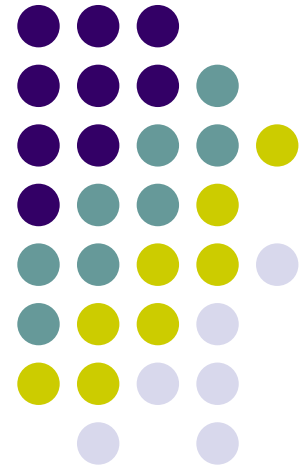


Нанобиоаналитические системы. Биосенсоры.



Курочкин Илья Николаевич
д.х.н., профессор
Химический Факультет МГУ
ikur@genebee.msu.su



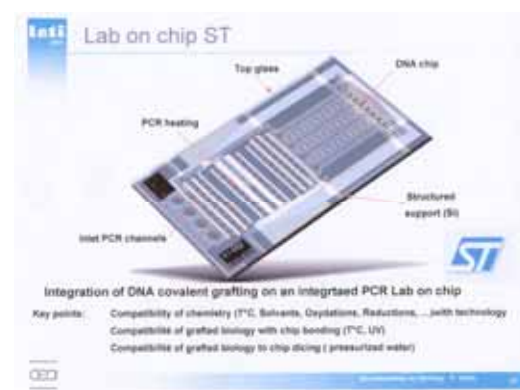
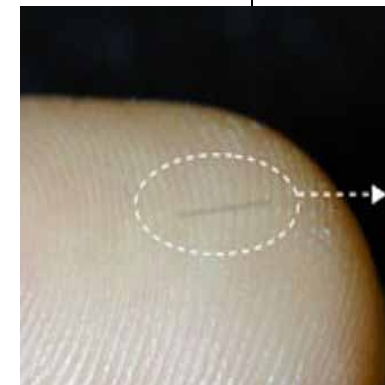
Развитие биоаналитических методов



конец 19 века



конец 20 века



Лабораторные прототипы
2006-2009 года

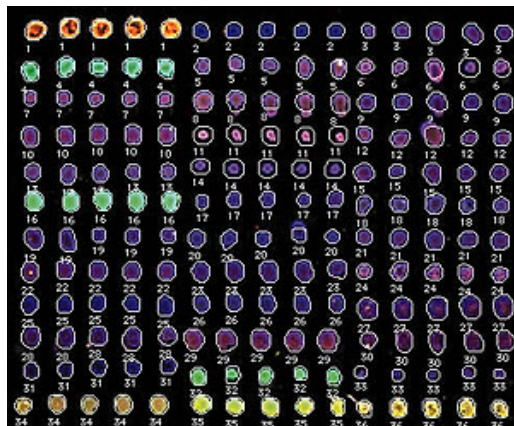
Развитие биоаналитических методов



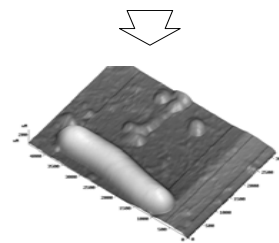
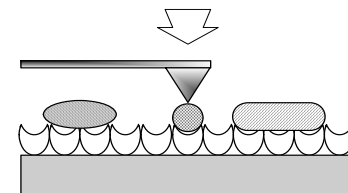
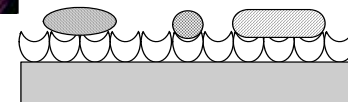
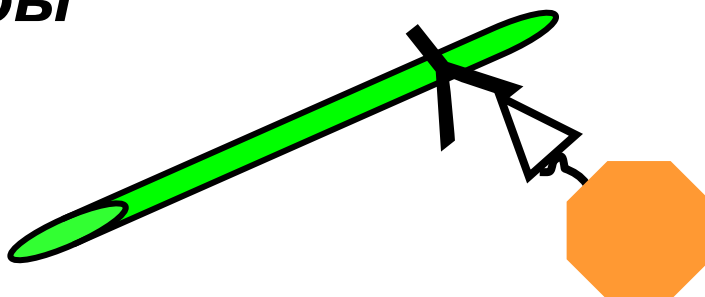
- **Биосенсоры**



- **Биочипы**



- **Наносенсоры**

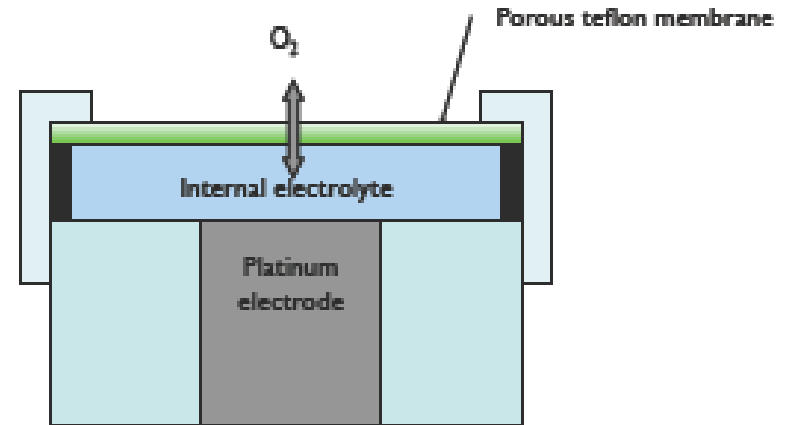
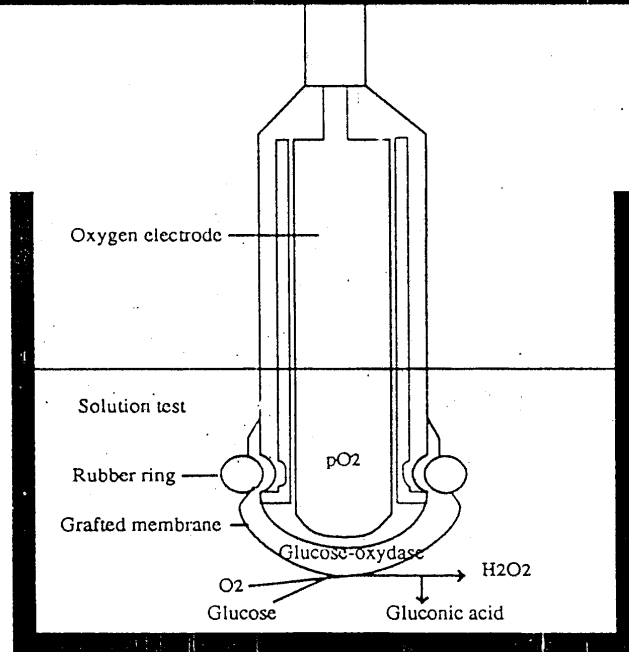
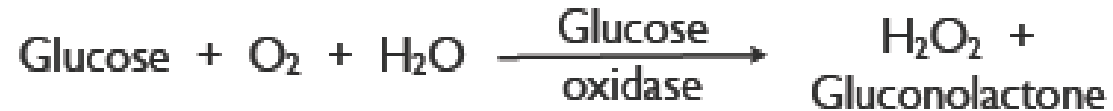
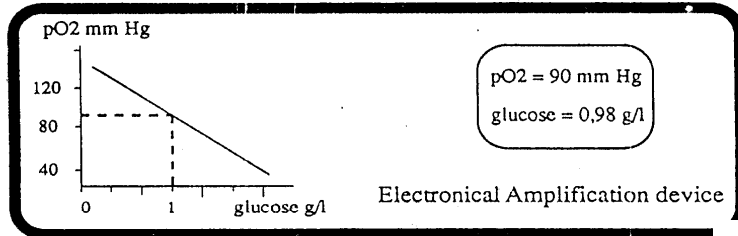


Биосенсоры



Сенсоры, включающие в себя биологический материал

Первый биосенсор – ферментный электрод (Лиланд С. Кларк-младший, 1962 г.)



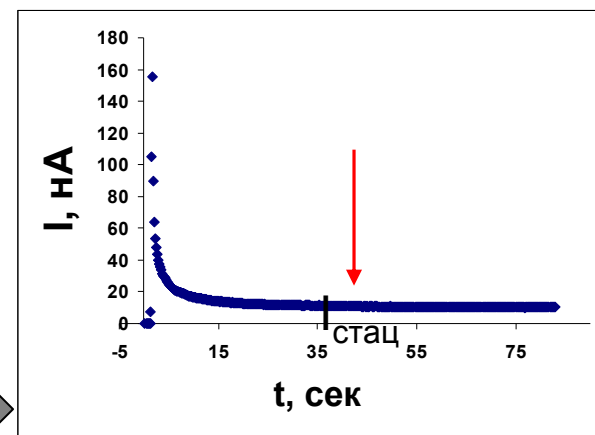
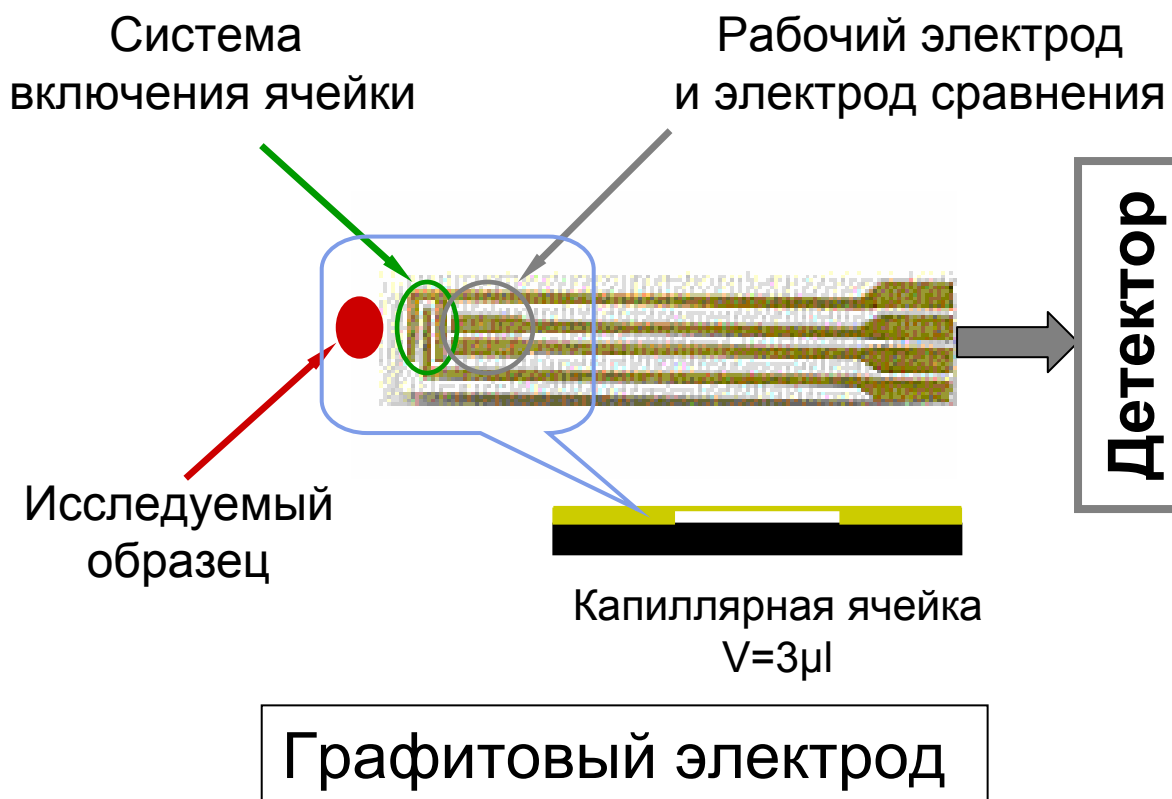
Principle of Glucose Potentiometric Electrode:

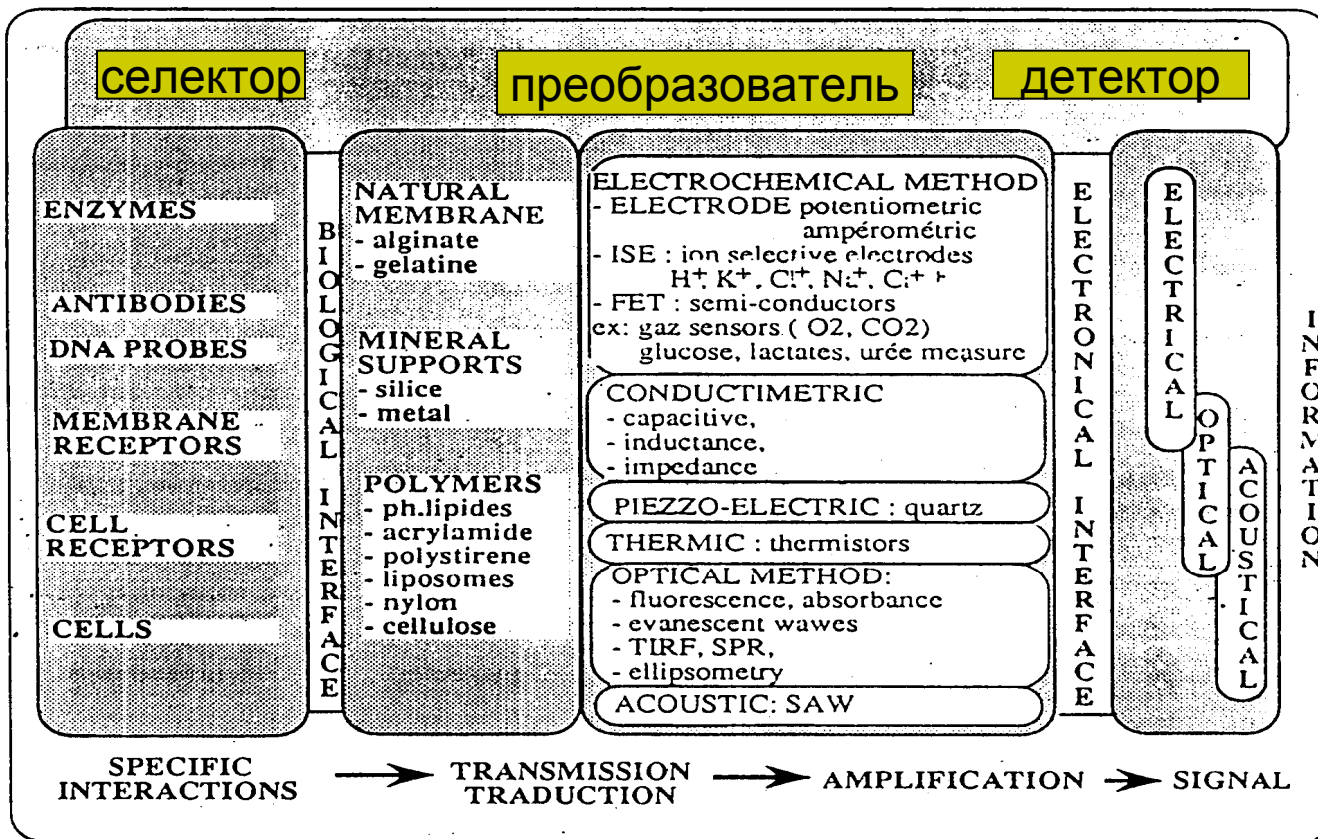
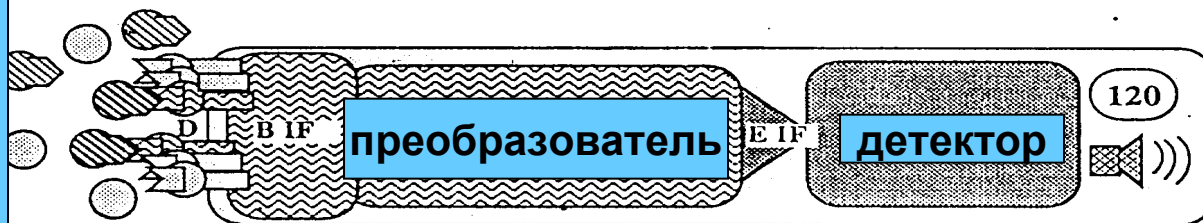
Glucose reacts with O₂ in the oxydase layer (Glucose-oxydase) to form gluconic acid and H₂O₂. The decrease O₂ concentration in the enzyme layer is measured by recording the signal from the oxygen electrode. A increase in concentration of glucose causes a decrease in O₂ concentration at the electrode.

Создание планарных электродов



1. Выбор материала: золото, графит
2. Выбор оптимальной подложки для нанесения электродов
3. Выбор оптимальной конструкции электродов
4. Разработка метода иммобилизации и стабилизации фермента
5. Обработка и анализ данных





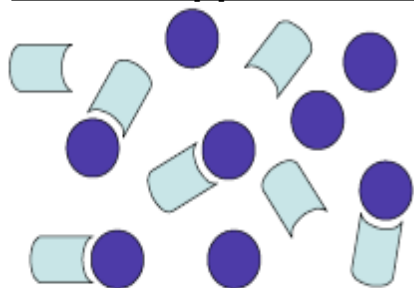
**Биосенсоры:
основные компоненты и функции**

Биоанализ и биосенсоры



Биоанализ

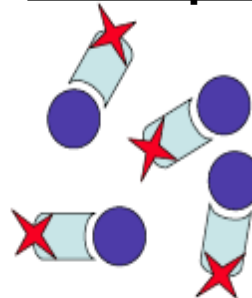
Взаимодействие



Разделение

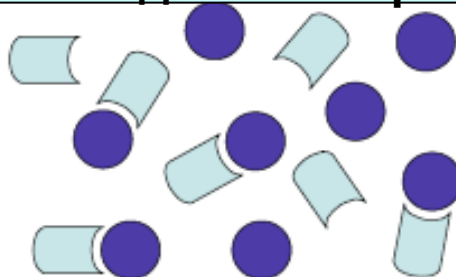


Регистрация



Биосенсор

Взаимодействие=регистрация

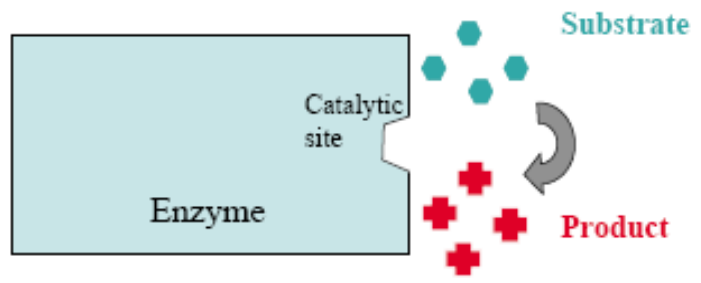




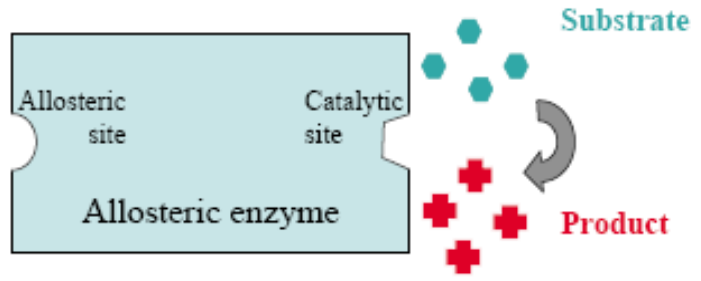
Биосенсоры

нано и микромолярные концентрации

Каталитические сенсоры

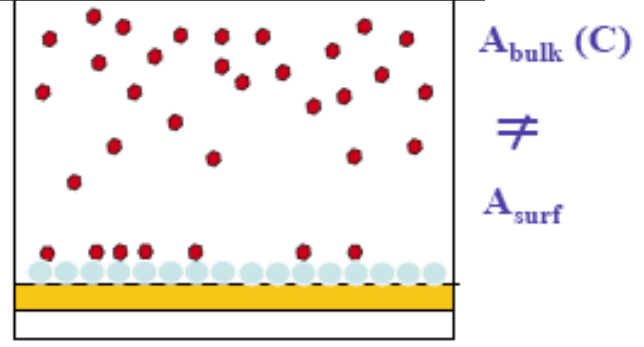


эффектор

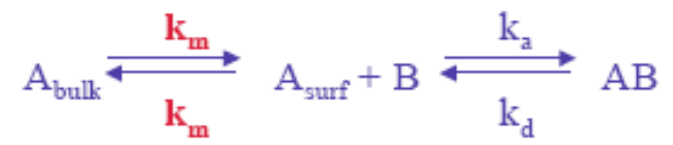


Аффинные сенсоры

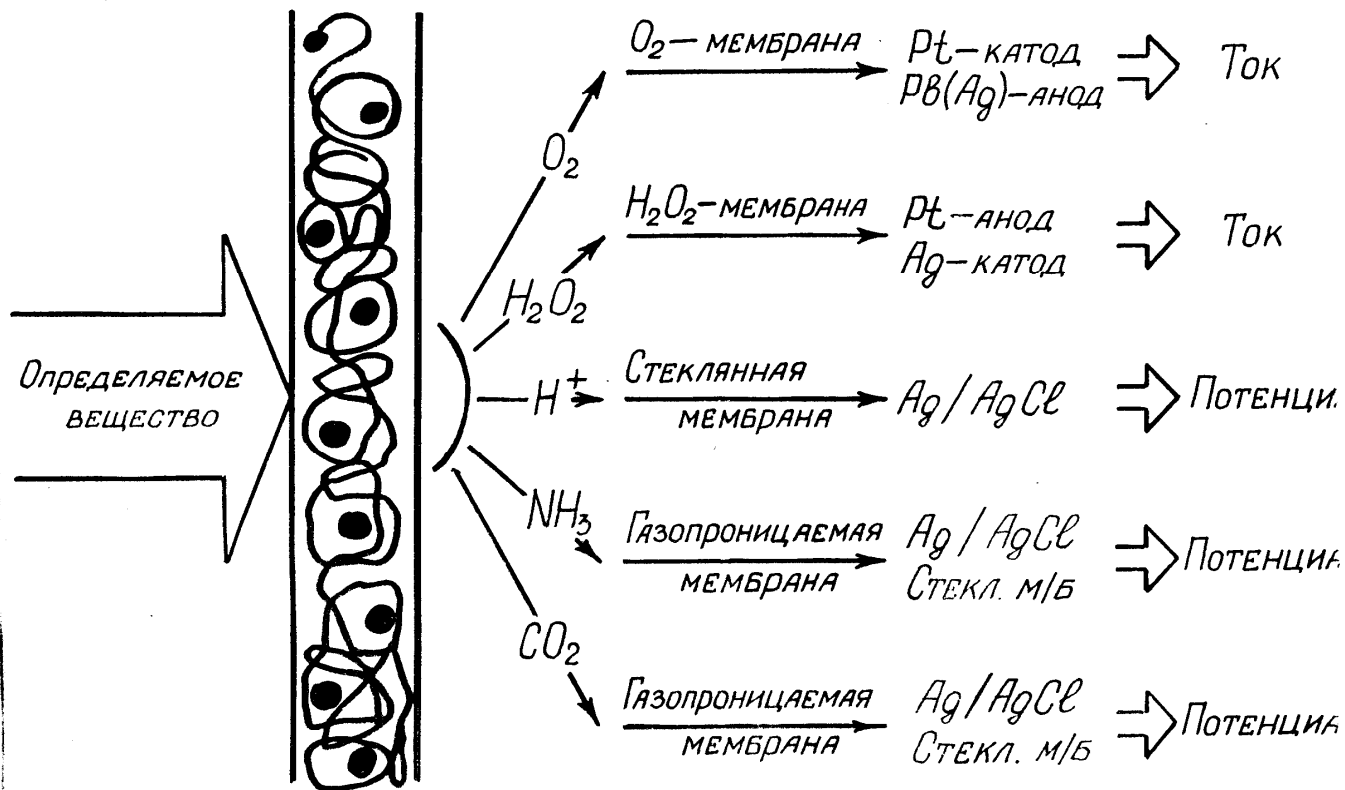
Массоперенос



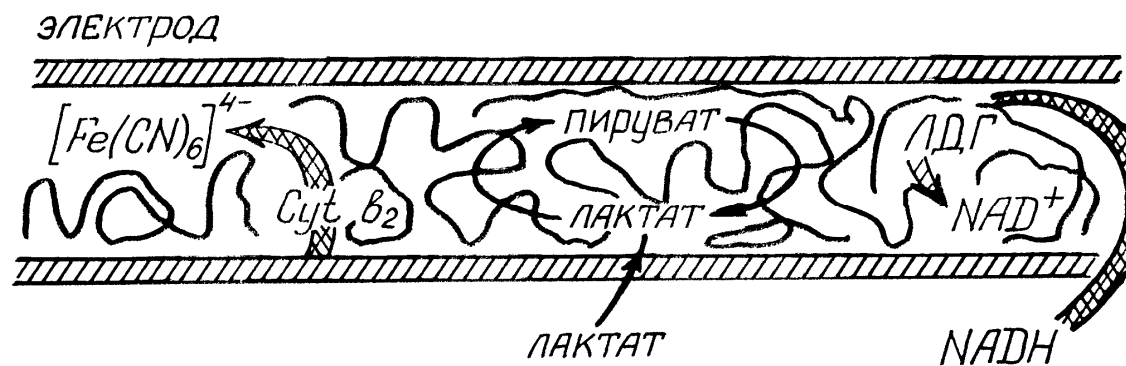
Количественный анализ



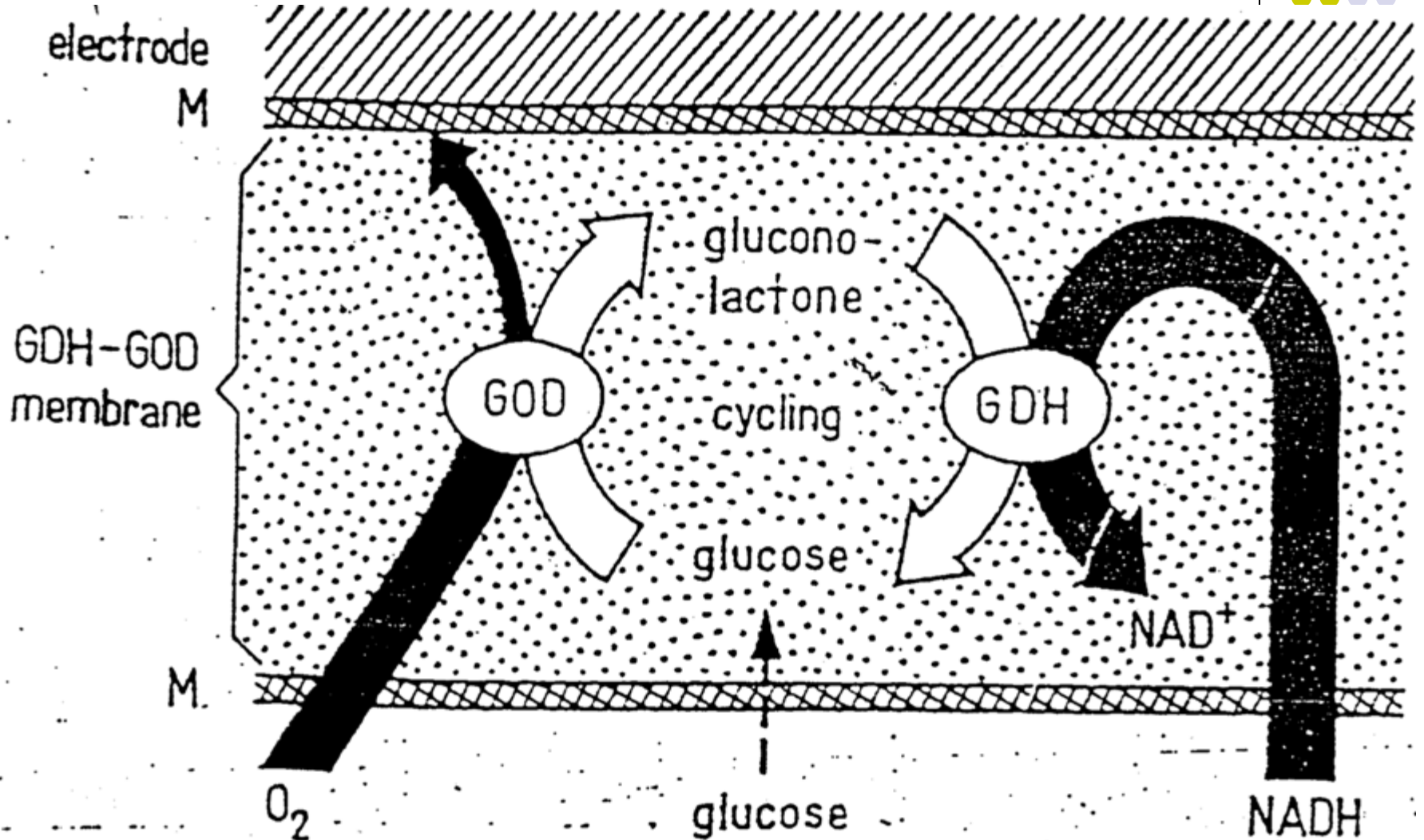
ФЕРМЕНТНЫЕ СЕНСОРЫ



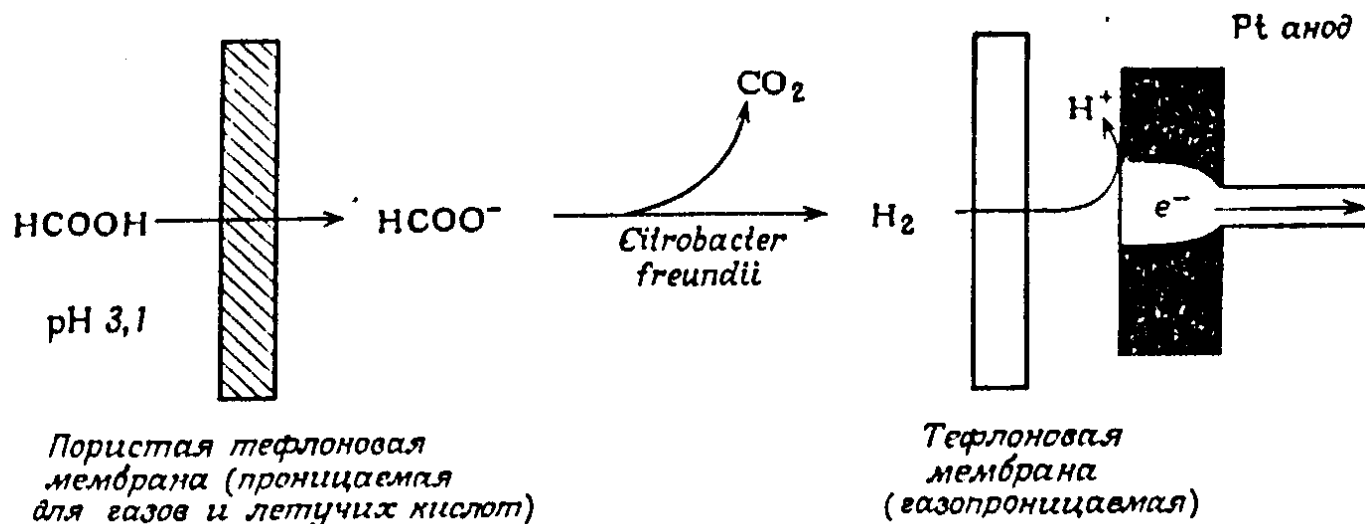
СУБСТРАТНОЕ УСИЛЕНИЕ



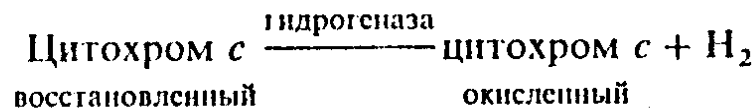
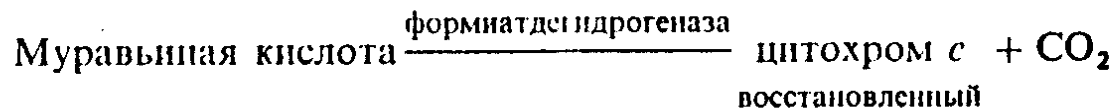
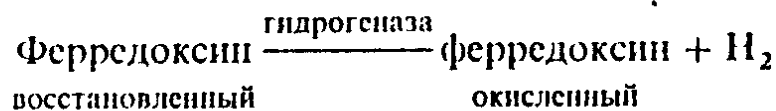
Субстратное усиление



