторных слоев для микрокантилеверных систем, основные требования к которым заключаются в максимальной плотности прививки молекул рецептора, наименьшей шероховатости подложки и максимальной степени ориентировки сайтов связывания относительно нормали к подложки рецептора. Изготовлен и испытан лабораторный образец системы регистрации сверхмалых отклонений микрокантилеверных датчиков.

С помощью лабораторной установки произведен прямой контроль сил, действующих в монослойных пленках группы серосодержащих соединений, во время их самоорганизации на золотой поверхности микрокантилевера. В низкомолекулярных пленках выявлены механизмы генерации латеральных сил, обусловленных гидрофобным и электростатическим взаимодействием между мономерами пленки. Показана связь сил, действующих в пленке, со структурой ее мономерного звена.

Впервые создан микрокантилеверный анализатор с рецептором из молекул бис-4-(2-пиридилметиленаминофенил)дисульфида, селективный к ионам тяжелых двухвалентных металлов:  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ , образующих с этими молекулами хелатный комплекс. Показано, что механический изгиб кантилевера главным образом зависит от двух конкурирующих факторов: конформационных трансформаций молекул в слое и изменения его зарядовой плотности. Определен порог чувствительности сенсора  $-10^{-7}$  М.

Разработаны методики ковалентной и физической иммобилизации белков на кремниевой и золотой поверхностях кантилевера. На базе лабораторной установки реализованы высокоселективные микрокантилеверные анализаторы на основе пары комплиментарных биополимеров – пероксидазы хрена и иммуноглобулина G (IgG) – с чувствительностью к нескольким наномолям пероксидазы в литре буферного раствора. Показано, что конформационные изменения молекул IgG при связывании с пероксидазой уменьшают энтропию системы и вызывают регистрируемый сигнал деформаций кантилевера.

Результаты проведенных НИР могут быть использованы для проведения опытно-конструкторских и опытно-технологических работ в научно-исследовательских организациях и предприятий производящих наукоемкую биомедицинскую продукцию. В частности результаты НИР особенно перспективно использовать для проведения опытно-конструкторских и опытно-технологических работ для создания анализатора прямого действия для экстренной медицинской диагностики и прикроватной диагностики пациентов.



## СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. G. Binnig, H. Rohrer, C. Gerber. Scanning tunneling microscopy // *Phys. Rev. Lett.*, – 1982, – Vol.49, – pp.57-61.
2. G. Binnig, C.F. Quate, C. Gerber, E. Weibel. Atomic force microscope // *Phys. Rev. Lett.*, – 1986, – Vol.56, – pp.930-933.
3. H.K. Wickramasinghe. Progress in scanning probe microscopy // *Acta Mater.*, – 2000, – Vol.48, – No.1, – pp.347-358.
4. J. K. Gimzewski, C. Gerber, E. Meyer, R. R. Schlittler. Observation of a chemical reaction using a micromechanical sensor // *Chem. Phys. Lett.*, – 1994, – Vol.217, – No.5-6, – pp.589-594.
5. G. G. Stoney. The tension of metallic films deposited by electrolysis // *Proc. R. Soc.*, – 1909, – Vol.82, – No.553, – pp.172-175.
6. 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, – No.7, – pp.2229-2253
7. P.B. Каттралл. Химические сенсоры // *Научный мир, Москва*, – 2000, – 144 стр.
8. I.V. Yaminsky, G.A. Kiselev. Scanning Probe Microscopy of Biomacromolecules: Instrumentation and Experiments, in "Frontiers of Multifunctional Integrated Nanosystems" // *Ed. by E. Buzaneva, P. Schraff. Kluwer Academic Publishers*, – 2003, – pp.221-228.
9. T. Ono. X. Li, H. Miyashita, M. Esashi. Mass sensing of adsorbed molecules in sub-picogram sample with ultrathin silicon resonator // *Rev. Sci. Instrum.*, – 2003, – Vol.74, – No.3, 1240-1243.
10. B. Ilic. Using a nanomechanical cantilever and atomic force microscopy to measure bacterial cell mass // *Microscopy and Analysis*, – 2003, – p.9.
11. P.G. Datskos, T. Thundat, N.V. Lavrik. Micro and Nanocantilever Sensors // *Encyclopedia of Nanoscience and Technology, American Publishers*, – 2004, – Vol.5, – pp.551-560.
12. S. Timoshenko. Analysis of bi-metal thermostats // *J. Opt. Soc. Am.*, – 1925, – Vol.11, – pp.233-255.
13. F.M. Battiston, J.-P. Ramsteyer, H.P. Lang, M.K. Baller, C. Gerber, G.K. Gimzewski, E. Meyer, H.-J. Guntherodt. A chemical sensor based on a microfabricated cantilever array with simultaneous resonance – frequency and bending readout // *Sensors and Actuators B Chemical*, – 2001, – Vol.77, – pp.122-131.
14. T. Naik, E.K. Longmire, S.C. Mantell. Dynamic response of a cantilever in liquid a solid wall // *Sensors and Actuators A Physics*, – 2003, – Vol.102, – No.3, – pp.240-254.
15. G.A. Kiselev, I.V. Yaminsky, G.F. Tereshenko. Chemical sensor on the basis of atomic force microscope // *Third International Symposium "Molecular Design and Synthesis of Supramolecular Architectures"*, Казань, Россия, – 2004, – стр.102.
16. Г.А. Киселев, Д.В. Багров, П.В. Горелкин, И.В. Яминский. Сенсор на основе атомно-силового микроскопа // *Сенсор*, – 2005, – No.4, – сс.22-26.

17. N.V. Lavrik, P.G. Datskos. Femtogram mass detection using photothermally actuated nanomechanical resonators // *Appl. Phys. Lett.*, – 2003, – Vol.16, – No.82, – pp.2697-2699.
18. S. Cherian, T. Thundat. Determination of adsorption-induced variation in the spring constant of a microcantilever // *Appl. Phys. Lett.*, – 2002, – Vol.80, – No.12, – pp.2219-2221.
19. A.L. Dring, B.E. Jones. Integrated on-line multisensing of fluid flow using a mechanical resonator // *Sensors and Actuators*, – 2000, – Vol.85, – No.1, – pp.275-279.
20. B.H. Kim, F.E. Prins, D.P. Kern, S.Raible, U. Weimar. Multicomponent analysis and prediction with a cantilever array based gas sensor // *Sensors and Actuators B Chemical*, – 2000 – Vol.78, – No.1, – pp.12-18.
21. M.L. Roukes. Nanoelectromechanical System // *Technical Digest of the 2000 Solid-State Sensor and Actuator Workshop, Hilton Head Isl., SC*, – 2000, – Vol.6, – pp.1-10.
22. Z.J. Davis, G. Abadal, B. Helbo, O. Hansen, F. Campabadal, F. Pérez-Murano, J. Esteve, E. Figueras, J. Verd, N. Barniol. Monolithic integration of mass sensing nano-cantilevers with CMOS circuitry // *Sensors and Actuators A physics*, – 2003, – Vol.105, – No.3, – pp.311-319.
23. Егоров А.М., Осипов А.П., Дзантиев Б.Б., Гаврилова Е.М. Теория и практика иммуноферментного анализа // *Высшая школа, Москва*, – 1991, – 288 с.
24. S. Sundararajan, B. Bhushan. Topography-induced contributions to friction forces measured using an atomic force friction force microscope // *J. Appl. Phys.*, – 2000, – Vol.88, – No.8, – pp.4825-4831.
25. L.B. Sharos, A. Ramana, S. Crittenden, R. Reifenger. Enhanced mass sensing using torsional and lateral resonances in microcantilevers // *J. Appl. Phys. Lett.*, – 2004, – Vol.84, – No.23, – pp.4638-4640.
26. D. Dragoman, M. Dragoman. Terahertz field characterization using Fabry-Perot-like cantilevers // *J. Appl. Phys. Lett.*, – 2001, – Vol.79, – No.5, – pp.581-583.
27. D. R. Baselt, G.U. Lee, K.M. Hansen, L.A. Chrisey, R.J. Colton. A High-Sensitivity Micromachined Biosensor // *Proceedings of the Ieee*, – 1997, – Vol.85, – No.4, – pp.672-680.
28. M.S. Kulomaa, H.A. Elo, P.J. Tuohimaa. A Radioimmunoassay for Chicken Avidin comparison with a biotin-binding method // *Biochem. J.*, – 1978, – Vol.175, – No.2, – pp.685-690.
29. T. A. Betts, C.A. Tipple, M.J. Sepaniak, P.G. Datskos. Selectivity of chemical sensors based on micro-cantilevers coated with thin polymer films // *Anal. Chim. Act.*, – 2000, – Vol.422, – No.1, – pp.89-99.
30. M. Toda, A.N. Itakura, K. Beuscher, K. Graf, R. Berger. Surface stress of polyelectrolyte adsorption measured by micromechanical cantilever sensors // *e-J. Surf. Sci. Nanotech.*, – 2006, – Vol.4, – pp.96-99.
31. M.K. Baller, H.P. Lang, J. Fritz, Ch. Gerber, J.K. Gimzewski, U. Drechsler, H. Rothuizen, M. Despont, P. Vettiger, F.M. Battiston, J.P. Ramseyer, P. Fornaro, E. Meyer, H.-J. Güntherodt. A cantilever array-based artificial nose // *Ultramicroscopy*, – 2000, – Vol.82, – pp.1-9.
32. J.Z. Hilt, A.K. Gupta, R. Bashir, N.A. Peppas. Ultrasensitive biomems sensors based on patterned with environmentally responsive hydrogels // *Biomedical Microdevices*, – 2003, – Vol.5, – No.3, – pp.177-184.

