

УДК 531.384

ИССЛЕДОВАНИЕ КИНЕТИКИ ОБРАЗОВАНИЯ ИММУННОГО КОМПЛЕКСА С ПОМОЩЬЮ КАНТИЛЕВЕРНОГО СЕНСОРА

Н. Ю. Гетманенко
Младший научный сотрудник*
Контактный тел.: 050-845-45-33
E-mail: getmanenko@gala.net

Н. Н. Рожицкий
Доцент физико-математических наук, проф.*
Контактный тел.: 057-702-03-69
E-mail: rzh@kture.kharkov.net

С. С. Черниенко
Студент
*Кафедра "Биомедицинские электронные устройства и системы"
Харьковский национальный университет
радиоэлектроники
пр. Ленина, 14, г. Харьков, Украина, 61000
Контактный тел.: 093-747-31-34

У роботі проводиться дослідження кінетики процесу утворення імунного комплексу між вірусом вітряної віспи Varicella Zoster штаму Ока і ан-тібілами до цього вірусу. Дослідження проводяться за допомогою кантилеверного сенсорного пристрою

Ключові слова: кантилевер, сенсор, Varicella Zoster штаму Ока

В работе проводится исследование кинетики процесса образования иммунного комплекса между вирусом ветряной оспы Varicella Zoster штамма Ока и антителами к этому вирусу. Исследования проводятся с помощью кантилеверного сенсорного устройства

Ключевые слова: кантилевер, сенсор, Varicella Zoster штамм Ока

In the work the it was investigated the kinetic of process of formation of immune complex between Varicella Zoster viruses of Oka strain and antibodies. Investigation carried out with the help of cantilever sensor instrument

Keywords: cantilever, sensor, Oka strain Varicella-Zoster virus

1. Введение

Следуя тенденциям полупроводниковой электроники, механические устройства стремятся уменьшать свои размеры и сейчас уже находятся в субмикронной области. Разработанные наномеханические структуры обладают чрезвычайно высокой резонансной частотой собственных колебаний и низкой массой. Дополнительным и важным свойством этих устройств является высокая добротность (Q). Она в настоящее время находится в диапазоне $Q \approx 10^3-10^5$, что значительно выше, чем у электрических колебательных контуров. Этот уникальный набор свойств делает возможным фиксировать с высокой чувствительностью изменение массы при высоких резонансных частотах, что открывает новые области сенсорного применения.

Указанные особенности могут быть использованы при разработке сенсорных устройств, позволяющих определять возбудителей опасных вирусных и инфекционных заболеваний человека.

В настоящее время исследователями ведутся работы по созданию сенсорных устройств на основе кантилеверов на таких возбудителях инфекционных заболеваний как, *Aspergillus niger* Spores [1], *e/coli* [2].

Принцип работы сенсорного устройства основан на изменении частоты собственных колебаний кантилевера под действием присоединенной массы [3]. При разработке подобных устройств особое внимание следует уделить формированию акцепторного слоя сенсора. В работе [4] предложен метод иммобилизации антител на поверхность кремниевых кантилеверов.

Несмотря на большое количество научных публикаций в мире в области сенсоров на основе кантилеверов, в отечественных публикациях данная тематика практически не раскрыта. Очевидно, что работы в данной области имеют высокую научную ценность для отечественной науки, т.к. данные устройства позволяют не только детектировать различные вещества, но и в режиме реального времени наблюдать процессы формирования слоев детектируемого вещества на поверхности кантилевера.

В данной работе в качестве анализируемого вещества выступает вирус ветряной оспы *Varicella Zoster* штамм Ока. Динамические исследования резонансных частот собственных колебаний кантилеверов с иммобилизованными на их поверхности специфическими антителами при образовании специфического комплекса антиген-антитело дают новые данные о протекании процессов формирования иммунного

Таблица 1

комплекса и о влиянии на их образование внешних факторов.

Поэтому актуальной научной проблемой является развитие методов образования акцепторных слоев на поверхности кантилеверов на заданные аналиты и разработки сенсорных устройств на основе модифицированных кантилеверов.

2. Постановка задачи исследования

Целью данной работы является исследование кинетики образования иммунного комплекса между антителами к вирусу Varicella Zoster и аттенуированным вирусом Varicella zoster штамм Ока с помощью разработанного кантилеверного сенсора. Для достижения поставленной цели в данной работе были решены следующие задачи: был сформирован акцепторный селективный слой на рабочей поверхности кантилевера путем иммобилизации на поверхности кремния специфических антител к вирусу Varicella Zoster, исследовано изменение собственное резонансной частоты кантилеверной системы в присутствии аналита во временном интервале.

3. Материалы, оборудования и метод

В работе использовались кантилеверы серии NSC35 производства «Mikromash» (рис. 1). Характеристики кантилеверов приведены в таблице 1. Работа проводилась с балкой В (табл. 1).