Микробные биосенсоры



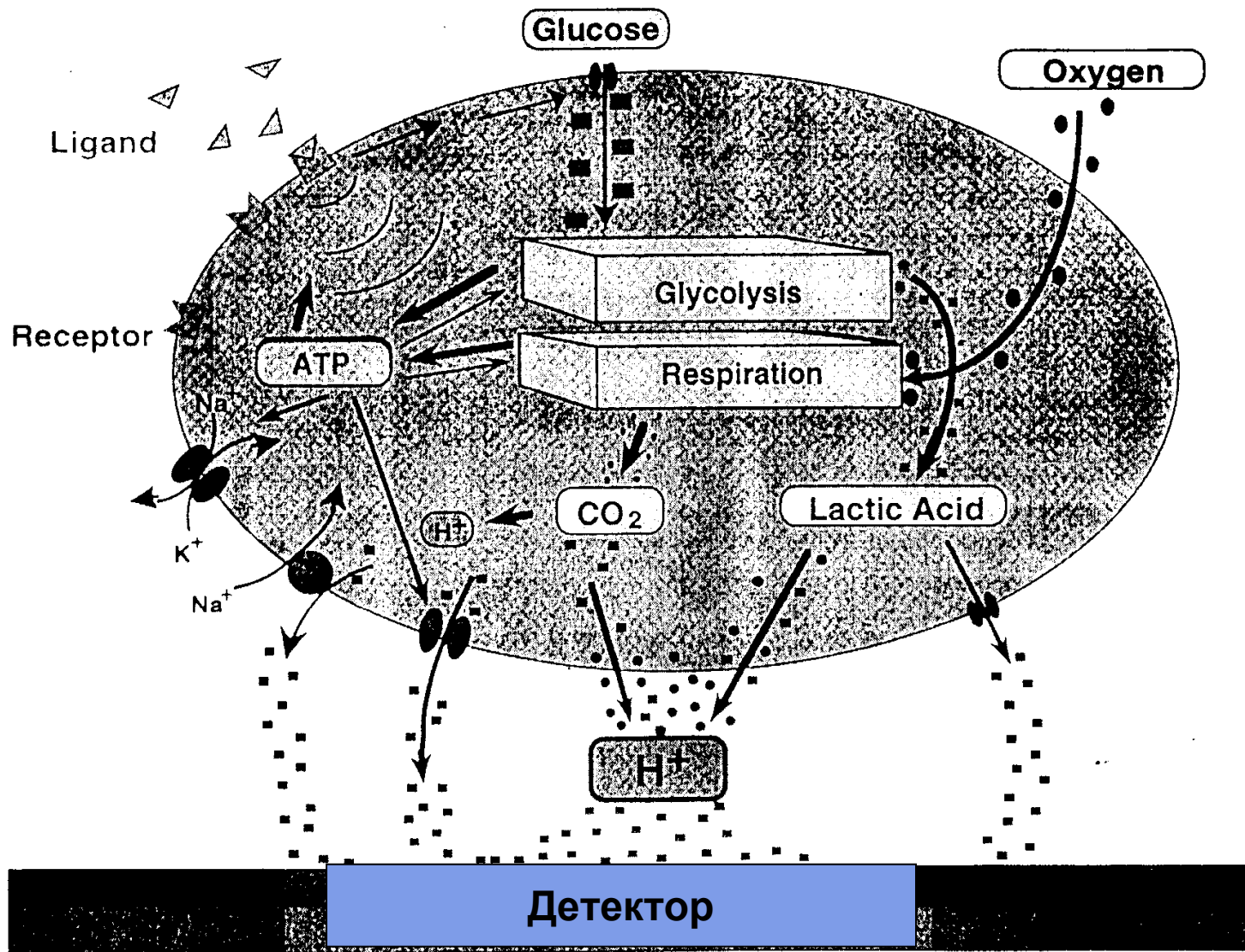
Принцип действия микробного биосенсора



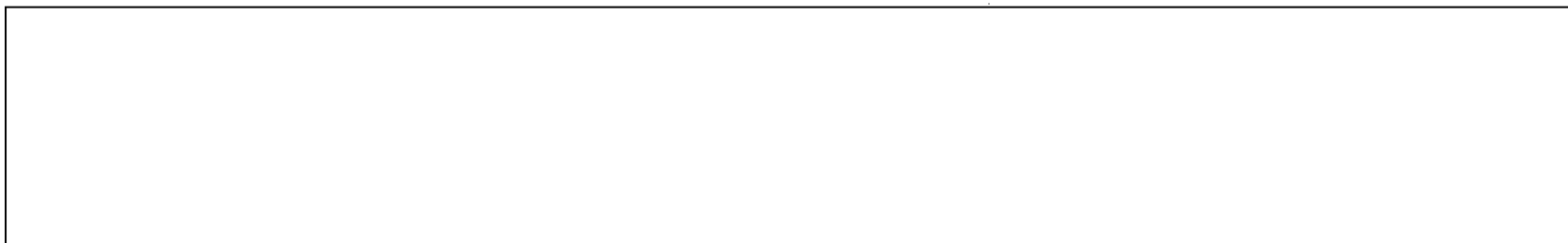
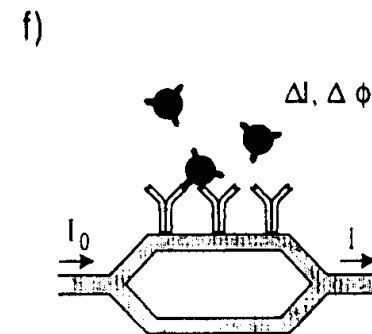
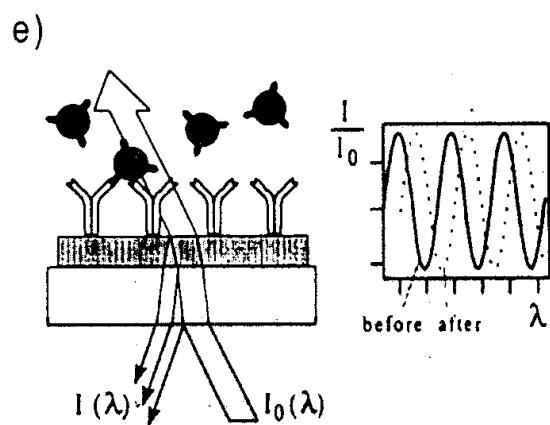
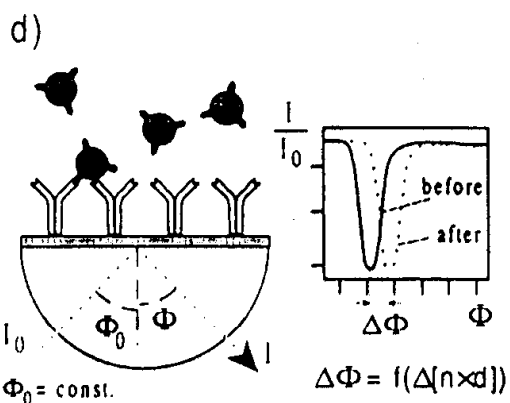
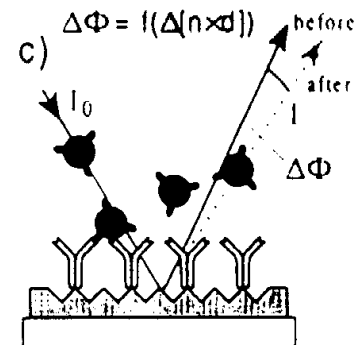
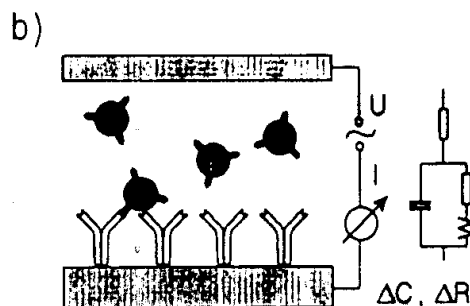
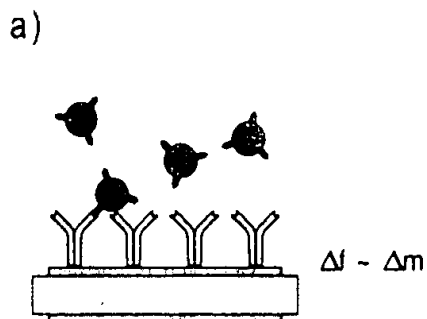
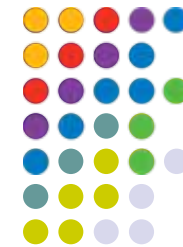
Клеточные биосенсоры



Рецепторы



Основные типы иммуносенсоров





Тканевые биосенсоры

● Субстрат

Глутамин

Аденозин

Аденозин-5-монофосфат

Гуанин

Пероксид водорода

Глутамат

Пируват

Мочевина

Фосфат/фторид-ионы

Допамин

Тирозин

Цистеин

Глутамин

● Биокаталитический материал

Клетки почки свиньи

Клетки слизистой мышцы

Мышца кролика

Печень кролика

Печень быка

Жёлтая тыква

Кукурузное зерно

Мука из бобов

Клубень картофеля

Мякоть банана

Сахарная свёкла

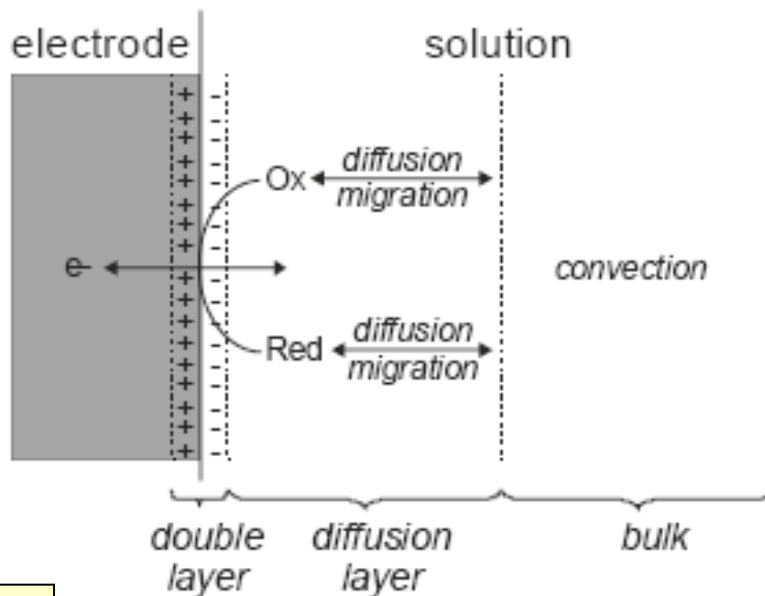
Лист огурца

Митохондрии почки свиньи

Принципы электрохимии

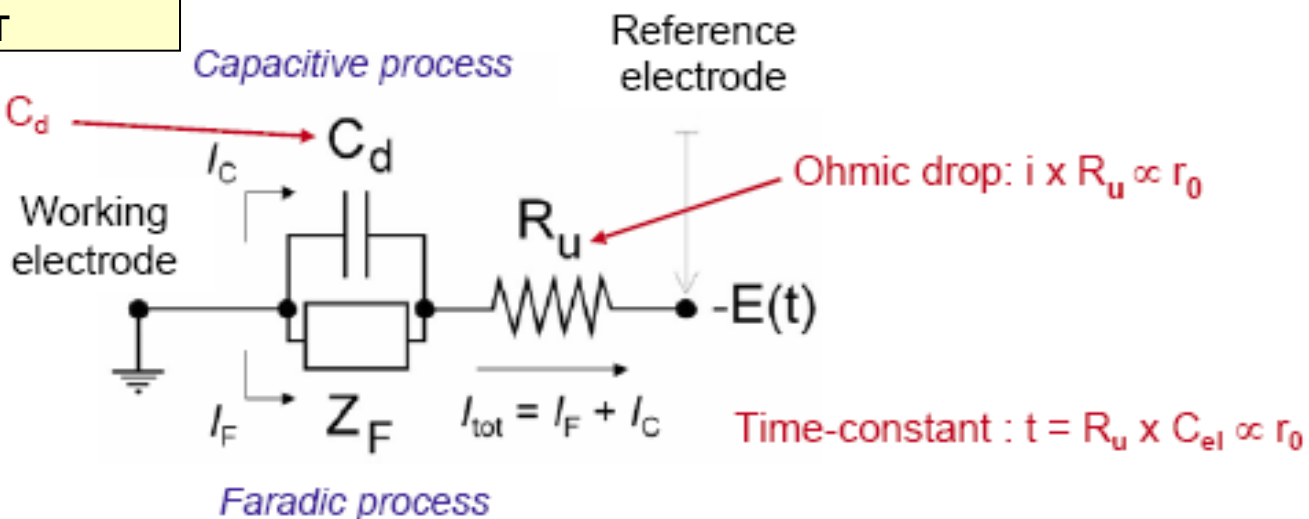


Электрохимическая система.
Рабочий электрод с радиусом r



Электрический эквивалент

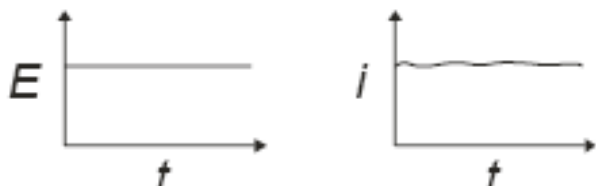
Noise $\propto C_{el} = 2\pi r_0^2 \times C_d$



Электрохимические методы

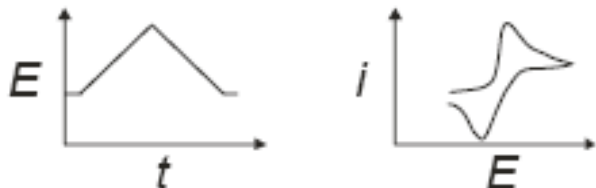


Амперометрия (стац.)



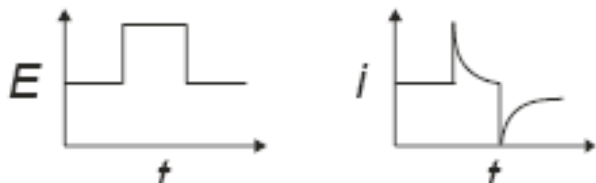
- + разрешение по току
- + разрешение во времени
- селективность
- потенциал приложен постоянно

Быстрая сканирующая вольтамперометрия



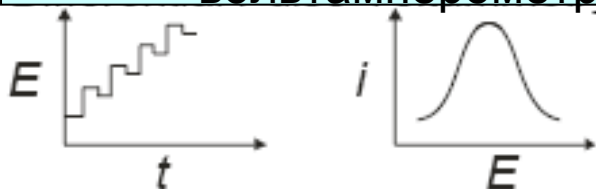
- + селективность
- + разрешение во времени
- + потенциал не приложен постоянно
- разрешение по току
- емкостные токи

Хроноамперометрия



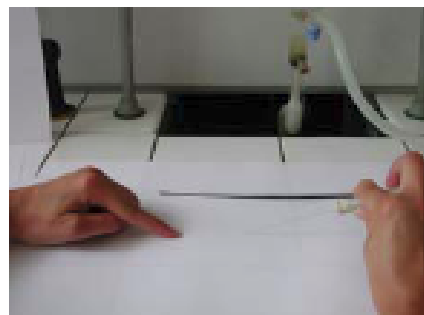
- + разрешение во времени
- + потенциал не приложен постоянно
- Средняя селективность
- разрешение по току
- емкостные токи

Дифференциальная импульсная вольтамперометрия

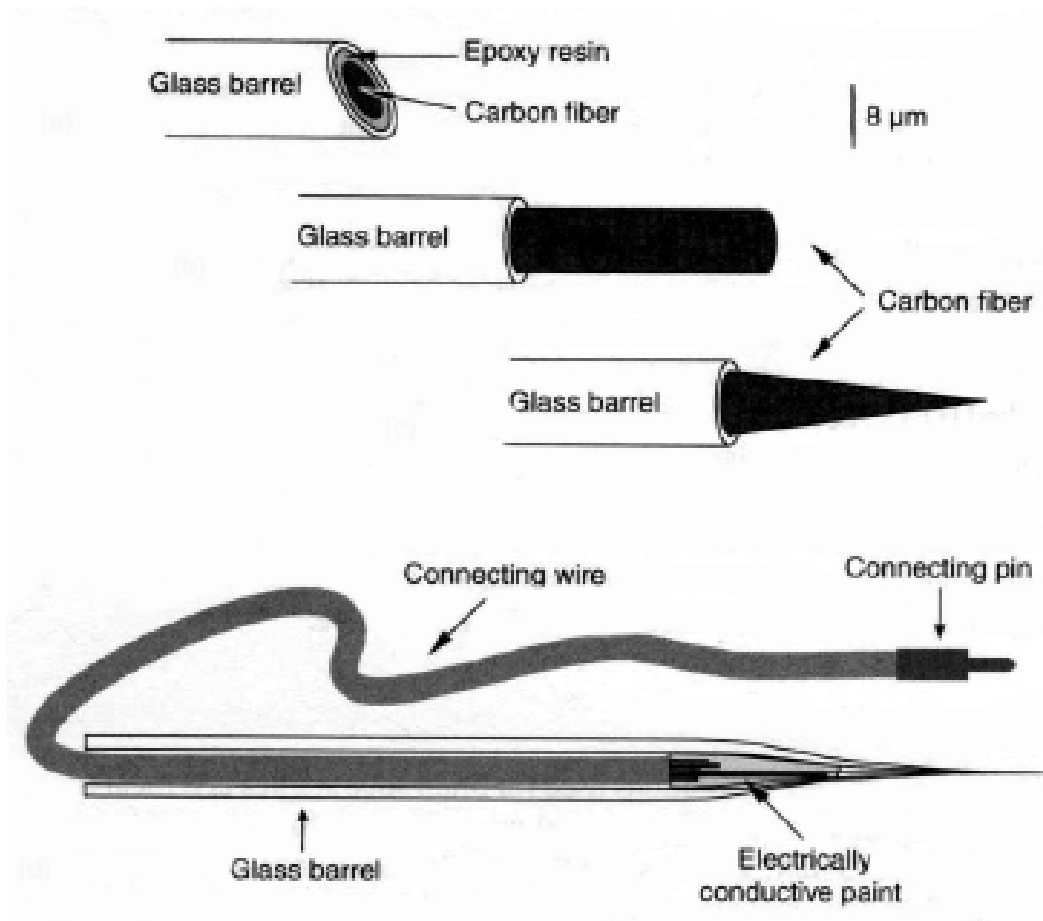


- + селективность
- + разрешение по току
- разрешение во времени
- потенциал приложен постоянно

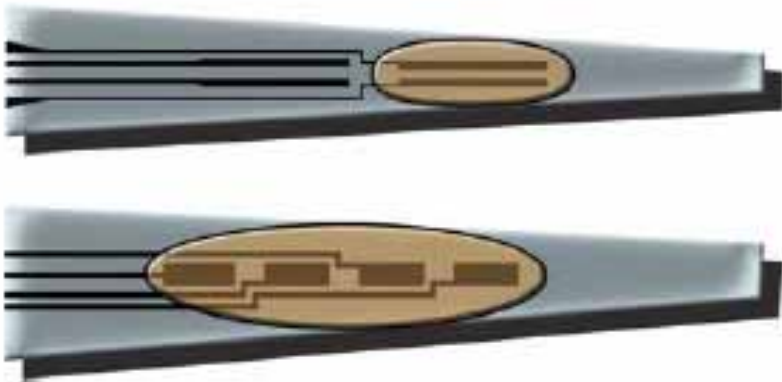
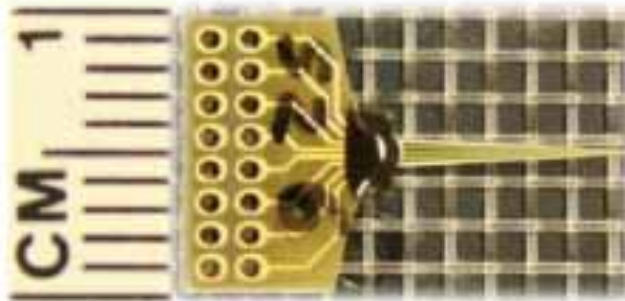
Микроэлектроды из углеродного волокна



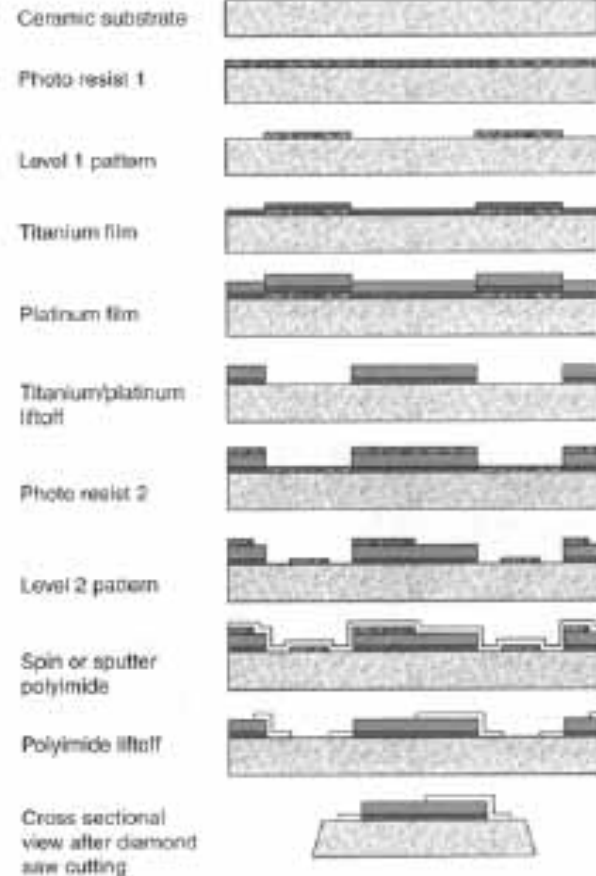
Different shapes and sizes

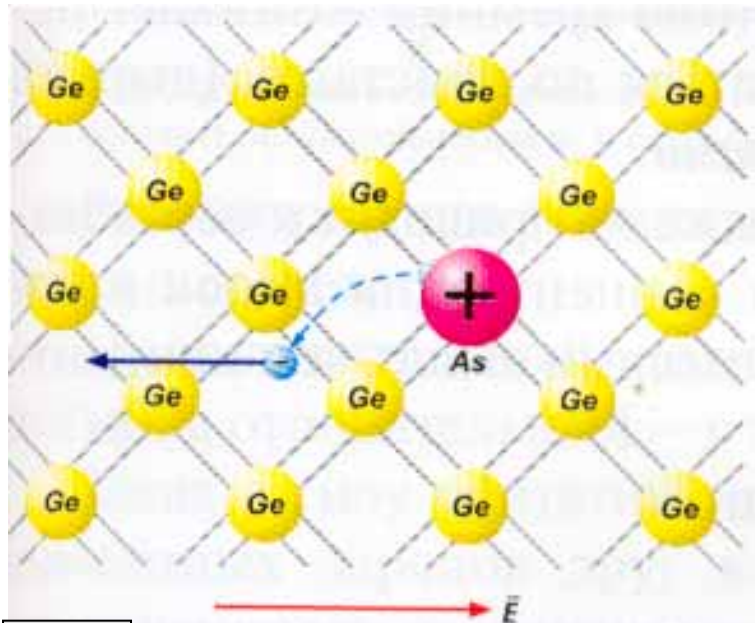


Планарные микроэлектроды на керамической подложке



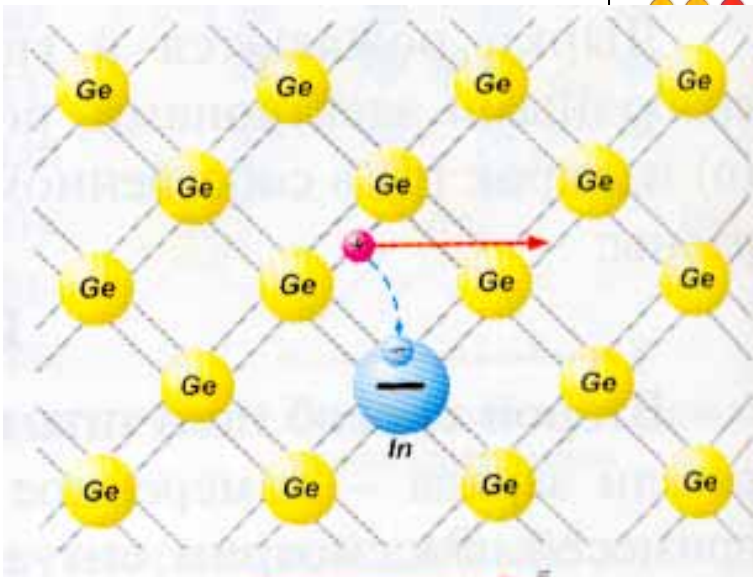
G.A. Gerhardt 's lab:
<http://www.mc.uky.edu/cenmet/>





