

УДК 616.51

Н.Ю. Гетманенко

Харьковский национальный университет радиоэлектроники, Харьков

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ПРИНЦИПА АТОМНО-СИЛОВОЙ МИКРОСКОПИИ ПРИ РАЗРАБОТКЕ БИОСЕНСОРОВ

Рассмотрены преимущества атомно-силовой микроскопии (АСМ) при работе с биологическими объектами. Приведены результаты исследования биоструктур с помощью АСМ. Рассмотрена схема работы биосенсора на основе кантилеверных систем. Обосновывается выбор регистрируемого отклика сенсорной системы в зависимости от назначения сенсора.

Ключевые слова: атомно-силовая микроскопия, кантилевер, датчик, биосенсор.

Введение

Инфекционные заболевания продолжают наносить весьма ощутимый вред здоровью людей во всем мире, в том числе, в Украине. Высокая технологическая и антропогенная нагрузка на окружающую среду, политические и экономические кризисы, неблагоприятная демографическая ситуация, старение нации способствуют распространению инфекций. Агрессивно в последние десятилетия проявляют себя туберкулез и дифтерия, корь и краснуха, грипп, СПИД. Ежегодно в мире регистрируют до 30 новых и малоизученных патогенов.

Актуальность. Определение возбудителей инфекционных болезней актуально сегодня, необходимость усовершенствования методов диагностики и средств борьбы с инфекциями будет актуальной и в ближайшем будущем. Ранняя экспресс-диагностика инфекционных заболеваний на порядок увеличивает эффективность терапии, что позволяет значительно снизить риск наступления летального исхода. Разработка новых систем и устройств диагностики, обладающих более высокими характеристиками, такими, как время анализа, точность, чувствительность, является остро необходимой.

В настоящей работе рассмотрено применение АСМ как инструмента исследования биологических объектов и построение на основе фундаментального принципа АСМ нового класса сенсоров, которые могут быть использованы как детекторы биологических объектов и химических соединений.

Основной материал

Атомно-силовая микроскопия. В настоящее время в арсенале исследователя микробиолога имеется огромное количество измерительной и аналитической техники. Однако следует выделить из этого множества относительно новые устройства – сканирующие зондовые микроскопы (СЗМ), которые позволили визуализировать биологические структуры с высоким пространственным разрешением на уровне отдельных молекул.

Первым СЗМ стал сканирующий туннельный микроскоп (СТМ), разработанный в 1981 году Герхардом Биннигом и Хайнрихом Рёерером из лаборатории IBM в Цюрихе [1]. С его помощью были получены поразившие всех изображения поверхности кремния в реальном масштабе. Результатом продолжения работ в области СЗМ стала разработка в 1986г. Герхардом Биннигом, Калвином Куэйттом и Кристофером Гербером атомно-силового микроскопа (АСМ) [2]. В том же 1986 г. Биннинг и Рёерер получают Нобелевскую премию в области физики за открытие принципа туннельной, атомно-силовой и световой сканирующей микроскопии.

Разработанный АСМ стал основой для появления различных сканирующих устройств, использующих принципы, заложенные Биннигом и Рёерером [3]. Принцип работы АСМ основан на силовом взаимодействии, возникающем между зондом и образцом под действием сил межмолекулярного взаимодействия – сил Ван-дер-Ваальса. Под действием этих сил происходит изгиб кантилевера, на конце которого находится зонд, взаимодействующий с поверхностью образца (рис. 1). На верхнюю поверхность кантилевера, которая является зеркальной, падает луч лазера. Отраженный луч лазера попадает на четырехсекционный фотодиод, сигнал с которого и является регистрируемым откликом системы на межмолекулярное взаимодействие.

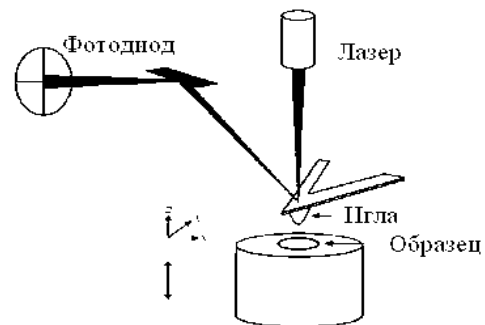


Рис. 1. Принцип работы АСМ

Строго говоря, взаимодействие, возникающее между зондом и образцом, носит сложный характер.

Однако, как правило, исследователи выделяют наиболее значимые составляющие, обуславливающие силовые взаимодействия, протекающие между поверхностью образца и зондом: дисперсионная составляющая сил Ван-дер-Ваальса, силы электростатического отталкивания, капиллярные силы и силы упругости консоли (рис. 2).