33. J. Fritz, M. K. Baller, H.P. Lang, T. Strunz, E. Meyer, H.-J. Guntherodt, E. Delamarche, C. Gerber, J.K. Gimzewski. Stress at the Solid-Liquid Interface of Self-Assembled Monolayers on Gold Investigated with a Nanomechanical Sensor // *Langmuir*, – 2000, – Vol.16, – No.25, – pp.9694-9696.
34. R. Berger, E. Delamarche, H. P. Lang, C. Gerber, J.K. Gimzewski, E. Meyer, H.-J. Guntherodt. Surface stress in the self-assembly of alkanethiols on gold probed by a force microscopy technique // *J. Appl. Phys. A*, – 1998, – Vol.66, – No.55.
35. M. Godin, O. Laroche, V. Tabard-Cossa, L.Y. Beaulieu, P. Grutter. Combined in situ micromechanical cantilever-based sensing and ellipsometry // *Rew. of Sci. Inst.*, – 2003, – Vol.74, – No.11, – pp.4902-4907.
36. J. H. Fendler. Chemical Self-assembly for Electronic Applications // *Chem. Mater.*, – 2001, – Vol.13, – No.10, – pp.3196-3210.
37. D.W. Carr, S. Evoy, L. Sekaric, H.G. Craighead, J.M. Parpia. Measurement of mechanical resonance and losses in nanometer scale silicon wires // *J. Appl. Phys. Lett.*, – 1999, – Vol.75, – No.7, – pp.920-922.
38. R. L. Johnson. Characterization of piezoelectric ZnO thin films and the fabrication of piezoelectric micro-cantilevers // *PhD Iowa State University Ames*, 2005.
39. D.L. Devoe, A.P. Pisano. Modeling and Optimal Design of Piezoelectric Cantilever Microactuators // *J. of Microelectrochemical System*, – 1997, – Vol.6, – No.3, – pp.266-270.
40. B. Piekarski, D.L. Devoe, M. Dubey, R. Kaul, J. Conrad. Surface micromachined piezoelectric resonant beamfilters // *Sensors and Actuators A Physics*, – 2001, – Vol.91, – No.3, – pp.313-320.
41. F. J. Giessibl. High-speed force sensor for force microscopy and profilometry utilizing a quartz tuning fork // *Appl. Phys. Lett.*, – 1998, – Vol.73, – No.26, – pp.3956-3958.
42. T.L. Porter, M.P. Eastman, D.L. Pace, M. Bradley. Sensor based on piezoresistive microcantilever technology // *Sensors and Actuators A Physical*, – 2001, – Vol.88, – No.1, – pp.47-51.
43. J. Thaysen, A. Boisen, O. Hansen, S. Bouwstra. Atomic force microscopy probe with piezoresistive read-out and a highly symmetrical Wheatstone bridge arrangement // *Sensors and Actuators A Physical*, – 2000, – Vol.83, – No.1, – pp.47-53.
44. R. Berger, J.-H. Fabian. Thermal Analysis of Nanogram Quantities Using a Micromechanical Cantilever Sensor // *Manuscript for 30th Conference on Thermal Analysis and Applications, Pittsburgh, USA*, – 2002, – pp.68-73.
45. Z.J. Davis, G. Abadal, B. Helbo, O. Hansen, F. Campabadal, F. Pérez-Murano, J. Esteve, E. Figueras, R. Ruiz, N. Barniol, A. Boisen. High Mass and Spatial Resolution Mass Sensor based on Resonating Nano-Cantilevers Integrated with CMOS // *The 11th International Conference on Solid-State Sensors and Actuators*, Munich, Germany, – 2001, – pp.72-75.
46. J.G. Simmons. Generalized formula for the electronic tunnel effect between similar electrodes separated by a thin insulating film // *J. Appl. Phys.*, – 1963, – Vol.34, – No.6, – pp.1793-1803.
47. P.G. Datskos, T. Thundat. Nanocantilever Signal Transduction by Electron Transfer // *J. of Nanoscience and Nanotechnology*, – 2002, – Vol.2, – pp.369-372.
48. D. Dilella, L.J. Whitman, R.J. Colton, T.W. Kenny, W.J. Kaiser, E.C. Vote, J.A. Podosek, L.M. Miller. A micromachined magnetic-field sensor based on an electron

- tunneling displacement transducer // *Sensors and Actuators*, – 2000, – Vol.86, – No.1, – pp.8-20.
49. C.A. Savran, T.P. Burg, J. Fritz, S.R. Manalis. Microfabricated mechanical biosensor with inherently differential readout // *Appl. Phys. Lett.*, – 2003 – Vol.83, – No.8, – pp.1659-1661.
  50. A. Majumdar, J. Lai, M. Chandrachood, O. Nakabeppu, Y. Wu, Z. Shi. Thermal imaging by atomic force microscopy using thermocouple cantilever probes // *Rev. Sci. Instrum.*, – 1995, – Vol.66, – No.6, – pp.3584-3592.
  51. R. Berger, C. Gerber, H.-P. Lang, J.K. Gimzewski. Micromechanics: A Toolbox for Femtoscale Science: «Towards a Laboratory on a Tip» // *Microelectronic Engineering*, – 1997, – Vol.35, – No.1, – pp.373-379.
  52. V. Tabard-Cossa, M. Godin, L.Y. Beaulieu, P. Grutter. A differential microcantilever-based system for measuring surface stress changes induced by electrochemical reactions // *Sensors and Actuators B*, – 2005, – Vol.107, – No.1, – pp.233-241.
  53. M. Su, V.P. Dravid. Surface Combustion Microengines Based on Photocatalytic Oxidations of Hydrocarbons at Room Temperature // *Nano Letters*, – 2005, – Vol.5, – No.10, – pp.2023-2028.
  54. P. Dutta, L.R. Senesac, N.V. Lavrik, P.G. Datskos, M.J. Sepaniak. Signatures for Nanostructured, Optically-Probed, Functionalized Microcantilever Sensing Arrays // *Sensor Lett.*, – 2004, – Vol.2, – No.3-4, – pp.238-245.
  55. I. Yaminsky, P. Gorelkin, G. Kiselev. Concurrence of Intermolecular Foci in Monolayers // *Japanese Journal of Applied Physics*, – 2006, – Vol.45, – No.3B, – pp.2316-2318.
  56. M. Yue, J.C. Stachowiak, A. Majumdar. Cantilever Arrays for Multiplexed Mechanical Analysis of Biomolecular Reactions // *Mechanics and Chemistry of Biosystems*, – 2004, – Vol.1, – No.3, – pp.211-220.
  57. M. Godin, P.J. Williams, V. Tabard-Cossa, O. Laroche, L.Y. Beaulieu, R.B. Lennox, P. Grutter. Surface Stress, Kinetics, and Structure of Alkanethiol Self-Assembled Monolayers // *Langmuir*, – 2004, – Vol. 20, – No.17, – pp.7090-7096.
  58. A.G. Hansen. In Situ Scanning Tunneling Microscopy and Microcantilever Investigations of yeast cytochrome c on gold. // *Ph.D. Department of Chemistry Technical University, Denmark*, – 2002.
  59. N.V. Lavrik, C.A. Tipple, M.J. Sepaniak, P.G. Datskos. Gold nano-structured for transduction of biomolecular interactions into micrometer scale movements // *Biomedical Microdevices*, – 2001, – Vol.3, – No.1, – pp.35-44.
  60. B. C. Fagan, C.A. Tipple, Z. Xue, M.J. Sepaniak, P.G. Datskos. Modification of microcantilever sensors with sol-gels to enhance performance and immobilize chemically selective phases // *Talanta*, – 2000, – Vol.3, – No.3, – pp.599-608.
  61. C.A. Savran, A.W. Sparks, J. Sihler, J. Li, W.-C. Wu, D.E. Berlin, T.P. Burg, J. Fritz, M.A. Schmidt, S.R. Manalis. Fabrication and Characterization of a Micromechanical Sensor for Differential Detection of Nanoscale Motions // *J. of Microelectromechanical Systems*, – 2002, – Vol.11, – No.6, – pp.703-708.
  62. M. Lutwyche, C. Andreoli, G. Binnig, J. Brugger, U. Drechsler, W. Haberle, H. Rohrer, H. Rothuizen, P. Vettiger, G. Yaralioglu, C. Quate. 5X5 2D AFM cantilever arrays a first step towards a Terabit storage device // *Sens. and Act.*, – 1999, – Vol.73, – No.1, – pp.89-94.

63. H.P. Lang, M. Hegner, C. Gerber. Cantilever array sensors // *Material today*, – 2005, – Vol.8, – pp.30-36.
64. F. Quist, V. Tabard-Cossa, A. Badia. Nanomechanical Cantilever Motion Generated by a Surface-Confined Redox Reaction // *J. Phys. Chem. B*, – 2003 – Vol.107, – No.39, – pp.10691-10695.
65. H.M. Schessler, D.S. Karpovich, G.J. Blanchard. Quantitating the Balance between Enthalpic and Entropic Forces in Alkanethiol/Gold Monolayer Self Assembly // *Am. Chem. Soc.*, – 1996, – Vol.118, – No.40, – pp.9645-9651.
66. A. Bietsch, J. Zhang, M. Hegner, H.-P. Lang, C. Gerber. Rapid functionalization of cantilever array sensors by inkjet printing Nanotechnology // *Nanotechnology*, – 2004, – Vol.15, – No.8, – pp.873-880.
67. P.G. Datskos, N.V. Lavrik, M.J. Sepaniak. Detection of Explosive Compounds with the Use of Microcantilevers with Nanoporous Coatings // *Sensor Lett.*, – 2003, – Vol.1, – No.1, – pp.25-32.
68. C. Hagleitner, A. Hierlemann, D. Lange, A. Kummer, N. Kerness, O. Brand, H. Baltes. Smart single-chip gas sensor microsystem // *Nature*, – 2001, – Vol.414, – No.6861, – pp.293-296.
69. F. Schreiber, A. Eberhardt, T.Y.B. Leung, P. Schwartz, S.M. Wetterer, D.J. Lavrich, L. Berman, P. Fenter, P. Eisenberger, G. Scoles. Adsorption mechanisms, structures, and growth regimes of archetypal self-assembling system: decanethiol on Au(111) // *Phys. Rev. B*, – 1998, – Vol.57, – No.19, – pp.12476-12481.
70. L.A. Pinnaduwege, V. Boiadjev, J. E. Hawk, T. Thundat. Sensitive detection of plastic explosives with self-assembled monolayer-coated microcantilevers // *Appl. Phys. Lett.*, – 2003, – Vol.83, – No.7, – pp.1471-1473.
71. K.A. Peterlinz, R. Georgiadis. In Situ Kinetics of Self-Assembly by Surface Plasmon Resonance Spectroscopy Langmuir // *Langmuir*, – 1996, – Vol.12, – No.20, – pp.4731-4740.
72. M. Helm, J. J. Servant, F. Saurenbach, R. Berger. Read-out of micromechanical cantilever sensors by phase shifting interferometry // *Appl. Phys. Lett.*, – 2005, – Vol.87, – No.6, – pp.64101-64103.
73. G. Yang, G. Liu. New Insights for Self-Assembled Monolayers of Organothiols on Au(111) Revealed by Scanning Tunneling Microscopy // *J. Phys. Chem. B*, – 2003, – Vol.107, – No.34, – pp.8746-8759.
74. J. Brugger, M. Despont, C. Rossel, H. Rothuizen, P. Vettiger, M. Willemin. Microfabricated ultrasensitive piezoresistive cantilevers for torque magnetometry // *Sensors and Actuators*, – 1999, – Vol.73, – No.3, – pp.235-242.
75. P.G. Datskos, I. Sauers. Detection of 2-mercaptoethanol using gold-coated micromachined cantilevers // *Sensors and Actuators B*, – 1999, – Vol.61, – No.1, – pp.75-82.
76. R. Raiteri, H.-J. Butt, M. Changes in surface stress at the liquid-solid interface measured with a microcantilever // *Grattarola Electrochimica Acta*, – 2000, – Vol.46, – No.3-4, – pp. 157-163.
77. H.-F. Ji, K.M. Hansen, Z. Hu, T. Thundat. Detection of pH variation using modified microcantilever sensors // *Sensors and Actuators B*, – 2001, – Vol.72, – No.3, – pp.233-238.

