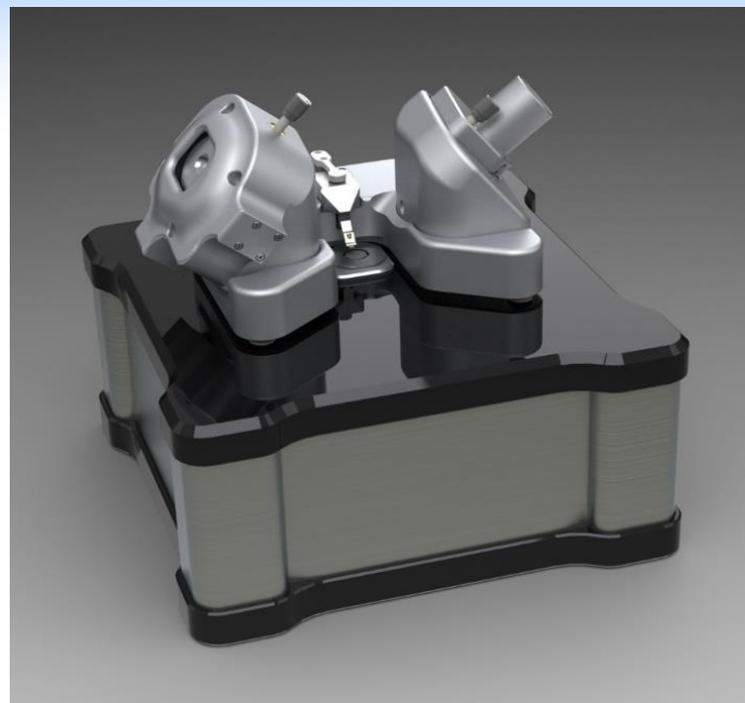


# Высокочувствительные электромеханические биосенсоры для обнаружения вирусов и белков



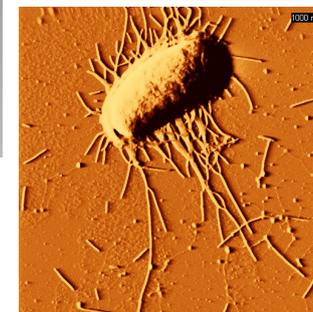
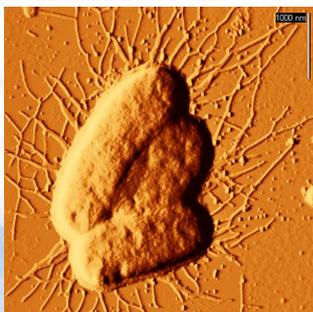
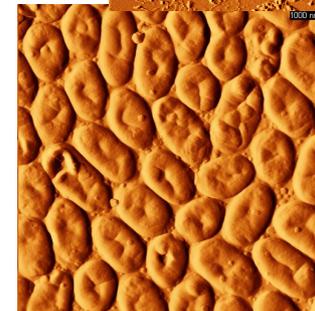
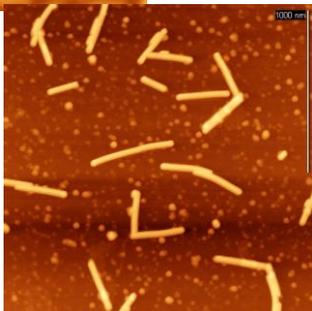
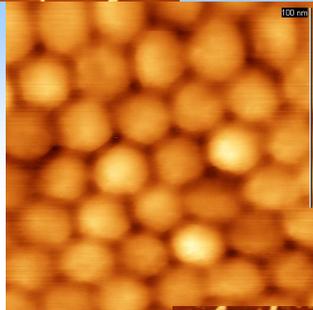
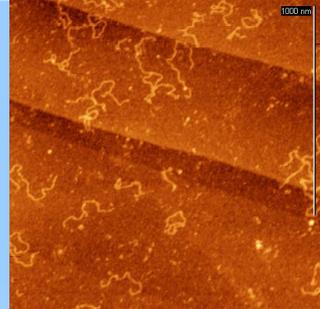
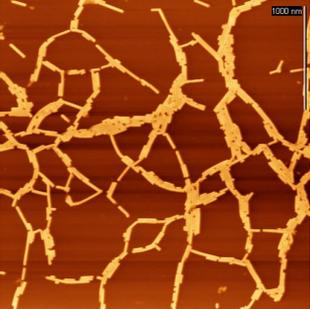
И.В. Яминский

Физический и химический факультеты МГУ имени М.В.Ломоносова  
Центр перспективных технологий

ПЕРВАЯ ВСЕРОССИЙСКАЯ МЕЖДИСЦИПЛИНАРНАЯ КОНФЕРЕНЦИЯ  
МИКРОФЛЮИДИКА: СОВРЕМЕННЫЕ УСПЕХИ И ПЕРСПЕКТИВЫ РАЗВИТИЯ

06 декабря 2019 года

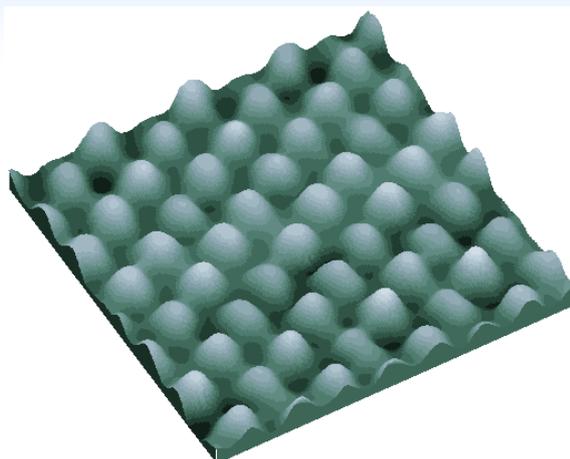
[www.nanoscopy.ru](http://www.nanoscopy.ru)



