

Оптические одномерные «Пикоскопы» – новые возможности для биосенсорики и нанотехнологии

Никитин П.И., Горшков Б.Г.
лаборатория "Биофотоника" отдела СПЯ ЦЕНИ ИОФ РАН

Работы Никитина П.И. и Горшкова Б.Г. посвящены фундаментальным исследованиям, направленным на достижение рекордного пространственного разрешения оптической микроскопии по глубине при стандартном для оптики продольном разрешении (вплоть до половины длины волны света) с помощью высокочувствительных фазовых методов, впервые предложенных авторами данного цикла работ [1-6]. Авторами разработаны физические основы принципиально новых оптических приборов, названных «Пикоскопами», а также созданы экспериментальные образцы устройств для регистрации динамики молекулярных реакций на поверхности с разрешением по глубине в пикометровом диапазоне толщин, усредненных по области наблюдения [1,2,5]. Указанные устройства позволяют регистрировать присоединение к исследуемой поверхности малых биомолекул лишь на 0.1% площади поверхности, то есть регистрацию «островковой» сорбции в 1000 раз меньшего количества биомолекул на поверхности, чем необходимо для формирования монослоя белковых молекул. Кроме того, созданные приборы испытаны в качестве биосенсорных систем или аналитических "молекулярных весов", чувствительных только к определенному типу молекул, селективно взаимодействующих со специальными рецепторными слоями, предварительно нанесенными на поверхность [5]. Созданные образцы Пикоскопов успешно испытаны для исследования разнообразных реакций молекулярного распознавания и социально-значимых биосенсорных применений [1-5].

Предложенный авторами спектрально-корреляционный метод [1,2,4-6] регистрации молекулярных реакций на поверхности основан на применении двух интерферометров Фабри-Перо, связанных в оригинальной оптической схеме, использующей широкополосное низкокогерентное излучение суперлюминисцентных диодов. База первого интерферометра (расстояние между двумя зеркалами) периодически изменяется с помощью пьезоэлектрического драйвера. Роль второго интерферометра выполняет плоскопараллельная стеклянная пластина с биораспознающими молекулами на верхней поверхности, которая и является биочипом. Метод использует интерференцию между опорным лучом, отраженным от нижней поверхности стеклянной пластины и зондирующим лучом, отраженным от верхней поверхности со слоем биологического агента. Результат интерференции зависит от фазовой толщины суммарного слоя стекла и биологического чувствительного слоя, изменение толщины которого в ходе реакции регистрируется по изменению фазы корреляционного сигнала при периодическом сканировании базы первого интерферометра Фабри-Перо [1,2,6].

Второй разработанный метод, названный авторами спектрально-фазовым интерференционным методом, использует непосредственно изменение фазы спектра излучения, отраженного от биочипа, для определения в реальном масштабе времени динамики изменения толщины молекулярного слоя на поверхности [3,5,6].

Авторы работ впервые предложили использовать в качестве дешевых и широкодоступных интерферометров (и биочипов одновременно) стандартные микроскопные покровные стекла толщиной 50-150 мкм без напыления каких либо металлических или диэлектрических покрытий. Было установлено, что такие стекла являются приемлемыми интерферометрами Фабри-Перо с четко определенными спектральными характеристиками при условии, что размер каждой отдельной зоны наблюдения на стекле составляет около 1-8 мм. На такой длине толщина стандартных покровных стекол варьирует менее, чем на четверть длины волны излучения, что позволяет использовать их в качестве дешевых расходных материалов в биосенсорных системах. Кроме, того при использовании подобных интерферометров легко реализовывать схожую с стандартной для микроскопии конфигурацию

исследования биообъектов на стеклянных подложках, однако, за счет предложенной авторами новой «начинки» прибора получать гораздо более обширную информацию, чем при применении традиционных микроскопов.

Отметим, что поскольку отражение света от покровных стекол без покрытий очень мало (6% в интерференционных максимумах и 2% в минимумах) авторами был предложен и реализован целый ряд оригинальных алгоритмов измерений, обработки сигналов и конструкций устройств, обеспечивающих предельно низкие шумовые и дрейфовые характеристики созданных устройств [1-6]. Разработанные методы и алгоритмы позволили авторам цикла работ впервые достигнуть на 3 порядка большей чувствительности к регистрации молекулярных слоев, чем достигается в распространенном методе оптической низкокогерентной томографии, также использующей излучение суперлюминисцентных диодов, но построенной на иных принципах.

Предложен целый ряд модификаций разработанных методов, в том числе для реализации волоконно-оптических Пикоскопов с миниатюрными чувствительными пластинами-интерферометрами, расположенными на торцах оптических волокон для проведения уникальных биохимических исследований, например, непосредственно в процессе хирургических операций или при контроле биотехнологических производственных процессов [4,5].