78. H.-F. Ji, E. Finot, R. Dabestani, T. Thundat, G. M. Brown, P. F. Britt. A novel self-assembled monolayer (SAM) coated microcantilever for low level caesium detection // *Chem. Commun.*, – 2000, – pp.457-458.
79. H.-F. Ji, T. Thundat, R. Dabestani, G.M. Brown, P.F. Britt, P.V. Bonnesen. Ultrasensitive Detection of CrO4<sup>2-</sup> Using Microcantilever Sensor // *Anal. Chem.*, – 2001, – Vol.73, – No.7, – pp.1572-1576.
80. A.M. Moulin, S.J. O'Shea, R.A. Badley, P. Doyle, M.E. Welland. Measuring Surface-Induced Conformational Changes in Proteins // *Langmuir*, – 1999, – Vol.15, – pp.8776-8779.
81. А.А. Карякин, Е.А. Уласова, М.Ю. Вагин, Е.Е. Карякина. Биосенсоры: устройство, классификация и функциональные характеристики // *Сенсор*, – 2002, – No.1, – сс.16-24.
82. H.-F. Ji, X. Yan, M.J. McShane. Experimental and theoretical aspects of glucose measurement using a microcantilever modified by enzyme-containing polyacrylamide // *Diabetes Technol. Ther.*, – 2005, – Vol.7, – No.6, – pp.986-995.
83. X. Yan, X.K. Xu, H.-F. Ji. Glucose oxidase multilayer modified microcantilevers for glucose measurement // *Anal. Chem.*, – 2005, – Vol.77, – No.19, – pp.6197-6204.
84. J. Pei, F. Tian, T. Thundat. Glucose biosensor based on the microcantilever // *Anal. Chem.*, – 2004, – Vol.76, – No.2, – pp.292-297.
85. A. Subramanian, P.I. Oden, S.J. Kennel, K.B. Jacobson, R.J. Warmack, T. Thundat, M.J. Doktycz. Glucose biosensing using an enzyme-coated microcantilever // *Appl. Phys. Lett.*, – 2002, – Vol.81, – No.2, – pp.385-387.
86. N. Nugaeva, K.Y. Gfeller, N. Backmann, H.P. Lang, M. Duggelin, M. Hegner. Micromechanical cantilever array sensors for selective fungal immobilization and fast growth detection // *Biosensors and Bioelectronics*, – 2005, – Vol.21, – pp. 849-856.
87. J. Tamayo, A.D.L. Humphris, A.M. Malloy, M.J. Miles. Chemical sensors and biosensors in liquid environment based on microcantilevers with amplified quality factor // *Ultramicroscopy*, – 2001, – Vol.86, – No.1-2, – pp.167-173.
88. W. Guanghua, H. R. Datar, K.M. Hansen, T. Thundat, R.J. Cote, A. Majumdar. Bioassay of prostate-specific antigen (PSA) using microcantilevers // *Nature Biotechnology*, – 2001, – Vol.19, – pp.856-860.
89. R. Raiteri, M. Grattarola, H.-J. Butt, P. Skladal. Micromechanical cantilever-based biosensors // *Sensors and Actuators B*, – 2001, – Vol.79, – No.2, – pp.115-126.
90. C. Grogan, R. Raiteri, G.M. O'Connor, T.J. Glynn, V. Cunningham, M. Kane, M. Charlton, D. Leech. Characterisation of an antibody coated microcantilever as a potential immuno-based biosensor // *Biosensors & Bioelectronics*, – 2002, – Vol.17, – pp.201-207.
91. Y. Arntz, J.D. Seelig, H.P. Lang, J. Zhang, P. Hunziker, J.P. Ramseyer, E. Meyer, M. Hegner, Ch. Gerber. Label-free protein assay based on a nanomechanical cantilever array // *Nanotechnology*, – 2003, – Vol.14, – pp.86-90.
92. P. Dutta, C.A. Tipple, N.V. Lavrik, P.G. Datskos, H. Hofstetter, O. Hofstetter, M.J. Sepaniak. Enantioselective Sensors Based on Antibody-Mediated Nanomechanics // *Analytical Chemistry*, – 2003, – Vol.75, – No.10, – pp.2342-2348.
93. M. Su, S. Li, V.P. Dravid. Microcantilever resonance-based DNA detection with nanoparticle probes // *Appl. Phys. Lett.*, – 2003, – Vol.82, – No.20, – pp.3562-3564.

94. J. Fritz, M.K. Baller, H.P. Lang, H. Rothuizen, P. Vettiger, Meyer, H.-J. Guntherodt, Ch. Gerber, J.K. Gimzewski. Translating Biomolecular Recognition into Nanomechanics // *Science*, – 2000, – Vol. 288, – pp. 316-318.
95. R. Marie, H. Jensenius, J. Thaysen, C. B.Christensen, A. Boisen. «Adsorption kinetics and mechanical properties of thiol-modified DNA-oligos on gold investigated by microcantilever sensors // *Ultramicroscopy*, – 2002, – Vol.91, – pp.29-36.
96. M. Yang, H.C.M. Yau, H.L. Chan. Adsorption kinetics and ligand-binding properties of thiol-modified double stranded DNA on a gold surface // *Langmuir*, – 1998, – Vol.14, – pp.6121-6129.
97. G. Wu, H. Ji, K. Hansen, T. Thundat, R. Datar, R. Cote. M.F. Hagan, A.K. Chakraborty, A. Majumdar. Origin of nanomechanical cantilever motion generated from biomolecular interactions // *PNAS*, – 2001, – Vol.98, – No.4, – pp.1560-1564.
98. R. McKendry, J. Zhang, Y. Arntz, T. Strunz, M. Hegner, H. P. Lang, M.K. Baller, U. Certa, E. Meyer, H.-J. Guntherodt, C. Gerber. Multiple label-free biodetection and quantitative DNA-binding assays on a nanomechanical cantilever array // *PNAS*, – 2002, – Vol.99, – No.15, – pp.9783-9788.
99. M. F. Hagan, A. Majumdar, A.K. Chakraborty. Nanomechanical Forces Generated by Surface Grafted DNA // *J. Phys. Chem. B*, – 2002, – Vol.106, – pp.10163-10173.
100. F. Liu, Y. Zhang, Z.-C. Ou-Yang. Flexoelectric origin of nanomechanic deflection in DNA-microcantilever system, *Biosensors and Bioelectronics*, – 2003, – Vol.18, – pp.655-660.
101. K.M. Hansen, H.-F. Ji, G. Wu, R. Datar, R. Cote, A. Majumdar, T. Thundat., Cantilever-based optical deflection assay for discrimination of DNA single-nucleotide mismatches // *Anal. Chem.* – 2001, – Vol. 73, – No. 7, – pp.1567-1571.
102. V. T. Moy, E.L. Florin, H.G. Gaub. Intermolecular forces and energies between ligands and receptors // *Science*, – 1994, – Vol. 266, – pp.257-259.
103. K.Y. Gfeller, N. Nugaeva, M. Hegner. Rapid Biosensor for Detection of Antibiotic-Selective Growth of *Escherichia coli* // *Applied and Environmental microbiology*, – 2005, – Vol.71, – No.5, – pp.2626-2631.
104. K.Y. Gfeller, N. Nugaeva, M. Hegner. Micromechanical oscillators as rapid biosensor for the detection of active growth of *Escherichia coli* // *Biosensors and Bioelectronics*, – 2005, – Vol.21, – pp.528-533.
105. 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, – pp.3194-3198.
106. H.-F. Ji, T. Thundat. In situ detection of calcium ions with chemically modified microcantilevers // *Biosensors & Bioelectronics*, – 2002, – Vol.17, – pp.337-343.
107. X. Xu, T. Thundat, G.M. Brown, H.-F. Ji. Detection of Hg<sup>2+</sup> using microcantilever sensors // *Anal. Chem.*, – 2002, – Vol.74, – No.15, – pp.3611-3615.
108. H.-F. Ji, Y. Zhang, V.V. Purushotham, S. Kondu, B. Ramachandran, T. Thundat, D.T. Haynie. 1,6-Hexanedithiol monolayer as a receptor for specific recognition of alkylmercury // *Analyst*, – 2005, – Vol.130, – pp.1577-1579.
109. K. Liu, H.-F. Ji. Detection of Pb<sup>2+</sup> using a hydrogel swelling microcantilever sensor // *Anal. Sci.*, – 2004, – Vol. 20, – No.1, – pp.9-11.

110. Y. Zhang, H.-F. Ji, G.M. Brown, T. Thundat. Detection of  $\text{CrO}_4^{(2-)}$  using a hydrogel swelling microcantilever sensor // *Anal. Chem.*, – 2003, – Vol.75, – No.18, – pp.4773-4777.
111. B. Ilic, Y. Yang, H.G. Craighead. Virus detection using nanoelectromechanical devices // *Appl. Phys. Lett.*, – 2004, – Vol.85, – No.13, – pp.2604-2606.
112. A. Gupta, D. Akin, R. Bashir. Single virus particle mass detection using microresonators with nanoscale thickness // *Appl. Phys. Lett.*, – 2004, – Vol.84, – No.11, – pp.1976-1978.
113. J. Zlatanova, S.M. Lindsay, S.H. Leuba. Single Molecule Force Spectroscopy in Biology Using the Atomic Force Microscope // *Prog. Biophys. Mol. Biol.*, – 2000, – Vol.74, – pp.37-61.
114. X. Jiang, C. Z. Yang, K. Tanaka, A. Takahara, T. Kajiyama. Effect of chain end group on surface glass transition temperature of thin polymer film // *Physics Letters A*, – 2001, – Vol.281, – pp.363-367.
115. Y. Sugawara, T. Ishizaka, S. Morita, S. Imai, N. Mikoshiba. Simultaneous observation of atomically resolved AFM/STM images of a graphite surface // *Jpn. J. Appl. Phys.*, – 1990, – Vol.29, – No.1, – pp.L157- L159.
116. T. Hochwitz, A.K. Henning, C. Levery. Imaging integrated circuit dopant profiles with force-based scanning Kelvin probe microscope // *J. Vac. Sci. Technol. B*, – 1996, – Vol.14, – No.1, – pp.440-446.
117. J.J. Saens, N. Garcia, P. Grutter, E. Meyer, H. Heinzelmann, R. Wiezendanger, L. Rosenthaler, H.R. Hidber, and H.J. Guntherodt. Observation of magnetic forces by the atomic force microscope // *J. Appl. Phys.*, – 1987, – Vol.63, – pp.4293-4295.
118. Е.В. Дубровин. Зондовая микроскопия биомакромолекул: нуклеиновых кислот, белков и их комплексов // *Диссертация на соискание ученой степени канд. физ.-мат. наук*, МГУ, – 2005, – 112с.
119. Y. Martin, H.K. Wickramasinghe. Magnetic imaging by "force microscopy" with 1000-Å resolution // *Appl. Phys. Lett.*, – 1987, – Vol.50, – No.20, – pp.1455-.
120. T.V. Ratto, K.C. Langry, R.E. Rudd, R.L. Balhorn, M.J. Allen, M.W. McElfresh. Force Spectroscopy of the Double-Tethered Concanavalin-A Mannose Bond // *Biophysical Journal*, – 2004, – Vol.86, – pp.2430-2437.
121. O.H. Willemsen, M.E. Snel, A. Cambi, J. Greve, B.G. De Grooth, C.G. Figdor. Bimolecular Interactions Measured by Atomic Force Microscopy // *Biophysical Journal*, – 2000, – Vol.79, – pp.3267-3281.
122. R. Tycko. Insights into the Amyloid Folding Problem from Solid-State NMR // *Biochemistry*, – 2003, – Vol.42, – No.11, – pp.3151-3159.
123. T. Strunz, K. Oroszlan, R. Schafer, H.-J. Guntherodt. Dynamic force spectroscopy of single DNA molecules // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, – 1999, – Vol.96, – pp.11277-11282.
124. K.L. Ekinci, Y.T. Yang, M.L. Roukes. Ultimate limits to inertial mass sensing based upon nanoelectromechanical systems // *J. Appl. Phys.*, – 2004, – Vol. 95, – No. 5, – pp. 2682-2689.
125. C.P. Green, J.E. Sader. Torsional frequency response of cantilever beams immersed in viscous fluids with applications to the atomic force microscope // *J. Appl. Phys.*, – 2002, – Vol.92, – No.10, – pp.6262-6274.