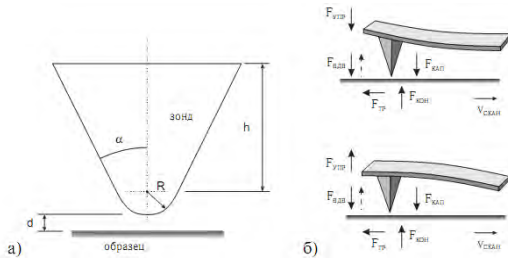


Рис. 2. Обобщенная геометрия зонда атомно-силового микроскопа и баланс силового взаимодействия зонда и образца:

- а) h – высота зона, R – радиус кривизны зонда, d – расстояние между зондом и образцом;
- б) указаны силы, действующие на зонд: дисперсионная $F_{ВДВ}$, капиллярная $F_{кап}$, сила трения $F_{тр}$, упругая сила $F_{упр}$

АСМ обладает уникальными свойствами по сравнению с другими инструментами микроскопии, которые в первую очередь делают его неотъемлемым и необходимым инструментом современного микробиолога. В первую очередь следует отметить высокую разрешающую способность АСМ, позволяющую визуализировать объекты размером от 2А. Так, благодаря АСМ были получены первые устойчивые изображения молекул ДНК [4]. Принципы работы АСМ делают его не зависимым от электропроводящих свойств объектов, что позволяет исследовать не только проводящие поверхности (в отличие от СТМ), но и диэлектрические. При этом не требуется обработка образцов красителями и солями тяжелых металлов, что делает возможным проводить нативные исследования биообъектов. Исследования биообъектов в АСМ возможно проводить как в газовой среде, так и в жидкой, что позволяет исследовать биообъекты *in vitro*.

С опытом развития технологий АСМ многим исследователям, работающим в области атомно-силовой микроскопии, интуитивно стало понятно, что кантилеверы можно использовать не только в качестве профилометра поверхности, но и как высокочувствительные датчики для измерения различных физико-химических воздействий со стороны внешней среды.

Биосенсоры на основе АСМ. Анализируя публикации в области атомно-силовой микроскопии, стоит отметить, что большинство из них посвящено разработке биосенсоров на основе кантилеверных систем. Действие биосенсоров основано на важнейших химических реакциях антитело/антиген, фермент/субстрат, рецептор/гормон – все они ис-

пользуются для получения высокоселективных и чувствительных сенсоров на конкретные определяемые вещества. Для иллюстрации высокоселективных реакций, протекающих между биологическими молекулами, предложен механизм, получивший название «ключ-замок».

В биосенсорах узнающим реагентом обычно является макромолекула, иммобилизованная внутри мембраны, либо химически связанная с поверхностью, контактирующей с раствором определяемого вещества [5]. Архитектура биосенсора на основе кантилеверов АСМ показана на рис. 3.

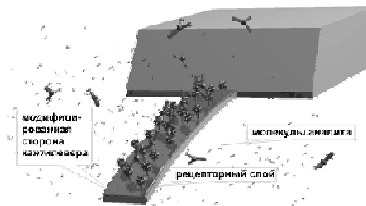


Рис. 3. Архитектура силового микрокантилеверного сенсора

Принцип действия кантилеверного биосенсора основан на специфичности одной из его поверхностей к исследуемому адсорбированному веществу. 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. Нами на основе приведенного принципа ведется работа над созданием иммунного сенсора, принцип действия которого основан на специфичном взаимодействии антигенов с антителами. На одну из поверхностей кантилевера иммобилизуются антитела, при образовании комплекса антиген-антитело, происходит изменение массы кантилеверной системы, что приводит к изменению ее механических характеристик. Изменение массы приводит к сдвигу резонансной частоты собственных колебаний кантилевера. Минимальная масса m_{min} , которую можно измерить с помощью кантилевера, выражается следующим образом [6]:

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

где ω_0 – резонансная частота; $R = -\omega_0 / (2m_{\dot{y}\delta})$ – чувствительность системы; DR – динамический диапазон; Q – добротность; Δf – сдвиг резонансной частоты.

Если считать, что амплитуда колебания кантилевера много меньше его длины l , то, используя приближение гармонического осциллятора, частоту собственных колебаний стержня, соответствующую основному колебанию, можно записать в виде [7]:

$$f_0 = \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{k}{m}}, \quad (2)$$

где k – коэффициент жесткости кантилевера; m – масса кантилевера.

Коэффициент жесткости кантилевера описывается, следующим выражением [8]:

$$k = ql/\delta_{\text{ст}}, \quad (3)$$

где q – равномерно распределенная нагрузка; l – длина кантилевера; $\delta_{\text{ст}}$ – статический прогиб кантилевера под действием равномерно распределенной нагрузки.

Статический прогиб определим из уравнения изогнутой оси равномерно нагруженной консоли [9]:

$$y = \frac{q}{24EJ} (x^4 - 4lx^3 + 6l^2x^2), \quad (4)$$

$$\delta_{\text{ст}} = \frac{q}{8EJ}, \quad (5)$$

где E – модуль Юнга материала кантилевера; J – момент инерции поперечного сечения относительно нейтральной оси кантилевера.