Продемонстрирована возможность одновременной регистрации множества независимых реакций в отдельных зонах на поверхности, покрытых различными рецепторами. Созданы экспериментальные образцы Пикоскопов для одновременной регистрации 96 реакций в независимых реакционных ячейках протяженных биочипов с размерами 120 x 80 мм² в формате стандартных плашек для иммунологических анализов. Уровень шумов подобных устройств в терминах порога измерения толщины составил 3 пм, а дрейфов базовой линии - 40 пм/час [5].

Созданные прототипы оптических устройств успешно использованы для регистрации патогенов в продуктах питания - бактерий сальмонеллы и листерии, причем порог чувствительности составил порядка 10⁴ клеток/мл, что на два порядка лучше, чем у безметочных биосенсорных систем, основанных на поверхностном плазмонном резонансе [4]. Продемонстрирована высокая эффективность приборов для картирования эпителий важного для медицинской диагностики белка - фактора некроза опухоли и выбора оптимальных антител, специфичных к разным участкам такой белковой молекулы [5]. Приборы успешно испытаны для:

- контроля биотехнологических процессов производства бактериоцинов – новых передовых препаратов с функциями антибиотиков, но лишенных многих недостатков традиционных антибиотиков [4];
- исследований в иммунотерапии и быстрого поиска антител, специфичных к вирулентным участкам бактерий, в частности, бактерий чумы [5];
- исследования фармацевтических препаратов, в частности, для скрининга лектинов, способных избирательно связываться с молекулами мембран опухолевых клеток [3];
- оптимизации химических интерфейсных слоев и протоколов оригинального магнитного иммуноанализа, основанного на использовании магнитных наночастиц в качестве меток биохимических реакций [5].

На наш взгляд, Пикоскопы имеют хорошие перспективы стать же распространенными инструментами, как обычные оптические микроскопы, поскольку они могут обладать стандартным оптическим продольным разрешением, и, помимо этого, обеспечивать уникальное разрешение по глубине в пикометровом диапазоне, а также использоваться для получения важной информации о динамике связывания молекул с поверхностью, для регистрации различных биологических агентов и химических соединений, кинетики молекулярных взаимодействий в режиме реального времени, контроля биотехнологических процессов, а также в качестве универсального инструмента для различных аспектов

нанотехнологии (контроля связывания молекул и сборки наноструктур, селективности и скорости молекулярных реакций, химических свойств поверхности наночастиц, и т.д.).

Все обсуждавшиеся выше оптические методы и устройства являются оригинальными и новыми, впервые предложенные авторами выдвигаемого на конкурс работ. Приоритет авторов указанных разработок подтвержден не только научными публикациями, но и оформлен юридически: авторами цикла работ получен патент Российской Федерации N 2181487, а также патент США [6], причем указанные патенты получены авторами без привлечения каких-либо зарубежных партнеров.

Список публикаций

1. P.I. Nikitin, M.V. Valeiko, B.G. Gorshkov, New Direct Optical Biosensors for Multi-Analyte Detection. *Sensors and Actuators B*, vol. 90, pp. 46-51, 2003.
2. P.I. Nikitin, B.G. Gorshkov, E.P. Nikitin, T.I. Ksenevich. Picoscope, a new label-free biosensor. *Sensors and Actuators B*, vol.111–112, pp. 500 -504, 2005.
3. M. Hartmann, M. Keusgen, P. Nikitin "Innovative analytical system for screening on lectins" *Biosensors and Bioelectronics*, vol.22, pp. 28-34, 2006.
4. P.I. Nikitin, I.E. Svetoch, M.P. Nikitin, T.I. Ksenevich, B.G. Gorshkov, N.M. Lyndin, V.I. Aksinin. Optical Picoscopes - New Opportunities for Biosensing and for Molecular Technologies. *Proc. of SPIE Vol. 6733, 67331M*, 2007.
5. P.I. Nikitin. Picoscopes, New Label-Free Biosensors, in: *Handbook of Biosensors and Biochips*, ed. R. Marks, D. Cullen, C. Lowe, H.H. Weetall, I. Karube. John Wiley & Sons, ISBN 978-0-470-01905-4, 2007.
6. P.I. Nikitin, B.G. Gorshkov. Method for optical detection of an adjoining of a material component to a sensor material with the aid of biological, chemical or physical interaction and device for carrying out said method (variants). The US patent # 7,368,294. Дата выдачи: May 6, 2008.

НИКИТИН П.И.

ГОРШКОВ Б.Г.