126. M.C. Coen, R. Lehmann, P. Groning, M. Biemann, C. Galli, L. Schlapbach. Adsorption and Bioactivity of Protein A on Silicon Surfaces Studied by AFM and XPS // *Journal of Colloid and Interface Science*, – 2001, – Vol.233, – pp.180-189.
127. Э.П. Медянцева, Б.В. Халдеева, Г.К.Будников. Иммуносенсоры в биологии и медицине: аналитические возможности, проблемы и перспективы // *Журн. анал. химии*, – 2001, – том 56, – №10, – сс.1015-1031.
128. E. Carnes, E. Wilkins. The Development of A New, Rapid, Amperometric Immunosensor for the Detection of Low Concentrations of Bacteria Part I: Design of the Detection System and Applications // *American Journal of Applied Sciences*, – 2005, – Vol.2, – No.3, – pp.597-606.
129. M.S. Wilson, R.D. Rauh. Novel amperometric immunosensors based on iridium oxide matrices // *Biosensors and Bioelectronics*, – 2004, – Vol.19, – pp.693-699.
130. A.A. Suleiman, Y. Xu. An Amperometric immunosensor for cocaine // *Electroanalysis*, – 1998, – Vol.10, – No.4, – pp.240-243.
131. J. Parellada, A. Narvaez, M.A. Lopez, E. Domingueza, J.J. Fernandez, V. Pavlov, I. Katakis. Amperometric immunosensors and enzyme electrodes for environmental applications // *Analytica Chimica Acta*, – 1998, – Vol.362, – pp.47-57.
132. P. Skládal, M. Fiala, J. Krejčí, Detection of pesticides in the environment using biosensors based on cholinesterases // *Int. J. Environ. Anal. Chem.*, – 1996, – Vol.65, – pp.139-148.
133. M.F. Ylaev, R.A. Sitdikov, N.M. Dmitrieva, E.V. Yazynina, A.V. ZHerdev, B.B. Dzantiev. Development of a potentiometric immunosensor for herbicide simazine and its application for food testing // *Sensors and Actuators B*, – 2001, – Vol.75, – pp.129-135.
134. J.E. Martin. Composite films for modifying evanescent wave characteristics in long-period grating biosensors // *Thesis submitted to the Faculty of Virginia Polytechnic Institute and State University in partial fulfillment of the requirements for the degree of MASTER OF SCIENCE In Chemical Engineering*, – 2001.
135. D.V. Brown, M.E. Meyerhoff. Potentiometric enzyme channeling immunosensor for proteins // *Biosens Bioelectron*, – 1991. – Vol.6, – No.7, – pp.615-622.
136. D. Jiang, J. Tang, B. Liu, P. Yang, X. Shen, J. Kong. Covalently coupling the antibody on an amine-self-assembled gold surface to probe hyaluronan-binding protein with capacitance measurement // *Biosensors and Bioelectronics*, – 2003, – Vol.18, – pp.1183-1191.
137. M. Kanungo, D.N. Srivastava, A. Kumar, A.Q. Contractor. Conductimetric immunosensor based on poly(3,4-ethylenedioxythiophene) // *Chem. Commun.*, – 2002, – pp.680-681.
138. R.G. Sandberg, L.J. Van-Houten, J.L. Schwartz. A conductive poly mer-based immunosensor for the analysis of pesticide residues. In: *Biosensor Design and Application // ACS Symposium Series 511, Washington D.C.*, – 1992, – pp.81-88.
139. A.L. Ghindilis, P. Atanasov, M. Wilkins, E. Wilkins. Immunosensors: electrochemical sensing and other engineering approaches // *Biosens. Bioelectron*. – 1998, – Vol.13, – No.1, – pp.113-131.
140. N. Nath, M. Eldefrawi, J. Wright, D. Darwin, M. Huestis. A rapid reusable fiber optic biosensor for detecting cocaine metabolites in urine // *J Anal. Toxicol.*, – 1999, – Vol.23, – No.6, – pp.460-467.

141. P.J. Devine, N.A. Anis, J. Wright, S. Kim, A.T. Eldefrawi, M.E. Eldefrawi. A fiber-optic cocaine biosensor // *Anal. Biochem.*, – 1995, – Vol.227, – pp.216-224.
142. G. Sakai, K. Ogata, T. Uda, N. Miura, N. Yamazoe. A surface plasmon resonance-based immunosensor for highly sensitive detection of morphine // *Sens. actuators B*, – 1998, – Vol.45, – No.1, – pp.5-12.
143. G. Sakai, S. Nakata, T. Uda, N. Miura, N. Yamazoe. Highly selective and sensitive spr immunosensor for detection of methamphetamine // *Electrochim. Acta.*, – 1999, – No.21-22, – pp.3849-3854.
144. В. В. Малов // *Пьезорезонансные датчики*, Москва, Энергоатомиздат, – 1989, – 272с.
145. T. Honda, T. Miwatani, Y. Yabushita, N. Koike, K. Okada, A Novel Method To Chemically Immobilize Antibody on Nylon and Its Application to the Rapid and Differential Detection of Two *Vibrio parahaemolyticus* Toxins in a Modified Enzyme-Linked Immunosorbent Assay // *Clinical and diagnostic laboratory immunology*, – 1995, – Vol. 2, – No. 2, – pp.177-181.
146. N. Barie, M. Rapp. Covalent bound sensing layers on surface acoustic wave (SAW) biosensors, *Biosensors & Bioelectronics*, – 2001, – Vol.16, – pp.979-987.
147. K. Kalantar-Zadeh, W. Wlodarski, Y.Y. Chen, B.N. Fry, K. Galatsis. Novel Love mode surface acoustic wave based immunosensors // *Sensors and Actuators B*, – 2003, – Vol.91, – pp.143-147.
148. Г.В. Лисичкин, А.Ю. Фадеев, А.А. Сердан, П.Н. Нестеренко, П.Г. Мингалев, Д.Б. Фурман // *Химия привитых поверхностных соединений.*, Москва, Физматлит, – 2003, – 592с.
149. Стрелков С. П. // *Введение в теорию колебаний*, 2 изд., Москва, – 1964, – 440с.
150. J.E. Sader. Calibration of rectangular atomic force microscope cantilevers // *Rev. Sci. Instrum.*, – 1999, – Vol.70, – No.10, – pp.3967-.
151. J. Zak, H. Yuan, M. Ho, L. K. Woo, M.D. Porter. Thiol-Derivatized Metalloporphyrins: Monomolecular Films for the Electrocatalytic Reduction of Dioxygen at Gold Electrodes // *Langmuir*, – 1993, – Vol.9, – pp.2772-.
152. K.V. Gobi, T. Ohsaka, Enhanced Electrostatic Interactions for Selective and Controllable Permeation of Ionic Species at a Monolayer of Self-Assembled Dicationic Nickel Complex // *J. Electroanal. Chem.*, – 1999, – Vol.465, – pp.177-.
153. M. Haga, H.-G. Hong, Y. Shiozawa, Y. Kawata, H. onjushiro, T. Fukuo, R. Arakawa. Synthesis and Proton-Coupled Electron Transfer Reaction of Self-Assembled Monolayers of Ruthenium(II) Complex Containing Tridentate 2,6-Bis(benzimidazol-2-yl)-pyridine on Gold Surface // *Inorg. Chem.*, – 2000, – Vol.39, – pp.4566-.
154. C.G.F. Cooper, J.C. MacDonald, E. Soto, W.G. McGimpsey. Non-Covalent Assembly of a Photoswitchable Surface // *J. Am. Chem. Soc.*, – 2004, – Vol.126, – pp.1032-.
155. E. Coronado, A. Forment-Aliaga, F.M. Romero. Copper(I) pseudorotaxane monolayers assembled on gold electrodes // *Inorg. Chem.* – 2003, – Vol.42, – pp.6959-.
156. E. Beloglazkina, A. Majouga, N. Zyk, R. Rakhimov, I. Yaminsky, P. Gorelkin, G. Kiselev, A. Kutateladze. Bis-(4-(2-pyridylmethyleneiminophenyl))disulfide — A chelating ligand capable of self assembly on gold surface and its complexes with  $M(\text{BF}_4)_2$  and  $M(\text{ClO}_4)_2$ ; M – Co, Cu and Ni. Experimental and theoretical study // *Thin solid films*, – 2007, – Vol.515, – No.11, – pp.4649-4661.

157. A. Ulman. Self-Assembled Monolayers of 4-Mercaptobiphenyls // *Acc. Chem. Res.*, – 2001, – Vol.34, – pp.855-.
158. А.Ю. Фадеев, А.А. Ельцов, Ю.К. Алешин, С.И. Малышенко, Г.В. Лисичкин. Жидкостной химически модифицированный кварцевый резонатор как иммуносенсор // *Ж. физ. хим.*, – 1994, – том 68, – №2, – сс.2071-2075.
159. L.S. Shlyakhtenko, V.N. Potaman, R.R. Sinden, A.A. Gall and Y.L. Lyubchenko. Structure and dynamics of three-way DNA junctions: atomic force microscopy studies // *Nucleic Acids Research*, – 2000, – Vol.28, – No.18, – pp.3472-3477.
160. J. Homola, S.S. Yee, G. Gauglitz. Surface plasmon resonance sensors: review // *Sens. Actuators B Chem.*, – 1999, – Vol.54, – pp.3-15.
161. K. Bizet, C. Gabrielli, H. Perrot, J. Therasse. Validation of antibody-based recognition by piezoelectric transducers through electroacoustic admittance analysis // *Biosens. Bioelectron.*, – 1998, – Vol.13, – pp.259-269.
162. T. Braun, M. Ghatkesar Krishna, N. Backmann, H.P. Lang, C. Gerber, M. Hegner. Nanomechanical Biosensors for Membrane Proteins // *International Conference on Nanoscience and Technology 2006, Switzerland, Basel*, – 2006.
163. H. Wang, Y. Liu, Y. Yang, T. Deng, G. Shen, R. Yu. A protein A-based orientation-controlled immobilization strategy for antibodies using nanometer-sized gold particles and plasma-polymerized film // *Anal Biochem.*, – 2004, – Vol.324, – No.2, – pp.219-226.
164. N. Backmann, C. Zahnd, F. Huber, A. Bietsch, A. Pluckthun, H.-P. Lang, H.-J. Guntherodt, M. Hegner, C. Gerber. A label-free immunosensor array using single-chain antibody fragments // *PNAS*, – 2005, – Vol.102, – No.41, – pp.14587-14592.
165. Y. Arntz, J.D. Seelig, H.P. Lang, J. Zhang, P. Hunziker, J.P. Ramseyer, E. Meyer, M. Hegner, Ch. Gerber. Label-free protein assay based on a nanomechanical cantilever array // *Nanotechnology*, – 2003, – Vol.14, – pp.86-90.
166. S. Ohnishi, K.Takano. Amyloid fibrils from the viewpoint of protein folding // *Cell. Mol. Life Sci.*, – 2004, – Vol.61, – pp.511-524.
167. J.L. Pellequer, S. Chen, V.A. Roberts, J.A. Tainer, E.D. Getzoff. Unraveling the effect of changes in conformation and compactness at the antibody V(L)-V(H) interface upon antigen binding // *J. Mol. Recognit.*, – 1999, – Vol.12, – No. 4, – pp.267-275.
168. А.С. Филонов, И.В. Яминский, Д.Ю. Гаврилко, Программное обеспечение для обработки трехмерных изображений "ФемтоСкан Онлайн", Москва, Центр перспективных технологий, – 2005, – 89с.
169. А.С. Филонов, И.В. Яминский. Руководство пользователя пакета программного обеспечения для управления сканирующим зондовым микроскопом и обработки изображений "ФемтоСкан Онлайн", Москва, Центр перспективных технологий, – 2006, – 103 с.
170. Eremenko A.V., Bauer Ch.G., Makower A., Kanne B., Baumgarten H., Scheller F.W. The development of a non-competitive immunoenzymometric assay (IEMA) of cocaine. // *Anal. Chim. Acta.* 1998. V. 358. №1. P. 5-13.
171. He Y.-N., Chen H.-Y., Zheng J.-J., Zhang G.-Y., Chen Z.-L. Differential pulse voltammetric enzyme-linked immunoassay for the determination of helicobacter pylori specific immunoglobulin G (IgG) antibody. // *Talanta.* 1997. V. 44. №5. P. 823-830.
172. Halámek J. Makower A., Skládal P., Scheller F.W. Highly sensitive detection of cocaine using a piezoelectric immunosensor. // *Biosens. and Bioelectron.* 2002. V. 17. P. 1045-1050.