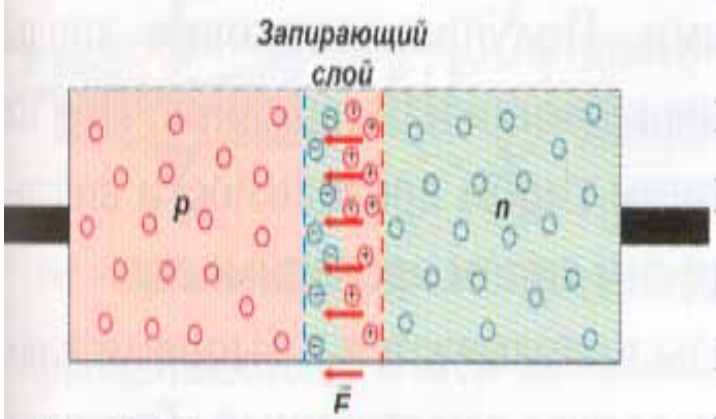
1

Атом мышьяка в решетке германия.
Полупроводник n-типа



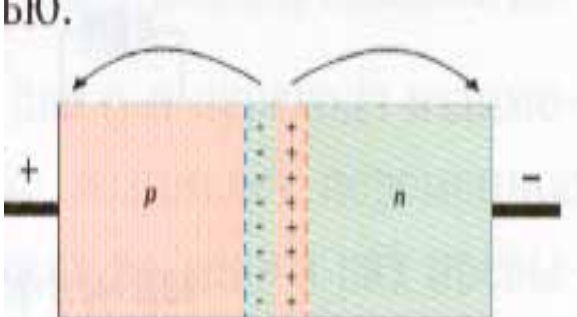
2

Атом индия в решетке германия.
Полупроводник p-типа



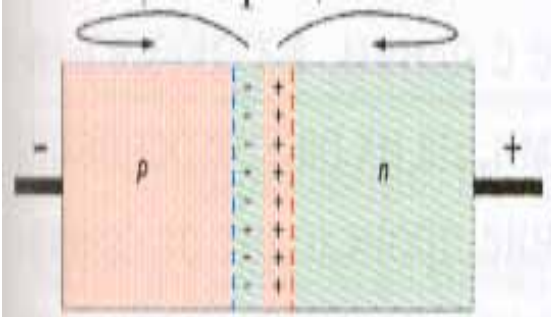
3

Образование запирающего слоя при контакте полупроводников p- и n-типов



4

Прямое включения p-n перехода



5

Схема обратного включения p-n перехода

Химически чувствительные полевые транзисторы

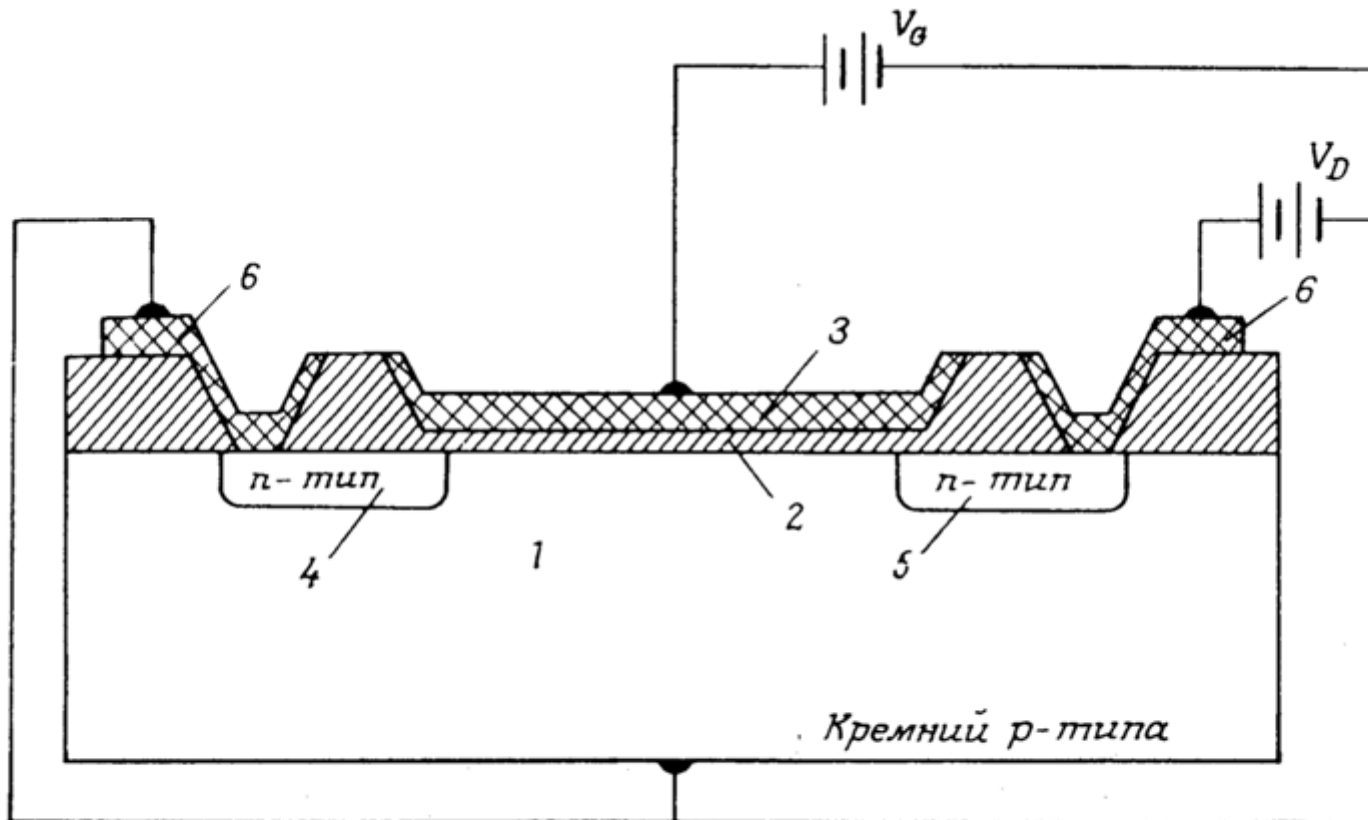
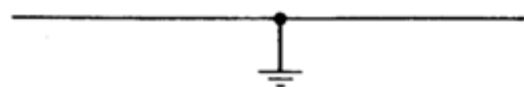
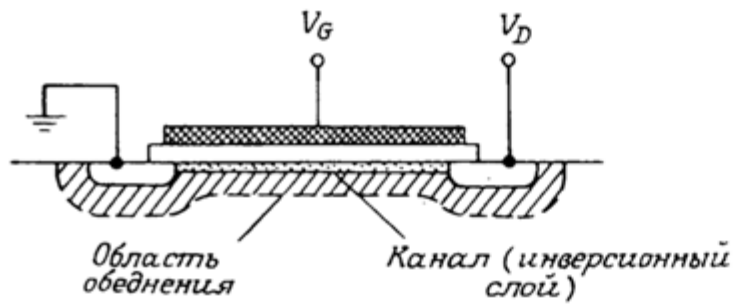
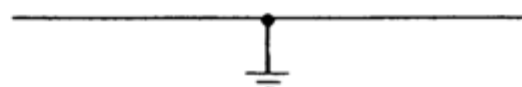
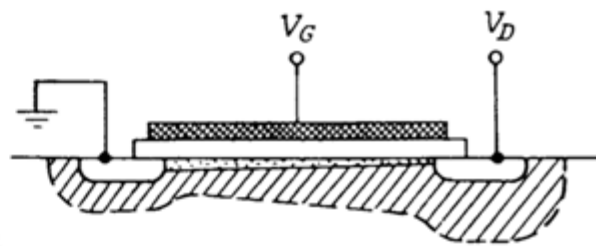


Схема ПТ

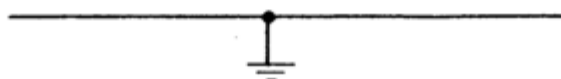
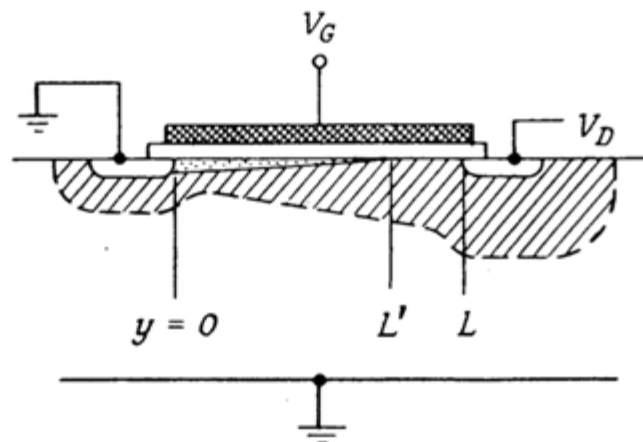
1 – кремниевая подложка n-типа; 2 – диэлектрик; 3 – металлический затвор; 4 – исток n-типа; 5 – сток n-типа; 6 – металлический контакт со стоком и истоком.



$\alpha: V_G > V_T, V_D \approx 0$



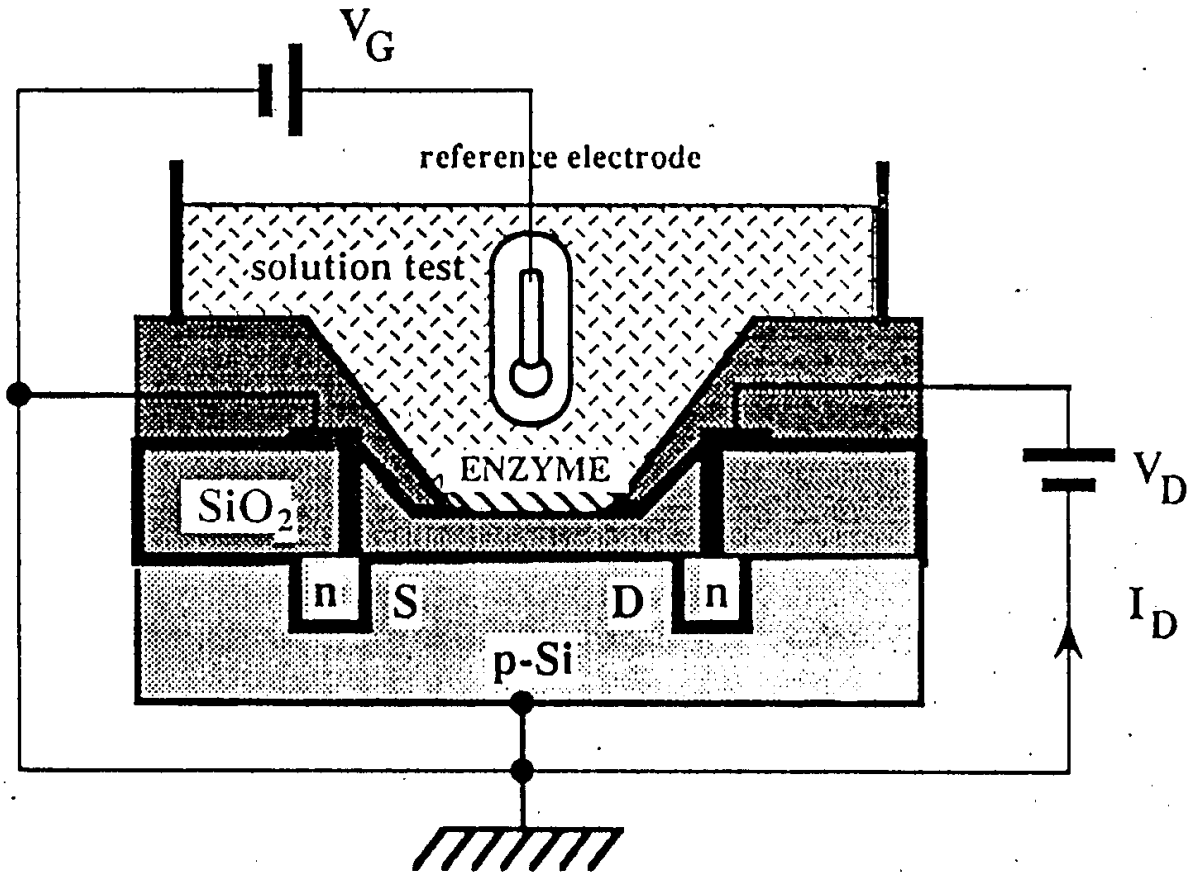
$\delta: V_G > V_T, V_D < V_G - V_T$



$\beta: V_D > (V_G - V_T), V_G > V_T$



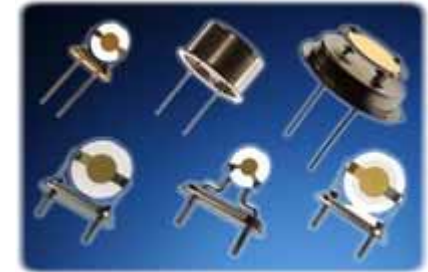
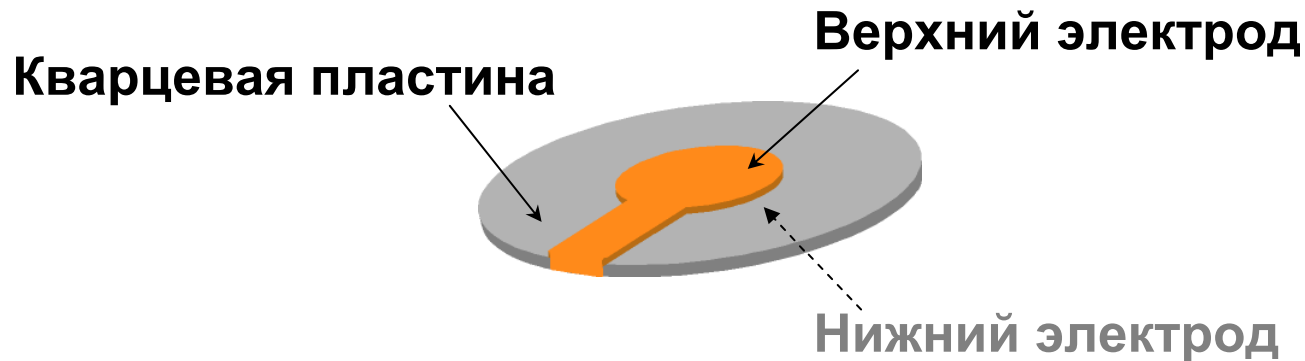
Химически чувствительные полевые транзисторы



Quartz crystal microbalance (QCM)

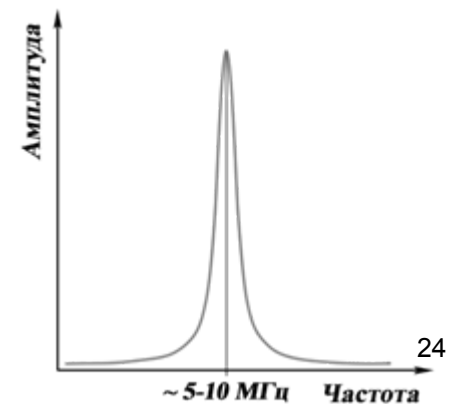
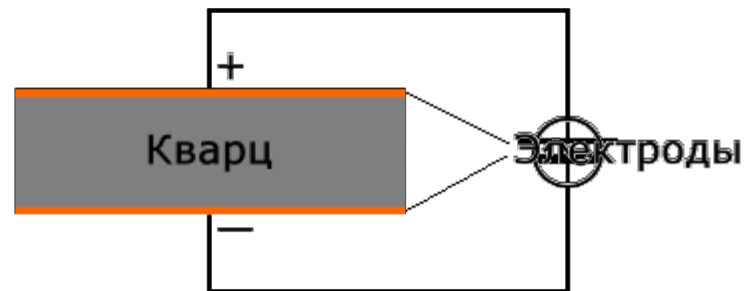


Кварцевые микровесы

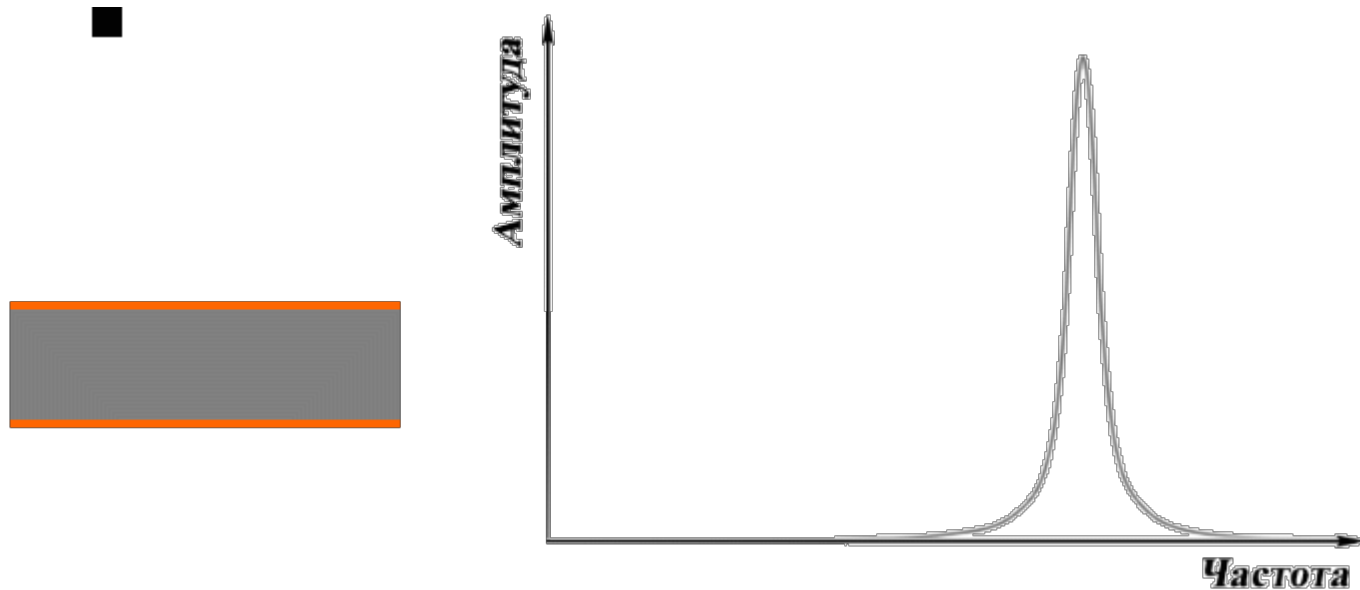


Деформации пластины под действием разности потенциалов
(обратный пьезоэффект)

Генерация горизонтальных сдвиговых колебаний



Кварцевые микровесы (QCM): принцип



Для жестких тонких пленок $\Delta f \sim \Delta m$

Уравнение Сауэрбрея:

$$\Delta f = \frac{-2f_0^2}{(\rho_q \mu_q)^{1/2}} \Delta m$$

Δf : измеряемый сдвиг частоты резонанса

Δm : изменение массы на единицу площади (г/см²)

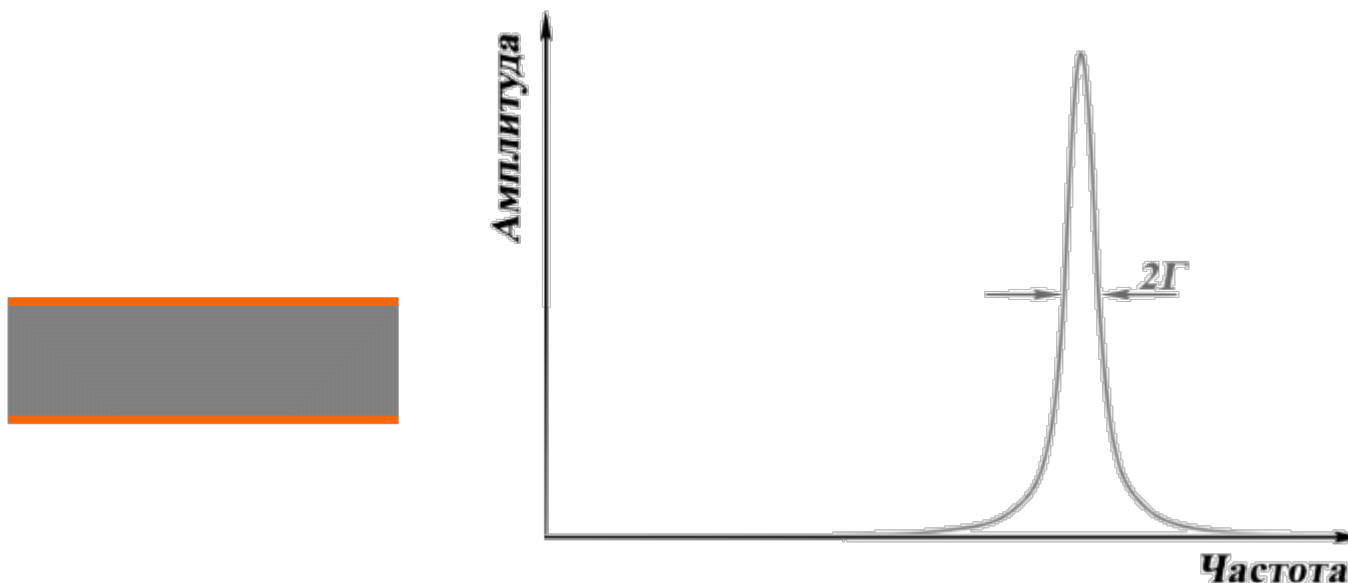
f_0 : резонансная частота колебаний пьезокристалла

ρ_q : плотность кварца, 2.648 г/см³.

μ_q : модуль упругости кварца (сдвиговый),
2.947·10¹¹ г/(см×с²)

Для 5 МГц-кристалла с тепловым дрейфом резонанса ± 0.1 Гц $\Delta m \approx 2$ нг/см²

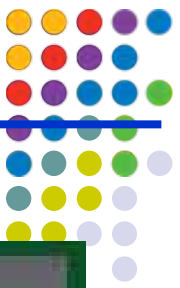
Кварцевые микровесы с контролем диссипации энергии (QCM-D): принцип



$$D = \frac{2\Gamma}{f} = \frac{1}{Q} = \frac{\text{Диссипация энергии за период}}{2\pi \text{ Полная энергия осциллятора}}$$

Для **вязко-упругих** тонких пленок Δf и ΔD связаны как с массой пленки ($d_{\text{пл}}$, $\rho_{\text{пл}}$), так и ее вязко-упругими характеристиками ($\eta_{\text{пл}}$, $\mu_{\text{пл}}$). Интерпретация данных осуществляется на основании модели, предложенной Войновой.

Приборное оформление



Области применения QCM (-D)



Изучение межмолекулярных взаимодействий

Количественное определение скоростей реакций ассоциации и диссоциации, констант связывания, быстрый скрининг партнеров

Изучение и контроль процессов формирования тонких пленок

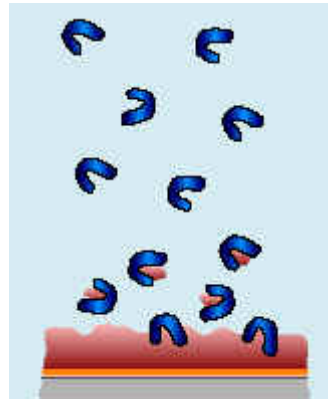
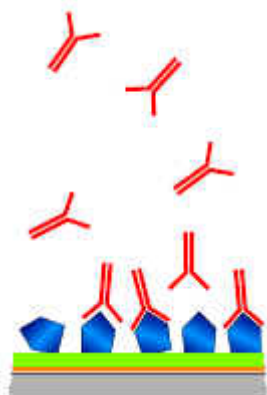
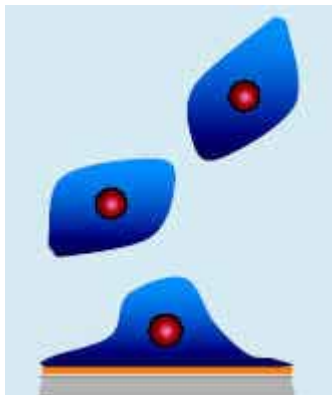
Микро- и наноэлектроника, функционализация поверхностей

Сенсорные устройства

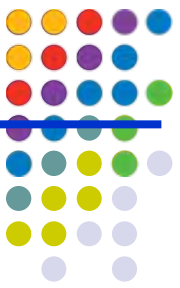
Газовые сенсоры, биосенсоры

Биосовместимые материалы

Взаимодействие клеток с поверхностью, адсорбция белков и полимеров, биodeградация поверхностей и пленок



Основные характеристики



Измеряемая масса

D-фактор

in air (1 bar)

$\sim 1 \text{ ng/cm}^2$

$\sim 2 \times 10^{-8}$

in water (25 °C)

$\sim 5 \text{ ng/cm}^2$

$\sim 3 \times 10^{-7}$

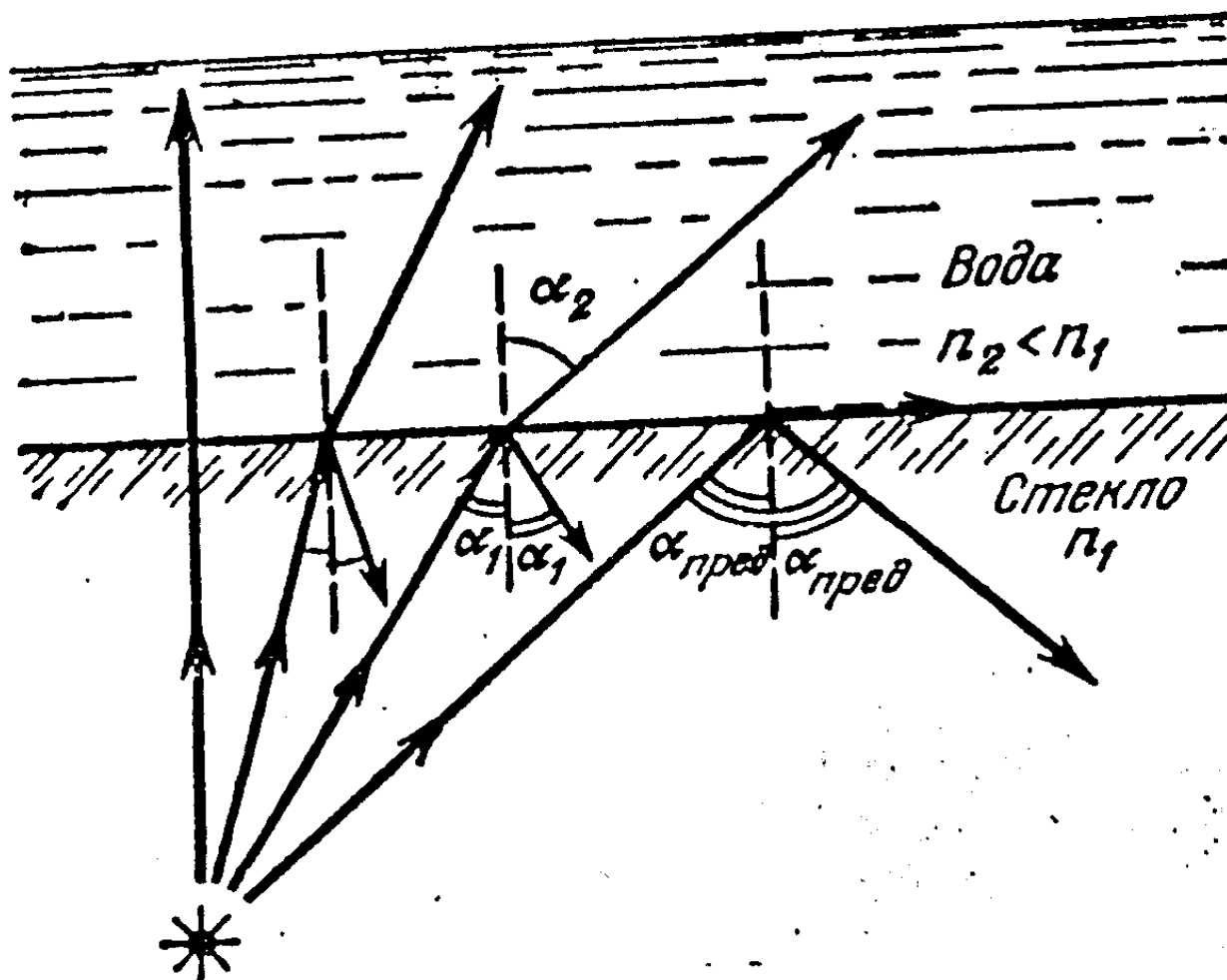
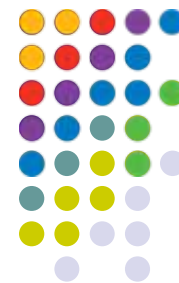
- Активная область: $\sim 0.2 \text{ cm}^2$



