

И. Л. Юркова

НАНОБИОАНАЛИТИКА



УЧЕБНОЕ ПОСОБИЕ

И. Л. Юркова

НАНОБИОАНАЛИТИКА

Допущено

*Министерством образования Республики Беларусь
в качестве учебного пособия для студентов
учреждений высшего образования по специальностям
«Фундаментальная химия», «Химия лекарственных соединений»,
«Химия (научно-производственная деятельность)»,
«Химия (фармацевтическая деятельность)»*

УДК 577.1.08(075.8)
ББК 28.072я73
Ю75

Рецензенты:

кафедра химии Белорусского государственного педагогического университета имени Максима Танка (заведующий кафедрой кандидат химических наук *В. В. Жилко*);
профессор факультета экологической медицины Международного государственного экологического института имени А. Д. Сахарова Белорусского государственного университета, доктор химических наук, профессор *Е. И. Квасюк*

Юркова, И. Л.

Ю75 Нанобиоаналитика : учеб. пособие / И. Л. Юркова. – Минск : БГУ, 2019. – 195 с.
ISBN 978-985-566-760-6.

В учебном пособии на современном научном уровне освещены методы анализа, базирующиеся на использовании биосенсоров и микроаналитических систем (биологических и микрофлюидных чипов). Представлена информация о применении наноразмерных материалов для улучшения аналитических характеристик указанных устройств.

Для студентов учреждений высшего образования, обучающихся по специальностям «Фундаментальная химия», «Химия лекарственных соединений», «Химия (научно-производственная деятельность)», «Химия (фармацевтическая деятельность)».

УДК 577.1.08(075.8)
ББК 28.072я73

ISBN 978-985-566-760-6

© Юркова И. Л., 2019
© БГУ, 2019

ПРЕДИСЛОВИЕ

На современном этапе биоаналитика составляет основную долю в клинической диагностике, системах общественной безопасности и мониторинга окружающей среды, контроля качества пищевых, сельскохозяйственных и косметических продуктов, криминалистике, фармацевтике и биотехнологии. Биоаналитика, с одной стороны, охватывает всю совокупность методов для исследования биологических молекул и биологически активных веществ *in vitro* и *in vivo* (микроскопия, калориметрия, масс-спектрометрия с «мягкими» методами ионизации, гель- и капиллярный электрофорез, электрохроматография и т. д.). С другой стороны, арсенал биоаналитики представлен методами, основанными на применении биомолекул (ферменты, антитела, ДНК) или биомиметических структур (аптамеры, молекулярно-импринтированные полимеры) в качестве высокоспецифичных реагентов для анализа различных образцов с минимальной или отсутствующей пробоподготовкой (ферментативные, иммунные, биосенсорные).

За последние десятилетия в биоаналитике особую актуальность приобрели направления, связанные с созданием новых эффективных аналитических платформ на основе современных достижений молекулярной биологии, микро- и нанотехнологий, что в целом формирует такое направление, как нанобиоаналитика. Уникальное сочетание высокоспецифичного биомолекулярного распознавания, наноматериалов и миниатюрных аналитических систем способствует развитию методов анализа с улучшенными характеристиками, позволяя решать сложные биоаналитические задачи.

Применение синтетических наноразмерных структур в биосенсорах и микроаналитических устройствах (биочипах и микрофлюидных чипах) на различных стадиях анализа (детектирование, управление движением молекул и частиц, концентрирование, разделение и т. д.) наряду с развитием инструментальной техники вывело анализ объектов на совершенно другой уровень. Это выражается в существенном снижении объемов анализируемой пробы (10^{-9} – 10^{-15} л), времени анализа (с – мин), пределов обнаружения веществ (10^{-18} – 10^{-21} М) и расхода реагентов. Разработка методов с использованием микро- и наноустройств дала возможность не только точно определять ультрамалые количества веществ, но и детектировать и изучать свойства единичных молекул ($1,66 \times 10^{-24}$ М) вместо ансамблей частиц.

Совершенствование методов на базе микро- и наносистем способствует созданию недеструктивных методов анализа сложных биообъектов в режиме реаль-

ного времени, позволяет осуществлять мультиплексный анализ и высокопропускной скрининг.

Развитие нанобиоаналитики открывает новые горизонты в исследовании биосистем, когда на первое место выходит не измерение количества компонента, а возможность исследовать определенные состояния макромолекул (белков, ДНК, антител и т. д.), их взаимодействие друг с другом и биологически активными соединениями (полисахаридов, лекарственных соединений, антигенов и т. д.). Понимание основ молекулярного взаимодействия рецептор – лиганд способствует пониманию меж- и внутриклеточных процессов (клеточной сигнализации, экспрессии генов, активности ферментов и т. п.), что открывает новые перспективы в разработке диагностических тестов и фармацевтических препаратов.

Для аналитика, занятого в области современного биоанализа, актуальны и необходимы знание и владение различными аналитическими методами, базирующимися на применении достижений микро- и нанотехнологий. Данное учебное пособие состоит из двух глав, посвященных биосенсорам, биологическим и микрофлюидным чипам. В каждой главе представлена информация о применении функциональных элементов и материалов, размеры которых лежат в нанометровой области длин, для улучшения аналитических характеристик различных систем.

Материал представлен как совокупность теоретических основ и методических указаний, необходимых для понимания и применения методов, базирующихся на использовании микроаналитических устройств и наноструктур. Для углубленного изучения отдельных методов целесообразно обращаться к специальной литературе.

Возрастающая роль нанобиоаналитики в научной и производственной сферах делает необходимым ее введение в обучающие дисциплины для студентов химических и биохимических специальностей. Книга также может быть полезна магистрантам и аспирантам естественно-научных специальностей, сотрудникам специализированных лабораторий для успешного решения сложных биоаналитических задач.

ВВЕДЕНИЕ

Биоаналитика является междисциплинарной областью знаний на стыке аналитической химии, биохимии, молекулярной биологии, микробиологии и материаловедения. Она охватывает многосторонний арсенал физико-химических методов для анализа низкомолекулярных биологически активных соединений и биополимеров, а также ферментативные и иммунохимические методы, базирующиеся на использовании биомолекул или биомиметиков в качестве распознающих элементов для анализа различных аналитов. Развитие биоаналитики обусловлено потребностями различных областей науки (протеомика, геномика, липидомика, биомедицина и др.) и практики (биотехнологические производства, медицина, спорт, сельское хозяйство, фармацевтика, криминалистика, система общественной безопасности, охрана окружающей среды и др.).

На современном этапе перед биоаналитикой стоят обширные задачи. Они заключаются не только в снижении пределов обнаружения веществ (аттомоль – зептомоль) и объемов анализируемой пробы (нано – фемто), но в большей степени в необходимости проведения мультиплексного анализа биологических образцов, быстрого параллельного анализа большого числа (массива) комплексных проб, изучения межмолекулярных взаимодействий в режиме реального времени.

При этом анализ биологических образцов требует применения неразрушающих методов на стадии подготовки проб или выбора методов анализа без пробоподготовки. Это обусловлено тем, что биопробы обладают рядом особенностей: гетерогенностью и многокомпонентностью состава, низкими концентрациями аналитов при больших количествах других компонентов; сохранением биологической специфичности биомолекул в узком диапазоне значений температур, pH и ионной силы; низким энергетическим уровнем внутренних взаимодействий, определяющих устойчивость структурных комплексов на молекулярном и субмолекулярном уровнях.

Мультиплексный анализ представляет собой одновременное детектирование большого количества аналитов (десятки и более) в одном биологическом образце за один аналитический цикл. Данный анализ широко используется в функциональной геномике для обнаружения в пробе всех биомолекул определенного класса (например, мРНК, белков) и/или определения их состояния, а также для установления эффекта экспериментального лечения (или мутаций ДНК) на биомолекулы и метаболические пути в образце или клеточного ответа на воздействие множественных реагентов. Метод имеет важное значение в клинической

диагностике заболеваний (например, рака), так как позволяет определить от 10 до 100 биологических маркеров в капле крови пациента в течение нескольких минут.

В области фармацевтики, биомедицины и биопроизводств становятся все более актуальными методы высокопропускного скрининга (ВПС) (англ. *High-throughput screening, HTS*). ВПС позволяет исследователю быстро проводить миллионы химических, генетических или фармакологических тестов. Благодаря ВПС стало возможным одновременно проверить активность сотен – тысяч экспериментальных образцов (химические соединения, аминокислоты, пептиды, целые клетки и др.) по отношению к биологическим мишеням (белки, ферменты и др.). Это позволяет быстро идентифицировать активные соединения, антитела или гены, которые модулируют конкретный биомолекулярный путь. Результаты такого анализа являются отправными точками для разработки новых лекарств и понимания роли конкретного биохимического процесса в биологии.

В целом решению задач биоаналитики способствовали миниатюризация аналитических систем и применение при их конструировании наноразмерных структур. Достижения микро- и нанотехнологий сделали возможным создание нового направления инструментальной аналитики – микро- и наноаналитические системы, которое становится ключевым в мировой аналитической химии. *Нанобиоаналитика* охватывает совокупность методов анализа, базирующихся на использовании микро- и наноразмерных устройств.

Сочетание высокоспецифичного взаимодействия биомолекул, уникальной инструментальной техники (спектроскопия поверхностного плазмонного резонанса, флуоресцентная микроскопия со сверхвысокой разрешающей способностью, высокочувствительная масс-спектрометрия с «мягкими» методами ионизации, оптический пинцет и др.), микроаналитических устройств и наноматериалов способствовало развитию ультрочувствительного мультиплексного биоанализа. Совершенствование аналитических методов на основе микро- и наноструктур сделало возможным определение не только сверхмалых количеств вещества (ниже аттомолей), но и детектирование единичных молекул в многокомпонентных пробах.

Анализ единичных молекул (англ. *Single molecule detection, SMD*) представляет собой основную цель в современной аналитике. Такой анализ дает возможность получить уникальную информацию об индивидуальной молекуле (физические и химические свойства, поведение во времени и пространстве, например, оценка динамики изменения, связанного со взаимодействиями молекулы в рамках определенной модели поведения – катализа, комплексообразования, конформационных изменений, связанных с изменением pH или ионного состава среды и т. д.), что позволит прояснить вопросы, ранее «не имеющие» ответов, в области физических, химических и биологических наук. Это открывает новые возможности в понимании клеточных процессов, молекулярных механизмов развития патологий и действия лекарственных средств, а также в создании и изучении механических свойств различных синтетических материалов.

Обнаружение и идентификация единичных белков и их комплексов в биологическом материале имеет важное значение, например, для протеомики, в частности клинической, что обусловлено необходимостью создания новых систем диагностики заболеваний и их лечения, так как подавляющее количество типов

функциональных белков, которые могут быть и маркерами заболеваний, присутствуют в плазме крови в крайне низких концентрациях, вплоть до нескольких молекул.

В развитии микроаналитических систем можно выделить следующие этапы: биосенсоры (1960–70-е гг.); биологические и микрофлюидные чипы (1980–90-е гг.); наносенсоры, наночипы (настоящее время).

Биосенсоры представляют собой аналитические устройства, в которых для распознавания аналита используется биологический чувствительный элемент, возникающие при их взаимодействии физико-химические изменения преобразуются с помощью трансдюсера в другой сигнал, который можно легко измерить. В качестве распознающего элемента могут быть как биологические компоненты (ферменты, ДНК, антитела, клетки и др.), так и биомиметические структуры (миметики антител – аптамеры, молекулярные импринты, аффибоди, синзимы – синтетические низкомолекулярные аналоги ферментов). В отличие от других биоаналитических систем биосенсоры не требуют дополнительных шагов обработки пробы, таких как добавление реагентов. Биосенсоры позволяют определять аналиты в комплексной пробе при отсутствии или минимальной пробоподготовке. Первым биосенсором был ферментный электрод для определения глюкозы, запатентованный американским ученым Лиландом С. Кларком в 1962 г.

Развитие микро- и нанотехнологий способствовало миниатюризации биосенсоров, с одной стороны, и появлению таких микроаналитических устройств, как чипы, с другой стороны. Идея аналитического чипа вытекает из микроэлектроники, где чип представляет собой комбинацию множества электронных компонентов на миниатюрной пластине из полупроводящего материала (обычно кремния), позволяющих выполнять большое количество операций.

В настоящее время в биоаналитике используют два различных вида аналитических чипов – биочипы (англ. *biochips*), для которых в англоязычной литературе более распространено название «микромножество» (англ. *microarray*); и микрофлюидные чипы (англ. *microfluidic chips*), получившие название «лаборатория-на-чипе» (англ. *Lab-on-a-Chip, LOC*) или «микроаналитическая система полного анализа» (англ. *micro-Total Analysis System, microTAS*).

Микрофлюидный чип (МФЧ), или «лаборатория-на-чипе», – микрофлюидное устройство, представляющее собой микропластину площадью несколько квадратных сантиметров с развитой сетью микроканалов (до 10^6), позволяющих манипулировать малыми количествами (10^{-9} – 10^{-15} л) жидкости (флюидами). МФЧ осуществляет общие функции макроскопической лаборатории, так как на нем проводится полный анализ пробы. Для этого на МФЧ, помимо каналов, формируются различные функциональные элементы (смесители, фильтры, реакционные камеры, датчики, насосы и т. п.), что позволяет проводить различные операции с микроколичествами жидкой пробы (очистка, концентрирование, транспортировка, смешивание с реагентами, разделение на отдельные компоненты, детектирование). При этом возможно осуществлять управление и контроль на всех стадиях анализа. Объединение всех аналитических этапов в одном компактном устройстве дает возможность осуществлять анализ пробы в микроформате с высокой чувствительностью, точностью и экспрессностью.

Первой микроаналитической системой был газовый хроматограф, разработанный в 1975 г. в Стэнфордском университете С. Терри (S. Terry), который разделял простую смесь компонентов в течение секунд. Это устройство на одной кремниевой пластине включало клапан ввода и разделительную колонку, а на другой пластине, соединенной механически с первой, располагался детектор по теплопроводности. В 1980-е гг. благодаря развитию микроэлектроники и других наукоемких технологий на кремниевых подложках стали создавать отдельные функциональные модули (миниатюрные клапаны, насосы и инжекторы), что стало преддверием появления микроаналитических устройств.

Важной вехой в развитии аналитических микрочипов стала концепция, предложенная в 1990 г. А. Манцем в работе «Микрохимические системы полного анализа (A. Manz. Microchemical Total Analysis Systems). Фундаментальная роль в данной концепции была отведена миниатюризованным системам полного химического анализа, а именно кремниевым чипам, объединяющим на одной подложке все стадии анализа – пробоподготовку, разделение и детектирование компонентов. Несколькими годами позже (1992–1993) исследовательская группа А. Манца продемонстрировала на практике микрофлюидный стеклянный чип, с помощью которого, используя принцип капиллярного электрофореза, разделяли аминокислоты за 4–15 с. И уже в 1994 г. в Нидерландах состоялась первая Международная конференция по вопросам микроаналитических систем полного анализа (International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences in Enschede, The Netherlands).

Другой вид аналитических чипов – *биологические чипы* (биочипы), которые могут быть двух видов – планарные и жидкостные (суспензионные). Планарный биочип представляет собой твердую микроматрицу (пластинка из стекла, кремния или пластика со стороной 5–10 мм), к которой прикреплено множество (10^4 – 10^6 на 1 см^2) различных биологических (ДНК, олигонуклеотиды, белки) или биомиметических молекул (аптамеры). Жидкостный биочип представляет собой суспензию микрочастиц, на поверхности которых иммобилизованы биомолекулы. Принцип работы биочипов, как и у биосенсоров, базируется на биоспецифическом распознавании аналитов, но в отличие от биосенсора биочип позволяет одновременно анализировать множество различных компонентов в одной пробе. На биочипах одновременно могут протекать сотни или тысячи биохимических реакций. Биочип состоит из множества индивидуальных биосенсоров, что позволяет одновременно определять большое количество аналитов в одной пробе и получать различную информацию (мультиплексный анализ). Поэтому биочипы и получили в англоязычной литературе название «биосенсорное множество». Кроме того, биочипы позволяют проводить высокопропускной скрининг большого числа различных соединений.

Прообразом современных ДНК-чипов послужил саузерн-блот, изготовленный в 1975 г. Э. Саузерном (E. Southern). Ученый использовал меченую нуклеиновую кислоту для определения специфической последовательности фрагментов ДНК, зафиксированных на твердой подложке (нейлоновая мембрана). В 1979 г. этот подход был адаптирован Д. П. Гергеном и соавторами (J. P. Gergen [et al.]) для создания с помощью механического устройства упорядоченных массивов ДНК на квадратах из фильтровальной бумаги, которые можно было повторно исполь-

зовать несколько раз. В 1982 г. Л. Аугенлихт и Д. Кобрин (L. Augenlicht, D. Kobrin) использовали подобный ДНК-массив для исследования экспрессии генов в раковых тканях. Ранние генные массивы получали путем нанесения малых капель раствора комплементарной ДНК (раскапывание) на фильтровальную бумагу. В начале 1990-х гг. группа Г. Лехраха (H. Lehrach) разработала роботизированную систему для автоматизации этого процесса.

В 1994 г. С. П. Фодор (S. P. Fodor [et al.]) в компании «Affymetrix» (США, Калифорния, основана в 1992 г.) продемонстрировал технологию создания ДНК-множества «*in-situ*» (лат. «на месте»). Путем комбинирования фотолитографии и фотохимического синтеза был получен массив из 256 различных олигонуклеотидов с высокой плотностью на твердой подложке.

В 1995 г. в журнале «Science» М. Шена (M. Schena) и его коллеги из Стэнфордского университета опубликовали результаты первого параллельного исследования экспрессии многих генов с помощью ДНК-микрочипа. Массив комплементарных ДНК на стеклянной пластине был получен с помощью высокоскоростной роботизированной печати (контактной). В статье использовано слово «микрочип», и это своеобразное представление микромножеств (чипов) в качестве новой научной технологии. М. Шена был провозглашен учеными «отцом технологии микрочипов» (2003). Технология не была коммерциализирована, и лаборатория Стэнфордского университета опубликовала инструкции по созданию робототехники, необходимой для микрочипа. Хотя сегодня существуют коммерческие варианты микрочипов с большей чувствительностью, простое производство микро-массивов позволило легко проводить эксперименты в лабораториях. В настоящее время лидером в производстве ДНК-чипов является фирма «Affymetrix», которая предложила чип с 1,2 млн распознающих элементов. В России ученые начали активно разрабатывать тему ДНК-биочипов в конце 1980-х гг. в Институте молекулярной биологии под руководством А. Д. Мирзабекова.

Идея миниатюризации иммунного анализа для диагностики была высказана в 1963 г. Д. Г. Фейнбергом и А. В. Велером (J. G. Feinberg, A. W. Wheeler) для анализа использовали антитела, иммобилизованные в микроспотах. Концепция и методология иммунных микрочипов (разновидность белковых чипов) впервые была представлена С. В. Чангом (Tse Wen Chang, США) в 1983 г. Чанг ввел термин «матрица антител» и для проведения множества параллельных иммунных анализов предложил конфигурацию измерительного устройства, в котором «массив» антител располагался на небольших стеклянных пластинах. Ученый продемонстрировал, что сетка из пятен антител (10×10 , всего 100, и 20×20 , всего 400) может быть расположена на поверхности размером $1 \times 1 \text{ см}^2$. Теоретические основы анализа, базирующегося на использовании белковых чипов, были разработаны Р. П. Экинсом (R. P. Ekins) в 1989 г. Экинс в своей теории (англ. *the ambient analyte theory*) постулировал, что миниатюризация иммунологического анализа (т. е. уменьшение концентрации антитела, связывающего аналит) значительно снижает предел обнаружения. Экинс изложил основные принципы микрочипового мультиплексного анализа и предусмотрел его потенциальное применение в научных исследованиях и клинической диагностике.

Первое сообщение об использовании белковых чипов для изучения белок-белковых взаимодействий было сделано в 2000 г. (G. MacBeath and S. L. Schreiber; H. Zhu [et al.]).

Анализ с помощью чипов обладает рядом преимуществ. Прямое следствие миниатюризации — снижение объема пробы (нанол-фемтол) и расхода реагентов (несколько мкл), что приводит к снижению стоимости одного анализа. Достоинства чипов — быстрый анализ, высокая пропускная способность (скрининг до 10^6 соединений в день), параллельный анализ множества проб. Биосенсоры и микроаналитические устройства дают возможность проведения как экспресс-анализа непосредственно на месте (англ. *at the point of care*) (например, определение токсинов или вирусов в крови в месте нахождения больного за минуты, используя переносное устройство), так и мультиплексного анализа.

Аналитические чипы все чаще применяют для химических и биохимических исследований в области клинической диагностики, фармацевтики, экологии и пищевой промышленности (например, этикетки на продовольственных упаковках изменяют цвет, если истек срок годности продукта и он испортился, или легко определить генно-модифицированную еду). Так, микрочиповые системы позволяют исследовать молекулярную структуру живых клеток в естественных условиях в режиме реального времени (*in vivo*) в противоположность анализу образцов, приготовленных в лаборатории, что часто приводит к некрозу клеток или изменению морфологии и функции клеток в результате процедуры их извлечения и обработки в искусственной среде (*in vitro*). Это дает возможность, например, более глубокого понимания молекулярных механизмов развития патологий.

Лидеры в производстве биосенсоров и микрочипов — США, Германия, Япония, Китай.

Современной тенденцией в развитии микроаналитических устройств является применение достижений нанотехнологий. Синтетические наноразмерные структуры стали широко использовать в биосенсорах и микроаналитических устройствах (биочипах и МФЧ).

Основы нанотехнологий заложены лауреатом Нобелевской премии физиком Р. Фейнманом, который в 1959 г. представил в американском Физическом обществе свой доклад «Там, внизу, еще много места». Он рассмотрел принципиальную возможность манипулирования материей на атомном уровне, включая исследование и контроль в нанометровом диапазоне. Термин «нанотехнология» был введен профессором Токийского университета Норио Танигучи в 1974 г. в контексте обработки материалов путем добавления или удаления атома или молекулы. Наноструктуры (греч. *drorf* — карлик) имеют хотя бы один характерный размер в интервале от 1 до 100 нм (например, атом водорода имеет размер 0,1 нм, молекула — ~0,5 нм). Надо отметить, что этому интервалу принадлежат размеры большинства биологических частиц (например, размер вируса ~100 нм).

Наноразмерные материалы из-за квантовых эффектов, вызванных малыми размерами и большой площадью поверхности (большое соотношение поверхность/объем), обладают уникальными механическими, оптическими, электрическими и магнитными свойствами. Для наноматериалов характерен значительный рост удельной поверхностной энергии. Физические свойства (размер, форма, состав) наночастиц можно легко модулировать химически. Наночастицы склонны к агломерации, их можно легко функционализировать (т. е. присоединить к их поверхности различные биомолекулы), они биосовместимы. Благодаря различию в свойствах наноструктуры подходят для проведения мультиплексного анализа.

В биосенсорах и микроаналитических устройствах применяют наночастицы (0D), нанопроволоки и нанотрубки (1D), наноструктурированные поверхности (2D), наноструктурированные комплексные структуры (3D). Наноматериалы используют:

- для детектирования (в том числе для одномолекулярного) оптического – как специфические метки в качестве спектральных маркеров (наночастицы благородных металлов, квантовые точки, одностенные углеродные нанотрубки), электрохимического – для модификации электродов (углеродные нанотрубки);
- управления движением молекул и частиц (нанонасосы) и переноса иммобилизованных объектов (магнитные наночастицы);
- концентрирования, разделения и фильтрации проб (нанопористые мембраны, микроколонки, нанопоры, углеродные нанотрубки в качестве сорбентов);
- создания большой активной поверхности для смешивания проб, проведения реакций, теплообмена и т. п. как элементы для воздействия на пробу (локальный нагрев пробы).

Применение наноструктур в биосенсорах привело к появлению высокоэффективных устройств с улучшенными аналитическими параметрами. Биосенсоры, в которые для улучшения характеристик трансдюсеров вводят нанофотонные (наночастицы благородных металлов, фотонные кристаллы), наноэлектронные (на базе квантово-размерных структур), наноэлектрохимические (нанометаллические электроды) или наномеханические (наноиглы) элементы, относят к наносенсорам.

Важной особенностью аналитических чипов является то, что их можно использовать многократно, комбинировать друг с другом в единую систему, встраивать в аналитические системы со сложной архитектурой (интеграция в устройства новых функциональных модулей). В настоящее время в биоанализе широко практикуются различные комбинации аналитических чипов с высокоэффективной жидкостной хроматографией (ВЭЖХ), капиллярным электрофорезом, а также масс-спектрометрией (МС) с «мягкими» методами ионизации (МАЛДИ МС, электроспрейная МС). Так, тандем биочипов и МАЛДИ МС привел к созданию такого метода, как время пролетная масс-спектрометрия с поверхностно-усиленной лазерной десорбцией/ионизацией пробы (*surface-enhanced laser desorption/ionization, SELDI-TOF MS*) для анализа белков и полипептидов. Данный метод позволяет анализировать одновременно до 10 тыс. индивидуальных белков в одном образце, фиксируя при этом мельчайшие сдвиги в их концентрациях под влиянием различных факторов. Микрофлюидные чипы задействуют на стадии пробоподготовки, что позволяет эффективно выделить, разделить и сконцентрировать компоненты сложной пробы, а затем проанализировать их с помощью МАЛДИ или электроспрейной МС. Особенно это важно в случае анализа малых объемов (нано, пико) с крайне низкой концентрацией аналита (10^{-18} М). Применение макрометодов в этом случае делает пробоподготовку невозможной или сложной, трудоемкой и времязатратной, при этом постоянно существует угроза потери аналита на различных стадиях.

1.1. ПРИНЦИП ДЕЙСТВИЯ И ОБЩАЯ КЛАССИФИКАЦИЯ

В настоящее время биосенсорика (*biosensor*, от греч. *bio(s)* – жизнь и лат. *sensus* – чувство) представляет собой междисциплинарную область, базирующуюся на фундаментальной физике, химии, биологии и достижениях в материаловедении, инженерии, электронике и информатике. Биосенсорика стала развиваться в середине 70-х гг. XX в. как отдельная отрасль биотехнологии на стыке с аналитической химией. Вехами в этом процессе стали основание в 1985 г. журнала «Biosensors» и проведение в 1990 г. в Сингапуре первого международного конгресса «1st World congress on biosensors». История развития биосенсорики представлена в таблице. Первым биосенсором был амперометрический ферментный электрод для определения глюкозы, запатентованный американскими учеными Л. К. Кларком (L. C. Clark) в 1962 г. Первый коммерческий биосенсор для определения глюкозы появился в 1975 г., в настоящее время оборот ферментных электродов для определения глюкозы в крови на мировом рынке составляет десятки миллиардов долларов США в год. Немецкий исследователь К. Камманн в 1977 г. впервые использовал термин «биосенсор», определение которого было дано в ИЮПАК в 1997 г. и уточнялось в последующие 1999–2001 гг.

История развития биосенсорики

Год	Событие
1916	Первое сообщение об иммобилизации белков: адсорбция инвертазы на активированном угле
1922	Первый стеклянный рН-электрод
1956	Американский биохимик Л. К. Кларк опубликовал свою фундаментальную работу о кислородном электроде
1962	Первое описание биосенсора – амперометрический ферментный электрод для определения глюкозы (тонкий слой фермента на поверхности электрода был защищен полунепроницаемой мембраной) (Л. К. Кларк)
1969	Опубликовано описание потенциометрического электрода для определения мочевины с использованием иммобилизованной уреазы и рН-чувствительного сенсора Г. Гильбо, Ж. Монтальво (G. Guilbault, J. Montalvo)

Год	Событие
1970–1972	Первый химический сенсор на основе ион-чувствительного полевого транзистора для определения ионов в нервных тканях – П. Бергвельд (P. Bergveld)
1973	Первый биосенсор для определения лактата – У. Миндт, Ф. Расин (W. Mindt, Ph. Racine) (компания «Hoffmann-La Roche Ltd., Switzerland», Швейцария)
1974	Применение термистора в качестве трансдьюсера для биосенсора: К. Мосбах, Б. Даниэльсон (K. Mosbach, B. Danielsson)
1975	Впервые Д. В. Лубберс, Н. Опитц (D. W. Lubbers, N. Opitz) ввели термин «оптод», чтобы описать волоконно-оптический датчик с иммобилизованным индикатором для измерения CO ₂ и O ₂ . Первый коммерческий биосенсор для определения глюкозы, основанный на амперометрическом определении гидропероксида (Yellow springs Instruments Company, Ohio, USA). Первый микробный биосенсор, использовали электрод с иммобилизованными бактериями для определения спирта: К. Дивиес (C. Diviès). Первый иммуносенсор с потенциометрическим трансдьюсером – Дж. Джаната (J. Janata)
1976	Первый иммуносенсор с амперометрическим трансдьюсером М. Айзава (M. Aizawa)
1980	Первый сенсор на основе оптического волокна для определения газов в крови <i>in vivo</i>
1982	Первый оптоволоконный биосенсор для определения глюкозы: Дж. С. Шульц (J. S. Schultz). Впервые описано применение игольчатого ферментного электрода, который можно имплантировать под кожу – М. Шичири (M. Shichiri [et al.])
1983	Опубликованы основы применения технологии поверхностного плазмонного резонанса (ППР) для биосенсорике, разработан первый иммунный биосенсор на основе данного эффекта: В. Лидберг, С. Ниландер, И. Лундстрем (B. Liedberg, C. Nylander, I. Lundstrom). Газовый биосенсор на основе кварцевого кристаллического микробаланса
1984	Первый ферментный амперометрический биосенсор с использованием медиатора (ферроцена) для определения глюкозы: Г. Касс и соавторы (G. Cass [et al.])
1987	Первый портативный электрохимический биосенсор для самоконтроля глюкозы в крови размером с шариковую ручку (the MediSense ExacTech™)
1990	Коммерческий ППР-биосенсор (the Pharmacia BIACore)
1992	Запуск i-STAT портативного переносного анализатора крови (англ. <i>hand-held blood analyser</i>) (Abbott Point of Care Inc., Princeton, NJ, USA).
1998	Быстродействующий глюкозный биосенсор (LifeScan FastTake blood glucose biosensor). Первое электрохимическое устройство, разработанное специально для активного образа жизни, исключает использование ланцета. Капля крови извлекается автоматически. Запуск экспресс-тестов «Glucocard Test Strip» для самоконтроля уровня глюкозы в крови (Self-monitoring of blood glucose). Разработка первого коммерческого электрохимического игольчатого биосенсора для непрерывного мониторинга глюкозы (Датчик непрерывного контроля глюкозы, <i>Medtronic Minimed Inc.</i>)

Год	Событие
2000	Запуск первого носимого неинвазивного (неразрушающего) глюкозного биосенсора (GlucoWatch). Устройство, подобное часам, базировалось на трансдермальной экстракции межклеточной жидкости посредством обратного ионофореза. Был отозван в 2008 г., так как имел большую погрешность, вызывал раздражение кожи
2008	HLAB-2020, биосенсоры для определения пищевых аллергенов (Hanson Technologies); липидный анализатор ICA-LG400 (ферментный электрод) для определения холестерина, триглицеридов, фосфолипидов (Toyo Jozo)
2011	ППР-биосенсор для определения витаминов и пищевых контаминантов (Q Biacore, General Healthcare, USA)
Настоящее время	Нанобиосенсоры, использующие квантовые точки, наночастицы, наноканталеверы, нанопроволоки и т. д.)

Согласно определению Международного союза теоретической и прикладной химии (ИЮПАК, англ. *International Union of Pure and Applied Chemistry, IUPAC*) биосенсор (БС) это автономное комплексное устройство, которое способно обеспечить получение специфической количественной или полуколичественной аналитической информации, используя биологический распознающий элемент (биохимический рецептор), находящийся в непосредственном пространственном контакте с физико-химическим преобразователем.

Главная особенность БС заключается в том, что данное устройство детектирует специфический аналит в пробе и преобразовывает его присутствие и концентрацию в удобный для регистрации и обработки сигнал, обычно оптический или электрохимический. В идеале БС не требует предварительной подготовки пробы, а его отклик на концентрацию аналита не зависит от остальных макро- и микрокомпонентов, присутствующих в пробе. Необходимые для биохимического взаимодействия реагенты интегрированы в сенсорное устройство. В отличие от биосенсоров другие биоаналитические системы для получения аналитической информации требуют дополнительных технологических операций, таких как добавление реагентов или предварительное разделение компонентов (например, с помощью препаративной хроматографии). Биосенсор может быть составной частью интегрированной системы. Например, ВЭЖХ-система может включать БС в качестве детектирующего устройства.

Биосенсор является аналитическим устройством, конструктивно состоящим из следующих функциональных блоков (рис. 1):

- биологический распознающий элемент (биорецептор или биокомпонент) – чувствительный биологический компонент, который специфично взаимодействует с искомым аналитом, в результате чего происходят изменения физические (температура, интенсивность светового потока, масса, электрический ток или потенциал) или химические (образование низкомолекулярных продуктов, например, кислорода, углекислого газа, аммиака, пероксида водорода). Биорецептор «распознает» специфическое для него вещество в многокомпонентной смеси с высокой степенью селективности. Биорецептор обычно иммобилизован на поверхности трансдьюсера;

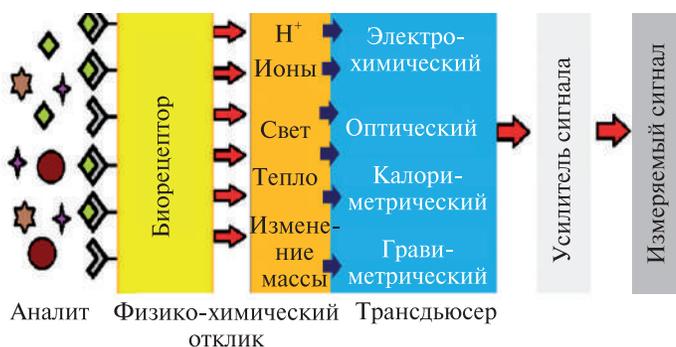


Рис. 1. Схема биосенсора

- физико-химический преобразователь (трансдюсер, англ. *transducer*) – датчик, который регистрирует физико-химические изменения, происходящие в результате биохимической реакции биорецептора с аналитом, и преобразует их в форму измеряемого электрического сигнала. Трансдюсер является детектором биосенсорной системы;

- электронная система для усиления сигнала трансдюсера (аналого-цифровой преобразователь и т. п.) и отображения результатов.

Биосенсор дает сигнал, пропорциональный концентрации аналита в пробе.

Различные виды иммобилизованных биологических элементов (биорецепторов) можно комбинировать с различными преобразователями (трансдюсерами). Это позволяет создавать большое разнообразие различных типов биосенсоров.

В создании биосенсора можно выделить два главных этапа. Сначала подбирается биорецептор, распознающий требуемое вещество, и определяется выходной параметр (например, изменение концентрации, массы системы, выделение теплоты, возникновение флуоресценции и т. д.). После этого осуществляется подбор трансдюсера, который способен эффективно преобразовать данный выходной.

Биосенсоры могут быть использованы для многократного или однократного определения. Устройства, которые должны быть заменены после одного измерения или не способные обеспечить быструю и воспроизводимую регенерацию после измерения, называются биосенсорами одноразового использования. Часто такие устройства называют биозондами, биоиндикаторами, но так как нет единого общепринятого понятия, то ИЮПАК рекомендует термин «биосенсор одноразового использования».

К *преимуществам* биосенсоров относится то, что их конфигурация существенно упростила аналитическую процедуру в сравнении с классическими анализаторами, позволив проводить простой и точный анализ в режиме безреагентного измерения, при этом существенно сократился объем анализируемой пробы. Анализ с помощью БС не требует пробоподготовки (или она минимальна), является высокоселективным. БС позволяет обнаружить аналит в мультикомпонентных пробах. При этом не нужны предварительные шаги по разделению компонентов и возможно относительно простое определение сложных соединений. БС дают возможность не только идентифицировать определенное химическое

соединение, но и установить его биологический эффект (токсичность, цито- или генотоксичность), что в некоторых случаях более значимо, чем химический состав. К тому же это позволяет избежать длительных экспериментов с животными. С помощью БС можно определить как общую концентрацию соединения, так и его биодоступность (биоэквивалентность), что имеет огромное значение для экомониторинга и фармацевтики. Современные БС имеют высокую чувствительность при незначительном потреблении реагентов и могут стоить недорого. БС устойчивы к большому числу внешних воздействий, они имеют малые размеры и массу, небольшую потребляемую мощность, способность работы в автоматическом автономном и непрерывном режиме.

Недостатки биосенсоров обусловлены тем, что биологический слой уязвим по отношению к экстремальным условиям (высокая температура, очень высокий или низкий показатель pH, высокая концентрация солей, присутствие органических растворителей). Вследствие этого отдельные БС имеют короткий срок жизни и малую стабильность при длительном хранении.

Биосенсоры широко *применяют в различных областях*. В медицине — для диагностики как в больницах, так и дома, например, определение содержания глюкозы при диабете и белков при заболевании почек, в спорте — для контроля лактата у спортсменов. В биотехнологии — для мониторинга концентрации компонентов в ферментаторах, в криминалистике — для идентификации наркотиков и ядов, в системе безопасности и защиты от терроризма — для определения химических и биологических средств поражения. Биосенсоры используют для мониторинга окружающей среды, для охраны которой в настоящее время нужно контролировать свыше 200 опасных компонентов в воде, воздухе и почве. В одной питьевой воде требуется регулярный контроль до 50 важных опасных веществ. Особенно сложные задачи возникают перед аналитикой в связи со снижением предельно допустимых концентраций многих соединений. В области производства продуктов питания и сельского хозяйства БС используют, например, для контроля свежести рыбы, зрелости фруктов, свежести и возраста молока и сыров, а также содержания в них антибиотиков, пестицидов и т. п.

В целом БС должен удовлетворять следующим требованиям: простота в эксплуатации, дешевизна, высокие точность и селективность, малое время анализа. *Развитие* современной биосенсорики базируется на расширении и освоении новых распознающих элементов и трансдюсеров, а также повышении интеграции и миниатюризации. Разработка миниатюрных БС базируется на достижениях нанотехнологий. Наноразмерные материалы (углеродные нанотрубки, синтетические полимеры, наночастицы металлов и др.) являются перспективными структурными и/или преобразующими компонентами биосенсоров благодаря необычной структуре и физико-химическим свойствам. Наноматериалы служат основой улучшения существующих биосенсоров, а также создания принципиально новых наноструктур.

Классификация биосенсоров. БС могут быть классифицированы по составу специфической биологической системы распознавания аналита, по способу распознавания аналита и по принципу преобразования физико-химического сигнала.

Разделение БС *по виду компонента для распознавания* аналита. Распознающий элемент биосенсора находится в непосредственном контакте с исследу-

емым образом, именно он отвечает за химические и биохимические реакции, протекающие в процессе анализа. Основное предъявляемое к ним требование – способность улавливать определенный аналит и не реагировать на посторонние вещества, присутствующие в образце. Биоконпоненты, используемые в БС, очень разнообразны.

В качестве биологического распознающего компонента могут быть биологические макромолекулы либо сложные биологические структуры и системы. Наряду с природными молекулами в качестве распознающих компонентов могут быть их синтетические аналоги, так называемые биомиметические структуры – аптамеры, импринты, синзимы, аффибоди и т. д.

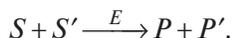
Вид используемых рецепторных систем сенсора определяет его название:

- ферменты – ферментные сенсоры;
- антигены, антитела – иммуносенсоры;
- нуклеиновые кислоты – ДНК-сенсоры;
- рецепторы – рецепторные сенсоры;
- клеточные органеллы (митохондрии, клеточные стенки и др.) – органелльные сенсоры;
- микроорганизмы – микробиологические сенсоры;
- клетки – клеточные сенсоры;
- ткани – тканевые сенсоры;
- аптамеры – аптамерные сенсоры и т. д.

Взаимодействие распознающего рецептора с искомым аналитом приводит к химическим (образование или расход соединений) или физическим (масса рецепторного слоя, диэлектрические свойства среды (т. е. ее показатель преломления), температуры и др.) изменениям, которые регистрируются трансдюсером.

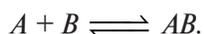
По способу распознавания аналита БС могут быть каталитическими и аффинными.

Каталитические БС основаны на распознавании молекул биокатализатора-ми, т. е. ферментами, и их последующем преобразовании в биохимической реакции в продукты. В данном случае аналиты являются субстратами ферментативно-катализируемых реакций. Аналит (субстрат S) в присутствии фермента E превращается в продукт P по следующей схеме:



Детектирование аналита основывается на доказательстве образования продукта P или расходе ко-субстрата S' . В качестве аналитов также могут выступать ингибиторы (пестициды, яды и т. п.) или активаторы (лекарства и т. п.) ферментов. С помощью каталитического БС можно контролировать непосредственно концентрацию аналита или его скорость расхода/образования в реакции.

Аффинные БС базируются на явлении высокоизбирательного связывания биологических молекул, в основе которого находятся равновесные реакции вида



В таких реакциях не образуется новых продуктов, а происходит связывание реагирующих молекул в комплекс AB . Образование комплекса приводит к изменению физических свойств (коэффициент экстинкции, толщина слоя, по-

верхностное натяжение, показатель преломления) и может регистрироваться соответствующими методами. В природе существует несколько типов аффинных взаимодействий. Наиболее распространено использование в анализе иммунохимической реакции высших организмов, основанной на высокоспецифическом взаимодействии антител с антигенами. В ответ на попадание в организм чужеродных веществ (антигенов) начинается синтез антител к этим веществам для их нейтрализации. Другим типом аффинных взаимодействий, нашедшим широкое применение в биосенсорах, является связывание комплементарных цепей молекул ДНК. В таких сенсорах рецепторный слой состоит из одноцепочечных фрагментов ДНК – олигонуклеотидов, способных улавливать из анализируемого раствора комплементарные им цепи.

При разработке аффинных БС следует учитывать то, что аффинные взаимодействия часто имеют высокие значения константы ассоциации, т. е. слабообратимы, и использующие их распознающие элементы часто являются одноразовыми или требуют специальных методов регенерации.

В БС в качестве биораспознающих элементов, кроме отдельных молекул, могут использоваться различные надмолекулярные структуры биологической природы (органеллы, клетки, ткани и т. п.). Формирование ответа таких распознающих структур на присутствие аналита в пробе основывается на биохимических реакциях как биокаталитического, так и биоаффинного типа. Примером служат микробиологические БС. Их функционирование основано на том, что аналит, как правило, влияет на активность ферментной системы сложного биологического компонента, что приводит к изменению его метаболизма (например, выделяется аммиак, изменяется потребление кислорода и т. п.).

По типу трансдьюсера БС могут быть подразделены на четыре основные группы: электрохимические, гравиметрические (или масс-чувствительные), оптические и калориметрические. В основу работы *электрохимических* БС положены превращения определяемого аналита в электрохимической ячейке, вырабатывающей аналитический сигнал. К таким сенсорам относятся потенциометрические (ионселективные электроды или полевые транзисторы и т. д.), амперометрические, вольтамперометрические, импедансометрические, кондуктометрические.

Масс-чувствительные, или *гравиметрические*, БС регистрируют изменения массы в результате биохимического взаимодействия. К ним относятся сенсоры на поверхностных акустических волнах или пьезокварцевые микробалансы, основанные на изменении скорости распространения акустических волн или частоты колебаний пьезоэлементов при селективной сорбции определяемого вещества на чувствительной поверхности или электродах. К этой группе также относятся микрокантилеверные сенсоры – датчики, чрезвычайно чувствительные к силовому воздействию.

Калориметрические (или термометрические) БС регистрируют изменение теплоты в ходе взаимодействия биорецептора и аналита. К данной группе БС относятся сенсоры, работающие на основе термисторов.

Оптические БС используют зависимость оптических свойств сред от концентраций определяемых веществ. Они регистрируют поглощение или отражение светового потока, изменение в показателе преломления, интенсивность люминесценции. К данной группе относятся флуорометрические, колориметрические

ские, эллипсометрические сенсоры, а также датчики, основанные на поверхностном плазмонном резонансе, интерферометрии и др.

Детектирование взаимодействия аналита с распознающим рецептором возможно *прямым* или *непрямым* способом. В первом случае трансдьюсер регистрирует непосредственно изменение, происходящее в ходе связывания аналита с биорецептором. Как правило, для прямых трансдьюсеров используют аффинные биокомпоненты, а именно антитела, ДНК. Присоединение аналита к биорецепторному слою вызывает изменение физических параметров в слое сенсора. Это может быть изменение потенциала или проводимости, массы, поглощение или отражение света, которые регистрируются соответствующим трансдьюсером. К распространенным БС, в которых измерение осуществляется прямыми методами, относятся оптические сенсоры на основе поверхностного плазмонного резонанса и нарушения полного внутреннего отражения света, гравиметрические БС – электромеханические, основанные на пьезоэлектрических элементах (кварцевый резонатор), и механические (микрочантилеверный).

Непрямое детектирование базируется на использовании маркированных реагентов для визуализации биоспецифических взаимодействий.

Один из реагентов маркируется, т. е. в его состав вводится соединение (метка), изменение физико-химических свойств которого служит аналитическим сигналом. При этом сигнал метки пропорционален концентрации аналита в пробе. В качестве соединений-маркеров могут быть ферменты, флуорофоры, радиоактивные изотопы, люминофоры, наноструктуры (магнитные НЧ, Au-НЧ, квантовые точки, УНТ и др.). Однако методы, основанные на использовании меченых лигандов, обладают рядом недостатков. В первую очередь они более трудо- и времязатратные. Процедура присоединения маркера может привести к маркированию не только детектируемых молекул, но и других молекул в растворе, что приведет к искажению детектируемого сигнала и, следовательно, чувствительности анализа. Маркирование может повлиять на участок связывания биомолекулы и изменить ее сродство к молекуле аналита.

В настоящее время для улучшения производительности трансдьюсеров и их миниатюризации широко используют наноструктуры, обладающие уникальными физико-химическими свойствами вследствие их размера (1–100 нм). Биосенсоры, модифицированные наноматериалами (углеродные нанотрубки, нанопроволоки, наночастицы, тонкие пленки нанокристаллической структуры), называют условно *наносенсорами*.

Углеродные нанотрубки (УНТ) обладают замечательными электрическими, механическими и структурными свойствами. Их используют при производстве электрохимических ферментативных биосенсоров для модификации электродов. УНТ повышают электроактивность биомолекул и способствуют реакции переноса электронов от редокс-активных центров ферментов на трансдьюсер.

Наночастицы (НЧ) разных составов и размеров в последние годы используют для производства электрохимических, оптических или микрогравиметрических трансдьюсеров с целью улучшения их чувствительности. Например, отличная проводимость металлических НЧ способствует переносу электронов между окислительно-восстановительным центром ферментов и поверхностью электродов.

1.2. АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Биосенсор позволяет получить информацию о наличии и количестве искомого вещества в многокомпонентном образце. Надежность применения БС для определения аналита в сложных матрицах (т. е. на фоне присутствия большого числа других компонентов) оценивают по параметрам, установленным ИЮПАК (1999). К таким параметрам относятся калибровочные характеристики (чувствительность, рабочий и линейный диапазон измеряемых концентраций, предел обнаружения и предел количественного определения), селективность, воспроизводимость, операционная стабильность, время хранения и жизни, время отклика и регенерации, пропускная способность.

Отклик БС, как и любого другого прибора, в отношении количества аналита должен быть известен и оцениваться в определенном диапазоне концентраций. Для определения аналитических характеристик БС используют зависимость величины аналитического сигнала от концентрации аналита. Для калибровки БС могут быть применены различные методы, которые базируются на использовании внешнего стандарта, внутреннего стандарта или добавки стандарта.

Метод внешнего стандарта (метод абсолютной калибровки) базируется на следующем. Готовят серию (5–8) стандартных растворов с известной концентрацией аналита, строят зависимость сигнала сенсора (R_s), скорректированного по сигналу холостой пробы, или «бланка» (от англ. *blank*, R_{bl}), относительно концентрации аналита (c , моль/л). В случае некоторых типов БС для построения калибровочной кривой (градуировочного графика) используют зависимость $\Delta R/\Delta t - \Delta c$. Полученную калибровочную кривую используют для определения калибровочных параметров: коэффициента чувствительности, линейного и рабочего диапазона, предела обнаружения и предела количественного определения.

В биоанализе, как правило, пробы представляют собой по составу многокомпонентные смеси, для которых характерны свои значения рН, ионной силы и т. п. Термином «матрица» обозначают все присутствующие в реальном образце вещества, отличные от аналита. Влияние матрицы на детектирование искомого вещества в пробе может выражаться в том, что величина сигнала БС для одной и той же концентрации аналита в реальном образце и стандартном растворе будет различной.

В случае анализа сложных по составу проб калибровочные стандарты (метод внешнего стандарта) должны готовиться в той же матрице, что и матрица образцов, предназначенных для исследования. Для получения стандартных растворов, содержащих аналит в матрице, аналит в известной концентрации вносят в холостую пробу, представляющую собой биологическую или иную матрицу, не содержащую искомого вещества (т. е. «бланк матрицы»). Использование стандартных растворов, содержащих аналит в чистом растворителе (или буфере), позволяет получить информацию о влиянии матрицы на определение аналита. Например, глюкозу определяют в крови (цельной, плазме, сыворотке), моче, соках и др. Такие пробы различаются по своим химическим и физическим свойствам, а следовательно, их матрицы тоже различны. Однако получить оригинальные калиброванные матрицы удается не всегда, поэтому часто используют синтетические

матрицы. Если матрица данного образца обладает относительно постоянными физическими и химическими свойствами, не зависящими от того, когда и где был получен образец, то ее можно достаточно полно охарактеризовать и воспроизвести. Состав биологических жидкостей, таких как плазма крови или моча, известен, что позволяет создавать искусственные матрицы для проведения определенных анализов. Другой метод состоит в том, что для стандартов и исследуемого вещества создают матрицы примерно одинакового состава. Для этого к образцу и стандартам добавляют большое количество какого-либо «инертного» вещества, так что небольшие различия в других компонентах матрицы становятся несущественными. Влияние матрицы при этом не исключается, напротив, оно усиливается, но теперь это влияние в исследуемом образце и стандарте практически одинаково.

Для учета влияния матрицы на детектирование аналита для калибровки БС могут быть использованы как метод внутреннего стандарта, так и метод добавленных стандартов. *Метод внутреннего стандарта* состоит в сравнении сигналов аналита и внутреннего стандарта. Вещество, используемое в качестве внутреннего стандарта, должно отсутствовать в анализируемом образце и представлять собой химический аналог определяемого вещества, быть инертным по отношению к компонентам анализируемой пробы и хорошо в ней растворяться. Внутренний стандарт должен определяться по той же методике, что и аналит, его сигнал должен быть близким сигналу аналита и хорошо с ним разрешенным. Например, для определения натрия в плазме крови в качестве внутреннего стандарта часто используют литий, поскольку он химически аналогичен натрию и в крови обычно отсутствует. На практике внутренний стандарт (S) в строго одинаковом количестве вводят в исследуемые образцы, «бланк» и стандартные растворы аналита (A). Для построения калибровочной кривой получают отношение (q) сигналов аналита (A_A) и внутреннего стандарта (A_S) и затем строят зависимость в координатах $q - x$, где x – отношение концентраций аналита $[A]$ и стандарта $[S]$, т. е. $q = f(x)$, в идеальном случае $q = bx$. На первом этапе определяют фактор (F), используя выражение $A_A/[A] = F(A_S/[S])$. На втором этапе определяют неизвестную концентрацию аналита в пробе.

В *методе добавленных стандартов* для приготовления стандартных растворов используют исследуемый образец. Существует два подхода. В первом случае готовят серию растворов, в которых содержится одинаковое неизвестное количество аналита и возрастающее количество стандартного вещества. Исследуемый образец, в котором нужно определить аналит, размножают, т. е. делят на равные объемы (V_x). Так получается n проб (например, четыре) с одинаковой неизвестной концентрацией аналита (c_x), одну из которых оставляют без изменения. В другие ($n-1$) пробы добавляют различные объемы ($V_{ст1} < V_{ст2}$ и т. д.) стандартного раствора аналита с фиксированной концентрацией ($c_{ст}$). В итоге все имеющиеся пробы доводят до одинакового объема ($V_{общ}$) (эксперимент с постоянным объемом) и получают серию растворов с градиентом концентрации аналита ($c_x, c_x + c_{ст1}$ и т. д.). Сигнал измеряют для всей серии растворов и строят калибровочную кривую.

Предположим, что мы хотим определить содержание натрия в плазме крови. Исходный исследуемый образец делят на несколько равных частей, например на четыре. К одной из них ничего не добавляют (концентрация аналита c_x), к трем другим добавляют возрастающие количества стандарта (в данном случае Na), так что концентрация аналита в образцах становится соответственно $(c_x + c_{ст1})$, $(c_x + c_{ст2})$, $(c_x + c_{ст3})$, т. е. концентрация аналита в пробе прирастает. Далее определяют Na во всех полученных растворах и строят график зависимости сигнала от прироста концентрации. Из графика определяют концентрацию натрия в исходном образце.

Во втором случае измеряют сигнал одного образца (объем V_x) с неизвестной концентрацией аналита (c_x), затем в него добавляют определенный объем стандарта ($V_{ст}$) с известной концентрацией ($c_{ст}$) и снова измеряют величину сигнала. Далее еще несколько раз последовательно добавляют стандарт и детектируют сигнал после каждого добавления, а затем строят калибровочную кривую. В каждом случае сигнал измеряют в различных объемах раствора (эксперимент с варьируемым объемом), но в одном контейнере (измерительной ячейке или емкости).

Рабочий диапазон. Калибровочная кривая должна охватывать диапазон концентраций, которые необходимо определять в исследуемых пробах. Наименьшая и наибольшая концентрация, при которых могут быть получены статистически приемлемые результаты анализа, определяют *рабочий диапазон* измеряемых концентраций. По сути, рабочий диапазон – это диапазон концентраций, в пределах которого применима данная методика. Требования к рабочему диапазону определяются конкретной задачей. Например, для измерения уровня глюкозы в крови рабочий диапазон метода должен включать все те значения концентрации глюкозы, которые встречаются как у здоровых людей, так и у диабетиков, т. е. составлять от 0,2 до 20 мМ (в идеальном случае от 0,1 до 50 мМ).

Линейный диапазон – это линейный участок калибровочной кривой, он отвечает области концентраций, в которой результаты наиболее надежны. При близких к предельным значениям (высокие и низкие) концентрациям рабочие кривые обычно становятся нелинейными. Это обусловлено ограниченными возможностями используемых БС. Если концентрация определяемого вещества попадает в нелинейную область высоких значений, то образец следует разбавить и анализ повторить.

Линейность (англ. *linearity*) методики (в пределах диапазона применения) дает возможность получать результаты, прямо пропорциональные количеству анализируемого вещества в образце. Если линейная зависимость наблюдается, то результаты обрабатывают подходящим статистическим методом, например методом наименьших квадратов. Линейная зависимость описывается уравнением

$$y = bc + y_0,$$

где y – величина отклика (сигнала) БС для данной концентрации c определяемого вещества; b – угловой коэффициент (соответствует коэффициенту чувствительности), представляющий собой отношение аналитического сигнала к определяемой величине (тангенс угла наклона калибровочной кривой); y_0 – точка пересечения с осью Y ; если калибровочная кривая проходит через начало координат, то $y_0 = 0$.

Степень корреляции калибровочной кривой с линейной зависимостью описывают с помощью коэффициента корреляции (R), как правило, значение R должно быть не менее 0,995 (чем ближе значение коэффициента корреляции к 1, тем сильнее связь между двумя случайными величинами).

В некоторых типах БС (например, иммунных, основанных на взаимодействии антитела и антигена) может быть нелинейная зависимость аналитического сигнала от концентрации аналита. В таких случаях для получения линейности данные следует подвергнуть предварительному математическому преобразованию (например, логарифмированию).

Чувствительность. Это понятие отражает способность аналитического метода обнаруживать разницу между различными количествами определяемого вещества. Величина этой разницы зависит от характера связи между измеряемым сигналом и количеством присутствующего аналита. Чувствительность сенсора характеризуется величиной изменения измеряемого (выходного) сигнала при данном изменении концентрации аналита, вызвавшего этот сигнал ($\Delta R/\Delta c$). По сути, чувствительность анализа – это минимальное изменение наблюдаемой (определяемой) величины, которое может быть зафиксировано на индикаторе прибора. Как правило, чем выше чувствительность, тем надежнее результаты. Следует отличать чувствительность от предела обнаружения – той минимальной концентрации аналита, которая может быть детектирована и измерена. Чувствительность выражается как производная аналитического сигнала по концентрации искомого компонента. Чувствительность БС определяют внутри линейного диапазона калибровочной кривой, а именно по углу наклона (α) начального линейного участка калибровочной кривой. Коэффициент чувствительности БС (S) рассчитывают как отношение аналитического сигнала (Y) к определяемой величине (концентрации, c) (или тангенсу угла наклона $\text{tg}\alpha$ градуировочного графика):

$$S = \text{tg}\alpha = dY/dc.$$

Угол наклона указывает на чувствительность определения, чем больше $\text{tg}\alpha$, тем чувствительнее метод. Большей чувствительности соответствует более крутой наклон калибровочной кривой, иначе говоря, отклик меняется сильнее при том же изменении концентрации. При меньшей чувствительности наклон калибровочной кривой меньше. В идеальном случае БС должен иметь постоянную чувствительность в широком диапазоне концентраций (от нуля до максимальной возможной в исследуемой пробе). Чувствительность сенсора определяется многими факторами, например толщиной биорецепторного слоя, эффективностью массопереноса частиц из пробы к чувствительному слою, наличием в пробе компонентов, влияющих на стабильность биорецепторного слоя и др. Если чувствительность излишне высока, диапазон концентраций, в котором можно вести анализ, будет очень узким. Чтобы попасть в этот диапазон, нужно очень тщательно готовить и разводить пробы. Если же чувствительность слишком низкая, методика не позволит распознать близкие концентрации анализируемых веществ. Чувствительность должна быть на среднем уровне, чтобы обеспечить как возможно более широкий рабочий диапазон, так и хорошее определение близких значений концентрации.

Важными параметрами, характеризующими методику с точки зрения возможностей качественного и количественного анализа, являются предел обнаружения и предел количественного определения.

Предел обнаружения (или определения) (ПО). ПО определяемого компонента (c_{\min}) (англ. *detection limit or limit of detection, LOD*) представляет собой наименьшее содержание вещества, которое может быть обнаружено по данной методике с заданной степенью достоверности. Предел обнаружения – это самая низкая концентрация аналита, которая может быть обнаружена, но не обязательно определена количественно при выбранных условиях теста. Предел обнаружения характеризует методику с точки зрения возможностей качественного анализа. Величина ПО зависит от чувствительности и точности метода: чем они выше, тем ниже минимальные определяемые концентрации.

Практически все методы оценки ПО основаны на результатах измерения холостой пробы, не содержащей определяемого компонента. Пределом обнаружения обычно считают содержание аналита, при котором регистрируемый сигнал достоверно отличается от сигнала холостого измерения.

ПО может быть определен одним из следующих способов:

- оценкой по величине стандартного отклонения сигнала и наклону калибровочной прямой;
- по соотношению сигнал/шум (сравнение сигналов холостой пробы и образца с низким содержанием аналита).

Фоновый сигнал – сигнал, который дает детектор при измерении холостой пробы («бланка»), т. е. в отсутствие аналита. *Шум* (англ. *noise*) – это флуктуации (колебания) сигнала детектора при измерении бланка (т. е. флуктуация фонового сигнала), обычно определяется как стандартное отклонение множественных измерений бланка (стандартное отклонение фонового сигнала). Шум можно определить как отклонение показаний детектора в одну и другую стороны от средневзвешенной базовой линии. *Базовой линией* (англ. *baseline*) называется линия фонового сигнала детектора.

Для расчета ПО первым способом важна флуктуация сигнала холостой пробы (т. е. флуктуация фонового сигнала, или уровень шума). Предел обнаружения c_{\min} соответствует минимальному аналитическому сигналу y_{\min} , значимо превышающему сигнал фона y_b , если сигнал от холостой пробы выражается значимым численным значением. Если сигнал холостой пробы слишком мал ($y_b = 0$), вместо него обрабатывают результат, соответствующий минимально возможной концентрации аналита.

Если y_b и σ_b – соответственно среднее значение измерений сигнала холостой пробы и стандартное отклонение фонового сигнала, то значение аналитического сигнала y_{\min} , который даст c_{\min} , рассчитывают по формуле

$$y_{\min} = y_b + k\sigma_b,$$

где k – коэффициент, выбранный в соответствии с заданным доверительным интервалом.

Как правило, $k = 3$, тогда $y_{\min} = y_b + 3\sigma_b$.

Как указано в рекомендациях ИЮПАК (1975), на практике для оценки c_{\min} в случае линейной калибровочной зависимости достаточно найти по методу

наименьших квадратов утроенное стандартное отклонение σ_b для холостого опыта (часто используется выражение «критерий 3σ »). Если градуировочная функция линейна, то, подставив значение y_{\min} в уравнение градуировочной функции $y = bc + y_0$, получаем выражение для предела обнаружения

$$c_{\min} = 3\sigma_b/b, \text{ или } c_{\min} = 3\sigma_b/S,$$

где b – тангенс угла наклона калибровочной прямой; S – чувствительность.

На нижнем пределе обнаружения отклик аналитической системы должен в три раза превышать отклик на нулевую концентрацию анализируемого вещества. Хороший ПО (значит, очень низкий) получают, если отклик «бланка» (сигнал холостой пробы) очень низкий и сопутствующие шумы (которые определяют величину σ_b) очень низкие.

Предел обнаружения можно оценить по параметру *отношение сигнал/шум* (S/N) (от англ. *signal/noise*). Этот подход применим только к тем приборам, для которых наблюдается шум базовой линии. Для определения соотношения сигнал/шум сравнивают величины сигналов, полученные для «бланка» и для образцов с низкими концентрациями анализируемого вещества. На основании полученных данных устанавливают минимальную концентрацию, для которой величина S/N составляет обычно от 3 до 2. Отношение сигнал/шум показывает, во сколько раз сигнал от анализируемого вещества должен превосходить по уровню шум, чтобы считаться истинным сигналом. Как правило, считают, что условием надежного обнаружения вещества является трехкратное превышение полезным сигналом амплитуды шума. Концентрацию компонента в пробе, при которой в выбранных условиях для пика данного компонента достигается $S/N = 3$, называют пределом обнаружения этого компонента.

Предел количественного определения (ПКО). ПКО (c_{\lim}) (англ. *limit of quantitation, LOQ*) для аналитической методики представляет собой минимальное количество анализируемого вещества в образце, которое может быть количественно определено с требуемой правильностью и прецизионностью. Для характеристики возможностей методики с точки зрения количественного анализа используют эту величину.

Для установления ПКО возможны различные подходы. При определении ПКО по параметру соотношение сигнал/шум сравнивают величины сигналов, полученные для холостой пробы (при отсутствии анализируемого вещества), и для образцов с низкими концентрациями анализируемого вещества. Условием адекватного количественного определения является десятикратное превышение амплитуды шума сигналом от аналита, $S/N \geq 10$. Концентрация компонента в пробе, при которой в выбранных условиях достигается $S/N = 10$, называют пределом определения этого компонента.

Предел количественного определения может быть выражен как

$$\text{ПКО} = 10\sigma_b/b,$$

где σ_b – стандартное отклонение сигнала; b – тангенс угла наклона калибровочной прямой.

Оценка стандартного отклонения сигнала может быть проведена так же, как и в случае определения ПО. Измеряют величину аналитического сигнала для не-

обходимого числа образцов, не содержащих анализируемое вещество, и вычисляют стандартное отклонение.

Селективность. Это важнейшая характеристика БС, она отражает способность системы различать аналит в присутствии множества других компонентов, которые могут присутствовать в образце. Величина селективности БС зависит от выбора как биорецептора, так и трансдьюсера. В основном селективность биосенсора определяют следующими способами:

- по отношению величин откликов на анализируемое вещество и на мешающий компонент, взятых в одинаковых концентрациях; калибровочные кривые для аналита и для посторонних примесей строят при одинаковых условиях эксперимента;

- изменению отклика биосенсора (в %) при разбавлении вдвое раствора определяемого вещества (аналита) раствором мешающего компонента известной концентрации (обычно ожидаемой в пробе).

Высокоспецифичные БС используют для мониторинга состояния окружающей среды и анализа пищевых продуктов. В частности, для экспресс-контроля загрязнения сточных вод фенолами, анилинами, детергентами, тяжелыми металлами и пестицидами были разработаны сенсоры на основе иммобилизованных ферментов – холинэстераза и пероксидазы.

Стратегия для предотвращения неспецифического связывания. Для надежности определения искомого аналита важно, чтобы степень неспецифического связывания аналита и других компонентов, присутствующих в растворе пробы, с поверхностью сенсора была очень низкой. Чувствительность БС увеличивается со снижением неспецифического сигнала. Особенно эта проблема актуальна при анализе комплексных проб (клеточные экстракты, биологические жидкости и др.). В таких пробах искомым аналит может находиться в концентрации, которая в 10^3 – 10^6 раз ниже других компонентов, что усложняет измерение. Для снижения неспецифического сигнала БС разработаны различные стратегии, которые среди прочего включают разбавление пробы, введение различных добавок в раствор пробы и различный дизайн поверхности сенсора.

Разбавление образца (более, чем 1 : 20) является наиболее общей стратегией для сокращения неспецифического сигнала. Часто при анализе сложных проб (особенно в случае иммунных БС) используют предварительную стадию разделения компонентов пробы, например аффинную хроматографию. Предварительное разделение сложной пробы снижает неспецифический сигнал, способствует снижению неспецифического связывания, но увеличивает время анализа и может осложнять анализ из-за возможных потерь аналита на этой стадии.

Введение добавок в раствор пробы – другая часто используемая стратегия для снижения влияния мешающих компонентов. Так, добавление соли в высокой концентрации уменьшает неспецифические электростатические эффекты. Добавление поверхностно-активных веществ (например, Твин 80 или 20) снижает неспецифическую адсорбцию.

Снижению неспецифической адсорбции способствует *блокировка* свободных мест на поверхности трансдьюсера после иммобилизации биомолекул. Блокировка осуществляется, как правило, с помощью альбумина, казеина и ПЭГ. Действие каждого блокатора различно и зависит от природы взаимодействия био-

рецептор — аналит и физико-химических свойств поверхности трансдьюсера. В отдельных случаях блокаторы могут сокращать эффективность взаимодействия молекулы аналита с распознающим биорецептором. Для БС с проточной ячейкой простая блокировка может быть невыполнимой. В таких случаях применяют более сложные техники, например используют поддерживающие мембраны. В измерительную ячейку БС (с иммобилизованным слоем биорецептора) перед задачей пробы вводят липиды (в виде липосомальной суспензии), которые формируют мембрану. На мембране адсорбируются мешающие компоненты пробы (белки), которые затем удаляются вместе с мембраной при ее вымывании детергентом, при этом аналит остается связанным с биорецептором.

В отдельных случаях предварительное нагревание пробы также способствует снижению неспецифического связывания. Однако нагревание может воздействовать негативно на свойства аналита и его взаимодействие с иммобилизованным лигандом.

Воспроизводимость (англ. *reproducibility*) и **надежность** (англ. *reliability*). Воспроизводимость для БС определяется так же, как и для других аналитических устройств. Данный метрологический параметр характеризует рассеяние результатов анализа в серии повторных анализов одной и той же пробы относительно среднего значения, зависит от случайной погрешности метода. Воспроизводимость численно характеризуется относительным стандартным отклонением (в тех же единицах, что и результат анализа, или в процентах к результату анализа), а также дисперсией. Дисперсия (σ^2) в математической статистике является мерой рассеивания случайных величин, т. е. отклонения их от среднего.

Надежность БС зависит как от их селективности, так и воспроизводимости. Этот параметр определяется в фактических условиях работы, т. е. в присутствии возможных мешающих компонентов. Чтобы быть надежным для аналитика, отклик БС должен быть непосредственно связан с концентрацией аналита и не меняться в зависимости от колебаний концентраций мешающих веществ в матрице образца. Таким образом, для каждого типа БС и матрицы пробы нужно определить наиболее существенные мешающие компоненты и выбрать адекватный способ количественной оценки их влияния.

Временные характеристики. Работа биосенсора должна быть стабильной, т. е. сенсор должен генерировать воспроизводимый сигнал для одной и той же концентрации аналита во все сроки эксплуатации. Стабильность БС выражается через такие параметры, как *операционная стабильность* (т. е. стабильность в условиях эксплуатации) и *время хранения* (т. е. стабильность при хранении на полке). Оба параметра характеризуются периодом времени, в течение которого происходит потеря исходного сигнала (в %). Например, время, требуемое для того, чтобы сигнал, произведенный конкретной концентрацией аналита, уменьшился на 50 % от начального значения.

Для определения времени хранения БС важными являются условия хранения, а именно степень влажности, состав атмосферы, температура.

Операционная стабильность сенсора оценивается в условиях непрерывного его использования, т. е. в условиях работы. Например, операционная стабильность глюкозного биосенсора на основе берлинской лазури соответствует

100 %-му сохранению отклика в течение 10 ч работы. Операционная стабильность БС зависит от его конструкции, вида биорецептора и трансдьюсера, а также от условий эксплуатации. При определении операционной стабильности важно учитывать: концентрацию аналита, время контакта БС с раствором аналита, температуру, величину рН и состав буфера, присутствие органических растворителей, состав матрицы пробы.