## ПРИЛОЖЕНИЕ А

УТВЕРЖДЕНО  
Декан физического факультета МГУ  
\_\_\_\_\_ В.И. Трухин  
« 15 » октября 2009 г.

### Детализированный План выполнения поисковых научно-исследовательских работ

<b>Детализированный План выполнения поисковых научно-исследовательских работ (ИСПОЛНЕНИЯ ГОСУДАРСТВЕННОГО КОНТРАКТА)</b>			
<b>Номер этапа НИР</b>	<b>Действия Исполнителя при выполнении отдельного вида работ (в соответствии со столбцом 3 Формы 3), изложенные в хронологическом порядке</b>	<b>Дата начала действия</b>	<b>Дата завершения действия</b>
<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>
<b>I</b>	1. Разработка экспериментального образца системы регистрации сверхмалых отклонений кантилеверных датчиков позволяющий проводить мультиплексный анализ газовой или жидкофазной пробы	23.09.2009	15.09.2009
	2. Разработка оптимальной экспериментальной методики контроля натяжения биологических мембран на твердой поверхности, исследования кооперативных взаимодействий в биополимерных пленках	16.09.2009	01.11.2009
	3. Теоретическая оценка пределов чувствительности методов контроля натяжения тонких пленок на твердой поверхности	02.11.2009	25.11.2009
<b>II</b>	1. Создание методик и протоколов подготовки поверхности микрокантилеверов для базовой модификации биополимерными и биокаталитическими слоями.	26.11.2009	01.04.2010
	2. Разработка высокочувствительных кантилеверных сенсоров с оптимизированной отражающей способностью.	02.04.2010	01.07.2010
	3. Создание оптимизированных биокаталитических рецепторов для микрокантилеверных преобразователей применительно к задачам контроля латеральных напряжений внутри тонких биорецепторных пленок	02.07.2010	25.10.2010

Ш	1. Обобщение и оценка результатов исследований биосенсорных систем на основе микрокантилеверных датчиков по сравнению с альтернативными биосенсорными сисетмами.	26.10.2010	01.05.2011
	2. Разработка и создание прототипа микрокантилеверного биосенсора прямого действия (label-free) на конкретные тестовые высокомолекулярные белки (тромбин, пероксидаза хрена и д.р.)	02.05.2011	19.08.2011

## **ПРИЛОЖЕНИЕ Б**

**УТВЕРЖДЕНО**

Декан физического факультета МГУ,  
профессор

В. И. Трухин  
«15» октября 2009 г.

### **МЕТОДИКА КОНТРОЛЯ НАТЯЖЕНИЯ БИОЛОГИЧЕСКИХ МЕМБРАН НА ТВЕРДОЙ ПОВЕРХНОСТИ, ИССЛЕДОВАНИЕ КООПЕРАТИВНЫХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ В БИОПОЛИМЕРНЫХ ПЛЕНКАХ**

Этап 1. Установка микрокантиллеров в держателе прибора .....	<b>86</b>
Этап 2. Настройка прибора для измерения поверхностного натяжения в рецепторе микрокантиллера .....	<b>88</b>
Этап 3. Проведение эксперимента.....	<b>90</b>
Этап 4. Оценка межмолекулярных сил.....	<b>90</b>
Этап 5. Контрольные измерения.....	<b>92</b>
Метрологическое обеспечение .....	<b>93</b>
Характеристика сырья .....	<b>93</b>

*Руководитель работ*

\_\_\_\_\_ *И.В.Яминский*

## Этап 1. Установка микрокантилеверов в держателе прибора

Ключевым звеном системы являются кантилеверы – микроконсоли, модифицированные специальным рецепторным покрытием. Изменение внешних условий приводит к изменению поверхностного натяжения в рецепторной пленке. В результате получившейся разности поверхностных натяжений на двух сторонах консоли (кантилевера) происходит деформация кантилевера. Величина наноперемещений кантилевера определяется с помощью прецизионной лазерно-оптической системы с высокой точностью, чем обеспечивается хорошая чувствительность устройства.

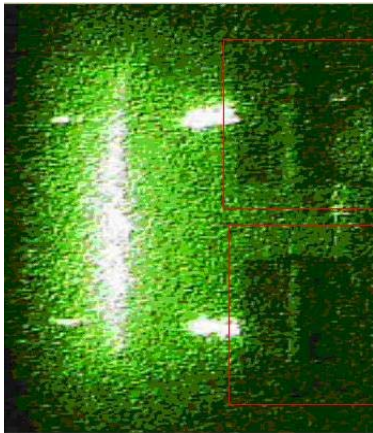
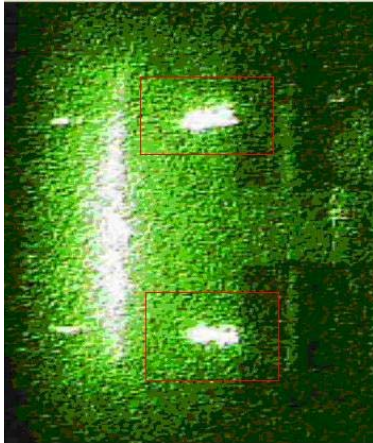
Ниже приведен алгоритм установки кантилеверной системы в прибор. На протяжении всего процесса установки следует помнить, что кантилеверы обладают очень хрупкой консолью, в связи с этим необходимо предотвращать возможность касания консоли с чем-либо.

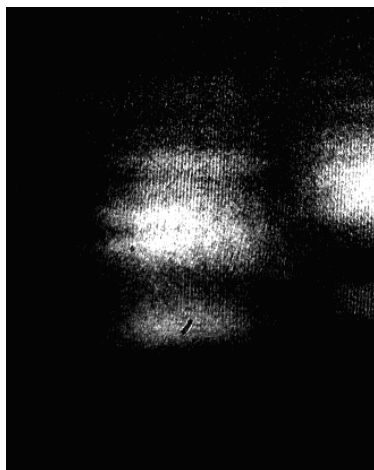
	<p>Необходимо положить держатель на плоскую поверхность так, как показано на рисунке</p>
	<p>Далее нужно ослабить отверткой фиксирующий болт, приподнять пинцетом фиксирующую пластинку, с помощью пинцета аккуратно установить чипы с кантилеверами, используя отвертку и пинцет, закрепить</p>

	<p>чипы с кантилеверами фиксирующей пластиной</p>
	<p>Положить предметное стекло над ячейкой с кантилеверами на специальное силиконовое кольцо, используя отвертку зафиксировать, прижимную пластину.</p>
	<p>Установить ячейку в измерительной системе.</p>

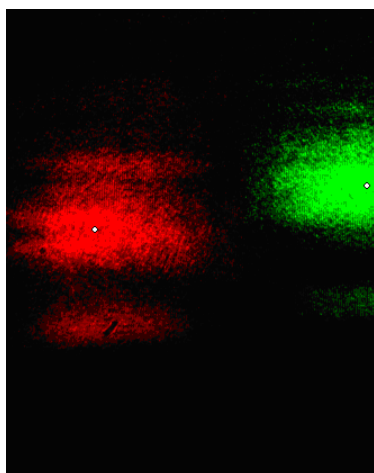


**Этап 2. Настройка прибора для измерения поверхностного натяжения в рецепторе микрокантилевера**

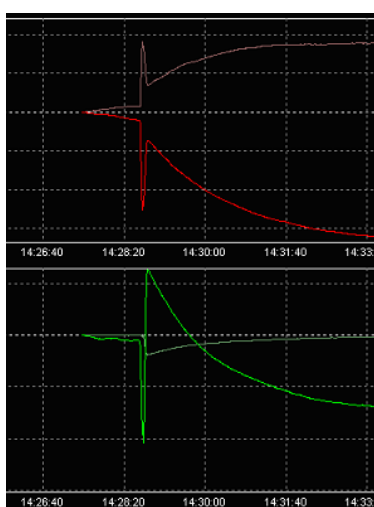
	<p><b>Необходимо установить держател кантилеверов (если он не вставлен) в разработанный прибор. С помощью вмонтированной камеры можно увидеть основания кантилеверов</b></p>
	<p><b>С помощью регулировки управления ходом луча от лазерного источника производится юстировка луча на консолях кантилеверов</b></p>



Используя возможность управления ходом луча, отраженного на детектор, необходимо поймать рефлекс от кантилеверов (пример двух консолей) в верхнем среднем окне



С помощью клиентской программы обработки изображения разделить полученные рефлексы.



В нижнем окне программы обработки изображения находятся графики, соответствующие красному и зеленому рефлексу. Линии меньшей интенсивности соответствуют режиму «Смещение центра масс». Линии большой интенсивности соответствуют режиму «Смещение разности интенсивности». Вид графиков, изображенных на иллюстрации, соответствует величине изгиба

	<b>консоли, т.е. фиксирует увеличение поверхностного натяжения.</b>
--	---

### Этап 3. Проведение эксперимента

После процедуры юстировки системы в жидкостную камеру экспериментального образца измерителя межмолекулярных сил следует ввести буфер в котором белки находятся в нативной конформации (данную информацию можно почерпнуть из литературных данных). После времени установления системы 1 ч. В ячейку следует ввести буфер способствующий изменению конформации молекул. В результате изменения конформации молекул в рецепторе будет изменяться поверхностное натяжение, как правило этот процесс хорошо аппроксимируется изотермами ленгмюра. После выхода сигнала на плато измерения следует прекратить и записать в текстовый файл. В процессе обработки текстового файла необходимо записать максимальное значение отклонения поверхностного натяжения от первоначального состояния до погружения в буфер, изменяющий конформационную структуру белковой пленки.

### Этап 4. Оценка межмолекулярных сил

Для оценки сил межмолекулярных взаимодействий в белках или иммунных комплексах, находящихся в связанном состоянии на поверхности

была принята модель упаковки взаимодействующих субъединиц в монослойной пленке на поверхности. Для определения средней силы парных взаимодействий предполагается, что молекулы, находясь на поверхности в глобулярном состоянии в виде шаров, образуют плотнейшую гексагональную упаковку (рис. 1.) (более плотная упаковка классических объектов невозможна).

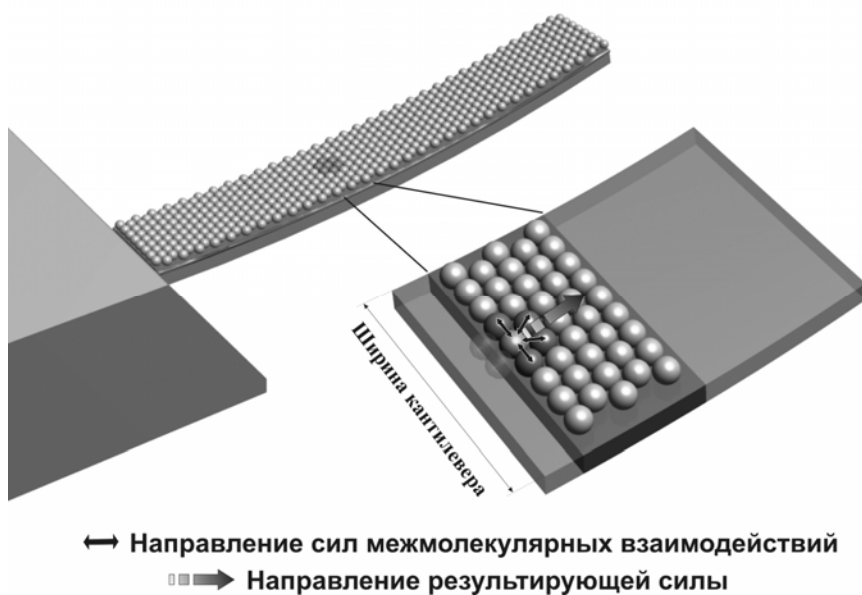


Рис. 1. Модель плотнейшей гексагональной упаковки монослоя белка на поверхности кантилевера. Стрелками указаны направления действия сил межмолекулярных взаимодействий и результирующей силы, дающей вклад в поверхностное натяжение белковой пленки.