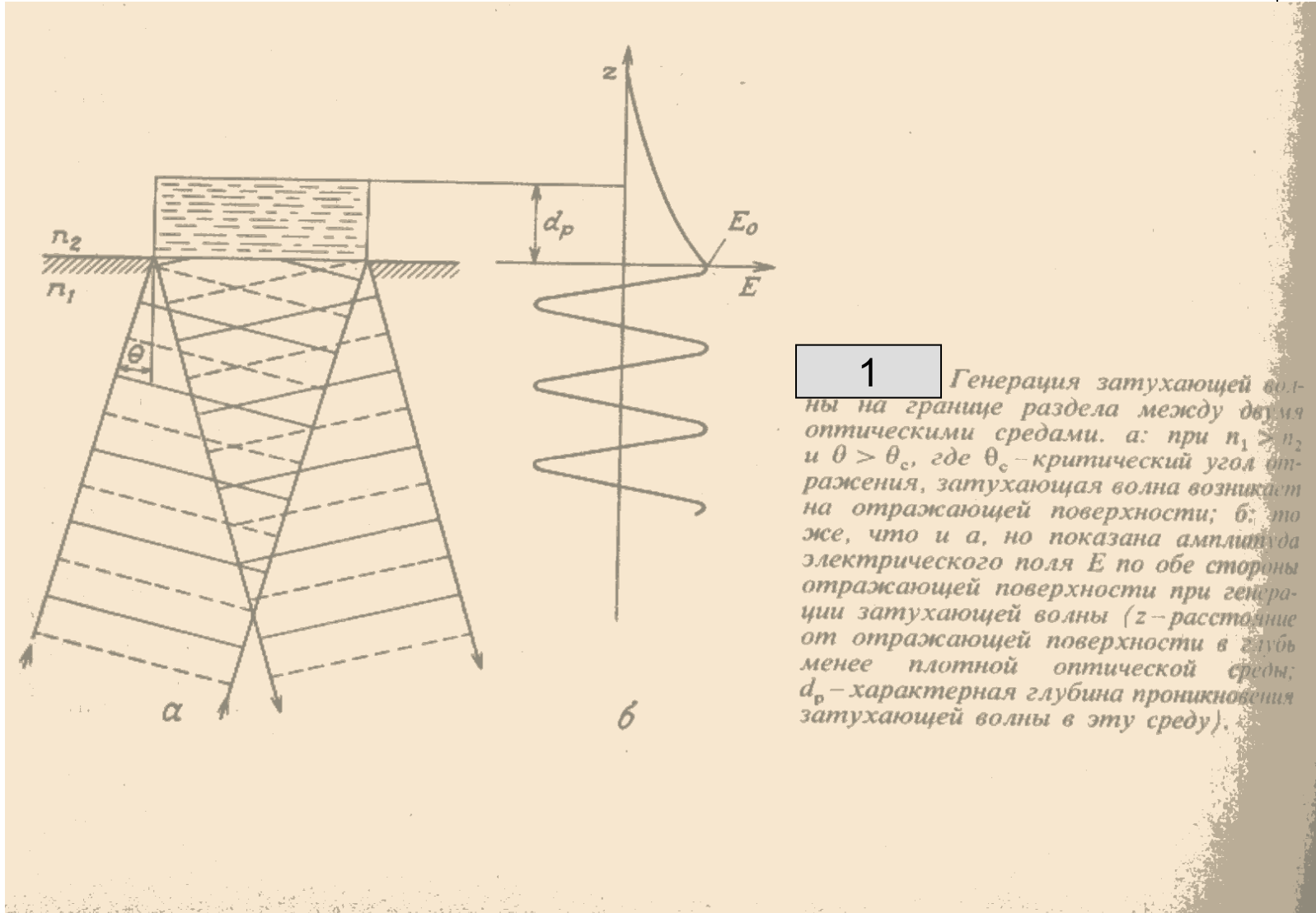
Диапазон толщин вязко-упругих плёнок: nm - μm

A monolayer (<100% surface coverage) of Myoglobin (17800 Da) corresponds to 10 Hz.
Detection limit is approximately 0.2 Hz

Спектроскопия внутреннего отражения (СВО)



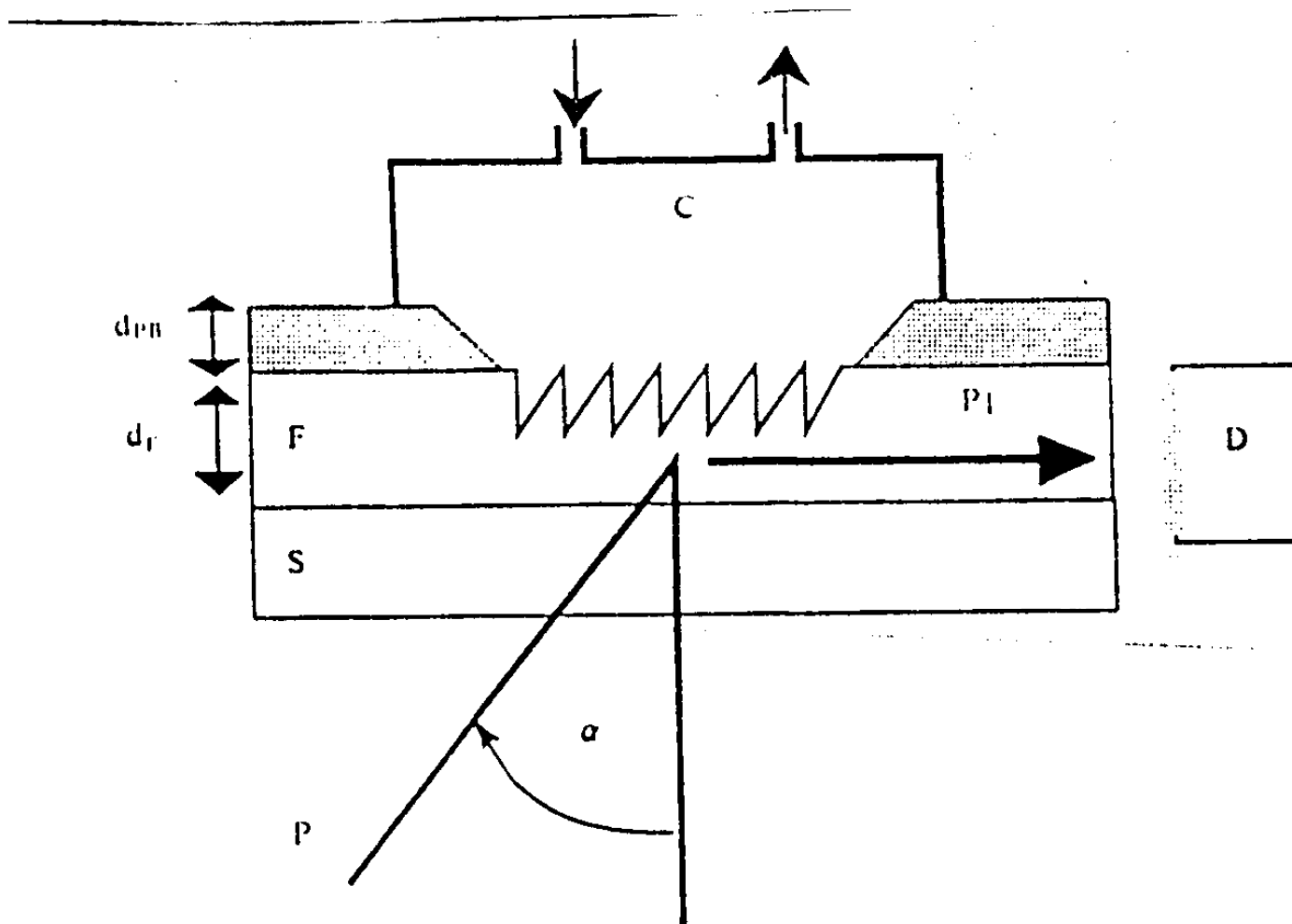
Спектроскопия внутреннего отражения (СВО)



Нарушенное полное внутреннее отражение (НПВО) и НПВО с флуоресценцией (НПВОФ)



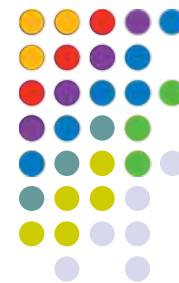
- В методе НПВО измеряют ослабление отражённого света как функцию его длины волны.
- В спектроскопии НПВОФ используют флуоресцирующие вещества и, таким образом, поглощенная энергия частично вновь излучается в виде флуоресцентного света, который и детектируется.



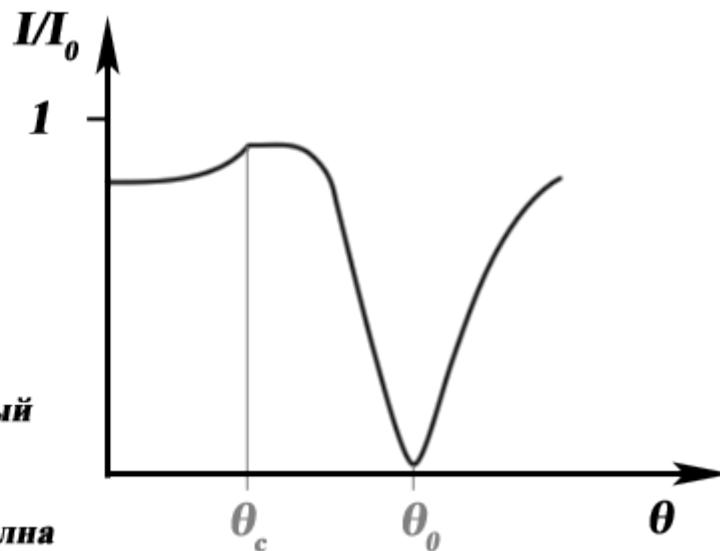
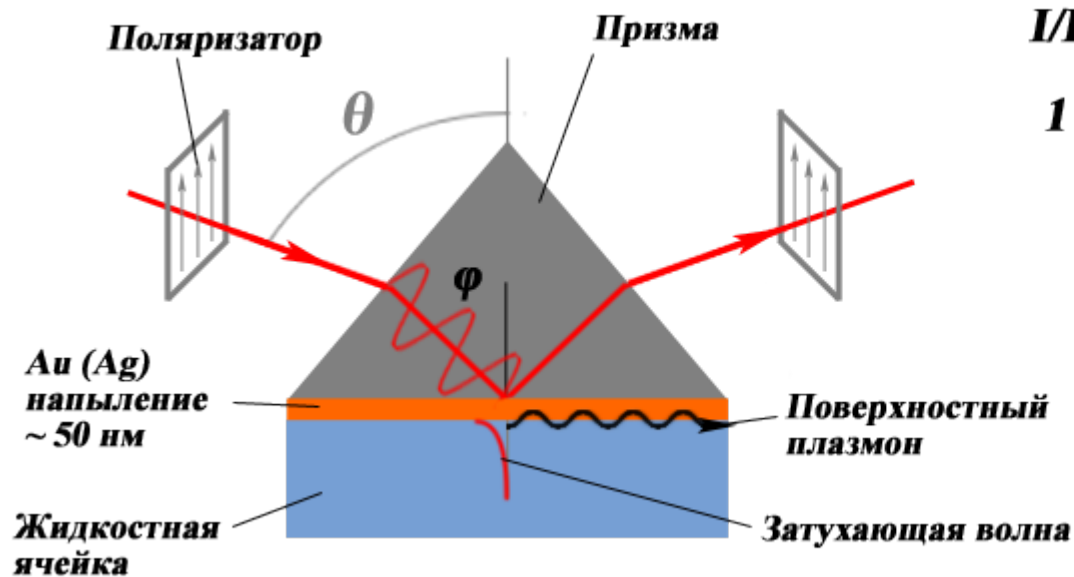
НПВО ячейка

Поверхностный плазмонный резонанс

Surface Plasmon Resonance (SPR)



Поверхностный плазмон - коллективные колебания свободного электронного газа на границе металла с диэлектриком



Волновой вектор поверхностного плазмона:

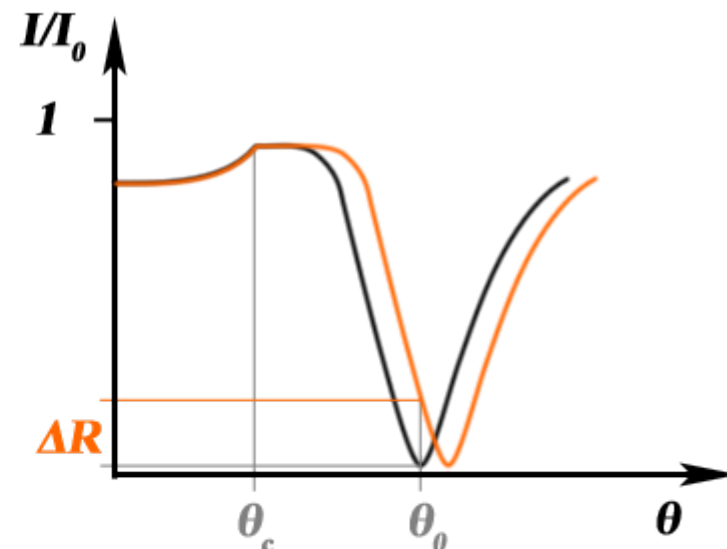
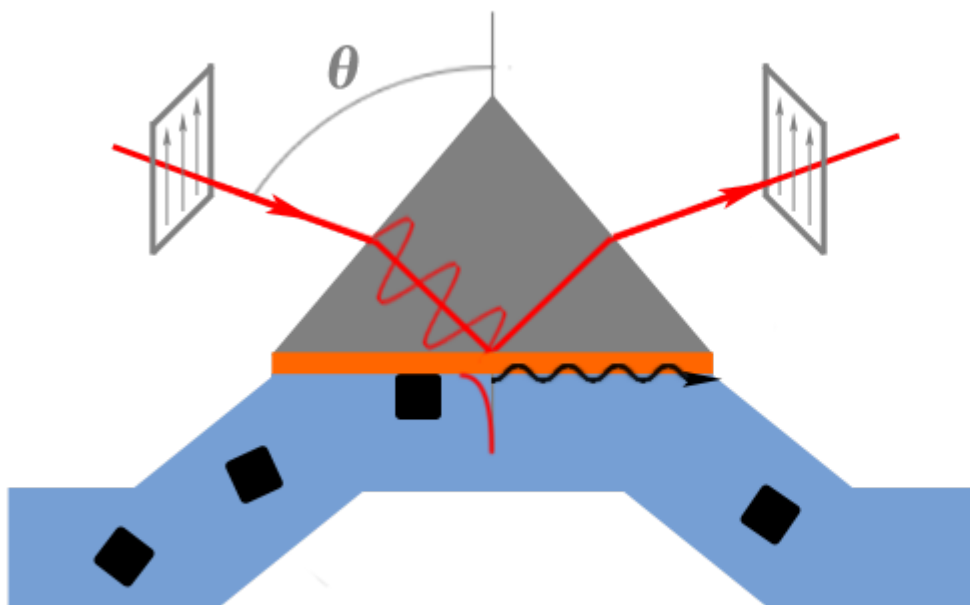
$$k_{sp} = \frac{2\pi}{\lambda} \sqrt{\frac{\epsilon_{Au} \epsilon_{p-ra}}{\epsilon_{Au} + \epsilon_{p-ra}}}$$

Условие резонанса: $k_{sp}^0 = k_{ph}^0 = \frac{2\pi}{\lambda} n_{призмы} \sin \varphi$

Поверхностный плазмонный резонанс

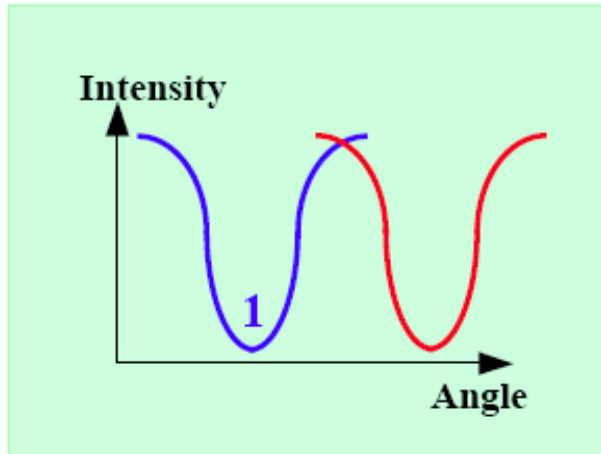


Изменение локальной диэлектрической проницаемости вблизи поверхности вследствие, например, взаимодействия свободного лиганда с иммобилизованным рецептором вызывает сдвиг положения резонанса

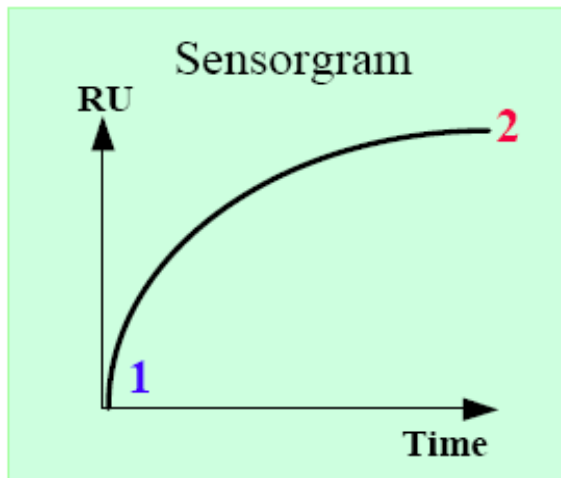


Чувствительность метода SPR составляет около 0.1 - 1 пг/мм²

Сенсограмма

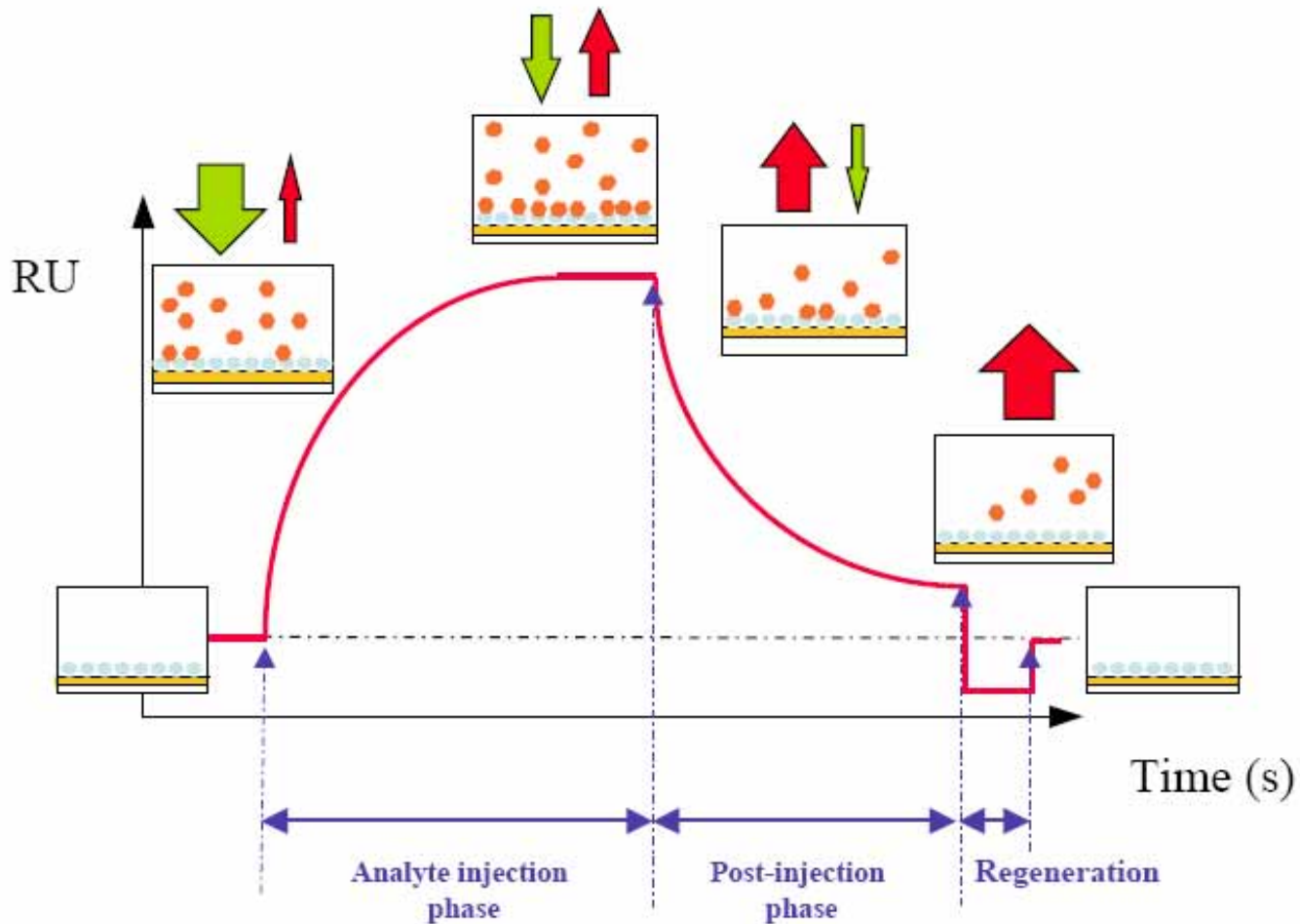


2

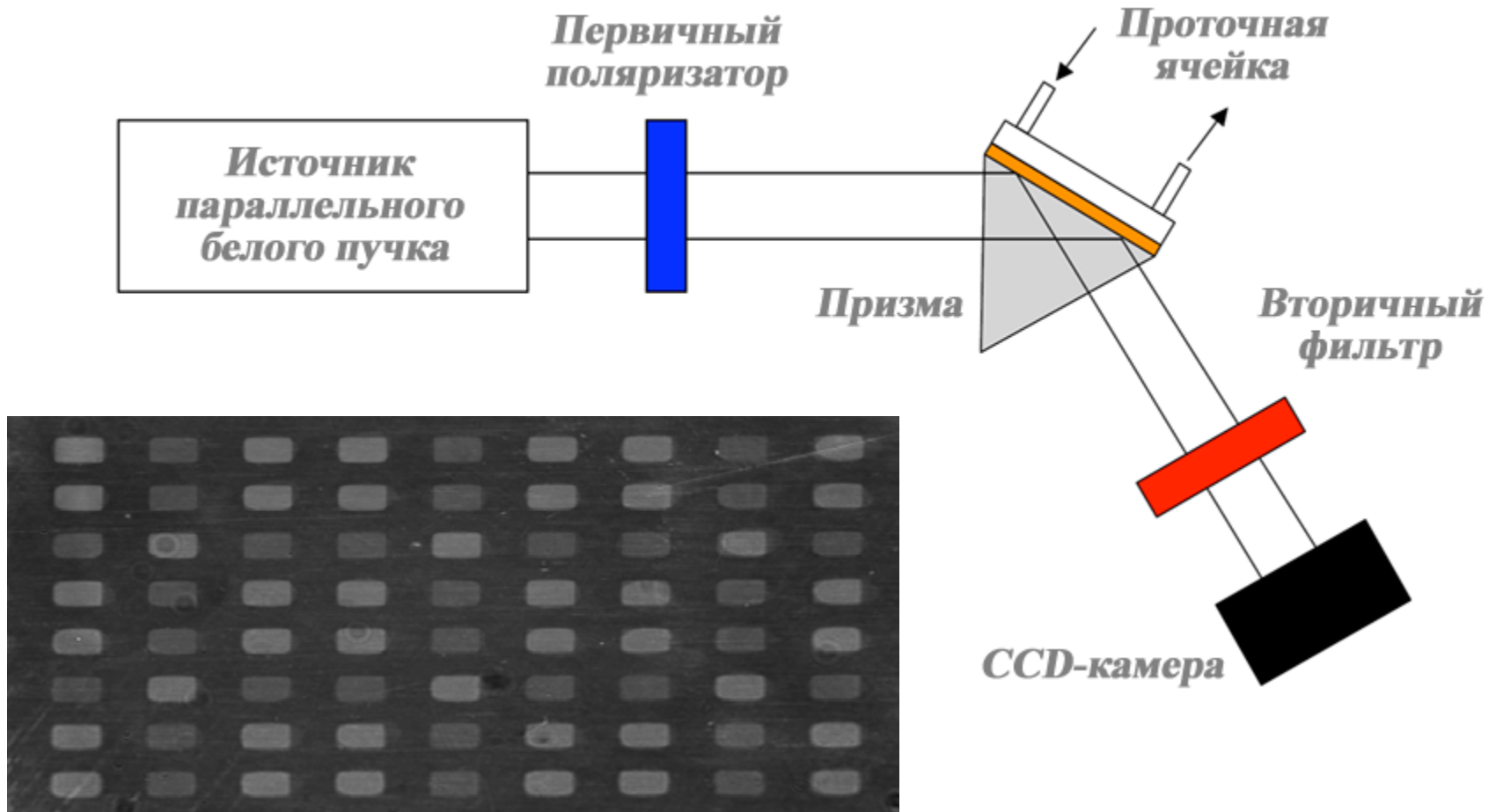


* RU – resonance units. Единица измерения, активно используемая компанией **BiaCore®**.
1000 RU = 0.1° сдвига положения резонанса.
1 RU приблизительно соответствует связыванию 1 пг белка на мм² сенсора.

Фазы сенсограммы



SPR Imaging

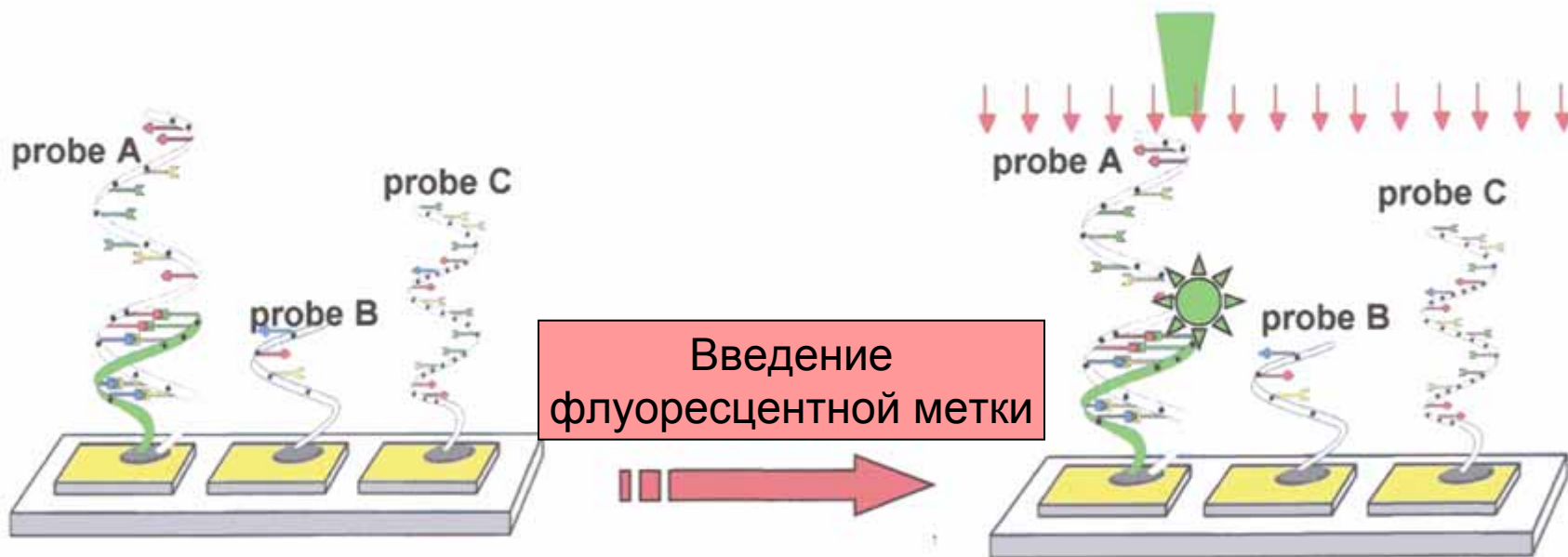


Изображение на CCD-камере. Белые участки соответствуют зонам с низким уровнем связывания, темные – с высоким. Усреднение сигнала по площади зоны дает количественную характеристику степени связывания