В конечном итоге должен быть определен способ оценки времени жизни БС, т. е. в отношении начальной чувствительности, верхнего предела линейного диапазона для калибровочной кривой, воспроизводимости. ИЮПАК рекомендует определять *время жизни* (t_L) как время хранения или эксплуатации, за которое происходит снижение чувствительности БС, в пределах линейного концентрационного диапазона, или на 10 % (t_{L10}), или на 50 % (t_{L50}).

К временным характеристикам БС относятся также время отклика и время регенерации. *Время отклика* БС отражает длительность определения, т. е. время, необходимое для возникновения равновесия между анализируемым образцом и рецепторным слоем. Время отклика сенсора при добавлении анализируемого вещества в систему определяется как время, необходимое для достижения 95 % от финального значения стационарного отклика. Время отклика в основном определяется скоростями массопереноса аналита (например, ко-субстратов и продуктов в случае ферментных БС) через различные слои и мембраны, поэтому важны толщина и проницаемость таких слоев. Время отклика зависит от активности систем биологического распознавания: чем выше активность, тем меньше время отклика. На время отклика также влияют способ подачи аналита и ее скорость (в случае непрерывной подачи) в измерительную ячейку, возможность перемешивания в ней. При слишком больших временах отклика метод может оказаться непригодным для рутинных измерений.

Время регенерации характеризует способность системы восстанавливать работоспособность распознающего элемента. Время регенерации после удаления аналита из системы определяется как время, необходимое для выхода сигнала на исходный уровень (т. е. достижение на 95 % базовой линии).

Время отклика и время регенерации определяют *пропускную способность* БС, определяющуюся числом проанализированных отдельных проб в единицу времени.

БС со временем отклика и регенерации порядка десятков секунд или меньше являются оптимальными устройствами для исследований *in situ* (лат. «на месте», значит, рассмотрение явления именно в месте, где оно происходит, т. е. без перемещения в специальную среду) и *in vivo* (лат. «в (на) живом», т. е. «внутри живого организма» или «внутри клетки»). В настоящее время созданы и развиваются БС, работающие в режиме реального времени (например, оптические БС на основе поверхностного плазмонного резонанса).

БС, использующие антитела для распознавания аналитов, часто имеют очень маленькие времена отклика, но требуют больше времени для регенерации. Такой результат является следствием высокой константы аффинности антител и их соответствующих специфических партнеров (аналитов), т. е. ассоциация реагентов с образованием комплекса идет очень быстро, а диссоциация образовавшегося комплекса — очень медленно. С целью снижения аффинности распознающей

молекулы по отношению к ее лиганду часто используют хаотропные реагенты и детергенты *ex situ* (лат. «вне места», т. е. в условиях культуры, в искусственных условиях), которые влияют на формирование водородных связей между молекулами или изменяют третичную структуру белка.

1.3. БИОСЕНСОРЫ НА ОСНОВЕ БИОЛОГИЧЕСКИХ МАКРОМОЛЕКУЛ

1.3.1. Ферментные сенсоры

Ферментные сенсоры были исторически первыми биосенсорами, и в настоящее время они представляют собой наиболее обширную группу среди других. Первым ферментным БС был амперометрический ферментный электрод, предложенный Кларком в 1962 г. Большинство коммерческих биосенсорных систем являются именно ферментными.

Ферментный БС — это сенсор, в котором распознающим биорецептором служит слой фермента, как правило, иммобилизованный на/в поверхность трансдьюсера. Ферментативные БС по принципу действия каталитические.

Ферменты (или энзимы) — это белки, которые являются высокоэффективными биокатализаторами, ускоряющими химические превращения определенных соединений (называются субстратами) в продукты. Добавка незначительного количества фермента (10^{-9} – 10^{-7} М) ускоряет превращение субстрата в 10^8 – 10^{15} раз. Ферменты катализируют за короткое время (1 с) превращения от 100 до 1000 молекул субстрата. Ферменты как катализаторы обладают уникальным свойством — специфичностью, т. е. способностью ускорять протекание одной определенной реакции, не влияя на скорость остальных, даже очень похожих. Высокая специфичность ферментов — продукт длительной эволюции. Именно эта способность ферментов позволяет использовать их в качестве высокоселективных химических реагентов в анализе. Специфичность ферментов основана на комплементарности пространственной конфигурации его активного центра и субстрата и является гарантом достоверности и надежности ферментативного метода при исследовании отдельных соединений в многокомпонентных смесях.

Кинетическую схему простейшей ферментативно-катализируемой реакции, когда один субстрат (*S*) превращается в продукт (*P*), можно представить следующим образом:



где k_1 — константа скорости реакции образования фермент-субстратного комплекса из фермента (*E*) и субстрата (*S*); k_{-1} — константа скорости реакции диссоциации фермент-субстратного комплекса на фермент и субстрат; k_2 — константа скорости реакции превращения фермент-субстратного комплекса в фермент и продукт (*P*).

Ферментативные методы анализа основаны на использовании зависимости скорости катализируемой ферментом химической реакции от концентрации реагирующих субстратов и фермента. Для ферментативной реакции скорость суще-

ственно зависит от количества добавленного фермента, т. е. скорость реакции будет являться мерой каталитической активности фермента. Количественное соотношение между концентрацией субстрата и скоростью ферментативной реакции описывается уравнением Михаэлиса – Ментен:

$$v_0 = \frac{d[P]}{dt} = k_2[E \cdot S] = \frac{k_2[E]_0[S]}{K_M + [S]}, \text{ или } v_0 = \frac{V_{\max}[S]}{K_M + [S]},$$

где $[P]$, $[E]$, $[S]$ и $[E \cdot S]$ – концентрация образующегося продукта, свободного фермента, свободного субстрата и фермент-субстратного комплекса соответственно; K_M – константа Михаэлиса; V_{\max} – максимальная скорость реакции.

Кинетические параметры, константу Михаэлиса и максимальную скорость реакции используют для характеристики эффективности работы фермента.

Ферменты не изменяются и не расходуются в процессе реакции. Для ферментативных реакций характерен почти 100 %-й выход продукта, и ферменты работают в «мягких условиях» (физиологические значения рН среды и температуры). Ферменты сохраняют свою активность и избирательность не только в живой клетке, но и вне организма. Уникальные свойства ферментов делают их мощными инструментами для создания высокоспецифичных и высокочувствительных аналитических систем, какими являются ферментативные БС. При разработке данных БС нужно учитывать факторы, влияющие на скорость ферментативно катализируемой реакции, а именно концентрацию фермента и субстрата (аналита), величины температуры, рН и ионной силы среды, наличие ферментативных эффекторов (активаторов и ингибиторов).

Величина константы Михаэлиса (K_M) фермента задает динамический диапазон работы БС. Для определения субстрата $[S] < K_M$, т. е. скорость реакции пропорциональна $[S]$; для определения фермента $[S] \gg K_M$, т. е. фермент насыщен субстратом и скорость реакции не зависит от $[S]$. Верхняя граница определяемых концентраций субстрата ограничена величиной константы Михаэлиса – Ментен. Нижняя граница определяемых концентраций субстрата устанавливается той величиной, которая может быть зафиксирована с помощью используемого для наблюдения трансдюсера. Применение высокоактивного фермента (большое значение каталитической константы, k_{cat}) и повышение его концентрации в реакционной смеси могут существенно снизить предел обнаружения субстрата. Например, нормальный уровень глюкозы в крови составляет 4–8 мМ. Ферменты, которые окисляют сахара, имеют достаточно высокое значение K_M (около 10 мМ). Если такие ферменты применяют для изготовления БС, то их можно использовать для определения субстрата (глюкозы), в этом случае скорость ферментативно катализируемой реакции пропорциональна концентрации субстрата.

Выбор фермента для создания БС определяется аналитической задачей, а также типом используемого трансдюсера. Ферменты получают из различного биологического материала – растительного сырья (проросшее зерно различных злаков и бобовых, латекс и сок зеленой массы некоторых растений), тканей и органов животных (например, крупного рогатого скота). В то же время основным источником ферментов являются микроорганизмы, свойства которых мож-

но легко улучшить с помощью методов генной инженерии. Именно достижения в генной инженерии позволяют получать ферменты с заданными свойствами, т. е. с определенной селективностью, активностью и стабильностью.

Широкое применение в изготовлении ферментативных БС нашли ферменты класса гидролаз, катализирующие гидролиз ковалентной связи в субстрате (кроме С–С-связей), и класса оксидоредуктаз (дегидрогеназы, оксидазы и гидроксипероксидазы), катализирующие окислительно-восстановительные реакции. Сегодня описано и классифицировано более 6000 ферментов, известно около 1800 оксидоредуктаз.

Дегидрогеназы катализируют реакции отщепления водорода от субстрата и транспортируют его на другое соединение, которое при этом восстанавливается (рис. 2). Аэробные дегидрогеназы катализируют дегидрирование субстрата, при этом акцептором водорода служат кислород или искусственные акцепторы (например, метиленовый синий), продуктом реакции является гидропероксид. Анаэробные дегидрогеназы не способны использовать O_2 в качестве акцептора водорода, в качестве последних они используют, как правило, коферменты никотинамидадениндинуклеотид ($НАД^+$) и никотинамидадениндинуклеотидфосфат ($НАДФ^+$) (восстановленные формы соответственно $НАД \cdot H_2$ и $НАДФ \cdot H_2$). Дегидрогеназы, использующие в качестве простетической группы флавинадениндинуклеотид (ФАД) и флавиномононуклеотид (ФМН) (восстановленные формы соответственно $ФАД \cdot H_2$ и $ФМН \cdot H_2$), могут быть как аэробными, так и анаэробными.

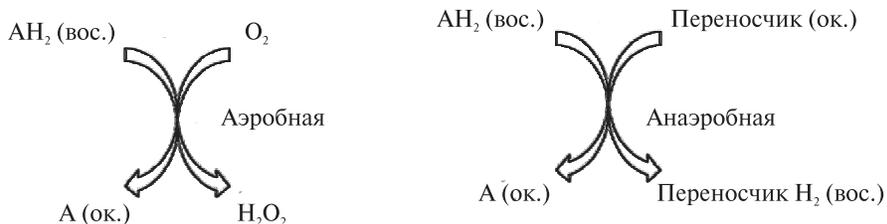


Рис. 2. Окисление соединений аэробной или анаэробной дегидрогеназой

Оксидазы катализируют удаление водорода из субстрата, используя молекулярный кислород в качестве акцептора H, продуктом реакции является молекула воды (рис. 3). В качестве субстратов оксидаз могут выступать фенолы, полифенолы, амины. Примерами ферментов класса оксидаз являются фенолаза, цитохромоксидаза, моноаминоксидаза, уриказы.

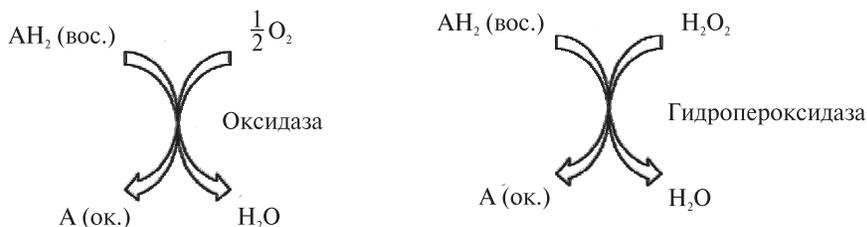


Рис. 3. Окисление соединений оксидазами и гидропероксидазами

Гидропероксидазы в качестве субстрата используют гидропероксиды или органические пероксиды, из этих ферментов широкое распространение при изготовлении БС получили гемсодержащие ферменты – каталаза и пероксидаза (см. рис. 3). Каталаза катализирует разложение гидропероксида с образованием кислорода и воды. Пероксидаза катализирует окисление широкого спектра субстратов (AH_2) в присутствии гидропероксида, выступающего акцептором электронов, продуктом является окисленный субстрат (А) и вода.

В ферментных сенсорах с электрохимическими трансдюсерами широко используются различные оксидоредуктазы, в частности оксидазы (для определения глюкозы, лактата, холестерина, глицерина или холина). В БС с оптическими трансдюсерами применяют, например, НАДФ-зависимые дегидрогеназы (для доказательства глюкозы, лактата, глицерина или глутамата), так как восстановленный НАДФ $\cdot H_2$ легко обнаружить спектрофотометрически по поглощению при 340 нм ($\epsilon = 6220 M^{-1}cm^{-1}$) благодаря наличию хиноидной структуры.

Моно- и мультиферментные БС. В *моноферментных* сенсорах в качестве биорецептора используется один фермент, катализирующий превращение одного субстрата в продукт (рис. 4). Однако не всегда искомым анализитом является продукт ферментативно-катализируемой реакции, который можно легко детектировать имеющимся трансдюсером. Например, при использовании электрохимических трансдюсеров в моноферментной системе должны образовываться электрохимически активные продукты. Число таких систем ограничено.

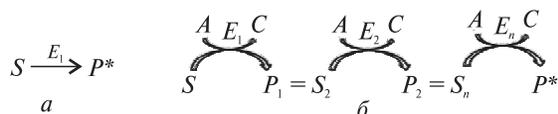


Рис. 4. Схема механизма действия (а) моноферментного и (б) мультиферментного сенсора:

A и C – ко-субстраты; P^* – продукт, детектируемый трансдюсером

В *мультиферментных* БС для идентификации анализита используют сопряженные ферментные системы. Ферменты могут быть комбинированы последовательно (продукт первого фермента становится субстратом второго фермента и т. д.) (см. рис. 4), параллельно (два фермента могут конкурировать за один субстрат), а также представлять собой циклические системы. Мультиферментные системы значительно расширяют диапазон анализируемых веществ, повышают предел обнаружения, в отдельных случаях улучшается селективность. Кроме того, применение мультиферментных систем может способствовать увеличению времени хранения и операционной стабильности, а также снижать стоимость анализа. Число сопряженных ферментов определяется аналитической задачей. В частности, число ферментов в последовательной цепи реакций определяется тем, как быстро можно превратить анализит-субстрат в продукт, который легко детектируется данным видом трансдюсера.

Примером сопряженной мультиферментной системы может служить система для определения нейромедиатора ацетилхолина. Фермент ацетилхолинэстераза катализирует превращение ацетилхолина в уксусную кислоту и ацетил, последний

с помощью оксидазы окисляется с образованием гидропероксида, который легко обнаружить электрохимически.

Ферментный сенсор для определения аденозинтрифосфата (АТФ) может служить примером БС с двумя конкурирующими ферментами. В состав системы входят два фермента – глюкозооксидаза (ГОД) и гексокиназа (ГК), конкурирующие за один субстрат – глюкозу, в качестве трансдьюсера может быть амперометрический (кислородный) электрод. Принцип работы такого сенсора следующий. ГОД катализирует окисление глюкозы кислородом воздуха с образованием гидропероксида, что детектируется по расходу O_2 в системе. Введение в биосенсор АТФ (т. е. аналита, который нужно обнаружить в пробе) приводит к запуску второго фермента, ГК, который катализирует превращение глюкозы в присутствии АТФ. При этом часть глюкозы уводится с поля действия первого фермента, ГОД. Метрой конкурентного действия ферментов служит снижение расхода кислорода в системе, которое зависит от концентрации АТФ в пробе.

Мультиферментные каскадные системы могут снижать влияние других компонентов сложной по составу пробы на чувствительность анализа. Например, фермент E_1 катализирует превращение субстрата S (аналит) в первичный продукт (P^*), который детектируется трансдьюсером (например, амперометрическим ферментным электродом) (рис. 5). Роль другого фермента E_2 заключается в превращении некоего компонента пробы (I^*), способного помешать детектированию первичного продукта, в инертный продукт (P), который не будет мешать определению. Например, ацетаминофенон может мешать амперометрическому определению глюкозы с помощью глюкозооксидазы (продукт реакции – гидропероксид) с помощью электрода, чувствительного к H_2O_2 . Для элиминирования его влияния используют фермент тирозиназу, способный окислять фенолы. Для этого тирозиназу вместе с ГОД иммобилизуют на электроде.

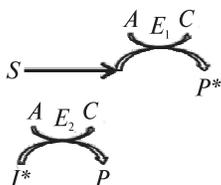


Рис. 5. Схема ферментативного элиминирования компонентов (I^*) пробы, мешающих определению: A и C – ко-субстраты; P^* – продукт, детектируемый трансдьюсером

Использование ферментативных циклических систем позволяет определить искомое вещество в очень низких концентрациях. В двухферментной циклической системе один фермент может катализировать превращение аналита с образованием двух продуктов – основного и побочного. Основной продукт служит субстратом для второго фермента и превращается в исходную молекулу-аналита, а побочный продукт легко детектируется трансдьюсером (т. е. дает сигнал сенсора). Таким образом в мультиферментной системе происходит увеличение ультрамалых количеств аналита. В результате, имея незначительное количество молекул аналита в пробе, получают сигнал, который можно измерить.

В другой двухферментной циклической системе аналит можно регистрировать по ко-субстрату, который используется в реакции, катализируемой первым

ферментом. Например, глюкоза превращается в глюконолактат (окисляется) посредством глюкозооксидазы, и при этом потребляется кислород (восстанавливается до гидропероксида), а глюконолактат снова превращается в глюкозу (восстанавливается) посредством глюкозадегидрогеназы и использования системы ($\text{НАД}^+ + 2e^- + \text{H}^+ \rightarrow \text{НАДН}$). В данном случае измеряется расход кислорода.

1.3.2. Иммунные сенсоры

В иммунных сенсорах распознающим биорецептором является слой антитела (может быть и слой антигена), иммобилизованный на/в поверхность трансдьюсера. Иммунные БС по принципу действия являются аффинными. При разработке иммунных БС нужно учитывать факторы, влияющие на взаимодействие антитела со специфичным антигеном (возможность перекрестного взаимодействия со структурными аналогами, неспецифические взаимодействия, величины температуры, рН и ионной силы среды).

Принцип работы иммунных сенсоров базируется на высокоспецифическом взаимодействии антитела (Ат) с антигеном (Аг) с образованием иммунного комплекса Ат • Аг. В сущности, иммуноанализ – разновидность лиганд-связывающего анализа, базирующегося на способности лиганда избирательно связывать молекулу аналита с образованием стабильного комплекса.

Антитела в биоанализе зарекомендовали себя как идеальные реагенты, так как для доказательства и идентификации различных белков и других веществ в образцах необходимо только осуществление реакции антитела с антигеном, которую выработала природа для иммунной защиты организма. Все вещества, против которых возможно получение антител, выявляются этими методами. Высокие специфичность и чувствительность (пико- и атомомоль область) иммуноанализа позволяют определять аналиты в присутствии даже сотен тысяч других веществ. Иммуноанализ используют для исследования комплексных систем (биожидкости, пробы окружающей среды, продукты питания, косметические средства и др.). Иммуноанализ является надежным, высокоэкспрессным, для его проведения не требуется дорогой и деструктивной подготовки проб.

Антитела являются глобулярными гликопротеинами (иммуноглобулинами (*Ig*), подразделяющимися на пять основных классов – *IgA*, *IgD*, *IgE*, *IgG*, *IgM*), которые синтезируются в организме позвоночных животных в ответ на попадание в него чужеродного вещества (антигена) и обладают способностью избирательно связываться с такими веществами. Антитела присутствуют на поверхности В-лимфоцитов в виде мембраносвязанных рецепторов, а также в сыворотке крови и тканевой жидкости в виде растворенных молекул. *IgG*-антитела (150 кДа) являются основными иммуноглобулинами плазмы и межклеточной жидкости здорового человека, они составляют 70–75 % всей фракции иммуноглобулинов. *IgG* служат основными реагентами в иммунохимической аналитике. Антитела получают путем иммунизации животных соответствующим антигеном.

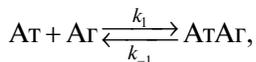
Общей структурной единицей всех иммуноглобулинов является комплекс из четырех полипептидных цепей: двух идентичных длинных тяжелых цепей ($M \sim 50$ кДа) и двух идентичных коротких легких цепей ($M \sim 25$ кДа). В целом

структура такого комплекса напоминает латинскую букву Y с вертикальной осью симметрии и характерна для иммуноглобулинов классов *IgG*, *IgD*, *IgE*. В структуре антитела выделяют следующие фрагменты: два F_{ab} (вверх «Y»-структуры) и один F_c . F_{ab} -Фрагмент (англ. *fragment antigen binding*) связывает и распознает антигены, т. е. отвечает за специфичность и аффинность антител при распознавании и связывании чужеродных веществ. Антиген-связывающую область одного F_{ab} -фрагмента называют паратопом. Один паратоп антитела (F_{ab} -фрагмент) связывает один эпитоп антигена, т. е. является одновалентным. Белок *IgG* имеет два одинаковых паратопа, связывающих одинаковые антигены, поэтому он дивалентен. Антитела *IgA* могут быть тетравалентными, *IgM* являются декавалентными. F_c -фрагмент (англ. *fragment crystallizable*), константная область At, представляет собой легко кристаллизуемый гликопротеин, который обладает постоянными функциями, он не способен связывать антигены. F_c -Фрагмент может связывать антивидовые иммуноглобулины (вторичные антитела) и другие белки (например, белок A или G). Это свойство антител используют, например, при их иммобилизации на поверхность трансдьюсера.

Понятие «антиген» определяется не через химическую структуру соединения, а по тому, существует ли антитело, которое с определенным сродством связывается с данным веществом. Вещества, которые, попадая в организм, вызывают в нем иммунную реакцию, т. е. образование антител, называют антигенами (иммуногенами). К таким веществам относятся белки и полисахариды как в очищенном виде, так и в виде компонентов различных биологических структур (клетки, ткани, вирусы и т. д.). Для индукции иммунного ответа молекулярная масса должна быть не менее 10 кДа. Молекулы малого размера в организме не вызывают образования антител. На поверхности молекулы сложного антигена можно выявить функциональные фрагменты, обуславливающие антигенную специфичность, называемые антигенными детерминантами или эпитопами. Понятие «антигенная детерминанта» включает в себя последовательность образующих ее химических функциональных групп и их пространственное расположение. Эпитоп антигена комплементарен антиген-связывающей стороне антитела (паратопу). Число эпитопов на поверхности сложной молекулы определяет валентность антигена, т. е. его способность связать определенное число молекул антител. Природные антигены в большинстве случаев мультивалентные, т. е. имеют несколько или много антигенных детерминант.

Имунохимический анализ используется не только для определения высокомолекулярных, но и низкомолекулярных соединений (<2000 Да), которые не способны вызывать иммунный ответ в организме (т. е. образование антител). Однако малые органические молекулы (их называют гаптенами) при связывании с макромолекулами (белками) приобретают иммуногенные свойства и вызывают в организме продуцирование специфических антител, которые могут быть использованы для обнаружения данных молекул в свободном виде. В качестве гаптенных могут выступать самые разнообразные вещества: пептидные и стероидные гормоны, лекарственные препараты, антибиотики, витамины, олигосахариды, пестициды, наркотики, витамины и т. д. Таким образом, с помощью иммунного БС можно определять очень широкий круг (био)органических соединений.

В простейшем случае взаимодействие одного центра связывания (паратопа) антитела с одним эпитопом антигена с образованием иммунного комплекса $Аг \cdot Аг$ в соотношении 1 : 1 может быть представлено следующей схемой:



где $Аг$ – свободный антиген; $Аг$ – свободное антитело; $Аг \cdot Аг$ – иммунокомплекс; k_1 и k_{-1} – константы скорости прямой и обратной реакции соответственно.

В основе реакции антиген – антитело лежит сумма нековалентных сил (водородные связи, вандерваальсовы силы, электростатические и гидрофобные взаимодействия). Антитело своим паратопом связывается с эпитопом антигена не ковалентно, а по принципу комплементарности. Чтобы паратоп мог связаться со своим эпитопом, взаимодействующие участки должны обладать структурным и пространственным соответствием, т. е. быть комплементарными (подобно соответствию ключа с замком).

Образование иммунокомплекса можно детектировать, например, по изменению массы слоя или показателя преломления среды. Кроме того, растворимый комплекс $Аг \cdot Аг$ можно обнаружить, если использовать меченые реагенты. В состав молекул $Аг$ или $Аг$ вводятся различные соединения (флуорофор, фермент и т. д.), по изменению физико-химических свойств которых при комплексообразовании и детектируется иммунокомплекс. Выбор способа определяется видом трансдьюсера.

При производстве иммунных БС используют различные схемы проведения гетерогенного иммуноанализа с использованием меченых реагентов – прямой, конкурентный и двусторонний (или сандвич от англ. *sand-wich*) анализ. Прямой анализ базируется на взаимодействии антитела со специфическим меченым антигеном ($Аг^*$) и образовании комплекса $Аг \cdot Аг^*$. При конкурентном анализе маркированные и немаркированные антигены конкурируют за свободное место связывания на рецепторном слое (слой антитела). Например, к антителу, закрепленному на поверхности трансдьюсера, одновременно с раствором аналита (искомый $Аг$) добавляют известную концентрацию маркированного антигена ($Аг^*$) (как правило, идентичен аналиту). Маркированные и немаркированные антигены конкурируют за место связывания с паратопом $Аг$. В случае сандвич-анализа антиген связывается с двумя антителами, одно из которых содержит метку, причем антиген должен иметь не меньше двух эпитопов, которые достаточно удалены друг от друга на поверхности молекулы. Например, к антителу, иммобилизованному на трансдьюсере, добавляют раствор пробы, искомым антиген (аналит) одним эпитопом связывается с $Аг$ (первая стадия), далее добавляется маркированное антитело (вторая стадия), которое связывается с другим эпитопом антигена, в результате образуется сандвич $Аг \cdot Аг \cdot Аг^*$. Сигнал маркера пропорционален концентрации аналита в случае прямого и двустороннего анализа и обратно пропорционален – для конкурентного.

Иммунные БС широко используются для анализа пищевых продуктов (например, контроль содержания пестицидов), сельском хозяйстве, клинической диагностике (например, ранняя диагностика рака), экологическом мониторинге и т. д.

1.3.3. ДНК/РНК-сенсоры

В ДНК/РНК-сенсорах (генные биосенсоры) в качестве рецепторного слоя используют олигонуклеотиды с известной (заранее заданной) последовательностью азотистых оснований или фрагменты молекул ДНК/РНК. Принцип действия таких БС базируется либо на реакции гибридизации комплементарных цепей ДНК, т. е. способности односпиральных комплементарных цепей ДНК формировать двуспиральные структуры главным образом за счет водородных связей, образующихся между двумя парами азотистых оснований (аденин – тимин, гуанин – цитозин), либо на том, что ДНК/РНК структуры служат высокоспецифическими рецепторами для (био)химических частиц. В отличие от антител и ферментов слой олигонуклеотидов может быть легко синтезирован и регенерирован для многократного использования. Кроме того, очень малые количества ДНК/РНК можно увеличить с помощью метода полимеразной цепной реакции (ПЦР). Молекулы ДНК более стабильны, чем РНК, поэтому используются для производства БС чаще.

В ДНК-сенсорах, основанных на реакции гибридизации, в качестве рецепторного слоя, иммобилизованного на поверхность трансдьюсера, служат одноцепочечные олигонуклеотиды (ДНК-зонды). При наличии в анализируемой пробе соответствующей комплементарной нуклеиновой последовательности будет происходить реакция гибридизации между иммобилизованной нуклеотидной цепочкой и нуклеотидной цепочкой раствора пробы. Происходит связывание нуклеотидов в устойчивые пары аденин – тимин и гуанин – цитозин с образованием спиральной двунитевой ДНК – так называемый процесс гибридизации. Такие взаимодействия отличаются высокой специфичностью. Они позволяют регистрировать не только комплементарное связывание, но и влияние на него различных факторов.

Протекание биохимической реакции с образованием дуплекса ДНК (т. е. двуцепочечной структуры) детектируется соответствующим трансдьюсером (электрохимическим или оптическим). С помощью такого ДНК-сенсора, например, выявляют генетически модифицированные организмы в пищевой продукции, обнаруживают различные вирусы.

Известно, что при температуре 94–100 °С комплементарные связи между азотистыми основаниями разрушаются и молекула ДНК быстро диссоциирует на две отдельные цепи (процесс денатурации). Данный процесс обратим, при температуре 65 °С происходит ренатурация – восстановление структуры двойной спирали ДНК.

Любой вирус включает одну специфическую для него молекулу ДНК (или РНК) со строго определенной последовательностью нуклеотидов. Чтобы в исследуемом материале обнаружить вирусную нуклеиновую кислоту, нужно выделить ее из исследуемого материала и денатурировать (т. е. получить односпиральный фрагмент ДНК). Образующиеся односпиральные цепи ДНК (или РНК) будут реагировать с рецепторным слоем (ДНК-зонды) при 55–65 °С с формированием двуспиральных молекул (гибридизация) в случаях их взаимной комплементарности.

В других типах ДНК-сенсоров связывание искомым низкомолекулярных веществ с нуклеиновой кислотой (НК) может детектироваться по окислению азотистых оснований ДНК или по общему повреждению структуры ДНК.

Для оценки окислительных повреждений ДНК в сенсорах широко используют электрохимические трансдюсеры. Наиболее применим метод, по которому регистрируют сигналы окисления отдельных оснований в составе ДНК (гуанина, реже аденина). Гуанин в ДНК, обладая самым низким среди природных азотистых оснований окислительно-восстановительным потенциалом (1,29 мВ относительно нормального водородного электрода), легко окисляется в положении С8, образуя 8-оксогуанин. С помощью ДНК-сенсора можно, например, определять противораковые препараты на основе комплексов платины – цисплатина и хлордиэтилентриаминоплатины(II). Образующиеся аддукты с ДНК окисляются на электроде в 80 раз медленнее, чем свободная ДНК, что выражается в уменьшении высоты пиков окисления гуанина, регистрируемых с помощью дифференциальной импульсной вольтамперометрии. Метод позволяет определять субмикромольные концентрации фармацевтических препаратов.

Молекула ДНК, как и другие НК, находится как в клетке, так и в растворе в водной среде в виде полианиона, и ее нативная структура двунитевой спирали сохраняется только в присутствии определенной концентрации катионов. Многие низкомолекулярные вещества и ионы металлов могут влиять на стабильность структуры и свойства ДНК, что в БС регистрируется соответствующим трансдюсером. В целом сигнал ДНК-сенсора будет меняться в зависимости от природы аналита, его активности, времени воздействия, способа включения ДНК в состав биосенсора. Для изготовления БС часто используют нативную ДНК из тимуса теленка или спермы лосося, а также плазмидную сверхспирализованную ДНК и термически денатурированную ДНК.

Вещества с преимущественно цепной структурой молекул при связывании с ДНК укладываются в бороздки на ее поверхности, взаимодействуя с фосфатными группами и атомами азотистых оснований, находящимися в бороздках. Ассоциация таких молекул с ДНК осуществляется за счет водородных связей, электростатического и гидрофобного взаимодействия. К этому типу соединений относятся многие современные противомикробные, противовирусные и противораковые средства.

Вещества, имеющие плоскую гетероциклическую структуру молекул, могут встраиваться между плоскостями оснований ДНК (интеркалировать), раздвигая основания и деформируя локальную структуру НК. В частности, происходит раскручивание двойной спирали ДНК, изменение ее гибкости, удлинение молекулы, повышение температуры перехода спираль – клубок и изменение других свойств полимера. В данную группу входят акридиновые красители, антрациклиновые антибиотики, используемые в онкологии (дауномицин, адриамицин, карминомицин), фенотиазины, к которым относятся вещества, обладающие бактерицидным и фотосенсибилизирующим действием (тиазиновые красители: метиленовый синий, метиленовый зеленый, толуидиновый синий), нейролептик промазин и его аналоги, а также другие лекарственные средства, в молекулах которых присутствуют конденсированные ароматические, а также другие планарные фрагменты, облегчающие интеркалирование их в молекулу ДНК.

ДНК-сенсоры используют для анализа воды, пищи, почвы, растений, биологических жидкостей на наличие различных токсических веществ (тяжелых металлов, наркотиков, пестицидов, гербицидов и др.), способных высоко специфически связываться со структурой НК. ДНК являются основной биологической мишенью для широкой группы лекарственных препаратов, прежде всего противоопухолевого действия. Поэтому ДНК/РНК-сенсоры широко применяют для фармацевтического скрининга, в частности для изучения взаимодействия ДНК с лекарственными соединениями, а также выявления генотоксичности последних. Перспективным является использование ДНК-сенсоров для мониторинга противоопухолевых препаратов, регулярного контроля за содержанием данных фармпрепаратов в сыворотке крови пациентов. В целом данный вид БС позволяет изучать взаимодействие различных эффекторов (например, ионы тяжелых металлов, цитостатики, антибиотики и др.) с ДНК, быстро определять их на уровне малых концентраций без дорогостоящего оборудования, длительной пробоподготовки, достаточно специфично и селективно.

1.4. БИОСЕНСОРЫ НА ОСНОВЕ НАДМОЛЕКУЛЯРНЫХ СТРУКТУР

Клеточные сенсоры. К данному типу БС относятся сенсоры, в которых в качестве биоспецифического чувствительного элемента используют живые клетки. Принцип их работы базируется на способности живых клеток реагировать на изменение условий микроокружения и при этом производить соответствующий отклик.

Клеточные БС используют для детектирования либо отдельных специфических молекул (например, молекулы-рецепторы, белки или глипротеины на поверхности клеточной мембраны специфично реагируют с изменением своей пространственной конфигурации на присоединение к ней молекулы определенного химического вещества), либо для контроля общего состояния окружающей среды. Первый микробный БС был описан К. Дивисом (С. Diviès) в 1975 г. для детектирования этанола с помощью электрохимического трансдьюсера (кислородный электрод с закрепленной на нем целлюлозной пленкой с бактериями *Acetobacter xylinum*).

Для получения клеточных БС используют такие микроорганизмы, как бактерии и грибы, а также клетки млекопитающих (раковые, нейроны). Культивирование микроорганизмов проще и дешевле по сравнению с культурами клеток высших организмов. Микробные клетки характеризуются большой стабильностью, они могут существовать в различных условиях. Одни их виды выживают при 400 °С, другие живут во льдах, некоторые способны выживать в сильноокислой среде, другие могут существовать без воздуха и т. д. Интересным является такое свойство бактерий, как селективность в питании, бактерии чаще всего являются не всеядными, а существуют за счет какого-то одного субстрата. Вышеуказанные свойства микроорганизмов делают их уникальными биорецепторами в БС. При выборе штамма микроорганизмов в качестве распознающих элементов БС основными критериями являются селективность определения искомого ве-

щества и чувствительность его детектирования. Так, изучение различных штаммов глюконобактерий позволило выбрать клетки, специфичные по отношению к углеводам, спиртам и органическим кислотам. Регистрация отклика клеток на эти соединения может осуществляться с помощью амперометрических и потенциометрических электродов.

В гибридных микробных БС в качестве биорецептора может содержаться смесь нескольких культур одного или различных штаммов или композиция из живых клеток и свободных ферментов. Использование таких гибридов повышает селективность и расширяет диапазон анализируемых веществ.

Благодаря достижениям генной инженерии в качестве биокомпонентов БС, помимо природных микроорганизмов, стали применять генно-модифицированные. Использование технологий рекомбинантных ДНК (молекула ДНК, полученная в результате объединения *in vitro* чужеродных, т. е. в природе никогда вместе не существующих, фрагментов ДНК) для получения микроорганизмов с заданными свойствами повышает аналитический потенциал микробных сенсоров. Это позволяет увеличить селективность анализа и расширить диапазон определяемых веществ.

Способ распознавания аналита, т. е. механизм генерации сигнала, в клеточных БС в общем аналогичен таковому в ферментативных сенсорах. Согласно модели, используемой в работе Т. Икеда и соавторов (Т. Ikeda [et al.], 1996), микробную клетку в биосенсорике чаще всего рассматривают как «мешок ферментов». Это, конечно, упрощенный подход, не учитывающий сложность структурной организации клетки и гомеостатическую систему внутриклеточных биохимических процессов. Принцип работы микробных сенсоров можно представить следующим образом. Аналит, попадая в клетку, преобразуется в процессах, катализируемых внутриклеточными ферментами. В результате либо расходуются ко-субстраты, либо образуются электрохимически активные продукты, что можно детектировать с помощью электродов. Изменение уровня кислорода, ионного состава и других параметров в слое иммобилизованных на поверхности трансдьюсера клеток может использоваться в качестве индикатора клеточного метаболического состояния и быть основой для определения биологически активных веществ. Многие биологические субстраты (углеводы, аминокислоты, метан, спирты, органические кислоты, другие азот- или серосодержащие соединения) могут быть обнаружены через потребление кислорода, образование газов (аммиака или диоксида углерода) или изменение рН значения. Чувствительность микробных БС варьируется в зависимости от аналита, вида микроорганизмов и типа выбранного трансдьюсера. Предел обнаружения для БС с электрохимическим или калориметрическим трансдьюсером может составлять порядка 10^{-4} – 10^{-7} М. Для оптических микробных БС, базирующихся на регистрации биолюминесценции, характерен более низкий предел обнаружения (около 10^{-9} М). Примером такого БС служит микробный сенсор на основе генно-модифицированных клеток *E. coli*, которые в присутствии аналита начинают производить зеленый флуоресцирующий белок.

Несмотря на подобие операционных принципов, микробные БС в сравнении с ферментативными имеют свои преимущества и недостатки. К преимуществам относится то, что не нужно выделять «чистые» ферменты, что значительно до-

роже, чем выращивание микроорганизмов. К тому же некоторые ферменты при выделении могут терять свою пространственную структуру и дезактивироваться. В живых клетках ферменты находятся в естественной среде, что гарантирует их долгую стабильность, к тому же они могут регенерироваться при росте клеток. В микроорганизмах ферменты лучше защищены от ингибирующих веществ, а необходимые ко-факторы и активаторы поставляются самими клетками, что избавляет от необходимости вводить их дополнительно. Важным аспектом является многообразие ферментативного аппарата микробных клеток, что открывает возможность подбора микроорганизмов для анализа практически любого соединения. В клетках могут функционировать ферментные сопряженные системы, что также делает анализ более простым, нет необходимости их разрабатывать искусственно. Помимо этого, важной причиной использования целых клеток в аналитическом сенсорном устройстве является то, что живые клетки позволяют получить функциональную информацию, т. е. установить, как то или иное вещество воздействует на организм *in vivo*. Это особенно важно при разработке новых лекарственных средств и установлении механизма их действия.

К *недостаткам* микробных БС относится то, что может снизиться скорость генерирования аналитического сигнала и селективность. При поступлении аналита внутрь клетки клеточная стенка может служить диффузионным барьером, что будет увеличивать время отклика. Решением этой проблемы может быть использование клеток с проницаемой мембраной либо применение методов генной инженерии для получения мутантов, в которых необходимые ферменты будут локализоваться на поверхности клеточной стенки. Например, был получен штамм рекомбинантных бактерий *Escherichia coli*, содержащих на поверхности органофосфат гидролазу, которая превращала субстрат с более высокой скоростью, чем внутриклеточный фермент. Большинство микробных БС характеризуются чувствительностью по отношению к большому числу субстратов, что снижает их селективность и препятствует анализу сложных по составу проб. Кроме того, большая гибкость микроорганизмов по отношению к внешним условиям может ограничить селективность микробных сенсоров. В условиях стресса (например, очень сложная проба) может измениться обмен веществ и переключиться на другую субстратную специфичность.

Клеточные биосенсоры применяют в области биотехнологии, медицине, функциональной геномике, фармакологии, пищевой и химической промышленности, для мониторинга окружающей среды и др. С помощью клеточных БС можно оценить токсичность различных органических соединений, металлов, пестицидов и фунгицидов, мутагенный и канцерогенный потенциал антибиотиков и других лекарственных соединений. Например, для определения содержания компонентов сточных вод в странах, где в туалетах используется морская вода, применяют галофильные (солелюбивые) бактерии.

Тканевые, оргanelльные и рецепторные БС. В тканевых биосенсорах в качестве распознающего элемента служит срез тканей как растительного (картофель, зерно кукурузы, огурец, банан, цветы и др.), так и животного происхождения (почки, печень, мускулы), в которых содержатся определенные ферменты. Аналит, например, может быть ингибитором или субстратом ферментов тканей. Ткани закрепляются на трансдьюсере с помощью полупроницаемой мембраны или

нейлоновой сетки. Обычно детектируют расход кислорода или образование аммиака, диоксида углерода электрохимически. С помощью тканевых БС определяют аминокислоты, соли (не)органических кислот, фенолы, катехолы, мочевины. Первый тканевый БС с электрохимическим трансдьюсером был разработан в 1978 г. Г. А. Рехнитцем (G. A. Rechnitz) для определения аминокислоты аргинин. Например, для определения аминокислоты глутамин использовали ткани из почек свиньи, иммобилизованные на потенциометрическом аммиачном электроде. В цереброспинальной жидкости такой сенсор может работать до 60 дней с устойчивым различием к другим аминокислотам. Листья сои используют в БС для определения сельскохозяйственных гербицидов.

Преимущество тканевых БС, как и микробных, состоит в том, что отсутствует необходимость проводить выделение и очистку требуемых ферментов. Ферменты в тканевых препаратах находятся в естественном биохимическом окружении, что способствует сохранению их активности более длительное время. Уникальное сочетание в клетках различных ферментных систем и ко-факторов расширяет круг определяемых веществ. Однако у тканевых биосенсоров есть и *недостатки*. В ряде случаев может быть низкая селективность, обусловленная присутствием ряда ферментов, которые способны катализировать побочные реакции. Часто тканевые биосенсоры являются медленно работающими в основном из-за диффузионных ограничений проникновения субстратов в клетки и продуктов ферментативной активности их клеток. Тем не менее применение тканей в рецепторных слоях в некоторых случаях позволяет радикально снизить себестоимость биосенсоров.

Органелльные БС в качестве биораспознающей системы используют различные клеточные структуры (мембраны, хлоропласты, митохондрии, микросомы). Аналиты в качестве субстратов превращаются ферментами органелл, обычно детектируют продукты превращений или расход кислорода. Предел обнаружения таких сенсоров составляет, как правило, 0,05–0,5 мМ. Стабильность сохраняется в течение 1–2 недель.

Рецепторные БС базируются на применении рецепторов – мембранных белков, способных связывать определенные лиганды и вызывать специфический физиологический отклик в ответ на акт связывания. Некоторые виды моли реагируют только на несколько молекул действующего вещества. Существуют морские животные, которые уже в морской воде улавливают концентрацию отдельных веществ меньше, чем 10^{-13} М. Чувствительные рецепторы, которые имеются в органах чувств подобных живых организмов, могут быть использованы напрямую, так как нервные импульсы несут электрохимическую природу. При этом существует два варианта. Первый – рецепторные молекулы можно изолировать из органов и иммобилизовать на трансдьюсере, например мембранном электроде. Более дешевым способом получения данных рецепторных молекул являются генно-инженерные методы. Второй – использовать полностью интактную (неповрежденную) хеморецепторную структуру в качестве и биокомпонента, и трансдьюсера. Такие структуры содержат аксоны или нейроны, вырабатывающие потенциал действия, который, в свою очередь, можно регистрировать как нервный сигнал. Примером этому служат крабовые щупальца, с помощью которых можно определять аминокислоты.

1.5. БИОСЕНСОРЫ НА ОСНОВЕ БИОМИМЕТИЧЕСКИХ СТРУКТУР, ИХ ВИДЫ

Биологические макромолекулы (ферменты, антитела, ДНК) обладают высоким сродством к целевым молекулам, анализ на их основе является высокоспецифическим и чувствительным, практически не требует пробоподготовки. Однако природные рецепторы в нефизиологических условиях крайне нестабильны, возможности их получения в больших количествах часто ограничены и дороги. Поэтому стали разрабатываться технологии получения альтернативных искусственных структур, имитирующих свойства биомолекул (биомиметики или биоподражатели). Биомиметики, как и биореагенты, способны к распознаванию и связыванию разнообразных молекул-мишеней с высокой аффинностью и специфичностью. К таким структурам, в частности, относятся аптамеры и молекулярно импринтированные полимеры.

1.5.1. Аптамерные сенсоры

Аптамеры (лат. *aptus* – подходящий, приложенный и греч. *meros* – часть) – это искусственные молекулы, синтетические миметики антител. Аптамеры представляют собой высокоаффинные реагенты, они способны связываться с другими молекулами-мишенями с высокой аффинностью и селективностью благодаря их вторичной и третичной структуре. В настоящее время существуют аптамеры на основе НК и полипептидов (рис. 6). Аптамеры могут связываться как с отдельными молекулами, так и со сложными комплексами (вирусы, белки, пептиды, лекарства, малые органические молекулы, ионы металлов и др.). Кроме того, аптамеры могут различать энантиомеры и очень схожие по строению молекулы (например, теofilлин и кофеин). Взаимодействие активных центров аптамеров с молекулами-мишенями, как и взаимодействие антител с целевым анализом, базируется на водородных связях, электростатических и вандерваальсовых взаимодействиях.

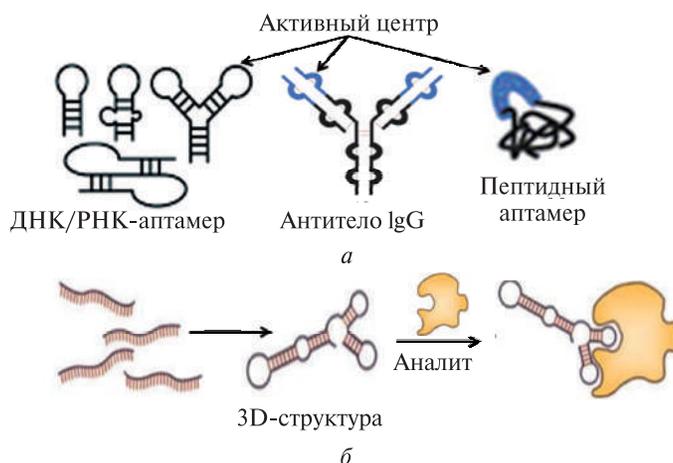


Рис. 6. Схема структур аптамеров и антител (а), реакции взаимодействия ДНК-аптамера с анализом (б)

Впервые методы получения *in vitro* высокоаффинных молекул по отношению к выбранным целевым молекулам (Т4 ДНК-полимеразы и органических красителей) на основе нуклеиновых кислот представили в 1990 г. независимо друг от друга две группы исследователей. Первая группа К. Турка и Л. Голда (С. Tuerk and L. Gold) дала обозначение метода получения аптамеров – SELEX (англ. *Systematic Evolution of Ligands by EXponential enrichment* – систематическая эволюция лигандов путем экспоненциального обогащения), вторая – А. Эллингтона и Дж. Шостака (А. Ellington and J. Szostak) ввела термин «аптамер». Селекцию, проводимую с помощью метода SELEX, можно сравнить со сложнейшим процессом биосинтеза и отбора антител, который природа создавала тысячелетиями. Сложнейший процесс биосинтеза белковых «распознающих» структур стали моделировать в пробирке.

ДНК-аптамеры. Данные аптамеры представляют собой искусственные одноцепочечные олигонуклеотиды, состоящие обычно из 20–100 нуклеотидов, способные спонтанно образовывать 3D-структуры за счет взаимодействия комплементарных участков (см. рис. 6). Это могут быть 3D-структуры с выпуклостями и петлями (шпильки, петли, лупы, псевдоузлы) либо в случае гуанин-богатых олигонуклеотидов – квадруплексные структуры (G-квартет или G-тетрады, «четверная спираль» ДНК, состоящая из четырех нуклеотидных цепей).

Основными элементами вторичной структуры аптамеров являются короткие двухцепочечные участки, образованные за счет комплементарного спаривания оснований, и одноцепочечные фрагменты. При этом одноцепочечные участки аптамера отвечают за специфичность взаимодействия аптамера с мишенью, а двухцепочечные – стабилизируют структуру аптамера и обеспечивают правильное расположение функциональных групп для узнавания аптамером мишени.

Технология SELEX (или *in vitro* селекция и амплификация) позволяет быстро получить аптамеры с заданными свойствами к различным синтетическим и природным компонентам. Селекция аптамеров основана на отличительных физических (или функциональных) свойствах комплекса аптамер – мишень.

В качестве стартового вещества в методе SELEX используется комбинаторная библиотека олигонуклеотидов, в которой каждый олигонуклеотид имеет общие 3' и 5' фланги длиной 17–25 нуклеотидов, а средние области длиной 20–60 нуклеотидов (в некоторых случаях от 8 до 220 нт.) уникальны. Надо помнить, что цепи ДНК антипараллельны (разнонаправлены), т. е. нуклеотиды разных цепей располагаются в противоположных направлениях, и, следовательно, напротив 3'-конца одной цепи находится 5'-конец другой. Такую библиотеку можно синтезировать как единый препарат олигонуклеотида, в котором в средней части в каждой позиции с равной вероятностью включается каждый из четырех нуклеотидов. Данный препарат инкубируют с молекулой-мишенью, которая обычно зафиксирована на каком-либо твердом носителе. Олигонуклеотиды, не связавшиеся с мишенью, отделяют от комплексов олигонуклеотид-мишень и удаляют. Далее связавшиеся последовательности элюируют и амплифицируют при помощи ПЦР, используя общие 3' и 5' фланги, чтобы получить новый пул молекул с увеличенным сродством. Данный цикл повторяют 10–15 раз, в результате чего происходит постепенное обогащение библиотеки олигонуклеотидов последовательностями, обладающими повышенным сродством к молекуле-

мишени. После окончания селекции обогащенную библиотеку клонируют и определяют последовательности индивидуальных аптамеров. Такая технология позволяет получать аптамеры за сроки от двух недель до нескольких месяцев. Опыт использования SELEX показал, что аптамеры могут быть получены практически к любым мишеням: отдельным молекулам (белки, полисахариды, малые органические молекулы, ионы металлов), сложным комплексам, отдельным организмам (вирусы, целые клетки). Уже разработаны методы автоматического отбора, которые позволяют проводить одновременный отбор аптамеров к большому числу различных мишеней.

Аптамеры фактически являются искусственными аналогами моноклональных антител. При этом они имеют ряд важных преимуществ перед природными антителами. Антитела получают путем иммунизации животного соответствующим антигеном (иммуногеном), а для получения антител к низкомолекулярным соединениям (гаптенам) необходимо предварительно создать его конъюгат с нейтральным белком. Производство аптамеров значительно проще, дешевле и быстрее, чем получение моноклональных антител. Аптамеры можно получать для тех целевых молекул, которые не вызывают стабильного иммунного ответа. Аптамеры получают *in vitro*, и поэтому они могут быть лучше адаптированы к нефизиологическим условиям. Селекция аптамеров – повторяющаяся операция и обычно требует 5–10 циклов (варьируется от анализа к анализу), скрининг моноклональных антител – времязатратный и дорогой процесс. Вследствие химического способа синтеза активность аптамеров одинакова независимо от партии синтеза, активность антител может варьироваться от партии к партии. Свойства аптамеров могут быть изменены в зависимости от поставленной задачи. Исследователь может определять активную сторону анализа, с которой будет взаимодействовать аптамер. В случае антител это определяет иммунная система животного. Аптамеры, как и антитела, обладают высокой аффинностью, величина константы диссоциации комплекса аптамера с целевой молекулой может лежать в нано- и пикообласти. Многие аптамерные БС имеют более высокую чувствительность, чем иммунные сенсоры. Достоинством ДНК/РНК-аптамеров является их способность к многократной денатурации-ренатурации без потери сродства к мишени. Антитела при высоких температурах подвергаются необратимой денатурации. Срок хранения аптамеров без потери свойств в отличие от антител практически неограничен.

В случае анализа биожидкостей аптамеры, как и НК, могут быть расщеплены под действием нуклеаз, что ведет к инактивации за время от нескольких секунд до минут. Для увеличения устойчивости аптамеров в биожидкостях они могут быть модифицированы постселекцией или селекция может быть выполнена с использованием модифицированных нуклеотидов, устойчивых к ферментам.

Пептидные аптамеры – это малые гибридные белки, которые обладают способностью специфически распознавать и взаимодействовать с молекулярной мишенью (белки, полипептиды) как *in vitro*, так и *in vivo*. Пептидные аптамеры состоят из короткой варибельной последовательности (5–30) аминокислот, которая генно-инженерными методами встроена в стабильную полипептидную цепь белка-основы (названной «лесом») (см. рис. 6). Короткие аминокислотные цепи образуют на поверхности белка-основы одну или несколько петель.

Впервые концепция пептидных аптамеров опубликована в 1996 г. Р. Брэнтом (R. Brent). Исследователь предложил модель аптамера «петля на структуре» (англ. «loop on a frame»), имитирующую паратоп антитела. Эта модель была усовершенствована, аптамеры стали включать несколько переменных петель, инкорпорированных в более сложные комбинаторные белки, что улучшило связывающие способности данных аптамеров.

Пептидные аптамеры получают путем скрининга комбинаторных пептидных клонотек как *in vitro* с помощью рибосомного и мРНК-дисплея, так и непосредственно в живой клетке в дигибридных системах. Отобранные по способности взаимодействовать с молекулами-мишенями пептидные аптамеры могут специфически распознавать не только белки, относящиеся к одному семейству, но и менее значительно различающиеся аллельные варианты полипептидов.

В пептидных аптамерах полипептидная цепь белка-носителя выполняет скелетную функцию. Она обеспечивает правильное пространственное расположение пептидной петли на поверхности белковой глобулы носителя, а также высокий уровень экспрессии пептида во внутриклеточном окружении. В качестве белка-носителя чаще всего используют бактериальный тиоредоксин, а также зеленый флуоресцирующий белок и нуклеазы стафилококков.

Пептидным аптамерам присущи некоторые черты антител. Пептидная часть гибридного белка является аналогом переменного участка полипептидных цепей иммуноглобулинов (антител). Данные аптамеры, как и антитела, обладают высокой специфичностью по отношению к целевым молекулам, константы диссоциации их комплексов с лигандами находятся в пределах 10^{-7} – 10^{-9} М.

В настоящее время пептидные аптамеры используют в основном для обнаружения белков и изучения белковых взаимодействий *in vivo*. Однако возможности белковой инженерии открывают перспективы создания новых пептидных аптамеров для фактически любого рода биохимических исследований.

ДНК-аптамерные сенсоры – «молекулярные маяки». Применение аптамеров в качестве биоконпонентов в БС и аналитических микрочипах позволяет создать надежные и стабильные системы для анализа как макромолекул, так и малых органических молекул (пестицидов, лекарств, наркотиков и т. д.). Наиболее широко используемыми стали ДНК-аптамерные сенсоры, получившие название «молекулярные маяки» (ММ) (англ. *molecular beacons probes*). ММ были разработаны в 1996 г. С. Тьяги, Ф. Р. Крамером (S. Tyagi, F. R. Kramer) для определения НК в растворе. Детектирование искомым молекулам с помощью ММ базируется на явлении флуоресценции, так как для производства сенсоров используют аптамеры, маркированные флуорофорами.

Флуоресцентные красители (флуорофоры) – это молекулы, которые при поглощении фотона испускают свет с большей длиной волны (с меньшей энергией). Различные процессы могут снижать интенсивность флуоресценции данного вещества, что называется тушением флуоресценции. К тушению могут приводить реакции флуорофора в возбужденном состоянии, перенос энергии, образование комплексов и тушение при столкновениях. При конструировании ММ, как правило, используют статическое тушение и ферстеровский-резонансный перенос энергии (ФРПЭ) (англ. *Förster Resonance Energy Transfer, FRET*).

ММ представляет собой одноцепочечный олигонуклеотид, образующий в свободном состоянии структуру «шпилька» (или «стебель-петля»), к 5'- и 3'-концам которой ковалентно присоединены либо два флуорофора, либо флуорофор и нефлуоресцирующий хромофор (тушитель флуоресценции). Структура «шпилька» состоит из двух участков – петли (обычно 15–35 пар оснований) и основы (обычно 5–8 пар оснований). Одноцепочечная последовательность нуклеотидов в петле обладает сродством к молекуле-мишени, это участок аптамера, который взаимодействует с искомой молекулой и таким образом распознает ее в пробе. Именно данный фрагмент ММ определяет его селективность. Две части основы «шпильки» состоят из комплементарных друг другу нуклеотидов (т. е. 5' и 3'-концы олигонуклеотидной цепочки гибридизуются между собой) и поэтому образуют стабильную структуру при отсутствии молекулы-мишени.

Рассмотрим принцип работы ММ, содержащего пару флуорофор – тушитель флуоресценции (рис. 7). Дизайн зондов выполнен так, что молекулы флуорофора и тушителя всегда находятся в непосредственной близости в отсутствие аналита и отделены друг от друга в его присутствии. Появление флуоресцентного сигнала указывает на наличие искомой молекулы в пробе, а падение сигнала – на ее отсутствие. В качестве флуорофора могут быть 5-карбоксихлорофлуоресцеин (англ. FAM), 6-карбоксихлоро-4',5'-дихлор-2',7'-диметоксихлорофлуоресцеин (6-JOE), 4,7,2',7'-тетрахлорофлуоресцеин (TET), 5-карбокситетраметилродамин (5-TAMRA), 6-карбоксихлородамин (R6G), цианиновые красители (Cy3, Cy5). В качестве гасителей часто используют следующие вещества: ВНQ1 (англ. *Black Hole Quencher*) и ВНQ2 с диапазоном гашения соответственно 480–580 и 550–650 нм, а также 4-([4-(диметиламино)фенил]азо)бензойную кислоту (DABCYL) с диапазоном гашения 390–510 нм. В качестве источника света может служить лазер, обеспечивающий возбуждение флуоресценции в узком диапазоне длин волн (например, 500–540 нм в случае аргоновых лазеров). В то время как источники белого света (например, вольфрамо-галогенная лампа) и светодиоды в сочетании с фильтрами возбуждения и эмиссии могут возбуждать флуорофоры во всем видимом диапазоне (400–700 нм).

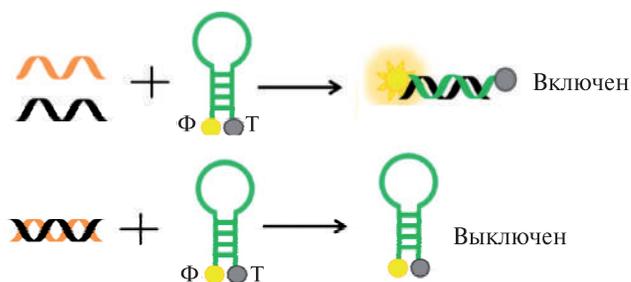


Рис. 7. Схема работы сенсора «молекулярный маяк», маркированного флуорофором (Ф) и тушителем (Т) (контактное тушение)

При отсутствии молекулы-мишени шпильчатая структура зонда находится в закрытом состоянии: флуорофор и тушитель находятся в непосредственной близости друг от друга, вследствие чего флуоресценция флуорофора подавлена, т. е. ММ «выключен». Пару флуорофор – тушитель подбирают так, чтобы в основ-

ном состоянии в зонде, принявшем шпильчную конформацию, происходило эффективное тушение флуоресценции. Тушение флуорофора является результатом образования нефлуоресцирующего комплекса с молекулой тушителя. Этот механизм известен как статическое тушение (или контактное тушение), для реализации которого флуорофор и тушитель должны контактировать (расстояния, близкие к контактным < 1 нм; $0,5-0,8$ нм). При контактном тушении происходит гашение флуоресценции независимо от того, перекрываются спектры эмиссии флуорофора и поглощения тушителя или нет.

При контактном тушении молекулы взаимодействуют посредством протон-связанного переноса электрона (англ. *proton-coupled electron transfer, PCET*) через образование водородных связей. В случае PCET перенос электрона сопровождается переносом протона, что осуществляется в одном совместном элементарном акте и контрастирует с последовательным переносом частиц. В водных растворах электростатические и гидрофобные силы, а также стерические факторы управляют образованием водородных связей. Флуорофор и тушитель часто представляют собой планарные гидрофобные молекулы, которые взаимодействуют друг с другом для минимизации контакта с окружающей водой.

Если комплекс флуорофор – тушитель поглощает энергию света, то возбужденное состояние быстро возвращается в основное без эмиссии фотона, энергия расходуется преимущественно в виде выделения тепла. Характеристическая черта контактного тушения – изменение в спектрах поглощения молекул флуорофора и тушителя при формировании комплекса. Эффективность контактного тушения зависит от сродства флуорофора и тушителя.

В присутствии молекулы-мишени образуется гибридная структура, в которой центральная петля взаимодействует с искомой молекулой, при этом ММ-зонд «раскрывается», т. е. происходит распрямление «шпильки». В раскрытом состоянии 5'- и 3'-концы, которые изначально образовывали основу зонда, оказываются разнесенными на значительное расстояние. Соответственно, расстояние между флуорофором и тушителем увеличивается, и тушитель не может эффективно гасить флуорофор, уровень флуоресценции сильно повышается («маяк» зажигается) (см. рис. 7). Интенсивность флуоресценции пропорциональна концентрации аналита. ММ позволяет обнаружить аналит в пробе в присутствии других ее компонентов без предварительной пробоподготовки в режиме реального времени.

После удаления из системы молекулы-мишени структура ММ восстанавливается, сигнал флуоресценции снова становится минимальным. Ошибки в измерении могут вносить компоненты пробы, способные флуоресцировать. Для одновременного анализа нескольких аналитов в одной пробе могут быть использованы ММ, меченные различными по цвету флуорофорами.

Чувствительность молекулярных маячков как аналитических зондов определяется главным образом двумя параметрами: некоторой остаточной флуоресценцией, когда ММ находится в закрытой форме («ложные положительные сигналы» из-за неполного подавления флуоресценции или случайных примесей), и флуоресценцией датчика, когда ММ находится в открытой форме.

В идеале эмиссия флуорофора в закрытой форме должна быть полностью подавлена гасителем. В действительности, однако, остаточная флуоресценция варьируется значительно в основном из-за таких факторов, как жесткость – гиб-

кость и длина петли, выбор пары флуорофор – тушитель и их свойств, способ присоединения флуорофора – тушителя к олигонуклеотиду. Любая остаточная флуоресценция ММ в его закрытой форме значительно ограничивает чувствительность обнаружения. Кроме того, ММ типа флуорофор – гаситель не всегда используется для количественного определения целевой молекулы.

Для преодоления этих ограничений, свойственных классическому типу ММ, разрабатываются различные новые виды, одним из которых является ММ с применением двух флуорофоров – ФРПЭ-пары. Принцип работы такого ММ базируется на использовании ФРПЭ (безызлучательный перенос энергии). ФРПЭ – это механизм переноса энергии возбужденного состояния между двумя флуорофорами – от донора к акцептору. Он происходит без промежуточного испускания фотонов и является в основном результатом диполь-дипольного взаимодействия между донором и акцептором. Несмотря на то что теория ФРПЭ была разработана Теодором Ферстером в конце 1940-х гг., первое биологическое применение этого явления стартовало в 1970-х и было использовано для исследования белков. ФРПЭ- приложения для изучения ДНК начали разрабатываться только в середине 1980-х и 1990-х гг.

В данном типе ММ вместо пары флуорофор – тушитель концы одноцепочечного аптамерного зонда модифицируют двумя флуорофорами, которые образуют ФРПЭ-пару (рис. 8). В паре один флуорофор является донором (например, кумарин), другой – акцептором (например, 6-карбоксифлуоресцеин). Донор поглощает энергию света и флуоресцирует. Однако в присутствии акцептора флуоресценция донора не наблюдается. Акцептор-флуорофор поглощает свет на длине эмиссии донора и флуоресцирует при $\lambda_{\text{эмис}} > \lambda_{\text{эмис}}$ донора. Необходимым условием для реализации ФРПЭ является перекрывание спектров эмиссии донора со спектром возбуждения акцептора, а также пространственная близость доноров и акцепторов (порядка 1–10 нм), поскольку эффективность переноса падает с увеличением расстояния между ними. Кроме того, дипольные моменты переходов донора и акцептора должны быть ориентированы параллельно друг другу. В отсутствие молекулы-мишени в пробе регистрируют флуоресценцию акцептора. Присутствие искомого соединения можно детектировать либо по исчезновению флуоресценции акцептора, либо по росту эмиссии донора.

ММ с двумя флуорофорами обнаруживают более высокую чувствительность, чем классические ММ с парой флуорофор – тушитель.

Перспективным развитием ММ с механизмом ФРПЭ стало использование в качестве флуорофоров наноразмерных объектов, в частности квантовых точек (КТ). Преимущества таких ММ – большая чувствительность и стабильность. КТ очень устойчивы к фотовыцветанию (обесцвечивание светом, фотохимическое разрушение). Применение в качестве донора КТ и акцептора – ноночастиц Au приводит к увеличению соотношения сигнал/шум более чем в семь раз.

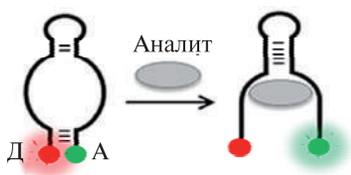


Рис. 8. Схема работы сенсора «молекулярный маяк», маркированного ФРПЭ-парой: донором (Д) и акцептором (А)

1.5.2. Сенсоры на основе молекулярно-импринтированных полимеров

Молекулярно-импринтированные полимеры (МИПы), или полимеры с молекулярными отпечатками, — это синтетические полимеры, способные специфически взаимодействовать с целевой молекулой (молекула-отпечаток). Метод получения «молекулярных отпечатков» различных соединений на полимерной матрице называется «молекулярный импринтинг» (англ. *imprint* — отпечаток, оттиск, штамп). Метод заключается в сополимеризации функционального и сшивающего мономеров в присутствии целевой молекулы. После удаления такой молекулы из сетчатого полимера в структуре матрицы образуются полости, комплементарные целевой молекуле стереометрически и по расположению активных центров.

МИПы являются миметиками антител и используются в качестве рецепторного элемента в производстве биосенсоров. МИПы обладают сравнимой с нативными антителами селективностью и аффинностью по отношению к анализам. Анализ с использованием молекулярно-импринтированных полимеров (МИП-анализ) называют также псевдоиммуноанализом или молекулярно-импринтированным анализом.

Исторически впервые молекулярный импринтинг был описан советским химиком М. В. Поляковым в 1931 г., а именно получение на основе силикагеля материалов с «химической памятью» для распознавания малых молекул. В 1940 г. Л. Полинг (L. Pauling) высказал идею о создании антител, согласно которой молекула антигена может служить трафаретом в формировании молекулы антитела. Затем молекулярный импринтинг как техника, известная сегодня, был представлен одновременно Д. Вульфом и А. Шарханом (G. Wulff and A. Sarhan), И. Клотцем и Т. Такагиши (I. Klots and T. Takagishi) в 1972 г. Исследователи впервые опубликовали метод «печатания» молекул в органических полимерах. Однако интенсивное развитие молекулярного импринтинга началось в 1990-е гг.

Процесс получения МИПов. Процесс формирования МИПа начинается с образования предполимеризационных комплексов между искомой молекулой (аналитом), которую принято называть шаблоном (англ. *template* — лекало, образец, трафарет) или импринт-молекулой, и мономерами, несущими определенные функциональные группы. Шаблон вносят в смесь функциональных мономеров. В результате взаимодействия мономеров с шаблоном образуется комплекс, при этом мономеры занимают вокруг шаблона определенные позиции. Затем позиции функциональных мономеров вокруг шаблона закрепляются с помощью поперечно сшивающих мономеров (кросс-линкеров), вокруг молекул импринтируемого вещества формируется полимер (достигается высокая степень поперечной сшивки). Для получения материала с соответствующей механической стабильностью обычно используется высокое соотношение кросс-линкер/функциональный мономер. После завершения процесса полимеризации шаблон удаляется, внутри полимера остаются специфические полости с трехмерной структурой, т. е. в полимере остаются молекулярные отпечатки шаблона. Полости по форме, размеру и расположению функциональных групп комплементарны молекуле-шаблону. Благодаря «молекулярной памяти», заложенной в сверхсшитой

полимерной решетке, эти участки способны к повторному высокоспецифичному взаимодействию с шаблоном. По сути, такой отпечаток способен распознавать и взаимодействовать с аналитом в пробе и удерживать его. В результате получается МИП с заданной селективностью, так называемая пластиковая «кукла» антитела. Возможно многократное использование полимерных частиц с регенерацией и полным восстановлением связывающей способности. В основе взаимодействия МИПов с целевыми аналитами лежат те же нековалентные связи, благодаря которым формируется иммунореактивный комплекс антитело – антиген. Между функциональными группами аналита и группами, представленными в полимерной матрице, формируются водородные связи, диполь-дипольные и электростатические взаимодействия.

Выбор функциональных мономеров в молекулярном импринтинге является очень важным, он определяет получение высокоспецифических МИПов. Именно подбор функциональных мономеров определяет создание «формочки», идеально соответствующей по дизайну структуре шаблона. В качестве функциональных мономеров, как правило, используют карбоновые кислоты (метакриловая, 2-(трифторметил)-акриловая, винилбензойная), сульфокислоты (2-акриламидо-2-метилпропан сульфокислота) и гетероароматические соединения (винилпиридин, винилимидазол), несущие основные группы. Мономеры могут нести заряд (N,N,N-этиламиноэтилметакрилат, 3-акриламидопропилтриметиламмоний хлорид) или быть гидрофобными (стирол). Широкое распространение получила метакриловая кислота из-за ее способности образовывать водородные связи. Для связывания определенных аминокислотных последовательностей в качестве функциональных мономеров используют координационные соединения металлов. Наиболее часто для полимеризации выбирают мономеры с виниловыми и акриловыми группами.