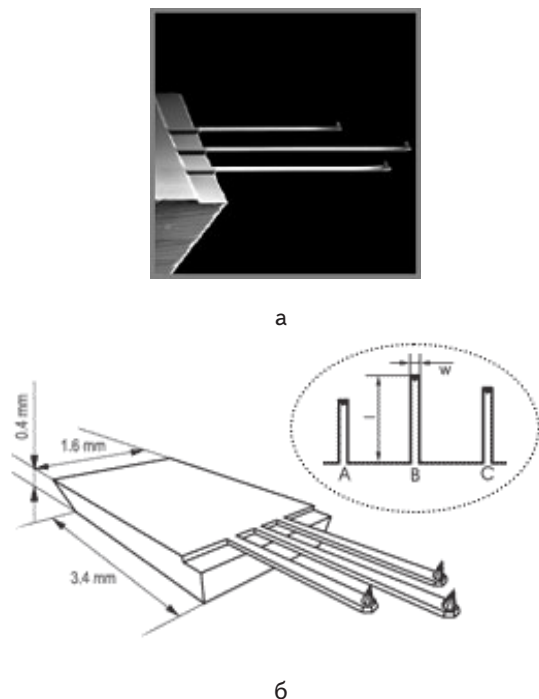


Рис. 1. Кантилевер производства «Mikromash» серии NSC35: а – изображение кремниевых кантилеверов, полученное при помощи сканирующего-электронного микроскопа; б – схематическое изображение кремниевого чипа с тремя кантилеверами

Параметры кантилеверов серии NSC35

NSC35		A	B	C
Резонансная частота, кГц	min	165	240	120
	типовая	210	315	150
	max	240	405	190
Коэффициент упругости, Н/м	min	3.5	6.5	2.5
	типовой	7.5	14	4.5
	max	12.5	27.5	8.5
Длина, 1 ± 5 мкм		110	90	130
Ширина, $w \pm 3$ мкм		35	35	35
Высота, мкм	min	1.7	1.7	1.7
	типовая	2.0	2.0	2.0
	max	2.3	2.3	2.3

В качестве измерительного устройства использовался атомно-силовой микроскоп (АСМ) NT-206 производства ОДО «Микротестмашины» (г. Гомель, Беларусь). Возбуждение колебаний производилось пьезокварцевым генератором, входящим в состав АСМ. Измерение частоты проводилось с помощью оптической системы (рис.2).

При модификации кремниевых кантилеверов использовались следующие материалы: 3-аминопропилтриэтоксисилан АПТЭС Sigma–Aldrich Chemie GmbH (Buchs, Switzerland), глутаровый альдегид Sigma–Aldrich Chemie GmbH (Buchs, Switzerland), бидистиллированная вода, абсолютный этанол ГП «Завод химических реактивов» (г. Харьков, Украина), препарат «зостевир», содержащий специфические антитела к вирусу Varicella Zoster, вакцина «окавакс», содержащая живой аттенуированный вирус Varicella zoster штамм Ока в количестве не менее 2000 БОЕ/мл.

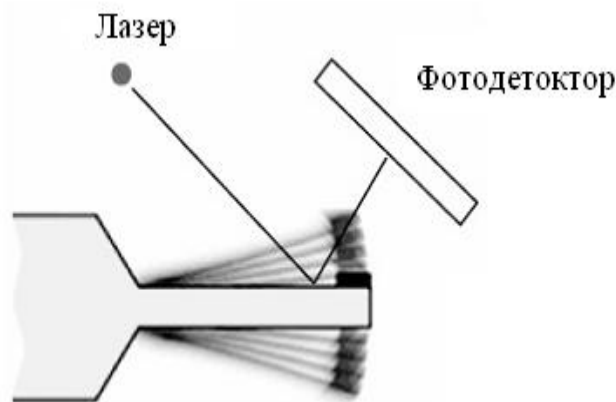


Рис. 2. Схема измерения частоты собственных колебаний кантилевера

Модификация поверхности кремниевого кантилевера проходила в три этапа (рис. 3):

- отчистка поверхности кантилевера;
- модификация поверхности путем силанизации кремния с помощью АПТЭС;
- иммобилизация антител на модифицированной поверхности кремния.