Подставив выражения (3) и (5) в (2) получим:

$$f_0 = \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{8EJ}{l^3 m}}. \quad (6)$$

Выразим массу из выражения (6):

$$m = \frac{8EJ}{f_0^2 \cdot (2\pi)^2 \cdot l^3}. \quad (7)$$

Таким образом, изменение массы можно представить как:

$$\Delta m = \frac{8EJ}{(2\pi)^2 \cdot l^3} \left(\frac{1}{f_0^2} - \frac{1}{f^2} \right), \quad (8)$$

где f_0 и f – частоты кантилевера до и после присоединения массы на его незакрепленном конце. Для прямоугольного поперечного сечения момент инерции равен $J = bh^3/12$, где b – ширина кантилевера. Таким образом, из приведенных расчетов можно сделать вывод, что повышение чувствительности кантилеверного сенсора сводится к повышению его резонансной частоты колебаний.

Выводы

Разрабатываемый сенсор обладает рядом преимуществ по сравнению с существующими. Иммунный биосенсор на основе кантилеверных систем позволяет изучать процессы образования комплексов антиген-антитело в режиме реального времени, что дает возможность получать дополнительную информацию об иммунных процессах, протекающих в организме. Так как сенсор может работать непосредственно в жидкой среде, это дает возможность исследовать комплексообразование в зависимости от внешних ус-

ловий, а также изучать влияние химических добавок на процесс связывания антител с антигенами. Полученная информация позволяет получить более детальную информацию о процессе специфичного связывания антиген-антитело, что может быть использовано при разработке более эффективных противовирусных препаратов. Также стоит отметить, что описанная концепция построения сенсора может быть использована не только в биосенсорах. На основе кантилеверных систем сейчас уже существуют сенсоры на такие взрывоопасные химические соединения, как тринитротолуол и гексоген обладающие высокой чувствительностью и быстротой отклика. Исследование и разработка кантилеверных сенсоров является новым направлением в технике, анализируя количество публикаций в этой области можно с уверенностью говорить, что в скором будущем эти устройства будут выделены в отдельный широкий подкласс сенсоров.

Данная работа выполнена при поддержке проекта УНТЦ № 4495.

Список литературы

1. Binnig G. Scanning tunneling microscopy/ G. Binnig, H. Rohrer, C. Gerber // *Phys. Rev. Lett.* – 1982. – V. 49. – P. 57-61.
2. Binnig G. Atomic force microscope / G. Binnig, C.F. Quate, C. Gerber, E. Weibel // *Phys. Rev. Lett.* – 1986. – V. 56. – P. 930-933.
3. Wickramasinghe H.K. Progress in scanning probe microscopy / H.K. Wickramasing // *Acta Mater.* – 2000. – V. 48, №1. – P. 347-358.
4. Bustamante C. Circular DNA molecules imaged in air by scanning force microscopy / C. Bustamante, J. Vesenka, C. L. Tang, W. Rees, M. Guthod, R. Keller // *Biochemistry.* – 1992. – V. 31. – P. 22-26.
5. Каттралл П.В. Химические сенсоры / П.В. Каттралл. – М.: Научный мир, 2000. – 144 с.
6. Ekinci K.L. Ultimate limits to inertial mass sensing based upon nanoelectromechanical systems/ K.L. Ekinci, Y.T. Yang, M.L. Roukes // *J. Appl. Phys.* – 2004. – V. 95, № 5. – P. 2682-2689.
7. Davis Z.J. High Mass and Spatial Resolution Mass Sensor based on Resonating Nano-Cantilevers Integrated with CMOS/ Z.J. Davis, G. Abadal, B. Helbo, et al // *The 11th International Conference on Solid-State Sensors and Actuators, Munich, Germany.* – 2001. – P. 72-75.
8. Бидерман В.Л. Теория механических колебаний / В.Л. Бидерман. – М.: Высшая школа, 1980. – 480 с.
9. Тимошенко С.П. Сопротивление материалов / С.П. Тимошенко. – М.: Наука, 1965. – 364 с.

Поступила в редколлегию 28.01.2011

Рецензент: д-р физ.-мат. наук, проф. Н.Н. Рожицкий, Харьковский национальный университет радиоэлектроники, Харьков.

ВИКОРИСТАННЯ ПРИНЦИПУ АТОМНО-СИЛОВОЇ МІКРОСКОПІЇ ПРИ РОЗРОБЦІ БІОСЕНСОРІВ

М.Ю. Гетманенко

Розглянуто переваги атомно-силового мікроскопії (АСМ) при роботі з біологічними об'єктами. Наведено результати дослідження біоструктур за допомогою АСМ. Наведено схему роботи біосенсора на основі кантилеверних систем. Обґрунтовується вибір реєстрованого відгуку сенсорної системи в залежності від призначення сенсора.

Ключові слова: атомно-силова мікроскопія, кантилевер, датчик, біосенсор.

APPLICATION OF ATOMIC FORCE MICROSCOPY PRINCIPLES FOR BIOSENSORS DEVELOPMENT

M.Y. Getmanenko

The advantages of atomic-force microscopy (AFM) for working with biological objects are considered. The results of bio-structures investigation using AFM are presented. The operation principle of biosensor based on cantilever system is considered. The choice of detected response of sensor system depending on sensor utilization is substantiated.

Keywords: *atomic-force microscopy, cantilever, detector, biosensor.*