Выбор мономеров определяется силой и природой взаимодействия мономера и шаблона. Хорошее взаимодействие между мономером и шаблоном с образованием стабильного комплекса мономер – шаблон является основой специфичности МИПа. В настоящее время существует две стратегии получения МИПов, различающиеся по природе предполимеризационного взаимодействия шаблона и мономера.

Первая стратегия базируется на том, что формирование комплекса шаблон – мономер происходит путем самосборки (англ. *self-assembly*) подобно процессу образования упорядоченных надмолекулярных структур в биосистемах, в основе взаимодействия лежат нековалентные связи (водородные связи, вандерваальсовы силы, электростатические и гидрофобные взаимодействия). При этом шаблон удаляется из полимера путем многократной экстракции с помощью смеси органических растворителей, как правило, последовательного применения смеси метанол/уксусная кислота и метанола. Высушенные под вакуумом частицы хранятся длительное время без ущерба для функциональных свойств. Участки молекулярного распознавания в полученных таким способом МИПов неодинаковы по аффинности, что позволяет сравнивать эти искусственные рецепторы с поликлональными антителами.

Второй методологический подход основан на образовании ковалентных связей между функциональными группами мономеров и шаблона. В этом случае

для удаления шаблона из полимерной матрицы ковалентные связи должны быть разрушены химически (например, с помощью сильной кислоты). Ковалентные полимеры очень стабильные и селективные. Ковалентный подход позволяет получить более гомогенные распознающие стороны, так как есть возможность контроля стехиометрии взаимодействующих шаблона и мономера. Недостатком является то, что ковалентные МИПы имеют лимитированное число функциональных групп для взаимодействия с целевой молекулой и обнаруживают медленную кинетику связывания.

Способ получения МИПов на основе самосборки, его называют *методом полимеризации в массе раствора* (англ. *bulk polymerization*) (3D-импринтинг, или «объемный» метод), наиболее широко распространен. Это обусловлено простотой образования комплекса и его диссоциацией, кроме того, применяемые в этом случае мономеры могут взаимодействовать с почти любым шаблоном. Однако соответствующие МИПы имеют меньшую аффинность, чем МИПы, полученные с использованием ковалентных связей. Стандартный протокол получения МИПов этим способом включает несколько стадий (рис. 9).

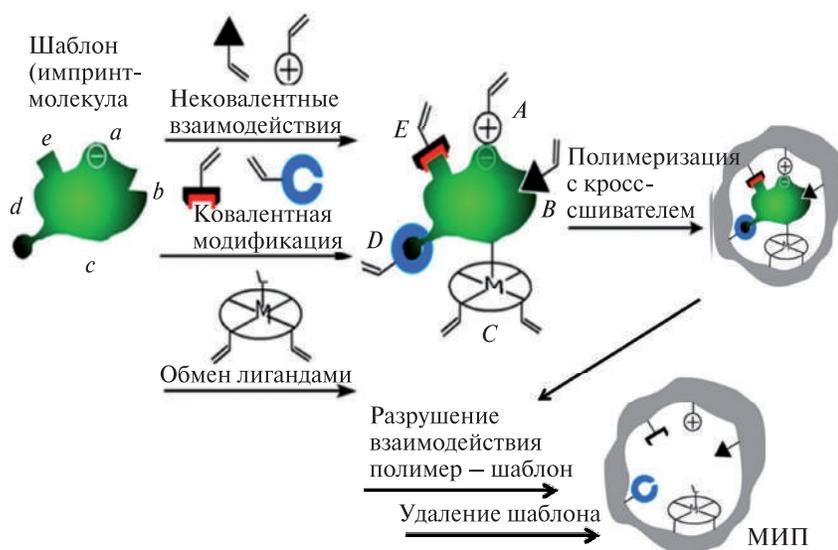


Рис. 9. Получение МИПов методом полимеризации в массе (3D-импринтинг)

На стадии приготовления реакционной смеси шаблон добавляется к полимеризационной смеси, содержащей тот или иной функциональный мономер и сшивающий агент, а также необходимый для образования пор растворитель. Полимеризация может инициироваться либо нагреванием реакционной смеси до 50–60 °С, либо ультрафиолетовым облучением. Процесс самоассоциации между функциональным мономером и шаблоном является равновесным, и обычно мономер добавляют в избытке по отношению к шаблону, что способствует формированию комплекса. Как правило, соотношение функциональный мономер : шаблон составляет 3 : 1 или 4 : 1. Количество сшивающего компонента в реакционной среде максимально и достигает 70–90 %. Стандартное объемное

соотношение мономер : порогенный растворитель составляет 3 : 4. Доступность участков (сайтов от англ. *site* – участок, местоположение) связывания в МИПе становится возможной именно благодаря пористости сшитой полимерной матрицы. Для нековалентного импринтинга предпочтительны неполярные или апротонные полярные растворители (бензол, толуол, хлороформ, ацетонитрил), обеспечивающие прочность нековалентных связей. Полярные протонные растворители (вода, метанол и др.) затрудняют полимеризацию и дестабилизируют водородные связи между шаблоном и функциональными мономерами. Данные растворители используют, если в формирование комплекса вовлечены гидрофобные силы.

В последние годы создают *флуоресцентные* МИПы. Их особенностью является наличие в структуре специальных центров, которые при связывании с аналитом изменяют параметры флуоресценции полимерной матрицы. Флуоресцентные МИПы получают путем включения в реакционную среду флуорофоров, содержащих полимеризуемую функциональную группу. Природа используемых флуорофоров весьма разнообразна – от простых ароматических молекул до сложных порфириновых систем, а также наноразмерные структуры (квантовые точки, углеродные нанотрубки). В большинстве случаев связывание молекул аналита с подобным МИПом приводит либо к тушению флуоресценции, либо к усилению эмиссии.

При 3D-импринтинге МИПы обычно получают в виде полимерного монолита, который механически размалывают с получением неоднородных частиц. Гомогенизация по размеру осуществляется путем многократного просеивания через сита с определенным диаметром пор и последующей седиментации. Для аналитических целей используют частицы диаметром примерно 25 мкм. Для последующего взаимодействия молекулы аналита с функциональными группами МИПов важны размер пор, их объем и распределение по размеру. Сайты связывания, ассоциированные с мезо- и макропорами (размер соответственно 2–50 нм и >50 нм), более доступны молекуле-шаблону, чем участки, локализованные в мелких микропорах (<2 нм), диффузия в которые идет медленнее. Данный метод получения МИПов является простым и самым популярным, однако времязатратным и дает часто частицы, различающиеся по размеру и форме. Кроме того, во время помола некоторые взаимодействующие стороны могут быть повреждены, что снижает аналитическую мощность МИПа.

3D-Импринтинг более подходит для «печатания» низкомолекулярных соединений. Импринтинг биологических макромолекул, особенно белков, является более сложной задачей из-за их большого размера, конформационной гибкости и нестабильности в органических растворителях. Поддержание конформационной стабильности белка во время процесса полимеризации – сложная задача. Большие макромолекулы проблематично удалить из МИПов. Кроме того, в МИПе формируются большие по размеру распознающие сайты, которые могут быть легко доступными для меньших молекул (например, полипептидов). Это приводит к снижению селективности вследствие кросс-реактивности.

Для преодоления ограничений 3D-импринтинга применяют альтернативные методы «печатания». К ним относится *импринтинг на поверхности* (2D-импринтинг) (англ. *surface imprinting*), который осуществляется различными

способами: мягкой литографией с формированием комплекса шаблон – мономер путем самосборки, ковалентной иммобилизацией шаблона на поверхность, привитой и эмульсионной полимеризацией. В качестве планарных поверхностей используют стекло, слюду, кремний. При поверхностном импринтинге высокоаффинные распознающие сайты формируются непосредственно на поверхности МИПа, что делает их более доступными для целевых молекул, снижаются диффузионные ограничения. Поэтому техника применима для «печатания» биомолекул, включая белки. Причем для получения МИПов требуется меньшее количество молекул шаблона, чем в «объемном» методе. Существует большое разнообразие техник 2D-импринтинга, как правило, на первом этапе происходит непосредственная иммобилизация молекулы-шаблона на поверхность, а затем к ней добавляют мономеры и кросс-реактанты.

МИПы в сравнении с антителами обладают рядом *преимуществ*. Импринты получают *in vitro*, причем методы получения достаточно просты и оперативны (несколько дней, а не месяцев, как в случае антител). Благодаря высокой воспроизводимости синтеза свойства МИПов стабильны, тогда как свойства антител в существенной степени зависят от индивидуальных особенностей иммунизированного животного. МИПы обладают предсказуемой специфичностью, и можно в большей степени исключить перекрестную реакционную способность, характерную для природных антител. МИПы обладают высокой аффинностью и селективностью по отношению к искомой молекуле, использованной в процессе импринтинга, по этим свойствам МИПы и природные антитела сопоставимы. К тому же в зависимости от размера МИПы могут иметь большое число связывающих сторон (тысячи или даже миллионы), а природные антитела только несколько (в случае иммуноглобулинов IgG – два). МИПы обладают длительной стабильностью (сохраняют специфическую активность в течение нескольких лет при комнатной температуре), химически инертны, нерастворимы в воде и большинстве органических растворителей. Устойчивость МИПов к экстремальным для биологических макромолекул кислотным и щелочным средам, органическим растворителям, высоким температурам и давлениям обеспечивает их значительные преимущества по сравнению с природными антителами.

МИПам, используемым в качестве реагентов в псевдоиммунном анализе, присущ ряд *недостатков*. Из-за нерастворимости в воде МИПы не могут быть альтернативой природным рецепторам в гомогенных форматах иммуноанализа. Они непригодны для неконкурентного, обычно более чувствительного «сэндвич»-анализа (последовательность взаимодействий: антитело I – аналит – антитело II), поскольку доступ второго рецептора к молекуле, связавшейся с полимерной матрицей, стерически затруднен.

В целом привлекательной особенностью молекулярного импринтинга для анализа является возможность его применения для широкого спектра целевых молекул, даже тех, для которых трудно получить антитела. В настоящее время разработаны методы получения полимерных аналогов антител для широкого спектра низкомолекулярных соединений с массой <1500 Да (фармацевтические препараты, пестициды, аминокислоты, пептиды, нуклеотидные основания, стероиды, сахара и др.). И несмотря на трудности, активно развивается синтез МИПов для высокомолекулярных структур: белков – маркеров заболеваний, ДНК, вирусов и бактериальных клеток.

МИП-анализ. МИП-частицы в качестве свободных реагентов, имитирующих антитела, могут использоваться непосредственно для анализа аналита в жидкой пробе (псевдоиммуноанализ). Такой анализ чаще всего проводят в органической среде. При тестировании биологических жидкостей и водных проб требуется предварительная экстракция аналита в органическую фазу. Предлагаемые методы МИП-анализа аналогичны конкурентному иммуноанализу с использованием меченых реагентов. Этапы разработки и характеристики иммуноанализа и МИП-анализа в основном совпадают. Впервые псевдоиммуноанализ с применением МИПов и радиоизотопных меток был реализован Г. Влатакисом с соавторами (G. Vlatakis [et al.]) в 1993 г. для определения в плазме крови двух лекарственных соединений – диазепама и теофиллина.

МИПы нашли широкое применение для изготовления сенсоров, используемых для анализа в жидких средах. Принцип действия МИП-сенсоров аналогичен БС с биорецепторным слоем, просто вместо биомолекул используется нанесенный на трансдьюсер полимер, который содержит участки молекулярного распознавания. МИПы используются с различными типами трансдьюсеров – электрохимическими (электроды), гравиметрическими (пьезокварцевый микробаланс), оптическими (на основе эллипсометрии, поверхностного плазмонного резонанса и др.).

Интеграция МИП-частиц с сенсором может осуществляться через иммобилизацию МИП-частиц с помощью поливинилхлоридной матрицы, агарозного геля. МИПы, после предварительного измельчения и фракционирования, обрабатывают подходящим растворителем или смешивают с полимером либо гелем и наносят в виде тонкого слоя на поверхность трансдьюсера. Силы адгезии между МИП-частицами и поверхностью трансдьюсера могут быть слабыми. Кроме того, время отклика у таких сенсоров может быть достаточно большим вследствие медленного переноса масс.

Для создания МИП-сенсоров также широко используют метод поверхностного импринтинга. Главный недостаток данного метода в дизайне сенсора – более низкая чувствительность в сравнении с 3D-импринтингом вследствие сокращения числа сайтов распознавания. Однако такие сенсоры можно использовать как для анализа низкомолекулярных соединений, так и белков, микроорганизмов и целых клеток.

МИПы могут быть сопряжены с наноматериалами для повышения электропроводности, площади поверхности, электронтранспортных свойств и вместе с тем чувствительности анализа. Для этих целей получают конъюгаты МИПов с наночастицами золота или кремния, углеродными нанотрубками, графеном, магнитными наночастицами, нанопроводами и квантовыми точками.

В последнее время для получения сенсоров с молекулярными импринтами используют молекулярно-импринтированные мембраны (МИМ). МИМы способны распознавать целевые аналиты в растворе посредством простой адсорбции на поверхности или при прохождении молекул через мембрану. Классическая мембрана определяется как селективный барьер, расположенный между двумя смежными фазами и регулирующий транспорт различных частиц между фазами. В отличие от обычных мембран МИМы вдобавок к эксклюзивным свойствам имеют специфическую сторону распознавания аналита. Существуют различные

стратегии разработки МИМов, они могут быть плоскостойными или иметь конфигурацию полого волокна (англ. *flat-sheet and hollow fiber configurations*). Плоскостойные МИМы (подобны листу бумаги) – это тонкие пленки с пористой или плотной структурой. Полые волоконные МИМы имеют конфигурацию трубки, подобную длинным спагетти, их диаметр варьируется от 50 до 3000 мкм. Данные МИМы могут иметь пористую структуру с плотным селективным слоем на внешней поверхности.

Плоские МИМы могут изготавливаться методом УФ-индуцированной полимеризации смеси раствора шаблона, функциональных мономеров и кросс-линкеров. Волоконные мембраны получают методом термической сополимеризации. Перед полимеризацией к смеси добавляют пластификаторы, чтобы получить более гибкие и механически стабильные мембраны. Сенсоры на основе МИМов обладают высокой селективностью и стабильностью.

1.6. МЕТОДЫ ИММОБИЛИЗАЦИИ БИОРАСПОЗНАЮЩЕЙ СИСТЕМЫ НА ПОВЕРХНОСТЬ ТРАНСДЬЮСЕРА

Эффективность работы БС, а именно его чувствительность, селективность, воспроизводимость результатов определения, продолжительность эксплуатации, в первую очередь определяется качеством биорецепторного слоя. Для стабильной работы БС существенным является закрепление, т. е. иммобилизация, распознающего элемента – биологического материала – на физико-химическом преобразователе.

В соответствии с определением ИЮПАК *иммобилизация* биокомпонентов – это техника, используемая для физической и химической фиксации клеток, органелл, ферментов и других белков на твердой поверхности, в твердой матрице или удерживание мембраной для того, чтобы увеличить их стабильность и сделать возможным их повторное или длительное использование.

Методы иммобилизации биорецепторного слоя должны удовлетворять определенным требованиям. При иммобилизации должна сохраняться высокая активность биоструктур в течение как можно более продолжительного времени. Нужно помнить, что белки (ферменты, антитела) очень чувствительны к условиям окружающей их среды и могут подвергаться деградации или денатурации при физическом или химическом воздействии. Во время иммобилизации 3D-структура белков не должна изменяться, так как это приведет к потере их активности. Молекулы ДНК более стабильны, чем белки, поэтому их иммобилизовать легче.

При иммобилизации перенос молекул аналита к распознающему биорецептору не должен быть затруднен, а если в распознающей структуре (например, ферментативный слой) осуществляется каталитическая реакция, то должен быть обеспечен отвод продуктов реакции. Метод иммобилизации должен быть применим в достаточно широких диапазонах температур, значений pH и давлений. Однако наилучший способ фиксации макромолекул на трансдьюсере – это иммобилизация в мягких условиях, максимально приближенных к физиологическим. Метод иммобилизации должен обеспечивать хорошую воспроизводимость получения иммобилизованного слоя.

При проведении иммобилизации на трансьдьюсере должен быть получен слой биорецептора, удовлетворяющий определенным требованиям, что позволит получить БС с оптимальными аналитическими характеристиками. При использовании антител, ферментов или других белков в качестве биокомпонента их активный центр должен быть максимально доступен для реакционного партнера, т. е. молекул аналита (рис. 10). Активные центры связывания биорецепторного слоя должны быть равномерно распределены по всей площади поверхности. Для слишком плотной упаковки биоструктур существуют стерические и электростатические препятствия для подхода молекул аналита. В то же время низкая плотность упаковки приведет к недостатку центров связываний и увеличению неспецифического взаимодействия молекул аналита с поверхностью трансьдьюсера и в целом к снижению чувствительности БС (см. рис. 10). Кроме того, биорецепторный слой должен обладать физической и химической устойчивостью при контакте с жидкостью, включая устойчивость к регенерации. Для определенных видов трансьдьюсера, чувствительных к поверхностным явлениям (например, основанных на поверхностном плазмонном резонансе или нарушении полного внутреннего отражения), требуется иммобилизация очень тонких слоев. Для гравиметрических трансьдьюсеров масса рецепторного слоя должна быть минимальной, что обеспечивает возможность регистрации большей величины приращения массы сорбируемого аналита.

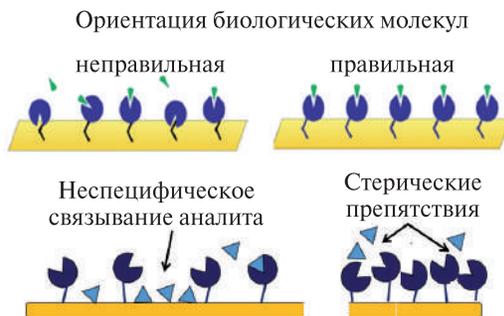


Рис. 10. Ориентация и плотность упаковки иммобилизованных биомолекул на поверхности трансьдьюсера

Преимущества иммобилизации заключаются в том, что стабильность биокомпонента повышается, например по отношению к действию органических растворителей и колебаниям температуры и величины pH среды. Кроме того, система биокомпонент – носитель может легко отделяться от анализируемого раствора.

К *недостаткам* иммобилизации относится то, что иногда теряется часть активности биокомпонентов, особенно это может происходить, когда макромолекулы химически модифицированы. При помещении биоструктур в мембрану или гель для молекул аналита возникает диффузионный барьер.

Основные методы иммобилизации биокомпонентов (рис. 11):

- физические: адсорбция из раствора, включение в матрицу (гель или полимер), изолирование (капсулирование) с помощью инертных мембран;

- химические: неполимерное ковалентное связывание, поперечная сшивка;
- аффинный;
- метод самоорганизующихся монослоев (СОМ);
- с помощью магнитных частиц.

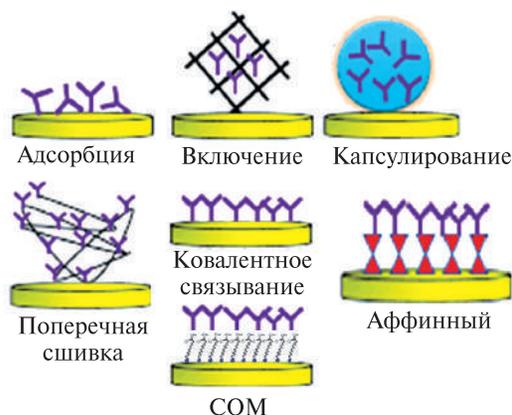


Рис. 11. Методы иммобилизации биокомпонентов

Выбор метода иммобилизации определяется рядом факторов, включая свойства поверхностей для иммобилизации, структуру и свойства биокомпонентов, состав матрицы исследуемых проб, свойства буфера, используемого для регенерации. Иммобилизация может осуществляться на кварцевые, стеклянные, полидиметилсилоксановые (ПДМС) поверхности, тонкие металлические (золотые) пленки, различные наноматериалы (проводящие полимерные нанопровода, углеродные нанотрубки, металлические наночастицы) и др. При некоторых видах иммобилизации поверхности специально обрабатывают с целью получения на них активных функциональных групп, чтобы можно было иммобилизовать биомолекулы в щадящих условиях и получить стабильный рецепторный слой.

Значение имеет не только химический состав материала, но и его форма. В то время как иммобилизация на плоские поверхности накладывает ограничения на плотность упаковки макромолекул, 3D-структуры – бусинки, золь-гели, гидрогели, полимерные монолиты – обладают большей мощностью по захвату биомолекул, что улучшает чувствительность анализа. Среди 3D-структур гидрогели из полиакриламида и полиэтиленгликоля обеспечивают гидрофильную окружающую среду, способствующую стабильности и активности таких биомолекул, как белки (ферменты, антитела).

1.6.1. Физические методы

1.6.1.1. Адсорбция из раствора

Физическая адсорбция (лат. *ad* – на, в; *sorbeo* – поглощаю) биокомпонентов является одним из самых распространенных и старейших (начало положено еще в 1916 г.) методов иммобилизации. Данный метод достаточно прост, практически не требует подготовки поверхности трансдьюсера и применения специальных

химических реагентов. Имобилизация биомолекул происходит в результате контакта их водных растворов с соответствующей поверхностью.

В качестве *адсорбционного материала* могут быть неорганические материалы (пористые стекла, кварц, кремний), натуральные полимеры (коллаген, агароза в виде сефарозы, целлюлоза), синтетические полимерные материалы (пластики, полидиметилсилоксан), металлические поверхности, кремнийорганические золь-гель матрицы, а также различные наночастицы (НЧ) – полимерные (полистирольные латексные), силикагельные (SiO_2) и металлические (Au, Ag), углеродные структуры (стеклоуглеродные электроды, пиролитический графит, углеродные композиты). При этом важную роль играют физико-химические свойства поверхностей, а именно площадь и пористость поверхности, поверхностное распределение энергии.

Адсорбция имеет место на границах раздела и представляет собой увеличение концентрации растворенного вещества у поверхности раздела двух фаз вследствие нескомпенсированности сил межмолекулярного взаимодействия на разделе фаз. Процесс, обратный адсорбции, называют десорбцией. Равновесие достигается при равенстве скоростей адсорбции и десорбции. Адсорбционное равновесие определяется двумя процессами: притяжением молекул к поверхности под действием межмолекулярных сил и тепловым движением, стремящимся восстановить равенство концентраций в поверхностном слое и объеме фазы. Количественно адсорбцию характеризуют числом молей или массой вещества, накапливающегося на границе раздела фаз, в расчете на единицу площади поверхности раздела, например мг/г или ммоль/г.

Поверхность твердых тел, как и жидкостей, обладает избыточной энергией Гиббса. Тенденция к уменьшению избыточной поверхностной энергии Гиббса проявляется у твердых тел в способности удерживать на поверхности молекулы растворенного вещества. Физическая адсорбция – обратимый экзотермический процесс. Теплота адсорбции $\Delta H = \Delta G + T \cdot \Delta S$ всегда отрицательна, так как ΔG и ΔS отрицательны при самопроизвольной адсорбции. Когда частица адсорбируется на поверхности, ее поступательное движение ограничивается, и поэтому процесс сопровождается уменьшением энтропии. При повышении температуры адсорбция уменьшается, а десорбция увеличивается.

При физической адсорбции взаимодействие между поверхностью и адсорбированной молекулой обусловлено межмолекулярным взаимодействием, которое не приводит к разрыву или образованию новых химических связей. Адсорбция основана преимущественно на вандерваальсовых силах (диполь-дипольные, индукционные и дисперсионные взаимодействия), а также водородных связях и электростатических взаимодействиях. Вклад каждого из типов связывания зависит от химической природы носителя и функциональных групп на поверхности биологической макромолекулы. Взаимодействие с носителем может оказаться настолько сильным, что сорбция биоконпонента может сопровождаться разрушением его структуры. При адсорбции, как правило, реализуется многоточечная адсорбция макромолекул, т. е. происходит установление связей между одной молекулой, например белка, и множеством участков на поверхности. Такая адсорбция, например белков на гидрофобных поверхностях, может быть необратима.

В случае поверхностей из пластика или ПДМС такие биорецепторы, как белки, могут адсорбировать на них за счет гидрофобных взаимодействий. Для улучшения адсорбции на такие поверхности их модифицируют с помощью линкеров, т. е. используют промежуточные соединения, которые одним концом присоединяются ковалентно к поверхности, а другой конец с гидрофобной или заряженной функциональной группой ответственен за физическую адсорбцию белков. Модифицированные таким образом поверхности обладают большим потенциалом удерживать биомолекулы за счет гидрофобных или электростатических взаимодействий, чем исходные. Физическая адсорбция на модифицированные поверхности может быть даже практически необратимой. В качестве положительно заряженных групп обычно используют протонированные аминогруппы (NH_3^+) и четвертичные аммониевые основания (NR_4^+), а в качестве отрицательных – карбоксильные ($-\text{COO}^-$) и сульфогруппы ($-\text{RSO}_3^-$). На углеродные поверхности, например электроды, адсорбция макромолекул осуществляется за счет гидрофобных взаимодействий. Для усиления адсорбции такие поверхности подвергают окислению для образования карбоксильных групп, что способствует взаимодействию за счет водородных связей.

На практике для иммобилизации методом физической адсорбции раствор биоконпонента с определенным значением pH помещают на нужную поверхность и выдерживают некоторое время при заданной температуре, затем поверхность отмывают от несвязавшегося вещества. Например, при адсорбции антител или клеток на поверхность пьезокварцевого трансдьюсера (металлический электрод на поверхности пьезокварцевой пластины) электрод выдерживают в водном растворе биореагента определенной концентрации. Адгезия к металлической поверхности достигается за счет электростатических взаимодействий и образования водородных или координационных связей между атомами металла электрода и, например, атомами серы, входящими в состав белков. Рецепторное покрытие, полученное при инкубировании в течение четырех суток, может выдержать до 20 измерительных циклов без снижения величины аналитического отклика. Количество иммобилизованных антител и клеток оценивается по сигналу (разности частотных сдвигов) модифицированного и чистого пьезокварцевого трансдьюсера.

Преимуществом адсорбции являются легкость и простота выполнения, отсутствуют сложные химические процедуры, нет необходимости модифицировать биомолекулы. Адсорбция практически не нарушает конформацию биологических макромолекул, и вследствие этого минимизируется потеря активности. Достоинство метода адсорбционной иммобилизации – доступность и дешевизна сорбентов, выступающих в роли носителей. Им также можно придать любую конфигурацию и обеспечить требуемую пористость. В отдельных случаях адсорбция происходит с очень высокой скоростью по сравнению с ковалентным или биоаффинным присоединением, которые, как правило, требуют значительного времени инкубации. По этой причине физическую адсорбцию можно использовать в качестве промежуточной стадии при определенных видах многоступенчатой иммобилизации.

В то же время физической адсорбции присущ ряд *недостатков*. Для метода характерна низкая стойкость формируемого покрытия. Изменение свойств среды (pH, ионная сила, температура, полярность) может привести к десорбции мо-

лекул. Это сказывается на воспроизводимости результатов определения и сроке службы сенсора. При физической адсорбции из раствора часть биомолекул адсорбируется, а часть остается в растворе, создается динамическое равновесие. Присутствующие в растворе биомолекулы способны распознавать молекулы аналита в растворе, что будет влиять на воспроизводимость и точность анализа. Удалять биомолекулы из раствора отмыванием в данном случае нельзя, так как нарушится адсорбционное равновесие. При физической адсорбции наблюдается произвольная ориентация молекул адсорбата, что может привести к недоступности некоторых активных центров рецепторного слоя. Кроме того, может сформироваться слой невысокой плотности и с неравномерным распределением функциональных групп, что снижает чувствительность и селективность БС.

На поверхности могут адсорбироваться нецелевые молекулы из раствора пробы, т. е. происходит неконтролируемое неспецифическое связывание (источник второстепенного сигнала – шумов). Например, если отрицательно заряженные белки (рецепторный слой) были адсорбированы на положительно заряженную поверхность, то все анионные частицы, присутствующие в исследуемой пробе, могут неспецифически связаться с такой поверхностью. В конечном итоге это приведет к снижению селективности и чувствительности анализа. Для разрешения этой проблемы после адсорбции биокомпонента оставшиеся свободные места на поверхности блокируют нейтральными реагентами (например, альбумином).

Метод адсорбции используют для иммобилизации живых клеток. В качестве адсорбирующих материалов используют различные мембраны, фильтровальную бумагу, углеродные материалы, стекло. Адсорбция основана на специфическом свойстве клеток – агрегировать, и далее образовавшийся агрегат адсорбируется на поверхности.

1.6.1.2. Включение в матрицу и капсулирование

Включение является универсальным методом, применимым для иммобилизации разных типов распознающих компонентов. Суть метода заключается в окклюзии (ограждении, включении) биологического материала внутри трехмерной матрицы, которая позволяет малым молекулам легко диффундировать туда-сюда, но удерживает большие биологические компоненты внутри. Существует несколько *разновидностей метода* включения, отличающихся по типу используемой матрицы, а именно включение в синтетические полимеры, гидрогели, золь-гели, в проводящую матрицу, например графитную пасту (композиты из угольной пасты). В отличие от плоских поверхностей 3D-матрицы обладают большей мощностью связывать биокомпоненты. Практическое применение метода включения лимитировано ограничениями переноса масс через матрицу. Диффузия в пористых материалах определяется главным образом его пористостью. Согласно рекомендациям ИЮПАК пористые материалы классифицируют по преимущественному размеру пор на микропористые (поры до 2 нм), мезопористые (от 2 до 50 нм) и макропористые (выше 50 нм). Иммобилизация биомолекул происходит, как правило, в мезопористый материал. Экспериментальные условия для создания пор в материале подбирают так, чтобы, с одной стороны, минимизировать утечку сквозь поры конкретного биокомпонента, а с другой

стороны, оптимизировать диффузию аналитов сквозь пористую матрицу. Пористость, например в случае синтетических полимеров, можно контролировать соотношением мономеров и кросс-сшивателей, для кремниевых золь-гелей – величиной рН или отношением вода/прекурсор (например, алкоксид кремния).

К *достоинствам* метода включения в матрицу относятся методическая простота и универсальность (применим для иммобилизации практически любых биоконпонентов); тесное взаимодействие между биоматериалом и трансдьюсером; сохранение высокой активности биоконпонента, так как он не модифицируется; повышенная устойчивость к загрязнениям и биодеструкции (надежная защита от инактивации вследствие бактериального заражения, так как крупные клетки бактерий не могут проникнуть, например, в мелкопористую полимерную матрицу), что способствует увеличению операционной стабильности и времени хранения.

К *недостаткам* метода можно отнести нижеследующее. Диффузия молекул через матрицу часто бывает затруднена, что снижает скорость взаимодействия биоконпонента с молекулами аналита и, следовательно, увеличивает время отклика биосенсора, снижается чувствительность, повышается предел обнаружения. В случае ферментативных БС, используемых для анализа высокомолекулярных субстратов, данный метод иммобилизации может быть не применим вообще. Биоконпонент может постепенно вытекать через поры в матрице, что влияет на воспроизводимость и чувствительность БС.

Включение в полимерную матрицу. Суть метода состоит в том, что происходит захват биоконпонента внутри трехмерной сетки из тесно переплетенных полимерных цепей. Среднее расстояние между соседними полимерными цепями меньше размера включенного биоконпонента, поэтому он не может покинуть полимерную матрицу и выйти в окружающий раствор, т. е. находится в иммобилизованном состоянии. Дополнительный вклад в удерживание биоконпонента в сетке полимера могут вносить также ионные и водородные связи между биоконпонентом и окружающими его полимерными цепями.

Для иммобилизации биоконпонентов методом включения в полимер, как правило, водный раствор биоконпонента добавляют к раствору мономера, а затем проводят полимеризацию с помощью кросс-сшивателя, в результате чего образуется полимер с включенными в него молекулами биоконпонента. Полимеризацию проводят на поверхности трансдьюсера, дают высохнуть ей, затем промывают водой, после чего она готова к использованию. В отдельных случаях биоконпонент вносят в раствор готового полимера.

Способ иммобилизации биоконпонентов путем включения в полимерную структуру позволяет создавать матрицы любой геометрической конфигурации, обеспечивая при этом равномерное распределение биоконпонента в объеме носителя.

Включение в гидрогель. В настоящее время широкое распространение в качестве матрицы для иммобилизации биоконпонентов получили гидрогели. Гидрогели – это поперечно сшитые 3D-полимерные структуры, способные набухать в воде и удерживать ее большое количество внутри (из-за наличия гидрофильных групп на полимерном остове), но при этом они остаются нерастворимыми вследствие присутствия поперечных сшивков. Пространство между полимерными це-

пиями в геле заполнено водой, на долю которой обычно приходится значительная часть всего объема геля. Например, широко применяемые гели полимеров акриловой кислоты в зависимости от концентрации полимера и его природы содержат от 50 до 90 % воды. Такие свойства гидрогелей, как высокая упругость, проницаемость и биологическая совместимость, имеют определяющее значение при их применении для иммобилизации биокомпонентов.

Гидрогели могут быть физическими и химическими. В физических гелях полимерные цепи скреплены между собой водородными связями, электростатическими силами, гидрофобными взаимодействиями или благодаря запутанности цепей (как нити в клубке). Полимерные цепи химических гидрогелей связаны между собой ковалентными связями. К гидрогелям относятся полиакриламид, полиуретан, полиэтиленгликоль (ПЭГ), полисахариды (декстран, альгинаты, линейный полимер хитозан, сшитый глутаровым альдегидом), желатин и др. Различия в гидрогелях определяются структурой используемых мономеров. Например, это могут быть акриловая кислота и ее соли, акриламид и др. За три последних десятилетия (начиная с 1998 г.) развитие получили суперпористые гидрогели, которые способны абсорбировать большие количества воды или биологических жидкостей (в 10–1000 раз больше их оригинального веса или объема) за относительно короткие периоды времени.

Биомолекулы в неизменном виде могут включаться непосредственно в гидрогель. Для улучшения характеристик БС используют также биомолекулы, конъюгированные с наноструктурами, выбор последних определяется типом трансдьюсера. Например, для повышения чувствительности электрохимических БС (трансдьюсер – электрод) используют проводящие ПЭГ-гидрогели, включающие биоконъюгаты фермента с Au-наночастицами (AuНЧ) (т. е. на поверхности НЧ закреплены молекулы фермента). Гидрогель, состоящий из ПЭГ, является идеальной матрицей для включения биоструктур, он не загрязняется, поэтому элиминирует загрязнение биосенсора при анализе сложных по составу биологических жидкостей. AuНЧ улучшают проводимость геля и способствуют передаче электрона от фермента к электроду. Предел обнаружения глюкозы с помощью электродов, модифицированных компонентами ПЭГ/AuНЧ/глюкозооксидаза (т. е. на Au-электрод наносится слой гидрогеля, содержащий конъюгаты глюкозооксидазы с AuНЧ), составляет $3,7 \times 10^{-7}$ М, что характерно для самых чувствительных глюкозных БС.

Метод включения широко используют для получения микробных БС. Иммобилизация живых клеток, например в полисахаридные гидрогели, снижает токсичное влияние компонентов матрицы пробы на клетки, что важно при разработке БС для анализа проб окружающей среды.

Включение в кремнийсодержащие золь-гель матрицы. В настоящее время данный метод широко используют для иммобилизации биокомпонентов. Кремнийсодержащие золь-гель матрицы ($n\text{-SiO}_2$ – матрицы) – это пористые полисилоксановые гели, полученные золь-гель методом. Они обеспечивают сохранение биологической активности биокомпонента и его эффективную защиту от механического, теплового и биологического воздействия. О возможности включения ферментов в кварцевые матрицы сообщалось еще в 1955 г. в работе Ф. Х. Дики (F. H. Dickey). Однако интенсивное развитие метода иммобилизации

биокомпонентов в золь-гели началось с 90-х гг. XX в. В 1990 г. С. Браун и соавторы в своей работе описали метод включения ферментов в кварцевые стекла, синтезированные золь-гель методом.

Золь-гель процесс — это технология получения материалов (в том числе наноматериалов) с определенными химическими и физико-механическими свойствами из растворов, включающая получение золя (коллоидная дисперсия частиц с размером 1–1000 нм в однородной жидкой фазе) и последующий его переход в гель. Золь-гель метод позволяет получать материалы с различным размером пор, не требует энергоемкого, дорогого оборудования, является экономичным и экологически чистым.

Процесс получения кремнийсодержащего золь-геля состоит из нескольких стадий. На первой стадии путем реакций гидролиза и поликонденсации получают золь (коллоидный раствор частиц гидроксидов, размер которых не превышает несколько десятков нм) из золь-прекурсоров (сложные эфиры ортокремниевой или поликремниевой кислоты, алкоксиды). На второй стадии увеличение объемной концентрации дисперсной фазы или иное изменение внешних условий (рН, замена растворителя) приводит к появлению коагуляционных контактов между частицами и началу структурирования — гелеобразования. На данной стадии происходит формирование пространственной сетки геля. Далее происходит старение геля, а именно уплотнение структуры геля, сжатие сетки и выделение из геля растворителя. Сначала в системе образуются отдельные частицы оксида кремния. Затем протекает их коалесценция с образованием больших пористых структур. Концентрирование золь с последующим гелеобразованием осуществляют путем диализа, ультрафильтрации, электродиализа, упаривания при относительно низких температурах или экстракции. На последней стадии осуществляется сушка, из пространственной структуры геля удаляется жидкость (растворитель). Эта стадия играет исключительно важную роль в золь-гель процессе, так как в зависимости от метода ее осуществления могут быть получены различные продукты синтеза (ксерогели, амбигели, криогели, аэрогели).

Поскольку золь-гель процесс протекает при мягких условиях и комнатной температуре, то он подходит для иммобилизации биоструктур без изменения их активности. Золь-гель метод широко используют для иммобилизации антител и ферментов, при этом сохраняется их нативная конформация. Метод иммобилизации в золь-гель матрицу обладает рядом преимуществ: высокой экспрессностью, простотой исполнения, нетоксичностью, доступностью прекурсоров.

Классическим методом золь-гель синтеза пористых кремнийсодержащих гелей является алкоксидный метод. Для получения золь-гель матриц используют соединения кремния, так называемые золь-прекурсоры, в частности алкоксиды кремния ($\text{Si}(\text{OR})_4$), которые растворяют в подходящем растворителе (вода, спирт). Процесс синтеза, как указывалось выше, состоит из нескольких стадий, протекающих при комнатной температуре. Сначала протекает гидролиз, вследствие чего заместители у атома Si гидролизуются с образованием силанолов $\text{HO}-\text{Si}(\text{OR})_3$. Далее гидролизованный прекурсор активируется путем добавления щелочи (или кислоты) для инициирования реакции поликонденсации между силанольными остатками, что приводит к образованию силоксанового полимера ($\equiv\text{Si}-\text{O}-\text{Si}\equiv$). В качестве прекурсоров чаще всего используют тетраметоксисилан $\text{Si}(\text{OCH}_3)_4$ (ТМОС) и тетраэтоксисилан $\text{Si}(\text{OCH}_2\text{CH}_3)_4$ (ТЭОС) (рис. 12).

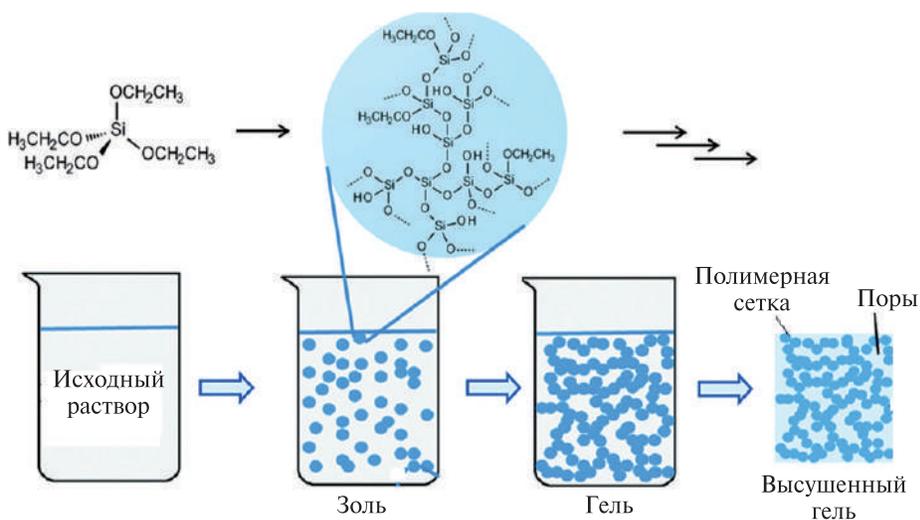


Рис. 12. Образование золь-геля из тетраэтоксисилана

Свойства золь-гель матриц (пористость, площадь поверхности, полярность, твердость) зависят от условий реакций гидролиза и поликонденсации. Важным также является тип прекурсора, молярное соотношение вода/прекурсор, растворитель, концентрация компонентов реакционной смеси, давление, температура, добавка различных веществ. Например, в золь-гель матрицу могут быть введены различные полимеры (альгинат, ксантан, желатин, хитин, хитозан, поливиниловый спирт, полиэтиленгликоль, полиакриламид, 2-гидроксиэтил метакрилат и др.). В таких гибридных золь-гель материалах между органическими и неорганическими компонентами могут формироваться ковалентные, водородные связи, устанавливаться вандерваальсовы и электростатические взаимодействия. Добавки макромолекул могут действовать как порообразующие агенты. Пористость материала можно варьировать путем добавления детергентов, ионных жидкостей, краун-эфиров, циклодекстринов.

Для иммобилизации биоконфентов в золь-гель матрицу их раствор добавляют к раствору алкоксидов кремния (или до, или после гидролиза прекурсора). Вследствие низкой растворимости ТМОС и ТЭОС в воде используют спирты для предотвращения разделения фаз. Кроме того, спирт выделяется в процессе гидролиза и конденсации. Это может повлиять на стабильность биомолекул. Поэтому разрабатываются различные методики с использованием более водорастворимых алкоксисиланов.

Протекание процессов гидролиза и конденсации приводит сначала к образованию коллоидного золя, который в присутствии целевых биомолекул подвергается дальнейшей конденсации до достижения точки гелеобразования. В точке гелеобразования по всему объему формируется твердая матрица, гель поликремниевой кислоты (трехмерная сетка из атомов кремния, соединенных кислородными мостиками) с промежуточной жидкой фазой, которая содержит биомолекулы. Полученный гель высушивают, измельчают и отмывают от невключившихся компонентов. В процессе высушивания может происходить сжатие жидкой фазы

и деформация белков. Для предотвращения этого на практике не проводят полную сушку. Для получения золь-гель матриц с различными характеристиками используют различные буферы и добавки.

Неорганические золь-гели (полисиликаты, полисилоксаны) в сравнении с органическими имеют преимущества, обусловленные их физическими свойствами, а именно высокую механическую прочность, высокую стабильность при изменении окружающей среды (рН, температура), высокую устойчивость к органическим растворителям и действию микроорганизмов, высокую фотостабильность и оптическую прозрачность (для длин волн выше 250 нм), простоту эксплуатации и легкость регенерации. Золь-гель матрицам можно придать различную форму и конфигурацию – волокна, пленки, монолита, мембраны, частиц (сферические частицы, полые наносферы, капсулы, нанотрубки). Кроме того, они могут быть прикреплены к различным материалам. Свойства неорганических золь-гелей обуславливают их применение для создания оптических и электрохимических сенсоров. Включение в кремнийорганические золь-гель матрицы является, например, одним из наиболее современных и перспективных методов иммобилизации ферментов в печатных электродах. Печатные электроды получают методом трафаретной печати (англ. *screen-printed electrodes*), они миниатюрны, многофункциональны, выпускаются большим тиражом, что позволяет создавать БС с низкой себестоимостью.

При производстве БС широко применяют также органо-неорганические нанокompозитные материалы, полученные со-конденсацией алкоксисиланов и органо-алкоксисиланов $R_{4-x}Si(OR)_x$ (например, метилтриэтоксисилан, аминопропилметилдиэтоксисилан). Такие материалы включают в себя органические функциональные группы, прикрепленные к неорганической решетке. Эти группы могут придавать материалу определенные оптические или электронные свойства, а также изменять химическую реакционную способность и полярность кремнеземной решетки. Таким образом можно получить нанокompозитные материалы с заранее определенными свойствами (оптическими или электрохимическими). Функциональные силаны позволяют получать гибридные золь-гель матрицы с оптимальным балансом гидрофильных/гидрофобных свойств. Это обеспечивает подходящую среду для иммобилизации лабильных белков и клеток, а также для последующей их активности. Композиты, полученные на основе редокс-активных прекурсоров (ферроцен-, убихинон-, флавин- и никотинамидмодифицированные силоксаны), используют для производства медиатор-опосредованных ферментативных сенсоров с заякоренной в матрице редокс-системой.

Капсулирование. Это один из распространенных методов, используемых при создании сенсоров. Он состоит в том, что биокomпоненты отделяются от остального раствора полупроницаемой мембраной. Данная мембрана легко пропускает небольшие молекулы аналита, но задерживает крупные молекулы биокomпонента (БК). БК заключаются между двумя мембранами или между мембраной и трансдюсером. БК в мембране может фиксироваться химически или физически. С применением этого метода был получен первый глюкозный биосенсор на кислородном электроде.

При капсулировании используют различные типы мембран. Помимо мембран из ацетата целлюлозы (диализных), не пропускающих молекулы белков и замедляющих транспорт многих низкомолекулярных соединений, применяют

также мембраны из полиуретанов поликарбоната (Nucleopore), природного белка коллагена и политетрафторэтилена (Teflon) – синтетического полимера, про-ницаемого лишь для некоторых газов (например, для кислорода).

Существующие модификации метода капсулирования различаются лишь способами получения полупроницаемой мембраны и ее природой. Водный рас-твор биомолекул, например фермента, можно включать внутрь микрокапсул, представляющих собой замкнутые сферические пузырьки с тонкой полимерной стенкой (микрокапсулирование).

При двойном эмульгировании получается водная эмульсия из капель органи-ческого раствора полимера, содержащих, в свою очередь, еще более мелкие кап-ли водного раствора биомолекул. Через некоторое время растворитель затвер-девает, образуя сферические полимерные частицы с иммобилизованным в них биокомпонентом. Если вместо водонерастворимого отвердевающего полимера используются жидкие углеводороды с высокой молекулярной массой, метод на-зывается иммобилизацией путем включения в жидкие мембраны.

К модификациям метода иммобилизации биокомпонентов с использовани-ем полупроницаемых оболочек относятся также включение в волокна (при этом вместо капель, содержащих биокомпонент, получаются нити) и включение в ли-посомы.

Применение систем мембранного типа позволяет получать иммобилизован-ные препараты с высоким содержанием биокомпонента. Благодаря высокому отношению поверхности к объему и малой толщине мембраны в случае иммо-билизации фермента в качестве распознающего элемента удастся избежать зна-чительных диффузионных ограничений скорости ферментативных реакций. Основной недостаток мембранных систем – невозможность ферментативного превращения высокомолекулярных субстратов.

1.6.2. Химические методы

1.6.2.1. Поперечная сшивка

Метод поперечной или кросс-сшивки является разновидностью химической иммобилизации. Суть метода заключается в том, что макромолекулы связываются (сшиваются) между собой ковалентными связями с образованием трех мерных поперечно сшитых агрегатов. Кросс-сшивку биомолекул осуществляют с помо-щью гомо- и гетеробифункциональных реагентов (кросс-линкеров), например гидразид- и сукцинимидсодержащих производных. Структуры некоторых би-функциональных реагентов приведены на рис. 13.

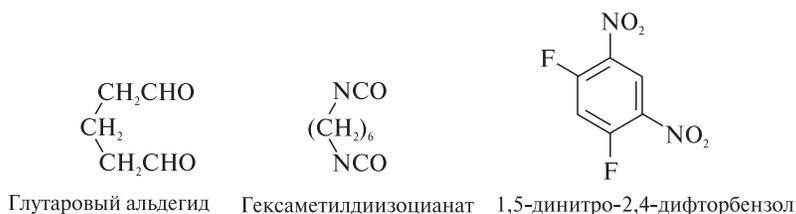


Рис. 13. Структура бифункциональных реагентов

Наиболее широкое применение нашел глутаровый альдегид (синонимы: 1,5-пентандиаль, глутараль, глутаровый диальдегид), что обусловлено его коммерческой доступностью и низкой стоимостью в дополнение к высокой реакционной способности. Впервые глутаровый альдегид (ГА) был применен для фиксации тканей еще в начале 1960-х гг. ГА сшивает молекулы белков преимущественно за счет взаимодействия с N-концевыми и ε-аминогруппами лизиновых остатков, располагающимися на поверхности макромолекул (при нейтральном pH). ГА в растворе может существовать в многочисленных формах (мономерной, олигомерной, например, α, β-ненасыщенные олигомеры, и полимерной) в зависимости от концентрации, величины pH, температуры и т. д., и все они могут быть реакционно-способными по отношению к ε-NH₂-группам. Поэтому сшивание молекул белка осуществляется через реализацию различных механизмов, включая образование оснований Шиффа и присоединение по Михаэлю.

Образование ковалентной связи между биокомпонентом и материалом подложки (поверхности трансдьюсера) происходит также посредством бифункциональных реагентов (ГА, гексаметилендиизоцианат и др.). Выбор химических реагентов для реализации процесса зависит от типа связываемых молекул и материала подложки.

Достоинство метода – простота выполнения и прочное ковалентное связывание биомолекул, что предотвращает их потерю в раствор. Недостатками является то, что при сшивке может происходить изменение конформации макромолекул и, как следствие, потеря их активности. Поэтому в процессе сшивки вводят инертные белки (желатин, бычий сывороточный альбумин) для минимизации этих драматических изменений. Кроме того, в полученных распознающих 3D-структурах может быть затруднена диффузия молекул.

1.6.2.2. Ковалентное связывание

Иммобилизация биокомпонентов посредством ковалентного связывания является одним из самых широко используемых методов. Ковалентное связывание осуществляется за счет взаимодействия функциональных групп биомолекул с активными группами материала подложки. При этом в реакцию не должны вовлекаться функциональные группы биомолекул, которые входят в состав их активных распознающих центров. Поверхность, на которую нужно присоединить биокомпоненты, – это, как правило, поверхность трансдьюсера. Последняя для получения надежного иммобилизованного слоя предварительно модифицируется различным образом. На нее может быть нанесен слой геля, полимера, наноструктур, она может подвергаться химической обработке и т. п.

При иммобилизации биологических молекул (НК, белки, углеводы и др.) на твердую поверхность процесс должен протекать в неденатурирующих условиях (низкие температуры, физиологическое значение pH) для сохранения их активности. Химические реакции, лежащие в основе иммобилизации, должны быть специфичны, протекать быстро и позволять использовать низкие концентрации реагентов, так как часто необходимые белки, ДНК и углеводы доступны в ограниченных количествах. На современном этапе необходимость масштабного производства биосенсоров требует, чтобы химия, лежащая в основе процесса иммобилизации, была проста и воспроизводима. Кроме того, важна надежность, так

как такие химические реакции могут осуществляться в технологических и биологических лабораториях, которые не оборудованы для проведения сложного химического процесса.

Выбор оптимального метода химической иммобилизации определяется как наличием функциональных групп биокон компонента, так и материалом подложки (трансдьюсера). Для этого могут использоваться немодифицированные биомолекулы, т. е. присоединение идет за счет их нативных групп, либо биомолекулы модифицируются – в их состав вводятся специальные группы.

Материалы подложки (матрицы) по их химической природе могут быть различными. В качестве неорганических материалов наиболее часто используют матрицы на основе диоксида кремния и оксидов металлов (цеолиты, мезопористые кремнеземы, пористые стекла, керамика, магнитные наночастицы), металлические (золото, серебро, платина) поверхности и наночастицы, а также углеродные наноструктуры (нанотрубки, нановолокна, нанокомпозиты). Из органических веществ в качестве матриц используют полиакриламиды, полиамиды и полисахариды – декстран (сефадекс), карбоксиметилцеллюлоза, агароза (сефароза). Важную роль играет не только химический состав матриц, но также геометрическая форма (плоские, сферические) и пористость. Последняя обеспечивает большую площадь поверхности и дает возможность иммобилизовать большое количество биокон компонента на единицу массы подложки. В отличие от плоских монокристаллических поверхностей в случае пористых 3D-матриц минимизируются стерические препятствия для взаимодействия аналита с закрепленным на поверхности биокон компонентом. Важными свойствами материала подложки являются механическая прочность, жесткость, возможность регенерации, нетоксичность.

Преимущество ковалентного присоединения заключается в том, что оно обеспечивает надежную связь биоматериала с подложкой и предотвращает его утечку. Это позволяет создавать сенсоры с длительным временем жизни. Данным методом получают насыщенные, плотные, трудно разрушаемые слои, устойчивые в жидких средах. При ковалентной иммобилизации достигается более прочное закрепление биослоя на поверхности трансдьюсера, что снижает потери рецепторных молекул при длительном контакте с жидкостью, обеспечивает более высокую воспроизводимость аналитического сигнала и возможность многократного использования биослоя после его регенерации. Метод способствует защите функциональной активности белков на длительное время (до двух лет).

Недостатком метода является то, что в результате может произойти конформационное изменение макромолекулы (к примеру, активного центра фермента), что приведет к снижению активности биокон компонента.

В целом ковалентное связывание, которое должно обеспечить получение прочного равномерного слоя биокон компонента, состоит из нескольких *этапов*. На первой стадии поверхность подложки подвергается химической модификации. Происходит активация поверхности, т. е. создание якорного блока – активной группы. Далее следует функционализация поверхности путем присоединения моно- или гетеробифункциональных линкеров к активным группам, образовавшимся на первой стадии. Как правило, на матрице создаются электрофильные группы, которые реагируют с нуклеофильными группами биомолекул. На следующем этапе происходит присоединение биомолекул, т. е. осуществляется биофункционализация поверхности. Заключительный этап – блокировка на

поверхности оставшихся свободных мест (сайтов) для предотвращения неспецифической адсорбции. Для минимизации адсорбции белков из раствора на поверхность свободные сайты блокируют с помощью нейтральных белков (альбумин, казеин), в случае ДНК – гидрофильными молекулами (спирт, полиэтиленоксид). Блокирующими реагентами в случае иммобилизации на золотую поверхность являются глицин, 6-меркапто-1-гексанол или этаноламин.

Активация и функционализация поверхности. Поверхности, используемые для иммобилизации биокомпонентов, предварительно модифицируют таким образом, чтобы было возможно присоединить к ним биоорганические молекулы при щадящих реакционных условиях. Кроме того, последовательная обработка поверхностей позволяет получать стабильный слой биокомпонента, определяющий надежную работу биосенсора. Сначала поверхности *активируют*, т. е. трансформируют имеющиеся на них группы в такие, которые позволяют просто и надежно присоединить к ним органические молекулы.

Для иммобилизации часто используют частицы SiO_2 , TiO_2 , Fe_2O_3 , сефарозы, на поверхности которых, как и пористого стекла, имеются гидроксильные группы. Последние на стадии активации подвергаются дериватизации органосиланами $\text{R}_n\text{SiX}_{(4-n)}$ (где R – органический остаток, несущий на своем конце активную группу, например, $-\text{NH}_2$, $-\text{SH}$, эпокси; X – активная гидролизующаяся группа, например, $-\text{Cl}$, $-\text{OMe}$, $-\text{OEt}$). Из органосиланов широко используют 3-аминопропилтриэтоксисилан (рис. 14) и 3-глицидоксипропилтриметоксисилан, благодаря которым поверхностные группы $-\text{OH}$ трансформируются соответственно в amino- и эпокси группы. Реакция силанов с поверхностными силанольными группами ($-\text{Si}-\text{OH}$) кварцевых частиц приводит к образованию стабильных силосановых связей ($\text{Si}-\text{O}-\text{Si}$), которые термически и химически стабильны.

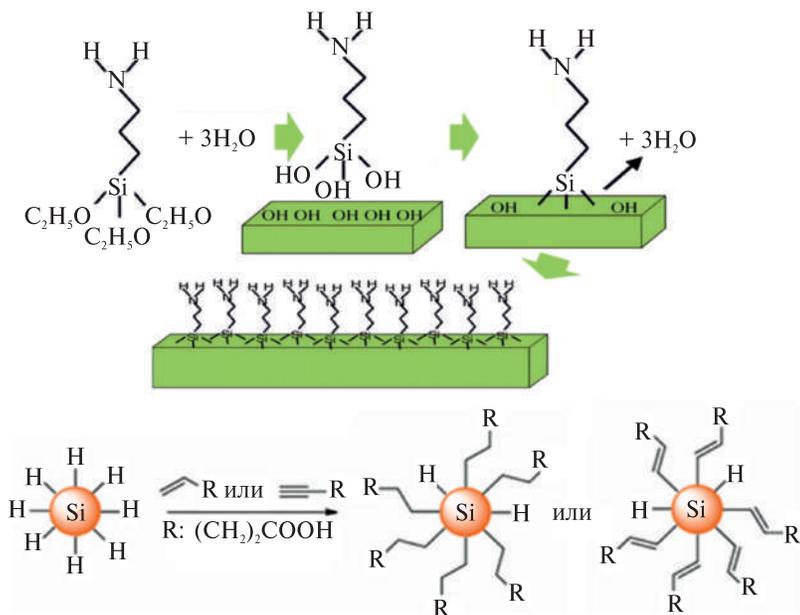


Рис. 14. Активация HO-содержащей неорганической поверхности аминопропилтриэтоксисиланом и кремниевых наночастиц алкенами или алкинами

В настоящее время с целью достижения высокой селективности и миниатюризации сенсоров в их производстве используют полупроводниковые кремниевые наноструктуры. Имобилизация органических соединений в таких БС происходит непосредственно на силановые поверхности без стадии поверхностного окисления кремния. Группы Si–H на поверхности кремниевых наночастиц дериватируют алкенами или алкинами ($\text{CH}_2=\text{CH}-\text{R}$ или $\text{CH}_2\equiv\text{CH}-\text{R}$, где R, например, $(\text{CH}_2)_2\text{COOH}$) (см. рис. 14). В результате образуются стабильные связи (Si–C), что обеспечивает получение очень прочного органического слоя на кремниевых поверхностях. В таких устройствах возможна прямая электронная связь между любыми органическими функциональными группами и кремниевой подложкой, что повышает производительность устройства по сравнению с таковыми, покрытыми нанопористыми слоями диоксида кремния. Это дает возможность создавать высокочувствительные электрохимические ферментные биосенсоры.

Для производства транзьюсеров также широко используют золотые слои и наночастицы благородных металлов (например, Au–НЧ), которые обладают большой площадью поверхности. Прямая адсорбция белков на объемных металлических поверхностях часто приводит к их денатурации и потере активности. Этого можно избежать, если белки сначала адсорбируют на металлические НЧ, которые затем осаждают непосредственно на поверхность транзьюсера. Полученные поверхности далее активируют производными алкантиолов (HSR) и диалкил-дисульфидов (RS_2R).

Разработка новых поколений оптических и электрохимических транзьюсеров базируется на широком применении УНТ и полистирольных латексных частиц. УНТ не растворимы в воде, и для присоединения биомолекул их предварительно модифицируют смесью концентрированных азотной и серной кислот с целью получения карбоксильных групп на поверхности. При этом имобилизация самих УНТ на поверхности транзьюсера может происходить двумя способами. В первом они закрепляются методами адсорбции или включения (в полимер или золь-гель), при этом произвольно располагаясь в пространстве. В другом – получают контролируемые по плотности упорядоченные слои вертикальных УНТ (так называемый лес), например, путем прямого их выращивания методом осаждения из газовой фазы (англ. Chemical Vapor Deposition, CVD).

Полистирольные латексные частицы обладают многими полезными свойствами, такими как биосовместимость, нетоксичность, сильная адсорбционная способность и химическая инертность. Они имеют высокую степень гидрофильности из-за наличия отрицательно заряженных сульфатных и карбоксильных групп. Поэтому данные частицы применяют при производстве различных биосенсоров и чипов как самостоятельно в качестве носителей либо в сочетании с другими НЧ (например, с Au–НЧ для получения нанокомпозитов с улучшенными электрохимическими свойствами).

Карбоксильные группы на поверхности УНТ или полистирольных латексных частиц модифицируют карбодиимидом ($\text{R}-\text{N}=\text{C}=\text{N}-\text{R}$) (рис. 15), например N,N'-дициклогексилкарбодиимидом.

В результате процесса активации получают модифицированную поверхность, несущую активные группы (например, amino, эпокси и др.). В отдельных случаях уже возможна имобилизация биомолекул непосредственно на такие акти-

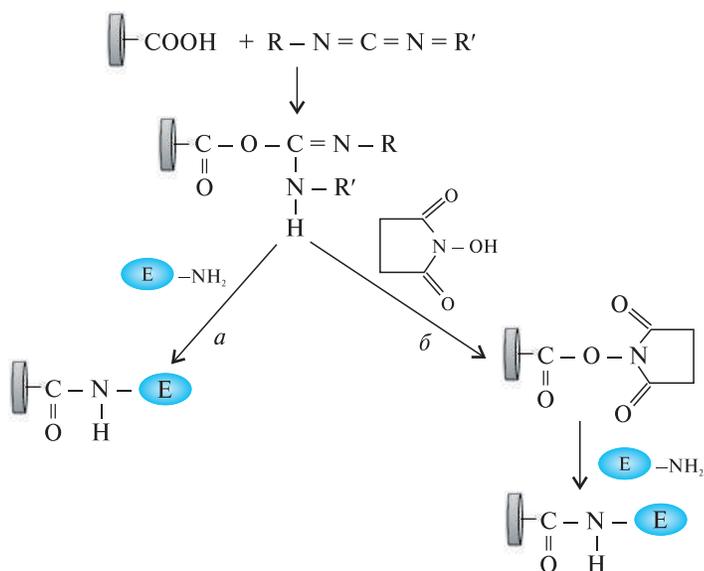


Рис. 15. Иммобилизация фермента на поверхность, активированную карбодиимидом (а) и функционализированную N-гидроксисукцинимидом (б)

вированные поверхности. Однако, как правило, данные поверхности на стадии *функционализации* подвергаются дальнейшей модификации с помощью бифункциональных связующих реагентов (или линкеров, англ. *link* – связывать, соединять). Такие линкеры одной концевой функциональной группой реагируют с активированной поверхностью, а второй конец остается свободным. В результате бифункциональные линкеры – глутаровый диальдегид, диглицидил эфир (эпоксигруппы), фенилен диизоцианат, N,N'-о-фенилендималеимид, циклогексилкарбодиимид – создают на поверхности слой функциональных групп, к которым непосредственно присоединяются биомолекулы. Это повышает эффективность иммобилизации. Кроме того, такой слой создает защитный барьер для контакта белков, ДНК и других лигандов с поверхностью подложки. Наиболее часто получают поверхности со следующими функциональными группами: альдегидная, тиольная, малеимидная, N-гидроксисукцинимидная, эпокси, карбоксильная. Например, поверхность, активированная карбодиимидом, может быть функционализирована с помощью N-гидроксисукцинимидом (англ. N-hydroxysuccinimide, NHS) (см. рис. 15). Активированные пористые стекла или органо-неорганические золь-гель наноконкомпозиты, несущие активные аминогруппы, функционализируют карбодиимидом или глутаровым альдегидом (рис. 16).

Биофункционализация поверхности. К активированным и функционализированным поверхностям присоединяют распознающие биокомпоненты, т. е. происходит биофункционализация поверхностей. Для этих целей используют как нативные, так и модифицированные биомолекулы. В первом случае взаимодействие с функциональными группами поверхности происходит за счет собственных групп биомолекул. Реакционно-способными группами белков, которые могут использоваться для иммобилизации, являются амино- (преимущественно остатков лизина), тиольные (цистеина), карбоксильные (аспарагиновой и глута-

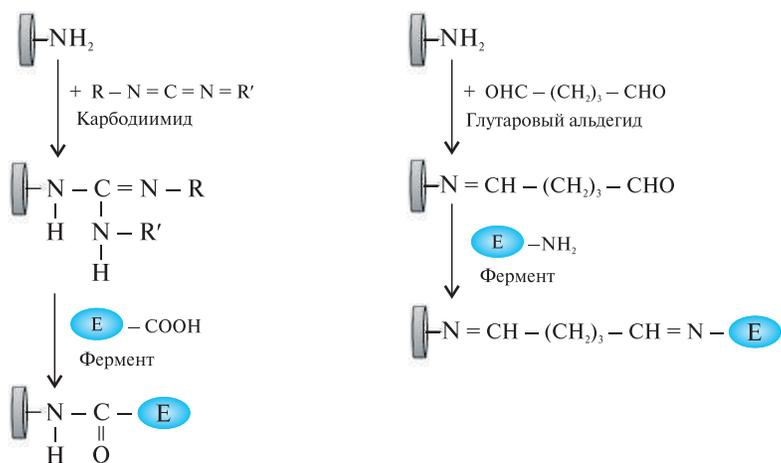


Рис. 16. Иммунизация фермента на поверхность, активированную аминогруппами и функционализированную карбодиимидом или глутаровым альдегидом

миновой кислот), фенольные (тирозина), гидроксильные (серина, треонина) или имидазольные (гистидина).

Аминогруппы белков наиболее часто используют для ковалентного присоединения макромолекул, так как их достаточно много и они высокореакционноспособны. Аминогруппы активно реагируют с поверхностью, активированной карбодиимидом либо функционализированной N-гидрокси-сукцинимидом с образованием стабильной амидной связи (см. рис. 15). При взаимодействии альдегидных групп с аминогруппами белков с образованием азометиновых связей ($-N=CHR$, оснований Шиффа) и последующем их восстановлении цианборгидридом натрия образуется стабильный вторичный амин ($-NH-CH_2R$) (см. рис. 16).

Тиольные группы ($-SH$) остатков цистеина позволяют иммобилизовать белки на поверхности, функционализированные ненасыщенными карбонилами (например, малеимидными группами), в результате реакции сопряженного присоединения образуются стабильные тиоэфирные связи (рис. 17). Надо отметить, что малеимидная группа при физиологических значениях pH (6,5–7,5) взаимодействует преимущественно с тиолами, так как при этих условиях аминогруппы преимущественно протонированы и неактивны.

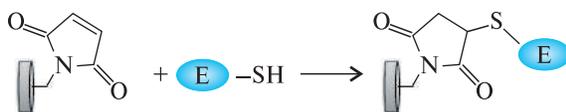


Рис. 17. Иммунизация фермента на поверхность, функционализированную малеимидом

К поверхностям, функционализированным эпокси-группами, белки активно присоединяются за счет тио-, амина- и гидроксигрупп. Преимущество эпокси-функционализированных материалов – в их относительной устойчивости к гидролизу при нейтральном значении pH, хотя реакции протекают медленно.

1.6.2.3. Ориентированная ковалентная иммобилизация

Ковалентное взаимодействие биомолекул с активной поверхностью за счет их нативных функциональных групп обеспечивает прочное присоединение. Однако у биологических макромолекул имеются множественные копии эндогенных групп, и они распространены вдоль их остова. Вследствие этого молекулы при классической ковалентной иммобилизации ориентированы в пространстве различным образом.

Для получения БС с хорошими аналитическими характеристиками важно, чтобы рецепторные молекулы не только связывались с поверхностью трансдюсера без потери их активности, но и были при этом правильно ориентированы для оптимального связывания аналита. В настоящее время альтернативой классическому ковалентному присоединению стали методы ориентированной ковалентной иммобилизации, которые позволяют в большей степени контролировать связывание биомолекул с поверхностью.

Контролируемая иммобилизация дает поверхность, равномерно покрытую одинаково ориентированными молекулами. При этом минимизируются следующие факторы:

- неспецифическая адсорбция биомолекул;
- ковалентное взаимодействие различных групп (отличных от тех, которые выбраны для ковалентной «пришивки») биомолекулы с поверхностью;
- стерические препятствия, т. е. когда доступность активного центра распознающей биомолекулы для аналита затруднена.

В целом такая иммобилизация способствует повышению аффинности, чувствительности, предела обнаружения, предела количественного определения. Кроме того, возрастает возможность многократного использования иммобилизованного слоя по сравнению с поверхностями, подготовленными случайным конъюгированием.

К методам ориентированной иммобилизации относится *сайт-специфичная* ковалентная иммобилизация (англ. *Site-specific covalent immobilization*). Этот процесс требует наличия двух уникальных и взаимореакционно-способных групп, одна из которых находится на поверхности подложки, другая — принадлежит макромолекуле. Реакция между этими двумя группами должна быть высокоселективной, представлять своего рода молекулярную «липучку» и протекать при физиологических условиях, чтобы избежать денатурации биомолекул. Для этих целей предварительно в определенные участки биомолекул вводят уникальные химические группы или последовательности (англ. *the site-specific introduction*). Выбор таких участков в структуре макромолекул имеет стратегическое значение, так как они должны иметь минимальное влияние на конформацию связывающих аналит областей. Вводимая группа в идеале должна быть биоортогональной, т. е. не встречаться в биомолекуле, и инертной по отношению к нативным функциональным группам.