Результирующая сила  $F_{рез}$  взаимодействия, приходящаяся на одну молекулу белка, представляющая собой суммарный вклад со стороны двух соседних молекул в эффективное поверхностное натяжение (рис 5.1), рассчитывается по формуле

$$F_{рез} = \sigma d, \quad (1)$$

где  $d$  – характерный линейный размер (диаметр) молекулы,  $\sigma$  – поверхностное натяжение монослойной пленки. При расчете силы взаимодействия двух молекул  $F_2$  учитывалось, что при образовании плотнейшего монослоя, состоящего из белковых глобул, каждая молекула взаимодействует с шестью соседними. Из принятой модели плотнейшей

гексагональной упаковки следует, что результирующая сила  $F_{рез}$  может быть разложена по базису сил парных взаимодействий молекул (рис. 1), тогда

$$F_2 = \frac{F_{рез}}{2 \cos(\pi / 6)}. \quad (2)$$

Применимость данной модели необходимо оценивать (если есть возможность) по результатам атомно-силовой микроскопии поверхности монослойной пленки белка. Модель гексагональной упаковки может дать завышенные значения силы парных взаимодействий, поэтому если имеются достоверные данные о структуре монослоя целесообразно произвести соответствующие изменения в расчетах силы. Например, для модели кубической упаковки (рис. 2.) сила парных взаимодействий  $F_2$  оказывается на 28 % меньше, чем в случае гексагональной.



Рис. 2. Модель кубической упаковки монослоя белка на поверхности кантилевера. Стрелками указаны направления действия сил межмолекулярных взаимодействий и результирующей силы, дающей вклад в поверхностное натяжение белковой пленки.

## Этап 5. Контрольные измерения

Контрольные измерения следует проводить с помощью исследования образцов слюды, модифицированных по аналогичной схеме, что и образцы микрокантилеверных рецепторов. Это делается для того, чтобы оценить

качество рецепторной поверхности и понять можно ли ее считать монослойной или нет.

Первоначально необходимо снять кадр размером 11 мкм<sup>2</sup>. Затем, на этом кадре выбирать область площадью 1х1 мкм<sup>2</sup> и сканируют ее в контактном режиме тем же зондом. После пятикратного прохождения зонда по данной площади, снова снимают кадр размером 11 мкм<sup>2</sup> в прерывистом режиме и измеряют глубину полученного углубления Рис. 2.

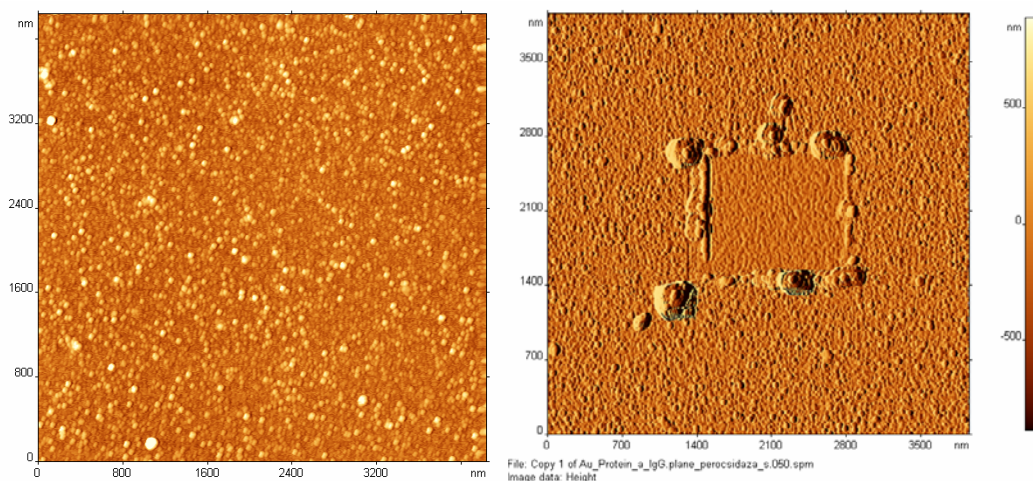


Рис. 3. Образование протертого квадрата в рецепторной пленке

Глубина полученного углубления в слое должна быть не более линейных размеров 1 глобулы белка в нативном состоянии. Погрешность данных измерений должна составлять 0.1 нм.

### Метрологическое обеспечение

Экспериментальный образец измерителя межмолекулярных сил на основе микрокантилеверных преобразователей

Клиентская часть программного обеспечения «Фемтоскан Видеосенс»

Атомно-силовой микроскоп «Фемтоскан»

### Характеристика сырья

1. Кантилеверы CSG 01 с золотым покрытием.

2. Буфер, в котором исследуемый белок имеет нативную конформацию – ЧДА.
3. Буфер, в котором исследуемый белок изменяет конформацию – ЧДА.
4. Золото для вакуумной напылительной установки IR-3 фирмы Eiko Engineering.
5. Слюда.

## **ПРИЛОЖЕНИЕ В**

**УТВЕРЖДАЮ**

Декан физического  
факультета МГУ  
профессор

В.И.Трухин

«19» октября 2009

Эскизная конструкторская документация на экспериментальный образец  
системы регистрации сверхмалых отклонений кантилеверных датчиков

Руководитель работ

И.В. Яминский.

«10» августа 2009

Разработал

Д.В. Колесов

«10» августа 2009

г. Москва



## ПРИЛОЖЕНИЕ Г

УТВЕРЖДЕНО  
Декан физического факультета МГУ  
\_\_\_\_\_ В.И. Трухин  
« 15 » октября 2009 г.

### Отчет о патентных исследованиях

по теме:

### **Биосенсоры на основе микроантилеверов**

Руководитель работ,  
профессор кафедры физики полимеров  
и кристаллов физического факультета МГУ  
имени М.В. Ломоносова

\_\_\_\_\_ И.В. Яминский  
«15» октября 2009 г.

Москва 2009 г

## Список исполнителей

Руководитель НИР,  
Генеральный директор,  
д.ф.-м.н., проф.

«15» октября 2009 г. И.В. Яминский

---

(подпись, дата)

Ответственный  
исполнитель, студент  
физического факультета  
МГУ

«15» октября 2009 г. А.С. Ерофеев

---

(подпись, дата)

## 1. Содержание

<b>Список исполнителей.....</b>	<b>104</b>
<b>Перечень сокращений.....</b>	<b>106</b>
<b>Общие данные об объекте исследований.....</b>	<b>107</b>
<b>Аналитическая часть.....</b>	<b>109</b>
<b>Заключение.....</b>	<b>111</b>
<b>ПРИЛОЖЕНИЕ ГА.....</b>	<b>112</b>
<b>ПРИЛОЖЕНИЕ ГБ.....</b>	<b>113</b>
<b>ПРИЛОЖЕНИЕ ГВ.....</b>	<b>116</b>

## **Перечень сокращений**

МПК (МКИ) - международная патентная классификация (международная классификация изобретений);

НКИ - национальная классификация изобретений;

НТИ - научно-техническая информация;

УДК- универсальная десятичная классификация;

ПВ - патентное ведомство;

БД - база данных;

ФИПС - федеральный институт промышленной собственности;

ЕПВ - европейское патентное ведомство;

ВОИС - всемирная организация интеллектуальной собственности

ПИ - патентные исследования;

ТУ - технические условия;

ПФ - патентный формуляр.

## **Общие данные об объекте исследований**

Работа по разработке биосенсоров на основе микрокантилеверов началась в июле 2009 года. Дата окончания работы - 25 сентября 2009 года.

Микрокантилеверных датчики – микроконсоли, модифицированные специальным рецепторным покрытием. Селективное взаимодействие определяемого вещества с одной из сторон консоли с рецепторным слоем, приводит к изменению поверхностного натяжения в рецепторной пленке. В результате получившейся разности поверхностных натяжений на двух сторонах консоли происходит ее деформация. Величина наноперемещений микрокантилевера определяется с помощью прецизионной лазерно-оптической системы. Отличительной особенностью микромеханических кантилеверных анализаторов от других сенсорных систем является устойчивость к актам неспецифического связывания, обусловленная низкими энергиями неспецифических связей и, следовательно, их незначительному вкладу в поверхностное натяжение рецепторной пленки. Устройство для контроля положения системы микрокантилеверных датчиков, основанное на прецизионной лазерно-оптической системе может определять одновременно положение сразу нескольких микрокантилеверных датчиков. Исследуемый объект может быть использован в качестве экспериментальной базы исследования развития силовых напряжений в мембранах биорецепторов. Система приспособлена к проведению исследований в газовых и жидких средах.

Сенсоры прямого действия (не использующие меток), созданные на базе системы регистрации сверхмалых отклонений микрокантилеверных датчиков при внедрении в медицине должны вытеснить имеющиеся стандартные аналитические методы определения веществ в определенных областях клинической диагностики (экстренной диагностики и прикроватной диагностики), а также восполнить отсутствующие технологические методы за счет:

- увеличения скорости определения веществ по отношению к другим методам анализа;
- сокращения числа циклов анализа до одного (что позволит проводить непрерывный мониторинг);
- способности к фильтрации актов неспецифического связывания при анализе веществ в многокомпонентных средах, таких как кровь.

## **Аналитическая часть**

Регламент поиска №1 выполнен полностью. В ходе поиска, проведенному согласно заданию №1, было отобрано 15 рефератов патентных документов. В данных работах описываются сенсорные устройства, в основе функционирования которых лежит один из двух методов: первый основан на изменении частоты, фазы или амплитуды собственных колебаний микромеханического деформационного датчика (микрোকантилевера); другой на регистрации статической деформации консоли микромеханического датчика. Изменение параметров микромеханических деформационных датчиков прецизионно определяются либо с помощью лазерно-оптической системы, либо с помощью пьезорезистивной измерительной системы, либо с помощью системы, в которой микрোকантилеверы выступают в роли волноводов.

В основе работы объекта исследования лежит прецизионный лазерно-оптический метод регистрации статической деформации микромеханического деформационного датчика (кантилевера). Данная лазерно-оптическая система имеет ряд инновационных решений, которые выделяют её из ряда лазерно-оптических систем, описанных в рефератах патентных документов указанных в приложении В (Отчет о поиске).

Во всех ранее описанных лазерно-оптических системах используется либо массив зафиксированных относительно друг друга лазеров, либо один подвижный лазер. Если используется массив неподвижных лазеров, ширина луча каждого из которых такова, что луч лазера может пересекать одновременно только один из кантилеверов, то они установлены на определенном, фиксированном расстоянии, что определяет соответствующее, строго фиксированное расположение микромеханических деформационных датчиков (кантилеверов). В результате чего усложняется юстировка устройства, и в сенсорном устройстве такого типа возможно использование микромеханических деформационных датчиков (кантилеверов) строго

определенного типа, расположенных на определенном расстоянии. Если используется один подвижный лазер, у которого ширина луча такова, что луч лазера может пересекать одновременно только один из кантилеверов, то это позволяет использовать микромеханические деформационные датчики (кантилеверы) любого типа без дополнительной юстировки, но движение достаточно массивного лазера вызывает механические колебания в лазерно-оптических системах, что уменьшает чувствительность измерений. Если используется один неподвижный линейчатый лазер, у которого ширина луча такова, что луч лазера одновременно пересекает только один из кантилеверов, то это позволяет использовать микромеханические деформационные датчики (кантилеверы) любого типа без дополнительной юстировки. Использование только одного лазера приводит к уменьшению флуктуаций мощностей, в результате чего увеличивается точность измерений. Но в такой системе кантилеверы постоянно подвержены нагреву со стороны луча от линейчатого лазера, что приводит к побочному неконтролируемому смещению кантилеверов, вызванному биметаллическим эффектом, что уменьшает точность измерений.