ДНК -чипы

Гибридизация образцов

Детекция образовавшихся комплексов

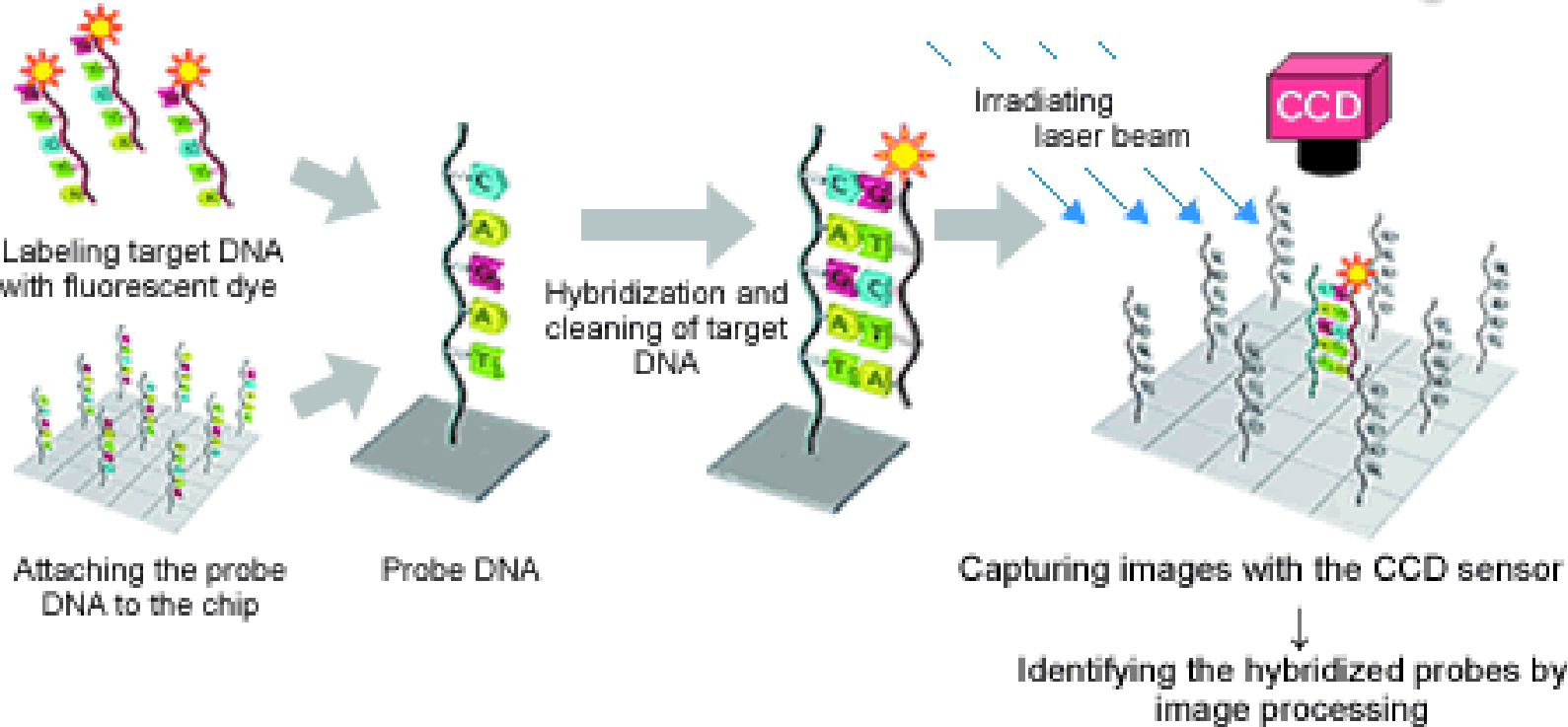




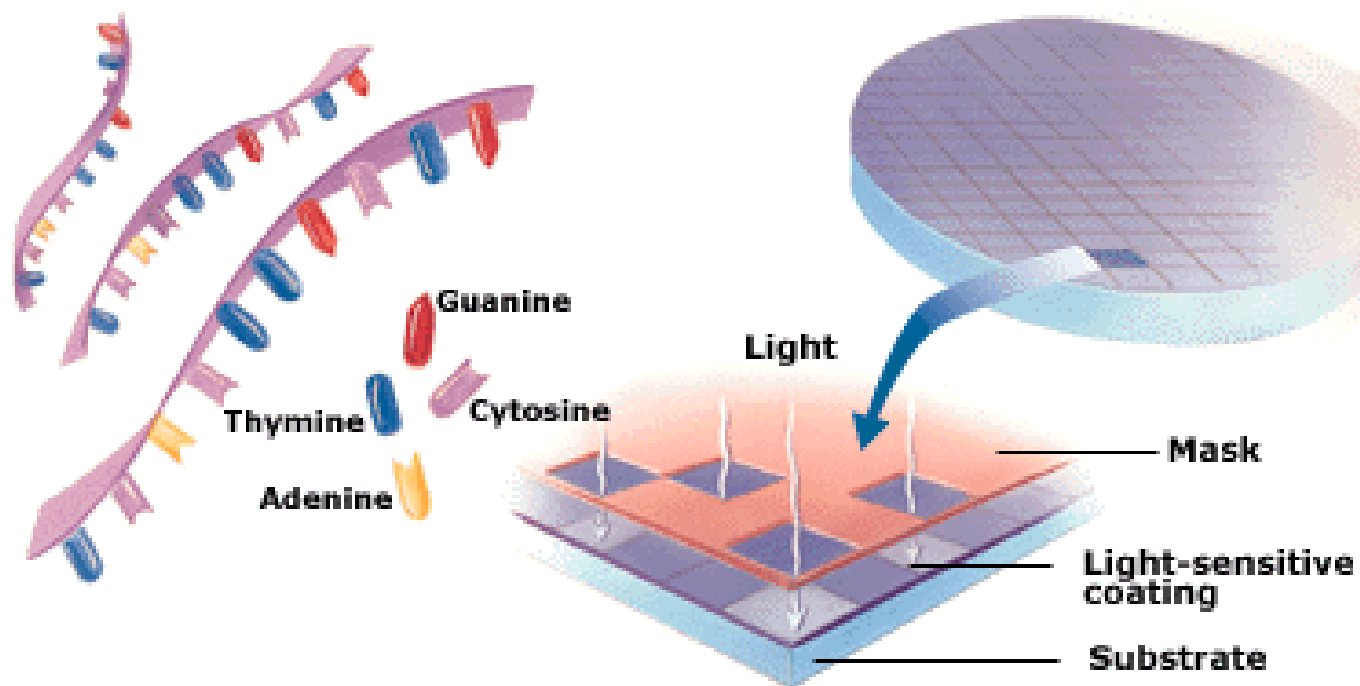
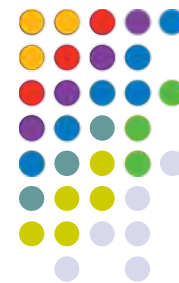
Предварительное введение флуоресцентной метки



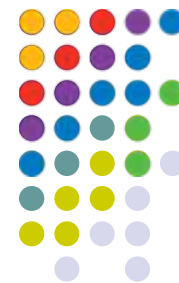
The four bases A, T, G, and C bind A to T or G to C. A target DNA sequence is analyzed by checking which bases the target DNA bases bind.



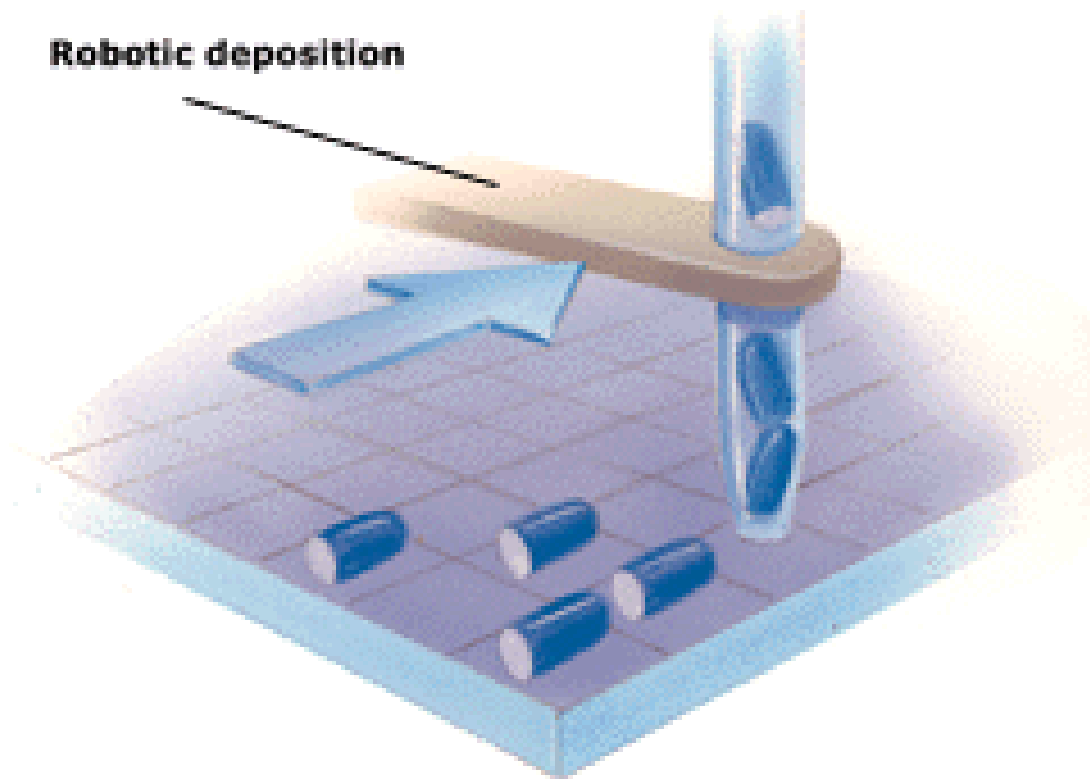
Изготовление ДНК-чипов



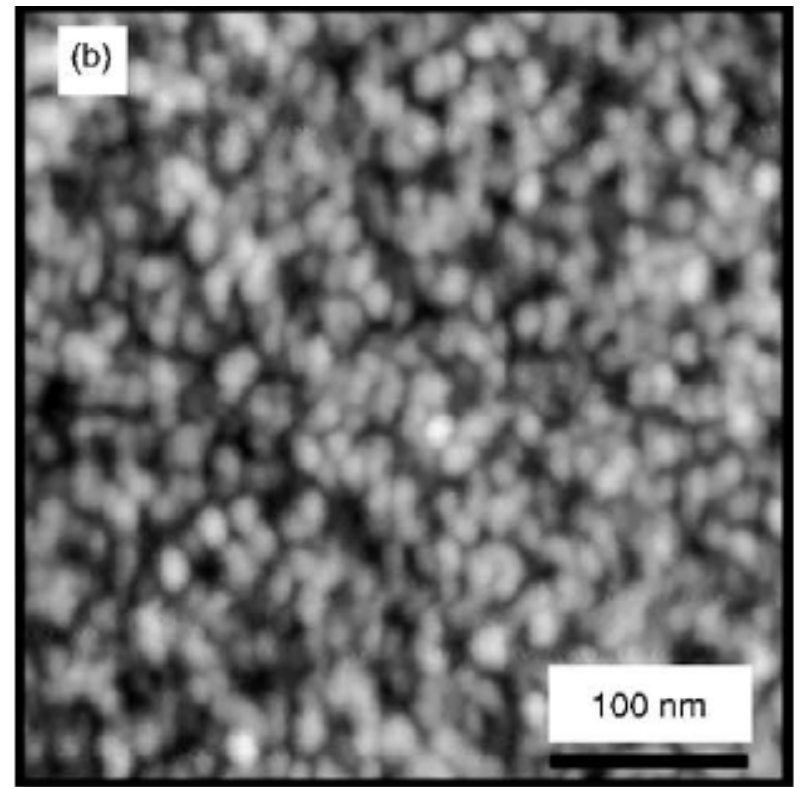
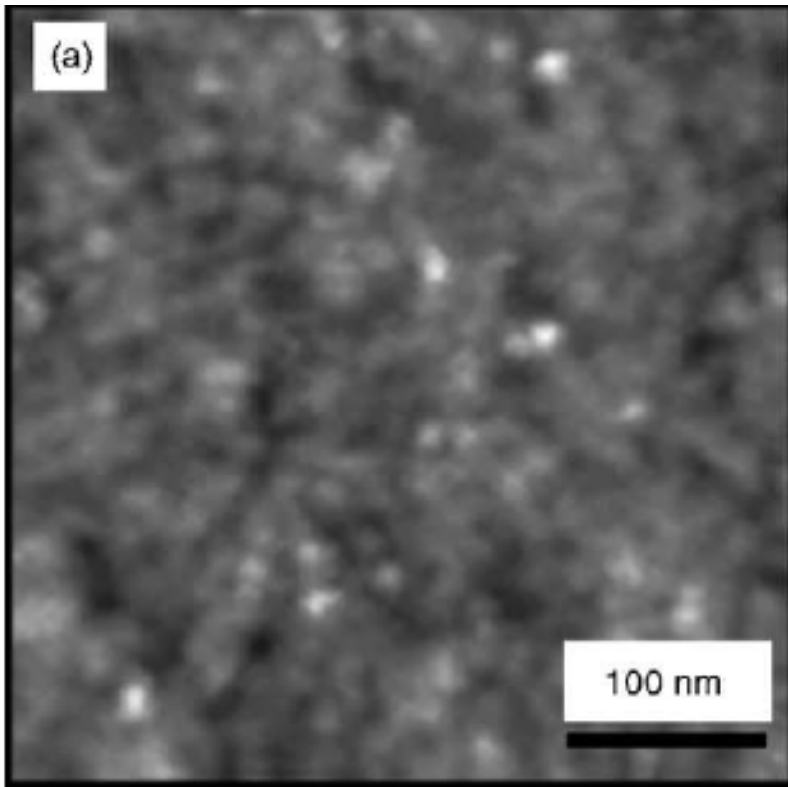
Нанесение генетического материала



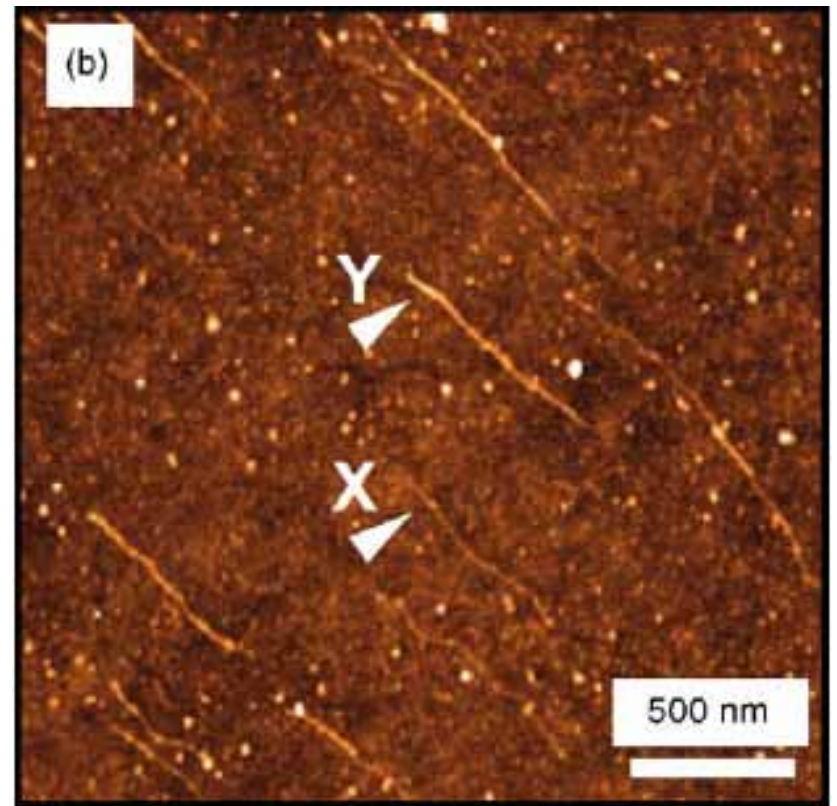
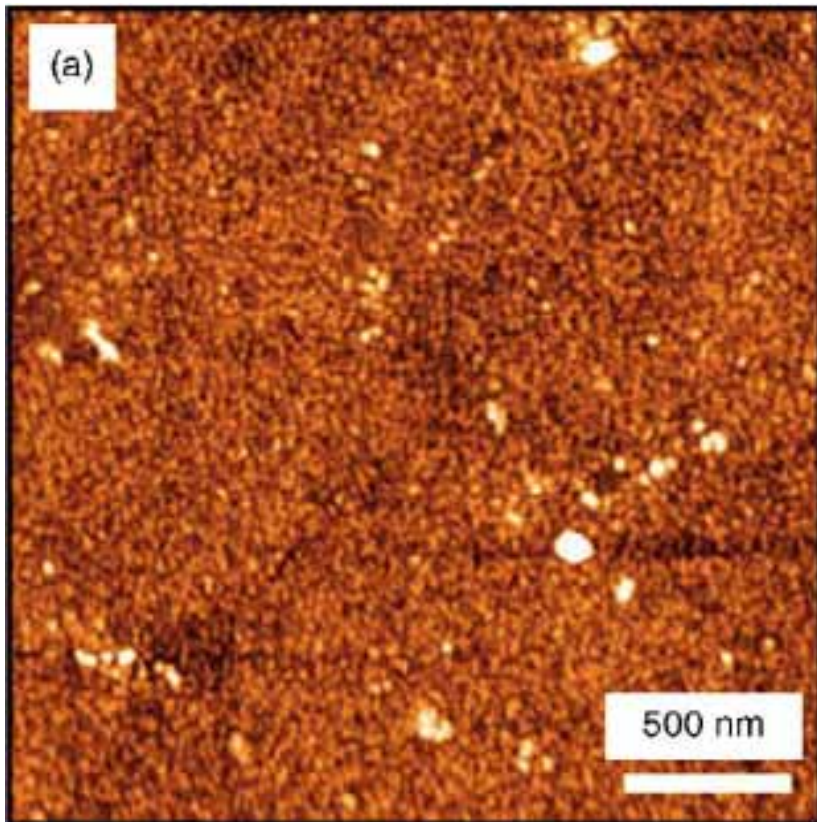
Robotic deposition



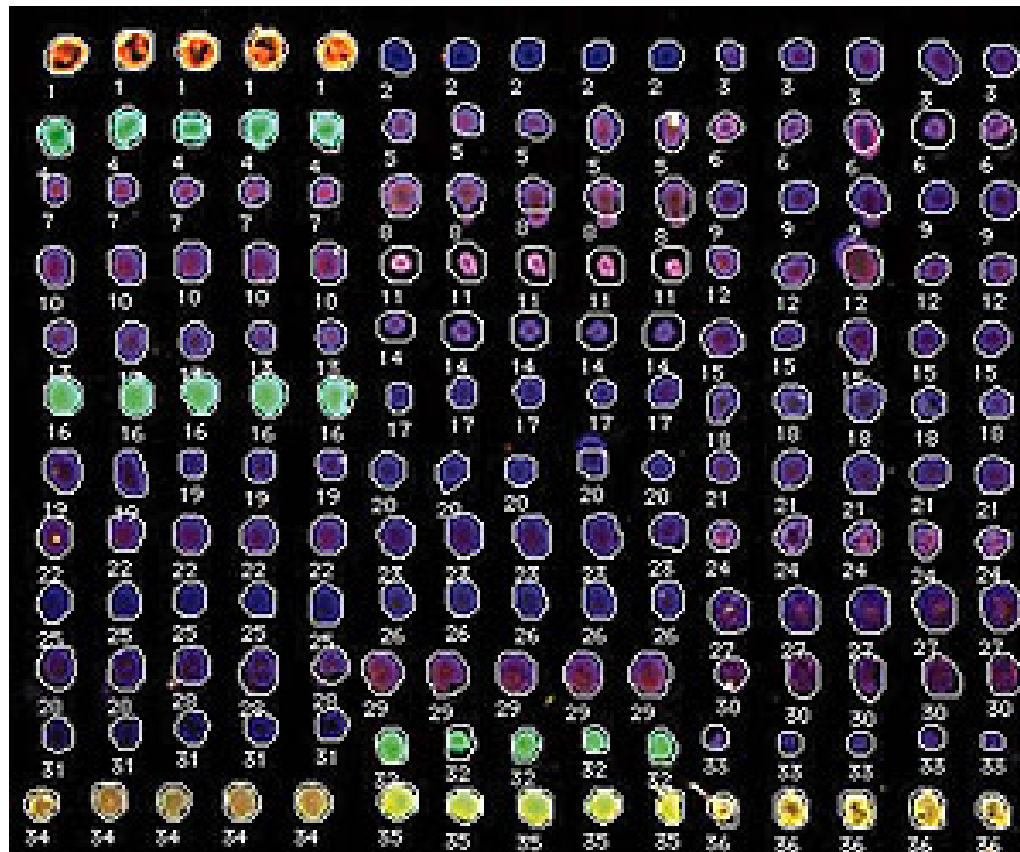
АСМ-изображение поверхности ДНК-чипа до и после иммобилизации зонда



АСМ-изображение поверхности ДНК-чипа до и после гибридизации



Типичный вид ДНК-чипа после анализа



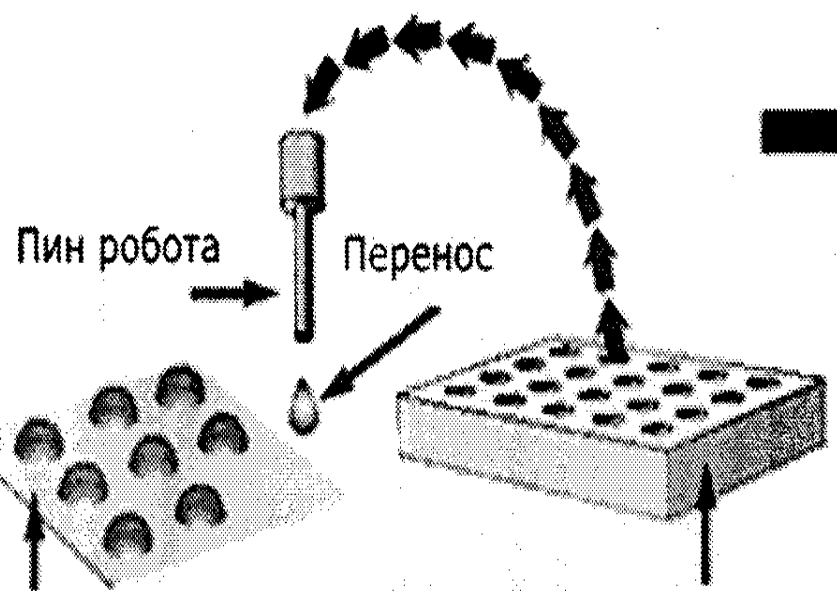


Биологические микрочипы, содержащие иммобилизованные в гидрогеле нуклеиновые кислоты, белки и другие соединения и частицы

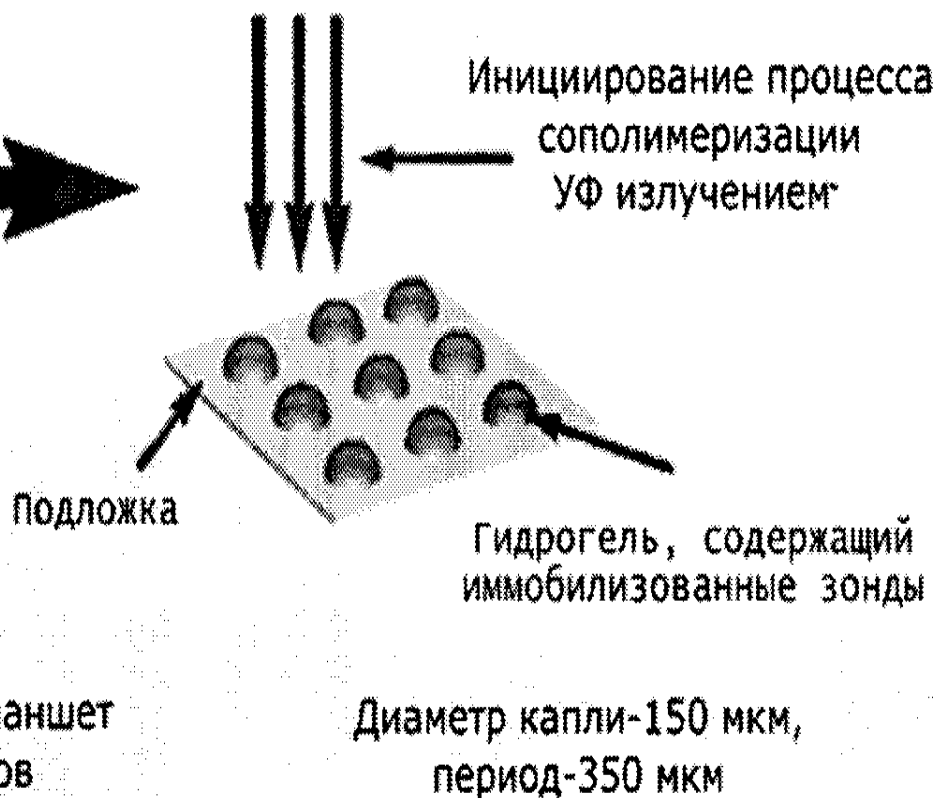
- **МАГИК – чип (Матрица Гель-Иммобилизованных Компонентов на микрочипе)**



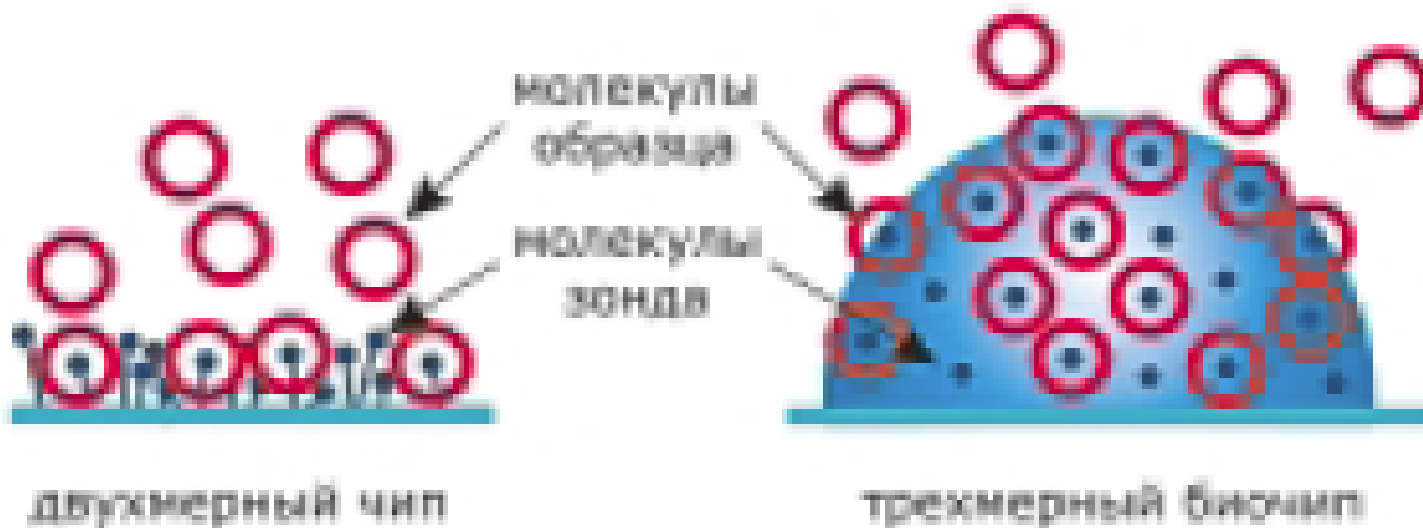
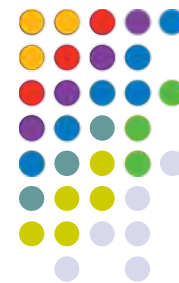
Робот переносит растворы зондов из планшета на подложку



УФ излучение



Молекулярные взаимодействия на поверхностных и МАГИК- микрочипах



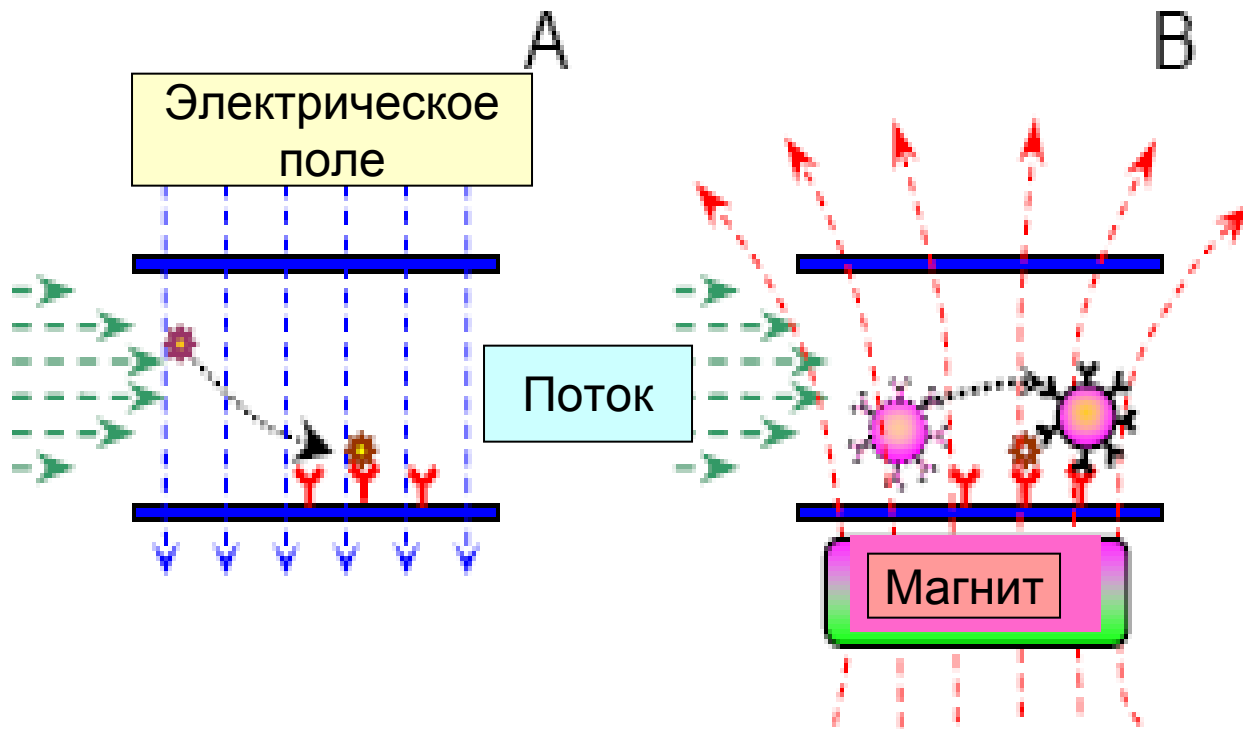
Анализатор биочипов с портативным флуоресцентным микроскопом, разработанный в ИМБ РАН