Большинство методов хемоселективного присоединения белков к поверхностям основаны на методах лигирования, первоначально разработанных для синтеза, полусинтеза и селективной дериватизации белков химическими или биохимическими реагентами. Все эти методы включают дериватизацию белка уникальной химической группой в определенной позиции, которая реагирует се-

лективно с комплементарной группой на поверхности подложки. Один из таких методов базируется на модифицированной реакции Штаудингера. Суть в том, что в белок вводится азидная группа, например, методами белковой инженерии, а подложка, активированная карбоксильными или аминогруппами, модифицируется производными арилфосфина. В результате взаимодействия комплементарных групп белок присоединяется к подложке посредством прочной амидной связи (рис. 18). Согласно принципу жестких и мягких оснований азид и фосфин относятся соответственно к мягким электрофилам и нуклеофилам, в то время как биомолекулы содержат в основном жесткие нуклеофилы, которые не способны к реакциям с азидами.

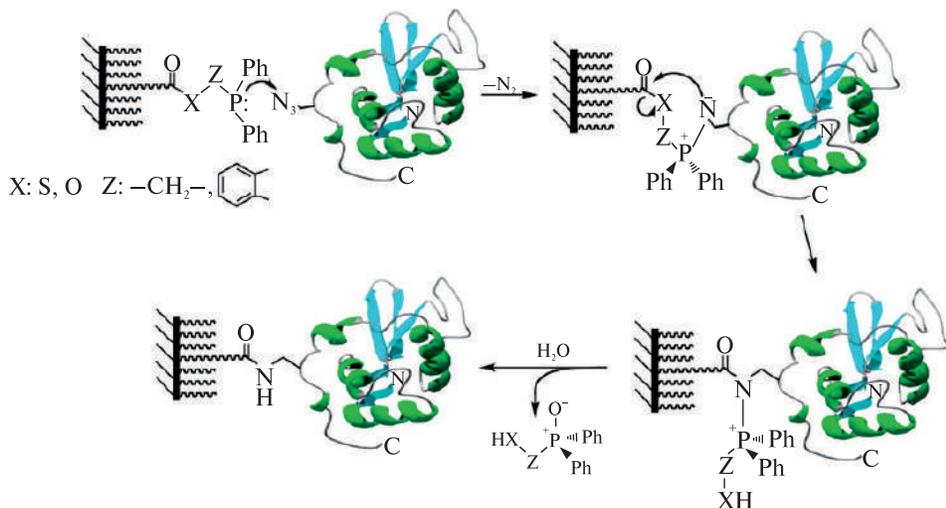


Рис. 18. Сайт-специфическое присоединение белка к подложке по модифицированной реакции Штаудингера

Для ковалентного присоединения биомолекул с контролируемой ориентацией также используют приемы *клик-химии* (англ. *click-chemistry*, *click* – щелчок). Концепция «клик-химия» впервые предложена нобелевским лауреатом Б. Шарплессом (B. Sharpless) в 2001 г. для описания нового типа органических реакций, простых в исполнении, высокостереоселективных, протекающих с высоким выходом при комнатной температуре в водных растворителях, практически не дающих побочных продуктов. В результате так называемых клик-реакций можно быстро и избирательно получать новые вещества за счет взаимодействия строительных блоков небольшого размера (молекулы, соединяясь, как бы «защелкиваются»). Клик-химия была задумана как подражание природе, которая также создает соединения из модульных элементов. Концепция возникла в связи с поиском новых подходов для получения больших количеств соединений для разработки новых препаратов, что требует перебора и синтеза большого числа структур.

Реакционные лиганды в клик-химии – малые молекулы, поэтому они легко конъюгируются с макромолекулами (антитела, ферменты, ДНК) и не изменяют при этом их активность. В сравнении с традиционными методами биоконъюгации клик-химия позволяет не только упростить процедуру, но также обеспечивает лучший контроль процесса за меньшее время и увеличивает хемоселективность.

Клик-реакции в соответствии с их механизмами можно разделить на четыре группы: циклоприсоединение ненасыщенных соединений (1,3-диполярное азид-алкиновое циклоприсоединение, реакция Дильса-Альдера), реакции нуклеофильного замещения (реакции раскрытия кольца напряженных гетероциклов, например эпоксидов, циклических сульфатов, азиридинов), реакции карбонильных соединений не-альдольного типа (англ. *non-aldol type carbonyl reactions*) (образование гидразонов, эфиров оксимов, ароматических гетероциклов, амидов), реакции присоединения по кратным углерод-углеродным связям (присоединение по Михаэлю, реакции окислительного типа – дигидроксилирование и эпоксидирование).

Наибольшее применение для клик-иммобилизации получила реакция Cu(I)-катализируемого 1,3-диполярного циклоприсоединения азидов и алкина с образованием стабильного 1,2,3-триазола (рис. 19). Для минимизации деструктивного влияния солей Cu(I) на биомолекулы их заменяют комплексами меди с хелатирующими лигандами.

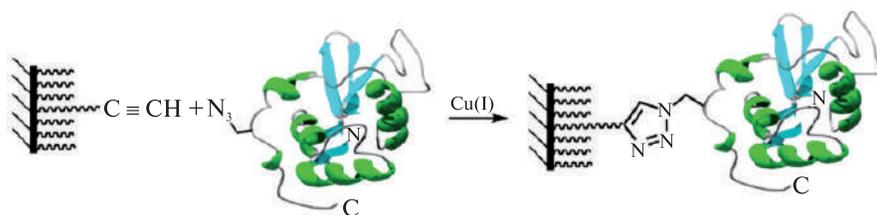


Рис. 19. Сайт-специфическое присоединение белка к подложке посредством Cu(I)-катализируемого азид-алкинового циклоприсоединения

Алкиновые и азидные группы легко вводятся в биомолекулы (ДНК, белки), они не реагируют с обычными органическими реагентами и функциональными группами макромолекул (в большинстве представлены группами $-\text{NH}_2$, $-\text{COOH}$). Реакция высокоселективна, протекает в водных растворах при комнатной температуре, не зависит от значения pH (диапазон 4–11), быстрая и количественная (позволяет получить наномоли конъюгатов в разбавленных растворах) процедура проста в исполнении.

В 2010 г. для клик-иммобилизации белков был предложен модифицированный вариант данной реакции, а именно алкин-нитронное циклоприсоединение. В данном случае использовали 1,3-диполярный нитрон как более реакционноспособный альтернативный реагент азиду, при этом реакция протекает в 30 раз быстрее.

Стратегию клик-химии также широко применяют для конъюгирования биомолекул с наноструктурами (наночастицы золота, квантовые точки, углеродные нанотрубки и др.). Наноматериалы используют не только для модификации и миниатюризации трансдьюсеров в классических БС, но и для создания наносенсоров. В последнем случае к поверхности наноструктур присоединяют биомолекулы, такие конъюгаты используют в качестве распознающих элементов. Примером применения клик-иммобилизации в иммунных наносенсорах служит присоединение антител к УНТ (рис. 20) или SiO_2 -наночастицам (рис. 21) посредством реакции Cu(I)-катализируемого азид-алкинового циклоприсоединения.

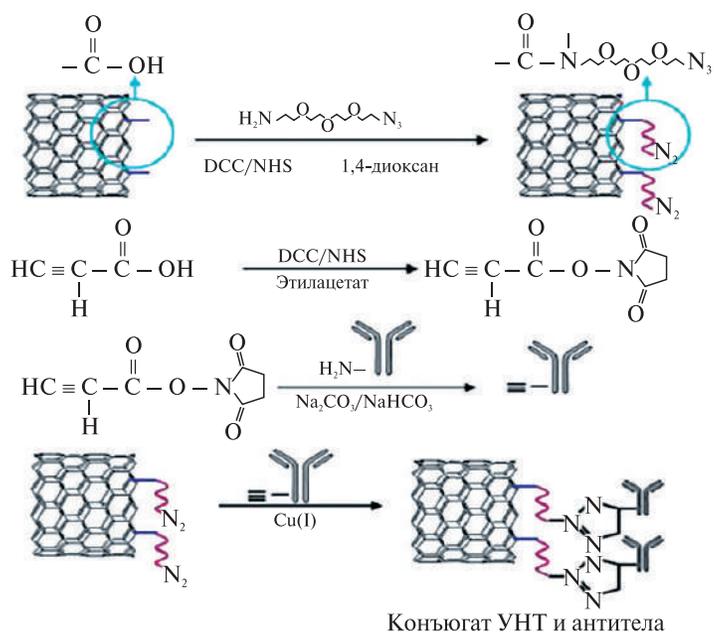


Рис. 20. Присоединение антитела к УНТ посредством реакции $Cu(I)$ -катализируемого азид-алкинового циклоприсоединения (DCC-N,N'-дициклогексилкарбодимид, NSH-N-гидроксиsuccинимид)

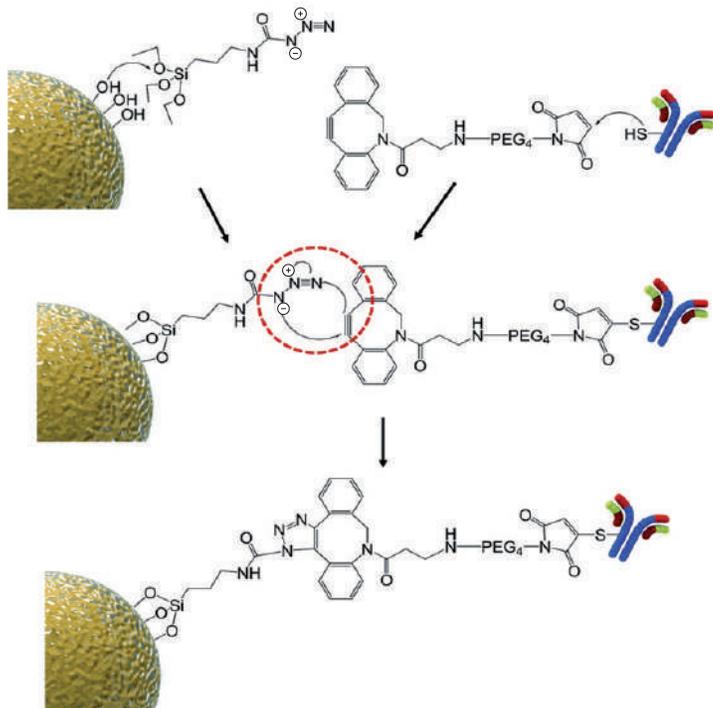


Рис. 21. Присоединение антитела к SiO_2 -наночастицам посредством реакции $Cu(I)$ -катализируемого азид-алкинового циклоприсоединения

В заключение коротко остановимся на ориентированной иммобилизации *антител* – гликопротеинов. Отличие этой группы белков состоит в их уникальной Y-подобной структуре, особенности которой используют для ориентированной иммобилизации (рис. 22). Антитела гликолизированы в области Fc-фрагмента (основание Y), максимально удаленного от распознающих аналит центров. С целью получения активной группы в Fc-регионе остаток углевода модифицируют путем окислительного раскрытия цикла. Например, вицинальные диольные группы углевода окисляют периодатом натрия (NaIO_4) в активные альдегидные. Последние используют для присоединения молекул антител к поверхностям, функционализированным аминогруппами.

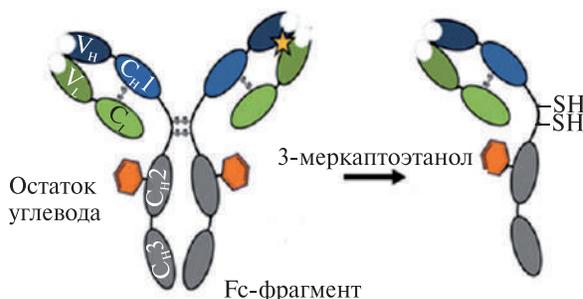


Рис. 22. Химическое восстановление S–S-связи в шарнирном участке молекулы антитела

Другой способ ориентированной иммобилизации антител базируется на химическом, фотохимическом или ферментативном восстановлении S–S-связи в шарнирном участке молекулы (см. рис. 22). В результате получают группы –SH, позволяющие иммобилизовать антитела на золотые поверхности за счет хемосорбции либо на поверхности, активированные тиольными группами.

1.6.2.4. Иммобилизация методом самоорганизующихся монослоев

Метод самоорганизующихся монослоев относится к методам иммобилизации с контролируемой ориентацией молекул. Самоорганизующиеся монослои (СОМ) (англ. *Self-assembled monolayers, SAMs*) – это упорядоченный молекулярный ансамбль (одиночный слой молекул), который спонтанно формируется в результате хемосорбции органических молекул из раствора на твердой поверхности в соответствии со специфическим сродством их функциональных групп. Процесс самосборки управляется меж- и внутримолекулярными взаимодействиями, которые переводят молекулы в стабильное, низкоэнергетическое состояние. Молекулы в СОМ удерживаются вместе за счет нековалентных связей – электростатических и гидрофобных взаимодействий, водородных связей, вандерваальсовых сил. Для получения СОМ не нужен внешний источник энергии.

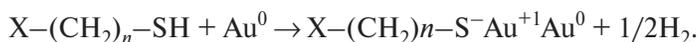
СОМ могут образовывать такие гетеро-функциональные соединения, как жирные кислоты, фосфолипиды, кремнийорганические и сераорганические соединения. Они могут формировать СОМ на поверхностях из различных материалов – стекла, кремния, силикагеля, оксида алюминия, золота и серебра.

Молекулы для формирования СОМ на поверхности трансдьюсера должны содержать три основных блока: активную группу, прикрепляющую их к поверхности; углеводородный сегмент, обеспечивающий межмолекулярное взаимодействие между метиленовыми группами; терминальную функциональную группу ($-\text{CH}_3$, $-\text{NH}_2$, $-\text{COOH}$, $-\text{OH}$), обращенную в водную или газовую фазу, через которую происходит непосредственное присоединение биомолекулы. Простым изменением терминальной группы можно получить различные по свойствам поверхности – гидрофобные ($-\text{CH}_3$), гидрофильные ($-\text{COOH}$ или $-\text{OH}$), предназначенные для ковалентного связывания ($-\text{NH}_2$, $-\text{N}_3$ и др.).

Получаемые таким образом покрытия имеют ряд достоинств: минимальную массу, однородность, равномерное распределение и пространственную доступность функциональных групп для закрепления рецепторных молекул, высокую механическую прочность и химическую стабильность. Биорецепторные слои на таких покрытиях характеризуются высокой устойчивостью к действию регенерирующих растворов и биологической активностью иммобилизованных конъюгатов.

Для функционализации биосенсорных поверхностей методом СОМ наиболее часто в качестве линкерных молекул используют органические тиолы (алкилтиолы $\text{Y}-(\text{CH}_2)_n-\text{SH}$, $n = 4, 6, 8, 10$, где Y – функциональная группа) или дисульфиды для иммобилизации на металлические (Au , Pt , Ag , Cu) поверхности, карбоксильные кислоты (RCOOH) – на оксиды металлов (например, алюминия), органофункциональные силаны ($\text{Y}-(\text{CH}_2)_n-\text{SiX}_3$, где Y – функциональная группа; $\text{X} = \text{OCH}_3$, OC_2H_5 , Cl , например, γ -аминопропилтриэтоксисилан, γ -глицидоксипропилтриметоксисилан) – на стекло, кварц или кремниевые подложки.

Наиболее распространенный метод получения СОМ базируется на использовании серосодержащих соединений, молекулы закрепляются на золотых поверхностях за счет образования связи $\text{Rs}-\text{Au}$ и ориентируются практически параллельно друг к другу с образованием плотного слоя (под углом 30° к поверхности). Процесс можно представить следующим уравнением:



Применяя тиольные производные, различающиеся длиной линкерной ножки и природой концевой группы (2-амино-3-меркаптопропионовая кислота, 11-меркапто-1-ундеканол, цистамин, 2-окси-3-меркаптоэтил-3-бензоилпиримидин), с большой точностью контролируют толщину органического монослоя и химические свойства внешнего интерфейса. Для тиолов с доста-

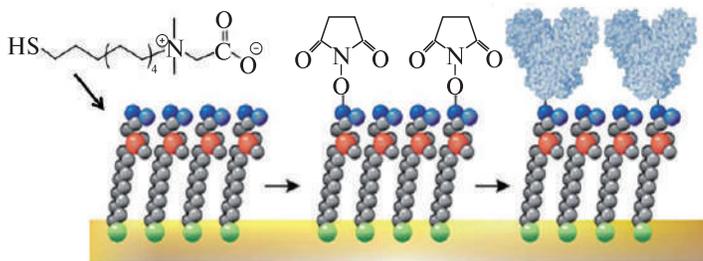


Рис. 23. Иммобилизация лектина на Au-поверхность через начальную стадию формирования СОМ из алкилтиола

точно длинной алкильной цепью (больше чем 10 звеньев CH_2) получают прочные монослои. На рис. 23 представлен пример иммобилизации лектина на Au-поверхность через начальную стадию образования СОМ из алкантиола, содержащего в качестве концевой группы карбоксибетаин, и последующей активацией групп $-\text{COOH}$ смесью 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)-карбодиимида и N-гидроксисукцинимидом для ковалентного присоединения белка.

1.6.2.5. Аффинная иммобилизация

Метод аффинной иммобилизации базируется на высокоспецифических взаимодействиях, которые протекают в биологических процессах — между антителами и антигенами, лектинами (лат. *legere* — собирать) (белки и гликопротеины) и свободными полисахаридными цепями или гликолизированными макромолекулами, нуклеиновыми кислотами и НК-связанными белками, гормонами и их рецепторами, авидином и биотином, полигистидином и ионами металлов. Аффинная иммобилизация является ориентированной. Из-за высокой селективности таких взаимодействий возможно контролировать присоединение белка к поверхности, если она функционализирована одним селективным лигандом, а второй введен в молекулу белка. Как правило, такие метки (якорные группы) вводятся в молекулы белков генно-инженерными методами.

Для аффинной иммобилизации антител используют то, что некоторые белки могут специфически связываться с углеводными остатками, расположенными в их Fc -фрагменте (см. рис. 22), не затрагивая активных центров антител. К таким белкам относятся лектин конканавалин А, получаемый из растений, белки А (56 кДа) и G, выделенные из стенок бактерий *Staphylococcus aureus* и *Streptococci* соответственно. На первом этапе происходит функционализация поверхности белками, промежуточный белковый слой формируют путем физической адсорбции или ковалентным связыванием (рис. 24). Например, белок А образует достаточно прочные комплексы с золотом в нейтральной среде. Молекулы белков А или G имеют более чем один Fc -связывающий участок, и поэтому их ориентация на поверхности не так важна. На втором этапе происходит иммобилизация антител через их Fc -фрагменты, так что их антиген-связывающие F_{ab} -регионы удалены от поверхности и максимально доступны для связывания аналитов. Такой способ обеспечивает не только высокую чувствительность рецепторного слоя, но и его эластичность, что немаловажно для эффективной и стабильной работы иммуносенсора.

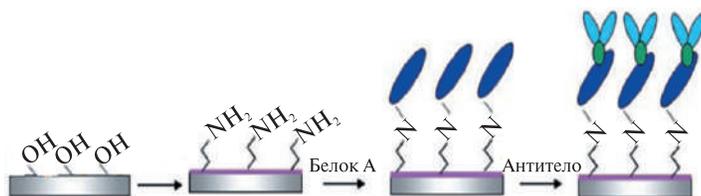


Рис. 24. Аффинная иммобилизация антител на поверхность, модифицированную белком А

Одной из широко применяемых для аффинной иммобилизации является техника, базирующаяся на сильном взаимодействии *биотина* и *авидина*. Биотин – малый, гидрофобный витамин, который обладает высоким сродством ($K_a = 10^{15} \text{ M}^{-1}$) по отношению к белку авидину (выделяют из яиц), стрептавидину (выделяют из бактерий) и химически модифицированному авидину NeutrAvidin™, имеющим по 4 участка для его связывания. Образующийся комплекс чрезвычайно устойчив в широком диапазоне pH 2–13. Биотин содержит карбоксильную группу, которую используют для ковалентного присоединения к биомолекулам или поверхности трансдьюсера. Как правило, присоединение происходит посредством линкерной молекулы, что повышает эффективность образования комплекса между биотинилированной молекулой (белком, ДНК и др.) и молекулой авидина.

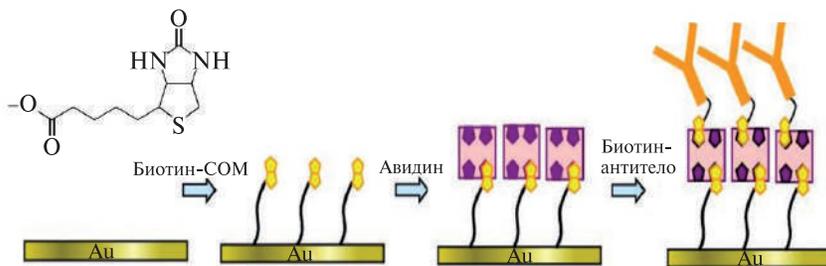


Рис. 25. Аффинная иммобилизация антител, базирующаяся на взаимодействии биотин – авидин

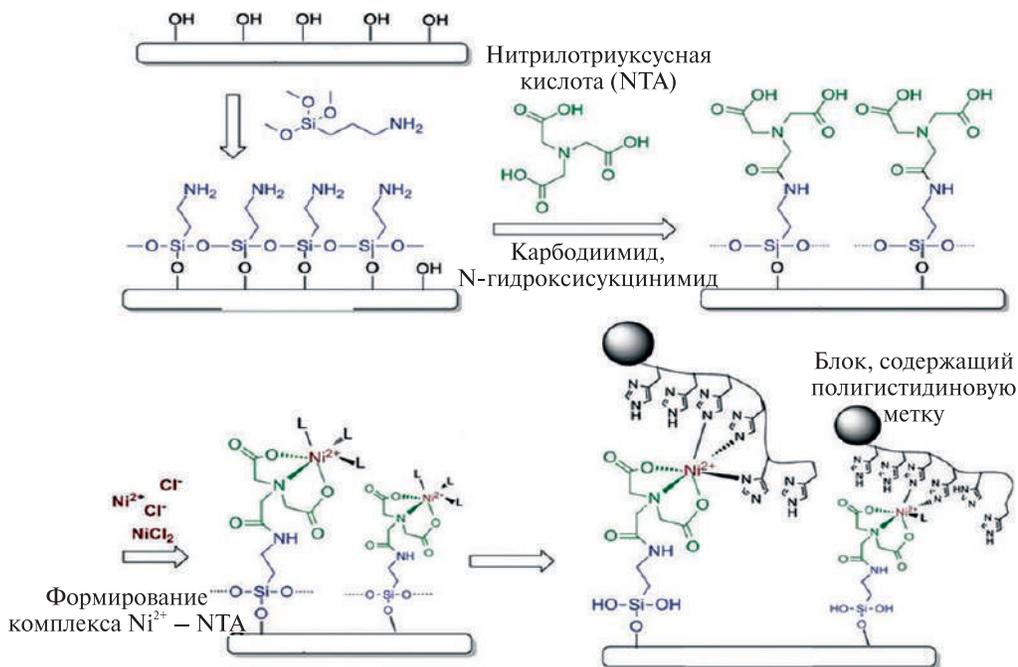


Рис. 26. Аффинная иммобилизация белка, меченного полигистидином, на поверхность, активированную нитрилтриуксусной кислотой

К аффинной иммобилизации относится присоединение биомолекул, преимущественно белков, базирующееся на образовании комплекса гистидина с ионами металлов (Ni^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+}). С этой целью белок маркируется полигистидином. Полигистидиновая метка рекомбинантно вводится в молекулу белка через его С- или N-концы. Ионы металла удерживаются на поверхностях, активированных хелатирующими реагентами (например, нитрилотриуксусной или иминодиуксусной кислотой). При инкубировании белков, меченных полигистидином, на таких поверхностях метка белка селективно связывается хелатированными ионами металлов (рис. 26). Такие взаимодействия обратимы при добавлении конкурирующих лигандов (имидазол или гистидин) или хелаторов металлов (ЭДТА).

1.7. ТИПЫ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИХ ПРЕОБРАЗОВАТЕЛЕЙ В БИОСЕНСОРАХ

1.7.1. Калориметрические трансдюсеры

Калориметрические, или тепловые, трансдюсеры после амперометрических являются одним из самых ранних видов датчиков, используемых для изготовления биосенсоров. Принцип действия калориметрических трансдюсеров основан на тепловом эффекте реакции биокомпонента с аналитом. Изначально данные преобразователи использовали в ферментативных БС, но в настоящее время они нашли применение в ДНК/иммунных сенсорах. Однако основная часть калориметрических сенсоров является ферментативными, они измеряют теплоту, выделенную при протекании ферментативной реакции. Выделенное тепло расходуется на нагрев поверхности, на которой иммобилизован фермент, или на нагрев среды, контактирующей с продуктами реакции. В результате трансдюсер регистрирует изменение температуры, которое прямо пропорционально изменению энтальпии реакции и концентрации расходуемого субстрата (аналита) или образующегося продукта:

$$Q = -n_p(\Delta H);$$

$$Q = c_p(\Delta T);$$

$$\Delta T = -\Delta H(n_p/c_p),$$

где Q – общая теплота, n_p – моль продукта, c_p – тепловая мощность системы.

В реакциях, катализируемых ферментами, может выделяться 4–100 кДж/моль. Например, при превращении холестерина в присутствии холестеролоксидазы образуется 53, глюкозы (глюкозооксидаза) – 80, гидропероксида (каталаза) – 100 кДж/моль. Если 1 мМ субстрата полностью превращается в продукт в ферментативной реакции, выделяющей 100 кДж/моль, то каждый миллилитр раствора генерирует 0,1 Дж теплоты. При КПД 80 % это приведет к изменению температуры раствора, составляющему приблизительно 0,02 °С.

Изменение температуры, т. е. теплоты, регистрируют с помощью термисторов (обычно из оксидных полупроводников) или микротермобатарей (термопара из полупроводников, соединенных последовательно). Термистор является транс-

дьюсером, очень чувствительным к изменению температуры. Этот датчик преобразует изменение температуры в изменение электрического сопротивления, т. е. его сопротивление меняется от температуры. С помощью термистора можно измерить температуру с точностью до 0,01–0,001 °С. Принцип работы термобатареи основан на термоэлектрическом эффекте, т. е. она преобразует тепловую энергию в электрическую.

Термисторы позволяют измерять абсолютную температуру, но восприимчивы к помехам вследствие неконтролируемых ад- и десорбционных процессов, таких, например, как тепловой эффект побочных реакций. Термобатарея позволяет измерять разницу температур между двумя участками, где локализуется соединение термодпары. В силу конструкции она менее восприимчива к помехам и обладает большей чувствительностью. Для биосенсоров с проточной ячейкой требуемый объем пробы варьируется от 10 до 1000 мкл.

На рис. 27 приведена схема ферментативного микрокалориметрического сенсора. Анализируемый образец пропускают через измерительную колонку, содержащую иммобилизованный фермент. При наличии аналита в пробе происходит ферментативная реакция. В результате выделяется теплота и изменяется температура системы, что регистрируется термисторами. Чувствительность таких систем повышают за счет создания цепочек ферментативных реакций. Например, H_2O_2 , продукт окисления глюкозы, дополнительно разлагают каталазой, увеличивая тепловыделение, или используют многократное омывание фермента пробой.

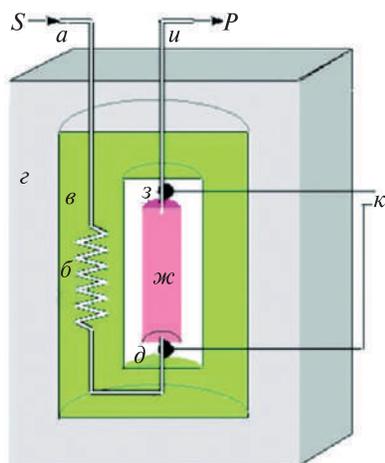


Рис. 27. Схема калориметрического ферментного биосенсора. Раствор пробы (а) поступает в теплообменник (б), который находится в алюминиевом блоке (в) с внешней изоляционной коробкой (г). Оттуда проба следует мимо контрольного термистора (д) в биореактор с уплотненным слоем фермента (ж) (объем 1 мл), где происходит реакция. Изменение температуры в ходе реакции определяется термистором (з), далее раствор переходит в отходы (и). Внешняя электроника (к) определяет разницу в сопротивлении и, следовательно, температуре между термисторами

Калориметрические трандьюсеры позволяют проводить прямые измерения, и поэтому их используют для исследования межмолекулярных взаимодействий, что актуально в фармацевтике при разработке новых лекарственных средств. Данные БС широко используют в пищевой промышленности и для экологического мониторинга.

Развитие современных микротехнологий сделало возможной миниатюризацию термодетектирующих элементов, в частности термобатарей. Это позволило интегрировать их в микрофлюидные аналитические чипы, в которых для анализа достаточно 0,8 мкл пробы.

1.7.2. Электрохимические трансдьюсеры

Принцип работы электрохимических трансдьюсеров базируется на том, что в результате реакции между биорецептором и аналитом образуются или расходуются электрохимически активные вещества. В качестве такого трансдьюсера могут быть кондуктометрические, потенциометрические и амперометрические электроды. В электрохимическом сенсоре определяемый компонент реагирует с чувствительным слоем непосредственно на электроде или в объеме слоя раствора около электрода. В различных типах электрохимических трансдьюсеров получают зависимость между электрическими параметрами электрода и концентрацией анализируемого вещества в измерительной ячейке. Преимущество электрохимических методов детектирования обусловлено тем, что они требуют минимального оснащения, не зависят от мутности и цвета пробы.

Электрохимические БС в качестве биорецептора, как правило, содержат ферменты, которые обладают высокой специфичностью и катализируют реакции при комнатной температуре. Электрохимические методы (потенциометрия, амперометрия) наиболее удобны для контроля скорости реакций, протекающих с поглощением или выделением протонов, а также окислительно-восстановительных процессов, сопровождающихся поглощением O_2 , образованием H_2O_2 и т. д. Ферментные электроды, в которых фермент включен (иммобилизован) в полупроницаемую полимерную мембрану, покрывающую электрод, позволяют специфически определять различные органические и неорганические соединения без введения в анализируемый раствор дополнительных реагентов.

Развитие электрохимических трансдьюсеров и их широкое применение обусловлено прежде всего применением микроэлектродов, получаемых методом трафаретной печати. Уменьшение емкостных и резистивных помех на микроэлектроде и интенсификация массопереноса к ним по сравнению с электродами традиционного размера способствовало снижению времени анализа. Технология трафаретной печати дала возможность печатания биологических и вспомогательных компонентов на поверхности электрода непосредственно в процессе его производства. Это позволило создавать недорогие одноразовые датчики. Наличие различных методов иммобилизации, надежно закрепляющих биокомпонент на электроде, позволяет создавать стабильные датчики для многократной эксплуатации. В целом применение микроэлектродов способствовало повышению чувствительности электрохимических БС и снижению их стоимости.

Мощным этапом в развитии электрохимических методов детектирования стало использование передовых нанотехнологий и различных наноматериалов. Углеродные наноматериалы (одностенные и многостенные УНТ, графен, оксид графена, фуллерены, наноалмазы) и металлические НЧ широко применяют для модификации различных типов электродов. Одними из наиболее используемых стали УНТ и золотые наночастицы ($AuНЧ$).

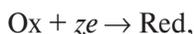
Кондуктометрические трансдьюсеры регистрируют биохимические изменения в системе по изменению проводимости раствора между двумя электродами. Кондуктометрические, а также импедиметрические (основаны на измерении полного сопротивления (импеданса) электрохимической ячейки и зависимости этого сопротивления от частоты переменного тока) способы измерения менее распространены в биосенсорах, если в качестве биоузнающего элемента служит

фермент. В большей степени их используют для детектирования афинных взаимодействий (например, в аптамерных, ДНК- и иммунных сенсорах).

Потенциометрические трансдюсеры контролируют изменение потенциала на рабочем электроде в сравнении с референтным (регистрация накопления заряда на электроде) вследствие взаимодействия биорецептора с аналитом. В качестве трансдюсера, как правило, выступает ионселективный электрод.

Амперометрические трансдюсеры детектируют изменение в силе тока на рабочем электроде (поток электронов через поверхность электрода), обусловленное окислением или восстановлением продуктов биохимической реакции, т. е. вещества окисляются или восстанавливаются на рабочем электроде, на котором задается соответствующий постоянный потенциал относительно электрода сравнения. Во время электролиза рабочий электрод может быть как анодом, так и катодом в зависимости от природы анализируемого вещества и прикладываемого потенциала. Потенциал электрода является решающим фактором в чувствительности сенсора. При этом предпочтительно работать с низким электродным потенциалом, чтобы избежать интерференции (взаимное наложение, помехи от постороннего вмешательства).

Саму реакцию обмена можно записать следующим образом:



где ze – количество электронов, прошедших через границу раздела электрод/раствор.

Наблюдаемый ток оказывается пропорционален либо объемной концентрации электроактивных частиц, либо скорости их расхода или образования в биокаталитическом слое.

Считается, что концентрация реагента линейно уменьшается в приграничном к поверхности электрода слое от значения C на расстоянии L от электрода до нуля на самом электроде, где он восстанавливается или окисляется. Ионы движутся за счет диффузии, характеризуемой коэффициентом диффузии D , и каждый ион переносит z электронов к электроду. Толщина слоя L считается постоянной.

Предельный ток диффузии определяется формулой Коттрела:

$$i_D = z F A_s D C / L,$$

где A_s – площадь электрода; F – константа Фарадея; z – число электронов, участвующих в реакции.

Так, диффузионный ток пропорционален концентрации вещества. За счет одного процесса диффузии ток нарастает крайне медленно. Чтобы увеличить скорость электрохимической реакции, перемешивают аналит или вращают электроды, в результате чего уменьшается толщина диффузионного слоя L . Это особенно важно в случае использования веществ с малыми скоростями диффузии. Перенос электронов может быть ускорен за счет увеличения разности потенциалов между электродами, но существенно повышать ее опасно, так как может произойти электролитическое разложение самого аналита. Более эффективен метод использования медиаторов (посредников в переносе электронов). Для увеличения скорости диффузии также применяют микроэлектроды, в которых диффузия происходит не через плоский слой, а радиально через сферу, центр которой находится на электроде. В результате скорость реакции увеличивается и стабилизируется.

1.7.2.1. Амперометрические ферментные биосенсоры

Амперометрические ферментные биосенсоры (АФБС) были, как указывалось выше, исторически первыми БС и в настоящее время представляют собой самый распространенный в плане коммерциализации класс биосенсоров. АФБС обладают высокой чувствительностью (ниже 10^{-9} М) и имеют широкий рабочий диапазон (3–4 порядка). Роль фермента в БС – генерировать или расходовать электрохимически активные вещества в стехиометрическом отношении с аналитом. Амперометрический трансдьюсер позволяет протекать электрохимическим реакциям на поверхности электрода, что приводит к возникновению тока.

В электрохимической ячейке происходит непосредственный обмен заряженными частицами между электродом и раствором, когда заряженные электроны движутся через границу раздела электрод/раствор. Эта стадия называется реакцией переноса заряда (или электрохимической стадией).

В зависимости от технологии производства выделяют три поколения амперометрических ферментативных сенсоров.

Первое поколение АФБС основывается на прямом детектировании либо увеличении продукта, образующегося из субстрата (аналита) в ходе ферментативно катализируемой реакции, либо расхода ко-субстрата (рис. 28). Продукты (или ко-субстраты) реакции диффундируют к поверхности электрода и вызывают электрический сигнал (отклик БС). По сути, низкомолекулярные участники ферментативно катализируемой реакции, способные к диффузии, передают сигнал от ферментного слоя к электроду. На основе сенсоров первого поколения в 1975 г. фирмой «Yellow Spring Instrument» (США) был выпущен первый коммерческий вариант биосенсора.

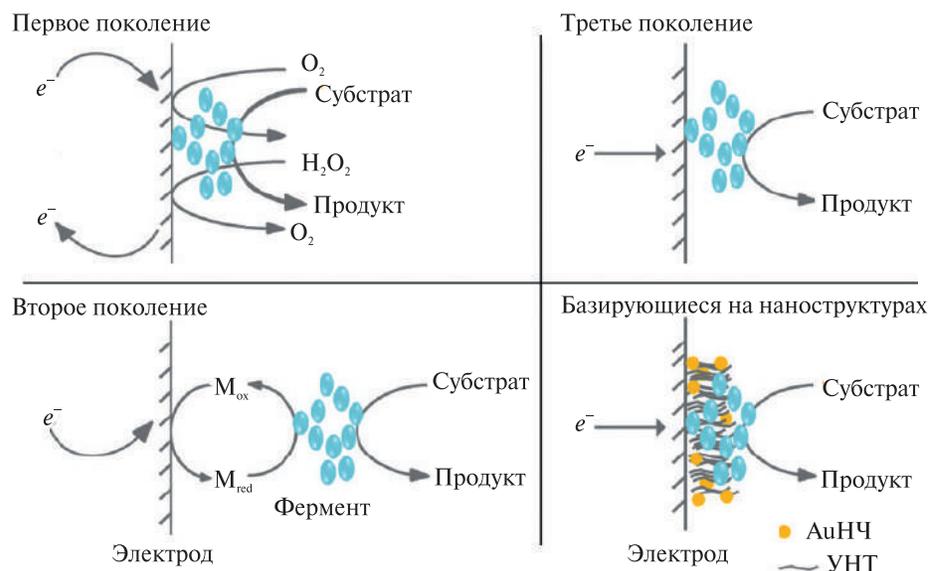
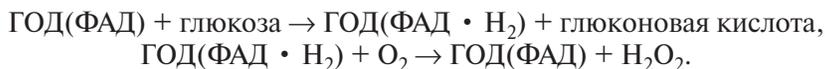


Рис. 28. Схематическое изображение амперометрических ферментативных электродов различных поколений

Рассмотрим принцип действия БС первого поколения на примере глюкозного БС, использующего в качестве распознающего рецептора глюкозооксидазу (ГО). Фермент иммобилизуется на поверхность амперометрического электрода, мониторинг концентрации глюкозы в пробе осуществляют либо по накоплению гидропероксида, либо по расходу кислорода.

ГО катализирует в ячейке окисление глюкозы кислородом воздуха с образованием глюконовой кислоты и гидропероксида. Глюкозооксидаза содержит в качестве ко-фактора ФАД, который в процессе каталитической реакции принимает два электрона и восстанавливается до ФАД • Н₂ (ФАД/ФАД • Н₂, редокс-потенциал -0,44 В). Затем оба электрона с ФАД • Н₂ переходят на молекулярный О₂ с образованием ФАД и Н₂О₂:



Расход О₂ измеряется с помощью его катодного восстановления (до ионов НО⁻) на электроде при потенциале -0,7 В (vs Ag/AgCl). Гидропероксид измеряется с помощью анодного окисления на электроде при потенциале +0,65 В (vs Ag/AgCl) (рис. 29). Гидропероксид отдает свои электроны электроду, т. е. осуществляется переход электронов из раствора в электрод – генерируется сигнал. Электрический сигнал коррелирует с концентрацией глюкозы в пробе.

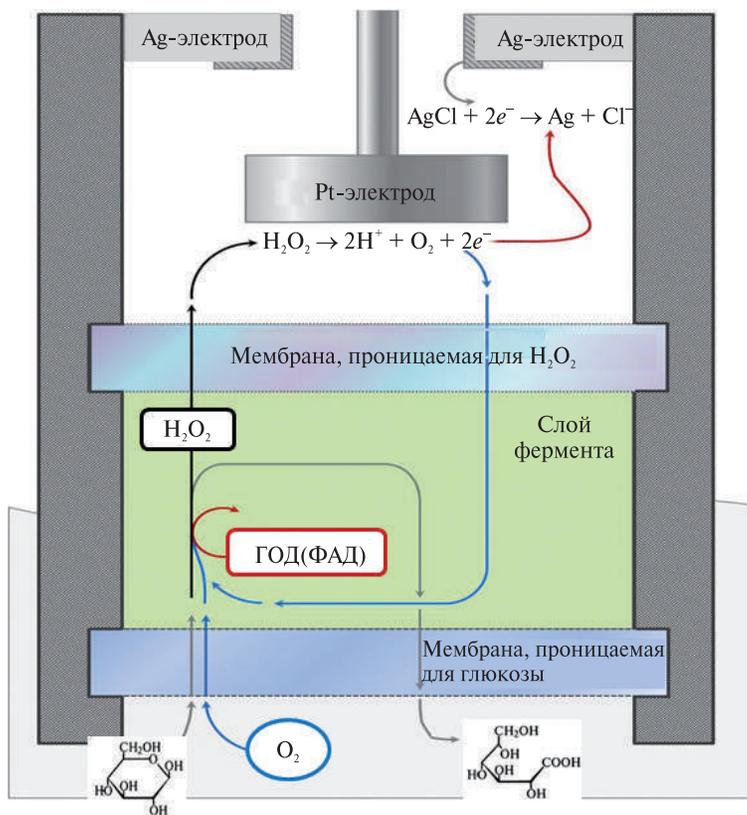


Рис. 29. Схема амперометрического ферментативного электрода для определения глюкозы с помощью глюкозооксидазы (ГОД)

Амперометрическое определение аналита с помощью ферментного электрода можно представить как многостадийный процесс (см. рис. 29), который включает подвод субстрата к поверхности электрода; диффузию субстрата через мембрану к активному центру фермента; реакцию в активном центре; перенос продукта ферментативной реакции через мембрану к поверхности электрода; определение продукта вблизи поверхности электрода. Первая стадия сильно зависит от перемешивания раствора, и поэтому интенсивное перемешивание ускоряет ее. А выбор высокоэффективного фермента и очень тонкой мембраны приведет к тому, что стадии 2 и 4 будут практически не влиять на процесс определения.

Основные *недостатки АФБС первого поколения* заключаются в следующем.

В случае детектирования молекулярного O_2 электрический сигнал зависит от его концентрации. Ошибки анализа обусловлены флуктуацией давления O_2 , т. е. трудно контролировать парциальное давление кислорода, которое в атмосферном воздухе составляет 20,94 % от 760 мм, т. е. 159 мм, а также количественным недостатком O_2 с точки зрения стехиометрии реакции. Такой «дефицит кислорода» обусловлен его ограниченной растворимостью в биологических жидкостях. Так, нормальная концентрация O_2 на порядок ниже физиологического уровня глюкозы. Это приводит к узкому линейному диапазону при измерении данного моносахарида. Для устранения проблемы «дефицит кислорода» используют мембраны (полиуретановые или поликарбонатные), лимитирующие транспорт масс. Такие мембраны позволяют регулировать поток аналита (глюкозы) и кислорода, улучшая их проходимость, и способствуют оптимизации соотношения обоих компонентов.

Другая проблема связана с тем, что потенциалы рабочего электрода для окисления H_2O_2 или восстановления O_2 являются высокими и неоптимальными, так как при таких потенциалах некоторые компоненты, присутствующие в пробе, электроактивны. Например, аскорбиновая кислота, мочевая кислота, дофамин и т. п., несмотря на то что в пробах их концентрация ниже, чем глюкозы, вносят существенную ошибку в детектируемый сигнал, т. е. влияют на соотношение сигнал : шум и предел определения. В 1980-е гг. эта проблема решалась путем использования селективных полупроницаемых мембран (полиметилцеллюлоза, гидрогели, полипиррол и другие электроосаждаемые пленки, проводящие или непроводящие) между пробой и фермент-покрытым электродом. Такие мембраны ограничивали доступ мешающих редокс-активных компонентов к поверхности электрода. Однако в отдельных случаях приводили к увеличению времени отклика БС. В 1990-е гг. стали использовать новые материалы для производства электродов вместо традиционных (углеродные и платиновые поверхности). А именно в углеродную пасту (смесь жидкого парафина с порошком графита) стали добавлять металлы – иридий, палладий, медь, родий или рутений. Применение электродов из таких материалов позволило понизить анодный потенциал для детектирования H_2O_2 (+0,25 В) или определять H_2O_2 с помощью катода с потенциалом в оптимальном диапазоне (от 0,0 до -0,2 В, vs Ag/AgCl). Использование мультиферментных систем также способствовало минимизации влияния редокс-активных примесей.

Второе поколение АФБС получило начало своего развития в середине 1970-х гг. В 1976 г. компания «La Roche» (Швейцария) выпустила амперометрический сенсор для анализа лактата, который базировался на использовании водорастворимого медиатора (гексацианоферрата) для обмена электронами между активным центром фермента и электродом.

Данное поколение АФБС базируется на использовании окислительно-восстановительных посредников (редокс-медиаторов) между ферментативной реакцией и трансдьюсером для улучшения отклика БС (рис. 28, 30). В общем случае медиатор — это искусственное диффузионно-подвижное низкомолекулярное вещество, переносящее электроны между редокс-центром фермента и рабочим электродом. В случае применения оксидаз медиаторы заменяют растворимый кислород, который в ферментативной реакции превращается в гидропероксид. Фермент, используемый в БС, должен быть способным отдавать или акцептировать электроны электрохимически активному редокс-медиатору. При этом очень важно, чтобы соответствовали редокс-потенциалы медиатора и ко-фактора (редокс-центр) фермента, т. е. он должен быть способным обмениваться электронами с ферментом. Как правило, различие в потенциале между различными ко-факторами и искусственным окислительно-восстановительным посредником не должно быть меньше, чем ~50 мВ, чтобы обеспечить приемлемую движущую силу реакции.

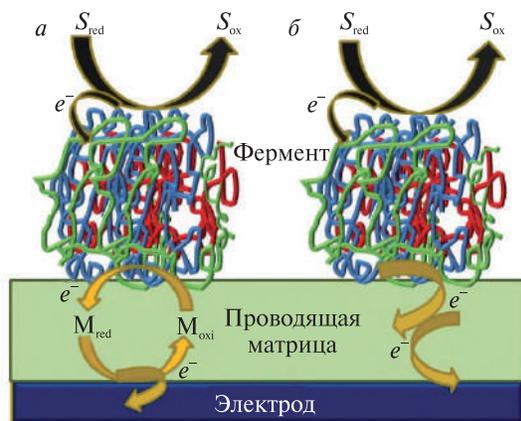
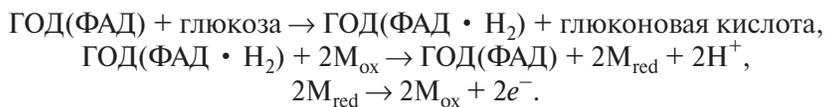


Рис. 30. Принцип действия амперометрических ферментативных сенсоров с использованием медиатора (а) и безмедиаторных (б)

Принцип действия АФБС с редокс-медиатором рассмотрим на примере определения глюкозы с помощью глюкозооксидазы. Медиатор (M_{oxi}) (например, бензохинон) окисляет восстановленный в процессе ферментативной реакции ФАД-центр ГОД ($ФАД \cdot H_2$), восстанавливаясь при этом. Далее восстановленный медиатор (M_{red}) окисляется на поверхности электрода (регенерируется до исходного состояния), производя таким образом электрический сигнал:



В данном случае медиатор ускоряет перенос электронов к поверхности электрода. Прямой перенос электронов от редокс-центра ГОД непосредственно к электроду невозможен вследствие его углубления в 3D-структуре молекулы фермента. Результатом этого является достаточно большое расстояние между окислительно-восстановительным центром ГОД и поверхностью электрода ($>1,2-1,7$ нм), что приводит к значительному снижению диффузионно контролируемой скорости переноса электрона. В соответствии с теорией Маркуса перенос электрона снижается экспоненциально с увеличением расстояния в растворе. Кроме того, активная часть фермента не всегда оптимально ориентирована относительно поверхности электрода.

Идеальный медиатор должен быстро реагировать с восстановленным ферментом (т. е. электронный перенос между восстановленным медиатором и ферментом должен быть очень быстрым), иметь низкую растворимость в водной среде образца, быть химически стабильным (как в окисленной, так и восстановленной форме), нетоксичным и иметь хорошие электрохимические свойства (т. е. низкий детектируемый потенциал). Восстановленный медиатор не должен реагировать с кислородом, прикладываемый потенциал должен быть меньше потенциала восстановления кислорода. Предпочтительно, чтобы базовую структуру медиатора можно было модифицировать для настройки желаемого окислительно-восстановительного потенциала. В качестве синтетических медиаторов используют производные ферроцена, органические красители, например голубой Мельдолы (нафтоловый краситель R, 7-(К-диметил)-3,4-бензо-7-феноксазим), феррицианиды, рутениевые и осмиевые комплексы, а также производные хинона.

В конечном итоге выбор медиатора с учетом указанных требований осуществляется исходя из окислительно-восстановительных свойств активного центра биохимического реагента.

Медиаторы могут использоваться как в свободном виде (диффузионно-подвижные), так и быть иммобилизованы на поверхность электрода. Иммобилизация медиаторов минимизирует их утечку с поверхности электрода. К тому же это дает возможность правильно ориентировать медиатор по отношению к редокс-центру фермента.

Применение медиаторов в АФБС привело к их существенным *преимуществам* в сравнении с первым поколением. Так, измерение аналита стало не зависеть от присутствия кислорода, т. е. минимизировались проблемы, связанные с дефицитом O_2 и флуктуацией его парциального давления. Синтетические медиаторы более доступны в водной среде, чем молекулярный O_2 , они обеспечивают более высокую скорость переноса электронов от окислительно-восстановительного центра фермента на поверхность электрода. Кроме того, медиаторы окисляются при более низком приложенном напряжении, что минимизирует влияние мешающих веществ на величину сигнала. Оптимальный приложенный потенциал для устранения таких помех (т. е. окисление на электроде компонентов пробы при заданном потенциале) находится в диапазоне $0,0-0,2$ В.

Однако второе поколение АФБС имеет определенные *недостатки*. К ним относится то, что существует высокая конкуренция между молекулярным O_2 и медиатором. Реакция синтетического медиатора с восстановленным активным центром ГОД протекает быстрее, чем взаимодействие последнего с кислородом.

Однако вероятность окисления восстановленного центра ГОД растворенным O_2 достаточно высока. В результате происходит накопление пероксида водорода вблизи поверхности электрода, что приводит к снижению активности фермента и, следовательно, отклика биосенсора. Малый размер и высокая подвижность медиаторов обуславливают проблему, связанную с утечкой медиатора из области между ферментом и поверхностью электрода. Данный процесс можно контролировать выбором соответствующего метода иммобилизации медиатора. Даже при низком приложенном потенциале существует возможность окисления электроактивных компонентов пробы, таких как аскорбат. Это не только влияет на точность датчика, но и усиливает шансы реакции синтетического медиатора с мешающими компонентами.

Несмотря на это, именно к данной группе БС относится большинство их коммерческих вариантов, в том числе самый известный глюкозный сенсор фирмы «MediSense» (США).

В течение 1980-х гг., помимо применения синтетических медиаторов, разрабатывались иные стратегии для ускорения переноса электронов между окислительно-восстановительным центром фермента и поверхностью электрода. Одной из них стала концепция «ферменты, соединенные проводами» (англ. *wired enzymes*), разработанная А. Хеллером и Й. Дегэни (А. Heller, I. Degani) (1988). Они ввели электрическое соединение (по типу «электрической проводки») редокс-центров ферментов с электродами посредством электрон-проводящих редокс-гидрогелей. Такие гидрогели, в которые иммобилизованы редокс-ионы/медиаторы, действуют как электрические провода, передавая электроны из активного центра фермента на поверхность электрода. Эта работа стала базовой для осуществления непрерывного контроля глюкозы с помощью миниатюризированных глюкозных БС, имплантированных под кожу.

Одним из способов электрически связать редокс-центр фермента с электродом является его иммобилизация в матрицу из проводящего полимера. Пример иммобилизации в редокс-полимерную матрицу — включение глюкозооксидазы в ферроцен-модифицированный полимер или в осмий (II)-полипиридинзамещенный полимер, что приводит к биоэлектрокатализу глюкозы. Важнейшее преимущество таких БС в том, что увеличивается скорость транспорта электронов. Дистанция переноса электронов может быть сильно сокращена (<1 нм). Полупроводниковые полимеры осуществляют прямую связь между редокс-центром фермента и электродом, они переносят электроны от фермента к электроду, изменяя при этом свой редокс-статус. Например, ко-фактор фермента в реакции превращения субстрата в продукт восстанавливается, затем происходит окисление (т. е. регенерация) проводящим полимером, в результате восстановленный полимер отдает электроны электроду. Проводящие полимеры действуют как автономные посредники без использования диффузионно-подвижных низкомолекулярных медиаторов. Таким образом, устраняются недостатки АФБС второго поколения (утечка растворимого медиатора в раствор пробы; диффузионный барьер для медиатора между фермент/электродной поверхностью) и увеличивается операционная стабильность БС.

Использование электропроводящих полимеров — один из наиболее перспективных направлений в разработке БС. Их применение в сенсорах обусловлено

тем, что электрические и электрохимические свойства этих полимеров чувствительны к различным физическим и химическим воздействиям.

Третье поколение АФБС (безмедиаторные) базируется на прямом каталитическом переносе электронов между поверхностью чувствительного элемента сенсора – электрода – и редокс-центром фермента (см. рис. 28, 30).

Основным преимуществом данных АФБС является то, что перенос электрона с электрода на молекулу субстрата и наоборот осуществляется непосредственно через активный центр фермента в отсутствие каких-либо низкомолекулярных переносчиков или использования наноструктур. В результате АФБС третьего поколения обладают высокой селективностью и чувствительностью благодаря высокой плотности тока. Для данных сенсоров диапазон рабочих потенциалов близок к редокс-потенциалам ферментов, и поэтому они в меньшей степени подвержены влиянию мешающих компонентов. Кроме того, отсутствие каких-либо дополнительных реагентов значительно упрощает реакционную систему.

Согласно теории электронного переноса константа скорости прямого электрохимического взаимодействия между донором и акцептором определяется разностью потенциалов между редокс-центром фермента и электродом, энергией преобразования при переносе электронов и наиболее сильно – расстоянием между активным сайтом фермента и поверхностью электрода. Прямой перенос электронов между редокс-ферментом и поверхностью электрода, находящимися на очень малом расстоянии (т. е. один монослой), обычно очень медленный. Если редокс-центр углублен на дистанцию значительно большую, чем 1–1,5 нм, то шансы эффективного электронного транспорта существенно снижаются в соответствии с теорией Маркуса. Вследствие указанных причин число ферментов, способных к прямому переносу электронов, ограничено. Из 1555 известных оксидоредуктаз только несколько способны передавать электроны непосредственно между активным центром и поверхностью электрода на близком расстоянии (не более 1 нм). Большинство этих ферментов содержат в активном центре гем, железо-серные кластеры или медь. Прямой перенос электронов происходит у медьсодержащих оксидаз – лактаз, пероксидаз и гидрогеназ, которые катализируют соответственно окисление веществ кислородом, распад H_2O_2 и присоединение водорода.

Эффективность электронного транспорта зависит не только от дистанции между активным редокс-участком фермента и электродом, но и от ориентации белка на электроде, даже если белок контактирует с электродом. Материал электрода и способ иммобилизации фермента на его поверхность влияют на биоэлектродокатализ. При неправильной иммобилизации активный центр фермента может быть ориентирован так, что прямой перенос электронов станет невозможен из-за удлинения дистанции между активным центром и электродом.

Впервые явление биоэлектродокатализа с участием прямого переноса электронов электрод – активный центр фермента опубликовано И. В. Березиным и соавторами в 1978 г., оно было установлено при изучении реакции электрохимического восстановления кислорода с участием медьсодержащей оксидазы – лактазы. В активный центр данного фермента входят четыре иона меди, осуществляющие координированное четырехэлектронное восстановление кислорода.

В 1980-е гг. для производства ФБС третьего поколения стали применять электроды с включенными проводящими органическими солями для предотвращения денатурации белка и быстрого прямого переноса электронов. Проводящие соли могут быть модифицированы в древовидные монокристаллы, спрессованы в таблетки или пасты с графитовым порошком для получения электрода. В качестве таких солей используют тетрацианохинодиметан (TCNQ) (акцептор) и тетратиафульвален (TTF) (донор), образующие полупроводниковые комплексы с переносом заряда ($A + D \leftrightarrow A^{\delta+} + D^{\delta-}$, где δ – степень переноса заряда; $0 < \delta < 1$). Образование таких комплексов происходит в результате формирования упорядоченной структуры с чередованием донорных и акцепторных молекул. Наличие планарности у молекул TCNQ и TTF с выраженной системой π -сопряжения способствует их укладыванию в регулярные слои либо стопки со степенью переноса заряда $\delta = 0,48-0,67$ (необходимым для появления выраженной электрической проводимости является значение $0,25 \leq \delta \leq 1$). Фермент с редокс-активным центром может быть иммобилизован непосредственно на проводящую соль TTF-TCNQ, которая обеспечивает электрическое соединение с рабочим Pt-электродом. Например, TTF-TCNQ-комплекс синтезируется *in situ*, кристаллы соли растут сквозь непроводящий полимерный тонкий слой на поверхности электрода и вытекают из пленки, образуя древовидную структуру. Полимерная пленка предотвращает попадание мешающих веществ на поверхность электрода. Кроме того, для создания БС третьего поколения используют алмазные электроды, легированные бором.

1.7.2.2. Амперометрические ФБС с электродами, модифицированными наноматериалами

Для улучшения аналитических характеристик АФБС в последние десятилетия применяют наноструктурные материалы. Электроды, модифицированные наноматериалами, позволяют снизить время отклика и пределы обнаружения, повысить чувствительность, достигать линейности в широких диапазонах и использовать низкие мощности.

Наноматериалы – это объекты, размер которых хотя бы в одном из трех измерений лежит в интервале 1–100 нм. Переход от макро- и микроразмеров к размерам в интервале нанометров приводит к качественным изменениям физико-химических свойств (электропроводность, магнетизм, поглощение и излучение света, оптическое преломление, термостойкость, прочность), проявлению каталитической или реакционной способности соединений и свойств получаемых на их основе материалов, которые не наблюдаются у макро- и микроскопических тел той же химической природы.

Уникальность оптических и электронных свойств наноматериалов обуславливается в первую очередь пониженной размерностью структуры. При характерных размерах материала, соизмеримых с межатомным расстоянием, в нем проявляются квантово-размерные эффекты.

В качестве наноматериалов, которые используют для модификации электродов, широкое применение нашли металлические НЧ, УНТ, графен и его оксид.

С одной стороны, данные наноструктуры являются хорошими платформами для иммобилизации биокomпонентов из-за большой площади поверхности. С другой стороны, они улучшают перенос электронов между редокс-центром фермента и электродом, что приводит к улучшению метрологических параметров биосенсоров. Надо отметить, что наночастицы металлов, УНТ и графен используют не только в каталитических, но и в аффинных БС.

Электроды, модифицированные наночастицами металлов. Среди данных наноструктур широкое применение в ферментативных БС нашли AuНЧ, или нанопроволоки золота. AuНЧ – один из наиболее изученных и привлекательных типов наноматериалов в АФБС. Это объясняется их превосходной проводимостью и химической стабильностью, а также биосовместимостью и легкой функционализацией (т. е. присоединением к ним биомолекул) за счет тиохимии.

AuНЧ выполняют важные функции в электроанализе, а именно существенно увеличивают величину проводящей поверхности, проявляют каталитические свойства, обусловленные их малыми размерами, и осуществляют контакт непосредственно с редокс-центрами ферментов. Значительное увеличение AuНЧ передачи электрона от активного центра фермента (например, простетической группы оксиредуктаз, широко используемых в АФБС) к электроду приводит к повышению чувствительности обнаружения аналита. Для металлических НЧ электрокаталитический эффект, выражающийся в увеличении константы скорости переноса электрона, может достигать шести порядков. Такое увеличение константы скорости переноса заряда вызвано высокоэнергетическими состояниями, в которых находятся НЧ.

Модификацию электродов (как правило, золотых) наноструктурами золота осуществляют различными способами. Первый способ заключается в адсорбции наноструктур из раствора на электрод в течение 24–48 ч. Второй – в первоначальной модификации золотого электрода короткоцепочечными дитиолами и последующем связывании наноструктур с поверхностью электрода за счет тиогрупп (-SH). Иммобилизация ферментов на такие электроды может осуществляться методом включения (в гидрогели, полимерные пленки), а также ковалентным присоединением.

Примером увеличения чувствительности АФБС с использованием AuНЧ может служить биосенсор на основе реконструированной глюкозооксидазы (Au-ФАД-ГОД).

Одним из способов обеспечения электрического контакта между редокс-центром фермента и его окружением является реконструкция фермента. Данный прием, базирующийся на удалении из фермента его нативного активного центра и замене его на искусственный, стали широко использовать для получения медиатор-опосредованных АФБС. В соответствии с этим методом в случае глюкозооксидазы ее активный центр, ФАД, удаляется, и остается только белковая часть фермента (апофермент) (рис. 31). Далее полусинтетический N⁶-(2-аминоэтил)-ФАД ковалентно присоединяется к медиатору (например, ферроцену) и функционализированный ко-фактор соединяется с апо-глюкозооксидазой (апо-ГОД). Биоэлектрокаталитические свойства таких «электроэнзимов» обусловлены участием ферроцена в переносе электрона между ФАД и поверхностью электрода.

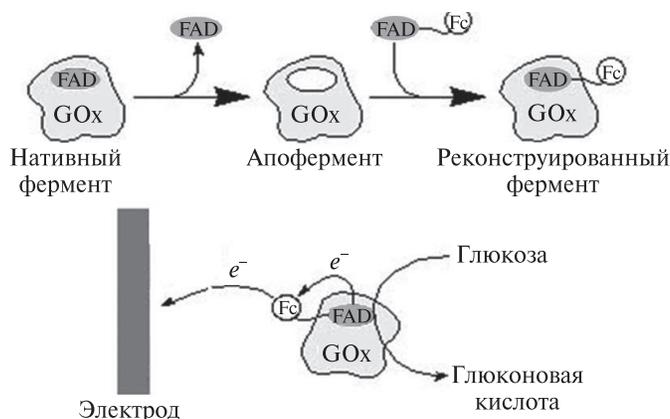


Рис. 31. Изготовление электрода, модифицированного реконструированной глюкозооксидазой (GOx), полученной в результате удаления нативного редокс-центра (FAD) и внедрения искусственного ферроцен-замещенного ко-фактора (Fc-FAD)

Метод реконструкции используют для изготовления АФБС, модифицированных наночастицами. Активный центр ГОД (ФАД) функционализируют золотыми (1,4 нм) НЧ и получают реконструированную апо-глюкозооксидазу (Au-ФАД-ГОД) (рис. 32).

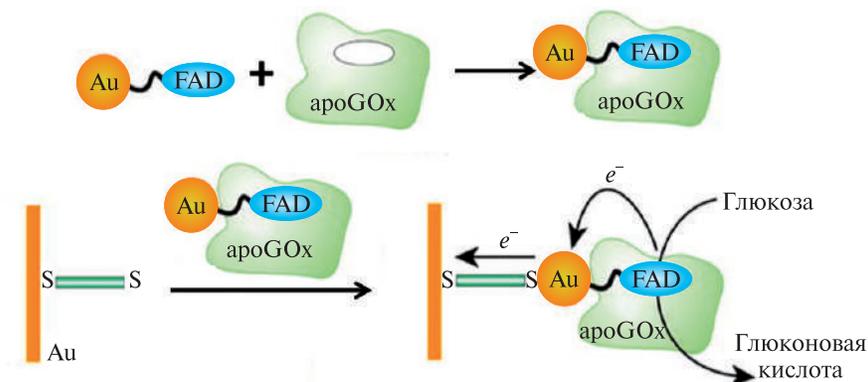


Рис. 32. Изготовление электрода, модифицированного реконструированной апо-глюкозооксидазой (apoGOx), полученной в результате удаления нативного редокс-центра (FAD) и внедрения искусственного ко-фактора, функционализированного AuНЧ (Au-FAD)

Иммобилизация Au-ФАД-ГОД на золотом электроде посредством тиохимии значительно улучшает метрологические характеристики АФБС. Константа скорости переноса электронов между поверхностью электрода и ФАД-центром апо-ГОД составила $5 \times 10^3 \text{ c}^{-1}$. Эта величина в семь раз выше, чем константа скорости переноса электронов от нативной ГОД молекулярному кислороду (700 c^{-1}) (первое поколение АФБС). При этом анализ глюкозы с помощью электрода, модифицированного апо-ферментом Au-ФАД-ГОД, не зависит от концентрации кис-

лорода и присутствия мешающих редокс-активных соединений (аскорбиновая кислота и др.).

Электроды, модифицированные УНТ. Первый химический сенсор на основе УНТ разработан в 1997 г. Сначала нанотрубки применяли преимущественно в сенсорах на основе полевых транзисторов, однако в настоящее время они широко используются в амперометрических сенсорах, реже в масс-чувствительных и оптических.

УНТ могут быть одностенными и многостенными, отличающимися по строению и свойствам. Идеальная одностенная углеродная нанотрубка (ОУНТ) образована свернутой в трубку графитовой плоскостью и покрыта на концах полусферическими головками, структурно гомологичными фуллерену С₆₀. Многостенные УНТ состоят из нескольких вложенных друг в друга концентрических графитовых слоев, расстояние между которыми, как и в графите, составляет почти 0,34 нм. Внешний диаметр трубок варьируется от 0,4 до 2,0 нм для одностенных УНТ и от 1,4 до 100 нм – для многостенных, в то же время длина обоих типов УНТ может быть в диапазоне от 50 нм до 1 см. ОУНТ являются одномерными (1D) наноматериалами.

УНТ обладают высокой механической прочностью (примерно в 100 раз больше, чем у стали) и теплопроводностью (выше, чем у алмаза), химической инертностью, высокой проводимостью (100 раз больше, чем у медной проволоки, имеют очень мало дефектов для рассеяния электронов), термической стабильностью (до 300 °С на воздухе и 1500 °С в вакууме). Возможность химической модификации УНТ (например, окисление с образованием карбоксильных групп), наличие сверхвысокой площади поверхности (теоретически 1300 м²/г) и совместимость с биомолекулами и клетками определяют их уникальные адсорбционные свойства.

Электрические свойства индивидуальных УНТ в значительной степени определяются ее хиральностью (т. е. углом ориентации графитовой плоскости относительно оси трубки). В зависимости от диаметра и степени хиральности ОУНТ могут обладать металлической проводимостью или свойствами полупроводника, в то время как многостенные УНТ характеризуются только металлической проводимостью.

Существуют различные способы модификации электродов углеродными нанотрубками, что определяется видом электрода. Наиболее простой способ изготовления электрода на основе УНТ включает в себя механическое смешивание препарата УНТ с минеральным маслом или твердым материалом и введение получаемой композиции в полость пастового электрода. Для модификации обычных стеклоуглеродных электродов УНТ могут быть модифицированы смесью азотной и серной кислот. УНТ по своей природе гидрофобны, и окисление их кислотами (образуются концевые кислородсодержащие группы) придает им гидрофильные свойства, что позволяет получать суспензии УНТ в полярных растворителях, включая воду.

Другим перспективным способом получения электродов, модифицированных УНТ, является создание микро- и нанoeлектродных массивов из пространственно (вертикально) организованных УНТ путем ковалентной иммобилизации гидрофильных УНТ (по концу трубки) на химически модифицированном электроде или *in situ* синтеза УНТ на поверхности металлического субстрата (рис. 33).

УНТ легко модифицируются для функционализации, как указано выше, неструктивно окисляются минеральными кислотами с образованием поверхностных карбоксильных групп. Например, ферменты можно ковалентно связать посредством карбодиимидной химии в результате образования амидной связи между аминокеттами фермента и карбоксильными группами модифицированных УНТ. Некоторые белки прочно адсорбируются на поверхности УНТ.

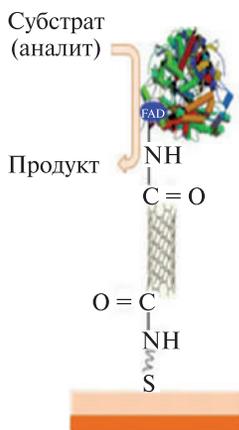


Рис. 33. Ферментативный амперометрический биосенсор, базирующийся на применении электрода, модифицированного УНТ

Одним из главных преимуществ электродов на основе УНТ является их необычно высокая чувствительность к электроактивным анализам по сравнению с традиционными углеродными и металлическими электродами. Это объясняется большой эффективной площадью поверхности УНТ, их высокой электрокаталитической активностью и высокой скоростью переноса электронов. Они способны ускорять электрохимические реакции с низкой скоростью переноса электронов.

Углеродные нанотрубки, иммобилизованные на поверхность электрода, обеспечивают правильную ориентацию для иммобилизации биомолекул, в частности ферментов, и способствуют связи между электродом и активным центром фермента, погруженным в глобулу. УНТ служат своеобразным электрическим соединителем (конектором) для увеличения транспорта электронов между активным редокс-центром фермента и электродом. Электрическая коммуникация возможна между активным центром и делокализованной π -системой УНТ, на которой иммобилизован фермент. Это позволяет переносить электроны на гораздо более длинные расстояния (приблизительно 150 нм) за более короткое время (несколько секунд), в то время как диффузионно-опосредованный перенос электронов на дистанцию более 0,8–1,7 нм требует значительно больше времени, приблизительно несколько минут.

Часто углеродные нанотрубки применяют в комбинации с другими наноматериалами, в частности наночастицами благородных металлов, что улучшает метрологические характеристики сенсоров. Например, композиционные материалы на основе УНТ и наночастиц золота позволили в два раза снизить предел обнаружения глюкозы и увеличить срок службы сенсора от одного дня до трех месяцев по сравнению с немодифицированной углеродной нанотрубкой.