В лазерно-оптической системе исследуемого объекта используется один неподвижный лазер, у которого ширина луча такова, что луч лазера может пересекать одновременно только один из кантилеверов. Направление лазерного луча на каждый из кантилеверов осуществляется путем прохождения луча через кристалл с изменяемым показателем преломления за счет эффекта Поккельса. Эффектом Поккельса называется изменение показателя преломления света в кристалле под действием электрического поля, причем это изменение пропорционально напряженности электрического поля. В качестве кристалла с изменяющимся показателем преломления можно использовать кристалл ниобита лития  $\text{LiNbO}_3$ . Изменение показателя преломления кристаллов под действием внешнего поля электрического поля происходит исключительно за счёт анизотропных свойств кристаллов. Под действием постоянного электрического поля



электроны смещаются в сторону того или иного иона (в случае кристалла ниобита лития  $\text{LiNbO}_3$  – это ион Li или Nb). Такая лазерная система (один узко сфокусированный лазер плюс кристалл с изменяющимся показателем преломления) позволяет одновременно использовать микромеханические деформационные датчики (кантилеверы) любого типа без дополнительной юстировки, а также обладает повышенной чувствительностью за счет уменьшения флуктуаций мощностей по сравнению с системой, включающей массив лазеров, и за счет отсутствия побочных неконтролируемых смещений кантилеверов, вызванных биметаллическим эффектом.

## **Заключение**

В результате проведенных патентных исследований согласно заданию №1, в виду анализа ранее описанных изобретений и ряда инновационных решений, отраженных в исследуемом объекте, можно считать патентную частоту исследуемого объекта и его составных частей достоверной.

## ПРИЛОЖЕНИЕ ГА

УТВЕРЖДАЮ  
Руководитель работ,  
профессор кафедры физики  
полимеров и кристаллов  
физического факультета МГУ, д.ф.-м.н.  
И.В. Яминский  
« 23 » июля 2009 г.

### ЗАДАНИЕ № 1 на проведение патентных исследований

Наименование работы (темы): «Биосенсоры на основе микрокантилеверов»  
шифр работы (темы) НК-37П

Сроки выполнения работы 23.07.2009-15.10.2009

Задачи патентных исследований Исследование патентной чистоты  
разрабатываемого объекта и его составных частей

#### КАЛЕНДАРНЫЙ ПЛАН

Виды патентных исследований	Подразделения-исполнители (соисполнители)	Ответственные исполнители (Ф.И.О.)	Сроки выполнения патентных исследований. Начало. Окончание	Отчетные документы
Исследования патентоспособности и патентной чистоты исследуемого объекта	Кафедра физики полимеров кристаллов физического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова	И.В. Яминский А.С. Ерофеев	23.07.2009 - 15.10.2009	1. Отчет о поиске  2. Отчет о патентных исследованиях

Студент 6 курса кафедры физики полимеров  
и кристаллов физического факультета МГУ  
имени М.В. Ломоносова

А.С. Ерофеев  
«23» июля 2009г.

## ПРИЛОЖЕНИЕ ГБ

### Регламент поиска № 1

23.07.2009

Наименование работы (темы) Биосенсоры на основе микрокантилеверов  
шифр работы (темы) НК-37П

Номер и дата утверждения задания: задание №1 от 23.07.2009.

Цель поиска информации (в зависимости от задач патентных исследований,  
указанных в задании) Исследование патентной частоты разрабатываемого  
объекта и его составных частей

Обоснование регламента поиска В качестве стран поиска выбраны: РФ  
(СССР), США, Франция, Германия, Великобритания, Япония, Швейцария,  
Корея. Глубина поиска – 24 года, исходя из того, что период развития данной  
области составляет 21 год.

Начало поиска            23.07.2009            Окончание поиска            25.09.2009

Предмет поиска	Страна поиска	Источники информации, по которым будет проводиться поиск				Ретроспективность	Наименование информационной базы (фонда)
		патентные		НТИ			
		Наименование	Классификационные рубрики (МПИ, НКИ)	Наименование	Рубрики и УДК и другие		
Устройство, способ для контроля массива микромеханических деформационных датчиков (кантилеверов) для биохимического мониторинга малых проб жидкого или газообразного вещества	1. РФ (СССР)  2. Франция, Германия, Великобритания, Япония, Швейцария, Корея.	1. Рефераты российских патентных документов/ сайт ФИПС Роспатента  2. Рефераты французских, великобританских, японских, швейцарских, корейских патентных документов/				1985-2009 гг.	1. Интернет БД ФИПС адрес <a href="http://www.fips.ru">http://www.fips.ru</a>  2. Интернет БД ЕПВ адрес <a href="http://www.european-patent-office.org">http://www.european-patent-office.org</a>

	3. США	Сайт ЕПВ 3. Рефераты патентных документов США/ сайт патентного ведомства США					3. Интернет БД ПВ США адрес <a href="http://www.uspto.ru">http://www.uspto.ru</a>
--	--------	---	--	--	--	--	---

Студент 6 курса кафедры физики полимеров и кристаллов физического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова

\_\_\_\_\_ А.С. Ерофеев  
«23» июля 2009г.

## **ПРИЛОЖЕНИЕ ГВ**

### **ОТЧЕТ О ПОИСКЕ**

В.1 Поиск проведен в соответствии с заданием профессора кафедры физики полимеров кристаллов физического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова И.В. Яминского №1 от 23.07.2009 и Регламентом поиска №1 от 23.07.2009

В.2 Начало поиска 23.07.2009 Окончание поиска 25.09.2009

В.3 Регламент поиска выполнен полностью без отступлений от требований регламента

В.4 Предложений по дальнейшему проведению поиска и патентных исследований нет

В.6 Материалы, отобранные для последующего анализа

Таблица В.6.1 Патентная документация

Предмет поиска (объект исследования, его составные части)	Страна выдачи, вид и номер охранного документа. Классификационный индекс*	Заявитель (патентообладатель), страна. Номер заявки, дата приоритета, конвенционный приоритет, дата публикации*	Название изобретения (полной модели, образца)
Микрокантилеверные датчики и система для контроля положения системы микрокантилеверных датчиков	<p>1. Япония, п. № JP 2008241619 (A) G01N 13/16</p> <p>2. ЕПВ, п. № EP 1 736 804 A1, G02B 6/00</p>	<p>1. Tokyo Sokki Kenkyusho Co LTD , Япония, з. № 20070085569, 20070328, 10.09.2008</p> <p>2. Consejo Superior de Investigaciones Cientificas, Испания, з. №05380137.9, 27.12.2006 Бюл.2006/52</p>	<p>1. Кантилевер как биосенсор и зонд микроскопа. Это изобретение связано с разработкой формы кантилевера, которая позволяет увеличивать чувствительность детектирования массы. Форма кантилевера – прямоугольная с множеством сквозных отверстий. Присутствие этих сквозных отверстий позволяет уменьшить силы вязкости, действующие на кантилевер. Вследствие чего вклад от присоединенной массы в изменение частоты кантилевера становится больше.</p> <p>2. Детектирующее устройство на базе кантилевера и метод его изготовления. Детектор состоит из двух частей, разделенных воздушным зазором. На первой из них находится по крайней мере один кантилевер, представляющий из себя первый волновод, а на второй части детектора находится второй волновод. Первая и вторая часть детектора</p>

	<p>3. США, п. № US 7022540 B2, H01L 21/00</p> <p>4. США, п. № US 20060065046A1, G01N 29/24</p>	<p>3. Korea Institute of Science and Technology, Южная Корея, з. № 10/448,188, 05.30.2002,</p> <p>4. Concentris GmbH, Швейцария, з. № 11/230,852, 24.09.2004, 10 2004 046 685.8, 30.03.2006</p>	<p>расположены так, что первый и второй волновод смещены друг относительно друга в невозмущенном состоянии детектора.</p> <p>3. Кантилеверный сенсор и метод его изготовления. Изменение положение кантилевера определяется с помощью пьезоэлектрической системы за счет пьезоэлектрической пленки сформированной на поверхности кантилевера. Кантилевер имеет Т-образную форму. Расширение на конце кантилевера позволяет увеличить сенсорную площадь.</p> <p>4. Измерительная ячейка и метод для анализа жидкостей. Это изобретение связано с измерительной жидкостной ячейкой для микромеханических сенсоров, так называемых кантилеверных сенсоров. Такие сенсоры используются для регистрации биомолекул без флуоресцентной и радиоактивной маркировки. Такие исследования обычно проводятся в жидкостях. Пузыри газа или воздуха в анализируемой жидкости внутри измерительной ячейки могут значительно влиять на результаты измерений или даже повредить сенсор. В измерительной ячейке, согласно данному изобретению,</p>
--	--	---	---



	<p>5. ЕПВ, п. № EP 1 617 211 A1, G01N 27/00</p>	<p>5. Cantion A/S, Дания, з. №05109776.4, 03.05.1999 DK 60199 07.05.1999 US 133240 Р, 18.01.2006, Бюл. №03</p>	<p>изолированный объем газа находится выше уровня жидкости. Следовательно, пузыри газа или воздуха всегда впитываются газовым объемом и не контактируют с кантилеверными сенсорами. Измерительная ячейка так же характеризуется очень малым объемом, порядка микролитров, и может быть совмещена с различными оптическими и пьезорезистивными методами считывания.</p> <p>5. Метод разработки сенсора. Метод разработки интегрированной кантилеверами, управляемой жидкостной микросистемы. Такая система обеспечивает новый механизм для наблюдения физических, химических и биологических свойств жидкостей в этой системе. Данное изобретение также связано с разработкой микро-кантилеверных сенсоров с встроенной системой считывания. Такая система дает ламинарное течение потоков разных жидкостей внутри канала без смешивания, что открывает новые виды эксперимента и уменьшает шумы, вызванные движением жидкости. Также в данном изобретении сенсоры имеют смежные или расположенные на близком расстоянии микро-кантилеверы, которые могут подвергаться воздействию разных химических сред одновременно.</p> <p>6. Многокантилеверный химический сенсор. Химический сенсор состоит из одного или нескольких кантилеверных сенсоров с пьезорезистивным элементом прямого считывания. Сенсор состоит из базового</p>
	<p>6. ВОИС, п. № WO 2004/083802A2,</p>	<p>6. Cantion A/S, Дания, з. № PCT/DK2004/000185,</p>	