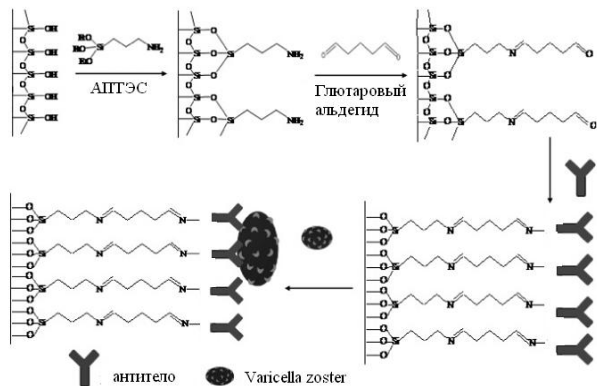


Рис. 3. Схема функционализации кантилевера

4. Экспериментальные исследования

Очистка кантилеверов проводилась в растворе хромовой смеси в течении 10 мин, затем образец промывался в бидистиллированной воде и высушивался. После чего проводили силанизацию поверхности кремния в 0.1% растворе АПТЭС в абсолютном этаноле. Результат силанизации контролировался с помощью исследования морфологии поверхности кремния до и после силанизации (рис.4), а также измерением резонансных частот кантилевера до и после силанизации (рис.5).

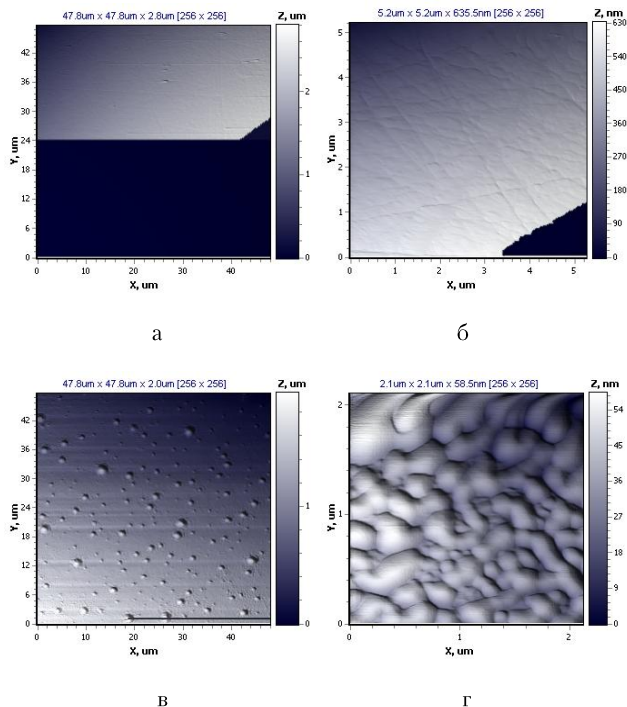
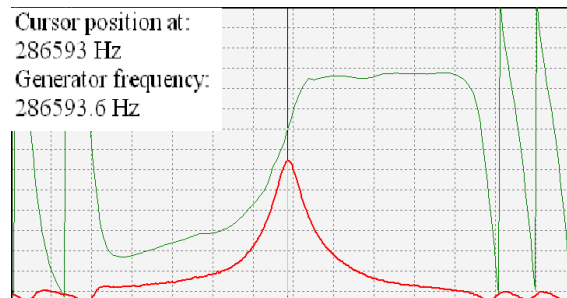
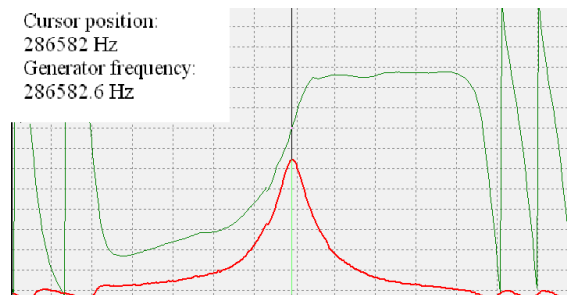


Рис.4. АСМ сканирование поверхности кремния: а — отчищенная поверхность кремния до силанизации (47.8мкм*47.8мкм); б — отчищенная поверхность кремния до силанизации (5.2мкм*5.2мкм); в — силанизированная поверхность кремния (47.8мкм*47.8мкм); г — силанизированная поверхность кремния (2.1мкм*2.1мкм)



а



б

Рис. 5. Величина резонансной частоты собственных колебаний кантилевера серии NSC35: а — до силанизации; б — после силанизации

Строгое выражение зависимости резонансной частоты собственных колебаний кантилевера от массы представлено в [4]. Учитывая то, что в нашем исследовании используются препараты, полученные из сыворотки крови, которые не являются чистыми (в своем составе могут иметь различные группы иммуноглобулинов), для расчета изменения массы можно использовать приближенное выражение, полученное из зависимости [4]:

$$m = \left(\frac{33}{140} \right)^2 \frac{k}{\omega^2}$$

Исходя из полученных данных можно говорить, что прирост массы после силанизации составил $1.406 \cdot 10^{-9}$ мкг.

На следующем этапе силанизированный кантилевер помещался в раствор специфических к вирусу Varicella zoster антител. Измерение резонансной частоты проводили через интервалы времени 1 мин, 10 мин, 30 мин, 1ч, 2ч, 4ч, 24ч. Отклонение резонансной частоты обнаружено не было.