Электроды, модифицированные графеном. Вследствие своих уникальных свойств электропроводящий и прозрачный материал графен нашел широкое применение в различных БС, включая электрохимические.

Графен — это слой углерода толщиной в один атом, состоящий из sp^2 -гибридизованных атомов С, которые плотно упакованы в гексагональной кристаллической двумерной (2D) решетке. Графен легче представить как одну

плоскость графита, отделенную от объемного кристалла, — плоскую сетку из шестиугольников, в вершинах которых находятся атомы углерода.

Графен имеет удивительно высокую подвижность электронов при комнатной температуре, обладает высокой механической прочностью (прочность разрыва в 100–300 раз больше, чем у стали, выдерживающей давление в 130 ГПа), настраиваемыми оптическими свойствами, высокой эластичностью, химической стабильностью и теплопроводностью. Существуют различные по форме графеновые материалы (листы, ленты, пластины), при этом важную роль в электронных свойствах играет строение краев графена. Скорость гетерогенного переноса электронов высока в краевых плоскостях графена или на дефектах в базовой плоскости. Таким образом, большая площадь поверхности графена способствует образованию большого количества дефектов и, следовательно, электроактивных участков.

Чистый однослойный графен является квазидвумерным полупроводником с нулевой щелью (отсутствие щели между валентной зоной и зоной проводимости), трехслойный графеновый лист — полуметаллом.

В производстве электрохимических БС также используют наноструктурированный материал оксид графена (ГО), содержащий кислородные функциональные группы, и его восстановленную форму (гГО). В окисленном графене на его поверхности могут произвольно распределяться эпоксидные и гидроксильные группы, а по краям — карбоксильные, карбонильные и лактонные. Большое количество кислородных функциональных групп на поверхности ГО снижает скорость переноса электронов. Восстановленный оксид графена обладает меньшим количеством кислородных функциональных групп, но его электрические свойства больше приближены к графену.

Электроды, модифицированные графеном, проявляют исключительные каталитические свойства и чувствительность, что, несомненно, связано с уникальной электронной структурой графена, особыми свойствами дефектов краевых участков материалов графена и большой площадью его поверхности. Накопленные экспериментальные данные указывают на то, что графен и его производные обладают лучшими электрохимическими характеристиками в сравнении со стеклоглеродом, графитом или УНТ.

Для модификации АФБС используют, например, ультратонкие многослойные графеновые пластины (так называемые графитовые нанопластины) (рис. 34). Фермент может быть иммобилизован с помощью физической адсорбции методом включения, например, в полимерную пленку (Nafion) с графеновыми наночастицами. Присоединение фермента к ГО и гГО может осуществляться ковалентными методами либо комбинацией различных способов.

Электрохимический биосенсор, модифицированный композитным материалом на основе восстановленного оксида графена, например, для определения эстриола (соединения, разрушающего эндокринную систему) обладает высокой селективностью, быстрым аналитическим откликом, высокой чувствительностью (275 мАМ^{-1}), низким пределом обнаружения (11 нМ) и широким линейным диапазоном (25 нМ — 1,03 мМ).

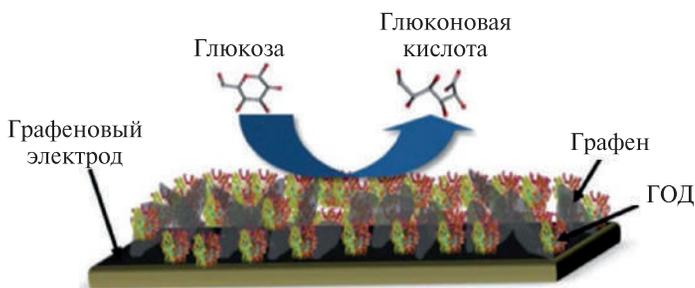


Рис. 34. Глюкозооксидазный (ГОД) амперометрический биосенсор, базирующийся на применении электрода, модифицированного графеном

В настоящее время использование электрохимических ферментативных биосенсоров на основе графена значительно возросло в фармацевтической и биомедицинской областях благодаря их чувствительности, специфичности, экономичности, простоте и возможности миниатюризации, что важно для создания портативных устройств.

1.7.2.3. Вольтамперометрические ДНК-сенсоры

Вольтамперометрические ДНК-сенсоры широко используют для оценки специфичности связывания, механизма регуляторного или повреждающего действия, трансформации биологически активных веществ в биохимических реакциях с участием ДНК.

Если в амперометрии регистрируют изменение результирующего тока после того, как постоянный потенциал приложен к рабочему электроду, то вольтамперометрия основана на измерении токового отклика как функции потенциала, приложенного к вольтамперометрической ячейке. В вольтамперометрии контролируемый параметр – потенциал индикаторного электрода – меняется во времени, а измеряемой величиной является ток, протекающий через индикаторный электрод. Эти методы анализа основаны на расшифровке поляризационных кривых (вольтамперограмм), получаемых в электролитической ячейке с поляризующимся индикаторным электродом и неполяризующимся электродом сравнения. Метод прямой вольтамперометрии пригоден для определения веществ, восстанавливающихся или окисляющихся в интервале поляризации платинового и графитового электрода.

В ДНК-сенсорах, основанных на использовании олигонуклеотидов, детектирование базируется на применении редокс-активного вещества в качестве маркера олигонуклеотидного зонда. В отсутствие аналита маркер способен проявлять электрохимическую активность. После взаимодействия меченого олигонуклеотидного зонда с искомой последовательностью, присутствующей в пробе, сигнал снижается (рис. 35).

Принцип действия многих ДНК-сенсоров основан на прямом взаимодействии отдельных соединений со спиралью ДНК (интеркалировании). Такие соединения обычно имеют полициклическую, ароматическую структуру, являются плоскими. Плоская ароматическая молекула или ее фрагмент встраивается

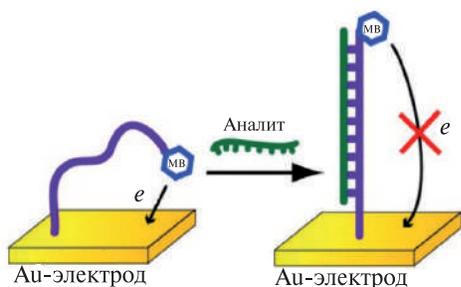


Рис. 35. Принцип действия вольтамперометрического ДНК сенсора с использованием редокс-активного вещества (МВ) в качестве маркера распознающей олигонуклеотидной последовательности

между соседними парами оснований двойной спирали ДНК, в основе взаимодействия — вандерваальсовы силы. Константы комплексообразования интеркаляторов с ДНК составляют обычно 10^5 – 10^6 M^{-1} . Типичными интеркаляторами являются акридиновый оранжевый, профлавин, бромистый этидий, пиронин, метиленовый синий.

Интеркалирование возможно только с двухцепочечной ДНК. Поэтому интеркаляторы также используют в качестве маркеров процесса гибридизации при использовании одноцепочечной ДНК в качестве распознающих зондов. Сигнал интеркалятора, обусловленный их электрохимическим окислением, меняется в зависимости от того, произошла ли гибридизация с искомым анализом (т. е. с комплементарной последовательностью) или нет.

1.7.3. Гравиметрические трансдюсеры

Гравиметрические, или масс-чувствительные, трансдюсеры основаны на детектировании изменения массы распознающего биорецепторного слоя в результате его взаимодействия с анализом. Данный вид трансдюсеров позволяет осуществлять прямую регистрацию биохимических взаимодействий без дополнительного введения меток (флуоресцентных, ферментных, радиоактивных, люминесцентных и др.) в режиме реального времени. К ним относятся трансдюсеры на основе пьезокварцевых элементов и кантилеверные преобразователи.

1.7.3.1. Пьезокварцевые сенсоры

Основным элементом пьезокварцевых трансдюсеров являются пьезоэлектрические материалы, преимущественно кристаллы кварца, обладающие большой механической и термической прочностью, малым внутренним трением, высокой стабильностью электрофизических параметров. Данные трансдюсеры — электроакустические преобразователи (трансформируют электрическую энергию в механическую). В основе их действия лежит обратный пьезоэлектрический эффект. Пьезокварцевые трансдюсеры очень чувствительны к изменению массы на их поверхности.

Под воздействием внешнего электрического поля (постоянного напряжения) пьезоэлектрический кварцевый кристалл начинает механически деформироваться, т. е. изменяются геометрические размеры кристалла. При наложении переменного электрического напряжения кварцевая пластина пьезоэлектрика колеблется с частотой приложенного напряжения, т. е. колебания электрическо-

го напряжения преобразуются в механическое колебание твердого тела с определенной частотой. Частота колебаний кристалла зависит от частоты приложенного напряжения, а также от его массы. Вибрирующий (или осциллирующий) кристалл генерирует акустические волны внутри пьезоэлектрического материала.

Известны два класса электроакустических преобразователей: объемно-волновые устройства (англ. *bulk-wave*) – передающие акустическую волну с одной стороны кристалла на другую, и поверхностные волновые (англ. *surface acoustic wave*) – передающие акустическую волну по одной грани кристалла.

Уникальной особенностью пьезокварцевых БС является сочетание высокой чувствительности, обеспечиваемой использованием в качестве физического преобразователя пьезокварцевого материала, и селективности, определяемой природой биомолекул (антитела, ферменты, ДНК), используемых в качестве биокомпонента. Кроме того, в качестве распознающего компонента могут быть синтетические аналоги антител – МИПы и аптамеры.

Пьезокварцевые БС используют для анализа как низкомолекулярных (лекарственных препаратов, гормонов, алкалоидов, пестицидов, метаболитов, экотоксикантов, активаторов роста и других биологически активных веществ), так и высокомолекулярных соединений, а также отдельных клеток и вирусов.

К настоящему времени наиболее широкое распространение среди гравиметрических БС получили иммуносенсоры. Пьезокварцевые иммуносенсоры зарекомендовали себя как удобные инструменты для проведения биохимических и клинических обследований, сертификации пищевых продуктов и фармацевтических препаратов, мониторинга объектов окружающей среды. Они также используются для изучения кинетики биохимических взаимодействий.

Пьезоиммуносенсоры позволяют определять в сложных по составу образцах (пищевые продукты, объекты окружающей среды и лекарственные препараты) следовые концентрации различных по природе низкомолекулярных биологически активных веществ на уровне ПДК и ниже.

Кварцевые микровесы, или кварцевый микробаланс (англ. *Quartz Crystal Microbalance, QCM*). Это техника, которая использует акустические волны, генерируемые колебанием пьезоэлектрической монокристаллической кварцевой пластины для измерения массы.

Данный трансдьюсер относится к объемно-волновым устройствам, его основным элементом является пьезокварцевый резонатор. Он представляет собой тонкий диск из кристалла кварца (диаметр 5–16 мм), на обеих сторонах которого путем термического напыления сформированы электроды из различных металлов – золота, серебра, алюминия, никеля (0,1 мкм по толщине). Диск посредством жестких проволочных контактов закрепляют в держателе и помещают в герметичный корпус. Толщина пластины должна быть очень малой в сравнении с ее размерами. На одну из сторон диска, точнее, на поверхность электрода, иммобилизуют биокомпоненты.

Кварцевый резонатор является электромеханической колебательной системой и обладает собственной частотой (f_0). Если приложить к кварцевой пластине переменное напряжение, которое совпадает с частотой самой кварцевой пластины, то происходит резонанс частот и амплитуда колебаний резко возрастает. Резонансная частота в основном зависит от геометрии пластины, важным пара-

метром является толщина. Снижение толщины кристалла приводит к возрастанию его резонансной частоты и как следствие – увеличению чувствительности микробаланса. Например, общая частота (f_0) в 5 МГц соответствует толщине ~330 мкм.

Пьезоэлектрически активна только область между электродами, по мере удаления от центра диска колебания резко убывают и чувствительность резонатора существенно снижается. Вибрация кристалла зависит от угла его среза и симметрии, а также направления электрического поля (форма электродов).

Практическое распространение получили высокочастотные (5–15 МГц) пьезокварцевые резонаторы, изготовленные из так называемого «АТ-среза» кристалла кварца (наиболее термостабильные в интервале от 10 до 50 °С) с золотыми электродами диаметром 8 мм, полученными магнетронным напылением золота.

Кварцевые микровесы характеризуются простотой аппаратного оформления, имеют низкую стоимость, надежны и просты в эксплуатации. Данные трансдюсеры имеют предел обнаружения в диапазоне 10^{-7} – 10^{-10} М. Из-за широкого динамического диапазона QCM используют как для анализа маленьких молекул, так и целых клеток. В коммерческих системах QCM объем пробы в основном должен быть больше, чем 50 мкл на проточную ячейку.

Аналитический сигнал кварцевых микровесов. Изменение массы пьезокристалла в результате селективной сорбции определяемого вещества на привитом к поверхности слое рецепторных молекул приводит к изменению частоты колебаний пьезокристалла.

Принцип анализа – пьезокристаллическое микровзвешивание – был предложен в середине XX в. В конце 1950-х гг. Г. Зауэрбрей (G. Sauerbrey) продемонстрировал возможность использования пьезоматериала для получения кварцевого микробаланса, функционирующего в газах. И только с 1980-х гг. началось использование элементов для БС благодаря их способности генерировать и передавать акустические волны, изменение резонансной частоты которых зависит от биомассы на поверхности кристалла.

Изменение резонансной частоты (Δf , Гц) в зависимости от массы осажденного на поверхность кристалла вещества (Δm , г) вычисляют по уравнению Зауэрбрея

$$\Delta f = -\frac{2f_0^2}{A\sqrt{\rho_q\mu_q}}\Delta m,$$

где f_0 – собственная резонансная частота колебаний кристалла (Гц); μ_q – модуль упругости кварца ($2,947 \cdot 10^{11}$ г/(см · с²)); ρ_q – плотность кварца ($2,648$ г/см³); A – пьезоэлектрическая активная площадь (площадь электродов резонатора, см²); Δm – изменение массы пленки на единицу площади электрода (г/см²).

Как следует из уравнения, изменение частоты прямо пропорционально изменению массы. Кварцевые резонаторы обладают уникальной способностью регистрировать изменение массы до 10^{-11} г. Частота измеряется счетчиком частоты. В современных QCM взаимодействие аналита с биокомпонентом, иммобилизованным на электроде, оценивают по сенсограмме (зависимость аналитического сигнала от времени), что позволяет регистрировать процесс в режиме реального времени (рис. 36).

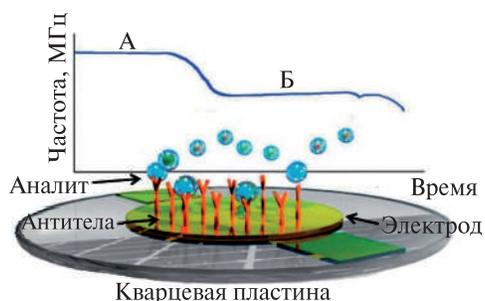


Рис. 36. Принцип действия кварцевого микробаланса. На сенсограмме участок А соответствует резонансной частоте (f_0) ненагруженного резонатора, участок Б – частоте (f) нагруженного (после нанесения пробы аналит связался с рецепторным слоем)

Резонансная частота снижается линейно, если на поверхность сенсора добавляется дополнительная масса. Однако это справедливо, если добавленная масса жесткая (твердая) и меньше массы сенсора. Если масса нежесткая, то во внимание нужно принимать вязкоупругие свойства адсорбирующегося слоя. Это имеет место главным образом при операциях в жидкостях и при адсорбции мягких материалов.

Для вязкоупругих пленок используют кварцевые микровесы с *диссипацией энергии* (англ. *Quartz Crystal Microbalance with Dissipation Monitoring, QCM-D*). QCM-D при его нагрузке регистрирует изменение не только в частоте резонанса, но и в диссипации энергии. Для вязкоупругих пленок изменение частоты и диссипация энергии за определенный период (по отношению к полной энергии осциллятора) связаны как с массой пленки (d , ρ), так и ее вязкоупругими характеристиками (η , μ).

Коэффициент диссипации энергии представляют следующим выражением:

$$D = \frac{1}{Q} = \frac{E_p}{2\pi E_3},$$

где Q – добротность; E_p – энергия, рассеиваемая (потерянная) в течение одного колебательного цикла; E_3 – энергия, запасенная в колебательной системе.

Добротность, параметр колебательной системы, обратно пропорциональна скорости затухания собственных колебаний в системе. Чем выше добротность, тем меньше потери энергии за каждый период и тем медленнее затухают колебания. Для кварцевых резонаторов величина добротности достигает 10^5 – 10^7 . Потери энергии в кварцевом резонаторе очень малы, т. е. количество энергии, потерянной во время колебаний на резонансной собственной частоте (f_0), минимально.

Технология QCM-D была коммерциализирована компанией «Q-Sense» в 1996 г. Рассмотрим принцип работы прибора «Q-Sense E4», основанного на мониторинге затухания колебаний кристалла после быстрого возбуждения вблизи резонансной частоты (поскольку скорость затухания пропорциональна диссипации энергии генератора) (рис. 37). До нанесения анализируемой пробы кварцевый резонатор колеблется с определенной частотой при подаче напряжения. Частота колебаний снижается при изменении массы датчика, т. е. при нанесении на резонатор исследуемой пробы (рис. 37, а). После отключения напряжения через определенный интервал регистрируют снижение колебаний во времени (миллисекунды). Затухание колебаний зависит от свойств резонатора и контактной

среды, слабое соответствует твердому нагруженному слою, а быстрое – мягкому (рис. 37, б, в). Детектируя изменения в частоте (Δf) и диссипации энергии (ΔD), можно анализировать состояние молекулярных слоев, связанных с поверхностью сенсора, их массу, толщину и структурные (вязкоупругие) свойства.

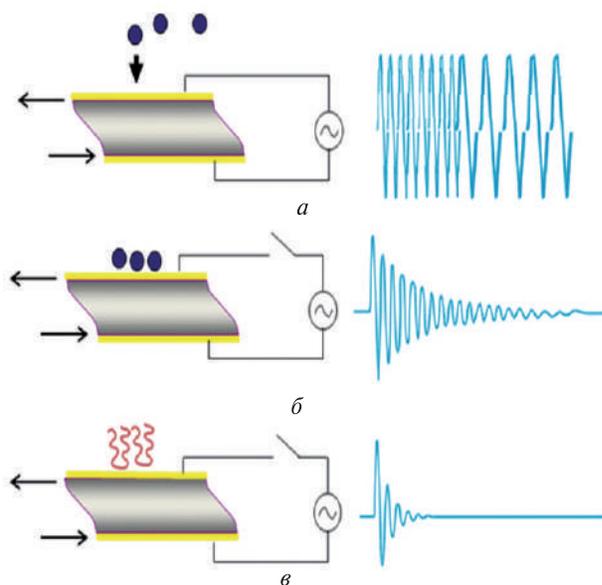


Рис. 37. Принцип действия кварцевого микробаланса с диссипацией энергии

Разрешающая способность прибора по частоте и рассеянию в жидкостях составляет порядка $\pm 0,1$ Гц и 1×10^{-7} соответственно. Типичные f - и D -отклики при адсорбции белков, везикул или клеток находятся в диапазоне от десятков до сотен Гц и от одной до десятков единиц диссипации (1×10^{-6}). Для вязкоупругих пленок толщиной более 100 нм эти отклики обычно на порядок выше.

QCM-D дает возможность наблюдать за процессами на поверхности в реальном времени без использования меток, позволяет изучать вязкоупругие свойства полимеров, межмолекулярные взаимодействия (количественное определение констант скоростей ассоциации/диссоциации, констант связывания, скрининг партнеров), адсорбцию белков и полимеров, поперечную сшивку белковых слоев и сворачивание/разворачивание белков, взаимодействие клеток с поверхностью и осуществлять контроль процессов формирования тонких пленок (формирование двойного липидного слоя, функционализация поверхности при производстве БС).

Трансдюсер на основе поверхностных акустических волн. Эти датчики основаны на изменении свойств поверхностных акустических волн (ПАВ) при их взаимодействии с материалом, помещенным вблизи поверхности датчика. ПАВ – это механические волны, распространяющиеся только вблизи поверхности прибора. Частота колебаний ПАВ значительно выше, чем у объемных волн. Сенсоры на основе ПАВ могут работать на высоких частотах (вплоть до 5 ГГц), что способствует повышению их чувствительности.

ПАВ-сенсор представляет собой пьезоэлектрическую подложку (тонкая пластина кварца (α -SiO₂) или ниобата лития LiNbO₃), на которую нанесены два металлических электрода. Электроды на поверхности пластины образуют встречно-штыревые структуры, по форме напоминающие гребенку, с количеством электродов до 20 на каждой стороне. ПАВ-сенсоры могут быть получены методом фотолитографии, что позволяет интегрировать большое число сенсорных элементов на малую площадь. Размеры устройства обычно составляют несколько квадратных миллиметров. ПАВ-сенсоры используют явление пьезоэффекта для активации устройства и получения отклика от воздействия измеряемой величины.

Встречно-штыревые преобразователи (ВШП) служат для ввода и вывода электрической энергии в резонатор. Один из ВШП работает в качестве передающего преобразователя, а второй является принимающим преобразователем (рис. 38). При подаче на один из ВШП высокочастотного напряжения вследствие обратного пьезоэффекта исходное переменное электрическое поле вызывает деформацию подложки. Деформация подложки, в свою очередь, из-за прямого пьезоэлектрического эффекта создает дополнительное электрическое поле. Дополнительное электрическое поле запаздывает относительно исходного поля. В результате суперпозиции этих двух полей возникает поле с эллиптически поляризованной составляющей, которое обуславливает возбуждение поверхностно-акустической волны. Эта волна затем распространяется вдоль поверхности пластинки до тех пор, пока не попадет на другую систему ВШП, где она генерирует в результате прямого пьезоэффекта электрический сигнал.

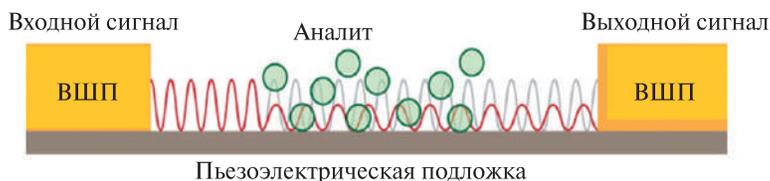


Рис. 38. Схематическое представление ПАВ-сенсора

Область распространения ПАВ между системами ВШП является чувствительной областью. Скорость распространения поверхностно-акустической волны в таких сенсорах очень чувствительна к любым изменениям свойств поверхности. Скорость волны уменьшается пропорционально увеличению добавленной массы.

При адсорбции подложкой определяемых веществ происходит изменение характеристик поверхностно-акустической волны, таких как фазовая скорость, амплитуда и частота. Обычно в качестве сенсорного эффекта в данном типе датчиков используется различие рабочих частот поверхностно-акустической волны прибора в различных средах. Охватываемый диапазон рабочих частот изменяется от десятков мегагерц до нескольких гигагерц.

ПАВ-сенсоры позволяют определять аналиты в различных жидких средах (объем пробы 1 мкл). Они теоретически имеют самую высокую чувствительность среди акустических резонаторов, их предел обнаружения ниже чем 0,08 нг/см².

Недостатком ПАВ-сенсоров является то, что на изменение частоты могут влиять многие факторы, такие как электропроводность и плотность жидкости, диэлектрические и вязкоупругие свойства адсорбента. В целом технология получения ПАВ-сенсоров более экономична в сравнении, например, с производством оптических трансдюсеров, и они просты в обращении.

1.7.3.2. Кантилеверные трансдюсеры

В последние десятилетия широкое применение в биосенсорике для обнаружения аналитов без использования меток в реальном времени нашли применение микро- и нанокантилеверные системы. Основной чувствительный элемент таких трансдюсеров – кантилевер, используемый в качестве распознающего зонда в сканирующей атомно-силовой микроскопии. Кантилеверные БС представляют собой простые в эксплуатации, недорогие, надежные и высокочувствительные аналитические платформы. Объем пробы обычно составляет 1 мкл. Кантилеверные трансдюсеры обладают высокой чувствительностью на уровне 10^{-12} М.

Кантилевер (англ. *cantilever* – кронштейн, консоль) представляет собой закрепленную на чипе тонкую гибкую пластину, на которой располагается слой рецепторных молекул для распознавания аналитов. Для создания на поверхности кантилевера слоя биомолекул преимущественно используют ковалентное присоединение, а также метод самоорганизующихся монослоев на основе тиолов для золотой поверхности или органосиланов – для кремниевой.

Размеры кантилевера составляют от 100 до 200 мкм в длину, от 10 до 40 мкм в ширину при толщине от 0,1 до 5 мкм, а масса не превосходит 10^{-10} кг. Кантилеверы изготавливают из пластин кремния, оксида и нитрида кремния с помощью фотолитографии, химического и физического травления. Упругие консоли формируются в основном из тонких слоев легированного кремния или нитрида кремния. Для улучшения светоотражающих свойств обратную сторону зонда обычно покрывают алюминием или золотом с помощью термического напыления в вакууме, что позволяет использовать оптическую систему контроля изгиба кантилевера. Кроме того, покрытие кантилевера пьезоэлектрической керамикой на основе цирконата-титаната свинца позволяет управлять движением кантилевера, прикладывая к контактам разность потенциалов, или непосредственно считывать частоту его свободных колебаний.

Кантилеверы относятся к механическому типу преобразователей. В основе сенсора лежит преобразование энергии взаимодействия аналита и сенсорного слоя в изменение механических характеристик консоли кантилевера, таких как деформация или резонансная частота. Данные трансдюсеры чрезвычайно чувствительны к силовому воздействию. Сенсор может регистрировать малейшее изменение поверхностных сил в результате адсорбции исследуемого вещества на его поверхность. Кантилеверы имеют очень низкую силовую константу (менее 0,1 Н/м). Благодаря высокой частоте и добротности резонансных колебаний кантилевера его можно использовать в качестве измерителя массы адсорбированных веществ с точностью до 10^{-19} г.

Чувствительность кантилеверных сенсоров зависит от природы материала, из которого он сделан, а также от свойств поверхности и геометрии (длина, ширина,

толщина) консоли. К примеру, для увеличения чувствительности на поверхности консоли создают шероховатости путем ее модификации нанокластерами (например, дыры) либо делают ее ребристой. Это способствует увеличению адсорбируемой массы. Традиционной формой кантилевера является прямоугольная.

Помимо разных форм, кантилевер может содержать несколько слоев из разных материалов. Часто дополнительные слои применяются для интеграции в датчик системы регистрации или возбуждения колебаний. Активные слои для возбуждения колебаний часто выполнены из пьезоэлектрического или магнитоэластичного материала. Кантилевер может содержать и пассивные слои, разделяющие активные или изменяющие его свойства, например жесткость. Простейшим вариантом являются биморфы, состоящие из двух слоев одинаковой длины. Более сложными системами являются кантилеверы, содержащие слои разной длины и геометрии. Такие системы имеют внутренние неоднородности, приводящие к уникальным резонансным свойствам.

Первое применение кантилеверных сенсоров для биологических систем было представлено в 1996 г. на примере неспецифической адсорбции белка бычьего сывороточного альбумина. Первые кантилеверные сенсоры базировались на использовании одной консоли. Дальнейшим развитием этих систем стало использование пары кантилеверов (измерительного и контрольного), что позволило улучшить надежность измерения, так как это дало возможность подавить сигнал, вызванный свойствами окружающей среды (неспецифическая адсорбция, изменения величины pH среды, ионной силы и температуры). Впервые применение биосенсоров на основе пары кантилеверов было продемонстрировано в 2000 г. для определения несовпадения одного основания между сенсорной и анализируемой молекулами ДНК. Впоследствии стали использовать системы с массивом кантилеверов.

В случае использования кантилеверов с несколькими консолями, содержащими различные рецепторные слои, можно добиться высокой селективности и проводить мультиплексный анализ (одновременно определять содержание нескольких аналитов в одном биологическом образце). Кроме того, многоконсольные системы повышают надежность и точность измерений.

В зависимости от физической величины, изменение которой фиксируется в процессе взаимодействия аналита и сенсорного слоя, различают динамический и статический режимы работы микрокантилеверных сенсоров.

Динамический режим работы кантилеверных сенсоров основан на изменении резонансной частоты кантилевера при связывании аналита из раствора. Кантилевер является высокочастотным резонатором, чья резонансная частота (f_0) зависит от эффективной массы (m) и жесткости консоли, которая выражается коэффициентом упругости (k):

$$f_0 = \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{k}{m}}.$$

Жесткость и, следовательно, резонансная частота кантилевера определяются его размерами и свойствами материала. Коэффициент упругости k кантилевера (константа жесткости) определяют следующим уравнением:

$$k = \frac{Ewt^3}{4L^3},$$

где E – модуль Юнга материала кантилевера; w – ширина; t – толщина; L – длина прямоугольного кантилевера.

При сканировании в кантилевере могут возникнуть собственные механические колебания из-за возвратно-поступательных движений относительно образца. Для того чтобы этого избежать, повышают частоту собственных колебаний зонда (f_0), что, в свою очередь, достигается посредством уменьшения эффективной массы зонда и увеличения коэффициента жесткости системы. Поэтому для повышения f_0 длина кантилевера (от которой зависит коэффициент жесткости) составляет порядка нескольких микрон, а масса не превосходит 10^{-10} кг. Резонансные частоты различных кантилеверов колеблются от 8 до 420 кГц.

При нанесении пробы на кантилевер в результате взаимодействия молекул аналита с рецепторным слоем, иммобилизованным на его поверхности, масса датчика изменяется (рис. 39). Добавленная масса (Δm) зависит от концентрации биомолекул в растворе и регистрируется изменением (сдвигом) резонансной частоты кантилевера.

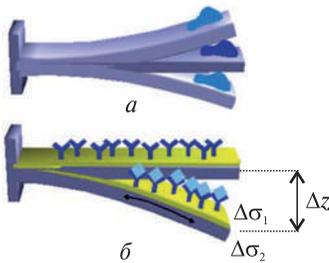


Рис. 39. Принцип динамического (а) и статического (б) режимов работы кантилеверного сенсора

Массовая чувствительность (S_m) кантилевера определяется через отношение изменения частоты (Δf) к массовой нагрузке (Δm) и экспериментально рассчитывается по следующему уравнению:

$$S_m = \frac{\Delta f}{\Delta m}.$$

Однако этот метод не очень эффективен при анализе в жидкой фазе из-за смачиваемого влияния жидкости. Жидкие среды демпфируют (ослабляют) колебания кантилевера. В результате чувствительность прибора существенно падает.

Статический режим является самым распространенным режимом измерений в кантилеверных сенсорах. Он широко используется для исследования жидких проб. Для анализа используют консоль, имеющую различные характеристики поверхностей, так как на одну из них иммобилизуют рецепторный слой. Процессы, проходящие в иммобилизованном сенсорном слое, вызывают возникновение механического напряжения на поверхности, приводящего к сжатию или растяжению модифицированной стороны кантилевера (см. рис. 39). При этом если другая сторона консоли остается ненапряженной, это приводит к возникновению разности сил поверхностного напряжения, обусловленной межмолеку-

лярным взаимодействием в сенсорном слое, и кантилевер изгибается. Система изгибается для достижения равновесия моментов и сил. В зависимости от природы взаимодействия напряжение может быть положительным или отрицательным (стягивающим или растягивающим), что приводит к изгибу кантилевера в ту или иную сторону. Это дает дополнительную информацию о характере межмолекулярных сил в слое.

Отклонение микроконсоли зависит от распределения и количества целевых молекул, адсорбированных на поверхности. Адсорбированная масса, в свою очередь, зависит от концентрации целевых молекул в исследуемом образце. Следовательно, отклонение консоли отражает концентрацию молекул в пробе.

Измеряя отклонение кантилевера в результате биоспецифического связывания, рассчитывают поверхностное напряжение, которое зависит от концентрации искомого вещества в пробе. Отклонение свободного конца консоли кантилевера от положения равновесия в простейшем случае связано с приложенным механическим напряжением формулой Стоуни

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

где $\Delta\sigma$ – изменение поверхностного напряжения (разность сил на верхней $\Delta\sigma_1$ и нижней $\Delta\sigma_2$ сторонах кантилевера); Δz – относительное отклонение кантилевера; ν – коэффициент Пуассона; E – модуль Юнга материала кантилевера; t и L – его толщина и длина соответственно.

Кантилеверы для статического режима имеют длинную и тонкую консоль с низкой жесткостью. Кантилеверы для резонансного режима характеризуются высокой жесткостью и, соответственно, большей резонансной частотой.

Изменение механических характеристик консоли может быть измерено различными методами. В кантилеверных датчиках для считывания результата преимущественно используют оптические и пьезочувствительные системы.

Оптические системы базируются на использовании лазерного луча. Луч направляется на свободный конец консоли и, отразившись, попадает на фотодатчик (диоды), чувствительный к смещению пятна лазерного луча (рис. 40). В случае когда конец кантилевера сгибается в результате взаимодействия рецепторного слоя с молекулами аналита, отраженный луч сдвигается от первоначального положения. Отклонение луча фиксируется фотоприемником. Изменение угла отклонения отраженного от поверхности луча является аналитическим сигналом.

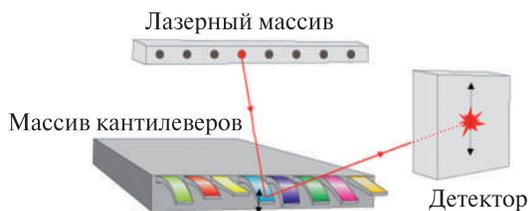


Рис. 40. Схема оптической системы для регистрации изменения механических характеристик кантилевера

Оптические системы наиболее используются, изначально применялись в АСМ. К преимуществам данной оптической системы относятся простота измерения, линейный ответ и отсутствие электрических соединений. Будучи очень чувствительным, метод имеет недостатки. К ним относятся высокая стоимость, необходимость подготовки поверхности, регулировка лазерного луча, необходимость проводить эксперимент в прозрачной среде. Кроме того, сфокусированное лазерное излучение может служить причиной локального нагрева образца и датчика.

К *пьезочувствительным* системам детектирования относятся пьезоэлектрические и пьезорезистивные, основанные на использовании пьезоэлектрических и пьезорезистивных материалов на поверхности кантилевера. Оба метода позволяют более высокую и более простую интеграцию в случае множества микроконсольей. Однако данные методы обладают меньшей чувствительностью, чем оптические.

В пьезоэлектрических системах (англ. *self-sensing piezoelectric-based sensor*) используется как прямой, так и обратный пьезоэффект соответственно для детектирования взаимодействия аналита с рецепторным слоем и для запуска системы. По сути, в данном типе кантилеверного трансдюсера используется единственный пьезоэлектрический слой, чтобы запустить систему и регистрировать аналит в пробе. Это обеспечивает простую и недорогую платформу для множественных анализов с возможностью миниатюризации платформы. Прямые пьезоэлектрические свойства используют, чтобы обнаружить самоиндуцированное (англ. *self-induced*) электрическое напряжение (поле), генерированное в пьезоэлектрическом слое в результате механической деформации консоли (например, изгиба). При использовании обратного пьезоэлектрического эффекта приложенное напряжение приводит к деформации пьезоэлектрического слоя, который, в свою очередь, приводит к колебаниям кантилевера. Недостаток таких трансдюсеров обусловлен использованием сложной электрической схемы.

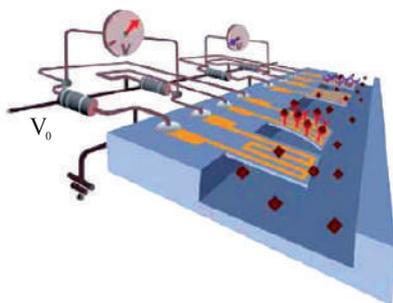


Рис. 41. Схема пьезорезистивной системы для регистрации изменения механических характеристик кантилевера

Пьезорезистивная система основана на изменении сопротивления датчика, находящегося на поверхности кантилевера, в ответ на возникновение поверхностного напряжения при изгибе консоли (рис. 41). Таким датчиком может служить простой золотой электрод нанометровой толщины, нанесенный на поверхность кантилевера. Обычно используются асимметрично легированные консоли. Данная система может применяться для анализа в различных средах, она обладает большим динамическим диапазоном. Недостатком метода является необходимость применения пьезорезистивного слоя (металла, легированного кремния) и тепловой дрейф.

1.7.4. Оптические биосенсоры

Оптические сенсоры являются одной из важнейших категорий БС и составляют значительную часть биосенсорики. В настоящее время развитие оптических биосенсорных технологий — чрезвычайно важная задача науки и техники, решение которой обусловлено потребностями различных областей практики, а именно клинической диагностики — обнаружение и контроль различных патологий и заболеваний; фармацевтики — разработка новых лекарств; экологии — контроль токсичных веществ; протеомики — изучение свойств и взаимодействий белков (например, с вирусами, лекарственными средствами); молекулярной инженерии и т. д.

Для клинико-диагностических целей используют коммерчески доступные оптические БС для контроля веществ (глюкоза, билирубин, газ в крови, холестерин), а также волоконно-оптические датчики для эндоскопии. Для экологического мониторинга доступны оптические сенсоры озона, различных отходов, пестицидов (инсектициды, фунгициды, гербициды, нематоциды и др.), к которым относятся различные соединения (хлор-, серо- и фосфорорганические, производные карбаминовой кислоты, триазины, производные мочевины, неорганические соединения меди, серы, ртути, фтора, бария и др.).

В оптических трансдьюсерах взаимодействие аналита с распознающим биокомпонентом вызывает либо существенное изменение в отклике трансдьюсера, а именно изменяются свойства света (интенсивность, фаза, амплитуда, поляризация), проходящего через образец, либо производит оптический сигнал, который регистрируется трансдьюсером (например, появление флуоресценции).

В целом физическая или химическая трансформация, вызванная процессом биораспознавания, в оптических сенсорах приводит к изменению оптических свойств системы и может быть оценена по различным параметрам оптического излучения — интенсивность поглощения или люминесценции, изменение коэффициента отражения или преломления и т. д. При этом используют зависимости оптических свойств сред от концентраций определяемых веществ.

За последние несколько десятилетий оптические БС получили мощный толчок в развитии благодаря новым достижениям в оптике вообще и развитию производства оптоэлектронных элементов в частности. Например, это создание миниатюрных источников света, оптоволоконна, оптоэлектронных устройств и т. д. Кроме того, параллельное развитие компьютерных и нанотехнологий позволило создать миниатюризированные эффективные смарт-сенсоры, которые делают возможным параллельный анализ большого числа различных аналитов в реальном времени.

Оптические трансдьюсеры обладают особенными свойствами. Некоторые оптические методы, такие как флуоресценция, имеют внутреннее усиление. Так, например, одна-единственная флуоресцентная метка может дать миллион фотонов. Несколько световых сигналов различной частоты можно послать по одному и тому же оптическому пути, потому что они не взаимодействуют друг с другом. Основываясь на различиях в длинах волны, времени прохождения или видах поляризации, оптические сигналы могут быть легко размножены и разделены по каналам (мультиплексированы и демультиплексированы).

Главными блоками оптических трансдюсеров являются источник света, оптическая среда различной геометрии (оптические волокна, волноводы, призмы и др.), иммобилизованный биокомпонент (антитела, ДНК, клетки и т. д.), оптическая детектирующая система.

Преимущества оптических сенсоров заключаются в том, что они позволяют проводить экспрессное детектирование аналитов без использования меток в режиме реального времени и онлайн-мониторинг межмолекулярных взаимодействий. Данные методы исключают механическое воздействие на пробу, т. е. измерения характеризуются неразрушающим и невозмущающим воздействием. Оптические методы имеют широкий диапазон измерений, низкий предел обнаружения и можно работать без использования стандартных растворов. Они обладают высокой чувствительностью, вплоть до обнаружения единичных молекул. Например, биосенсоры, основанные на поверхностном плазмонном резонансе и компенсаторной (нулевой) эллипсометрии, относятся к технике с нулевым фоном, так как единственный источник сигнала обусловлен только присутствием аналита.

Самым простым оптическим сенсором является сенсор на основе абсорбции света. В настоящее время широкое распространение получили трансдюсеры, базирующиеся на эллипсометрии, спектроскопии полного внутреннего отражения (ПВО) и поверхностного плазмонного резонанса (ППР), флуоресцентной и рефлектометрической интерференционной спектроскопии.

В оптических сенсорах в качестве оптических элементов для распространения и преобразования света широко используют различные волноводы – пространственно-неоднородные структуры для направления света (волоконные с круглым сечением или планарные с квадратным сечением). Оптический волновод служит для ограничения области пространства, в которой может распространяться свет. Как правило, волновод содержит область с увеличенным показателем преломления по сравнению с окружающей средой (так называемой оболочкой). В последние десятилетия все большее применение для конструирования оптических сенсоров находят волноводы на основе наноструктурированных сред, что позволяет значительно уменьшить габариты сенсоров. К ним, например, относятся фотонно-кристаллические волноводы, оболочка которых имеет структуру двумерного фотонного кристалла (среда с периодическим изменением коэффициента преломления) и плазмонные волноводы (протяженная полоска металла с поперечным размером, много меньшим длины волны излучения), оптический сигнал распространяется не внутри такого волновода, а по его поверхности в виде поверхностной электромагнитной волны. Это свойство плазмонных волноводов связано с возбуждением в металле плазмонов – резонансных колебаний коллектива свободных электронов.

1.7.4.1. Оптоволоконные сенсоры

Развитие сенсоров на основе оптического волокна началось с 70-х гг. XX в. Первый такой сенсор был описан Д. Любберсом и Н. Опитцем (D. Lubbers and H. Opitz) в 1975 г.

Оптическое волокно (оптоволоконно) – волновод с круглым поперечным сечением очень малого диаметра (обычно от 50 до 200 мкм), по которому передает-

ся электромагнитное излучение оптического диапазона в осевом направлении. Оптическое волокно состоит из сердцевины (ядра) и оптической оболочки. Основными материалами для его изготовления являются плавленый кварц, стекло и пластик (из полиметилметакрилата), прозрачные для оптического излучения.

Развитие оптоволоконных технологий привело к созданию волоконно-оптических сенсоров с широким спектральным диапазоном: от УФ- до ближней и средней ИК-области.

Свет распространяется по оптоволокну в соответствии с законом ПВО. Оптоволокну имеет сердцевину с показателем преломления n_1 и оболочку с показателем преломления n_2 . Для передачи света по механизму ПВО показатель преломления сердцевины должен быть больше такого для оболочки, т. е. $n_1 > n_2$ (например, 1,48 и 1,44 соответственно). Когда луч света падает на границу раздела между прозрачными средами с различными n под углом падения (θ_1), бóльшим критического угла, определенного законом Снеллиуса ($\theta_c = \arcsin[n_2/n_1]$), он будет полностью отражаться в среду с бóльшим n . В случае оптоволокну свет претерпевает полное внутреннее отражение от оптической оболочки (рис. 42, а). Путем многократных переотражений от оболочки свет распространяется только по оптическому волокну. Например, значения показателя преломления для кварца составляют 1,45, воды – 1,33, воздуха – 1,00.

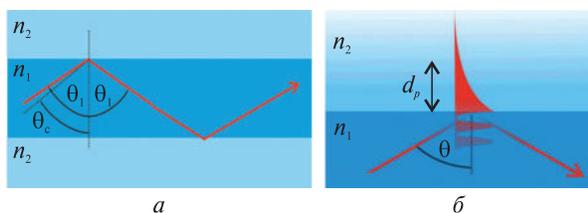


Рис. 42. Полное внутреннее отражение луча света в оптоволокну (а), затухающая волна на границе раздела двух оптических сред ($n_1 > n_2$) (б)

Однако когда падающий свет полностью отражается внутри волновода, его интенсивность не резко падает до нуля на границе раздела двух оптических сред. Небольшая часть света проникает в менее плотную оптическую (отражающую) среду на малое расстояние (порядка длины волны) (рис. 42, б). Это электромагнитное поле, называемое затухающей, или эвансцентной (англ. *evanescent* – недолговечный, исчезающий), волной, имеет интенсивность, которая экспоненциально снижается (затухает) с увеличением расстояния от границы раздела двух сред. Глубина проникновения затухающей волны в среду с низким показателем преломления (d_p) зависит от длины волны (λ), отношения показателей преломления граничащих сред (n_1, n_2), угла падения света на поверхность (θ):

$$d_p = \frac{\lambda}{4\pi\sqrt{n_1^2 \sin^2(\theta) - n_2^2}}.$$

Величина d_p может составлять 50–1000 нм. Проникновение затухающих волн уменьшается с увеличением разницы показателей преломления двух сред и возрастает при их сближении.

Затухающая волна может взаимодействовать с молекулами вещества, находящегося у границы раздела сред (т. е. в среде с показателем преломления n_2), в пределах глубины проникновения. Если молекулы поглощают энергию затухающей волны, то изменяются интенсивность отраженного луча и, следовательно, регистрируемый сигнал. На этом базируется такое явление, как нарушенное полное внутреннее отражение (НПВО).

Нарушение ПВО заключается в том, что коэффициент отражения (R) становится меньше единицы вследствие поглощения света в слое, в который проникает волна, падающая на отражающую среду. Величина ослабления ($A = 1 - R$) отраженной волны зависит от поляризации падающей волны, а также пропорциональна показателю поглощения второй среды. Это явление, так же как ПВО, используют при конструировании оптических трансдьюсеров на основе волноводов.

Оптоволоконные сенсоры могут быть внешними и внутренними. У внешних сенсоров свет выходит из волокна, изменяются его оптические характеристики в результате взаимодействия с аналитом. Это взаимодействие осуществляется в зоне освещения, например в реакционной ячейке (капилляре), далее измененный свет следует к детектору через второе принимающее волокно.

У внутренних сенсоров луч света не покидает волокно, но его свойства изменяются при прохождении имеющегося на волокне измерительного участка. Взаимодействие между светом и аналитом происходит на поверхности волновода на основе недолговечных затухающих волн. В результате взаимодействия аналита с распознающим слоем изменяются оптические свойства – интенсивность, фаза, поляризация, длина волны, спектральное распределение.

Внешние оптоволоконные сенсоры в отличие от внутренних просты в эксплуатации, недорогие, но менее чувствительны, и есть проблемы связи входа/выхода светового сигнала.

Внешние сенсоры – оптоды. Оптод (англ. *optode*), или оптический электрод, представляет собой оптическое волокно, на который (обычно на торец) иммобилизованы биоконпоненты. Эти датчики схожи по составу и механизму функционирования с ионселективными электродами, но вместо потенциометрического отклика изменяют свои оптические свойства пропорционально концентрации аналита в пробе.

Детектирование аналита в пробе с помощью внешнего оптода определяется его конфигурацией. Слой биомолекул может быть иммобилизован непосредственно на торце оптода либо закреплен на торце с помощью мембраны или заключен в гель. При иммобилизации нескольких компонентов на такой сенсор можно детектировать одновременно несколько веществ.

Проба может быть помещена в специальный капилляр, который представляет собой измерительную ячейку. Конец оптода вводят в капилляр, и через оптоволокно посылается свет. Аналит, взаимодействуя с биоконпонентом, будет изменять оптические свойства слоя иммобилизованного реагента (поглощение в видимой, ИК- или УФ-частях спектра, отражение светового потока, интенсивность люминесценции, показатель преломления) (рис. 43). Молекулы аналита, например, могут поглощать свет. Количество света, поглощенного аналитом, определяется по измерению интенсивности вышедшего света через

то же самое или второе вспомогательное оптоволокно. Изменение оптических характеристик фиксируется спектральными анализаторами поглощения либо отражения. Волоконно-оптические сенсоры могут быть связаны с различными типами спектроскопической техники (спектрофотометр, флуориметр или рефлектометр).

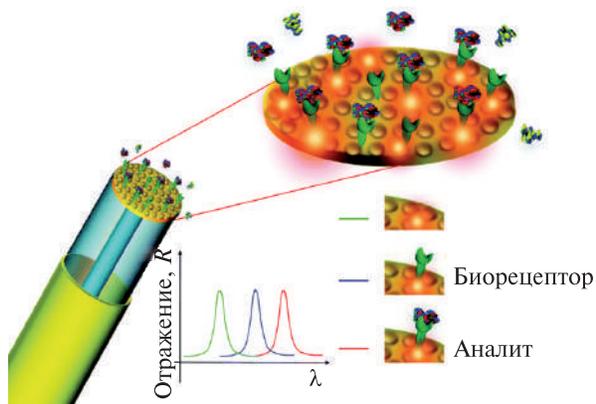


Рис. 43. Принцип работы внешнего сенсора – оптода

Главные преимущества оптодов состоят в том, что они конструктивно просты, легки в использовании и экономически выгодны. Оптоды имеют низкие пределы обнаружения (порядка 10^{-10} – 10^{-12} М против 10^{-5} – 10^{-6} М в случае ионоселективных электродов).

Оптоды нашли широкое применение в клиническом анализе и исследовании биологических объектов (клетки и ткани) и представляют достойную альтернативу давно известным потенцио- и амперометрическим сенсорам. Попытки применения оптодов для целей клинического анализа предпринимались начиная со второй половины 1980-х гг. При помощи оптодов можно измерять содержание анионов хлора, катионов калия, натрия и кальция в крови. Разработанные ферментные оптоды позволяют селективно определять нейтральные соединения (мочевина, этанол, никотин и др.).

Внутренние биосенсоры на основе затухающих волн. Принцип действия данных сенсоров основан на использовании явления НПВО света для детектирования взаимодействия аналита с рецепторным слоем. Преимущество данных сенсоров заключается в том, что они позволяют проводить быстрое детектирование *in situ* (лат. «на месте», т. е. рассмотрение явления именно в месте, где оно происходит, без перемещения в специальную среду) в режиме реального времени, чувствительны и надежны.

В биосенсорах, базирующихся на эвансцентных волнах, аналит может детектироваться прямым способом без модификации молекул или непрямым способом с помощью реагентов, меченных флуорофорами.

Прямое детектирование аналита может базироваться на поглощении аналитом энергии затухающей волны. Измерительная ячейка представляет собой сегмент оптоволокна, на который иммобилизован биокомпонент (например, антитела, олигонуклеотиды, аптамеры) (рис. 44). При наличии аналита в пробе

он селективно связывается с рецепторным слоем и попадает в поле затухающих волн, где происходит абсорбция света. Длина волны падающего света должна соответствовать максимуму поглощения аналита. При этом на определенной λ детектируют изменение интенсивности прошедшего через волокно света ($\Delta I_\lambda = I_{0\lambda} - I_\lambda$, где $I_{0\lambda}$ и I_λ – соответственно интенсивность входящего и выходящего из волокна света). Преимущества таких сенсоров состоят в непрерывном контроле реакций на поверхности, минимальных помехах со стороны веществ в растворе. Предел обнаружения таких БС может составлять 10^{-12} М.

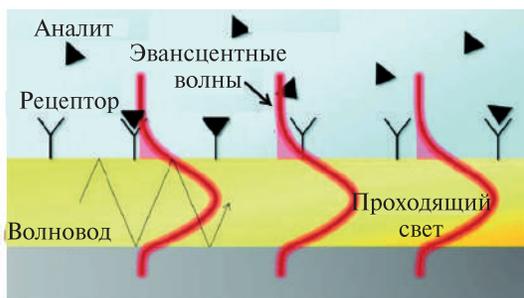


Рис. 44. Принцип работы биосенсора, базирующегося на эвансцентных волнах, с прямым детектированием аналита

Непрямое детектирование искомых соединений с помощью БС на основе затухающих волн широко используют в иммунохимическом анализе. Рассмотрим схему двусайтового (сандвич) иммуноанализа. Измерительная ячейка представляет собой сегмент оптоволоконна, на который иммобилизованы специфические антитела (Ат). При наличии аналита (антигена, Аг) в пробе они селективно связываются антителами. Далее добавляют вторые специфичные антитела (Ат*), меченные флуорофором (обычно цианином Су5), который возбуждается лазерным излучением при 635 нм. Луч от источника света проходит через оптическое волокно. Молекулы флуорофора на расстоянии 100–1000 нм от поверхности волновода возбуждаются энергией поля затухающих волн. Например, размер единичного иммобилизованного антитела может составлять 15 нм от поверхности, сандвича из Ат • Аг • Ат* – 30–50 нм, так что флуоресцентная метка находится в области затухающих волн, которые возбуждают флуорофорный маркер. Возникающая при этом флуоресценция через это же оптическое волокно и фильтр поступает на фотодиод или фотоумножитель. По сути, поглощенная флуорофором энергия затухающей волны частично испускается в виде флуоресценции, которая детектируется. Свободные меченые антитела находятся в толще раствора за пределами затухающих волн и не возбуждаются ими, поэтому не вносят помех в регистрируемый сигнал.

В простом формате иммуноанализа проба предварительно маркируется флуорофором. Меченый аналит связывается с иммобилизованными антителами, и флуорофор попадает в поле эвансцентной волны, где происходит его возбуждение (рис. 45).

В целом чувствительность БС может составлять 10^{-12} – 10^{-13} М.

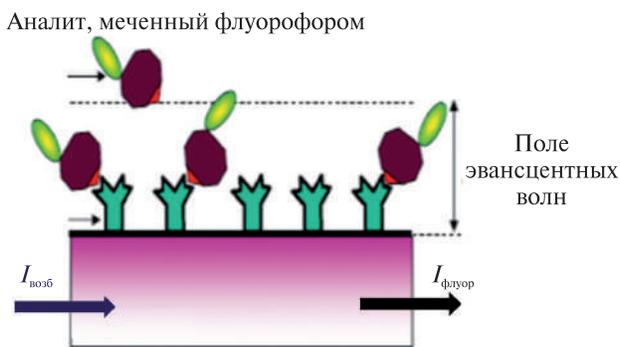


Рис. 45. Принцип работы биосенсора, базирующегося на эвансцентных волнах, с непрямым детектированием аналита

Прямой способ относительно простой в исполнении и дешевый, он позволяет изучать кинетику и выполнить количественную оценку межмолекулярных взаимодействий. Кроме того, некоторые методы обнаружения аналитов прямым способом базируются на регистрации изменения показателя преломления (коэффициент рефракции), вызванного межмолекулярными взаимодействиями, который связан с концентрацией аналита вблизи рецепторного слоя или поверхностной плотностью, а не с общей массой образца. В результате детектируемый сигнал не сокращается в соответствии с объемом образца. Такой метод детектирования особенно привлекателен для анализа ультрамалых (нанол, фемтол) объемов. Это является существенным преимуществом в сравнении с методом, базирующимся на флуоресценции, так как в этом случае детектируемый сигнал обычно зависит от общего количества аналита в анализируемом объеме или на анализируемой поверхности.

1.7.4.2. Биосенсоры на основе фотонно-кристаллических структур

Фотонный кристалл (ФК) (англ. *photonic crystal*) – это материал, структура которого характеризуется периодическим изменением показателя преломления в одном, двух или трех направлениях (соответственно 1D, 2D, 3D ФК), влияющим на движение фотонов. Обычно период ФК сопоставим с длиной волны взаимодействующего излучения. Термин «фотонный кристалл» впервые был предложен в 1987 г. американским ученым Э. Яблоновичем (E. Yablonovitch). Примером природных фотонных кристаллов с одномерной периодичностью являются крылья бабочек, живущих в жарких странах, перламутровое покрытие раковин моллюсков и др. Структуры с двумерной периодичностью присутствуют в строении глаз насекомых (например, моли), а также человека и других млекопитающих.

Уникальным свойством ФК благодаря периодическому изменению показателя преломления является наличие фотонных запрещенных зон (ФЗЗ) (англ. *photonic band gap, PBG*), препятствующих распространению света определенной частоты (или длины волны) в структуре. Практически это значит, что если на ФК падает фотон, обладающий энергией (длиной волны, частотой), которая соответствует запрещенной зоне данного ФК, то он не может распространяться

ся в фотонном кристалле и отражается обратно. И наоборот, если на ФК падает фотон, обладающий энергией (длиной волны, частотой), которая соответствует разрешенной зоне данного ФК, то он может распространяться в ФК. Другими словами, ФК выполняет функцию оптического фильтра.

Любая неоднородность в ФК называется дефектом фотонного кристалла, поскольку нарушает его периодичность. Введение дефектов точечных (микрорезонаторы) или линейных в идеальную фотонную решетку позволяет создать внутри ФЗЗ определенные состояния, на которых может быть локализован свет, а распространение света может быть ограничено или, наоборот, усилено вдоль и вокруг очень маленького волновода. С точки зрения применения ФК в биосенсорах именно структуры с дефектами представляют особый интерес, так как, например, наличие полостей в периодической структуре позволяет заполнять их исследуемыми образцами либо эти области крайне чувствительны к изменениям на их поверхности.

В ФК-биосенсорах значительно повышается эффективность взаимодействия излучения с биологическими объектами, которые адсорбируются на стенках полостей ФК. ФК-биосенсоры имеют очень малую чувствительную область, так что для анализа достаточно небольших объемов образца, содержащих низкие концентрации биомолекул. Например, для БС, основанных на ФК-микрорезонаторах, чувствительная область может составлять $1,7 \text{ мм}^2$, что позволяет проводить ультракомпактный мониторинг биомолекулярных взаимодействий.

Фотонные кристаллы способны обеспечить точный контроль оптических характеристик при трансмиссии света посредством выбора периодических параметров их структуры и материала, из которого они изготовлены. ФК обладают высокой селективностью по отношению к длине волны. Геометрия структуры фотонного кристалла может быть разработана так, что возможны концентрация света в чрезвычайно малых объемах и получение очень высокой локальной напряженности электромагнитного поля. Такие устройства часто называют «наноструктурными поверхностями», потому что их типичные размеры меньше длины волны света, которым они манипулируют. В целом это позволяет использовать ФК для определения различных частиц наноразмерного диапазона и широко применять при конструировании не только биосенсоров, но и микрофлюидных чипов.

В качестве сенсорных элементов используют фотонно-кристаллические волноводы (2D структуры) и планарные 1D ФК-структуры.

Биосенсоры на основе фотонно-кристаллических волноводов. В качестве оптических трансдюсеров в таких БС могут быть использованы ФК-волноводы как линейные, так и волоконные. Линейный волновод в фотонном кристалле формируется путем введения линии дефекта в решетчатую структуру двумерного фотонного кристалла или пластины из фотонного кристалла (рис. 46). Эта линия дефекта может быть создана путем удаления или изменения размера одного ряда отверстий. В такой ФК-структуре заданная ширина полосы света направляется в волновод. Свет ограничен по вертикали полным внутренним отражением пластины, а по бокам – шириной ФЗЗ структуры 2D-ФК. Линейные волноводы обладают высокой чувствительностью, незначительные изменения показателя преломления в окружающей среде в области дефекта (например, связывание аналита биокomпонентом) вызывают измеримый сдвиг длины волны, которая передается через ФК. Предел обнаружения находится в области $<10^{-9} \text{ М}$.

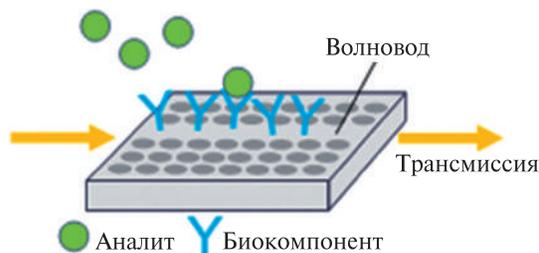


Рис. 46. Принцип работы БС на основе линейного ФК-волновода

Другой тип БС базируется на применении фотонно-кристаллического волокна с полый сердцевинной. Оно представляет собой в поперечном сечении двумерный фотонный кристалл (2D структуры). В центре симметрии такого волновода нарушена периодичность воздушных каналов – присутствует полый дефект решетки.

Фотонно-кристаллическое волокно (ФКВ) получают путем сплавления пучка полых стеклянных или кварцевых капилляров круглого или шестигранного сечения. Тонкостенные стеклянные капилляры укладывают в пакет требуемой формы с заданной периодичностью. В результате получается чередование сред с различным показателем преломления – воздух ($n = 1,0$) и кварц ($n = 1,45$). Путем варьирования конфигурации структурной оболочки (и значит, варьирования показателя преломления) можно добиться изменения спектрального состава проводимого по волноводу света. Так формируется спектр пропускания ФКВ. Образование полый сердцевинной световода происходит на этапе сборки структуры путем замены одного или нескольких стеклянных капилляров на такую же по геометрии направляющую втулку.

Для получения волновода требуемых размеров сформированный пакет капилляров нагревают до температуры размягчения стекла и перетягивают в подобии. Операция повторяется несколько раз – до получения требуемого диаметра волокна и заданного шага в расположении воздушных каналов в структурной оболочке. К примеру, можно использовать ФКВ со следующими параметрами: наружный диаметр – 750 мкм, диаметр полый сердцевинной – 150 мкм, диаметр единичного канала (одной воздушной ячейки) – 8 мкм.

ФКВ, так же как и оптоволокно, проводит электромагнитное излучение оптического диапазона, однако отличается конструктивно и по принципу распространения излучения. Направляющие свойства ФКВ с полый сердцевинной обусловлены наличием фотонной запрещенной зоны у периодической структуры, формирующей оболочку.

Оптическое излучение, вводимое в полую сердцевинную волокна, с резонансными частотами, лежащими в пределах ширины запрещенной зоны кристалла, не проходит сквозь структурную оболочку волновода и распространяется вдоль полый сердцевинной. Варьируя конфигурацию структурной оболочки, можно добиться изменения спектрального состава проводимого по волноводу света. Так, если на множество ФКВ с различными параметрами с торца падает белый свет, то каждый отдельный волновод будет иметь свой спектральный состав выходящего из него излучения, т. е. на выходе каждого отдельного ФКВ будем наблюдать свет определенного цвета (определенной длины волны), остальная часть спектра не пройдет сквозь волновод.

Схематично работу сенсора с ФКВ можно представить следующим образом. Оптическое излучение от источника собирается линзой так, что размер светового пятна в фокусе соответствует размеру полой сердцевины ФКВ. Благодаря юстировочному устройству входной торец фотонно-кристаллического волокна располагают так, чтобы излучение вводилось строго в его полую сердцевину. Прошедшее через волновод излучение с помощью микрообъектива фокусируется на входной оптоволоконный кабель анализатора оптических спектров.

Спектры пропускания полых ФКВ имеют гребенчатую структуру (рис. 47). Такая форма спектра возникает из-за того, что структурная оболочка волновода формирует ФЗЗ, в пределах которых она характеризуется высокой отражательной способностью.

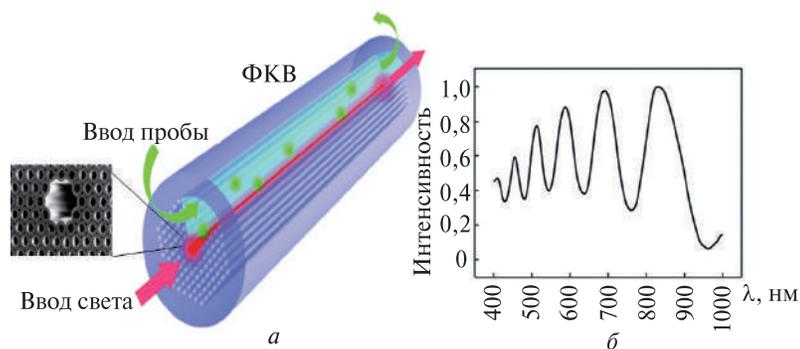


Рис. 47. Принцип работы БС на основе фотонно-кристаллического волокна (ФКВ) (а), спектр пропускания ФКВ (длина 50 мм, размер полой сердцевины 150 мкм, полость заполнена водой) (б)

В зависимости от диаметра полой сердцевины в спектре пропускания волновода можно наблюдать определенное количество различных по ширине максимумов. Причем их положение также определяется геометрией волновода. Оптимизируя геометрию ФКВ, можно настроить его спектр пропускания так, чтобы чувствительность к определенным веществам была максимальной.

Аналитическим сигналом при работе с ФКВ является его оптический отклик на изменение параметров среды, заполняющей его внутреннюю структуру. Существует прямая связь между свойствами среды, заполняющей сердцевину ФКВ, и его спектром пропускания. При изменении отдельных параметров жидкости, таких как показатель преломления, коэффициент поглощения или рассеяния, можно наблюдать однозначное изменение в спектре пропускания волновода. Присутствие аналита в пробе можно регистрировать, например, по изменению интенсивности максимума при определенной длине волны (I_λ) (смещение максимумов по шкале интенсивности), по сдвигу в спектре (смещение максимумов по шкале длин волн) либо по появлению новых максимумов.

ФКВ имеют ряд существенных преимуществ, а именно возможность получения одновременной информации о поглощении исследуемого вещества и его показателе преломления на ряде длин волн, малый объем исследуемой пробы и малое время отклика.

Биосенсоры на основе ФКВ нашли применение в медицине, экологии и других областях практики. Они подходят для быстрой и точной медицинской диагностики или для обнаружения патогенных микроорганизмов. Например, для определения холерогена (холерный токсин белковой природы) в пробах сначала получают спектр пропускания ФКВ для чистой воды. Спектр пропускания ФКВ характеризуется серией максимумов в диапазоне длин волн 400–100 нм (рис. 48). Затем регистрируются спектры оптического излучения, проходящего ФКВ, после заполнения его внутренней структуры водным раствором холерогена. С увеличением концентрации растворенного в воде вещества спектр пропускания света ФКВ изменяется значительно. Для анализа спектров выбирают определенный параметр – величину смещения максимума пропускания света, расположенного, например, на длине волны 580 нм, по шкале интенсивности относительно значения пропускания в соседнем максимуме 740 нм. Для оценки смещения данного максимума по шкале интенсивности при изменении количества растворенного в жидкости вещества получают зависимость величины смещения от концентрации холерогена в растворе, которые, по сути, представляют собой калибровочные кривые.

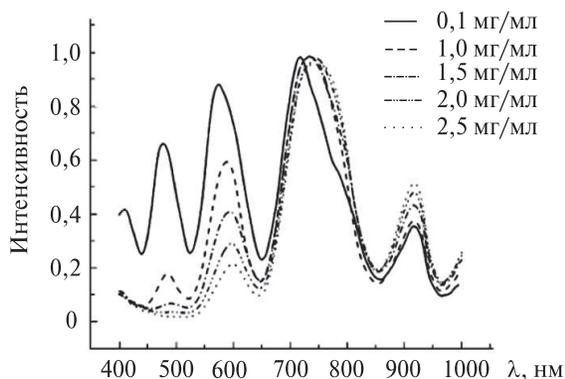


Рис. 48. Спектры оптического излучения, проходящего по полости ФКВ, после заполнения его внутренней структуры водным раствором холерогена (концентрация раствора возрастает от образца к образцу в интервале 0,1–2,5 мг/мл)

Биосенсоры на основе ФКВ обладают высокой чувствительностью, позволяют определять искомые соединения в концентрациях порядка 10^{-9} г/мл, детектируют абсорбируемую на их поверхности массу в пределах 10^{-12} г/мм².

Биосенсоры на основе планарных фотонно-кристаллических структур. Оптические биосенсоры на основе 1D ФК-структур относятся к сенсорам, базирующимся на изменении показателя преломления при взаимодействии молекул аналита с рецепторным слоем.

Одномерные фотонные кристаллы (1D ФК) характеризуются периодичностью показателя преломления только в одном пространственном направлении. Традиционно такие фотонные кристаллы представляют собой многослойную структуру из чередующихся параллельно друг другу слоев материалов с разными диэлектрическими константами. Одномерные ФК позволяют получить запре-

щенные зоны и фильтрующие свойства для излучения, распространяющегося в одном направлении, перпендикулярном слоям материалов.

Первые БС на основе 1D ФК получали из пористого кремния, изменение пористости которого приводит к изменению показателя преломления. Одномерный периодический ФК можно создать путем нанесения полосы кремния (высокий n) с прямоугольным сечением на подложку SiO_2 (низкий n) и вытравливания в ней субмикронных отверстий, расположенных на одной линии вдоль полосы на равном расстоянии друг от друга. Такая полосная структура формирует запрещенные зоны, в которых распространение света запрещено.

При освещении поверхности 1D ФК-структуры белым светом при нормальном падении получают оптический спектр отражения/пропускания, который содержит узкие резонансные пики внутри запрещенной зоны, точное положение которой определено показателем преломления пор. Механизм детектирования основан на сдвиге пика полосы отражения (англ. *the peak wavelength, PWV*) в результате изменения показателя преломления в окружающей среде. Внутренние поверхности пор 1D ФК функционализируют биомолекулами, способными избирательно связывать молекулы аналита из комплексного раствора. Таким образом, присутствие молекул в порах может быть детектировано путем мониторинга малых сдвигов в полосе отражения (англ. *the peak wavelength shift, PWS*) (рис. 49).