Ускорение иммунореакций за счёт электрического и магнитных полей



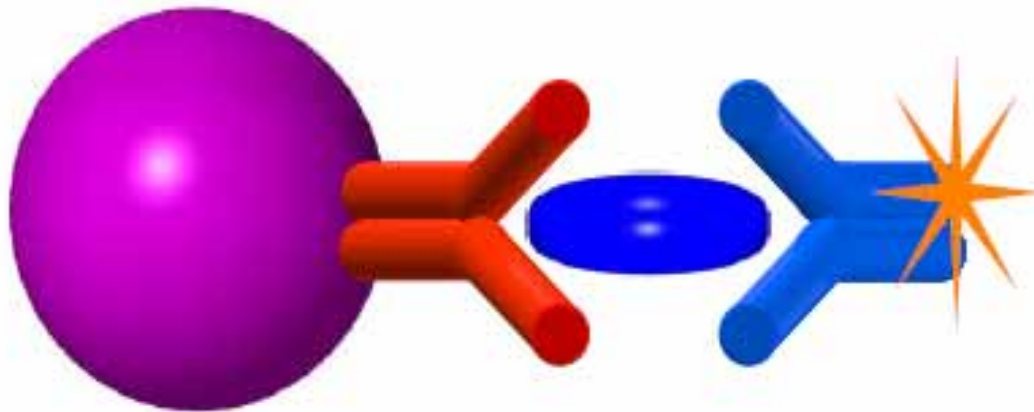
Ускорение реакций на поверхности чипов



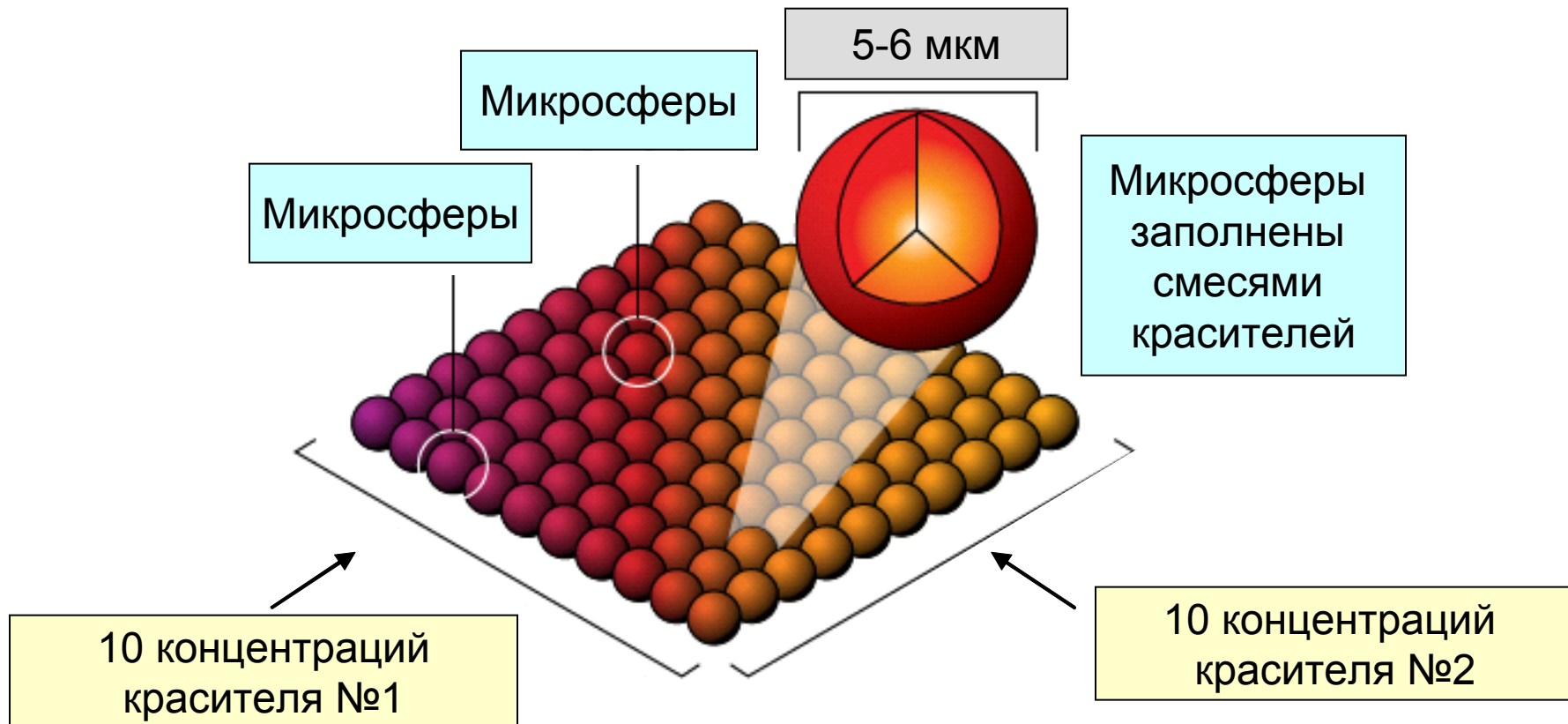
Микросферы



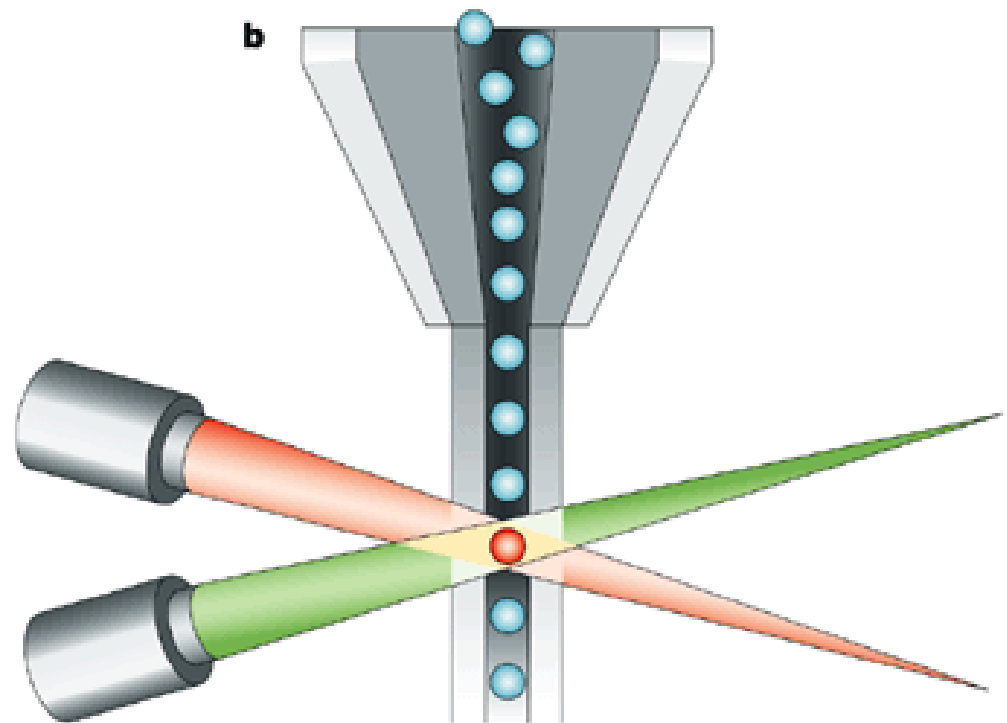
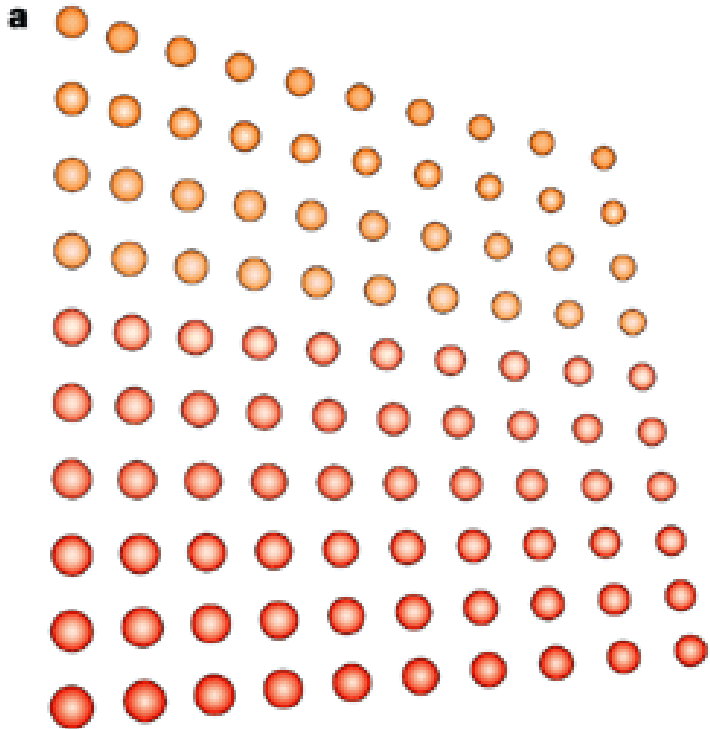
Иммуноанализ с использованием
микросфер



Микросферы

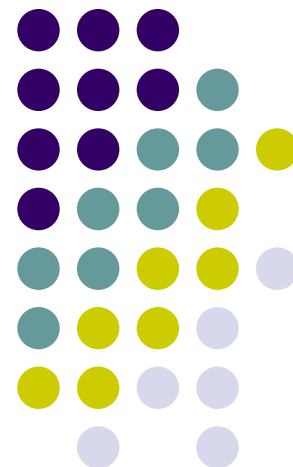


Регистрация сигналов от микросфер



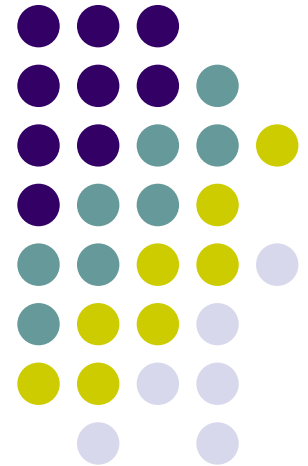


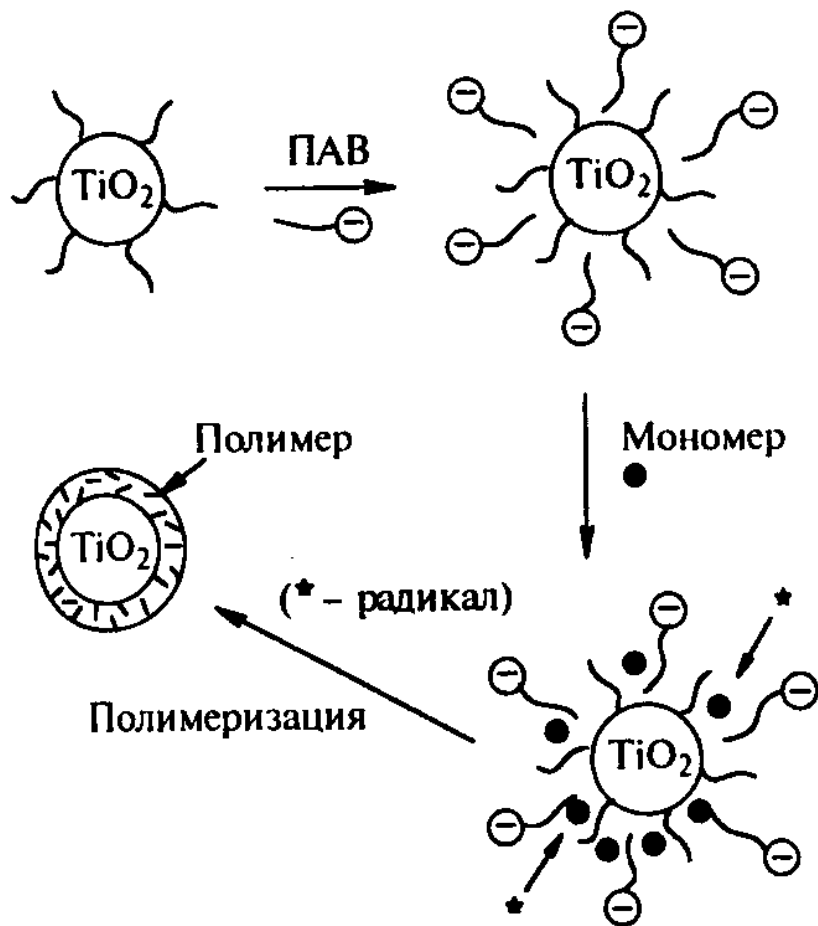
Наночастицы и «наносенсоры»



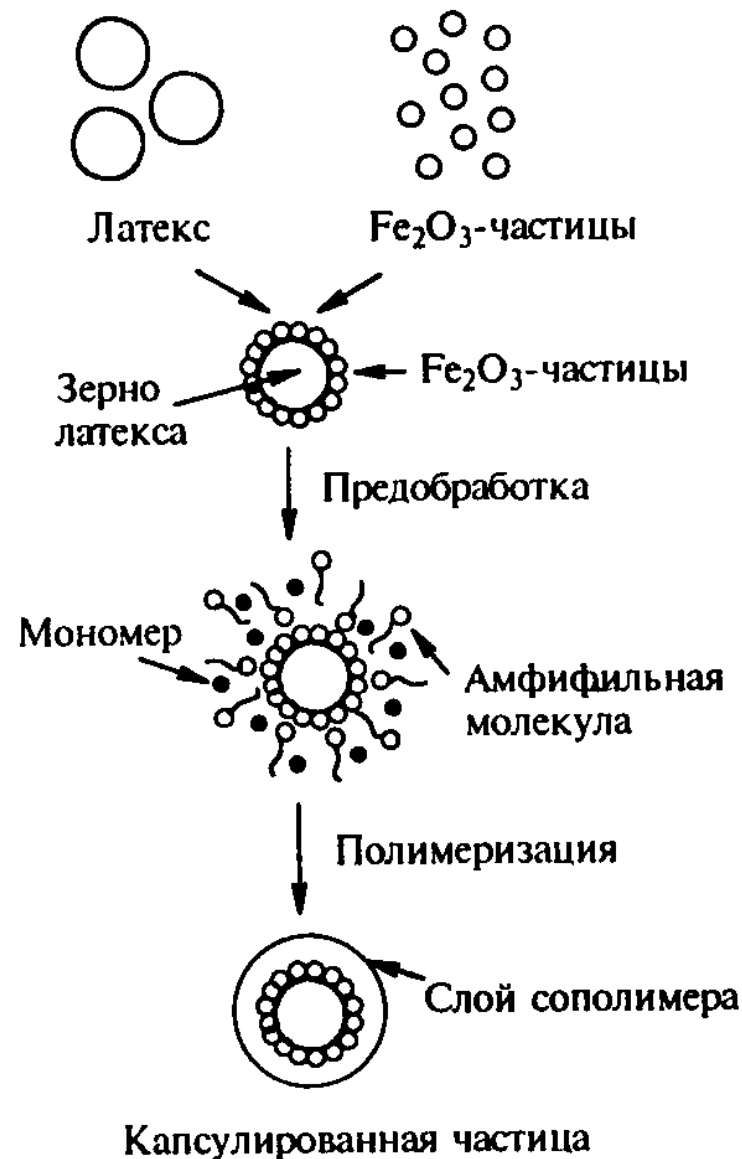


**Вопросы получения
наночастиц и процессы их
стабилизации необходимо
рассматривать совместно**





a



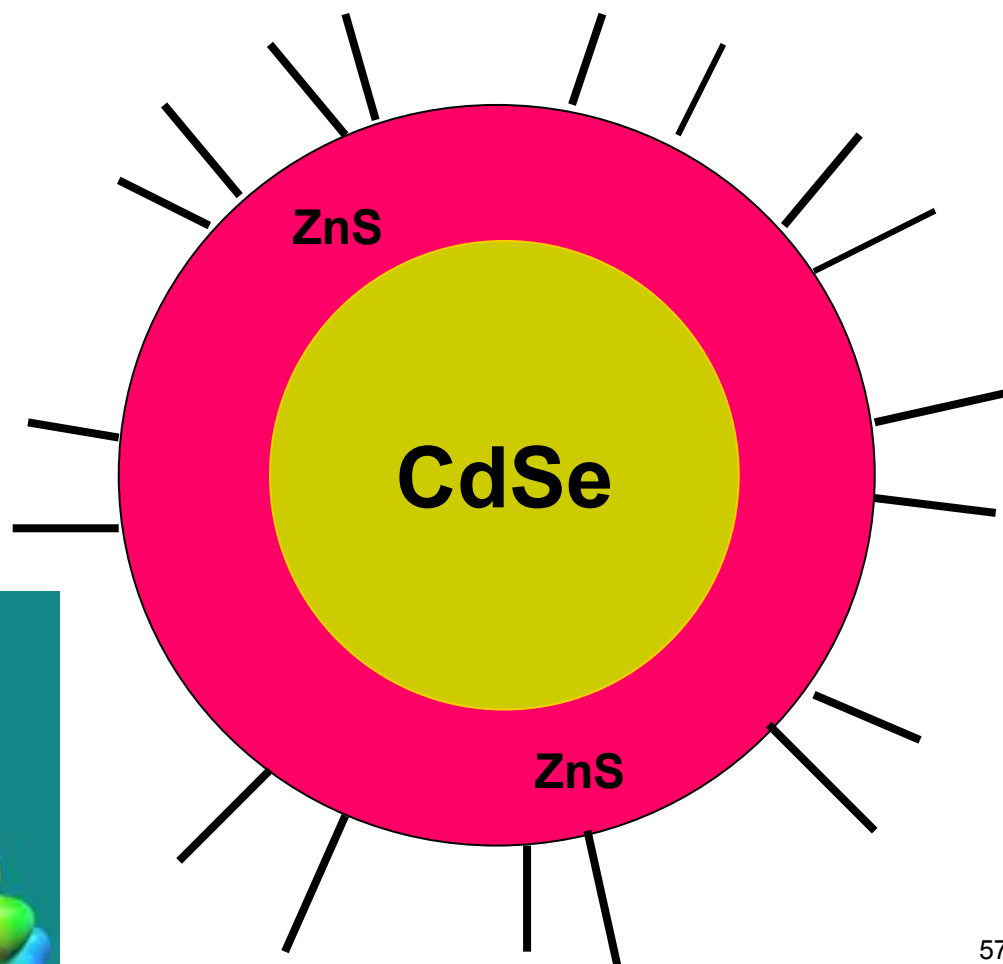
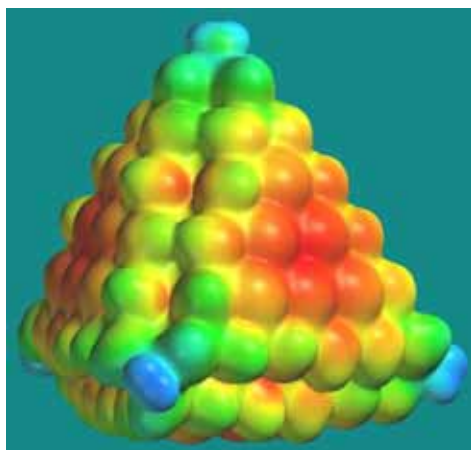
b

Эмульсионная полимеризация на поверхности НРЧ и их инкапсулирование

Полупроводниковые наночастицы – квантовые ТОЧКИ

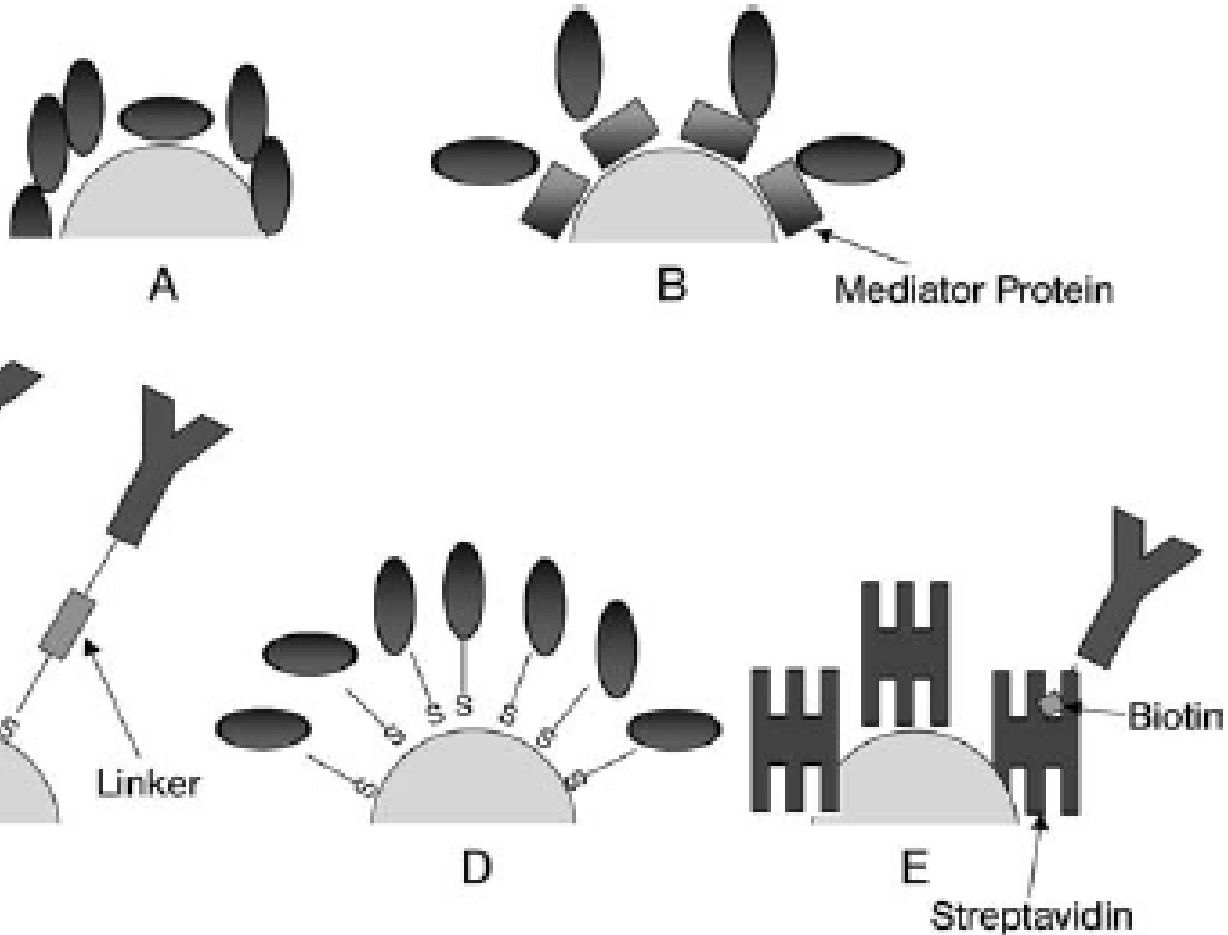


- InAs
- CdS
- CdSe
- CdTe





Стратегия получения конъюгатов наночастиц и биомолекул





Спектроскопия комбинационного рассеяния света («рамановская» спектроскопия) – раздел оптической спектроскопии, изучающий взаимодействие монохроматического излучения с веществом, сопровождающееся изменением энергии рассеянного излучения по сравнению с энергией падающего на объект (возбуждающего) излучения

- Комбинационное рассеяние света (КРС) – рассеяние в газах, жидкостях и кристаллах, сопровождающееся заметным изменением частоты.
- В отличие от рэлеевского рассеяния света, при КРС в спектре рассеянного излучения наблюдаются спектральные линии, отсутствующие в линейчатом спектре первичного (возбуждающего) света.
- Число и расположение появляющихся линий (называемых комбинационными линиями или спутниками) определяется молекулярным строением вещества.

КРС было открыто Г. С. Ландсбергом и Л. И. Мандельштамом в 1928 г. при исследовании рассеяния света в кристаллах и одновременно Ч. В. Раманом и К. С. Кришнаном при исследовании рассеяния света в жидкостях



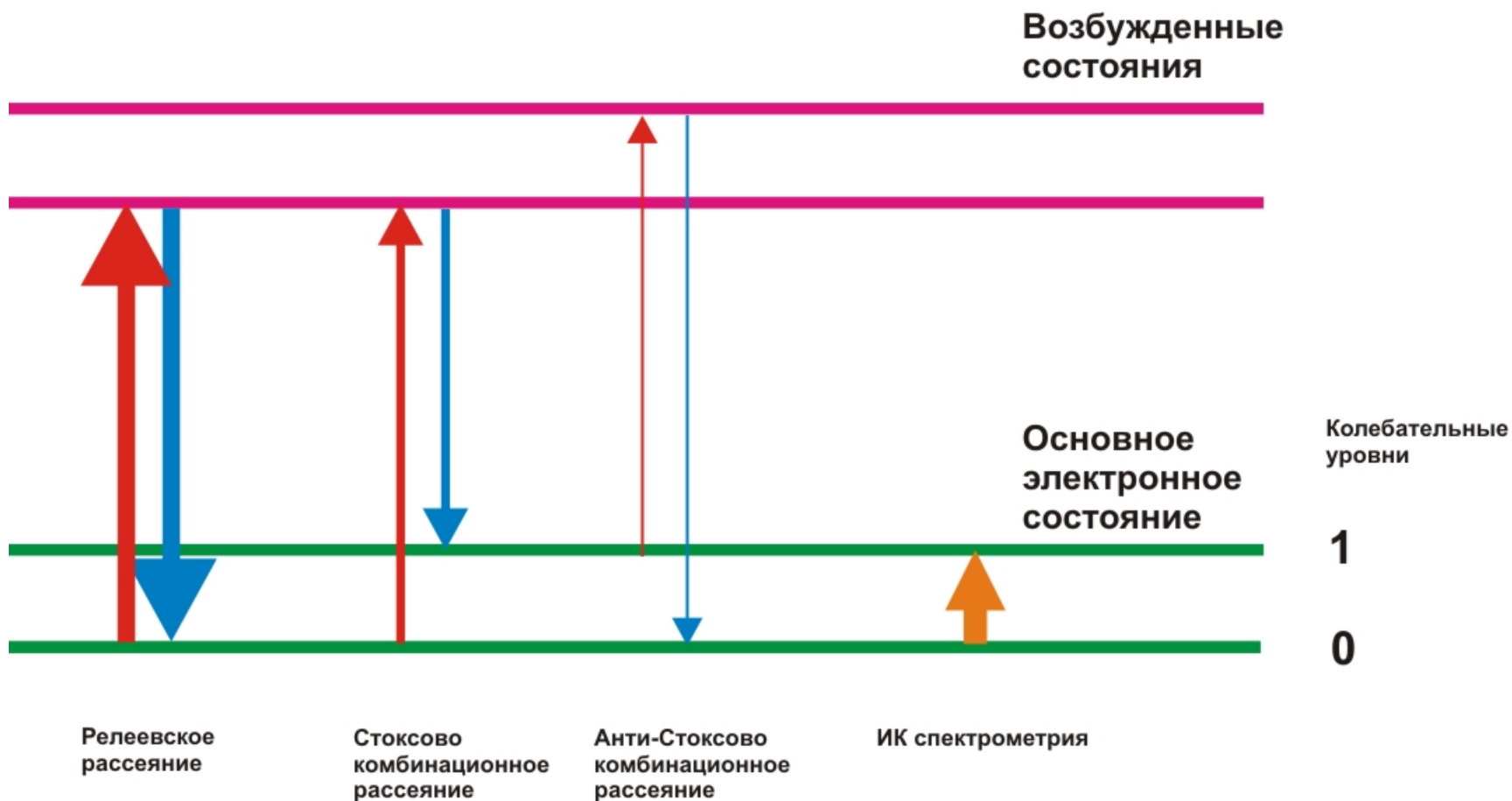
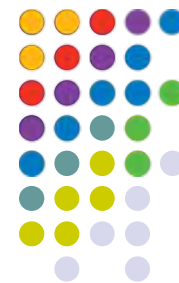
Ч. В. Раман

К. С. Кришнан

Г. С. Ландсберг

*Л. И.
Мандельштам*

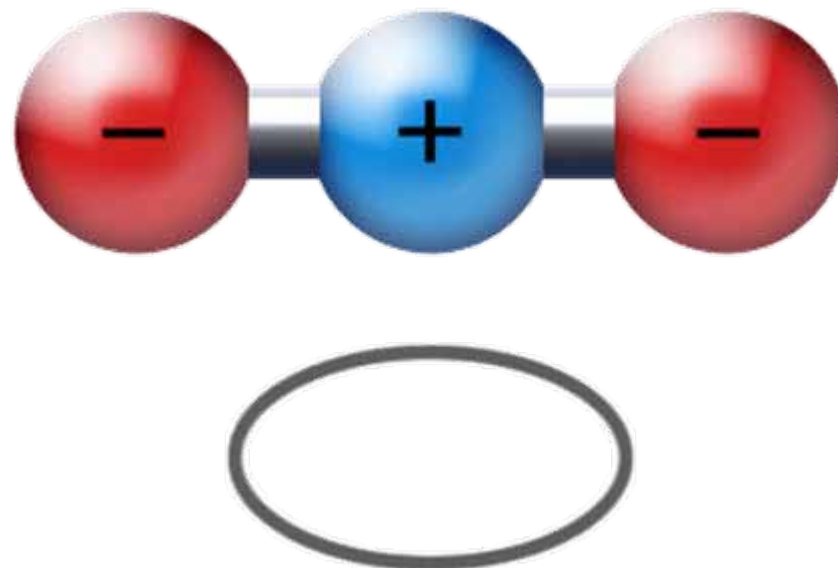
Схема процессов при взаимодействии излучения с веществом



Какие колебания видны?