Затем кантилевер погружался в раствор содержащий вирус Varicella zoster в концентрациях не менее 1000 БОЕ/мл и 2000 БОЕ/мл. Измерение резонансной частоты проводили каждые 10 сек. до полного прекращения изменения частоты собственных колебаний кантилеверной системы. Результаты исследования представлены ниже (рис. 6).

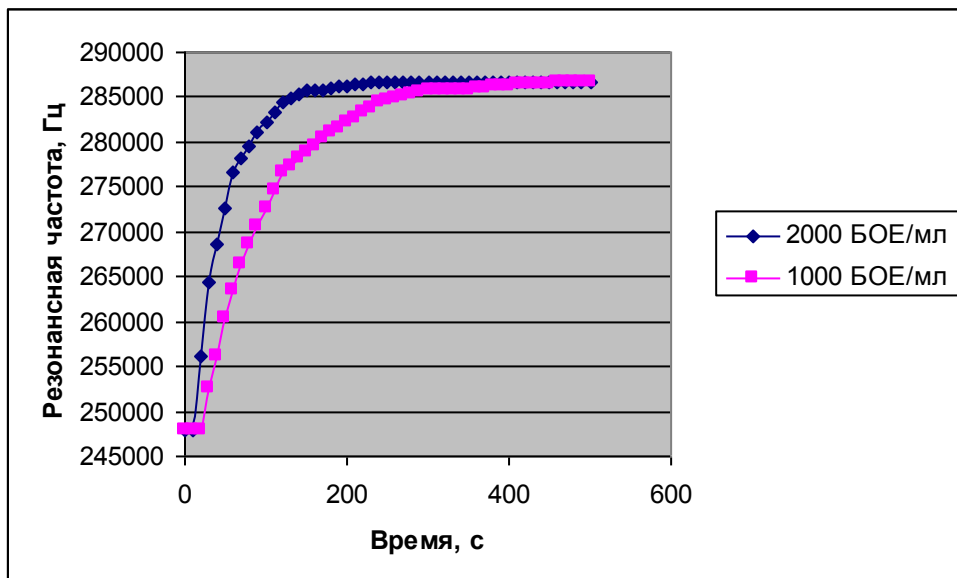


Рис.6. Зависимость частотного отклика системы на присутствие вируса *Varicella zoster* от времени при концентрации вируса 1000 БОЕ/мл и 2000 БОЕ/мл

вышает 150 кДа. В связи с этим становится актуальным вопрос повышения чувствительности сенсорной системы, которая напрямую связана с резонансной частотой собственных колебаний кантилеверов.

Анализируя данные (рис.6) можно сделать вывод о том, что на поверхности сенсора протекает процесс образования специфического комплекса антиген-антитело, сопровождающегося изменением массы резонирующей системы. Таким образом, данное устройство является сенсором на вирус ветряной оспы *Varicella Zoster*. Общий вид экспериментально полученных

5. Выводы

Анализ полученных данных показывает, что этап силинизации поверхности кремния выполнена успешно.

Отсутствие отклика системы при иммобилизации на поверхности сенсора антител, объясняется ультрамалой массой иммуноглобулинов, которая не пре-

зависимостей совпадает с данными полученными различными исследователями с помощью поверхностного плазмонного резонанса. Поэтому можно сделать вывод о том, разработанный кантилеверный сенсор может быть использован как альтернатива поверхностному плазмонному резонансу при исследовании кинетики процесса образования комплексов антиген-антитело.

Литература

1. Campbell, G.A, Mutharasan, R. A method of measuring *Escherichia coli* 0157:H7 at 1 cell/mL in 1 liter sample using antibody functionalized piezoelectric excited millimetersized cantilever sensor/ G.A. Campbell, R. Mutharasan // *Environ Sci Technol.* 2007. Mar 1.41(5):1668.P.74.
2. Nugaeva, N. An antibody sensitized microfabricated cantilever for the growth detection of *Aspergillus niger* spores./ N. Nugaeva, N. et al.// *Microsc. Microanal.* 2007.13. P.13–17.
3. Гетманенко Н. Ю. Использование принципа атомносиловой микроскопии при разработке биосенсоров / Н.Ю. Гетманенко // *Системы обработки информации.* –2011. –4(94)С.218221.
4. Wasserman, S.R. Structure and reactivity of alkylsiloxane monolayers formed by reaction of alkyltrichlorosilanes on silicon substrates/ S.R. Wasserman, Y.T. Tao, G.M. Whitesides // *Langmuir.* 1989.5.P.1074–1087.
5. Ekinci K.L. Ultimate limits to inertial mass sensing based upon nanoelectromechanical systems/ K. L. Ekinci, Y. T. Yang, M. L. Roukes E.M. // *Journal of applied physics.* – 2004. – № 5 (95). – P. 26822689.