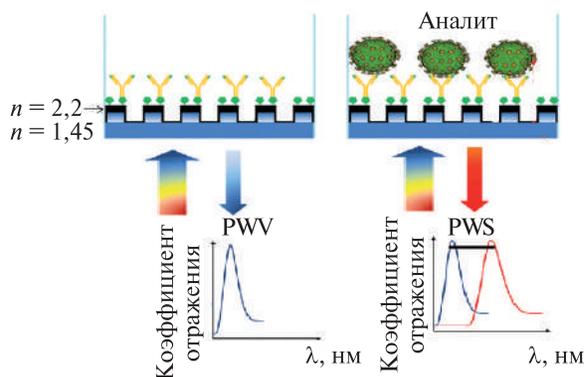


Рис. 49. Принцип работы БС на основе 1D ФК

Для изготовления 1D ФК также используют полимеры. Это позволяет создавать простые и крупномасштабные сенсоры, включая возможность их встраивания в микропланшеты и микрофлюидные чипы. Примером такого 1D ФК-сенсора является структура, состоящая из полимера с низкой диэлектрической проницаемостью (обычно полиэтилентерефталат, $n = 1,45$) и покрытия с высокой диэлектрической проницаемостью из TiO_2 ($n = 2,2$). Благодаря своей простой структуре датчик может быть изготовлен на непрерывных листах пластиковой пленки.

На основе вышеуказанных 1D ФК-структур компанией SRU Biosystems Inc. созданы недорогие биосенсоры (BINDTM), изготавливаемые из листов пластиковой пленки и включаемые в микропланшеты с 96-, 384- и 1536-луночным форматами для параллельного высокочувствительного анализа малых молекул, белков

и клеток. Такие системы особенно важны для анализа протеома и фармацевтического скрининга. Например, в фармацевтике первичный скрининг для определения ряда химических веществ-кандидатов, имеющих желаемый уровень сродства к белку, может включать более 106 анализов. Поэтому проведение крупномасштабных промышленных исследований определяет необходимость минимизации затрат на одну единицу.

Биосенсоры на основе 1D ФК обладают высокой чувствительностью, они позволяют детектировать разницу в показателе преломления (Δn , англ. ΔRI) порядка 10^{-8} и абсорбируемую на их поверхности массу в пределах 10^{-15} г/мм².

В настоящее время в связи с быстрым совершенствованием аппаратного и программного обеспечения смартфонов их стали широко использовать в биосенсорике. Смартфоны выступают в качестве детекторов, процессоров данных и даже индукторов сигналов с дополнительным специальным гнездом или насадкой для установки других небольших оптических или иных компонентов. В 2013 г. Д. Галлегосом (D.Gallegos) и соавторами был представлен 1D ФК-биосенсор на основе смартфона. В портативном устройстве, разработанном учеными, роль 1D ФК играет обычное предметное стекло, покрытое специальным материалом. Каждый такой слайд подготавливается с расчетом на обнаружение определенных молекул и вставляется в слот на подставке. С помощью камеры смартфона измеряется спектр пропускания слайда до и после нанесения на него биологического образца. Степень смещения темной полосы в этом спектре указывает на количество целевых молекул, присутствующих в образце.

1.7.4.3. Интерференционные биосенсоры на основе оптических волноводов

Работа данных БС базируется на интерференции белого света на тонких пленках – одной из старейших техник для измерения толщины прозрачного тонкого слоя. В основе метода лежит многократное отражение падающего света от поверхностей тонких прозрачных слоев. В качестве оптических структур используют как оптоволоконна с круглым диаметром, так и планарные волноводы.

Биосенсоры на основе биослойной интерферометрии (БСИ) (англ. *Biolayer Interferometry, BLI*). Данные БС представляют собой оптоволоконно, на острие которого иммобилизованы распознающие биомолекулы (рис. 50). Белый свет направляется по стекловолокону и отражается от двух поверхностей обратно в систему. Одна поверхность – это интерфейс между стекловолоконном и биомолекулярным слоем, другая – между биомолекулярным слоем и раствором. Отраженные лучи интерферируют. Наложение отраженных лучей дает характеристическую картину интерференционных полос (интерферограмму). Интерферограмма представляет собой зависимость относительной интенсивности ($I_{\text{отн}}$) от длины волны.

При взаимодействии молекул аналита с биомолекулярным слоем происходит изменение интерференционной картины, что выражается в сдвиге в спектре ($\Delta\lambda$). Это и есть аналитический сигнал, который непосредственно зависит от количества адсорбированных молекул. Чем больше молекул адсорбируется на поверхности датчика, тем сильнее этот эффект. Аналогично интерферометрический профиль смещается в противоположном направлении по мере того, как молекулы десорбируются с поверхности.

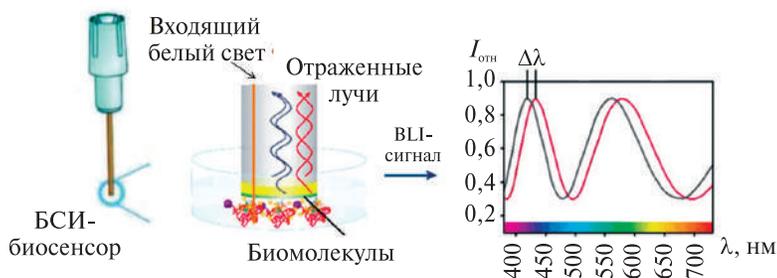


Рис. 50. Принцип работы БС на основе биослойной интерферометрии

Взаимодействие аналита с биомолекулярным слоем вызывает изменение физической толщины слоя d и показателя преломления n этого слоя. Результирующий продукт обоих параметров определяется как оптическая толщина слоя: nd . Изменение оптической толщины слоя ведет к модуляции спектра интерференции ($\Delta\lambda = \Delta nd$).

Графическое изображение изменения спектра интерференции, т. е. изменение в оптической толщине во времени, представляет собой сенсограмму. Сенсограмма в реальном времени позволяет исследовать кинетику ассоциации или диссоциации молекул (k_a , k_d) и рассчитать константу аффинности (K_A).

Достоинством оптоволоконных БС на основе БСИ является то, что можно использовать инновационные системы для образцов. А именно вместо проточной кюветы, в которую поступает жидкая проба для анализа, применяют многоячейчатые платы, в которые можно помещать большое количество различных растворов. Последовательные измерения выполняются путем погружения зонда в различные ячейки, что делает абсолютно ненужной проточную измерительную кювету. Это повышает надежность анализа и снижает эксплуатационные расходы. Например, современные системы Octet system, ForteBio (Menlo Park, CA) позволяют использовать до 16 датчиков параллельно.

Поскольку детектируются только вещества, связавшиеся с поверхностью сенсора, то влияние окружающей среды на датчик минимально, и в результате нет необходимости в контроле. Недостатком оптоволоконных БСИ является их предел обнаружения $\sim 0,1$ нг/см², что препятствует исследованию адсорбции малых молекул.

Современные биосенсоры на основе БСИ позволяют в режиме реального времени проводить количественный и кинетический анализ в простом формате «Drop-Read-Done» («образец, анализ, результат»), отличаются простотой в управлении, высокой скоростью и экономичностью. Данные платформы используют в фармацевтике для скрининга потенциальных кандидатов в лекарственные препараты.

Интерференционные биосенсоры на основе планарных волноводов. Принцип работы и регистрации данных БС такой же, как и для БСИ. Различия обусловлены конструкцией сенсора. Такой сенсор представляет собой многослойные пластины, например двуслойные – из диоксида кремния (SiO_2) и кремния (Si) или трехслойные – из слоя кварца (SiO_2) (нижняя часть пластины), оксида тантала (Ta_2O_5), кварца, который может модифицироваться химически и на

который иммобилизуют биомолекулы. На каждой границе раздела слоев часть лучей белого света, падающего на пластину вертикально, отражается, и они интерферируют (рис. 51).

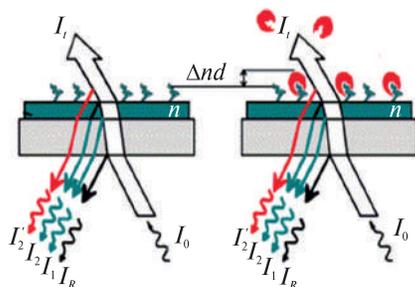


Рис. 51. Принцип работы интерференционного БС на основе планарного волновода

Планарные волноводы могут быть встроены в микрофлюидные чипы с целью получения многоканальной системы (например, из 32 ячеек) для мультиплексного анализа. Для считывания сигнала используют микроспектрометры.

Чувствительность интерференционных биосенсоров зависит от конфигурации, они способны регистрировать изменение показателя преломления среды порядка 10^{-8} .

1.7.4.4. Биосенсоры на основе поверхностного плазмонного резонанса

В настоящее время в биоаналитике широкое распространение получили биосенсоры, базирующиеся на уникальном физическом феномене – ППР. Биосенсоры с ППР-трансдьюсером основаны на детектировании изменения показателя преломления среды. Метод ППР применяют как для регистрации отдельных аналитов, так и для изучения взаимодействия различных молекул как низкомолекулярных (лекарственные средства, наркотики и т. д.), так и высокомолекулярных (липиды, белки, НК и т. д.), вплоть до вирусов и целых клеток. Образование межмолекулярных комплексов на границе раздела двух сред сопровождается изменением показателя преломления одной из них, что приводит к модуляции параметров ППР, регистрируемой детектором.

Для понимания функциональных процессов, которые являются основой жизнедеятельности биологических систем, установления молекулярных механизмов различных болезней в организме, разработки новых эффективных лекарств важно иметь подробную информацию о множестве межмолекулярных взаимодействий, управляющих функционированием клеток в норме и при патологии. Основными характеристиками межмолекулярных взаимодействий являются аффинность (константа равновесия K_A , энергия Гиббса), стехиометрия (n , количество соединений, связанных, например, с биополимером), кооперативные эффекты при связывании, кинетика связывания (константы скорости k , которые определяют динамику взаимодействия). Знание этих фундаментальных параметров является

ключом для понимания молекулярных взаимодействий, а также каким образом последние влияют на клеточное функционирование. Для экспериментального нахождения указанных параметров необходимы очень точные методы определения концентраций связанных и несвязанных компонентов.

Вследствие различных свойств биологических молекул и изменений в их свойствах, происходящих при формировании комплексов, часто трудно найти метод, который может охарактеризовать множество взаимодействий при варьировании условий. Например, в случае комплексов, основанных на очень сильном взаимодействии, необходимо провести эксперименты при очень низких концентрациях, в пределах наноМ и ниже, что меньше предела обнаружения многих аналитических систем. Детектирование с помощью ППР-сенсоров дает альтернативный метод, базирующийся на регистрации изменения показателя преломления или массы на сенсорной поверхности при образовании межмолекулярного комплекса на ней. Метод регистрации ППР не требует маркирования реагентов какими-либо метками и позволяет определять равновесные параметры взаимодействия без разделения свободных молекул и их комплексов.

Поскольку ППР-сенсор дает прямой сигнал в ответ при связывании определенного количества молекул в реальном времени в отличие от косвенных сигналов других инструментов, то он является очень мощным методом для изучения термодинамики и кинетики межмолекулярных взаимодействий. Метод ППР – весьма гибкий инструмент при исследовании межмолекулярных взаимодействий и может легко подстраиваться под задачи того или иного эксперимента. Например, ППР-сенсоры позволили исследовать трансмембранные рецепторы, сопряженные с G-белком (англ. *G-protein-coupled receptors, GPCRs*), нарушение работы которых приводит к возникновению множества различных заболеваний, а сами рецепторы являются мишенью до 50 % выпускаемых лекарств.

Преимущества ППР-сенсоров заключаются в следующем: высокие чувствительность (можно измерить связывание молекул в пределах 1 пиког/мм²), специфичность и временное разрешение, параллельность измерений, никакого механического воздействия на пробу, анализ в режиме реального времени *in situ* без использования меток, для анализа необходимо очень малое количество пробы.

Теоретические основы ППР. Существование поверхностных электромагнитных волн теоретически предсказано на основе уравнений Д. Максвелла (1873), явление было широко исследовано в течение первых десятилетий XX в. В конце 1960-х гг. Е. Кречманн и А. Отто (E. Kretschmann and A. Otto) продемонстрировали возможность возбуждения поверхностных плазмонов с помощью оптического метода, базирующегося на нарушении полного внутреннего отражения света. Потенциал ППР для характеристики тонких пленок и мониторинга процессов на металлических интерфейсах выявлен в конце 1970-х. В 1982 г. К. Найландер и Б. Лидберг (C. Nylander and B. Liedberg) использовали ППР в биосенсорах для исследования межмолекулярных взаимодействий. Первые коммерческие БС на основе ППР выпущены компанией «Biacore», созданной на базе шведской фирмы «Pharmacia Biosensor AB», в конце 1980-х гг. Со времени представления первого ППР-биосенсора компания разработала более 10 модификаций, повышая чувствительность и точность анализа, степень его автоматизации и реализуя высокопроизводительные мультиплексные технологии измерений. Впослед-

ствии и другими производителями были созданы различные ППП-инструменты с новыми возможностями — визуализирующий ППП (англ. *SPR imaging, IBIS*), мультипараметрический (англ. *multi-parametric SPR*, «BioNavis»), для изучения множественных взаимодействий («Interaction Array», Bio-Rad) а также новые типы сенсоров и чипов с различными модифицированными поверхностями (например, графеном, «Sensia»).

ППР представляет собой квантовое оптико-электрическое явление, возникающее в результате взаимодействия света со свободными электронами на поверхности тонкого слоя металла. При определенных условиях энергия, переносимая фотонами света, передается коллективному возбуждению электронов на границе раздела металла и диэлектрика (воздух, вода, органический растворитель). ППП, наблюдаемый для тонких металлических пленок, обозначают как распространяющийся в отличие от локализованного, которым обладают изолированные металлические наночастицы. Об этом будет сказано в главе 2.

Квазичастицы (кванты) коллективных колебаний электронов в проводящем материале называют плазмонами. Область локализации поверхностных плазмонов находится вблизи поверхности металла, где локализованы поверхностные заряды. Поверхностные плазмоны (ПП) можно также рассматривать как волны изменения плотности электрического заряда, которые могут возникать и распространяться за счет наличия электронов проводимости металла вдоль его поверхности. Плазмоны обозначают квазичастицами для их отличия от квантовых частиц — электронов, протонов, нейтронов и т. д. Плазмоны существуют только тогда, когда металл существует как единое целое.

При падении света на тонкий слой металла происходит его отражение. Передача энергии, которую несут фотоны света, поверхностным плазмонам происходит только при определенных резонансных условиях. Для того чтобы энергия падающего фотона могла быть преобразована в энергию поверхностного плазмона, необходимо выполнение условий сохранения энергии и момента движения, т. е. чтобы волновые векторы фотона и плазмона совпадали по величине и направлению (совпадение импульсов фотонов и ПП). Резонанс между энергией фотонов и электронов у металлической поверхности возникает, когда свет определенной (резонансной) длины волны взаимодействует с интерфейсом диэлектрик — металл под определенным углом, названным резонансным. Определенная часть энергии света при этом превращается в энергию ПП. В результате этого резко падает интенсивность отраженного от поверхности металла света. Экспериментально этот резонанс наблюдается как резкий минимум в спектре отражения света при варьировании его угла падения (рис. 52). Так, резонансное возбуждение ПП электромагнитной волной (светом) в тонком слое металла на границе металл — диэлектрик получило название «поверхностный плазмонный резонанс».

Возникающие ПП представляют собой сильно локализованные поверхностные электромагнитные волны, которые распространяются вдоль границы раздела между металлом и окружающей средой (см. рис. 52). Интенсивность поля этой недолговечной волны (напряженность электрического поля) достигает максимума на границе раздела металл — диэлектрик и затем экспоненциально с расстоянием от поверхности затухает как в металле, так и в диэлектрике. Величина

затухания поля зависит от длины волны излучения и диэлектрической проницаемости материалов. Глубина проникновения поля обычно составляет десятки нанометров (до 300 нм) от поверхности. Этот параметр возрастает при увеличении длины волны. Например, для системы золото – диэлектрик с показателем преломления 1,32 можно, варьируя длину волны возбуждающего света от 600 до 1000 нм, увеличить глубину проникновения поля от 100 до 600 нм.

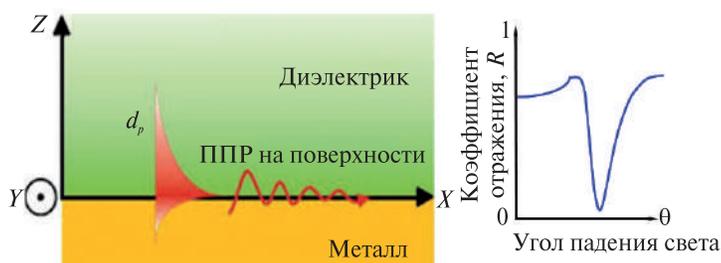


Рис. 52. Схема, иллюстрирующая ППР (d_p – глубина проникновения ПП в среду); спектр отражения света при варьировании угла его падения на поверхность тонкого слоя металла

Условия резонанса. Обычно импульс плазмонов больше, чем фотонов. Поэтому для возникновения ППР используют специальные приспособления (согласующие устройства), увеличивающие импульс фотонов. В качестве согласующих устройств могут быть призмы, волноводы или субволновые решетки. Импульс плазмона зависит от процессов, протекающих на поверхности металла (например, адсорбции на ней различных биомолекул). Импульс фотона, в свою очередь, зависит от угла падения и его энергии, т. е. длины волны.

В целом условия резонансного возбуждения поверхностных плазмонов зависят:

- от свойств металлической поверхности, на которой они возбуждаются;
- диэлектрических свойств среды (воздух, адсорбированная пленка), граничной к поверхности, т. е. показателя преломления среды, через которую свет падает на металл;
- угла падения света (длины волны света).

ПП, как указывалось выше, представляет собой затухающие (эвансцентные) волны. Они чрезвычайно чувствительны к изменениям в показателе преломления около металлической поверхности в области распространения плазмона, т. е. к составу среды вблизи границы раздела, например к адсорбции молекул на поверхности металла. Минимальное варьирование показателя преломления в приграничной области, вызванное изменением состава среды, приводит к изменениям условий ППР, а именно к сдвигу резонансной длины волны падающего света, изменению в интенсивности отраженного света или резонансного угла падающего света. Величина этих сдвигов количественно связана с величиной изменения показателя преломления среды, контактирующей с металлической поверхностью. Положение минимума отраженного света смещается даже при варьировании показателя преломления приповерхностного слоя на 10^{-10} . Эти сверхмалые изменения отражают, например, образование комплекса антиген – антитело или трансформацию комплексов биомолекул на поверхности тонкой пленки золота.

Это позволяет, регистрируя параметры отраженной волны, в режиме реального времени детектировать образование комплексов на границе сред. Регистрируемыми параметрами могут быть резонансная частота возбуждающего света при фиксированном угле падения луча или резонансный угол падения луча при фиксированной частоте, а также амплитуда или фаза света. Первые два типа ППР-детекции называют также спектроскопией поверхностных плазмонов с частотными и угловыми спектрами соответственно.

В результате в ППР-биосенсорах осуществляется детектирование молекул, находящихся только в тонком приповерхностном слое. Это позволяет реализовать высокую чувствительность и селективность, а также существенно уменьшить паразитный фоновый сигнал. ППР используют для высокочувствительной экспресс-диагностики в медицине, протеомных исследований белковых и белок-лигандных комплексов, биохимического анализа в фармакокинетических исследованиях связывания фармпрепаратов, исследования кинетики биохимических реакций для составления карт межбелковых и метаболических взаимодействий и др.

ППР-биосенсор на основе диэлектрической призмы. Наиболее часто для возбуждения поверхностных плазмонов используют призмную схему Отто – Кречманна (рис. 53). На стеклянную призму наносят тонкий слой металла (например, 50 нм). Обратная сторона металлической пленки контактирует с анализируемой средой, т. е. является частью проточной измерительной ячейки. Как правило,

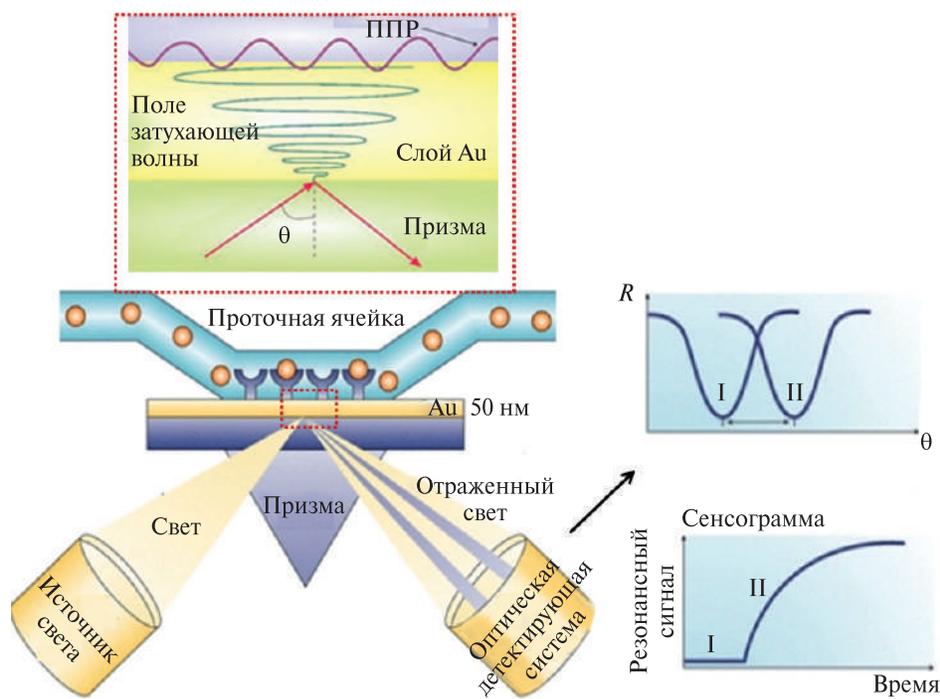


Рис. 53. Схема работы ППР-биосенсора на основе диэлектрической призмы: при связывании анализита с рецепторным слоем происходит сдвиг резонансного угла, сенсограмма отображает изменение резонансного сигнала во времени

в качестве металла используют золото, которое продуцирует ППР в ближней ИК-области. Оно инертно и может быть легко дериватизировано с помощью производных тиолов для иммобилизации биомолекул. Другие металлы не нашли широкого применения, например, серебро легко окисляется, индий дорогой, натрий очень реакционно-способный, медь и алюминий дают широкую полосу ППР-сигнала на спектре отражения и обнаруживают меньшую чувствительность к изменению показателя преломления. В качестве источника света используют, как правило, гелий-неоновый лазер.

Пучок монохроматического света проходит через призму с высоким показателем преломления и, полностью отражаясь от основания призмы, приводит к возникновению эванесцентной волны (см. рис. 53). Данная волна проникает в тонкую металлическую пленку, нанесенную на основание призмы, и возбуждает поверхностный плазмон. Согласование волновых векторов фотона и плазмона в данной схеме возбуждения осуществляется посредством изменения угла падения излучения (θ). Призма помещается на вращающуюся платформу (наиболее распространенная модель) для того, чтобы изменять угол падения света, т. е. резонансный угол. Свет, отраженный поверхностью золота, измеряется с помощью фотоячейки. В результате получают зависимость отражения (R) света от угла падения. На линейных участках кривой «угол падения (в градусах) — отражение (от 0 до 100 %)» можно проводить времязависимые измерения, например отслеживать кинетику связывания на поверхности металла.

Призменная конфигурация Отто — Кречманна коммерциализирована компанией «Viasore» — пионером в области ППР-сенсоров. Данный ППР-биосенсор работает в режиме углового сканирования, т. е. измеряемым параметром является резонансный угол. Межмолекулярное взаимодействие измеряется в резонансных единицах (англ. *resonance units*, *RU*). Одна единица RU равна $0,0001^\circ$ сдвига положения резонанса, $1000\text{ RU} = 1\text{ пиког/мм}^2$ (соответствует поверхностной плотности связанного с чипом белка или ДНК). Разрешение по показателю преломления БС «Viasore» составляет 10^{-6} – 10^{-7} единиц RIU (англ. *refractive index unit*, *RIU*).

В ППР-транздьюсерах сенсорная золотая поверхность, являющаяся частью проточной ячейки, через которую проходит проба, может быть модифицирована с помощью рецепторных биомолекул (антитела, пептиды, нуклеиновые кислоты и др.). Связывание биомолекул с сенсорной поверхностью осуществляют различными ковалентными и нековалентными методами иммобилизации. Образующийся молекулярный слой (покрытие) способен специфически связывать аналит, при этом он не влияет на эффект ППР. Существуют коммерческие сенсоры без покрытия, их рабочую поверхность можно модифицировать самостоятельно в зависимости от поставленной задачи.

Проба с аналитами инжестируется (вводится) в канал и проходит вдоль поверхности с иммобилизованным рецепторным слоем (см. рис. 53, 54). Ассоциация аналита с биораспознающими молекулами, т. е. реакция специфического взаимодействия лиганд — рецептор, приводит к изменению диэлектрических свойств среды. Сдвиг показателя преломления вблизи сенсорной поверхности усиливается с увеличением массы молекул, связанных с поверхностью. Поэтому если анализируемые объекты имеют большую массу ($>5\text{ кДа}$), то их связывание с модифицированной поверхностью сенсора приводит к значительному изменению показателя преломления в приграничной области.

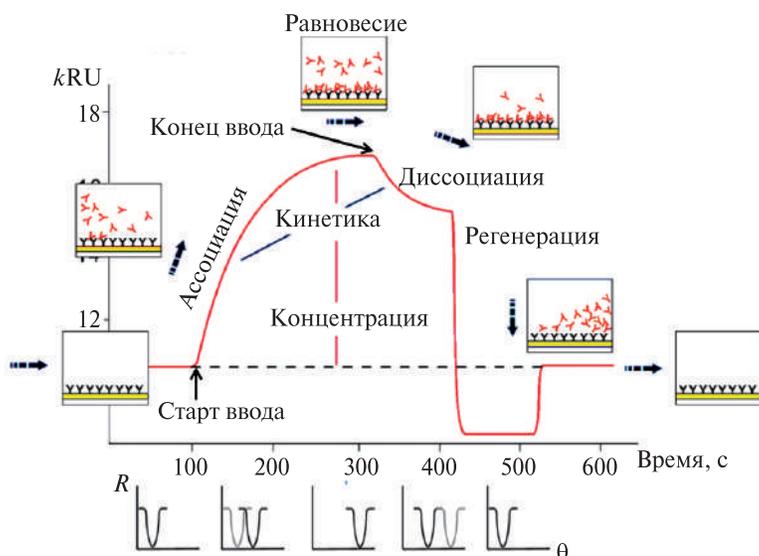


Рис. 54. Типичный вид ППР-сенсограммы, ее можно разделить на четыре фазы: ассоциации, устойчивого состояния или равновесия, диссоциации, регенерации

Ассоциация молекул регистрируется в реальном времени по изменению резонансного параметра (см. рис. 53, 54). Через определенное время пробу вымывают буфером и отслеживают диссоциацию аналита. После окончания измерения сенсорная поверхность обрабатывается регенерирующим раствором, разрушающим образовавшийся комплекс и удаляющим его с поверхности, после чего прибор готов к введению нового образца. Важно проводить регенерацию специальными растворами, но не повреждающими иммобилизованный компонент. Любое изменение взаимодействия на сенсорной поверхности фиксируется сенсором.

Процессы массопереноса между средой и сенсорной поверхностью в ходе образования и диссоциации межмолекулярных комплексов регистрируются в виде зависимости сигнала сенсора от времени (сенсограммы). На основании этих зависимостей можно рассчитать различные параметры реакции (кинетические и равновесные константы реакции комплексообразования, концентрация исследуемого вещества и др.). Данные об изменениях сенсограмм при различных температурах позволяют вычислить термодинамические характеристики реакции (изменения свободной энергии Гиббса, энтальпии и энтропии). Расчет параметров проводят с помощью программ, например, Biacore (BIAevaluation), или других средств по формулам. Например:

$$R = R_0 e^{-k_d(t-t_0)} + offset,$$

где R – значение сигнала при значении времени t ; R_0 – значение сигнала в начале участка диссоциации (при значении времени t_0); $offset$ – фоновый уровень сигнала; k_d – кинетическая константа диссоциации.

При анализе межмолекулярных взаимодействий между аналитом, находящимся в растворе, и биокомпонентом (рецептором), иммобилизованным на по-

верхности, важно учитывать стадии, лимитирующие массоперенос при связывании. Это может наблюдаться, когда связывание аналита с рецептором происходит быстрее, чем диффузия аналита из массы раствора к рецептору на поверхности. То же явление приводит к увеличению повторного связывания аналита на стадии диссоциации, так как диссоциированный аналит может снова связаться с рецептором, прежде чем диффундирует в раствор. Этот эффект особенно актуален для больших аналитов (с маленькими скоростями диффузии), а также аналитов, имеющих очень высокие скорости ассоциации (в сравнении со скоростью диффузии). Для минимизации данного эффекта иммобилизуют очень малые количества рецепторов и используют высокие скорости потока, что способствует сокращению толщины неперемешиваемого слоя. Другим вариантом является введение констант скоростей «транспорта масс» в подходящие алгоритмы для гарантии правильности оценки данных о связывании лиганда с рецептором.

ППР-сенсоры на основе оптических волноводов. В данных сенсорах в качестве оптической структуры используют волноводы. Свет распространяется внутри волновода, имеющего высокий показатель преломления, благодаря эффекту полного внутреннего отражения. Если на поверхность такого волновода нанести металлическую пленку, то поле затухающей световой волны возбуждает на внешней границе пленки поверхностные плазмоны.

Чаще всего в качестве волновода в указанных ППР-сенсорах используют оптическое волокно. Существует несколько типов оптоволоконных ППР-сенсоров. В первом роль сенсорного элемента выполняет полированная область оптоволоконна с удаленной оболочкой, на которую нанесена тонкая пленка металла (рис. 55). Во втором типе сенсоров роль сенсорного элемента играет оптоволоконно с сужающимся окончанием, покрытым тонкой пленкой металла. Возбуждение поверхностных плазмонов приводит к изменению интенсивности прошедшего света на определенной длине волны (сенсор с модуляцией интенсивности) или характерному провалу в спектре прошедшего света (сенсор с модуляцией длины волны). Для ППР-сенсоров на основе оптоволоконна, сохраняющего направление поляризации, разрешение по показателю преломления составляет порядка 10^{-6} RIU, что позволяет использовать его для обнаружения биомолекул с концентрацией 10^{-9} М.

ППР-сенсоры данного типа позволяют проводить измерения непосредственно в анализируемом растворе без дополнительного оборудования для подачи аналита в область сенсорного элемента.

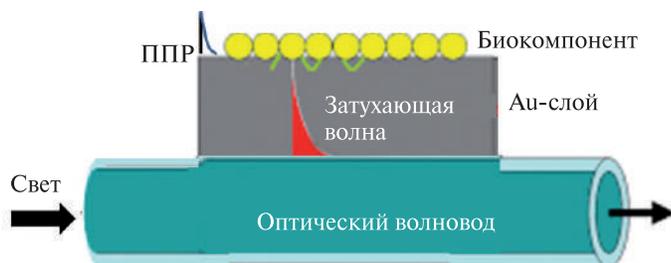


Рис. 55. Схема ППР-биосенсора на основе оптического волокна

ППР-сенсоры на основе металлических (металл-диэлектрических) дифракционных решеток. Вместо сплошных металлических покрытий для возбуждения плазмонов используют металлическую дифракционную решетку с периодом меньше длины волны света. В этом методе излучение падает из диэлектрической среды на металлическую решетку (рис. 56).

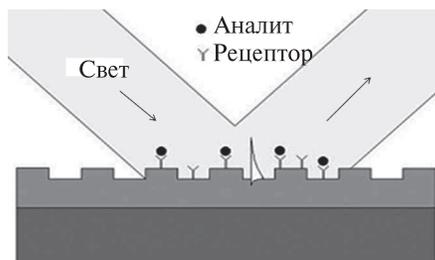


Рис. 56. Схема ППР-биосенсора на основе металлической дифракционной решетки

ППР-сенсоры с дифракционными решетками очень разнообразны: они могут работать как в режиме пропускания, так и в режиме отражения, а возбуждающий свет может падать непосредственно на сенсорную поверхность или с противоположной стороны от нее.

Использование данных оптических элементов позволяет уменьшить как размер сенсора, так и его стоимость. Примером подобного сенсора является сенсор, представляющий набор дифракционных решеток, которые изготовлены на основе полимера и покрыты золотой пленкой. Такой сенсор позволяет производить одновременные измерения в 200 каналах и достигать разрешения по показателю преломления до 5×10^{-6} RIU. Минимальная детектируемая концентрация биомолекул для сенсора данного типа составляет порядка 0,1 нМ.

ППР-сенсоры на основе дифракционных решеток специальной архитектуры позволяют создавать мультиплазмонные системы, т. е. возбуждать большое количество поверхностных плазмонов на разных длинах волн, с различным распределением поля вблизи поверхности наноструктуры. Одновременное использование длинно- и коротковолновых поверхностных плазмонов позволяет увеличить глубину проникновения длинноволновых поверхностных плазмонов и разделить отклики сенсора, обусловленные изменением объемного и поверхностного показателей преломления. Такой сенсор имеет разрешение по показателю преломления 10^{-6} RIU и позволяет детектировать мономолекулярные слои биомолекул, адсорбированных на его поверхности.

МИКРОАНАЛИТИЧЕСКИЕ СИСТЕМЫ: БИОЛОГИЧЕСКИЕ И МИКРОФЛЮИДНЫЕ ЧИПЫ

2.1. БИОЛОГИЧЕСКИЕ ЧИПЫ

Начиная с 90-х гг. XX в. (см. введение) для анализа комплексных проб (клеточные экстракты, смеси белков, кровь, ферментационные бульоны, пробы окружающей среды, наркотики, пищевые продукты и др.) в клинической диагностике, экологии, системе безопасности, биотехнологии, сельском хозяйстве, криминалистике, протеомике, геномике, фармацевтике и других областях науки и практики стали использовать такие микроаналитические системы анализа, как биологические и микрофлюидные чипы.

В настоящее время в мире производством аналитических чипов занимаются более пятидесяти фирм (Abbott Laboratories, Agilent Technologies, Illumina, BioRad Laboratories Inc., PerkinElmer, Roche Holding AG, Oxford Gene Technologies, Fluidigm, Merck, Biacore, CIPHERGEN, Affymetrix и др.). Среди стран лидерами являются США, Канада, Германия, Франция, Великобритания, Китай, Индия, Япония. В России также производят биочипы, такая лаборатория «Биочип-ИМБ» создана на базе Института молекулярной биологии им. В. А. Энгельгардта РАН. Технология аналитических микрочипов стремительно развивается, и рынок оценивается в десятки миллиардов долларов (10 700 млн долл. США в 2017 г.). Предполагают, что он достигнет 41 300 млн долл. США к концу 2025 г., при том что совокупный среднегодовой темп роста составит 18,4 % в период с 2018 по 2025 г.

Стоимость микрочипов для анализа варьируется в зависимости от дизайна и сложности. Например, цена анализа с помощью простого ДНК-чипа может колебаться от 10 до 100 долл. США, хотя исследование всего человеческого генома с помощью сложных биочипов может составлять от 300 до нескольких тысяч долларов. Несложные микрофлюидные чипы (МФЧ) из полидиметилсилоксана стоят в пределах 20–100 долл. США (компания «uFluidix», США), цена сложных по конструкции МФЧ может достигать 3000 евро (компания «microfluidic ChipShop's», Германия). Однако постоянное развитие микро- и нанотехнологий приводит к удешевлению микроаналитических систем, а возможность проводить

с их помощью высокочувствительное мультиплексное определение с малым расходом реактивов делает анализ с их помощью выгодным экономически.

Биологические чипы (БЧ) могут быть двух видов — матричные и жидкостные (суспензионные). Матричный БЧ представляет собой массив молекул на микро-размерной твердой поверхности. Каждая такая молекула является распознающим молекулярным датчиком или зондом (от англ. *probe*). Жидкостный биочип представляет собой суспензию микрочастиц, на поверхности которых иммобилизованы биомолекулы. В качестве молекулярных датчиков в биочипах используют биологические молекулы (олигонуклеотиды, фрагменты геномной ДНК, РНК, белки, полипептиды, антитела, олигосахариды и т. д.), а также биомиметические структуры (аптамеры).

Принцип работы биочипов, как и у биосенсоров, базируется на биоспецифическом распознавании аналитов. Однако в отличие от БС биочип позволяет одновременно анализировать множество различных компонентов в одной пробе (мультиплексный анализ). На биочипах одновременно могут протекать сотни или тысячи биохимических реакций. По сути, БЧ состоит из множества индивидуальных биосенсоров, что позволяет получать различную информацию о составе одной пробы. Достоинство технологии биочипов состоит в том, что тест проводится в формате «один образец — один реакционный объем биочипа», т. е. пробу не нужно разделять на несколько частей и отдельно их анализировать.

В англоязычной биохимической и биотехнологической литературе для обозначения такого массива молекул используют, как правило, термин «микромножество», «био- или биосенсорное микромножество» (англ. *microarray*, *biomicroarray*, *biosensor microarray*), реже — термин «чип» (англ. *chip*). Помимо биологического микромножества, существует также химическое микромножество (англ. *chemical microarray*). В химических чипах в качестве молекулярных зондов служат низкомолекулярные соединения — пептиды, органические молекулы, сахара.

Биочипы по принципу действия близки к электронным микросхемам (чипам), базирующимся на кремниевых микропластинах. Подобно электронным микрочипам биочипы извлекают и обрабатывают огромное количество информации из одной малой пробы на небольшой площади. И те и другие состоят из огромного количества идентичных миниатюрных элементов, размещенных рядом друг с другом, хотя ячейки биочипа по полупроводниковым меркам просто огромны. При этом действие электронного чипа основано на ответе «да/нет», а биочип позволяет выбрать из миллионов или миллиардов возможностей единственно верную. Компьютерный чип производит миллионы математических операций в секунду, но и на биочипе за пару секунд проходят тысячи биохимических реакций.

2.2. ПЛАНАРНЫЕ БИОЧИПЫ, ПРИНЦИП РАБОТЫ, ПОЛУЧЕНИЕ

Планарные (или плоские) БЧ представляют собой твердую матрицу или платформу (например, пластинку из стекла), на поверхности которой рядами расположены ячейки (рис. 57). В каждой отдельной ячейке иммобилизованы зонды (микротесты) с определенной специфичностью. Линейные размеры БЧ

находятся в пределах 5–10 мм (обычно стеклянный или пластмассовый слайд размером 25×75 мм), характерные размеры ячеек лежат в пределах 50–200 микрон с расстоянием между ними от 300 до 500 мкм, общее число ячеек на чипе составляет 10^3 – 10^5 . Объемы отдельной ячейки – от 1 нл до 1 мкл. Значения концентраций анализируемых макромолекул находятся в пределах пикоМ и ниже. Данные микросистемы не содержат интегрированных детектирующих систем, для обработки результатов используют отдельные специальные приборы и устройства.

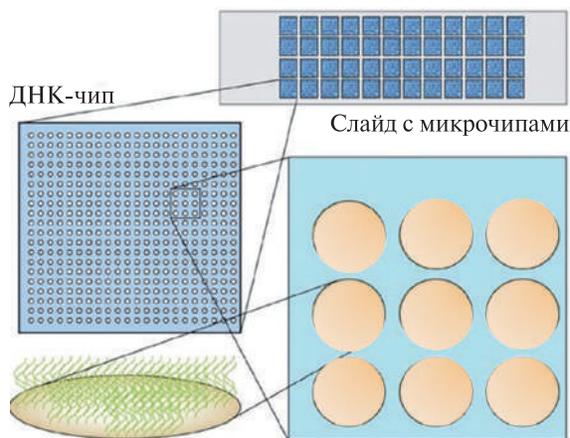


Рис. 57. Схематичное изображение ДНК-чипа

Принцип работы биочипа, как указано выше, основан на биоспецифическом распознавании анализируемых молекул молекулами-зондами, нанесенными на чип. Это распознавание построено либо на высокоспецифичном взаимодействии рецепторов с лигандами (например, антител с антигенами), либо на гибридизации комплементарных цепей ДНК.

По виду молекулярного зонда различают ДНК-, белковые, углеводные чипы.

В отличие от классического биосенсора БЧ позволяют одновременно анализировать множество различных аналитов в одной пробе. Однако БЧ в отличие от БС часто не могут быть повторно регенерированы (за немногим исключением). Кроме того, после молекулярного распознавания целевых молекул на чипе необходимы дополнительная стадия для детектирования (например, добавление меченых антител) и часто стадия разделения (т. е. нужно отмыть несвязавшийся материал).

В матричных микрочипах реализованы топологические принципы повторяющихся кодированных распознающих площадок микрометровых размеров (т. е. по пространственному расположению зондов, обычно организованных в двумерные сетки). Группы одинаковых молекул занимают определенные ячейки с соответствующими координатами, каждая из групп «узнает» определенное специфическое вещество. Например, в какой-то позиции $\langle x_1, y_1 \rangle$ находятся зонды для анализа вируса СПИДа, в другой $\langle x_6, y_6 \rangle$ – вируса гриппа. При нанесении пробы в случае наличия соответствующего аналита происходит специфическая реакция на микроплощадке, ведущая к изменению ее характеристик, что регистрируется внешними детектирующими системами. На эффективность анализа оказывают

влияние такие параметры, как размер и морфология микрочастицы, емкость иммобилизованного лиганда, фоновый сигнал.

Поскольку на БЧ одновременно могут осуществляться сотни различных биохимических реакций, то они позволяют проводить быстрый скрининг большого числа различных соединений в одном образце. Именно возможность параллельного проведения огромного количества специфических взаимодействий анализов с зондами определяет высокую эффективность биочипов.

Детектирование биоспецифических взаимодействий, происходящих на матричных биочипах, осуществляется с помощью различных детектирующих систем — флуоресцентных, хемилюминесцентных, электрохимических и масс-спектрометрических.

Оптические методы детектирования доминируют для биочипов. Это могут быть прямые методы обнаружения связавшегося с зондом аналита (например, интерферометрия, ППР) либо непрямые, базирующиеся на применении меченых реагентов.

Флуоресцентное и хемилюминесцентное детектирование базируется на использовании меток, веществ-маркеров, которые присоединяются к биомолекулам. Флуоресцентная маркировка обычно дешевле и менее сложна, чем радиоактивная или хемилюминесцентная. К тому же использование флуорофоров позволяет маркировать два (или, возможно, более) образца разными цветами и анализировать их смесь с помощью одного чипа. В качестве маркеров используют различные органические флуорофоры — флуоресцеин (в виде изотиоцианатного производного, FITC), флуоресцентные растительные белки (РЕ и АРС) и более часто цианиновые красители Су3 и Су5 (в виде N-гидроксисукцинимидных эфиров). Красители Су3 и Су5 содержат в структуре два индолениновых кольца по обоим концам полиметиновой цепочки, в их обозначении Су означает «цианин», а цифра — число атомов углерода между индолениновыми группами. Флуорофор Су3 имеет следующие спектральные характеристики: $\lambda_{\text{возб}}/\lambda_{\text{эм}} = (512)550/(570)615$ нм, $\epsilon = 1,3 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{см}^{-1}$, квантовый выход 0,14. Краситель Су5 обнаруживает флуоресценцию при большей длине волны $\lambda_{\text{возб}}/\lambda_{\text{эм}} = (625)650/670$ нм, $\epsilon = 2,5 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{см}^{-1}$, квантовый выход 0,18.

Детектирование с использованием меченых реагентов может осуществляться двумя способами. В первом случае метку присоединяют к молекулам аналита, процедура маркирования происходит по стандартизированным методикам. В другом случае детектирование происходит в два этапа, на первом аналит связывается с соответствующим зондом на БЧ и образующийся комплекс визуализируется с помощью дополнительного меченого реагента.

Детекция сигнала осуществляется специально разработанными флуоресцентными сканерами, оснащенными источником света (гелий-неоновые, аргонные лазеры или лазерные диоды), платформой для передвижений (XY-плоскость) и фотоумножительной трубкой в качестве датчика света. Для регистрации флуоресценции также может использоваться микроскоп. Сигналы в массивах обнаруживаются попиксельно, и размер пикселя может быть выбран в диапазоне от 1 до 20 мкм. Например, система детекции компании «Affymetrix» (лазерное конфокальное сканирующее устройство) позволяет регистрировать участки чипа с разрешением в несколько мкм. Система детекции «Genetic Microsystems» имеет

разрешающую способность ~ 10 мкм и чувствительность ~ 1 молекула флуоресцентного красителя на 1 мкм^2 .

Масс-спектрометрическое детектирование основано на прямом анализе аналита без использования маркеров. Тандем МАЛДИ масс-спектрометрии и биочипов привел к созданию такого метода, как времяпролетная масс-спектрометрия с поверхностно-усиленной лазерной десорбцией/ионизацией (ПУЛДИ) (англ. *Surface-enhanced laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry, SELDI TOF MS*).

К *преимуществам* матричных БЧ относятся высокая пропускная способность и параллельный анализ, возможность одновременно снять до 1000 параметров с одного образца, ультравысокая чувствительность, очень малый объем пробы и малая площадь нанесения и анализа пробы, концентрирование пробы, быстрое снятие кинетики взаимодействия.

Недостатки БЧ связаны с тем, что за один раз получают слишком много данных (особенно для ДНК-чипов), поэтому для оценки всех результатов нужно много времени. Результаты могут быть слишком сложными для интерпретации, не всегда воспроизводимыми и достаточно количественными.

Производство планарных биочипов. Традиционно пластины для БЧ производят с помощью микролитографии. В качестве материалов могут быть стекло, кремний, полимерные материалы (нейлон, пластмасса, гель, например, на основе полиакриламида) и даже золото. В последних разработках БЧ стеклянные пластинки заменяются особым образом изготовленными стеклянными бусинками. Матрица может быть пассивной или активной, состоящей из интегрированной электроники или микромеханических устройств, которые выполняют или помогают трансдукции сигнала.

Помимо планарных 2D БЧ, существуют 3D гелевые биочипы, которые представляют собой полусферические капли гидрогеля, фиксированные химической связью на поверхности стекла, пластика или силикона. Элементы микрочипа, гидрогелевые полусферы (диаметром около 100 мкм), находятся на расстоянии 250 мкм друг от друга на гидрофобизованной поверхности стекла.

Важным этапом в производстве БЧ является иммобилизация молекул-зондов на поверхность мембран или пластин. Процесс иммобилизации каждого зонда должен быть пространственно точным (с точностью до мкм) и при этом сохраняющим активность молекул. В результате на пластине получают микромножество молекулярных зондов с высокой плотностью. В зависимости от химических свойств молекул-зондов используют различные методы их иммобилизации непосредственно на поверхность пластины: точечное присоединение (контактный способ, неконтактное печатание) и синтез *in situ*.

Метод синтеза in situ — это высокопараллельный процесс, позволяющий синтезировать на платформе все зонды (блок за блоком) одновременно. Он базируется на принципах фотолитографии (аналогичный метод используется для производства структур в микроэлектронике) и светорегулируемого комбинаторного химического синтеза. Метод широко используется для создания БЧ с олигомерными молекулами (олигонуклеотидами или пептидами) в качестве зондов. Синтез олигомеров, т. е. непосредственное удлинение последовательности (цепочки) на определенном участке чипа, регулируется светом.

Впервые метод опубликован в 1991 г. С. Фодором и соавторами (S. Fodor [et al.]). Авторы описали получение массивов 10-аминокислотных пептидов на твердой подложке и, отдельно, массивов динуклеотидов. В 1994 г. Фодор и другие в компании «Affymetrix» продемонстрировали возможность применения этой технологии для создания массивов ДНК, состоящих из 256 различных октануклеотидов.

Синтез *in situ* основан на использовании фотолитографической маски для управления светом. Изначально получают, например, квадратную кварцевую пластину, на которой равномерно распределены гидроксильные группы. Затем происходит активация поверхности органофункциональными силанами с последующим присоединением линкеров, несущих на свободных концах фотолабильные защитные группы, способные разрушаться под действием света. В случае получения ДНК-чипа это могут быть короткие последовательности, например из 4 нуклеотидов. Фотолабильные группы необходимы для того, чтобы управлять присоединением следующего блока для увеличения олигомерной цепочки.

Синтез множества зондов происходит параллельно. УФ-свет направляется на поверхность пластины через фотомаску с окошками от 18 до 20 мкм², которые соответствуют размерам отдельных элементов (рис. 58). Это позволяет точно определить, какие нуклеотидные цепи будут получать нуклеотид на каждом этапе синтеза. УФ-излучение освещает через окошки линкеры с фотолабильной группой и снимает защиту. После этого на пластину наносится раствор, содержащий один тип дезоксирибонуклеотида со съёмной защитной группой. Данный нуклеотид присоединяется к активированным линкерам, т. е. происходит удлинение олигомерной цепочки (рост зонда). На следующем этапе синтеза поверх пластины накладывают другую маску, чтобы обеспечить следующий раунд снятия защиты и связывания. И так процесс повторяется многократно. В среднем каждый зонд длиной в 25 нуклеотидов требует около 100 различных масок на пластину.

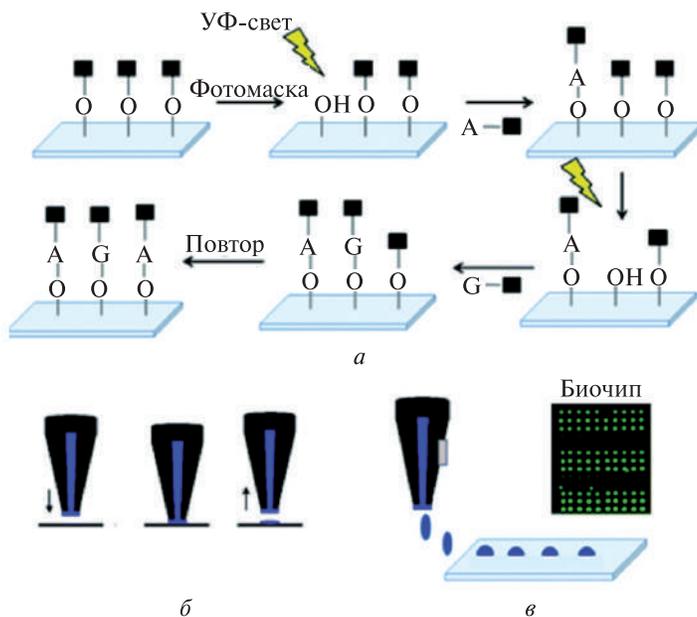


Рис. 58. Методы получения биочипов: а – синтез *in situ*; б – контактный способ; в – бесконтактный способ

Более гибким вариантом синтеза *in situ* является техника с использованием вместо фотомасок небольших зеркал (аналогичных тем, которые используются в видеопроекторах компьютерных систем), предложенная в 2002 г. (Nimblegen Systems Inc.). Цифровое устройство, состоящее из 600×800 множества микрозеркал, формирует виртуальную маску для управления светом при синтезе. Это позволяет изготавливать нестандартные массивы в небольших объемах при гораздо меньших затратах, чем фотолитографическими методами с использованием масок для направления света (которые дешевле при крупносерийном производстве).

Метод иммобилизации, основанный на синтезе *in situ*, позволяет получить микромножества с чрезвычайно высокой плотностью, а также дает возможность более или менее точно задать последовательность олигомерных молекул. Например, технология «GeneChip» компании «Affymetrix» создает массив с сотнями тысяч различных зондов, при этом между спотами (от англ. *spot* – пятно, зона на поверхности) почти нет пространства, а их размер менее 10 мкм. При этом такое производство является масштабируемым, потому что не количество зондов, а их длина определяет число необходимых стадий синтеза. К недостаткам метода можно отнести то, что он требует значительного времени и расходов для дизайна/изготовления фотомасок, весь процесс должен быть выполнен в чистом помещении с использованием дорогого оборудования. Кроме того, могут быть синтезированы только короткие олигомеры (например, олигонуклеотиды максимум в 25 оснований).

Метод точечного присоединения состоит в том, что на поверхность пластины наносятся предварительно синтезированные олигомеры с помощью соответствующего печатающего устройства, и их связывание с поверхностью происходит подходящим физическим, аффинным или химическим (ковалентная пришивка) методом иммобилизации.

Физическая адсорбция осуществляется на различные поверхности – полистирольные или покрытые другим полимером, стеклянные, содержащие катионные группы (например, amino). Для ковалентной пришивки поверхность платформы предварительно модифицируется для получения на ней активных функциональных групп (альдегидной, сукцинимидной, малеимидной и др.). При этом иммобилизуемая молекула может быть неизменной или предварительно преобразованной. Аффинная иммобилизация базируется на высокоспецифичных биохимических взаимодействиях (например, авидин/биотин, гистидин-тэг/ Ni^{2+} -нитрилоуксусная кислота). В этом случае поверхность предварительно модифицируется одним связывающим партнером, а иммобилизуемые молекулы – другим.

Например, присоединение нуклеиновых кислот на твердые поверхности может осуществляться за счет электростатических взаимодействий. Если поверхность функционализирована аминогруппами, то при нейтральном значении pH протонированные аминогруппы (NH_3^+) будут образовывать ионные связи с отрицательно заряженными фосфатными группами ДНК. Если поверхность функционализирована альдегидными группами, то ДНК, модифицированная аминогруппами, присоединится к ней за счет образования ковалентных связей.

При иммобилизации белков важно предотвратить их денатурацию, т. е. сохранить конформацию макромолекул и, следовательно, их свойства. При созда-

нии белковых чипов часто используют сайт-специфическое присоединение. Для этого в молекулу белка в определенном положении вводят уникальную активную группу, которая реагирует с комплементарной группой, ранее привитой на поверхность чипа. Реакции между этими группами высокохемоселективны и протекают при физиологических условиях (приемы клик-химии). Такие уникальные активные группы могут быть непосредственно встроены в иммобилизуемые белки с использованием стандартных методов рекомбинантной экспрессии.

Метод точечного присоединения биомолекул на пластину чипа осуществляют различными способами, предложенными в середине 90-х гг. XX в. При контактном способе игольчатые растры (набор крошечных штырей или микроигл, например, до 946 системы «AgarIt® sets») механического робота, контактируя непосредственно с поверхностью пластины, наносят на нее небольшое количество (порядка субнанолитра) раствора биомолекул (например, 500×10^{-15} моль/мл) (см. рис. 58). Каждая капля раствора образует на поверхности пятно, или спот, количество которых и их размер зависят от фирмы-производителя (например, 200 спотов диаметром 110 мкм или 780 спотов диаметром 130 мкм). Однако контакт с поверхностью является одним из главных недостатков этого метода. Так, фрагменты ДНК достаточно устойчивы и не подвергаются трансформации, когда кончики штырей касаются поверхности. В то же время такие лабильные молекулы, как белки, могут повреждаться в процессе печати.

Для минимизации данной проблемы был разработан бесконтактный способ нанесения зондов (см. рис. 58). Система дозирования базируется на технологии струйного принтера с пьезоприводом (например, пьезоэлектрическая струйная печатающая головка с 126 соплами). На поверхность чипа через капилляры наносятся капли малого объема (порядка 10^{-9} – 10^{-12} л). Бесконтактная печать позволяет создавать чипы с большей плотностью спотов в отличие от контактного метода. Контроль качества нанесения капель осуществляется с помощью специализированной оптики и компьютерного анализа изображения. Данный способ для производства БЧ использует компания «Agilent Technologies».

Метод точечного присоединения более универсален и может быть применен для иммобилизации микромножества почти любых молекул. В данном случае нет ограничений по длине ДНК. К недостаткам относится меньшее разрешение и плотность зондов, чем в случае использования метода, базирующегося на фотолитографии.

В гелевых БЧ иммобилизация происходит в трехмерном объеме геля, что дает ряд существенных преимуществ в сравнении с двумерной плоской поверхностью. В десятки и сотни раз увеличивается емкость биочипа на единицу поверхности и соответственно увеличивается чувствительность измерений. Иммобилизованные макромолекулы как бы фиксированы в гомогенной водной среде, составляющей около 95 % объема геля. Это исключает их взаимодействие как друг с другом, так и с твердой поверхностью, где гетерофазные процессы с участием фиксированных на ней биомолекул протекают более сложным образом. Это особенно существенно для белковых чипов, поскольку молекулы белков имеют тенденцию к денатурации в интерфазе, образованной между твердой поверхностью и водной средой. Иммобилизация в гелевых БЧ (технология второго поколения) состоит из трех этапов: модификации иммобилизуемых биополимеров мономер-

ными группами геля, нанесения раствора этих веществ в смеси с мономерными звеньями геля с помощью игольчатого или пьезоэлектрического робота и, наконец, фотоиндуцированной сополимеризации свободных и связанных с биополимерами молекул мономера. Это приводит к равномерной иммобилизации веществ во всем объеме геля.

2.3. ДНК-ЧИПЫ

В настоящее время основная доля производимых в мире планарных биочипов – ДНК-чипы, т. е. матрицы, несущие фрагменты молекул ДНК. ДНК-чипы представляют собой уникальный аналитический инструмент, позволяющий определять наличие в анализируемом образце заданных последовательностей ДНК. Впервые ДНК-чипы были использованы в исследованиях в конце 1980-х гг. В настоящее время выпускаются ДНК-чипы с различным количеством зондов, так, ДНК-чипы компании «Affimetrix» содержат 10^6 зондов на поверхности с площадью $1,28 \text{ см}^2$, «NimbleGen» – $2,1 \times 10^6$ зондов на чипе. ДНК-чипы позволяют обнаружить 10^{-16} – 10^{-18} М.

В основе работы ДНК-чипов лежит принцип гибридизации, основанный на комплементарных взаимодействиях основания аденина (А) с тиминном (Т) и гуанина (G) с цитозином (С) в двух цепочках ДНК. Если последовательность оснований в одной цепи ДНК (или олигонуклеотида) полностью комплементарна последовательности другой цепи, то образуется стабильная двухцепочечная спираль – дуплекс. Присутствие даже одной неправильной пары, например G-G, предотвращает образование дуплекса. Если иммобилизовать в одном из элементов микрочипа специфическую одноцепочечную ДНК или олигонуклеотид, то при добавлении к микрочипу комплементарных фрагментов ДНК/РНК будет происходить их высокоспецифичное взаимодействие. Заданный олигонуклеотидный элемент биочипа специфически свяжет только одну комплементарную последовательность из $4^{20} = 1,09 \times 10^{12}$ всех возможных последовательностей этой длины в ДНК. Так, один элемент биочипа производит одну выборку примерно из триллиона возможных вариантов.

Наиболее часто ДНК-микрочипы применяют для изучения экспрессии генов с целью определения их функции и состояния клеток, поиска генетических мутаций.

Принцип работы микрочипа для изучения экспрессии генов состоит в следующем. Активная работа гена в каждой клетке выражается в накоплении его матричной РНК (мРНК) в соответствии с типом клетки, биологическими процессами, нормальным или патологическим состоянием и т. д. Из образца выделяют все мРНК, для этого, как правило, используют соответствующие коммерческие наборы. Далее с помощью фермента обратной транскриптазы на них синтезируются первые цепи комплементарной ДНК (кДНК) (реакция обратной транскрипции), которая значительно устойчивей и удобней в работе, чем мРНК. Содержание индивидуальных кДНК в образце прямо пропорционально содержанию их мРНК-матриц и, следовательно, уровню активности соответствующих генов. Количество последовательностей кДНК в образцах может быть многократно увеличено в процессе амплификации методом ПЦР (увеличение коли-

чества копий ДНК). Иногда требуется еще один этап транскрипции с кДНК (для чипов, работающих с РНК), когда синтезируют комплементарную РНК (кРНК) с использованием ДНК в качестве матрицы.

Существует несколько различных способов маркирования целевых молекул флуоресцентными метками. Введение метки может происходить в процессе синтеза кДНК или кРНК путем использования нуклеотидов, содержащих флуоресцентную метку, либо биотин-модифицированных нуклеотидов, которые потом окрашиваются флуоресцентно-меченым стрептавидином.

В качестве альтернативы краситель может быть добавлен в два этапа. Первоначально на стадии синтеза кДНК вводится аминокислотомодифицированный нуклеотид (например, 5-(аминоаллил)-2'-дезоксидеоксиридин-5'-трифосфат, AA-dUTP). В результате полученная модифицированная аминокислотой ДНК может быть помечена любым аминокислотным красителем. Обычно для этого используют N-гидроксисукцинимидные эфиры флуорофоров. Хорошее соотношение — это метка на каждые 60 оснований, поэтому флуорофоры не слишком близко расположены друг к другу, что может привести к эффекту гашения. Данный двухстадийный метод приводит к высокой степени однородности маркировки ДНК, которую трудно получить другим способом. Это повышает чувствительность и воспроизводимость анализа с помощью ДНК-чипа.

Полученные образцы через микроскопическое отверстие наносят на ДНК-микрочипы и инкубируют некоторое время, чтобы произошла гибридизация, в ходе которой одна из цепей кДНК присоединяется к комплементарной ей цепи, имеющейся на микрочипе. После окончания процесса гибридизации чипы промываются для удаления остатков материала. После этого производят сканирование микрочипа при помощи лазера, который вызывает возбуждение флуоресценции меток, регистрируемой, например, на сканирующем конфокальном микроскопе. На выходе получаются одно- или двухцветные изображения (в зависимости от количества использованных красителей). Далее оценивают полученный массив данных — значения интенсивности свечения каждого конкретного сайта микрочипа. Используя самые различные математические методы сравнения, определяют сайты чипа, где прошла гибридизация, и, значит, устанавливают последовательность ДНК/РНК из образца.

Для анализа экспрессии генов используют микрочипы двух типов: на основе комплементарной ДНК и олигонуклеотидных зондов. Микрочипы на основе кДНК представляют собой фрагменты ДНК (300–1000 оснований), закрепленные на поверхности чипа. В олигонуклеотидных микрочипах на подложке иммобилизованы олигонуклеотиды длиной 25–70 нуклеотидных оснований. Переход к олигонуклеотидным чипам стал возможен благодаря увеличению количества общедоступной информации о последовательности ДНК. Кроме того, применение таких чипов способствует увеличению специфичности для предполагаемой мишени связывания, поскольку олигопоследовательности можно конструировать для нацеливания на узкую область гена, наиболее отличную от других генов.

В экспериментах с олигонуклеотидными микрочипами часто используют для мечения образца флуоресцентную метку одного типа, а уровни экспрессии генов определяют, сравнивая получаемые флуоресцентные сигналы с сигналами внутренних контрольных точек микрочипа.

При работе с микрочипами на основе кДНК в эксперименте используют два образца (рис. 59). Как правило, контрольная проба (здоровая ткань) маркируется одним флуорофором, например Су3, а исследуемая проба (больная ткань) – другим, например Су5. Далее обе пробы смешиваются и наносятся на поверхность чипа. При добавлении анализируемого образца происходит гибридизация комплементарных цепей ДНК – зонда и мишени. Затем чип сканируется для визуализации флуоресценции двух флуорофоров, возбуждение которых осуществляется лазерным лучом при различных длинах волн. По цвету флуоресценции и по соотношению интенсивности эмиссии двух флуорофоров в каждой ячейке микрочипа судят о повышении или понижении уровня экспрессии данного гена. Красный – если ген экспрессируется только в больной ткани, то в данной ячейке будет гибридизоваться только ДНК, меченная красным красителем (Су5). Зеленый – если ген экспрессируется только в здоровой ткани, то в данной ячейке будет гибридизоваться только ДНК, меченная зеленым (Су3) флуорофором. Желтый – если ген экспрессируется и в больной (Су5), и в нормальной (Су3) ткани, то в данном пятне будет гибридизоваться ДНК, меченная и красным, и зеленым красителями, в результате получится желтый цвет. Черный – если ген не экспрессируется ни в больной, ни в здоровой ткани.

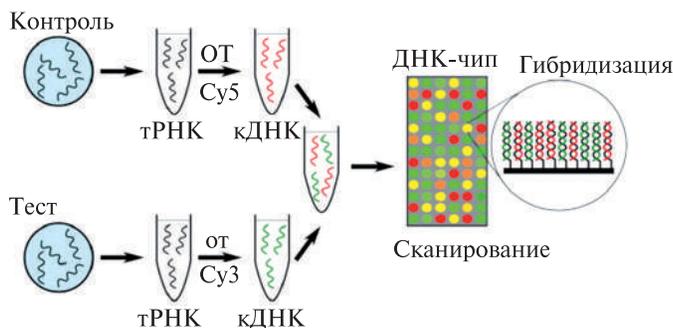


Рис. 59. Схема работы микрочипа на основе кДНК (ОТ – реакция обратной транскрипции)

ДНК-чипы позволяют одновременно анализировать информацию об экспрессии многих тысяч генов. Они в сочетании с иммунопреципитацией хроматина применяются также для определения сайтов связывания факторов транскрипции. ДНК-чипы «Affymetrix» и «Illumina» широко используют для установления мутаций генов. Для этого анализа используют геномную ДНК (гДНК). Гены (участки ДНК) могут отличаться друг от друга на одно нуклеотидное основание. Различие между двумя последовательностями ДНК в один нуклеотид известно как однонуклеотидный полиморфизм (англ. *single nucleotide polymorphism*, *SNP*). Причиной SNP являются точечные мутации. В биомедицинских исследованиях SNP используют для сравнения участков генома между исследуемыми группами, например, одна группа – люди с определенным заболеванием, а другая – без него.

В целом ДНК-чипы обеспечивают большой объем информации. Когда данная технология начала интенсивно применяться, быстро стало очевидно, что для того чтобы другие могли воспроизвести конкретный эксперимент с микрочипами, необходимо получить подробное описание состава микрочипа, иссле-

двумя образцами, протоколов и методов анализа результатов. Кроме того, стало ясно, что доступ к необработанным и обработанным данным позволит другим исследователям выполнять анализ и метаанализ (по комбинациям данных). Для решения этих проблем члены Общества микрочиповых данных по экспрессии генов (англ. Microarray Gene Expression Data, MGED)», созданного в 1999 г. и в 2010 г. переименованного в Общество данных функциональной геномики (англ. Functional Genomics Data Society, FGED), создали стандарты MIAME (минимальная информация об эксперименте с микрочипами) для обмена результатами в этой области. Эти усилия привели к созданию общедоступных баз данных, полученных с помощью ДНК-чипов.

ДНК-чипы используют в медицине для диагностики различных заболеваний (оспа, холера, гепатит, СПИД, венерические заболевания, другие особо опасные инфекции, вирусологического анализа донорской крови и т. д.), для определения концентрации канцерогенных веществ в продуктах питания, мониторинга окружающей среды, в ветеринарии и др.

Например, в России создан ДНК-чип «ТБ-Биочип» для диагностики туберкулеза, который разрешен к применению в медицинской практике страны. Для диагностики с помощью такого чипа достаточно нескольких часов, тогда как выращивание микобактерий на средах с разными противотуберкулезными препаратами занимает 2–3 месяца.

Одно из практических применений ДНК-чипов – это фармакогеномика, т. е. выяснение корреляции между экспрессией генов и эффективностью и токсичностью лекарств. Первым фармакогенетическим тестом на основе микрочипов, одобренным для клинического использования, является чип «AmpliChip CYP450» от швейцарского фармакологического концерна «Roche Diagnostics» (Basel). Данный чип, базирующийся на сочетании технологий ПЦР и микрочипов «Affymetrix», был одобрен для витродиагностического использования в США и Европе. Биочип анализирует мутации двух генов CYP2D6 и CYP2C19, играющих важную роль в усвоении примерно четверти всех продаваемых по рецепту медикаментов (антидепрессанты и средства, снижающие кровяное давление). С помощью «AmpliChip CYP450» можно заранее определить, насколько эффективным будет тот или иной препарат для данного пациента и какие побочные реакции он может у него вызвать. В настоящее время, например, только в США непереносимость медикаментов является четвертой по значимости причиной смерти (~100 тыс. летальных исходов в год) и пятой по значимости причиной заболеваний, что приводит к 2,2 млн госпитализаций ежегодно. Текущие расходы, связанные с этими факторами, оцениваются в 177 млрд долл. США ежегодно.

Другим аспектом применения ДНК-чипов в фармацевтике является создание новых эффективных лекарств. Например, сравнительный анализ генов от больной и нормальной клетки поможет определить биохимическое строение белков, синтезируемых больными генами. Такая информация может быть использована для синтеза лекарств, способных эффективно снижать действие этих белков.

Технология ДНК-чипов обеспечивает надежную платформу для исследования воздействия токсинов на клетки и их передачи потомству. Токсикогеномика устанавливает корреляцию между реакциями на токсиканты и изменениями в генетических профилях клеток, подвергшихся воздействию таких токсикантов.

2.4. БЕЛКОВЫЕ ЧИПЫ

В белковых чипах в качестве распознающих зондов используют полипептиды и различные белки, как природные, так и рекомбинантные, полученные методами генной инженерии. С их помощью можно анализировать как макромолекулы – НК, белки, полисахариды, так и низкомолекулярные соединения (лекарства, гормоны, аллергены, наркотики и т. п.), а также целые клетки. В основе принципа действия белковых БЧ лежит и способность биологических молекул к высокоспецифичному молекулярному узнаванию.

Создание белковых чипов в сравнении с ДНК-чипами сопряжено с рядом сложностей, обусловленных физико-химическими свойствами белков. Во-первых, белки в отличие от ДНК химически и структурно более сложные и разнообразные. Если молекулы ДНК/РНК представляют собой сравнительно однородные цепи, состоящие из нуклеотидов четырех типов, а правила специфического распознавания комплементарных цепей относительно просты, то полипептидные цепи строятся из 20 разных аминокислот, а правила пространственного молекулярного узнавания весьма сложны. Это затрудняет разработку единой для всех белков стратегии их иммобилизации и детектирования. Во-вторых, не существует метода, который позволял бы размножить искомую молекулу белка, как это можно сделать методом ПЦР для ДНК. В-третьих, в отличие от ДНК функционирование белков зависит от их третичной и четвертичной структур. Основой этих структур является сбалансированная система электростатических сил, водородных связей, гидрофобных и вандерваальсовых взаимодействий. В отличие от ДНК белки легче теряют их биохимическую активность вследствие денатурации, дегидратации или окисления. Кроме того, ~50 % белков не растворимы в воде или структурно нестабильны.