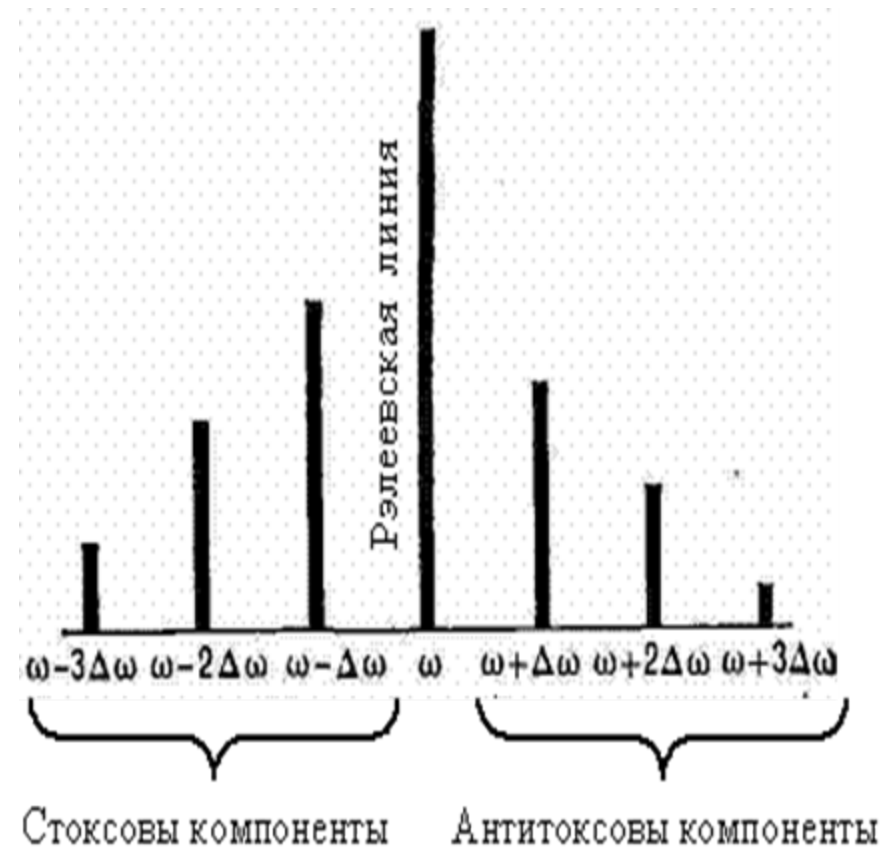
- Это колебание полностью симметричное и сохраняет все виды симметрии, имеющиеся в этой молекуле. Поскольку молекула имеет центр симметрии, то ее дипольный момент равен нулю, а следовательно, не может излучать (поглощать) инфракрасное излучение соответствующей частоты (в дипольном приближении).
- В спектре комбинационного рассеяния это колебание, напротив, наблюдается (говорят, что колебание «активно»), поскольку при таком колебании изменяется расстояние между атомами, а значит, сильно изменяется поле, в котором находятся валентные электроны молекулы, и, как следствие, изменяется поляризуемость молекулы.





Теория эффекта КРС

- Интенсивность линий КРС в большинстве случаев весьма мала, причём при обычных температурах интенсивность антистоксовых линий $I_{аст}$, как правило, значительно меньше интенсивности стоксовых линий $I_{ст}$.
- Поскольку вероятность рассеяния пропорциональна числу рассеивающих молекул, то отношение $I_{аст}/I_{ст}$ определяется отношением населённостей основного и возбуждённого уровней.
- При обычных температурах населённость возбуждённых уровней невелика и, следовательно, интенсивность антистоксовой компоненты мала. С повышением температуры их населённость возрастает, что приводит к увеличению интенсивности антистоксовых линий.





Теория эффекта КРС

- Интенсивности линий спектров КРС чрезвычайно слаба и составляет примерно 10^{-5} , 10^{-6} интенсивности рассеиваемой рэлеевской компоненты падающей световой волны.

Чувствительность – одна из 10^{11} молекул

- Поэтому для наблюдения спектров КРС необходимо сконцентрировать интенсивный пучок света на изучаемом объекте.
- В качестве источника возбуждающего света чаще всего применяют ртутную лампу, а с 60-х гг. прошлого столетия — лазерный луч. Рассеянный свет фокусируется и попадает в спектрограф, где спектр КРС регистрируется фотографическим или фотоэлектрическим методами.

Гигантские нелинейно-оптические явления на поверхности металлов



- В 1974 году в работе Флейшмана и соавторов было показано, что эффективность получения спектров комбинационного рассеяния может быть повышена в миллионны раз и более при адсорбции анализируемого соединения на поверхности наночастиц металлов.
- Это явление получило название **Surface-enhanced Raman Scattering (SERS)**.
- Fleischmann M, Hendra PJ, McQuillan AJ. Raman Spectra of Pyridine Adsorbed at a Silver Electrode. Chemical Physics Letters, 1974; 26(2), 163-6.

ГКР (SERS)



- Существенное усиление сигнала (в 10^4 – 10^6 обычно, 10^8 – 10^{14} иногда) сигнала при адсорбции вещества на поверхности.
- Электромагнитное усиление (ЕМЕ).
- Химическое усиление (СЕ).
- Наночастицы металлов – Au, Ag, Cu, Li, Na, K.
Плохо – Pt, Pd.



SERS

(демонстрация LSPR)

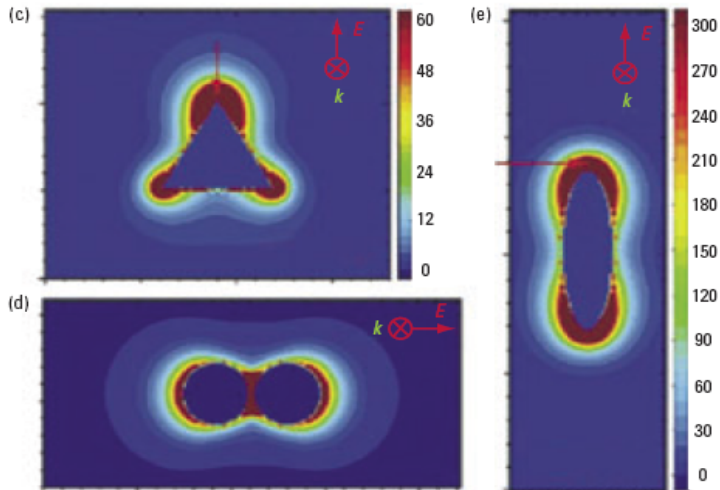
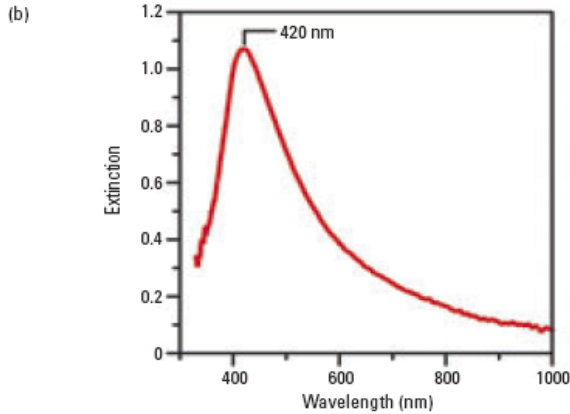
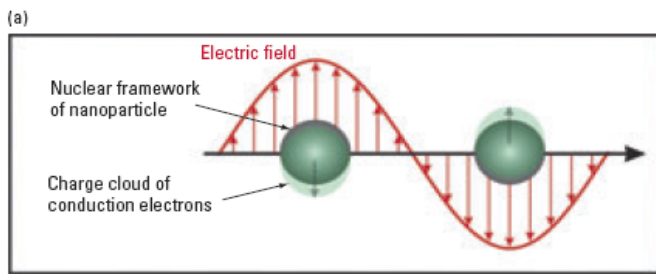


FIGURE 1. SERS phenomenon.

(a) Illustration of the excitation of the LSPRs of a spherical nanoparticle by incident electromagnetic radiation. (b) Extinction spectrum of citrate-reduced silver colloids. The peak indicates the excitation of the LSPR. Theoretical simulations of the electromagnetic field enhancement around silver nanoparticles of (c) a triangular nanoparticle (700 nm), (d) a dimer of spherical nanoparticles (520 nm), and (e) an ellipsoidal nanoparticle (695 nm). The intensity scale for (c) also applies to (d). (Adapted with permission from Ref. 23.)

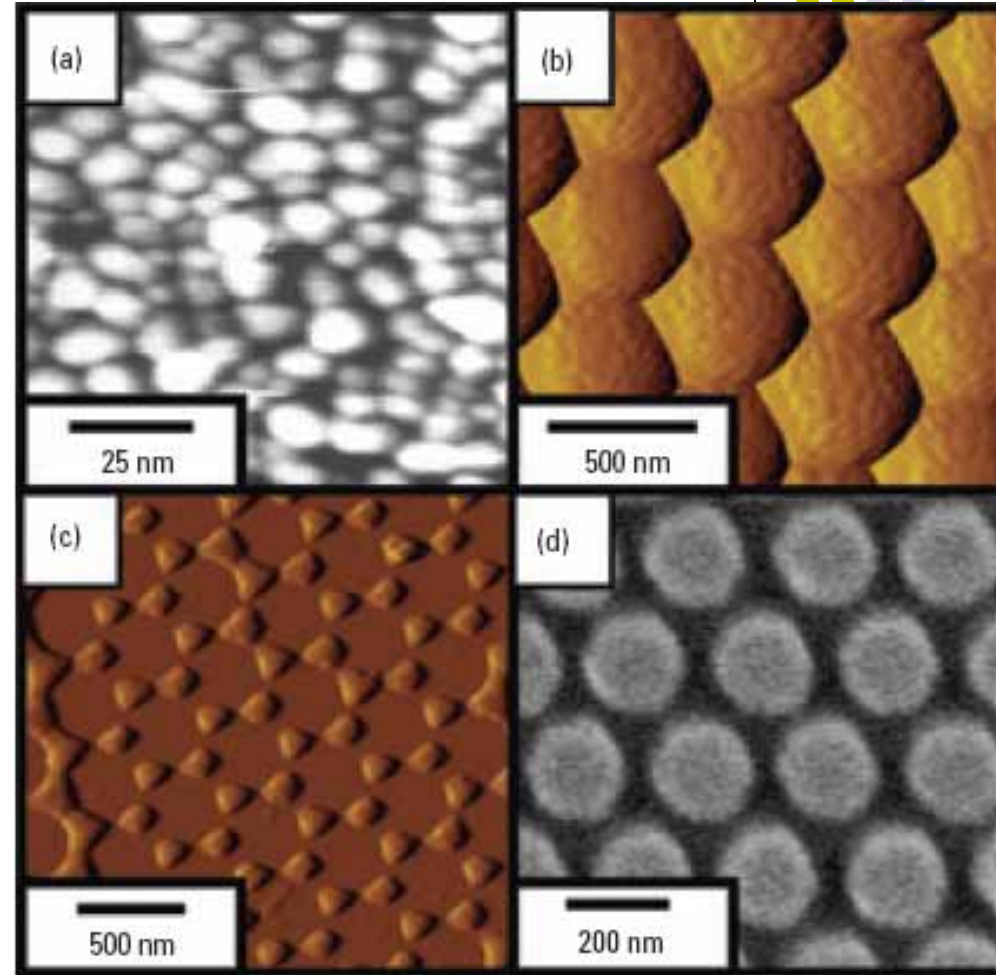
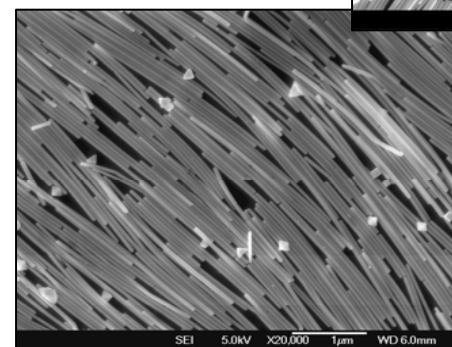
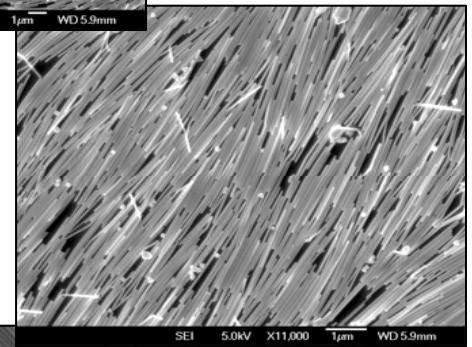
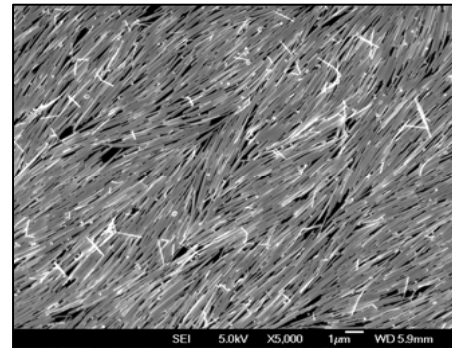
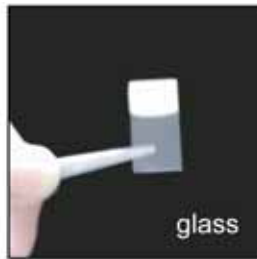
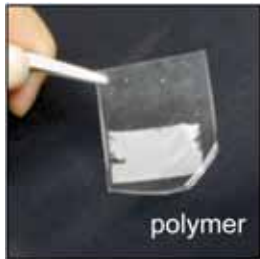


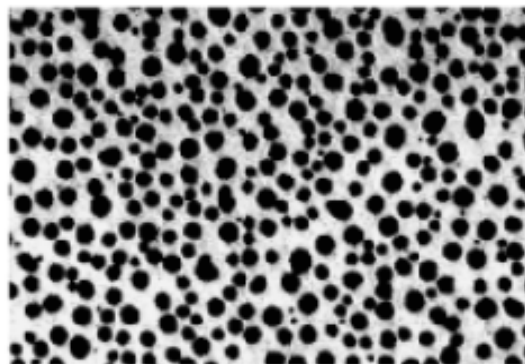
FIGURE 2. Sample substrates.

(a) Metal island film, (b) metal film over nanospheres, (c) triangular nanoparticle array fabricated with nanosphere lithography, and (d) cylindrical nanoparticle array fabricated with electron-beam lithography.

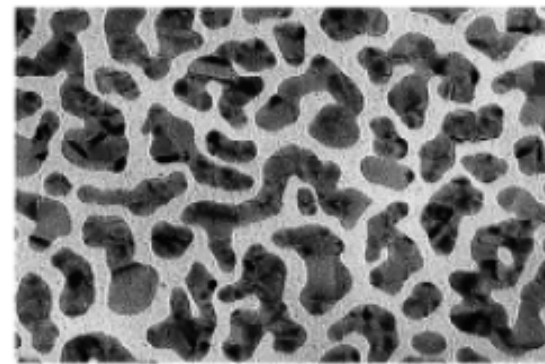
Монослой наностержней серебра



Полунепрерывные плёнки



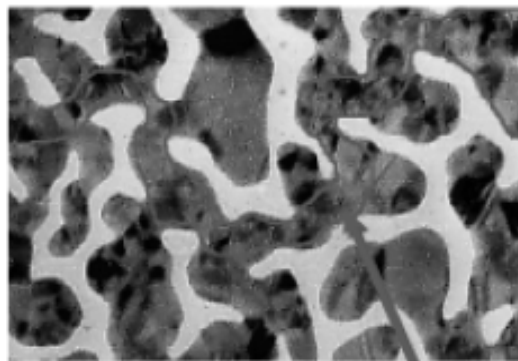
Equivalent Mass thickness $\sim 20 \text{ \AA}$



gold

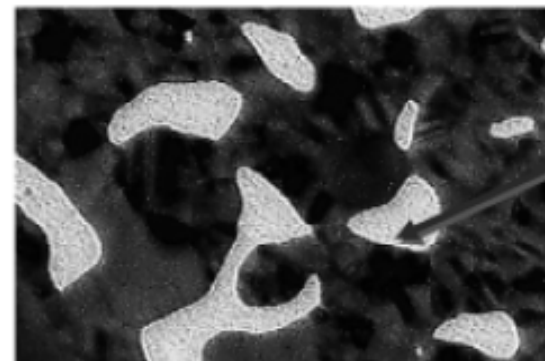
45 \AA

\longleftrightarrow
50 nm



65 \AA

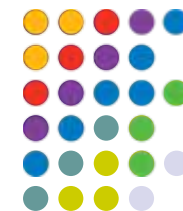
Percolation threshold



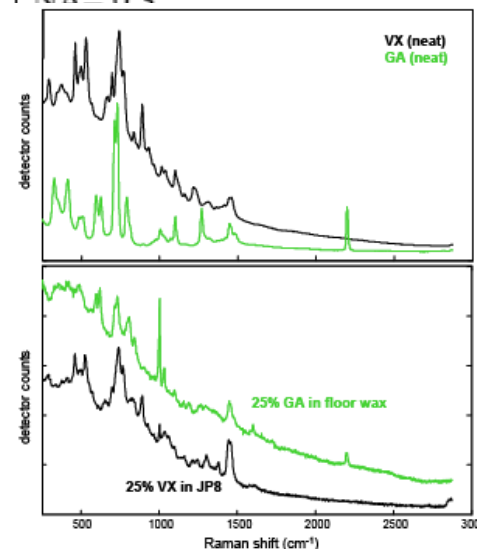
glass

106 \AA

Портативные КР-приборы для определения ОВ



Parameter	Specification
Monochromator Spectral Range	781 nm-1014 nm
Raman Spectrum Range	250 cm^{-1} to 2875 cm^{-1}
Spectral Resolution	7 to 10 cm^{-1} (FWHM) across range
Laser (excitation wavelength)	785 nm +/- 0.5 nm (<2 cm^{-1} line width)
Laser Output	Settable, 30 mW, 100 mW, 300 mW
Rayleigh Rejection Filters	OD 7
Detector	Silicon CCD 2048 Pixels; TEC Cooled
Detection Mode	Direct Dispersive
Dispersion Mode	Single Pass Spectrometer (1200 groove/mm Blazed @ 900 nm)
Collection Optics	NA = 0.2



Examples of Spectral Data Collected in the Course of FirstDefender Testing. Top: spectra of neat VX and GA that were added to the library on the handheld device. Bottom: spectra acquired in auto-exposure mode that were used for device performance testing.

SERS



(a)

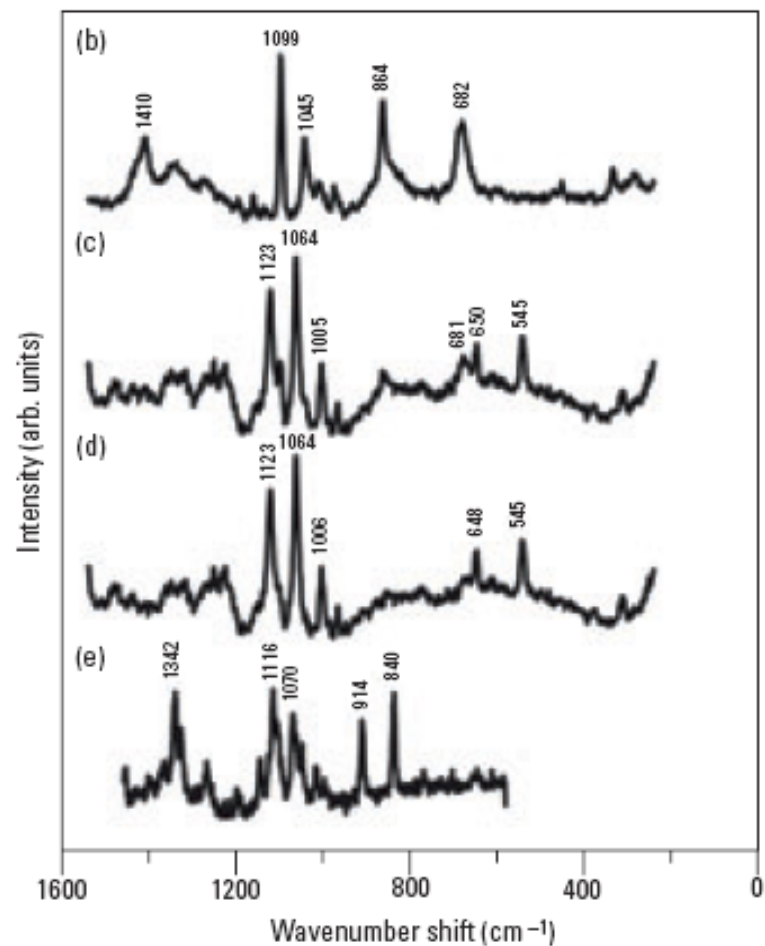
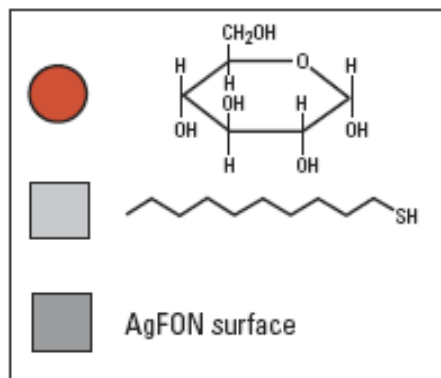
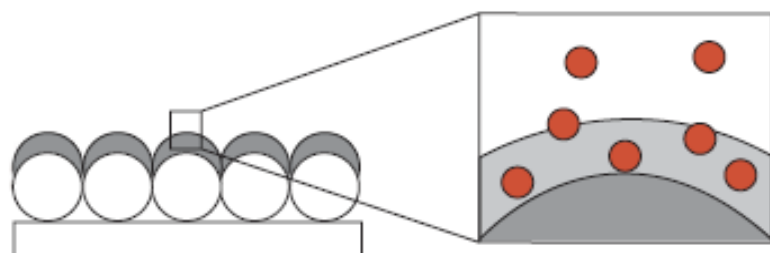
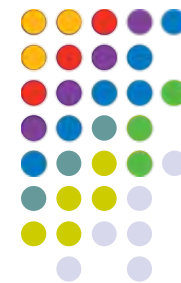


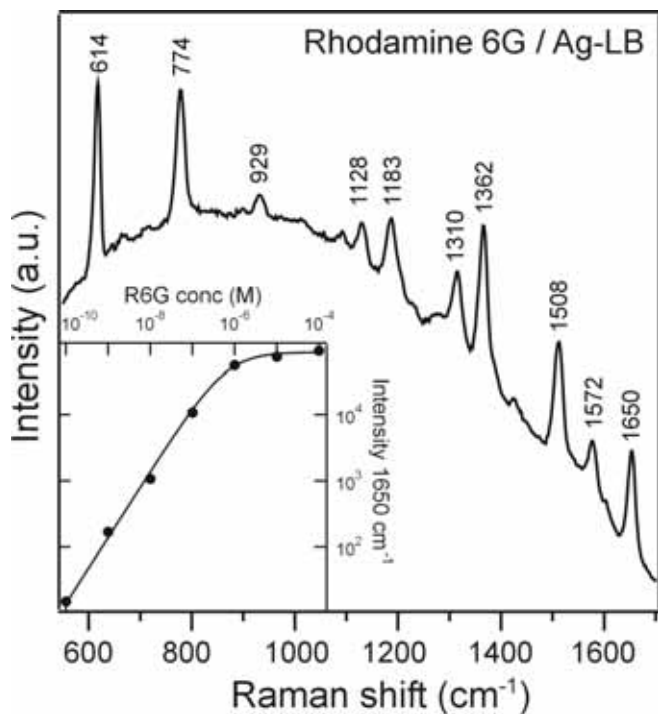
FIGURE 4. Prototype of an implantable glucose sensor.

(a) Schematic illustrating the use of a partition layer for detecting glucose. SER spectra of (b) a 1-decanethiol monolayer on a silver film over a nanosphere substrate and (c) the substrate during exposure to a 100-mM glucose solution. (d) The residual spectrum of glucose obtained by subtracting (b) from (c). (e) The normal Raman spectrum of crystalline glucose, for comparison. (Adapted from Ref. 7.)

Высокочувствительное и специфическое определения ВВ

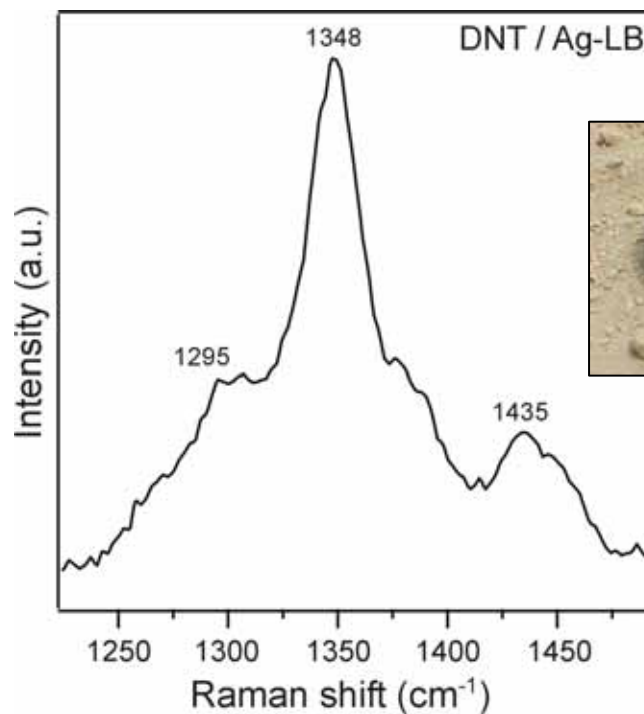


Dye detection



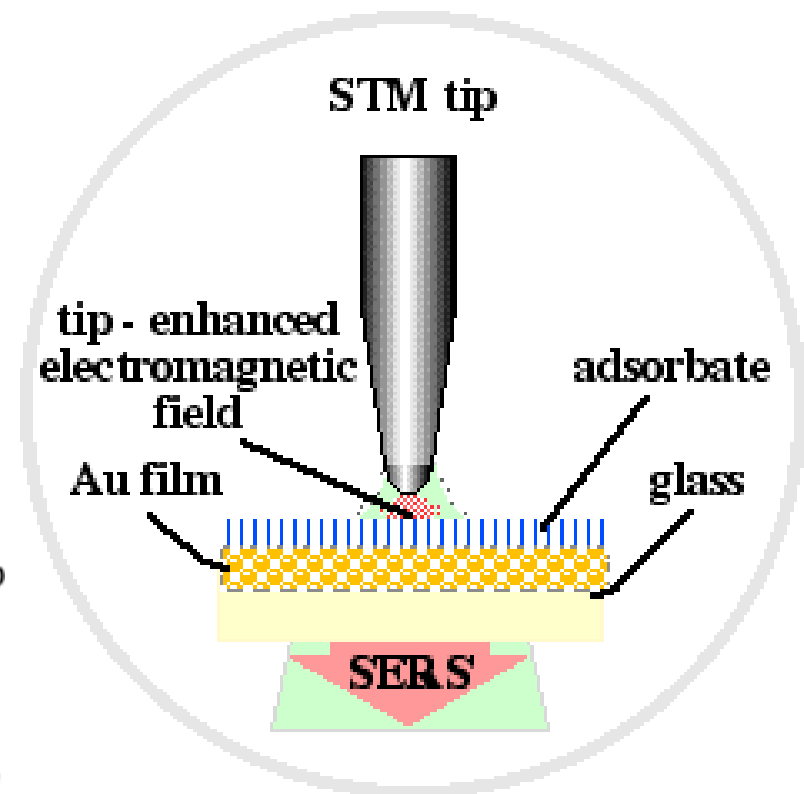
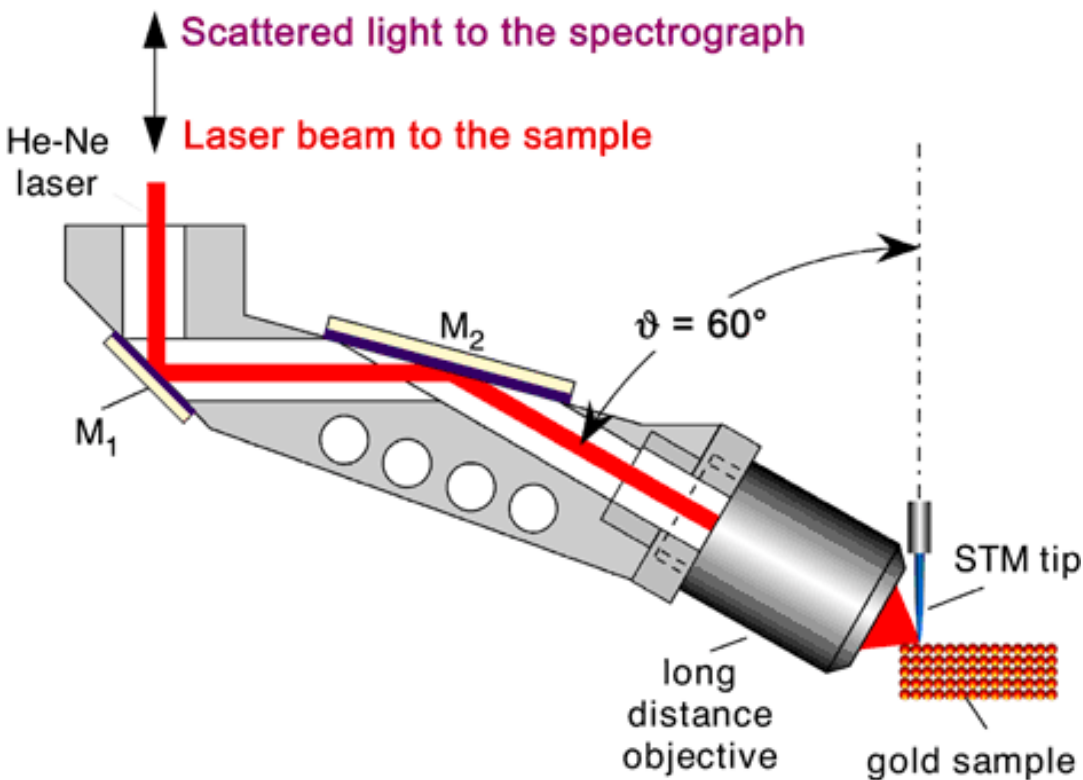
$$EF = 2 \times 10^9$$

Landmine detection



$$EF = 2 \times 10^5$$

Tip-Enhanced Raman Spectroscopy (TERS) – 2000 г.