	<p>G01N</p> <p>7. ВОИС, п. № WO 2005/083409A1, G01N 27/12</p>	<p>18.03.2003 PA 2003 00427, 30.09.2004</p> <p>7. Cantion A/S, Дания, з. № PCT/EP2005/050785, 26.02.2004 PA 2004 00316, 09.09.2005</p>	<p>основания, несущего кантилеверы, из основной выемки и основной соединяющей поверхности, которая частично окружает выше указанную полость. Кантилеверы выдвинуты в базовую полость. Пьезорезистивные элементы электрически подключены к основным соединяющим прокладкам на базовой соединяющей поверхности. Сенсор также включает в себя вспомогательные соединяющие прокладки, соответствующие основным соединяющим прокладкам, на вспомогательной соединяющей поверхности, соответствующей основной соединяющей поверхности. Основная соединяющая поверхность и вспомогательная соединяющая поверхность смонтированы друг с другом так, что основная соединяющая прокладка и вспомогательная соединяющая прокладка непосредственно совмещены друг с другом, преимущественно перевернутым кристаллом (связываемым с металлизированными межсоединениями подложки за одну операцию).</p> <p>7. Сенсор для нацеленного определения вещества в образце.</p> <p>Данное изобретение связано с микромеханическим сенсором для нацеленного определения вещества в жидкости или газе, который включает в себя, по меньшей мере, один сенсор с захватывающей поверхностью и, по меньшей мере, один проводящий элемент из проводящего электричество материала с парой проводов для</p>
--	---	--	--

	<p>8. ВОИС, п. № WO 03/044530A1, G01N 33/543</p>	<p>8. Cantion A/S, Дания, з. № РСТ/DK02/00779, 19.11.2002 РА 2001 01724, 30.05.2003</p>	<p>приложения электрического поля к проводящему элементу. Проводящий элемент состоит из двух отдельных единиц, и проводящий элемент имеет большую проводимость в одном состоянии сенсора, чем в другом, благодаря изменению площади контакта для электрической проводимости между двумя или более отдельных единиц из-за деформации, вызванной переходом сенсора из одного состояния в другое из-за возросшего поверхностного натяжения в результате химических реакций на захватывающей поверхности. Проводящий элемент может включать от 2-100 отдельных единиц и даже более, которые могут быть систематически упорядочены или расположены в произвольном порядке, например, в непроводящем диспергирующем материале. Наилучшее применение сенсора – это обнаружение ДНК, когда проводящий элемент содержит карбоновые нанопровода.</p> <p>8. Сенсорная система с контрольной поверхностью (поверхность, на которую ссылаются), имитирующей регистрирующую поверхность, но со слабой лиганд связывающей способностью.</p> <p>Сенсорная система, по меньшей мере, с двумя гнущимися единицами: сенсорная единица и контрольная единица (единица, на которую ссылаются). Сенсорная единица включает в себя захватывающую поверхность, модифицированную одной или несколькими связывающими функциональными группами,</p>
--	--	---	--

	<p>9. США, п. № WO 03/038409A1, G01N 21/00</p>	<p>9. Veeco Instruments INC., США, з. № PCT/US02/08831, 30.10.2001 09/999,681 US, 08.05.2003</p>	<p>содержащими захватывающий лиганд, который является частью комплементарной пары. Контрольная единица (на которую ссылаются) содержит имитационную захватывающую поверхность, модифицированную связывающими функциональными группами, которые не содержат лиганд, идентичный захватывающему лиганду. Захватывающим лигандом, на пример, может быть комплементарный партнер для биокомпонет, как правило, - это олигонуклеотиды РНК, ДНК или ПНК, белки, пептиды, гормоны, компоненты крови, антиген и антитела. Сигнал, который измеряет контрольная единица, - это шум, который вычитается из сигнала сенсорной единицы, что позволяет уменьшить шум измерений.</p> <p>9. Многокантилеверная сенсорная система. Интегрированная многокантилеверная сенсорная система точно регистрирует присутствие определенного вещества в различных окружающих условиях. Интегрированная многокантилеверная система состоит из кантилеверной сенсорной измерительной головной части, из кантилеверной сенсорной системы и из камеры для измерений. Измерительная головная часть состоит из кантилеверного массива, состоящего по меньшей мере из одного кантилевера, из источника света и из позиционного детектора, который регистрирует падающий на него свет, отраженный от кантилеверов из кантилеверного массива. Кантилеверная сенсорная система измеряет осциллирующие свойства кантилеверов из массива. В</p>
--	--	--	--

	<p>10. ВОИС, п. № WO 01/33226A1, G01N 33/543</p>	<p>10. IBM, США, з. № РСТ/IB00/01472, 03.11.1999 99121790.2 ЕР, 10.05.2001</p>	<p>сенсорную систему входит кантилеверный массив и система детектирования, которая измеряет сигнал, вызванный изгибом кантилевера. Кроме того, для более точного измерения осцилляций кантилеверов из кантилеверного массива, может быть добавлен высокочастотный счетчик или Q-control схема. Измерительная камера включает в себя ячейку для потока веществ, сконструированная так, что уменьшается неэффективный объем.</p> <p>10. Кантилеверный сенсор и передатчик. Сенсорная система для регистрации определенного вещества в соответствующей жидкости, включающая в себя измерительный кантилевер. Одна из поверхностей измерительного кантилевера модифицирована основным покрытием, чувствительным к определенному веществу. Кроме того, система включает в себя контрольный кантилевер (кантилевер, на который ссылаются), одна из его сторон покрыта контрольным покрытием (покрытие, на которое ссылаются), которое менее чувствительно к определяемому веществу, чем основное покрытие. Кантилеверы организованы так, что они оба подвергаются воздействию на контрольном этапе соответствующей жидкости и на этапе обнаружения соответствующей жидкости, содержащей определяемое вещество. Работа регистрирующей единицы заключается в определении разницы отклонений измерительного кантилевера и контрольного кантилевера во время контрольного этапа и</p>
--	--	--	---

	<p>11. ВОИС, п. № WO 95/02180A1, G01N 25/36</p>	<p>11. IBM, США, з. № PCT/EP93/01742, prior(no), 19.01.95</p>	<p>этапа обнаружения.</p> <p>11. Калориметрический сенсор. Калориметрический сенсор состоит из биметаллического рычага, комбинированного химически чувствительным слоем, на пример, катализатором, и из чувствительного прибора к отклонению биметаллического рычага. Благодаря своей высокой чувствительности, этот новый сенсор может быть применен в различных технических сферах.</p>
	<p>12.ВОИС, п. № WO 2004/044551, G01N</p>	<p>12. Protiveris INC., США, з. № PCT/US2003/035715, 08.11.2002 60/425,149 US 10.12.2002 60/432,052 US, 27.05.2004</p>	<p>12. Многокомпонентный облучатель и считывающий прибор для микрокантилеверного массива. В данном изобретении описан прибор считывания с многокомпонентным облучателем и методы для считывания отклонения большого количества кантилеверов. Облучатель содержит в себе микро-оптическую подсистему для облучения кантилеверов, в которой используется множество лазеров типа VCSEL для генерации массива электромагнитных пучков, и которая фокусирует пучки на кантилеверах. Отклонение кантилеверов приводит к изменению угла отражения пучков от кантилеверов, который записывается множеством позиционных чувствительных приборов.</p>
	<p>13. ВОИС, п. №</p>	<p>13. CSIC, Испания,</p>	<p>13. Система и способ регистрации смещения множества микро- или наномеханических элементов, таких как</p>

	<p>WO 2005/086172A1, G12B 21/20</p> <p>14. СССР, п. № SU1803827A1, G01N21/31</p>	<p>з. № PCT/EP2005/002356, 08.03.2004 04381004.3 EP, 15.09.2005</p> <p>14. Ленинградский Институт Точной Механики и Оптики, СССР, з. № 4880482/25, 11.11.90, 23.03.93. Бюл. № 11</p>	<p>микрочипы.</p> <p>Изобретение связано с системой и методом регистрации смещения, такого как отклонение, множества элементов, таких как микрочипы, формирующих часть массива, с помощью излучения пучка света на массив и получения отраженного пучка света на позиционном детекторе. Позиция падающего пучка света определяет смещение соответствующего элемента. Система также включает в себя: средства для сканирования перемещения пучка света вдоль массива так, что пучок света последовательно отражается от отдельных элементов из выше указанного массива; и средства для детектирования отражения для регистрации пучка света, отраженного от элементов. Система устроена так, что при регистрации пучка света, отраженного от элемента, средствами для детектирования отражения соответствующая позиция падающего пучка света на детекторе принимается за индикатор смещения элемента.</p> <p>14. Устройство для определения концентрации паров исследуемого вещества.</p> <p>Использование: измерительная техника, а именно определение влажности воздуха, а также в химической промышленности. Сущность изобретения: о концентрации паров судят по изменению формы сорбирующего чувствительного элемента, состоящего по меньшей мере из двух слоев с различными сорбирующими свойствами. Один из слоев пористый, а внешняя поверхность другого</p>
--	--	--	--

	<p>15. Российская федерация, п. № RU2327140 C2, G01N 5/02</p>	<p>15. Физические лица (авторы патента), Российская федерация, з. № 2006103665/28, 08.02.2006, 20.06.2008 Бюл. № 17</p>	<p>выполнена зеркальной и оптически сопряжена с источником и приемником излучения.</p> <p>15. Устройство и способ для качественного и количественно определения химических соединений и биологических объектов.</p> <p>Детектирующим элементом сенсора является одна или несколько консолей с иммобилизованным на поверхности комплексом специфически взаимодействующих молекул или биологических объектов. В качестве детектирующего элемента можно использовать кантилевер для атомно-силовой микроскопии. Определение одного из компонентов комплекса достигается за счет измерения статических деформаций микромеханического устройства, возникающих в результате диссоциации иммобилизованного комплекса и связывания другого компонента определяемым веществом. Изобретение обеспечивает увеличение абсолютной чувствительности.</p>
--	---	---	--



Таблица В.6.2. Научно-техническая, конъюнктурная, нормативная документация и материалы государственной регистрации (отчеты о научно-исследовательских работах)

Предмет поиска	Наименование источника информации с указанием страницы источника	Автор, фирма (держатель) технической документации	Год, место и орган издания (утверждения, депонирования источника)
1	2	3	4
Поиск не проводился			

Таблица В.6.3. Перечень покупных комплектующих изделий, по которым запрошена документация

Дата запроса. Реквизиты письма запроса	Наименование и обозначение покупных комплектующих изделий	Запрашиваемая документация (Ответ о ПИ, выписка из Отчета, ТУ, ПФ, выписка из ПФ)*. Цель получения запрашиваемой документации	Вид и номер документа, полученного при запросе или причина отказа. Реквизиты письма-ответа	Наименование запрашиваемой организации или предприятия с указанием местонахождения (адрес)
---	---	---	--	--

1	2	3	4	5
Не запрашивалась				

## ПРИЛОЖЕНИЕ Д

### ПРОТОКОЛ

#### испытания

Программы и методики испытаний экспериментального образца системы  
регистрации сверхмалых отклонений кантилеверных датчиков

№ 1

29 сентября 2009 г.

- 1. Объект испытания:** макеты многопараметрических анализаторов.
- 2. Цель испытания:** установление основных технических характеристик экспериментального образца системы регистрации сверхмалых отклонений кантилеверных датчиков.
- 3. Дата начала испытания:** 28 сентября 2009 г
- 4. Дата окончания испытания:** 29 сентября 2009 г.
- 5. Место проведения испытания:**  
МГУ им.М.В. Ломоносова, физический ф-т.

#### 6. Результаты испытания

Наименование показателя	Ед. изм.	Измеренное значение
чувствительность определения массы при параллельном съеме информации одновременно не менее чем 4-х коммерчески доступных микромеханических сенсорных элементов	г	$10^{-11}$
Чувствительность определения смещения кантилеверных датчиков	нм	0,1
Чувствительность измерения латеральных сил в рецепторе	Н/м	$10^{-5}$
Размер жидкостной ячейки	мл	1,0
Потребляемая мощность, не более	Вт	110
скорость обработки данных (время измерения)	мкс	3
Время измерения при параллельном считывании с 4-х датчиков	млс	140

#### Испытание проводили

*Н.с.*

*Д.В. Колесов*

*Н.с.*

*Г.Б. Мешков*