В отличие от ДНК-чипов количество зондов в белковых чипах гораздо ниже и составляет порядка нескольких сотен или тысяч молекул на 1 см^2 . Иммобилизация белков может осуществляться в результате физической адсорбции или ковалентного связывания.

Белковые чипы подразделяют на аналитические и функциональные.

Функциональные белковые микрочипы (также известные как массивы целых белков) создаются путем иммобилизации большого количества очищенных полноразмерных функциональных белков или белковых доменов (рис. 60). Важная веха в развитии и практическом применении функциональных белковых чипов – опубликованная в 2000 г. работа Шрайбера и коллег (G. MacBeath and S. L. Schreiber), в которой была продемонстрирована возможность создания микрочипов из полноценных белков без существенной потери их молекулярной и функциональной целостности. Исследователи получили белковый чип, иммобилизовав очищенные рекомбинантные белки на альдегид-модифицированные предметные стекла, и использовали его для анализа белок-белковых взаимодействий и киназа-опосредованного фосфорилирования иммобилизованных белков. Почти одновременно было продемонстрировано использование белкового чипа с 6 тыс. зондами (H. Zhu [et al.], 2000 г.) для определения субстратной специфичности протеинкиназ у дрожжей. С тех пор применение функциональных белковых микрочипов в фундаментальных исследованиях, а также в клиниче-

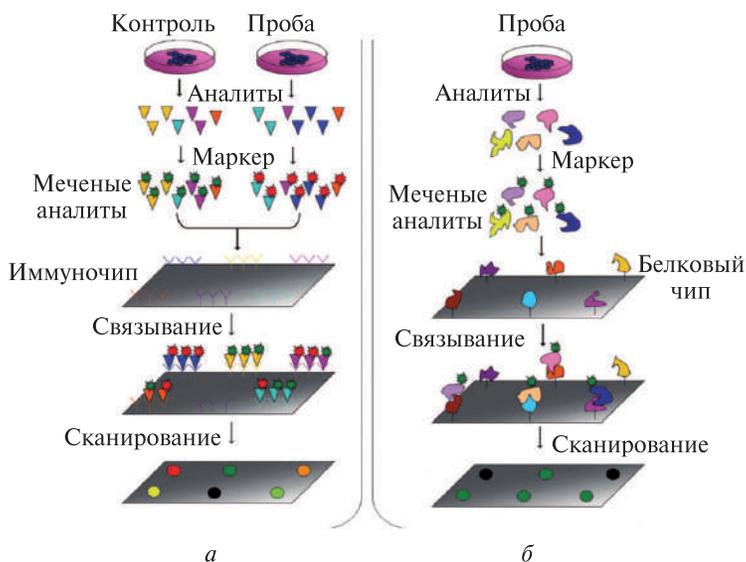


Рис. 60. Схема анализа с помощью аналитического (а) и функционального (б) белковых микрочипов

ской диагностике быстро растет. Биочипы этого типа используются для изучения биохимической активности протеома, включая взаимодействия белков с ДНК, РНК, другими белками, фосфолипидами или небольшими молекулами (например, лекарствами). Они позволяют изучать многие посттрансляционные модификации белков (т. е. фосфорилирование, ацетилирование, убиквитилирование, S-нитрозилирование) в широком масштабе, что крайне важно для понимания синтеза и функций клеточного протеома.

Аналитические чипы представлены в основном иммунологическими чипами. *Иммуночипы* были исторически первыми и составляют основную долю среди белковых чипов. Распознающими зондами в данных БЧ являются антитела (Ат). Это могут быть антитела (иммуноглобулины), которые получают путем иммунизации животных, или их аналоги, полученные генно-инженерными методами (например, аффибоды, аптамеры). В основе функционирования иммуночипа лежит иммунохимическая реакция между антителом (рецептор) и антигеном (лиганд) с образованием комплекса антитело – антиген (Ат • Аг) (см. раздел 1.2.3).

В аналитическом иммуночипе иммобилизуют различные антитела (зонды), позволяющие оценить много компонентов при анализе одной пробы, которая инкубируется на чипе (см. рис. 60). Такой формат анализа называют *прямым*, а чипы – *с прямой фазой* (рис. 61). Детектирование осуществляется преимущественно с использованием флуоресцентных маркеров, для этого используют различные методы. Доступные сегодня коммерческие иммуночипы позволяют детектировать до 100–200 антигенов в образце одновременно, например, «Serum Biomarker Chip» детектирует 120 сывороточных белков и пептидов. Предел обнаружения иммуночипов с использованием меченных флуорофором Ат может составлять 10^{-13} – 10^{-16} М.

В *обратном* формате на чип иммобилизуется много образцов (например, клеточные или тканевые лизаты) и высокоспецифичные меченые антитела ис-

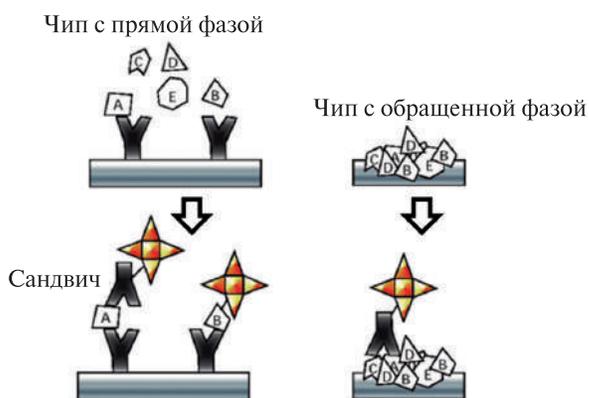


Рис. 61. Схема анализа с помощью аналитического белкового микрочипа с различными фазами

пользуют для оценки одного параметра для всех иммобилизованных образцов (например, присутствие какого-то белка во всех пробах) (см. рис. 61). Анализы с помощью чипа с *обращенной фазой* в основном применяют при разработке лекарств или скрининге молекулярных маркеров. Этот тип микрочипов был впервые создан в 2001 г. (С. Paweletz [et al.]) для мониторинга гистологических изменений у пациентов с диагнозом рак простаты. Белковые микрочипы с *обращенной фазой* обладают высокой чувствительностью и точностью, позволяют проводить количественную оценку низких концентраций модифицированных форм белков (например, оценить фосфорилирование белков, что является широко распространенным способом регуляции активности ключевых белков клетки).

Маркировку в иммуночипах осуществляют преимущественно двумя методами. В первом случае проба (белки) предварительно маркируется флуорофором и затем наносится на чип (см. рис. 60). Для маркировки белков, как и ДНК, используют модифицированные флуорофоры Су3 и Су5. Красители, как правило, содержат N-гидроксисукцинимидную или малеимидную группу, реагирующую соответственно с amino- или сульфгидрильной группой остатков лизина или цистеина. Применение двух красителей дает возможность окрашивать два разных образца и анализировать их смесь на одном чипе. Это повышает точность и надежность анализа, так как устраняет ошибки в оценке данных, которые возникают при проведении анализа проб в различных экспериментальных условиях.

В целом флуоресцентная маркировка образца непосредственно влияет на качество анализа и требует тщательной оптимизации для достижения наилучшего соотношения сигнал/шум (S/N). Для повышения отношения S/N образец может быть маркирован биотином и затем инкубирован со стрептавидином, меченным флуорофором. При этом следует помнить, что маркировка белков-мишеней может мешать взаимодействию антитело – антиген. Недостаточная процедура маркировки приводит к снижению чувствительности анализа, тогда как чрезмерная дает высокий фоновый сигнал. Наличие одного распознающего антитела не всегда позволяет различить специфическое и неспецифическое связывание на чипе.

Специфичность анализа значительно повышается при проведении детектирования с помощью вторых антител, конъюгированных с флуорофором (так называемый сандвич-метод), так как в этом случае протекают две реакции связывания аналита. В этом случае пробу наносят на иммуночип. Искомый аналит

(антиген) специфично связывается с антителом, иммобилизованным на поверхности биочипа, образуется комплекс $Ag \cdot At$ (см. рис. 60, 61). Несвязанные молекулы отмывают и чип инкубируют с детектирующими мечеными антителами (At^*), которые связываются с другим участком (эпитом) анализата (антигена). При этом образуется сэндвич $At \cdot Ag \cdot At^*$ (см. рис. 61). Сигнал может быть дополнительно усилен при использовании репортерной системы биотин — стрептавидин. Недостатком сэндвич-метода является то, что на его основе трудно проводить крупномасштабный мультиплексный анализ (т. е. >30 антигенов) из-за необходимости наличия двух полных наборов антител для каждой мишени и увеличения вероятности перекрестной реактивности между мечеными антителами и неспецифическими элементами массива по мере увеличения числа мишеней.

Сравнение результатов определений, выполненных с использованием современных иммуночипов, с данными классического иммунофлуоресцентного или иммуноферментного анализа показывает, что чувствительность белковых БЧ примерно на два порядка выше.

Поскольку процессы маркировки могут влиять на активность белка, разрабатывают методы детектирования без маркировки. К таким методам относятся спектроскопия ППР, оптическая визуализирующая эллипсометрия и рефлектометрическая интерференционная спектроскопия, способные регистрировать крайне малые изменения локального показателя преломления при поверхностном связывании в тонком слое (например, в массиве антител при их взаимодействии с анализатами). Данные методы позволяют проводить измерения в реальном времени для мониторинга динамики межмолекулярных взаимодействий. Такие методы особенно полезны для анализа биологических образцов, содержащих множество неизвестных биомаркеров, и где маркировка нежелательна, а вторичные антитела могут быть недоступны. Применение МАЛДИ масс-спектрометрии и атомной силовой микроскопии также дает возможность детектировать изменения на БЧ без использования маркированных реагентов.

Области применения белковых чипов разнообразны. Их используют для идентификации мишеней различных лекарственных средств, для оценки потенциальной эффективности и токсичности препаратов в доклинических испытаниях. В рамках изучения протеома человека белковые чипы дают возможность исследовать все белки, характерные для данного организма, изучить их связывание с другими белками, липидами, ДНК, различными лигандами. Использование таких чипов для изучения сигнальных и биохимических путей, иммунного ответа дает возможность понять молекулярные механизмы функционирования организма в норме и при патологии.

Белковые микрочипы нашли применение в клинических исследованиях и диагностике, например для идентификации биомаркеров. Обнаружение последних позволяет оперативно выявить инфекции или диагностировать заболевание. Созданы различные белковые микрочипы для одновременного определения нескольких маркеров онкологий. Новая тенденция в области применения данных устройств относится к установлению с их помощью взаимодействий между протеомом «хозяина» (например, человека) и патогенным фактором (микробы, вирусы). Эта идея особенно подходит для изучения взаимодействий вирус — хозяин, поскольку после проникновения в клетки хозяина патоген может захватывать/эксплуатировать пути и механизмы хозяина для собственной репликации.

2.5. СУСПЕНЗИОННЫЕ БИОЧИПЫ

В последние годы наравне с планарными БЧ находят применение надежные и гибкие аналитические системы, основанные на использовании кодируемых микроносителей. Такая система представляет собой суспензию микросфер (англ. *bead*) с иммобилизованными на ней зондами, способными распознавать аналиты в растворе. Микросфера, несущая распознающую биомолекулу, называется биоконъюгатом. Данные аналитические системы получили название суспензионных или жидких чипов (англ. *Bead-based assay*).

Особенностью жидких чипов является то, что применяют микросферы различных типов, т. е. они отличаются по цветовому коду, размеру или форме. Существуют различные схемы кодирования частиц. Однако, как правило, используют микросферы со спектральным кодированием, т. е. включение в микросферу для ее идентификации хромофоров, флуорофоров, фотонных структур. Это позволяет получить набор частиц, различающихся цветом. Широкое применение нашли микросферы, кодированные флуорофорами. Такие системы дают возможность получить сигнал (каждая метка для детектирования обеспечивает 10^7 – 10^8 фотонов), при этом он локализован в отличие от некоторых ферментативных схем амплификации (усиление сигнала). Флуоресценция является наиболее чувствительным методом для оптического обнаружения биологических объектов.

С помощью жидких микрочипов, как в случае с классическими планарными, проводят анализ по множеству параметров одновременно, используя микрообъемы пробы.

В настоящее время наиболее популярны жидкие чипы корпорации «Luminex™», основанной в 1995 г., а также компании «Invitrogen» (филиала «Thermo Fisher Scientific»), использующей технологию «Luminex xMAP».

Система «Luminex xMAP» объединяет в себе суспензионный чип, проточный цитометр с набором лазеров и программу для цифровой обработки сигналов. В сущности, это молекулярная диагностическая платформа для одновременного высокопроизводительного и мультиплексного обнаружения до 100 аналитов (белков, НК). В настоящее время она одобрена управлением по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов (англ. *Food and Drug Administration, FDA*) США для клинической диагностики и используется в различных приложениях.

Например, на основе технологии «Luminex xMAP» разработан чип «LiquiChip» (rMLA) (2015 г.) для проведения мультиплексного анализа шести распространенных респираторных вирусов, включая вирус гриппа типа А (FluA) и В (FluB), вирус парагриппа типа 3 (PIV-3), респираторно-синцитиальный вирус (RSV) и человеческий метапневмовирус (MPV), а также потенциально опасный вирус MERS-CoV. Компания «Luminex» производит ряд наборов для клинической диагностики, фармацевтики и исследований в области наук о жизни (например, для инфекционной диагностики заболеваний и обнаружения биологического оружия, иммунодиагностики, профилирования киназ, генотипирования, экспрессия генов и др.).

Основу жидкого чипа «Luminex» составляют полистирольные частицы (диаметр 5,5 мкм), в которые инкорпорированы два органических флуорофора (дли-

ны волн эмиссии 658 и 712 нм) при десяти различных уровнях интенсивности флуоресценции, что дает до 100 теоретически доступных кодов. Каждая частица «Luminex» имеет свой цветной код и соответствующий ему номер (рис. 62). Кроме того, микросферы содержат ферромагнетик для упрощения движения частиц при анализе (т. е. для автоматизации процесса). Соотношение красителей тщательно подобрано для каждой микросферы, что делает их легко отличимыми друг от друга при прохождении в анализаторе.

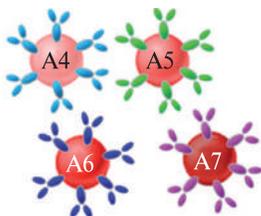


Рис. 62. Кодированные микросферы суспензионного чипа «Luminex xMAP»: каждая полистирольная частица имеет свой цветной код (номер) и несет на поверхности антитела, специфичные к одному конкретному анализу

На поверхности каждой микросферы иммобилизованы биомолекулы (как правило, антитела), специфичные к одному конкретному анализу (см. рис. 62). По существу, каждая микросфера является элементом биочипа, распознаваемым по спектральному коду и несущим на своей поверхности зондовую молекулу в соответствии со своим кодом. Полистирольные частицы содержат на своей поверхности карбоксильные группы (до 100 млн на одну частицу), которые активируются карбодиимидом в присутствии производных N-гидроксисукцинимиды, и затем к ним через аминогруппы присоединяются антитела, полипептиды, белки или олигонуклеотиды.

Микросферы, конъюгированные с различными антителами, можно смешивать для проведения мультиплексного анализа одной пробы. Так, в малом количестве пробы можно детектировать до 100 различных молекул. Недавно «Luminex» создал новую систему «FlexMAP 3D™» – в кодируемые микросферы добавлен третий внутренний флуорофор, что предлагает более высокую степень мультиплексирования (теоретически 500 анализов в пробе) и более высокую пропускную способность. Так, с помощью системы «Bio-Plex Multiplex», использующей технологию «Luminex xMAP», были одновременно количественно определены более 500 различных белков и пептидов-мишеней в одном образце объемом 12,5 мкл.

Надо отметить, что существуют микросферы, кодированные одним флуоресцентным красителем в различных концентрациях, например микросферы (7,5 мкм) фирмы «Becton Dickinson Biosciences», которая продает большое количество мультиплексных иммунотестов, но максимальный уровень мультиплексирования в них составляет менее 10.

Суспензионные чипы «Luminex MagPlex» выпускаются в концентрациях от 2,5 до 12,5 млн микросфер/мл и могут быть заказаны в ампулах 1 мл или 4 мл.

Кодированные микросферы получают путем помещения полистирольных микросфер в органический растворитель для создания в них пор, в которые за счет диффузии вводятся молекулы красителя. Перенос микросфер в водный раствор приводит к сжатию полимера и фиксации молекул красителя в микросферах.

Внедрение красителей с разными спектрами флуоресценции при разных концентрациях (и, следовательно, различными уровнями интенсивности эмиссии) позволило формировать микросферы с уникальными спектральными кодами.

Теоретически доступное количество кодов (C) определяется количеством красителей, включенных в состав полимерных микросфер, и уровнями интенсивности их излучения согласно уравнению

$$C = N^{m-1},$$

где N – количество уровней интенсивности; m – число цветов.

В действительности теоретическое число генерируемых спектрально различными кодами (C) ограничено многими экспериментальными факторами, включая совместимость красителей с растворителем, воспроизводимость процесса легирования и т. д. Получение микрочастиц, оптически кодируемых флуоресцентными красителями, усложняется по мере увеличения количества и концентрации красителей. Небольшие различия в диаметре и составе микросфер также влияют на процесс легирования (введение флуорофоров).

Процедура анализа. В суспензию кодированных микросфер добавляют пробу (объем 10–50 мкл). Присутствующие в пробе искомые аналиты будут взаимодействовать со специфичными им зондами на поверхностях микросфер (рис. 63). Связывание аналита с биоконъюгатом позволяет идентифицировать его, т. е. это качественная стадия анализа. Далее необходимо определить количество аналита. Для этого в водную суспензию добавляют детектирующие специфические молекулы-репортеры (от англ. *reporter molecules*). Обычно это антитела, меченные либо флуорофором фикоэритрином (см. рис. 63), либо биотином. Впоследствии биотин связывается с флуоресцентной меткой при добавлении меченного фикоэритрина стрептавидина. Молекулы-репортеры связываются с уже закрепленным на поверхности микросферы аналитом, образуя своеобразный сэндвич. Только в случае наличия в пробе искомого аналита образуется комплекс кодированная микросфера – аналит – конъюгат с фикоэритрином, который анализируется мультиплексным анализатором.

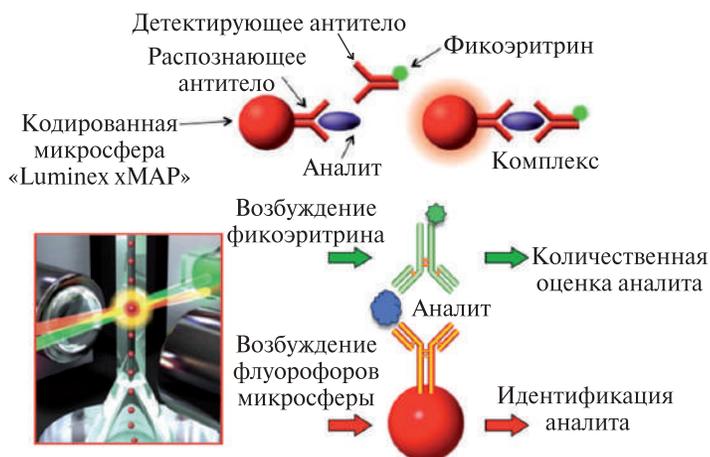


Рис. 63. Схема анализа с помощью иммунологического суспензионного чипа «Luminex xMAP»

Детектирование. В планарных биочипах аналит идентифицируют благодаря его связыванию с зондом, расположенным в определенной (x, y) позиции на поверхности чипа (качественный анализ) (рис. 64). Количественно его содержание можно оценить с помощью меченых реагентов. В жидких чипах детектирование также состоит из двух этапов. Топология на поверхности заменяется тем, что отдельные типы микросфер идентифицируют по их коду (соотношение внутренних флуорофоров). Полученный комплекс микросфера – аналит также детектируют с помощью соответствующих меченых реагентов.

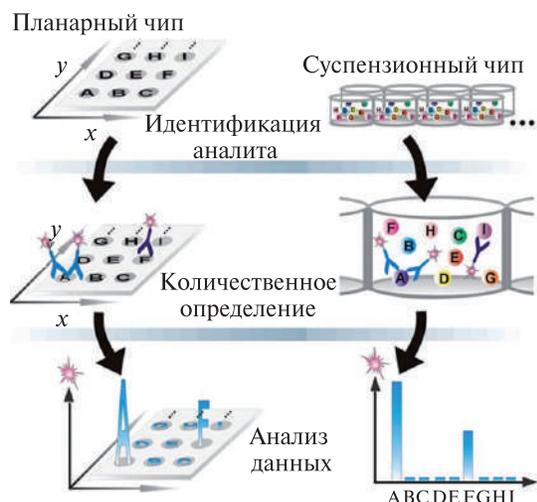


Рис. 64. Схема анализа с помощью планарного или суспензионного чипа.

Обе платформы могут быть применены для мультиплексного анализа.

В планарной системе сигнал связанного аналита определяется по (x, y) координатам на поверхности чипа, в суспензионном – по цветному коду микросферы

Для определения аналитов на планарном чипе, кроме флуоресценции, могут быть использованы и другие методы, например масс-спектрометрия или ППР-спектроскопия. В суспензионных чипах детектирование базируется преимущественно на флуоресценции. Для считывания данных применяют флуоресцентную микроспектроскопию или проточную цитометрию.

Лазерная сканирующая конфокальная микроскопия позволяет мультиспектральные исследования с высокой степенью разделения сигналов от разных флуорофоров. Для этого спектрально кодированные микросферы осаждаются на специально подготовленную поверхность так, что каждая из них может быть проанализирована отдельно. Время анализа, в сущности, ограничено только стабильностью флуорофоров.

При классическом мультиплексном анализе обычно используют метод проточной цитометрии. Проточные цитофлуориметры (цитометры) измеряют флуоресценцию и определяют число флуоресцентно маркированных объектов, проходящих в потоке жидкости через анализируемый объем (скорость до десятков тысяч в секунду). Причем каждая частица анализируется отдельно. Метод проточной цитометрии позволяет получать за короткое время качественные и ко-

личественные данные по анализируемым частицам с высокой статистической достоверностью. Для возбуждения флуоресценции применяется один или несколько лазеров, наиболее универсальный — голубой (длина волны 488 нм), широко распространены также красный (642 нм) и фиолетовый (405 нм). Для снижения фонового сигнала лазеры фокусируются на очень маленький объем. В качестве детекторов светового сигнала используются фотоумножители.

Центральным элементом проточного цитометра является проточная ячейка, в которой частицы (диаметр 5–15 мкк) выстраиваются друг за другом в ламинарном потоке жидкости и проходят через луч лазера. Лазерный луч, проходя через клетку, отклоняется, рассеивается и вызывает флуоресценцию красителей, которыми маркируются исследуемые структуры. Отклоненный и рассеянный свет облучающего лазера, а также свет, полученный в результате флуоресценции, попадает на детекторы, переводится в цифровой сигнал, значение которого пропорционально интенсивности попавшего на детекторы света. Данные по интенсивности обрабатываются компьютером и выводятся в виде графиков и статистических характеристик. Большинство проточных цитометров используют проточную ячейку с гидродинамической фокусировкой: ламинарный поток создается потоком жидкости (англ. *sheath fluid*), которая со всех сторон «обжимает» образец. Скорость, с которой клетки движутся в потоке, определяет время измерения: чем больше скорость, тем быстрее проходит измерение, но выше вариабельность результатов.

Для детектирования аналитов в суспензионном чипе данным методом микросферы проходят через проточный цитометр (например, Luminex 200™ или Bio-Rad® Bio-Plex® анализатор), содержащий два диодных лазера. Первый лазер (красный, 635 нм) классифицирует микросферу, т. е. возбуждает внутренние флуорофоровы и по интенсивности флуоресценции (цвета) определяет искомым аналит (происходит расшифровка спектрального кода) (см. рис. 63). Второй лазер (зеленый, 532 нм) возбуждает флуорофор, связанный с молекулой-репортером, фикоэритрин, и определяет интенсивность флуоресцентного сигнала, который прямо пропорционален количеству связанного аналита. Так по спектральному коду микросферы определяется тип анализируемого аналита, по яркости флуоресценции метки — его концентрация.

Преимущества жидких микрочипов в том, что они позволяют создавать тест-системы, в которых биомолекулы находятся в гораздо более естественных условиях, нежели на плоскости в матричных БЧ. В отличие от элемента планарного биочипа кодированная микрочастица может двигаться в растворе в любом направлении, что снимает диффузионные ограничения, присущие плоским системам, улучшает кинетические свойства и дает возможность сепарации микрочастиц. К тому же кинетика связывания с микросферой может быть улучшена путем простого перемешивания. Матричные БЧ используют позиционное кодирование, схема которого не может быть изменена в ходе исследования, т. е. они определяют панель тестов для пользователя. В противоположность этому жидкие БЧ обуславливают гибкие схемы анализа. Формируя суспензию из различных микросфер, можно легко оптимизировать систему под условия конкретной экспериментальной задачи. Кроме того, применение множества микросфер с различными кодами для каждой молекулы-мишени в одном и том же анализе позволяет улучшить статистическую обработку данных и повысить достоверность анализа.

К минусам классических суспензионных чипов относится то, что полимерные микросферы, кодированные органическими флуорофорами, дают ограниченное число уникальных кодов. Введение нескольких красителей с различными длинами волн возбуждения требует использования нескольких лазеров, что увеличивает стоимость инструмента. Наложение спектров эмиссии и возбуждения провоцирует безызлучательный перенос энергии между молекулами красителей, примененных для кодирования, что усложняет код. Кроме того, для мультиплексного обнаружения требуется репортерный краситель, и область спектра, которая занята профилем его излучения, недоступна для кодирования.

Подобные недостатки могут быть устранены или минимизированы при использовании наноразмерных структур для разработки жидких чипов.

2.6. ПРИМЕНЕНИЕ НАНОРАЗМЕРНЫХ СТРУКТУР В БИОЧИПАХ

В настоящее время при производстве БЧ широко применяют достижения нанотехнологий. В биочипы интегрируются функциональные элементы наноразмерного диапазона. Они используются в качестве меток, для усиления сигнала и (или) для иммобилизации распознающих биомолекул.

При снижении размера материала до наномасштаба происходят изменения в его химических и физических свойствах, обусловленные поверхностным и квантовым эффектами. Отношение поверхности к объему у наноматериалов драматически возрастает в сравнении с их массивной формой. Данный факт способствует увеличению чувствительности БЧ, так как увеличивается интерфейс для размещения распознающих биомолекул. Квантовый феномен приводит к увеличению энергии запрещенной зоны и смещению в УФ-область в спектре эмиссии при снижении размера материала. Как результат, электрические и оптические свойства наноматериалов становятся зависимыми от их размера и формы. Эти существенные особенности наноматериалов позволяют настраивать (задавать) их химические и физические свойства для определенного использования в БЧ, управляя их размером, формой и химическим составом.

Одним из направлений применения наноструктур в БЧ является их использование в качестве *спектральных маркеров* для визуализации взаимодействия молекулярных зондов и искомого аналита. Наиболее применимы в БЧ металлические НЧ, квантовые точки и ОУНТ.

Наноматериалы как маркеры имеют ряд преимуществ, обусловленных их уникальными оптическими свойствами. Неорганические структуры для идентификации взаимодействия молекулярного зонда и соответствующего специфического аналита применяют в виде биоконъюгатов. Биоконъюгат представляет собой наночастицу, к поверхности которой присоединены распознающие биомолекулы (молекулярный зонд), т. е. происходит «функционализация наночастиц». В биоконъюгате молекула-зонд служит для специфического связывания с мишенью, а наночастица, составляющая ядро (трансдьюсер), — для визуализации взаимодействия (рис. 65).

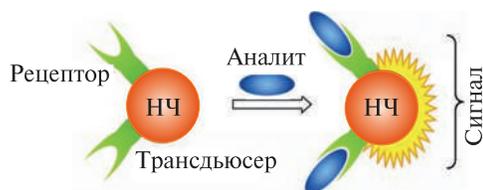


Рис. 65. Взаимодействие биоконъюгата НЧ (трансдюсер) – распознающая молекула (рецептор) с аналитом

Для предотвращения влияния среды на свойства наночастицы и получения более стабильного результата обычно создают комплексные биоконъюгаты: наночастицу помещают в оболочку (силиконовую, полимерную), на поверхность которой иммобилизуют молекулярные зонды. Применение наноструктур в суспензионных биочипах расширяет границы линейного диапазона и снижает предел обнаружения.

В качестве распознающих молекул могут быть олигонуклеотиды, антитела, белки, аптамеры. Конъюгация биомолекул с НЧ может осуществляться различными способами, а именно в результате физической адсорбции, ковалентного присоединения, аффинного взаимодействия. Примером аффинной ориентированной иммобилизации является связывание гистидин-меченых белков с золотыми НЧ, модифицированными нитрилоацетатным комплексом никеля(II). Адсорбция отрицательно заряженных молекул ДНК на положительно заряженные AuНЧ может происходить за счет электростатического взаимодействия. Хемсорбция (квази-ковалентное связывание) биомолекул, функционализированных тиольными группами, с AuНЧ позволяет надежную и поверхностно ориентированную функционализацию.

2.6.1. Суспензионные чипы на основе наночастиц благородных металлов

Наночастицы благородных металлов (Au, Ag) обладают уникальными оптическими свойствами, они способны поглощать и рассеивать электромагнитную энергию (свет) (т. е. обладают яркой окраской), что не наблюдается для объемных металлов. Необычные оптические свойства НЧ обусловлены таким явлением, как локализованный поверхностный плазмонный резонанс (ЛППР).

ЛППР возникает в результате взаимодействия электрического поля падающей световой волны с поверхностными валентными электронами наночастицы (рис. 66). В случае совпадения частоты внешнего излучения с собственной частотой колебания свободных электронов металлической НЧ можно наблюдать резкое увеличение амплитуды колебания «электронной плазмы» частицы, квантовым аналогом которой является плазмон. При достаточно малых размерах частиц (диаметр частицы меньше длины волны падающего электромагнитного излучения) она может быть рассмотрена как колеблющийся диполь. При этом полагают, что положительный заряд НЧ, связанный с ионным остовом, остается неподвижным, тогда как отрицательный заряд электронов проводимости колеблется под действием переменного электрического поля. В результате возникает изменяющаяся во времени поляризация сферической частицы.

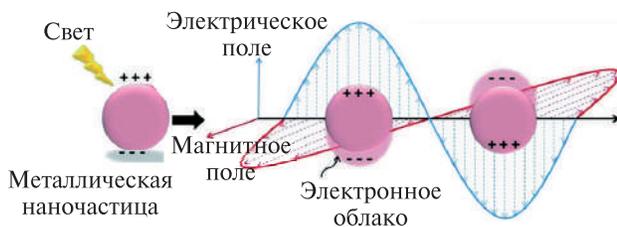


Рис. 66. Образование ЛППР в результате взаимодействия электрического поля падающей световой волны с поверхностными валентными электронами металлической наночастицы

Для частиц благородных металлов с размерами порядка 10–100 нм ЛППР наблюдается в видимой области спектра и в ближнем инфракрасном диапазоне. Это проявляется наличием в спектрах рассеяния и поглощения одного или нескольких резонансных пиков в видимой и ближней ИК-области. В сравнении с распространяющимся ППР глубина проникновения поля локализованных плазмонов в среду гораздо меньше – порядка 15–30 нм. Это способствует повышению чувствительности аналитических систем на их основе, так как эффект объема раствора становится значительно меньше.

ЛППР (т. е. цвет НЧ) зависит от размера, формы, структуры и материала наночастицы, а также от диэлектрических свойств среды. Зависимость ЛППР от ближайшего диэлектрического окружения используется для конструирования наносенсоров нового поколения, способных оптически детектировать взаимодействия биомолекул вблизи поверхности наночастиц. Чувствительность таких систем находится в пределах наноМ – пикоМ вплоть до анализа единичных молекул.

Преимущества ЛППР заключаются в возможности настройки длины волны, а также низкой стоимости, так как для детектирования подходит обычный спектрофотометр в режиме трансмиссии/отражения (белый свет). В сравнении с органическими красителями интенсивность поглощения и рассеяния света наночастицами на несколько порядков выше. ЛППР обладает высоким коэффициентом экстинкции (ϵ), он может составлять $\sim 3 \times 10^{11} \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Например, рассчитанный коэффициент поглощения частиц золота диаметром 40 нм при длине волны света 530 нм составляет $\sim 7,7 \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, в то время как для наиболее интенсивно поглощающего свет родамина G – $1,2 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

На основе ЛППР металлических наночастиц, как правило золота и серебра, разрабатываются различные стратегии анализа. Существует два типа жидкостных биочипов, основанных на данном эффекте. Они представляют собой суспензию индивидуальных металлических НЧ, конъюгированных с биомолекулами. В качестве последних обычно используют антитела, специфичные к соответствующим антигенам (наркотикам, патогенам и др.), олигонуклеотиды, аптамеры.

БЧ *первого типа* основаны на изменении оптических свойств наночастиц при связывании аналита (молекулы-мишени) с иммобилизованными на их поверхности биомолекулами (рис. 67). Регистрация биоспецифического связывания проводится по изменению величины или положения максимума экстинкции на длине волны ЛППР, что пропорционально концентрации аналита в пробе. AuНЧ или AgНЧ характеризуются сдвигом ЛППР в область большей длины волны с увеличением показателя преломления среды.

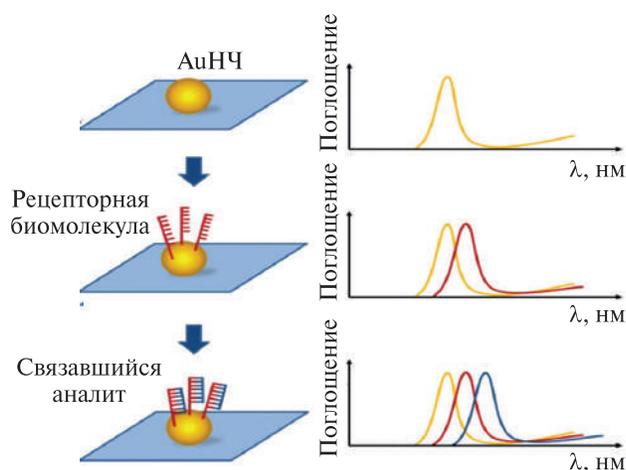


Рис. 67. Схема анализа с помощью суспензионного чипа на основе золотых наночастиц

Суспензионные чипы на основе биоконъюгатов НЧ с различными рецепторными молекулами позволяют проводить мультиплексный анализ и высокоскоростной параллельный скрининг. Особенно это важно при тестировании различных веществ на токсичность. В настоящее время существует тенденция минимизировать испытания на животных. Например, для тестирования ~30 тыс. химических соединений нужно 2,5–54 млн животных, а стоимость таких исследований составляет ~1,3–9,3 трлн евро.

БЧ *второго типа* базируются на том, что длина волны абсорбированного света (сдвиг в полосе ЛППР) зависит от того, находятся ли НЧ отдельно друг от друга в суспензии или они агрегированы (рис. 68). Пик поглощения для дисперсии НЧ сдвигается в область более длинных волн при агрегации частиц, что легко обнаруживается по изменению цвета суспензии. И наоборот, изменение цвета также может происходить в обратном направлении, т. е. при разделении НЧ. Степень

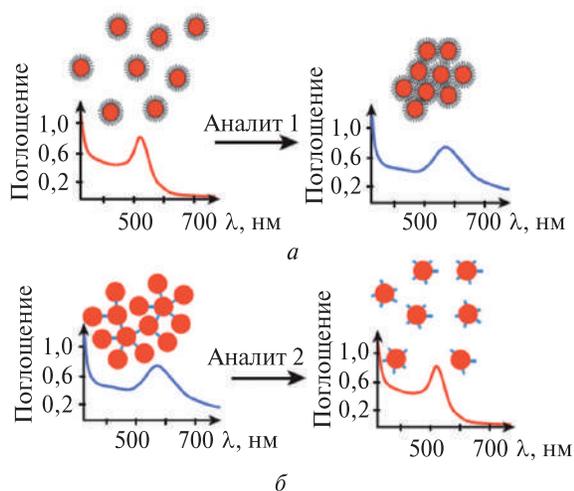


Рис. 68. Принцип действия колориметрического чипа на основе металлических наночастиц: *а* – агрегация НЧ в присутствии аналита; *б* – разделение конгломерата НЧ в присутствии аналита

агрегации/разделения НЧ пропорциональна сдвигу пика поглощения и, следовательно, количеству аналита (например, активного фермента), вызывающего агрегацию или разделение НЧ.

Данный тип суспензионных чипов на основе НЧ является колориметрическим и подходит для создания простых тест-систем. Такие чипы просты в использовании, дешевы, подходят как для количественной, так и качественной оценки, их результаты легко интерпретируются. Кроме того, они хорошо интегрируются в микрофлюидные чипы, представляющие собой лабораторию на микроплощадке.

Раствор индивидуальных AuНЧ имеет красный цвет, а агрегированных – синий, разница в цвете видна невооруженным глазом. Наличие анализируемого вещества в суспензии из AuНЧ приводит к их склеиванию и кластеризации. Образующийся конгломерат из биоконъюгатов и молекул аналита приводит к изменению оптических свойств спектра рассеяния AuНЧ и, соответственно, к изменению цвета суспензии. Изменение цвета от красного до темно-синего пропорционально концентрации аналита в пробе.

Для серебрянных НЧ цвет суспензии индивидуальных частиц при их агрегации меняется от желтого до коричневого. В сравнении с AuНЧ AgНЧ имеют более высокий коэффициент экстинкции и более низкую стоимость. Однако ограничения в применении AgНЧ в БЧ обусловлены тем, что процедура их функционализации может привести к деградации до свободных ионов серебра и их поверхность может быть легко окислена.

Недостатком колориметрических чипов является то, что в пробе могут присутствовать молекулы, способные поглощать видимый свет в той же области спектра, что и диспергированные и/или агрегированные НЧ. В этом случае трудно различить пики поглощения AgНЧ/AuНЧ и мешающих соединений.

Для определения различных патогенов в токсикологии, молекулярной диагностике и криминалистике широко используют суспензионные чипы, основу которых составляют AuНЧ, модифицированные олигонуклеотидами (рис. 69).

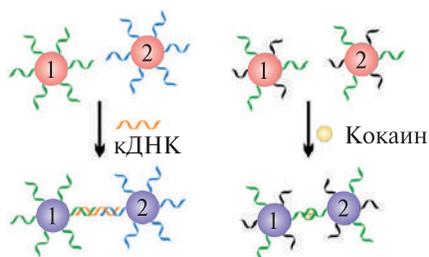


Рис. 69. Колориметрическое определение на основе НЧ, модифицированных олигонуклеотидами. Присутствие соответствующего аналита в пробе приводит к агрегации НЧ и, следовательно, изменению цвета суспензии

Для контроля качества пищевых продуктов (например, контроля меламина), анализа биожидкостей (например, определения дофамина) используют AgНЧ (рис. 70). Дофамин является важнейшим нейротрансмиттером. Меламин, богатое азотом химическое вещество, наравне с мочевиной используется недобросовестными производителями для создания иллюзии высокого содержания белка в молоке или других продуктах (при проведении большинства тестов содержание белка измеряется по содержанию азота методами Кьельдаля и Дюма). Тест основан на том, что дофамин может восстанавливать ионы Ag^+ ($AgNO_3$) и функци-

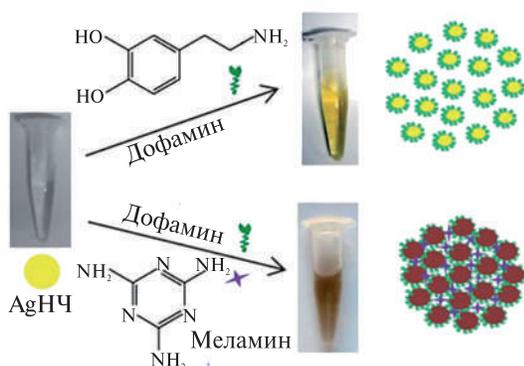


Рис. 70. Схема колориметрического определения меламина с помощью суспензии AgНЧ, стабилизированной дофамином. Наличие меламина в пробе вызывает агрегацию НЧ

анализировать полученные AgНЧ. Меламин, если присутствует в пробе, может связывать дофамин посредством реакции присоединения Михаэля и образования оснований Шиффа. Это приводит к агрегации AgНЧ и вызывает колориметрический ответ. Данный одноэтапный тест прост, быстр, очень чувствителен и может быть использован для экспресс-анализа. Изменение цвета количественно коррелирует с концентрацией меламина в диапазоне от 10 до 1,26 млн⁻¹ (англ. *ppm* – *parts per million*), что ниже предела безопасности в Китае (1,0 млн⁻¹) и ЕС (2,0 млн⁻¹). Сосуществующие вещества, включая фенилаланин, DL-лейцин, L-глутамат, галактозу, лизин, мочевины и глюкозу, не влияют на определение меламина.

В целом применение НЧ в качестве оптических маркеров позволяет достигнуть высокой чувствительности, вплоть до анализа единичных молекул. Например, с помощью AgНЧ был детектирован гексадекантиол на уровне зептомоль (10⁻²¹ моль), а сенсор на основе AuНЧ, модифицированных биотином, способен детектировать всего 50 молекул (10⁻²² моль) стрептавидина.

2.6.2. Суспензионные чипы на основе квантовых точек

Суспензионные чипы на основе полимерных частиц, кодированных одним или двумя органическими флуорофорами, имеют некоторые ограничения, обусловленные преимущественно свойствами органических красителей.

Флуоресценция всех флуорофоров характеризуется рядом параметров: спектрами возбуждения и флуоресценции, интенсивностью испускаемого света, положением максимума полосы испускаемого света и ее полушириной (ширина на половине максимума), а также квантовым выходом, временем жизни и анизотропией флуоресценции.

Органические флуорофоры легко фотообесцвечиваются, могут быть химически нестабильными, имеют короткое время жизни (<5 × 10⁻⁹ с), разные длины волн возбуждения и характеризуются широкими и асимметричными спектрами излучения. Наличие в спектрах эмиссии этих люминесцентных молекул длинноволнового хвоста, который простирается далеко в красную область, обуславливает наложение сигналов от разных флуорофоров. Это ограничивает число цветов меток для мультиплексной детекции. Кроме того, возбуждение разных красителей требует применения разных источников света, настроенных на воз-

буждение каждого из красителей, что усложняет систему детекции и не позволяет разработать недорогие варианты оборудования. К тому же аутофлуоресценция биомолекул в дальнем УФ и видимом спектре может маскировать сигналы от используемых органических флуорофоров. Эта проблема требует люминофоров с эмиссией в ближнем ИК-диапазоне.

Однако задача мультиплексности, заключающаяся в выяснении роли множества аналитов-мишеней одновременно, их взаимного взаимодействия и взаимопревращения в режиме реального или длительного времени, требует новых подходов к разработке кодированных микросфер. Увеличение чувствительности и мультиплексности суспензионных чипов происходит при использовании в качестве флуорофоров для кодирования микрочастиц квантовых точек.

Квантовые точки (КТ) обладают уникальными флуоресцентными свойствами в сравнении с органическими красителями. Данный новый класс флуорофоров, основанный на использовании полупроводниковых КТ в форме коллоидных нанокристаллов, гомогенных по форме и размерам, был создан в 1990-е гг.

Полупроводниковые КТ (от сотен до тысяч атомов, размер 2–10 нм) обычно синтезируют из элементов групп II–VI (например, CdSe, CdTe) или III–V (например InP, InAs) периодической таблицы. Для повышения эффективности флуоресценции применяют структуры ядро/оболочка, в которых флуоресцирующее полупроводниковое ядро (например, из CdSe) покрывают оболочкой из другого полупроводника с более широкой запрещенной зоной (например, CdS или ZnS). Введение оболочки значительно улучшает флуоресцентные свойства КТ и их химическую устойчивость.

Квантовые точки, получаемые в результате химического синтеза, как правило, не растворимы в воде. Для перевода их в водные или биологические среды поверхность КТ покрывают тонким слоем органических молекул, содержащих гидрофильные группы, что увеличивает их размер (часто >10 нм). Создание такого слоя из лигандов с различными активными группами позволяет функционализировать КТ, что дает возможность присоединить к ним биологические макромолекулы.

Ключевую роль в оптоэлектронных свойствах КТ играют квантово-размерные эффекты. Энергетический спектр квантовой точки принципиально отличается от объемного полупроводника. При уменьшении размеров полупроводника до наномасштабов движение электронов лимитируется физическими размерами области, в которой они могут находиться. В КТ (~2–10 нм) носители заряда (электроны и «дырки») ограничены по всем трем пространственным измерениям. Вследствие эффекта размерного квантования энергетический спектр квантовой точки имеет дискретную структуру (рис. 71).

При взаимодействии света с полупроводником образуются электронно-дырочные пары – «экситоны». Поглощение фотона полупроводником возбуждает электрон из валентной зоны в зону проводимости, в результате чего в валентной зоне образуется дырка. Экситон имеет ограниченное время жизни, и в итоге электрон возвращается в валентную зону и рекомбинирует с дыркой. Процесс рекомбинации обычно представляет собой процесс излучения, который включает высвобождение фотона, называемое флуоресценцией.

Дискретная структура энергетического спектра КТ приводит к тому, что спектры поглощения и флуоресценции квантовых точек зависят не только от

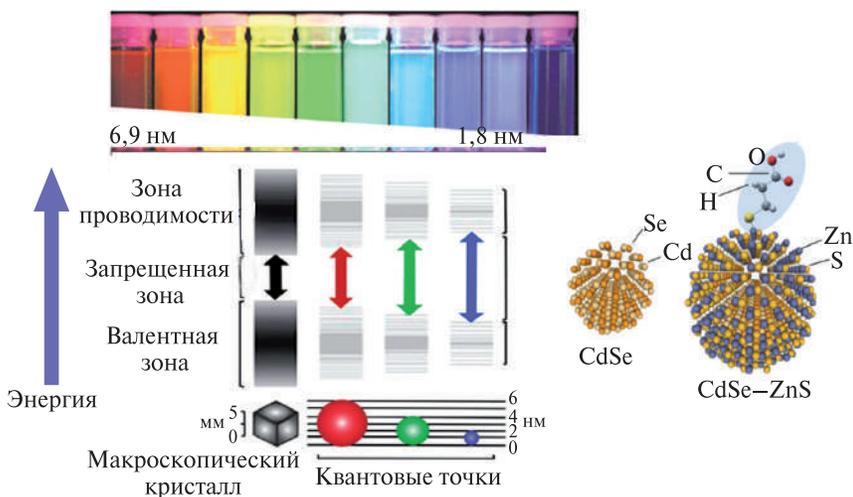


Рис. 71. Трансформация зонной структуры макроскопического полупроводника при уменьшении размера до нанометрового диапазона. Флуоресценция образцов квантовых точек CdSe с размером в диапазоне 1,8–6,9 нм, приготовленных в виде золь. КТ с ядром из CdSe и тонкой оболочкой из ZnS, легированная органическими молекулами

типа полупроводниковых соединений, из которых они синтезированы, но также непосредственно и от размеров самих нанокристаллов. Именно благодаря этому свойству становится возможным регулировать ширину запрещенной зоны, а следовательно, и длину волны флуоресценции КТ – чем меньше будет диаметр точки, тем короче будет длина волны флуоресценции.

Снижение размера нанокристалла приводит к увеличению ширины запрещенной зоны, и разность энергий между самым высоким уровнем валентной зоны и самым низким уровнем зоны проводимости становится больше. Это означает, что для возбуждения КТ требуется больше энергии и одновременно больше энергии высвобождается, когда кристалл возвращается в состояние покоя. Это соответствует высокочастотному свету, излучаемому после возбуждения КТ. Так, снижение размера КТ приводит к изменению цвета флуоресценции с красного на синий (см. рис. 71).

Размер нанокристаллов можно контролировать в ходе их синтеза. Изменяя параметры синтеза, можно получить КТ с регулируемыми в широких пределах параметрами флуоресценции. При варьировании размера КТ от 2 до 9,5 нм диапазон длин волн флуоресценции составляет 400–1350 нм. На основе наиболее распространенного типа квантовых точек со структурой ядро/оболочка CdSe/ZnS можно получить набор флуорофоров с эмиссией в пределах 500–650 нм. Важно, что цветом света, излучаемого КТ, можно манипулировать без значительных затрат или использования высокотехнологичных процессов.

Коммерческие препараты КТ выпускаются в виде наборов частиц, пригодных для конъюгации с биомолекулами, а также в виде готовых конъюгатов с различными молекулами (антителами, белком А, стрептавидином, биотином и др.).

Уникальные оптические свойства КТ обусловлены нижеследующим. Квантовые точки обычно демонстрируют симметричные и узкие пики флуоресценции

(ширина полосы на половине максимума $\sim 15\text{--}45\text{ нм}$), что позволяет излучать им чистый цвет (рис. 72). Напротив, полосы эмиссии органических красителей (например, флуоресцеина) обычно варьируются от 50 до 100 нм, и для них характерно наличие длинноволнового «хвоста». Наличие узких симметричных пиков снижает до минимума вероятность наложения сигналов от КТ разных цветов и позволяет надежно выделять сигналы их флуоресценции. Например, в видимой области спектра (400–800 нм) с приемлемым спектральным разрешением могут быть размещены только 4–6 различных органических флуорофоров. В то же время для этого окна обнаружения можно использовать 10–12 разных КТ. Варьируя размер ядра КТ, можно «настроить» нанокристаллы на эмиссию флуоресценции любого цвета оптического диапазона.

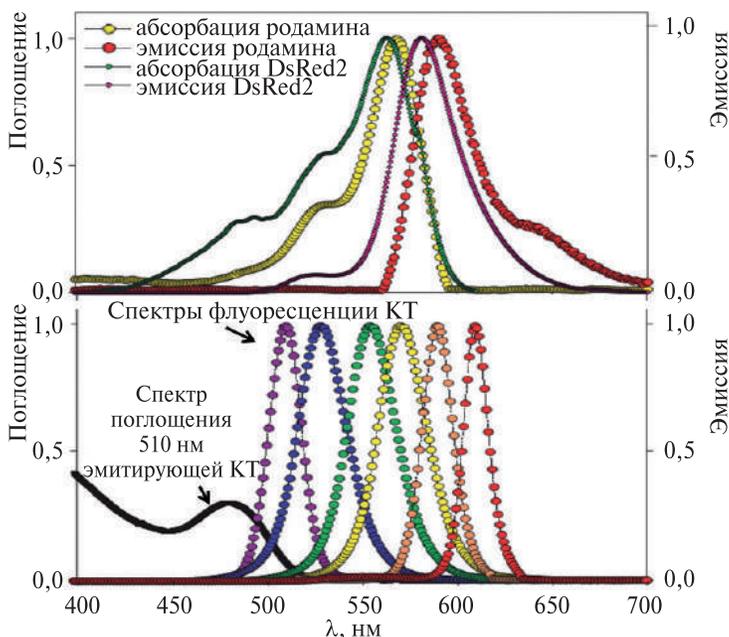


Рис. 72. Спектры поглощения и флуоресценции органических флуорофоров (родамина красного и рекомбинантного белка DsRed2) и шести квантовых точек CdSe различного размера. Все КТ были возбуждены при 365 нм с помощью УФ-света. Для 610 нм эмитирующей КТ сдвиг Стокса составил $\sim 250\text{ нм}$

В отличие от органических флуорофоров, имеющих узкие спектры возбуждения, полупроводниковые КТ независимо от их размера обнаруживают широкие полосы поглощения (начинается при $\sim 550\text{--}650\text{ нм}$ и неуклонно увеличивается к УФ-области). Поэтому для возбуждения КТ разных цветов можно использовать один источник излучения. Набор различных по размеру КТ (например, селенида кадмия), возбуждаемых электромагнитными волнами одной и той же длины, будут флуоресцировать в широком диапазоне длин волн (см. рис. 71, 72).

КТ имеют большой Стоксов сдвиг, т. е. разность между длинами волн возбуждения и эмиссии ($>100\text{ нм}$, иногда до 400 нм), что позволяет возбуждать КТ

далеко от положения пика эмиссии, например в УФ-области (см. рис. 72). Это повышает точность одновременного детектирования нескольких КТ с одним источником возбуждения и улучшает мультиплексный анализ на их основе.

КТ имеют относительно высокие квантовые выходы и более высокий коэффициент поглощения (ϵ), обычно в 10–50 раз больше, чем для органических флуорофоров, для которых $\epsilon < 250\,000\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Это обеспечивает настолько высокую яркость флуоресценции КТ, что они с помощью флуоресцентного микроскопа детектируются как единичные объекты. Это дает возможность создавать системы с чувствительностью, позволяющей регистрировать единичные молекулы и гарантировать их детекцию на фоне автофлуоресценции клеток, тканей и подложек биочипов.

КТ обладают уникально высокой фотостабильностью (в ~ 50 – 1000 раз устойчивее лучших из органических красителей). При одинаковых условиях возбуждения флуоресценция в органическом красителе выцветает в течение 1–5 мин, в то время как флуоресценция КТ остается неизменной даже после нескольких часов (например, 27 ч для CdSe/ZnS). Это позволяет применять источники возбуждения высокой мощности для повышения чувствительности метода, использовать методики накопления сигнала, выжигать автофлуоресценцию обработкой биочипов светом высокой интенсивности. Время жизни фотолюминесценции КТ обычно велико ($> 10 \times 10^{-9}$ с).

Кроме того, возможность настройки флуоресценции КТ делает их подходящими для использования в качестве эффективных доноров для ферстеровского резонансного переноса энергии (ФРПЭ) или акцепторов в биолюминесцентном ФРПЭ. Применение механизма ФРПЭ в биоанализе значительно повышает его селективность и чувствительность.

Однако, несмотря на превосходные оптические характеристики, КТ имеют некоторые *недостатки*. Оптическая микроскопия единичных КТ показала, что они подвергаются прерывистому включению-выключению при непрерывном возбуждении, т. е. интенсивность флуоресценции единичной КТ беспорядочно изменяется. Этот эффект называют «миганием» (англ. *blinking*), т. е. точка случайно-периодически переходит из люминесцирующего состояния (on-состояние) в темное состояние (off-состояние). Механизм мигания КТ понят только частично, считают, что оно обусловлено временным переходом квантовой точки в заряженное состояние. Электроны или дырки периодически удерживаются на поверхностных дефектах в нанокристаллах, что препятствует их излучающей рекомбинации и, следовательно, флуоресценции КТ. Периоды отсутствия флуоресценции для одиночной КТ могут достигать нескольких секунд. Поверхностным пассивированием КТ или внедрением КТ в полимерную матрицу удается существенно уменьшить эффект мигания. В целом в анализах задействовано более одной КТ, и хотя некоторые мигают, другие могут быть включены для окончательного обнаружения, и, таким образом, детектор не пропустит ни одного сигнала.

Оптическое кодирование с помощью КТ. Включение КТ в микросферы для их кодирования является критическим шагом при подготовке ярких, гомогенных и биологически совместимых частиц, подходящих для высокопроизводительной детекции и диагностики.

Включение КТ может быть реализовано с использованием трех основных методов. В первом случае КТ вводят в готовые полистирольные микросферы, в

которых после набухания в смеси органических растворителей увеличиваются поры. Гидрофобные КТ (CdSe/ZnS) диффундируют в поры и адсорбируются на их стенках, после удаления растворителя поры сужаются, эффективно удерживая КТ. Второй метод базируется на включении КТ в полимерные микросферы во время их синтеза либо путем микрокапсулирования, либо химической пришивкой. Третий способ базируется на формировании на поверхности микросферы концентрических оболочек, содержащих КТ. Все эти техники известны, так как используются для кодирования микрочастиц с помощью органических красителей. Однако большие размеры и специфическая поверхностная химия КТ делают применение этих процедур для КТ нетривиальной задачей.

Наиболее используемыми системами для считывания и декодирования флуоресцентных кодов КТ являются проточные цитометры и системы визуализации, такие как инвертированные эпи-флуоресцентные микроскопы, конфокальные лазерные сканирующие микроскопы или микроспектрометры. Последние имеют размер порядка $40 \times 42 \times 24$ мм (площадь менее 50 мм^2), при этом оптическое разрешение, стабильность, чувствительность и другие технические характеристики данных спектрометров соответствуют или превосходят аналогичные параметры более габаритных и дорогих спектрофотометров.

Первая работа, подтверждающая концепцию возможности применения КТ-кодированных микросфер для мультиплексного анализа, опубликована в 2001 г. М. Ханом и соавторами (M. Han [et al.]) и представляла суспензионный чип с олигонуклеотидными зондами. Многоцветное оптическое кодирование достигнуто путем последовательного включения в полимерные микросферы монодисперсных КТ (CdSe/ZnS) трех цветов при точно контролируемых соотношениях. Кодированные микрочастицы были конъюгированы олигонуклеотидами (рис. 73). Анализируемые последовательности были предварительно маркированы органическим флуорофором «Cascade Blue» (возбуждение при 375, 400 нм, эмиссия при 420 нм). Сигнал кода идентифицирует последовательность ДНК, а сигнал органического красителя указывает на присутствие искомой последовательности

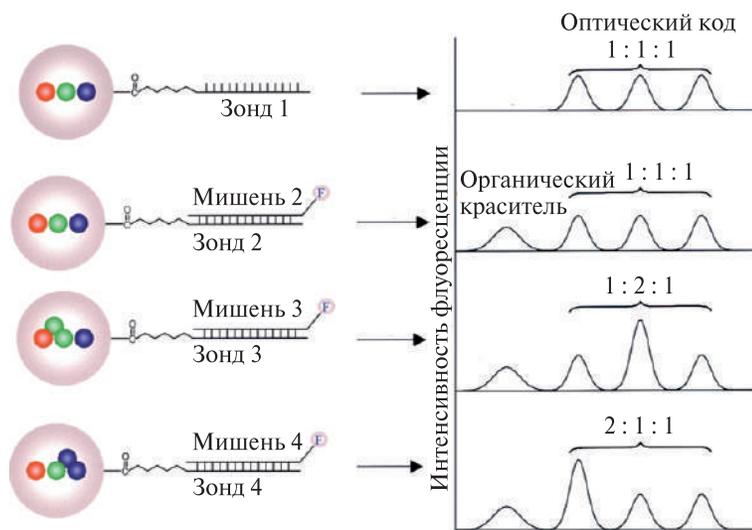


Рис. 73. Схема ДНК-гибризационного анализа с помощью КТ-кодированных микросфер, конъюгированных с олигонуклеотидами (№ 1–4). Наличие в пробе целевых последовательностей (мишени № 2–4) было детектировано по сигналу органического флуорофора, а их качественный состав – по цвету кода

и ее распространенность. В работе использовали флуоресцентный микроскоп, позволяющий регистрировать сигнал от единичной кодированной микросферы.

В работе было показано, что КТ, включенные в микросферы, имеют флуоресцентные свойства, схожие с таковыми для свободных нанокристаллов. Использование шести КТ (цветов) 10 уровней интенсивности теоретически может кодировать миллион последовательностей нуклеиновых кислот или белков. Кроме того, между встроенными КТ отсутствовала передача энергии по механизму ФРПЭ, что является ключевым требованием для мультиплексного оптического кодирования. Помимо этого, для возбуждения КТ и органического флуорофора был использован один источник УФ-света (330–385 нм), что значительно упрощает процедуру многопараметрического анализа. Применение КТ для кодирования позволило существенно разделить сигнал от органического флуорофора (т. е. избежать перекрытия спектров эмиссии) и соответствующего кода. С этой целью могут также использоваться КТ, флуоресцирующие в разных волновых диапазонах. Например, КТ с эмиссией в видимой области спектра для кодирования частиц, а в ближнем ИК-диапазоне – для маркировки аналитов.

Суспензионные чипы на основе КТ-кодированных микросфер обладают высокой чувствительностью, они позволяют детектировать концентрацию биомолекул на уровне пМ–фМ.

Сегодня суспензионные чипы на основе КТ находят применение для исследований экспрессии генов, для *in vitro* обнаружения и визуализации раковых клеток, в иммунологических исследованиях.

Помимо КТ, в качестве флуоресцентных маркеров используют такие наноструктуры, как полупроводниковые одностенные УНТ (диаметр 1 нм, длина 100–1 000 000 нм). УНТ имеют фотолюминесценцию в ближнем ИК-диапазоне (800–2000 нм) и обладают низкой токсичностью. Эти свойства УНТ имеют биомедицинское применение, потому что ИК-свет имеет большое проникновение в ткани и не поглощается биоструктурами. Это снижает аутофлуоресценцию биосреды и тем самым величину фонового сигнала. Кроме того, УНТ устойчивы к фотовыцветанию (фотохимическое разрушение при облучении светом).

2.7. МИКРОФЛЮИДНЫЕ ЧИПЫ. ПРИНЦИП ДЕЙСТВИЯ, ВИДЫ, ПРИМЕНЕНИЕ

Микрофлюидные чипы (МФЧ) представляют собой класс новых устройств с новыми функциональными, пользовательскими и аналитическими характеристиками. МФЧ способны выполнять функции макроскопических лабораторий, это своеобразные миниатюризованные «микроработатории» или «лаборатории-на-чипе» (англ. *lab-on-a-chip*). На микрофлюидном чипе осуществляются все манипуляции с малыми количествами пробы и реагентов в каналах микрометрового размера. На одном чипе происходят подготовка пробы, очистка и разделение компонентов смеси, химические реакции, детектирование компонентов. МФЧ могут включать сегменты биочипов, т. е. микроучастки с иммобилизованными на них биомолекулами.

В настоящее время существуют различные виды МФЧ. Классический микрофлюидный чип представляет собой миниатюрное устройство планарной геометрии с разветвленной сетью микроструктур (каналов, реакторов, резервуаров, дозаторов, смесителей, экстракторов, насосов, фильтров, датчиков, других функциональных элементов), в которых в микропотоках жидкости (флюидах) осуществляются аналитические операции (рис. 74). Для точного управления и контроля потоками флюидов внутри микроканалов используют различные инструменты, которые могут быть либо непосредственно интегрированы на чипе (электроды, клапаны и т. д.), либо внешними (различные насосы, источники напряжения, детекторы и т. д.). Площадь такого МФЧ составляет несколько квадратных сантиметров, его длина находится в пределах 5–100 мм, ширина 0,5–5 мм. Линейные размеры каналов МФЧ по двум измерениям обычно находятся в диапазоне от нескольких сотен нанометров до сотен микрометров (ширина 1–100 мкм, глубина 0,5–100 мкм; для сравнения: толщина человеческого волоса ~70 мкм). Такие размеры каналов значительно больше размеров многих биологических структур и молекул (клетки: от 0,1 до 30 мкм в диаметре, молекулы: от нескольких 10^{-9} м для маленьких молекул до сотен микрометров для белков и ДНК).



Рис. 74. Схема микрофлюидного чипа микрометров

Преимущества анализа с помощью МФЧ заключаются в возможности исследования очень малых объемов проб (от мкл до фемтол), снижении расхода реагентов и отходов, разделении и детектирование с высоким разрешением и чувствительностью. Для микрофлюидных систем предел обнаружения может быть чрезвычайно малым – порядка 10^{-18} – 10^{-21} моль.

Более быстрый анализ (порядка нескольких минут) с помощью МФЧ и малое время отклика обусловлены сокращением расстояния диффузии вещества в микроканалах, малой теплоемкостью и, следовательно, быстрым нагревом/охлаждением, большим соотношением площади поверхности микроканала и объема. Быстрый отклик системы позволяет лучше контролировать процессы, происхо-

дящие в каналах МФЧ. Компактность системы из-за интеграции многочисленных функциональных элементов, а также малых объемов делает возможным высокую пропускную способность, массивную параллельность анализа, обработку множества образцов. МФЧ позволяют проводить мониторинг процессов в реальном времени. Преимуществом является также низкое потребление мощности и небольшая стоимость их производства. Например, 10 образцов на МФЧ могут быть проанализированы за 30–40 мин.

Важнейшим достоинством и потенциалом МФЧ является возможность осуществлять пассивное управление потоками флюидов внутри микроканалов, т. е. без использования внешних источников энергии.

МФЧ имеют определенные *недостатки*. Поскольку определенные эффекты – капиллярные силы, шероховатость поверхности, химическое влияние конструкционных материалов на реакционный процесс – становятся более доминирующими в микрообъеме, то это может в отдельных случаях сделать процесс анализа более комплексным. Часто наблюдается низкое отношение сигнал/шум. Существует также проблема закупорки капилляров твердыми частицами.

В настоящее время создаются миниатюрные диагностические приборы, в составе которых предусмотрен порт для установки МФЧ. Такие приборы оснащены различными функциональными блоками для управления операциями на чипе (блок питания, микрокомпьютер с модулями беспроводной связи и библиотеками, точечные фотодиоды, источник магнитного поля, картриджи для реагентов и др.).

МФЧ нашли свое *применение* в области протеомики, геномики, клинической диагностики, фармацевтики, химии и нанотехнологий. МФЧ используют для анализа биомолекул (белков, ДНК/РНК и др.) и отдельных клеток, обнаружения генетически модифицированных организмов, оптимизации методов очистки белков и т. д.

МФЧ стали не только лабораториями для комплексного биоанализа, но и своеобразными синтетическими лабораториями по высокопроизводительному и высокоселективному синтезу органических веществ, а также по комбинаторному синтезу. МФЧ используют для химического синтеза фармакологически ценных хиральных органических соединений, а также наночастиц.

В последнее десятилетие разрабатываются МФЧ, включающие культуры (человеческих) тканей. Такие чипы представляют собой системы, имитирующие *in vitro* деятельность, механику и физиологическую реакцию целых органов. Данные МФЧ, являющиеся, по сути, миметиками искусственных органов, получили название «орган-на-чипе» (англ. *organ-on-a-chip*) и представляют альтернативу исследованиям на животных. В 2012–2013 гг. были разработаны МФЧ «желудок-на-чипе» и «сердце-на-чипе». Такие чипы позволяют получать не только информацию о функционировании органов, но и быстро тестировать действие на них потенциальных лекарств без затраты существенных средств.

Современными тенденциями развития МФЧ является интеграция в чипы новых функциональных микро- и наноразмерных элементов и систем (микро- и наноэлектродов, нанопроволок, нанопористых сред и т. д.), увеличение информативности измерений, управление и контроль за всеми стадиями анализа.

Виды МФЧ. Микрофлюидные чипы подразделяются на классические прямоугольные и радиальные (дисковые), в которых осуществляется непрерывный по-

ток жидкости, и капельные, в которых управляют дискретными объемами жидкости.

Классические *плоские прямоугольные* МФЧ характеризуются тем, что непрерывный поток жидкости реализуется в закрытых каналах (см. определение МФЧ выше) (см. рис. 74, 75). Прямоугольные МФЧ могут содержать большое количество каналов, что дает возможность проведения множества параллельных анализов. Например, на МФЧ с массивным распараллеливанием можно одновременно проводить до 48 экспериментов.

Сеть микроканалов МФЧ связана с макросредой отверстиями разных размеров, полученными непосредственно на чипе (см. рис. 75). Именно через эти отверстия (так называемые входные/выходные порты) вводится/удаляется жидкость в/из чипа (например, посредством трубок, шприцев). Для достижения желаемых целей (разделение клеток, экстракция молекул из плазмы крови, электрофорез белков, ДНК и т. д.) сеть микроканалов должна быть скрупулезно спроектирована. Для точного управления движением жидкостей внутри микроканалов требуются специальные системы. Эти элементы могут быть либо встроенными в МФЧ (например, различные клапаны, микронасосы), либо внешними (например, насосы).

Важную роль в управлении потоками жидкости в каналах МФЧ играют различные *микроклапаны*. Система микроклапанов позволяет перенаправлять потоки, перекрывать каналы, производить смешивание или разделение объемов жидкостей. Микроклапаны дают возможность управлять потоком жидкой среды в микроканале путем изменения заданного макроскопического параметра. Клапаны могут приводиться в действие механически, пневматически, электрически, а также под действием фазовых изменений или внешних сил. Электрокинетические клапаны основаны на электроосмотическом потоке, используются для перемены направления течения жидкости из одного канала в другой. Пневматические клапаны осуществляют контроль за потоком за счет деформации эластичной полидиметилсилоксановой мембраны, перекрывающей канал потока жидкости. В микроклапанах с изменением фазы для управления потоком применяются такие материалы, как парафин, гидрогели, температурно-чувствительный полимер полиэтиленгликоль или водные растворы. В них поток жидкости контролируется путем фазового перехода материала в конструкции клапана. Большинство конструкций таких клапанов включают в себя охлаждающий и нагревающий элементы, которые модулируют твердую и жидкую фазы клапана. При необходимости зону клапана в канале управления локально нагревают, полимер расширяется и таким образом закрывает клапан.