TERS

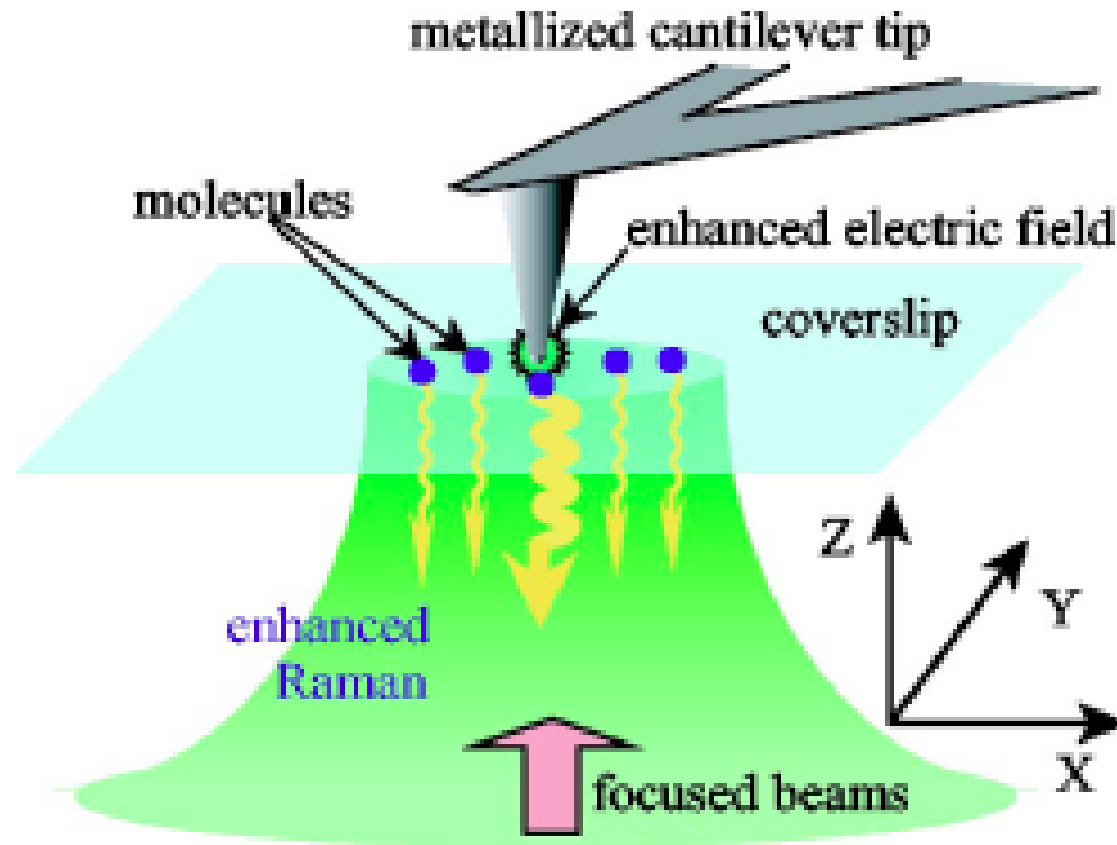
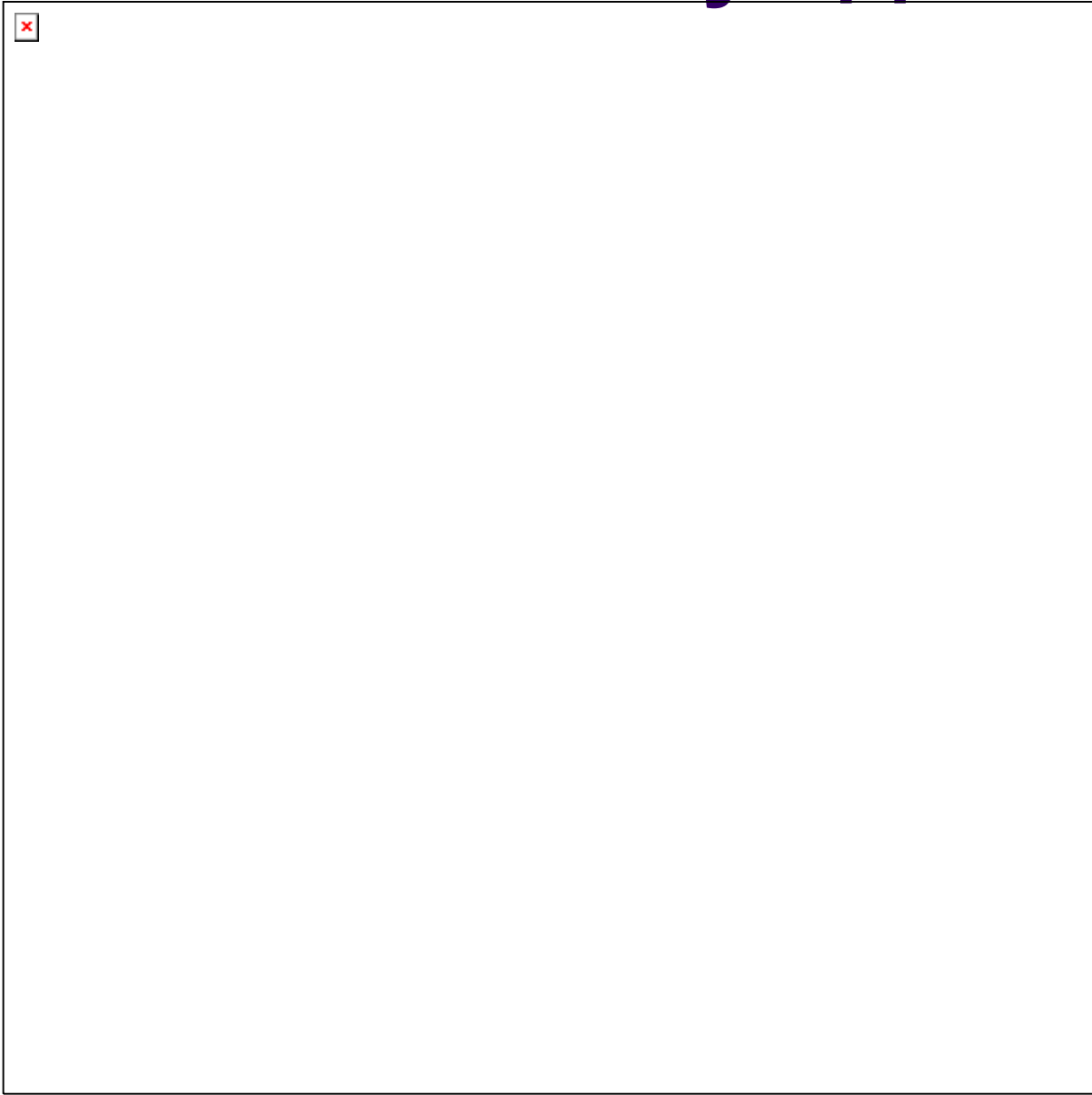


FIG. 1. Concept of tip-enhanced Raman spectroscopy.

TERS для определения единичных молекул ДНК



Иммуносенсоры на основе нанотрубок



Наноструктуры золота – плазмонный резонанс

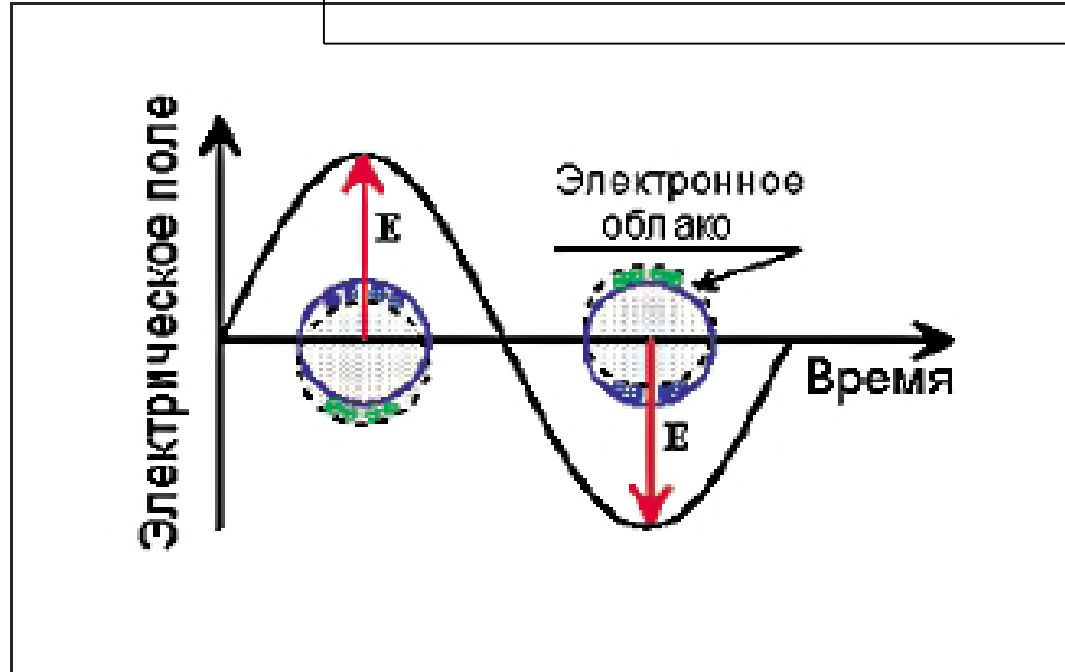
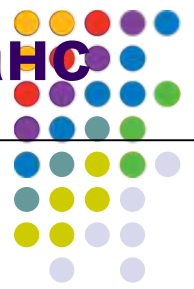


РИСУНОК 1 | Схематическое представление поверхностного плазмонного резонанса малой металлической частицы. Переменное электрическое поле вызывает когерентные колебания электронного облака около положения равновесия благодаря возвращающим силам нескомпенсированных зарядов на поверхности.



Наноструктуры золота – плазмонный резонанс

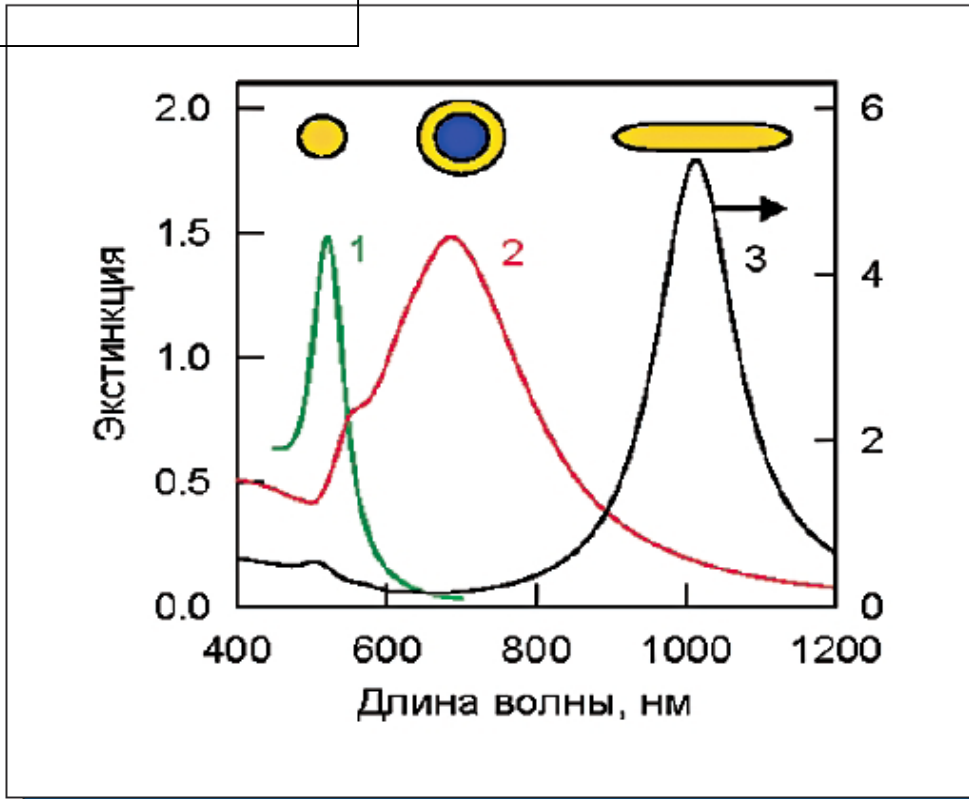
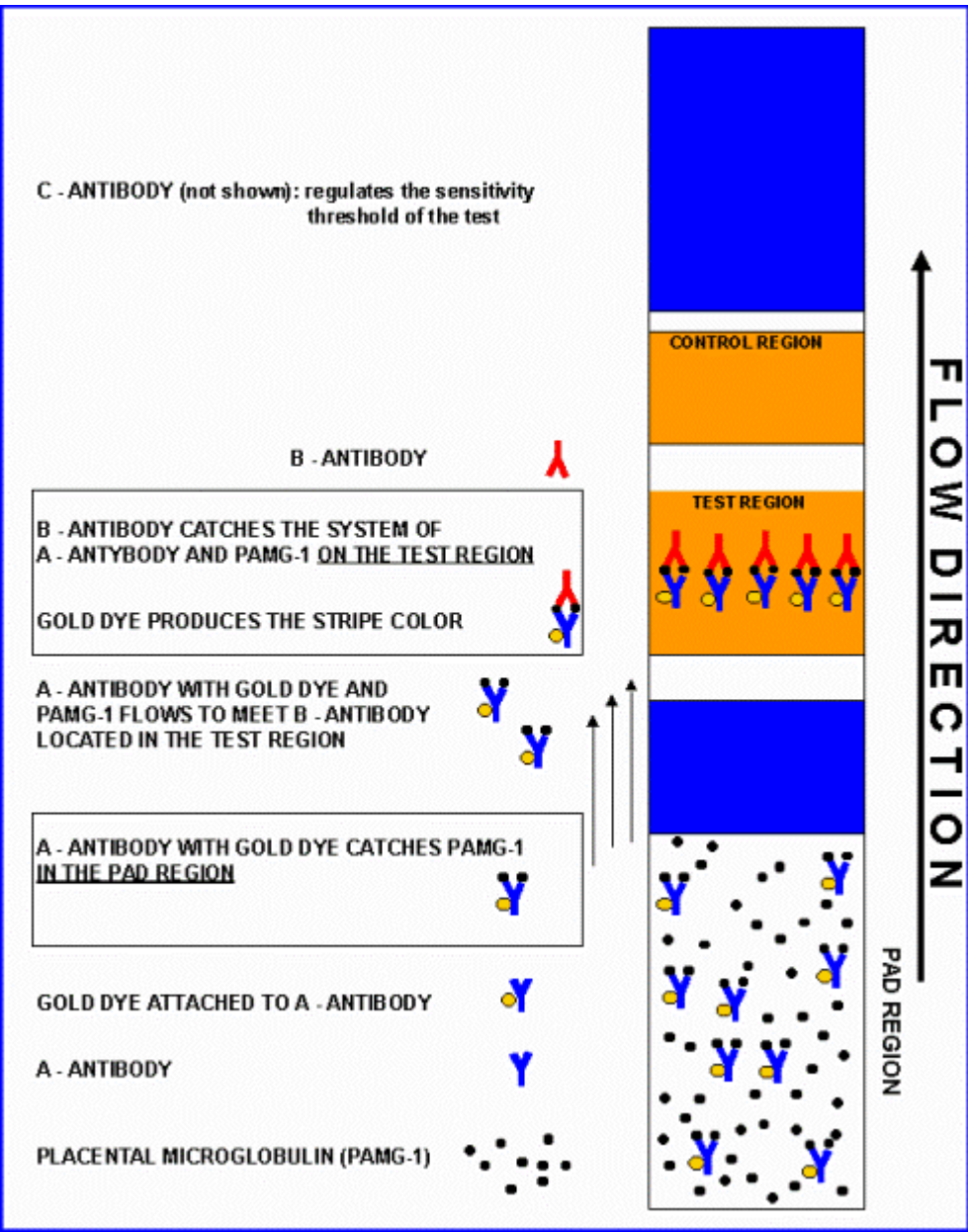


РИСУНОК 2 | Теоретические спектры оптической плотности водных коллоидных растворов золотых наносфер (1, диаметр 40 нм), оболочечных наночастиц (2, диаметр ядра SiO₂ 100 нм, толщина золота 20 нм) и золотых наностержней (3, эквивалентный диаметр 20 нм, отношение осей 6, хаотическая ориентация). Концентрация золота равна 57 мкг/мл, толщина слоя 1 см. Максимумы оптической плотности обусловлены доминирующими дипольными резонансами 520 (1), 685 (2) и 1010 (3, продольный резонанс). Для оболочечных наночастиц видно квадрупольное плечо около 580 нм, правая ось ординат для наностержней увеличена в 3 раза.



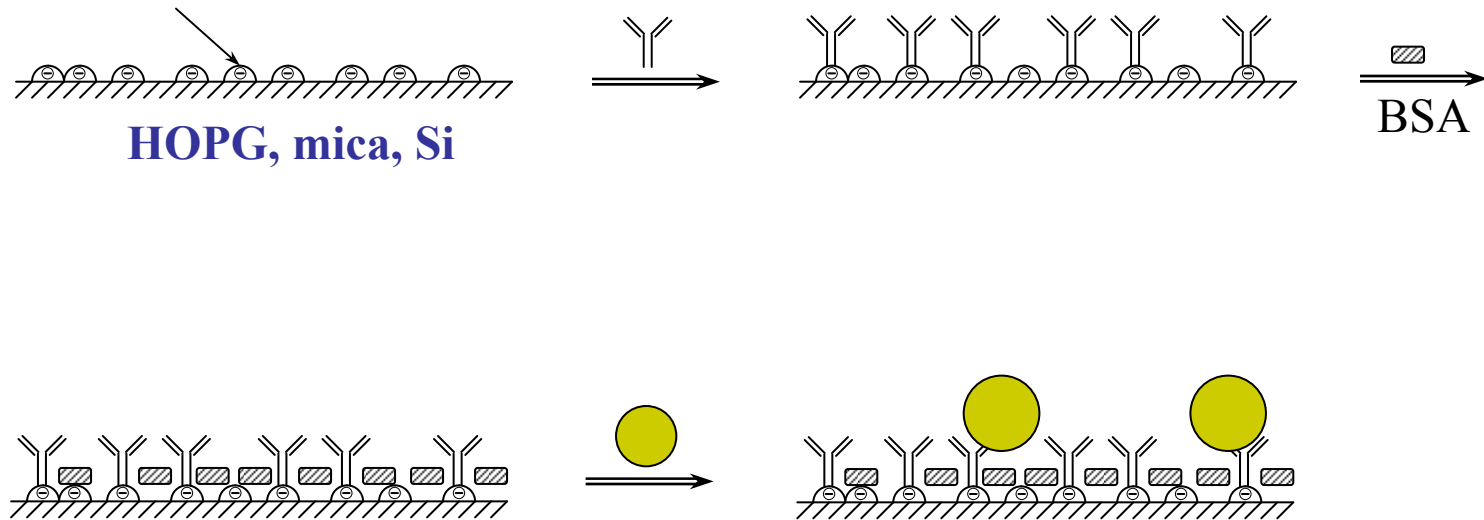
Иммунохроматография



Биосенсорные системы на основе СЗМ для определения крупных белковых антигенов

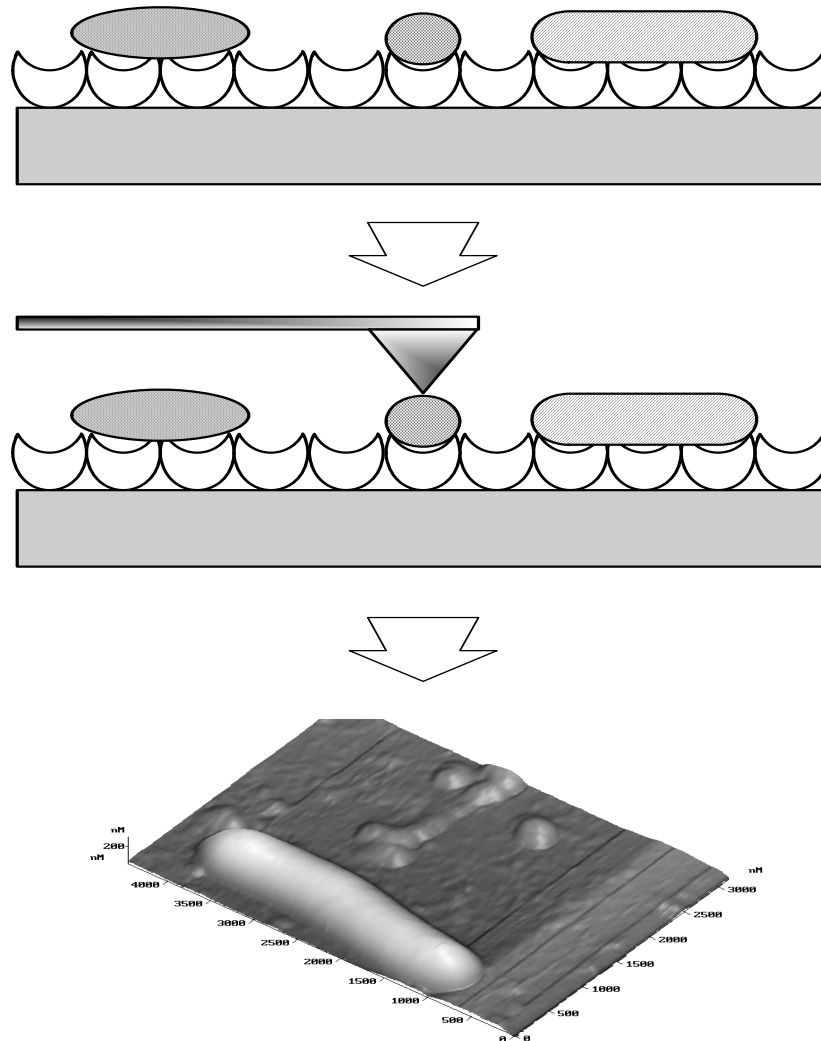


Polyanion, polycation



Kurochkin I.N., Chernov S.F., Pavelev A.B. Biosensor system based on atomic force microscopy. // In: Materials of The 3-d world congress on biosensors. New Orleans. 1994.

Биосенсорные системы на основе СЗМ для определения крупных белковых антигенов



Определение единичных комплексов антиген-антитело: высокочувствительный анализ белковых антигенов методами зондовой микроскопии

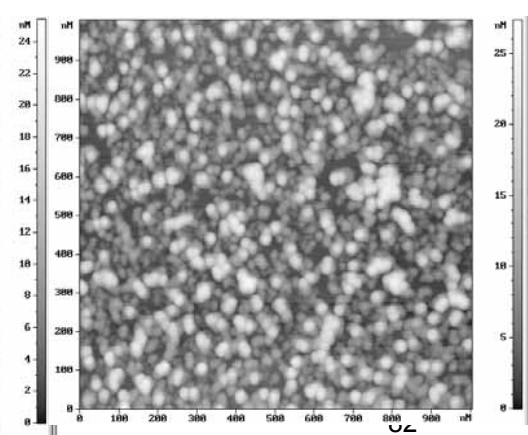
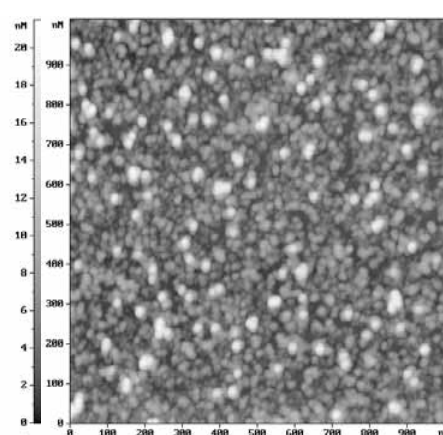
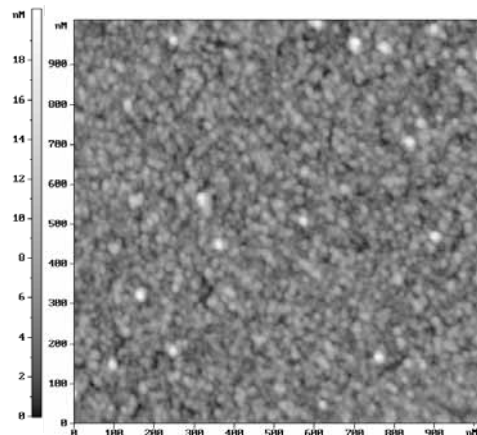
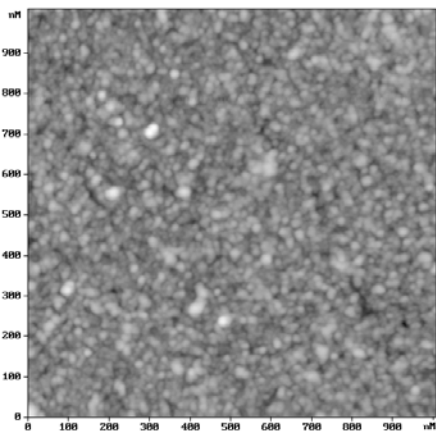
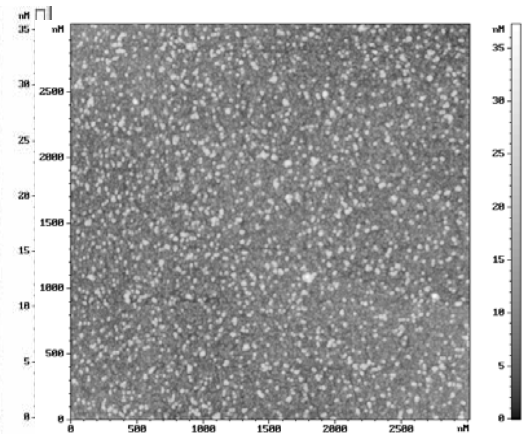
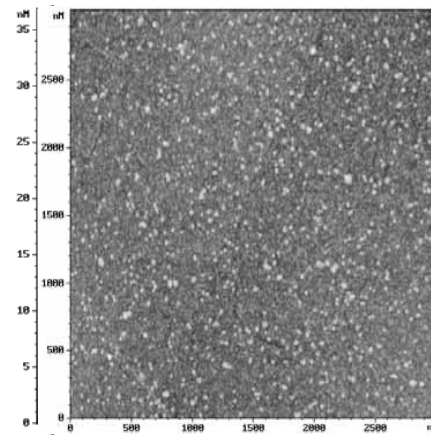
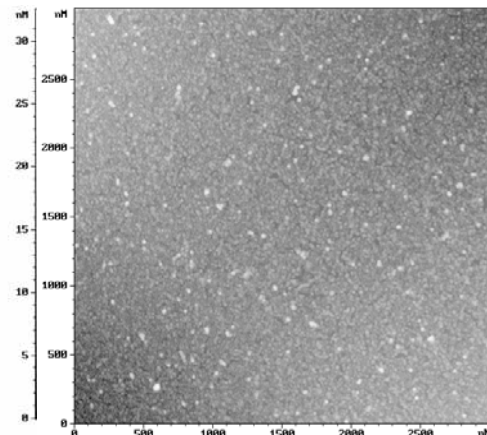
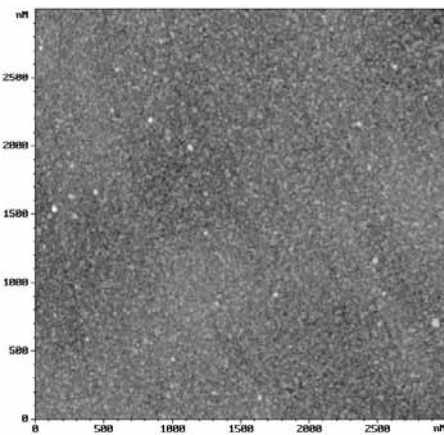


1,3 (фг)

13

130

1300



Наномеханические сенсоры