Дисковые, или радиальные, МФЧ (CD-чипы) появились в 1999 г. Круглая пластина (на подобие CD-диска от англ. Compact Disc) используется как основа для создания микроструктур, в которых происходят аналитические операции

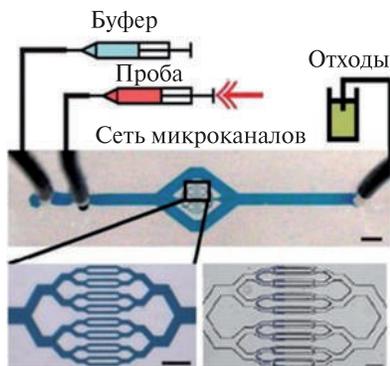


Рис. 75. Фрагмент микрофлюидного чипа с портом входа/выхода жидкостей в/из сеть микроканалов

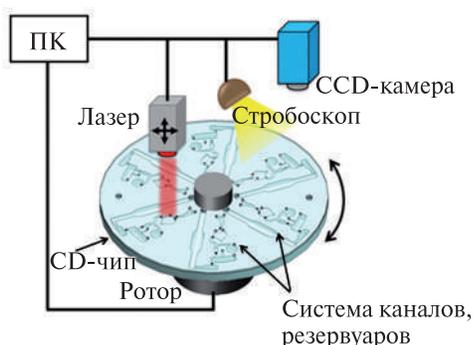


Рис. 76. Схема дискового микрофлюидного чипа

(рис. 76). На диске создается система каналов, реакторов, смесителей, микрососудов, а также зоны, на которых иммобилизованы распознающие биомолекулы (антигены, антитела, олигонуклеотиды и т. п.). Достоинство данных МФЧ в том, что перемещение жидкости в каналах осуществляется при вращении диска, т. е. в результате создания центробежных сил без использования центрифуги. Преимущество использования диска состоит в том, что центробежную силу можно легко контролировать. Реагенты расходятся из центра к периферии. Помимо

этого, для управления флюидами в радиальных МФЧ используют магнитное поле, температуру и капиллярную силу.

Капельные МФЧ (англ. *Droplet-based microfluidics*) могут быть двух типов, а именно с закрытыми каналами и планарные (рис. 77). Капельные микрофлюидные устройства генерируют капельки крошечных объемов (от нл до фл).

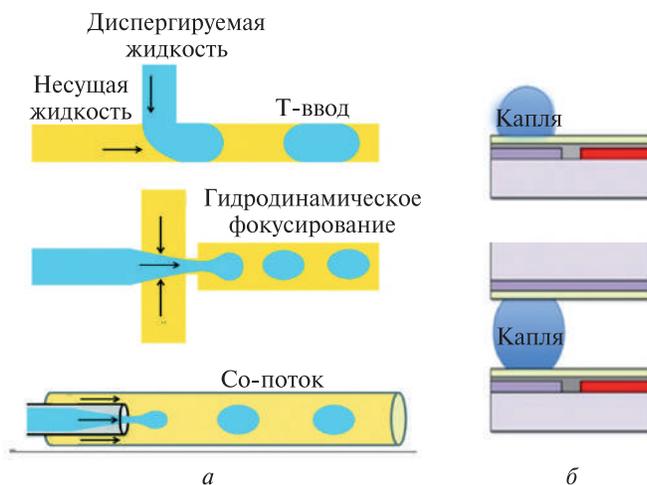


Рис. 77. Фрагмент капельного МФЧ:

а – с закрытыми каналами, в которых капли формируются различным образом двумя несмешивающимися жидкостями; *б* – с плоскими гидрофобными поверхностями, на которых формируются гидрофильные капли

В *капельных МФЧ с закрытыми каналами* монодисперсные капли образуются, если в канал втекают две несмешивающиеся жидкости. За образование капель ответственны силы поверхностного натяжения. Однако значение имеют также геометрия каналов, смачивающие свойства поверхности, вязкость и скорость потока, наличие поверхностно-активных веществ. Одна жидкость течет в канале непрерывно (управляется давлением), она называется несущей. Другая, поступающая в несущую, является жидкостью, образующей капли (диспергируемая).

Обычно для генерирования капель в микроканалах используют три конфигурации: Т-образный перекресток (Т-ввод), гидродинамическое фокусирование, со-поток (см. рис. 77).

В Т-образном вводе в основной канал поступает несущая жидкость, через перпендикулярный ему ввод – жидкость, генерирующая капли. Как правило, несущая жидкость является гидрофобной (инертное масло или его смесь с детергентами), вторая представляет собой водные растворы, т. е. эти жидкости – несмешивающиеся. Силы поверхностного натяжения стремятся уменьшить площадь их соприкосновения. Размер капель определяется скоростью несущей и диспергируемой жидкостей, силами поверхностного натяжения между двумя жидкостями, силами вязкости, геометрией каналов. Большое касательное напряжение (оно обусловлено силами трения) приводит к малым каплям. Используя сочетание системы каналов с последовательными Т-вводами, можно получить двойные эмульсии (масло – вода – масло или вода – масло – вода). Другой вариант генерирования капель базируется на замене несущей жидкости газом. В основной канал вводится газ, который делит поступающую через Т-ввод жидкость на капли.

При гидродинамическом фокусировании одна жидкость течет в центральном канале, а вторая несмешивающаяся – в двух симметричных каналах, перпендикулярных основному. Затем две жидкие фазы проходят через небольшое отверстие, расположенное ниже по потоку от трех каналов. Данный способ позволяет генерировать более маленькие капли с меньшим разбросом по размеру.

В методе совместных потоков (со-потоков) водная фаза проталкивается через капилляр, который расположен коаксиально внутри большего капилляра, через который прокачивается масло.

Капельные МФЧ имеют преимущества в сравнении с классическими МФЧ, а именно: меньший объем пробы (10^{-9} – 10^{-15} л) и расход реагентов, более быструю пробоподготовку, более высокую автоматизацию.

Капельная микрофлюидика делает возможным управление микрообъемами жидкости более удобным. Капельки представляют собой микрореакторы, внутри которых быстро происходит смешивание реагентов и легко контролировать кинетику реакций. Капли представляют собой герметичные капсулы внутри микроканалов, их легко сортировать. В целом чувствительность анализа с помощью капельных МФЧ значительно повышается. Они наилучшим образом подходят для проведения экспериментов с высокой пропускной способностью (до тысяч образцов в секунду).

Капельные МФЧ *планарного формата* с открытой структурой появились в 2000-е гг. Они представляют собой плоские пластинки с гидрофобной поверхностью (например, пластина из ПДМС покрыта слоем тефлона). Формирование на них гидрофильных (водных) капель базируется на силах поверхностного натяжения. Микрокапли раствора могут наноситься непосредственно на поверхность с помощью нанопипеток или извлекаться из микрорезервуара на поверхности чипа с помощью системы электродов. В качестве нанопипетки может быть пьезоэлектрический инжектор, позволяющий получить пиколитровые (10^{-12} л) капли. Микрокапельки в планарных чипах могут двигаться в двух направлениях (2D-движение). В твердую поверхность чипа интегрированы различные электроды и датчики, которые и позволяют перемещать капли по поверхности в про-

извольных направлениях и произвольной последовательности. Таким образом достигается полный контроль над перемешиванием и проведением любых экспериментов над каплями. Можно проводить очень быстрые реакции и в то же время сохранять возможность просчитать каждую молекулу в реакции.

По аналогии с цифровой микроэлектроникой данный вид МФЧ называют цифровыми (от англ. *Digital microfluidics*), так как в них каждая отдельная капля может контролироваться индивидуально. Используя дискретные капли (единичный объем от англ. *unit-volume*), можно переместить одну единицу объема на одну единицу расстояния. Этот метод «оцифровки» облегчает дизайн чипа, их легче изготовить. Цифровые чипы не требуют создания сложных систем каналов, клапанов, наносов в отличие от непрерывной микрофлюидики. Данные чипы легко комбинируются с различными детектирующими системами (электрохимическими, оптическими, масс-спектрометрическими), их широко используют на стадии пробоподготовки в МАЛДИ и электроспрейной масс-спектрометрии.

Цифровые МФЧ позволяют быстро выполнить различные операции с жидкостью. Время отклика снижается при увеличении концентрации аналита. Диапазон исследуемых концентраций составляет 10^{-15} – 10^{-18} М. Ограничения обусловлены только диффузией молекул к поверхности сенсора.

В целом капельная микрофлюидика нашла широкое применение в молекулярной биологии, синтезе наночастиц, фармацевтике. В молекулярной биологии стало возможным проводить масштабные генотипические или фенотипические скрининги на уровне отдельных клеток. Одиночные клетки включают в капли, где они испытывают серию реакций (своеобразный биореактор), и каждую такую каплю можно анализировать отдельно. Более того, весь протеомный или геномный анализ может быть выполнен в параллельном режиме с использованием минимального количества реагентов и тысяч отдельных клеток одновременно.

Капельная микрофлюидика позволяет синтезировать монодисперсные наночастицы, при этом микрокапли часто состоят из гидрогеля, который затвердевает после химической, термической обработки или под воздействием УФ-излучения.

Данную технологию используют для получения устойчивых монодисперсных эмульсий (краски, соусы для салатов, покрытия, доставка лекарств, косметические средства).

Широкие перспективы капельная микрофлюидика представляет для создания новых лекарств. Отдельные клетки млекопитающих или микроорганизмы с соответствующими реагентами заключаются в микрокапельки, что позволяет быстро оценить их реакцию на различные молекулы. Этот революционный подход к открытию лекарств позволяет фармацевтическим компаниям заново оценивать или переоценивать целые библиотеки молекул-кандидатов лекарств в рекордно короткие сроки.

Изготовление МФЧ состоит из нескольких этапов. В первую очередь идет разработка топологии и конструкции с помощью компьютера, затем подготовка заготовок. Далее следует создание микропрофиля, т. е. изготовление микро- и наноразмерных структур на подложке (лазерная и УЗ-обработка). В зависимости от поставленной задачи в МФЧ могут формироваться пленочные покрытия, поверхность каналов обрабатывается специальным образом (например, изменение свойств поверхностей путем создания шероховатостей). В завершение происходит

контроль параметров микро- и наноструктур, создание интерфейсных устройств и герметизация полученных каналов (термическая сварка, анодное соединение).

Основными методами изготовления МФЧ являются фотолитография, химическое травление, фрезерование, лазерная абляция, горячее тиснение, рентгеновская литография. Технологии создания МФЧ базируются на технологиях производства полупроводников на стеклянных и кремниевых подложках.

Основой производства большинства МФЧ является фотолитография. Суть процесса фотолитографии сводится к тому, что на обрабатываемую поверхность наносится фоторезист (материал, чувствительный к излучению видимого или УФ-диапазона) для получения рельефного покрытия определенной топологии. Формирование в слое фоторезиста, нанесенного на подложку, рельефных областей нужной конфигурации происходит в результате его локального экспонирования и последующего проявления. Экспонирование светом происходит через фотошаблон с заданным рисунком, который не пропускает излучения.

В качестве материалов для производства МФЧ служат полимеры, в первую очередь пластичный и оптически прозрачный полидиметилсилоксан, поликарбонат, полиметилметакрилат, а также стекло, кремний и даже бумага. Важными требованиями, предъявляемыми к материалу, являются инертность к реагентам и возможность обработки современными методами микротехнологии. Использование оптически прозрачных материалов в конструкции микрочипов дает возможность применять методы оптической микроскопии и спектроскопии.

Бумажные МФЧ появились в качестве простой в эксплуатации отдельной платформы для проведения сложных химических и биологических исследований. Особенностью данных чипов является то, что движением жидкости в их микроканалах управляют капиллярные силы и не требуются внешних насосов и источников энергии. Использование бумаги в качестве основного материала для производства МФЧ позволило производить доступные диагностические тесты (диагностика инфекций, контроль качества воды, стоков, продуктов) для экспресс-анализа в развивающихся странах. Такие МФЧ были применены в Африке в условиях, где нет электричества.

Бумажные МФЧ (квадраты размером 1 см²) после компьютерной разработки дизайна печатают на принтере. Каналы на гидрофильной целлюлозной бумаге создаются с помощью полос гидрофобного полимера (например, воска). В концах каналов бумага пропитана различными реагентами, при наличии/отсутствии аналита в пробе развивается окраска соответствующей зоны. Цвет зоны может соответствовать таковому на шкале цвета по принципу действия лакмусовой бумажки (рН-тест). Конечно, учитывают, что бумага не может выдержать воздействия агрессивных сред.

Базовые теоретические принципы микрофлюидики. Микрофлюидика – междисциплинарная область знаний, возникшая в начале 80-х гг. XX в. на пересечении инженерии, физики, химии, биологии, микро- и нанотехнологии, биотехнологий. Предметом микрофлюидики является изучение поведения, манипуляции и точный контроль жидкостей (фемтол-мкл) в сети каналов с параметрами от десятков до сотен микрометров. Благодаря использованию малых объемов жидкостей микрофлюидика позволяет выполнять полные лабораторные протоколы на одном чипе площадью в несколько квадратных сантиметров.

Формированию микрофлюидики как отдельной области в анализе способствовали достижения в развитии микроаналитических методов – капиллярной газовой и жидкостной хроматографии и капиллярного электрофореза. Успехи, достигнутые этими методами, послужили основой для развития и применения новых, более компактных и более универсальных микромасштабных методов в химии и биохимии.

Поведение жидкости в микрофлюидных системах отличается от такового в макроскопических системах. Одно из важнейших отличий обусловлено различием в *режиме движения жидкости* в микро- и макроканалах. В микрофлюидных системах наблюдается ламинарный режим течения жидкости, в то время как для макросистем характерен турбулентный.

При ламинарном течении частицы жидкости перемещаются параллельными струями (слоями) вдоль стенки канала, не перемешиваясь между собой (т. е. отсутствует поперечное передвижение частиц) и плавно обтекая встречающиеся препятствия. Турбулентным называется течение, сопровождающееся интенсивным перемешиванием жидкости с пульсациями скоростей и давлений. Наряду с основным продольным движением жидкости наблюдаются поперечные перемещения и вращательные движения отдельных объемов жидкости.

При ламинарном течении жидкости в каналах чипа частицы перемещаются только в направлении основного потока (скорость в поперечном направлении близка к нулю). Вследствие этого при ламинарном режиме смешивание жидкостей затруднено и происходит преимущественно за счет *диффузии*. В макроканалах смешивание происходит за счет конвекции. Ламинарность течения жидкости позволяет высокую степень контроля потока. Возможен точный расчет транспортируемых масс веществ к различным точкам микрофлюидной системы в зависимости от геометрии каналов, свойств жидкости. Ламинарность потоков и диффузия в комбинации могут обеспечивать создание градиентов веществ в микрофлюидных системах.

В микроканалах размер реактора может быть экстремально малым, а значит, расстояние для диффузии молекул очень короткое. Поэтому диффузионно-контролируемые химические реакции протекают быстрее, чем в макроскопических сосудах. Например, иммуноанализ в МФЧ может протекать за 25 с в отличие от классического метода, требующего 10 мин и более.

Большое *отношение площади поверхности к объему* в МФЧ ($S/V \sim 10^3 - 10^9 \text{ м}^{-1}$) создает оптимальные условия для диффузии и теплового обмена. Маленькие объемы жидкости почти мгновенно примут температуру окружающей среды, т. е. остынут или нагреются за очень короткое время. Возможность быстрого испарения жидкости используют для концентрирования образца, а также для транспортировки жидкости посредством так называемого испарительного насоса (англ. *evaporation pump*).

Микрофлюидика характеризуется сильным влиянием *состояния поверхностей и поверхностных явлений* на потоки жидкости. Поверхностные эффекты служат инструментами управления анализом в микроканалах. В микроразмерных системах начинают доминировать силы поверхностного натяжения, капиллярные, вязкие, они превосходят силу тяжести. Такие силы, в зависимости от их направления и природы, могут перемещать жидкость вдоль, вверх или поперек канала либо даже заблокировать ее движение.

Поверхностные электрокинетические эффекты обуславливают высокую эффективность электрофоретического разделения за малое время анализа за счет воспроизводимого создания сверхкоротких (десятки микрон) зон ввода пробы.

Шероховатость поверхности оказывает влияние на поток жидкости (эффекты сопротивления потоку, взаимодействия с частицами и т. п.). Неровности поверхности можно изготовить технологически и заранее усилить то или иное свойство участка поверхности в микроканале. Например, если поверхность канала гидрофобная, то создание на ней неровностей усиливает ее фобность; если гидрофильная – ее фильность.

В МФЧ из-за микроразмеров каналов *седиментация* становится мощным инструментом (без использования центрифуги) для разделения диспергированных частиц по плотности. Частицы пробы, более тяжелые, чем окружающая жидкость, опускаются на дно канала очень быстро. Например, красные клетки крови седиментируют в канале с глубиной 100 мкм примерно за одну минуту и в результате генерируют слой плазмы толщиной 50 мкм.

Достоинством и потенциалом МФЧ является *пассивное управление потоками*. Это заключается в возможности создавать доступные автономные устройства для анализа, не требующие никаких внешних источников питания или инструментов, однако выполняющих многие, если не все, стадии анализа. Принцип действия таких МФЧ базируется на влиянии свойств жидкости и ее микросреды (капиллярные явления, смачивание, теплопередача, диффузия и т. д.) на транспортировку жидкости, смешивание, нагревание/охлаждение, протекание химических реакций.

Пассивные микрожидкие устройства с интегрированным детектором, ввиду того что требуют для анализа малых количеств пробы, открывают перспективу создания микрочипов для проведения видов анализа, выполняемых в настоящее время только в лабораториях. Например, в области медицинской диагностики это могут быть МФЧ для экспресс-анализа холестерина, антител в случае инфекционных болезней и т. д.

В целом характер процессов (тепло- и массообмен, химические реакции), происходящих в потоке в микроканалах МФЧ, зависит от гидродинамического режима течения жидкости и соотношения различных сил – поверхностного натяжения, капиллярных, вязких и инерции. Для того чтобы понимать, какие силы управляют флюидами и движением частиц в МФЧ, используют определенные параметры – числа Рейнольдса, Пекле, Вебера и капиллярное число.

Число Рейнольдса (Re) позволяет судить о гидродинамическом режиме течения жидкости в МФЧ. Данный критерий предложен английским физиком О. Рейнольдсом (1842–1912), который изучал характер движения жидкостей по круглым трубам. Ученый предположил, что устойчивость ламинарного течения зависит от соотношения сил вязкости (трения) и инерции, он получил безразмерную величину, которую впоследствии (1919) стали называть его именем – числом Рейнольдса.

Жидкость в потоке обладает импульсом («инерционной силой»). По сути, это означает, что движущаяся жидкость стремится продолжить свое движение с прежней скоростью. В вязкой жидкости этому препятствуют силы внутреннего трения между слоями жидкости, стремящиеся затормозить поток. Число Re

как раз и определяет относительную роль инерции и вязкости жидкости при течении, т. е. режим движения жидкости. Высокие значения числа Re описывают турбулентный режим движения, когда силы вязкости относительно малы и в потоке преобладают силы инерции. Малые значения числа Re соответствуют ситуации, когда вязкие силы гасят турбулентность, делая поток ламинарным (слоистым).

Число Рейнольдса выражается формулой, в которой инерционные силы представлены в числителе, а вязкие – в знаменателе:

$$Re = \frac{\rho v L}{\eta},$$

где v – средняя скорость жидкости (например, по сечению канала), м/с; L – характерный размер сечения потока, обычно равен гидравлическому радиусу канала или эквивалентному диаметру $D_H = 4A/P$, где A – площадь поперечного сечения потока в канале, P – смачиваемый периметр канала, м; η – динамическая вязкость несущей жидкости, Па·с; ρ – плотность жидкости, кг/м³.

Низкие значения числа Re можно получить, либо увеличивая вязкость жидкости, либо снижая масштаб длины. Большинство микрофлюидных устройств имеют число Re меньше пяти или единицы, в таком режиме поток абсолютно ламинарный и никакая турбулентность не происходит. Переход к турбулентному течению обычно происходит в диапазоне числа $Re = 2000$. Ламинарное течение обеспечивает средство, которое позволяет транспортировать молекулы через микроканалы относительно предсказуемым способом.

Однако, увеличивая размер канала и/или скорость потока так, чтобы число Re стало порядка 10, не только вязкие силы управляют скоростью потока, но и инерция играет определенную роль (т. е. возникает некоторая турбулентность). Это может наблюдаться в каналах чипа, где поток жидкости регулируется простыми клапанами, действие которых обусловлено различной геометрией.

Важным параметром, который характеризует массоперенос в микроканалах МФЧ, является *число Пекле* (Pe). Массоперенос зависит от скорости несущего потока, размера каналов и природы исследуемого объекта. В движущейся среде перемещение вещества из одной зоны в другую (например, при протекании химической реакции между двумя реагентами) в МФЧ возможен как за счет молекулярной диффузии, так и конвекции. Молекулярная диффузия возникает при наличии разности концентраций вещества в жидкости, перенос осуществляется из области с высокой концентрацией в область с низкой. Конвекция обусловлена тем, что частицы вещества, растворенного в жидкости, увлекаются последней в процессе ее движения и перемещаются вместе с ней. В данном случае вещество переносится самой средой в направлении ее движения или отдельными ее частицами в разнообразных направлениях (поперек движения).

Число Pe используют для сравнения вклада конвекции и диффузии в перенос вещества, оно определяет меру переноса масс за счет каждого механизма. Число Пекле (безразмерная величина) выражают формулой

$$Pe = \frac{vL}{D},$$

где v – средняя скорость жидкости, м/с; L – характерный размер сечения потока; D – коэффициент диффузии, м²/с.

Если число Pe большое (>1), то конвекция становится основной, если маленькое (<1), то преобладает диффузия.

Особенностью МФЧ наряду с тем, что вязкие силы становятся преобладающими в микроразмерных каналах, является то, что диффузия выступает главным механизмом для транспорта, смешивания флюидов и контроля скорости реакции. Зная коэффициенты диффузии молекул/частиц и размеры каналов в МФЧ, можно устанавливать контролируемый градиент концентрации в потоке жидкости. Например, небольшой белок (размер 5 нм) с коэффициентом диффузии $D = 40 \text{ мкм}^2/\text{с}$ дистанцию в 50 мкм пройдет за 30 с, а клетка (размер 10 мкм) с $D = 0,2 \text{ мкм}^2/\text{с}$ – за 1000 мин.

Для капельных МФЧ, в которых используются двухфазные системы, важное значение имеют числа Вебера и капиллярное.

Число Вебера (We) характеризует соотношение сил инерции и сил поверхностного натяжения. Его можно выразить через следующее уравнение:

$$We = \frac{\rho v^2 L}{\sigma},$$

где v – средняя скорость жидкости, м/с; L – характерный размер сечения потока; σ – коэффициент поверхностного натяжения между двумя фазами, Н/м.

Капиллярное число (Ca) отражает соотношение вязких сил и сил поверхностного натяжения, действующих на границе двух несмешивающихся жидкостей. Данный безразмерный параметр особенно важен для формирования капель в капельных МФЧ с закрытыми каналами. Оно выражается следующей формулой:

$$Ca = \frac{v\eta}{\sigma},$$

где η – динамическая вязкость несущей жидкости, Па с; v – средняя скорость несущей жидкости, м/с; σ – коэффициент поверхностного натяжения между несущей и диспергируемой фазами, Н/м.

Поскольку силы сопротивления вязкой жидкости (англ. *viscous stress* – вязкое напряжение) представляют собой деструктивную силу, а поверхностное натяжение действует как связывающие силы, капиллярное число может считаться мерой (показателем) когезии (сцепления) капельки. Например, в МФЧ с закрытыми каналами и Т-вводом существует два режима формирования капель в зависимости от величины капиллярного числа. При большом числе Ca ($>10^{-2}$) образование капелек происходит в результате действия вязких сил («капельный» режим от англ. *dripping regime*). Две несмешивающиеся жидкости формируют интерфейс на соединении главного и бокового каналов, через который подается диспергируемая жидкость. Поток жидкости из бокового канала проникает в жидкость в главном канале, капелька начинает расти под эффектом вязких сил (вязкое напряжение сдвига преодолевает межфазное натяжение). Если капиллярное число выбрано достаточно большим, капли испускаются, прежде чем они смогут заблокировать канал.

Для низких значений числа Ca , когда силы поверхностного натяжения доминируют над вязкими, диспергируемая жидкость при входе в несущую испытывает действие сил сжатия, обусловленных межмолекулярными силами притяже-

ния. Они способствуют отделению капли от входящего основного потока (режим «сжатия» от англ. *squeezing regime*). Образующаяся капля будет закупоривать канал и, следовательно, ограничивать движение непрерывной фазы. Это приводит к резкому увеличению гидродинамического давления в верхней части канала перед концом диспергируемой фазы, что, в свою очередь, вызывает окончательное отщепление (англ. *the pinch-off*) капельки. В «капельном» режиме образуются почти сферические капельки, в то время как в режиме «сжатия» – пробковидные.

2.8. АНАЛИТИЧЕСКИЕ ОПЕРАЦИИ, ВЫПОЛНЯЕМЫЕ В МИКРОФЛЮИДНЫХ ЧИПАХ

Для проведения полного анализа пробы нужно знать, как в каналах МФЧ осуществляются ввод, транспортировка проб и реагентов, перемешивание реагентов, фильтрация, экстракция и концентрирование проб, разделение компонентов проб и продуктов реакции, детектирование искомым анализом.

2.8.1. Ввод, перемешивание, экстракция, фильтрация и концентрирование проб в МФЧ

Введение пробы в классические каналы МФЧ может осуществляться посредством внешних источников давления, внешними механическими насосами или встроенными микронасосами, посредством комбинирования электрокинетических механизмов и капиллярных сил, а также с помощью импульсного ультразвука.

МФЧ, базирующиеся на капиллярных явлениях, были первыми микрофлюидными платформами, которые были описаны и коммерциализированы. Капиллярный ввод пробы не требует насосов, что удешевляет систему в целом.

Наиболее технологичным и автоматизируемым способом считается электрокинетический ввод. Варьируя величины управляющих потенциалов, можно обеспечить реализацию режимов: загрузки пробы, дозирования и смешивания ее с реагентами, а также сепарации полученного продукта в соответствующих микрофлюидных структурах. Метод базируется на движении частиц пробы в электрическом поле в соответствии с их зарядом и массой (т. е. с их электрофоретической подвижностью). Самой простой топологией инжектора является система в виде креста из двух пересекающихся каналов – подводящего и сепарационного. При заполнении системы буферным раствором и последовательной подаче напряжения на подводящий, а затем на сепарационный канал создается электрокинетический поток, с помощью которого проба вводится в область пересечения каналов.

Гидродинамический ввод обусловлен созданием гидростатического давления из-за разницы в уровнях жидкости в канале и резервуаре. Существует два способа подачи флюидов в классические МФЧ – инъекция и погружение. Способ инъекции реализуется подведением и герметичным присоединением к чипу, например трубки из кремниевой резины, через которую определенным способом (например, шприцем) подается жидкость. Способ погружения подразумевает

помещение части чипа, содержащей входное отверстие, связанное с каналом, в емкость с пробой или реагентом, в результате чего данный флюид попадает в определенный канал МФЧ.

Ввод с помощью акустических волн (англ. *Acoustic droplet ejection, ADE*) базируется на использовании импульсного ультразвука для перемещения малых объемов жидкости без какого-либо физического контакта. В основе технологии лежит передача ультразвуковой энергии жидкому образцу для формирования и отрыва капелек объемом пикол. Чтобы извлечь капельку, датчик генерирует и передает акустическую энергию пробе. Когда акустическая энергия сосредоточена вблизи поверхности жидкости, образуется бугорок из жидкости и капля катапультируется. Жидкость, выбрасываемая из пробы, захватывается сухой пластиной (или лункой планшета), расположенной над резервуаром с пробой.

Диаметр капелек обратно пропорционален частоте акустической волны – более высокие частоты генерируют меньшие капельки. Особенностью метода является то, что не требуются пипетки и инструменты, касающиеся исходной жидкости или поверхностей назначения. Способы введения пробы, основанные на формировании капелек через отверстие, например пипетки или тонкого капилляра, неизменно теряют точность, когда объем задаваемой пробы снижается. Бесконтактная акустическая передача малых объемов жидкости обеспечивает более низкий коэффициент вариации, чем другие техники отбора.

Данная технология может быть использована для транспортировки белков, ДНК и клеток без их повреждения и потери жизнеспособности. Поэтому она подходит для широкого спектра приложений, в том числе в области анализа протеома и клеток.

Перемешивание реагентов. В МФЧ оно может быть пассивным, без использования источников энергии, и активным, базирующимся на применении внешних сил, приложенных к образцам. При этом имеют значение геометрия каналов, топология и пористость их поверхности, а также свойства поверхности – гидрофильность/гидрофобность, наличие поверхностного заряда, химическое сродство к определенным веществам и т. д.

Пассивное перемешивание в ламинарных потоках происходит только за счет молекулярной диффузии. Поэтому один подход заключается в усилении диффузионного эффекта благодаря увеличению времени или площади контакта смешиваемых образцов. Другой – базируется на эффектах хаотической адвекции (перемешивание в горизонтальном направлении), что реализуется путем манипулирования ламинарными потоками внутри микроканалов с различной геометрией или топологией поверхности.

Один из самых простых методов пассивного перемешивания реализуется с использованием Т- или Y-образных микроканалов (рис. 78, а), состоящих из двух входов и одного выхода. Смешивание происходит в общем канале на поверхности контакта между двумя жидкостями и сильно зависит от процесса диффузии, протекающего на границе раздела. Время смешивания для этого типа миксера довольно велико. Процесс можно контролировать путем изменения скорости потока жидкости. Замедление потока увеличивает время перемешивания, и наоборот, при высоких скоростях время сокращается.

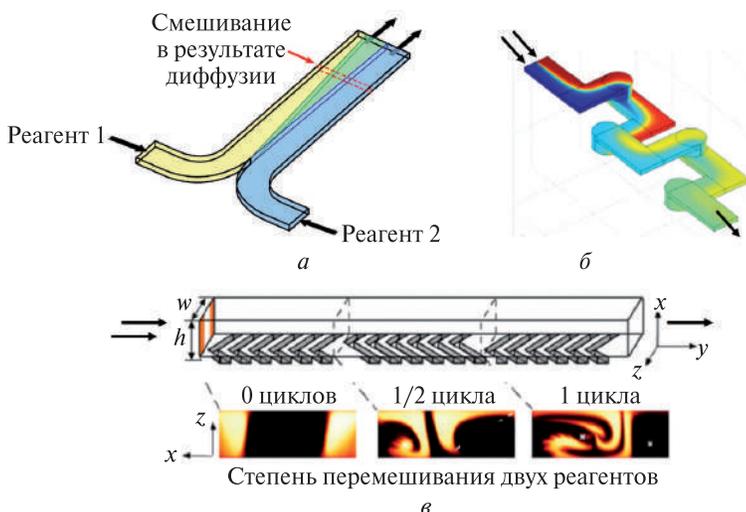


Рис. 78. Пассивное перемешивание в МФЧ:
a – в Т-образном смесителе; *б* – в зигзагообразном микроканале;
в – в каналах с заданной топологией, введение канавок в смесительный канал увеличивает эффективность процесса и сокращает время

Другим методом пассивного перемешивания является метод ламинирования, которое достигается разделением одного канала на множество тонких параллельных каналов и последующим их объединением. В них два (или более) потока жидкости разделяются на множество субпотоков и затем снова соединяются (рис. 75). Это позволяет увеличить площадь контакта между потоками и сократить путь диффузии, что способствует ускорению процесса. Чем больше каналов задействовано, тем быстрее происходит перемешивание. Время процесса обратно пропорционально квадрату количества субпотоков.

Хаотическая адвекция осуществляется в каналах с совокупностью бороздок на дне или в каналах зигзагообразной формы (рис. 78, *б*, *в*), где происходит попеременное сжатие – растяжение жидкостей, что приводит к их перемешиванию. Такая же геометрия используется и в капельных канальных МФЧ, циклы сжатие – растяжение внутри капли, переориентация потоков в ней способствуют перемешиванию за субмиллисекунды.

В радиальных чипах для перемешивания используется центробежная сила. Удержание жидкости в CD-МФЧ осуществляется с помощью «пассивных» капиллярных клапанов (рис. 79).

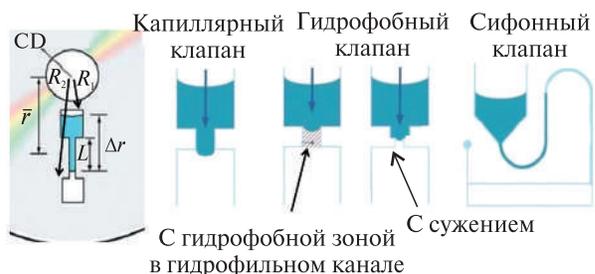


Рис. 79. Виды пассивных капиллярных клапанов в CD-МФЧ

Капиллярные запорные клапаны для остановки жидкости базируются на изменении геометрии канала. Их действие основано на уравнивании капиллярной силы (вследствие межфазного натяжения жидкости) и центробежной силы:

$$\omega = \frac{\sigma \cos \theta_c}{\sqrt{\pi^2 \rho \Delta r \bar{r} d_H}},$$

где ω – угловая скорость CD-платформы, рад/с; σ – сила поверхностного натяжения; θ_c – угол контакта между жидкостью и стенкой капилляра; ρ – плотность жидкости; $\Delta r = (R_2 - R_1)$ – разница между верхним (R_1) и нижним (R_2) уровнями жидкости в покое по отношению к CD-центру; \bar{r} – среднее расстояние жидкости от CD-центра, d_H – гидродинамический диаметр канала.

Когда скорость вращения увеличивается, центробежная сила превышает капиллярную силу и жидкость начинает двигаться и вытекает из одного резервуара в другой. Частота вращения, при которой центробежная сила преодолевает капиллярную силу, чтобы «открыть» клапан и выпустить жидкость, обычно называется частотой «взрыва» (англ. *the burst frequency*). Правильное размещение резервуаров на CD-МФЧ в сочетании с надлежащей сетью соединительных каналов позволяет контролировать последовательность потока.

Пассивные капиллярные клапаны могут быть гидрофобными, гидрофильными или сифонными (см. рис. 79). Гидрофобный клапан обычно представляет собой либо гидрофобный канал с сужением, либо сегмент гидрофобного материала, включенного в конкретную зону в гидрофильном канале. Гидрофильный клапан состоит из гидрофильного капилляра, который имеет внезапное расширение, например, когда узкий канал открывается в более широкий резервуар.

Активное перемешивание базируется на использовании внешних источников энергии. Это могут быть встроенные пьезоэлементы, генерирующие поверхностные ультразвуковые (УЗ) волны (происходит передача энергии УЗ капле жидкости, в результате перемешивание осуществляется за счет радиационного давления), наложение электрического поля посредством электродов, что изменяет энергию поверхности чипа. Для перемешивания также используют локальное повышение температуры (встроенные термоэлементы), что способствует возрастанию диффузии и снижению вязкости жидкости. Однако при активном способе перемешивания нужно точно рассчитывать приложенную силу, так как биологические образцы чувствительны к внешним воздействиям и изменениям температуры.

Экстракция, фильтрация и концентрирование в МФЧ. В основе простого способа *экстракции* веществ из водных растворов в органическую фазу в МФЧ лежит механизм диффузии. Например, в Н-канал поступают два потока жидкости, верхний представляет собой суспензию криозамороженных клеток, нижний – жидкость для отмывки клеток от криоконсерванта (ДМСО). В данном случае молекулы ДМСО диффундируют с верхнего потока в нижний. Важными являются геометрические параметры (особенно ширина) канала и ламинарность потоков жидкостей.

Пассивные методы фильтрации базируются на молекулярной диффузии (Н-фильтры), капиллярных (например, гидрофобные барьеры) и магнитных силах, применении микромембран, микросит и фильтров с определенной геометрией.

Принцип Н-фильтра базируется на том, что в центре устройства (перемычка в букве Н) потоки текут параллельно, за транзитное время протекания этой дистанции для малых молекул диффузия достигает равновесия, для больших – нет (рис. 80, а). Для эффективной фильтрации нужно знание коэффициентов диффузии молекул и задание определенных геометрических параметров Н-канала.

Применение каналов с различной геометрией (например, траншеи, ступени) также способствует эффективной сепарации компонентов проб (рис. 80, б). Разделение компонентов проб внутри микроканалов МФЧ может осуществляться с использованием различных наноструктурных материалов. В качестве последних могут быть встроены нанопористые мембраны, ряды из нанокколонок (рис. 80, в).

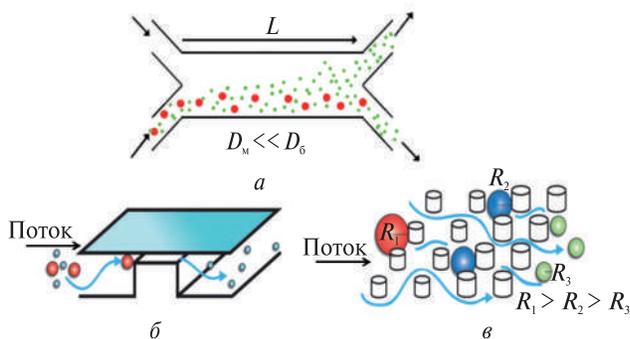


Рис. 80. Пассивные способы фильтрации в МФЧ, базирующиеся на применении Н-образного канала (а), канала с определенной геометрией (б), нанокколонок

Одним из *активных способов фильтрации* частиц является метод акустофореза, базирующийся на применении УЗ-волн для разделения частиц. Для этого в канале МФЧ размещают УЗ-преобразователь, а именно в одну стенку проточного канала встраивается пьезоэлемент (источник акустических волн), приводимый в действие переменным напряжением, а на противоположную – отражатель УЗ-волн (рис. 81). В результате в канале генерируется поле стоячей УЗ-волны с узлами и пучностями переменного акустического давления, расположенными в поперечном сечении канала. В узлах и пучностях соответственно возникает отрицательная и положительная акустическая радиационная сила.

Акустофоретическая сила способна фокусировать частицы (макромолекулы, клетки, вирусы) только в узлах давления или пучностях, которые статичны вдоль сечения канала. При этом данный метод практически не оказывает влияния на выживание или функцию клеток. На величину и направление силы влияет размер частиц, соотношение плотности и сжимаемости частицы по сравнению с плотностью и сжимаемостью окружающей среды. После выравнивания в звуковом поле различные частицы могут быть собраны в отдельные выходы. Как правило, большие частицы концентрируются в узлах, а малые – в области пучностей. Полученное разделение частиц сохраняется в дальнейшем благодаря ламинарности потоков. Это не позволяет перемешиваться слоям жидкости с разделенными частицами.

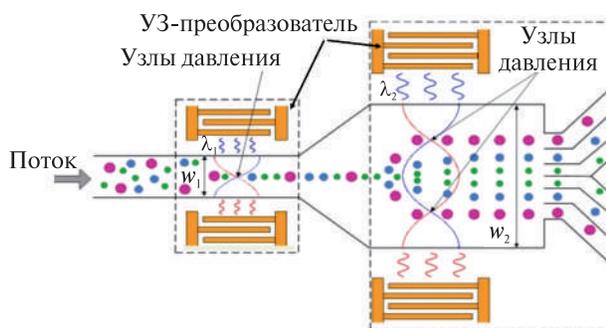


Рис. 81. Фрагмент МФЧ-канала со встроенными УЗ-преобразователями, генерирующими акустофоретическую силу для разделения частиц

Другим активным способом разделения частиц внутри каналов МФЧ является использование магнитных наночастиц с иммобилизованными на поверхности биомолекулами, способными вылавливать аналиты из потока пробы. Магнитными частицами легко управлять, что позволяет эффективно разделять и концентрировать компоненты пробы.

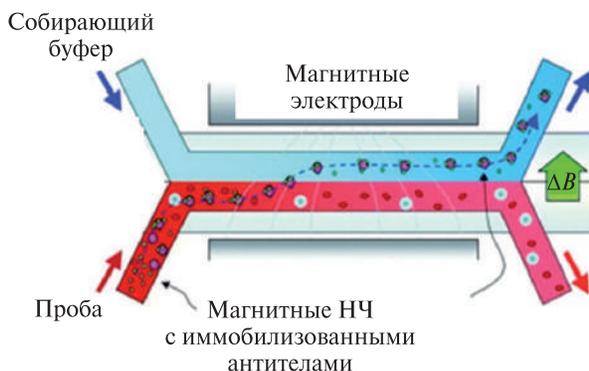


Рис. 82. Концентрирование пробы в МФЧ-канале с помощью магнитных НЧ, конъюгированных с антителами, специфически улавливающих аналиты из потока пробы

В МФЧ применяют различные активные методы *концентрирования* пробы, которые также используют для разделения компонентов. Они базируются на техниках капиллярного электрофореза (например, стэкинг, изофокусирование), диэлектрофореза (см. ниже), магнитном сепарировании (рис. 82) и др. Пассивное концентрирование пробы в МФЧ может осуществляться, если в канал встроен так называемый микроиспаритель. Он может представлять собой фрагмент поверхности канала из полидиметилсилоксана, в котором просверлены микроотверстия. При прохождении потока жидкости вдоль этого сегмента происходит испарение жидкости через отверстия и, соответственно, концентрирование пробы.

2.8.2. Методы транспортировки жидкости в МФЧ, детектирование

Работоспособность приборов на основе микрофлюидики, включая МФЧ, в решающей степени зависит от управления движением жидкости. Для транспортировки реагентов, растворов проб и т. п. используют различные методы: электрокинетические, гидродинамические, акустические, основанные на действии сил поверхностного натяжения (капиллярных) или магнитных сил.

Электрокинетические методы управления движением жидкости и частиц в МФЧ базируются на использовании электрофореза, электроосмотического потока и диэлектрофореза.

Электрофоретическое разделение базируется на различной подвижности заряженных частиц (в соответствии с их массой и зарядом) в водном растворе под действием внешнего постоянного электрического поля. Данный способ не подходит для разделения в целом нейтральных частиц (рис. 83). Электрофорез проводят в однородном электрическом поле (напряженность поля E одинакова во всех точках пространства), для создания которого в микроканалы интегрируют электроды.

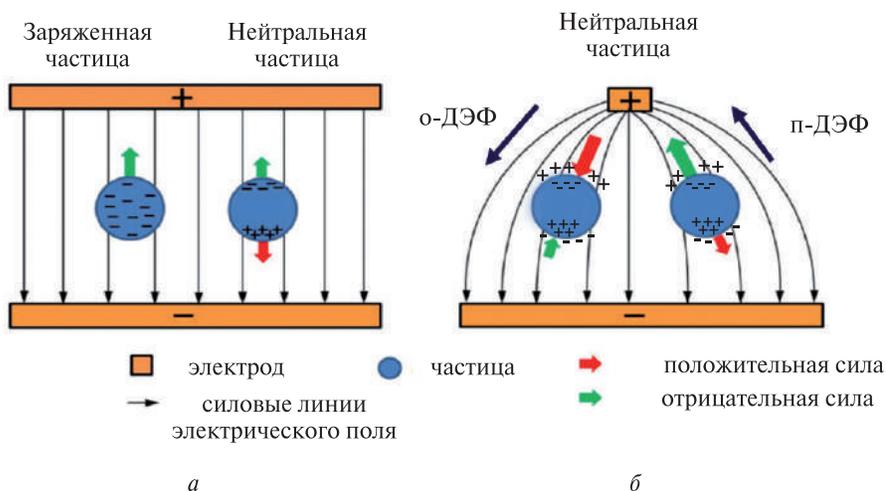


Рис. 83. Схема разделения частиц с помощью электрофореза (а), диэлектрофореза (б)

В качестве материалов для производства МФЧ в основном используют стекло или кремнийорганический полимер ПДМС. Поэтому в каналах таких чипов, как и в случае кварцевых капилляров, используемых в капиллярном электрофорезе, стенки несут заряд. Следствием этого является образование электроосмотического потока (ЭОП), за счет которого и происходит миграция частиц внутри каналов. ЭОП — это течение жидкости в капилляре под действием приложенного электрического поля. Физико-химическая модификация поверхности ПДМС-каналов позволяет придать им необходимые свойства для регулирования и стабилизации ЭОП.

Для управления движением частиц в МФЧ широкое применение нашел такой метод, как диэлектрофорез (ДЭФ). ДЭФ – это техника перемещения и разделения частиц в *неоднородном* электрическом поле, вызванного взаимодействием между вынужденным (индуцируемым) диполем в частице и внешним электрическим полем. Она подходит для разделения нейтральных частиц, в частности целых клеток, бактерий, вирусов, макромолекул. Феномен, названный диэлектрофорезом, был описан еще в начале XX в., однако был понят и назван Г. Полем только в 1951 г.

При воздействии электрического поля на поляризуемую частицу в частице индуцируется дипольный момент:

$$(+; -)p = qD,$$

где q – заряд; D – диаметр частицы.

Суммарная диэлектрофоретическая сила (F), действующая на частицу с распределенным зарядом q в неоднородном электрическом поле с напряженностью E , может быть выражена следующим образом:

$$F = p\nabla E,$$

где ∇ – векторный набла-оператор; p – дипольный момент частицы.

ДЭФ-сила возникает только в случае неоднородных полей. В остальных случаях она равна нулю. ДЭФ-сила зависит от электрических свойств частиц, ее формы и размера, свойств окружающей ее среды, величины и степени неоднородности приложенного электрического поля (градиент амплитуды или фазы).

Наиболее простым способом создания неоднородного электрического поля является применение электродов различной формы. Современные методы микро- и нанотехнологий позволяют получить любую геометрию электродов требуемых размеров. Самыми распространенными конструкциями являются сочетания пластинчатых и игольчатых электродов (см. рис. 83). Вблизи пластинчатого электрода формируется электрическое поле с меньшей напряженностью, а у игольчатого – с большей.

ДЭФ-сила перемещает частицу к области с высокой или низкой напряженностью поля (в направлении градиента поля или против него) в зависимости от ее поляризационных свойств по сравнению с окружающей средой. Если поляризуемость частицы выше, чем окружающей ее среды, то сила направлена к области с высокой напряженностью поля (положительный п-ДЭФ), в противном случае – с более низкой напряженностью (отрицательный о-ДЭФ) (см. рис. 83).

В МФЧ-каналы могут встраиваться системы из различных электродов, которые позволяют селективно разделять частицы пробы и концентрировать их (рис. 84). ДЭФ-техника широко используется для разделения вирусов, например герпеса и табачной мозаики. Вирус герпеса имеет отрицательный ДЭФ, в этой области частицы удерживаются слабее, а вирус табачной мозаики – положительный ДЭФ. После разделения вирусов происходит их последовательное удаление. Сначала удаляются вирусы из области с минимальной напряженностью поля, т. е. области отрицательного ДЭФ, простой промывкой жидкостью. Затем после выключения поля – из области с максимальной напряженностью поля.

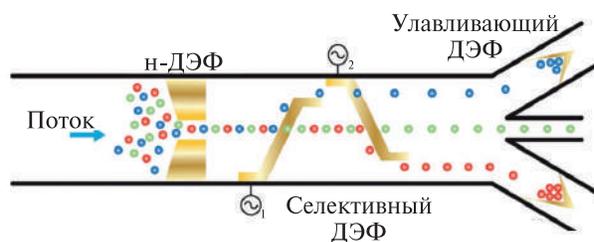


Рис. 84. МФЧ-канал с системой электродов для диэлектрофоретического разделения частиц пробы

Капиллярные явления также находят применение для перемещения жидкости и частиц в МФЧ. Ранее показано (см. рис. 79), что капиллярные клапаны создают для регулирования транспорта жидкости в *радиальных* МФЧ. Один из способов перемещения жидкости в каналах МФЧ, основанных на капиллярных силах, использует эффект Марангони, или Гиббса – Марангони (англ. Marangoni effect, или the Gibbs – Marangoni effect). Это явление заключается в переносе вещества вдоль границы раздела двух сред под действием тангенциальных капиллярных сил, обусловленных наличием вдоль поверхности градиента сил поверхностного натяжения. Явление было подробно изучено К. Марангони в 1865 г., но теоретически объяснено Д. У. Гиббсом в 1875 г.

Градиент поверхностного натяжения может быть вызван изменением температуры (поверхностное натяжение – функция температуры), градиентом концентрации. При наличии градиента поверхностного натяжения течение жидкости происходит из области малых значений поверхностного натяжения в область больших. Чем больше у жидкости поверхностное натяжение, тем с большей силой она стягивается. Эффект Марангони можно продемонстрировать, если получить тонкую пленку воды на гладкой поверхности и затем в ее центр нанести каплю спирта, например изопропанола. Поскольку поверхностное натяжение изопропанола меньше, чем воды, в системе возникает течение Марангони, направленное от центра капли к ее краям, т. е. вода будет двигаться из области нанесения капли спирта.

Эффект Марангони в случае зависимости от температуры называют термокапиллярной конвекцией (англ. *thermo-capillary convection*) (рис. 85). В условиях постоянной силы гравитации термокапиллярное движение, как правило, подавляется. Эффект Марангони перекрывается конвекцией жидкости под действием силы тяжести вдоль градиента плотности. Однако в случаях микропотоков эффект Марангони играет важную роль. В объемах жидкости, имеющих относительно протяженную свободную поверхность и малый вертикальный размер, таких как небольшие капли, тонкие горизонтальные слои и пленки жидкости, объемные силы оказываются малы по сравнению с поверхностными. В этих случаях конвекция Марангони способна вносить существенный вклад в процессы тепло/массообмена, а также влиять на форму свободной поверхности, вызывая поверхностные деформации и даже перемещения всего объема жидкости в целом. Поток Марангони может образовываться внутри микроканалов с замкнутой многофазной средой или сверху жидкой пленки в открытых микрофлюидных системах.

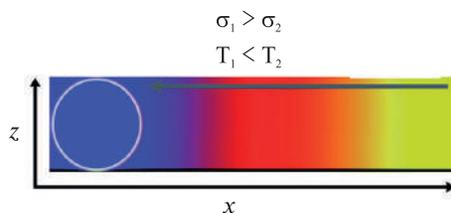


Рис. 85. Иллюстрация термокапиллярного эффекта Марангони в МФЧ: источник тепла нагревает жидкость в микроканале на одной стороне, вызывая тепловой и, следовательно, градиент поверхностного натяжения, в результате жидкость перемещается вдоль поверхности из области высокого поверхностного натяжения в область низкого

Капиллярные эффекты (например, Марангони) также широко применяют для управления движением жидкости в капельной микрофлюидике. Помимо этого, для приведения капелек в движение используют такие явления, как электросмачивание и оптоэлектросмачивание.

Электросмачивание на диэлектрике (англ. Electrowetting-on-Dielectric, EWOD) является одним из наиболее употребимых методов для управления движением и смешивания капелек в цифровых МФЧ. Эффект электросмачивания проявляется в изменении коэффициента смачивания поверхности под воздействием электрического поля или тока. Явление было открыто во второй половине XIX в. французским физиком Г. Липпманом. Суть его заключается в следующем: капля проводящей жидкости (например, буфер) помещается на металлическую подложку, покрытую тонким водоотталкивающим слоем диэлектрика. Благодаря силам поверхностного натяжения на водоотталкивающей поверхности капля принимает форму, близкую к шарообразной. Угол смачивания поверхности (θ) находится в пределах $90^\circ < \theta < 180^\circ$. Если к электроду внутри капли и к электроду под водоотталкивающим изолятором приложить разность потенциалов, смачиваемость поверхности усилится ($0^\circ < \theta < 90^\circ$) и капля растечется. После снятия напряжения капля опять соберется в шарик.

В МФЧ используют два вида устройств электросмачивания (см. рис. 77). Один вид МФЧ представляет собой открытую поверхность со слоем диэлектрика, покрытого, в свою очередь, гидрофобной пленкой (например, тефлона) (рис. 86). Под этот слой встроена двумерная сетка микроэлектродов (англ. *pixelated electrodes*), которую используют для активации капель. Минимальный объем жидкости, который они могут активировать, ограничен областью электродов. Капельки, меньшие чем электрод, не могут быть приведены в действие этими устройствами. Объем капельки колеблется от десятков нанолитров до нескольких микролитров. При подаче напряжения на определенные электроды (от 15 до 100 В) возникающее электрическое поле изменяет энергию диэлектрика (делает более гидрофильным), в результате поверхность становится более смачиваемой, изменяется угол смачивания и капля течет (движется) в нужном направлении (например, со скоростью 10 см/с). Открытые поверхностные системы хорошо интегрируются с другими микрофлюидными структурами.

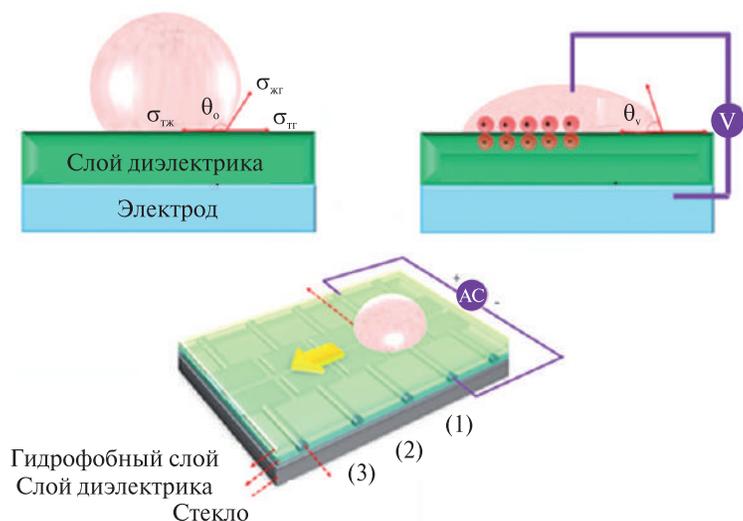


Рис. 86. Иллюстрация цифрового МФЧ, в котором перемещение капель основано на эффекте электросмачивания на диэлектрике

Другая система имеет конфигурацию сэндвича, в которой капля находится (зажата) между двумя подложками, к которым прикладывается напряжение.

Для управления движением жидкости в цифровых микрочипах также используют эффект *оптоэлектросмачивания на диэлектрике* (англ. Optoelectrowetting-on-Dielectric, OEWOD) – это способ манипулирования капельками с помощью лазерного света. По сути, множество электродов заменяется фоточувствительным слоем, который представляет своеобразный светочувствительный электрод (рис. 87). Проводимость фотопроводника повышается при действии света, что преобразует энергию поверхности и, следовательно, ее смачиваемость. Краевой угол смачивания капельки с поверхностью изменяется как функция интенсивности света. Контроль за лучом приводит к контролю движения капельки. Объем капельки составляет порядка 10 пикол.

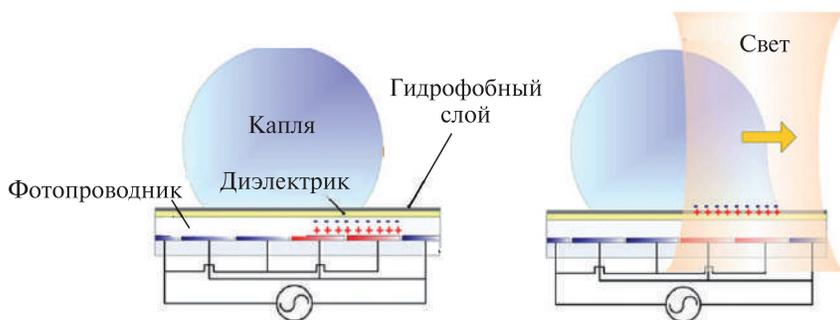


Рис. 87. Иллюстрация цифрового МФЧ, в котором перемещение капель основано на эффекте оптоэлектросмачивания на диэлектрике

В качестве фотопроводящего слоя может быть гидрогенизированный аморфный кремний (a-Si:H), обладающий высоким сопротивлением, но при освещении светом его проводимость увеличивается в десятки раз. Такой слой становится светочувствительным выключателем, который включает/выключает напряжение через диэлектрический слой. Таким образом, освещенная площадь является аналогом электрического электрода, или «виртуальным» электродом.

Главные преимущества устройств OEWOD – простота в процессе изготовления, быстро переключающееся время отклика (англ. *fast switching response times*), низкое энергопотребление, большая непрерывная область манипуляции капелькой по сравнению с устройствами EWOD и более простое управление несколькими каплями. Поверхности для OEWOD легко изготовить, так как они не требуют никакой литографии и вследствие реакции поверхности на интенсивность света имеют крупномасштабный контроль за манипуляцией капельками в реальном времени.

Поверхностные ультразвуковые волны (ПУВ) (наноГц) нашли эффективное применение в МФЧ не только для ввода пробы, смешивания, генерирования капель, но и транспортировки жидкости. Устройства, генерирующие ПУВ, были коммерциализированы еще в 60-е гг. XX в., однако применение в МФЧ нашли на стыке столетий. Для генерирования ПУВ используют встречно-штыревые преобразователи (подробно описаны в 1965 г. Уайтом и Волтмером). Это устройства, содержащие пьезоэлектрическую подложку, на поверхности которой размещены две группы электродов (штыри), одна из которых преобразует электромагнитные волны (электрическую энергию) в ультразвуковые, другая – наоборот.

Если жидкость находится на гидрофобной поверхности (например, тефлоновой) с углом контакта, больше чем 90° , то акустическая сила может переместить капельку вдоль пути волны. ПУВ передают энергию жидкости и вызывают акустические течения в каплях (рис. 88). Однако эти волны недостаточно мощны, чтобы перемещать жидкость на гидрофильных поверхностях.

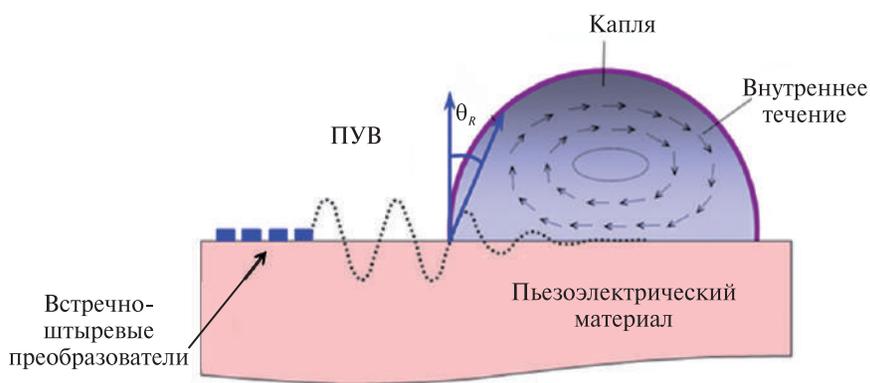


Рис. 88. Иллюстрация транспорта капельки в цифровом МФЧ с помощью поверхностных ультразвуковых волн

МФЧ с ПУВ-устройством обладают рядом преимуществ – простота конфигурации и структуры устройства, дистанционный электронный контроль, высокая скорость, компактность. Скорость течения (англ. *streaming velocity*) пропорциональна мощности устройства (напряжению, приложенному к электродам) и может достигать десятков сантиметров в секунду, что на несколько порядков больше, чем для других микрофлюидных устройств, диапазон скоростей для которых составляет сотни микрометров – несколько миллиметров в секунду.

Для разделения компонентов пробы могут быть использованы те же методы, что и для ее транспортировки, а также оптофорез, оптический пинцет, фотофорез, магнитофорез. Одним из первых аналитических методов, реализованных на МФЧ, был метод капиллярного электрофореза.

При реализации любой аналитической методики в микрочиповом формате особое внимание уделяется *методам детектирования* компонентов. Особенностью МФЧ являются малые объемы исследуемой пробы и, следовательно, низкие информативные сигналы. Это обуславливает применение высокочувствительных методов и систем детектирования в МФЧ. Методы детектирования в МФЧ можно разделить на три основные группы: оптические, электрохимические и масс-спектрометрические. Определение искомым аналитов может осуществляться непосредственно на чипе (например, электрохимическое) (on-chip детектирование), или чип является измерительной ячейкой и может вводиться в прибор (например, масс-спектрометр) (off-chip детектирование).

Оптические методы включают прямое обнаружение путем регистрации изменения свойств света (хемилюминесценция, интерферометрия, спектроскопия ППР, лазерно индуцированная флуоресценция (ЛИФ)). Для этого в МФЧ могут быть интегрированы различные оптические структуры (оптические волноводы, фотонные кристаллы и др.).

Электрохимические методы анализа активно применяются также в микрофлюидных устройствах, для этого микроэлектроды встраиваются в МФЧ-каналы.

Все больший интерес привлекает и комбинация микрочипов с масс-спектрометрией (МС), позволяющей детектировать самые разнообразные соединения с высокой чувствительностью. Это обстоятельство делает МС практичным методом определения для наукоемких аналитических и биохимических исследований на чипе.

Для увеличения чувствительности детектирования используют различные наноструктуры. Примером служит устройство для флуоресцентного детектирования меченых ферментов, которое представляет собой стеклянный микрочип с металлической тонкопленочной маской, в которой изготовлены нанопоры. Световое излучение проникает через нанопоры только на небольшую глубину и на таком расстоянии может возбуждать флуоресценцию. Таким образом, реализуется возможность регистрации молекул в очень тонком слое (на малой глубине).

Нанопоры успешно применяются и при электрохимическом детектировании. При невысоких концентрациях транспорт молекул через нанопоры (нанопоры) может быть обнаружен методом электрохимического детектирова-

ния с разрешением на уровне отдельных частиц. Основной проблемой при таком методе обнаружения является достаточно быстрое «забивание» нанопор, что требует контроля за их состоянием. Пример — анализ молекул ДНК с помощью МФЧ, в который встроена мембрана из нитрида кремния с отверстием диаметром около 4 нм (нанопора). По обе стороны отверстия расположены резервуары и электроды, к которым приложено внешнее напряжение. Перемещение молекулы ДНК через это отверстие под действием электрического поля вызывает изменение тока в цепи. Длительность регистрируемого сигнала зависит от длины молекулы. Таким образом, измеряя параметры электрического сигнала, можно получить информацию о размерах молекулы ДНК.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Аналитическая химия : в 3 т. / под ред. Л. Н. Москвина. – М. : Академия, 2008–2010.

Аналитическая химия и физико-химические методы анализа : в 2 т. / под ред. А. А. Ищенко. – М. : Академия, 2012–2014.

Андриевский, Р. А. Наноструктурные материалы / Р. А. Андриевский, А. В. Рагуля. – М. : Академия, 2005.

Биосенсоры: основы и приложения / под ред. Э. Тернер, И. Карубе, Дж. Уилсон. – М. : Мир, 1992.

Биологические микрочипы, содержащие иммобилизованные в гидрогеле нуклеиновые кислоты, белки и другие соединения: свойства и приложения в геномике / В. Барский [и др.] // Молекуляр. биология. – 2002. – Т. 36. – С. 563–584.

Боченков, В. Е. Наноматериалы для сенсоров / В. Е. Боченков, Г. Б. Сергеев // Успехи химии. – 2007. – Т. 76, № 11. – С. 1084–1093.

Гендриксон, О. Д. Молекулярно-импринтированные полимеры и их применение в биохимическом анализе / О. Д. Гендриксон, А. В. Жердев, Б. Б. Дзантиев // Успехи биол. химии. – 2006. – Т. 46. – С. 149–192.

Евстрапов, А. А. Физические методы управления движением и разделением микрочастиц в жидких средах. Ч. 1: Диэлектрофорез, фотофорез, оптофорез, оптический пинцет / А. А. Евстрапов // Науч. приборостроение. – 2005. – Т. 15, № 1. – С. 8–21.

Евстрапов, А. А. Микрофлюидные чипы для биологических и медицинских исследований / А. А. Евстрапов // Рос. хим. журн. (Журн. Рос. хим. о-ва им. Д. И. Менделеева). – 2011. – Т. LV, № 2. – С. 99–110.

Ермолаева, Т. Н. Пьезокварцевые иммуносенсоры. Аналитические возможности и перспективы / Т. Н. Ермолаева, Е. Н. Калмыкова // Успехи химии. – 2006. – Т. 75, № 5. – С. 445–459.

Микрофлюидные системы для химического анализа / под ред. Ю. А. Золотова, В. Е. Курочкина. – М. : ФИЗМАТЛИТ, 2011.

Мирзабеков, А. Д. Применение матричных биочипов с иммобилизованной ДНК в биологии и в медицине / А. Д. Мирзабеков, Д. М. Прокопенко, В. Р. Четкин // Информ. медико-биол. технологии / под ред. В. А. Князева, К. В. Судакова. – М. : ГОЭТАР-МЕД, 2000. – С. 166–198.

Юркова, И. Л. Биоаналитика : пособие / И. Л. Юркова. – Минск : БГУ, 2017.

Biosensors for Medical Applications / ed. by S. Higson. – Cambridge : Elsevier, 2012.

Electrochemical Biosensors / ed.: by S. Cosnier. — Singapore : Pan Stanford Publishing Pte Ltd, 2015.

Nanobiosensors and Nanobioanalyses / ed.: M. C. Vestergaard [et al.]. — Tokyo : Springer, 2015.

Microarray Technology and Its Applications / ed.: U. R. Müller, D. V. Nicolau. — Berlin ; Heidelberg : Springer, 2005.

Microfluidics : fundamentals, devices, and applications / ed.: by Y. Song, D. Cheng, L. Zhao. — Weinheim : Wiley-VCH, 2018.

Microfluidic Lab-on-a-Chip for Chemical and Biological Analysis and Discovery / ed. by Paul C. H. Li. — Boca Raton : Taylor & Francis-CRC Press, 2005.

СОДЕРЖАНИЕ

ПРЕДИСЛОВИЕ	3
ВВЕДЕНИЕ	5
Глава 1. БИОСЕНСОРЫ	12
1.1. Принцип действия и общая классификация	12
1.2. Аналитические характеристики	20
1.3. Биосенсоры на основе биологических макромолекул	29
1.3.1. Ферментные сенсоры	29
1.3.2. Иммунные сенсоры	34
1.3.3. ДНК/РНК-сенсоры	37
1.4. Биосенсоры на основе надмолекулярных структур	39
1.5. Биосенсоры на основе биомиметических структур, их виды	43
1.5.1. Аптамерные сенсоры	43
1.5.2. Сенсоры на основе молекулярно-импринтированных полимеров	50
1.6. Методы иммобилизации биораспознающей системы на поверхность трансдюсера	56
1.6.1. Физические методы	58
1.6.1.1. Адсорбция из раствора	58
1.6.1.2. Включение в матрицу и капсулирование	61
1.6.2. Химические методы	67
1.6.2.1. Поперечная сшивка	67
1.6.2.2. Ковалентное связывание	68
1.6.2.3. Ориентированная ковалентная иммобилизация	74
1.6.2.4. Иммобилизация методом самоорганизующихся монослоев	78
1.6.2.5. Аффинная иммобилизация	80
1.7. Типы физико-химических преобразователей в биосенсорах	82
1.7.1. Калориметрические трансдюсеры	82
1.7.2. Электрохимические трансдюсеры	84
1.7.2.1. Амперометрические ферментные биосенсоры	86
1.7.2.2. Амперометрические ФБС с электродами, модифицированными наноматериалами	93
1.7.2.3. Вольтамперометрические ДНК-сенсоры	99

1.7.3. Гравиметрические трансдюсеры	100
1.7.3.1. Пьезокварцевые сенсоры.....	100
1.7.3.2. Кантилеверные трансдюсеры	106
1.7.4. Оптические биосенсоры	111
1.7.4.1. Оптоволоконные сенсоры	112
1.7.4.2. Биосенсоры на основе фотонно-кристаллических структур	117
1.7.4.3. Интерференционные биосенсоры на основе оптических волноводов	123
1.7.4.4. Биосенсоры на основе поверхностного плазмонного резонанса	125

Глава 2. МИКРОАНАЛИТИЧЕСКИЕ СИСТЕМЫ:

БИОЛОГИЧЕСКИЕ И МИКРОФЛЮИДНЫЕ ЧИПЫ	134
2.1. Биологические чипы	134
2.2. Планарные биочипы, принцип работы, получение	135
2.3. ДНК-чипы	142
2.4. Белковые чипы	146
2.5. Суспензионные биочипы	150
2.6. Применение наноразмерных структур в биочипах	155
2.6.1. Суспензионные чипы на основе наночастиц благородных металлов	156
2.6.2. Суспензионные чипы на основе квантовых точек	160
2.7. Микрофлюидные чипы. Принцип действия, виды, применение	166
2.8. Аналитические операции, выполняемые в микрофлюидных чипах	178
2.8.1. Ввод, перемешивание, экстракция, фильтрация и концентрирование проб в МФЧ	178
2.8.2. Методы транспортировки жидкости в МФЧ, детектирование	184
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	192

Учебное издание

Юркова Ирина Леонидовна

НАНОБИОАНАЛИТИКА

Учебное пособие

Ответственный за выпуск *Е. А. Логвинович*
Художник обложки *Т. Ю. Таран*
Технический редактор *Л. В. Жаборовская*
Компьютерная верстка *О. В. Гасюк*
Корректоры *Л. С. Мануленко, Е. И. Бондаренко*

Подписано в печать 30.09.2019. Формат 70×100/16. Бумага офсетная.
Цифровая печать. Усл. печ. л. 15,8. Уч.-изд. л. 14,7.
Тираж 100 экз. Заказ 526.

Белорусский государственный университет.
Свидетельство о государственной регистрации издателя, изготовителя,
распространителя печатных изданий № 1/270 от 03.04.2014.
Пр. Независимости, 4, 220030, Минск.

Республиканское унитарное предприятие
«Издательский центр Белорусского государственного университета».
Свидетельство о государственной регистрации издателя, изготовителя,
распространителя печатных изданий № 2/63 от 19.03.2014.
Ул. Красноармейская, 6, 220030, Минск.