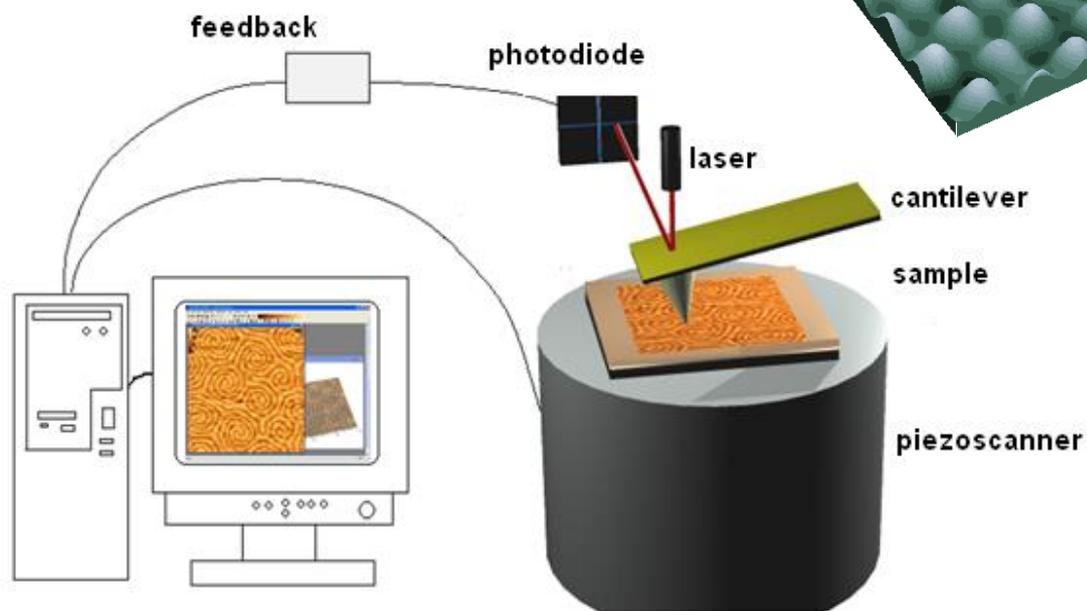
# Сканирующая зондовая микроскопия



Атомная решетка на графите



Микроскоп ФемтоСкан



# Программное обеспечение ФемтоСкан Онлайн

FemtoScan Online - 01\_1DEC.008

File Edit SPM Histogram View Window Help

1000 nm

1000 nm

1000 nm

01\_1DEC.008[Height]:1

100 nm

01\_1DEC.008[Height]:4

0.8  
0.4  
0  
-10 -5 0 5 10 nm  
XD: -1.3285 nm X1: 1.6668 nm X1-XD

E. COLI\_2.003 E. COLI\_2.003 E. COLI\_2.004 E. COLI\_2.029 E. COLI\_2.034

01\_1DEC.008[Height]:3

nm  
3  
0  
0 90 180 270 360 nm  
dX: 31.25 nm dY: 1.739 nm

File: H-PIROLY.022  
Image data: Height  
X: 3904 nm; Y: 3904 nm

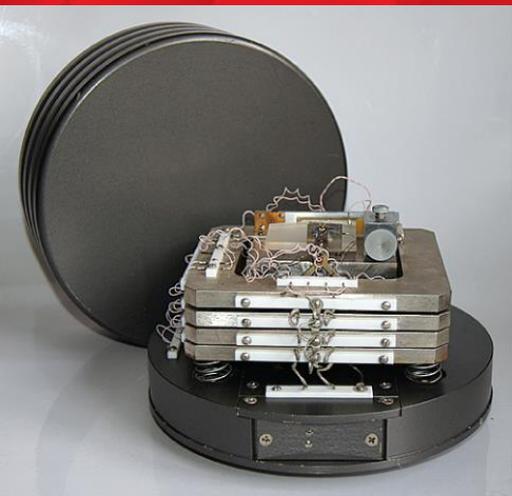
0.1  
0  
-0.1  
-0.2  
-0.4 -0.3 -0.2 -0.1 0 0.1 0.2 0

Click left mouse button to rotate/offset the image; use Ctrl, Shift and Z for tilt, pan, Z scaling and lamp movement

пуск DEMO-1 DemoRolik FemtoScan Online - 0...

RL 11:03

# Сканирующие зондовые микроскопы FemtoScan Центр перспективных технологий



**1987**

**Скан -7 и 8**

Сканирующий  
туннельный и  
атомно-силовой  
микроскоп

**1993**

**FemtoScan**

$\geq 100$   
различных  
режимов



**2019**

**FemtoScan Xi**

Сканирующий  
капиллярный /  
зондовый  
микроскоп



**2013**

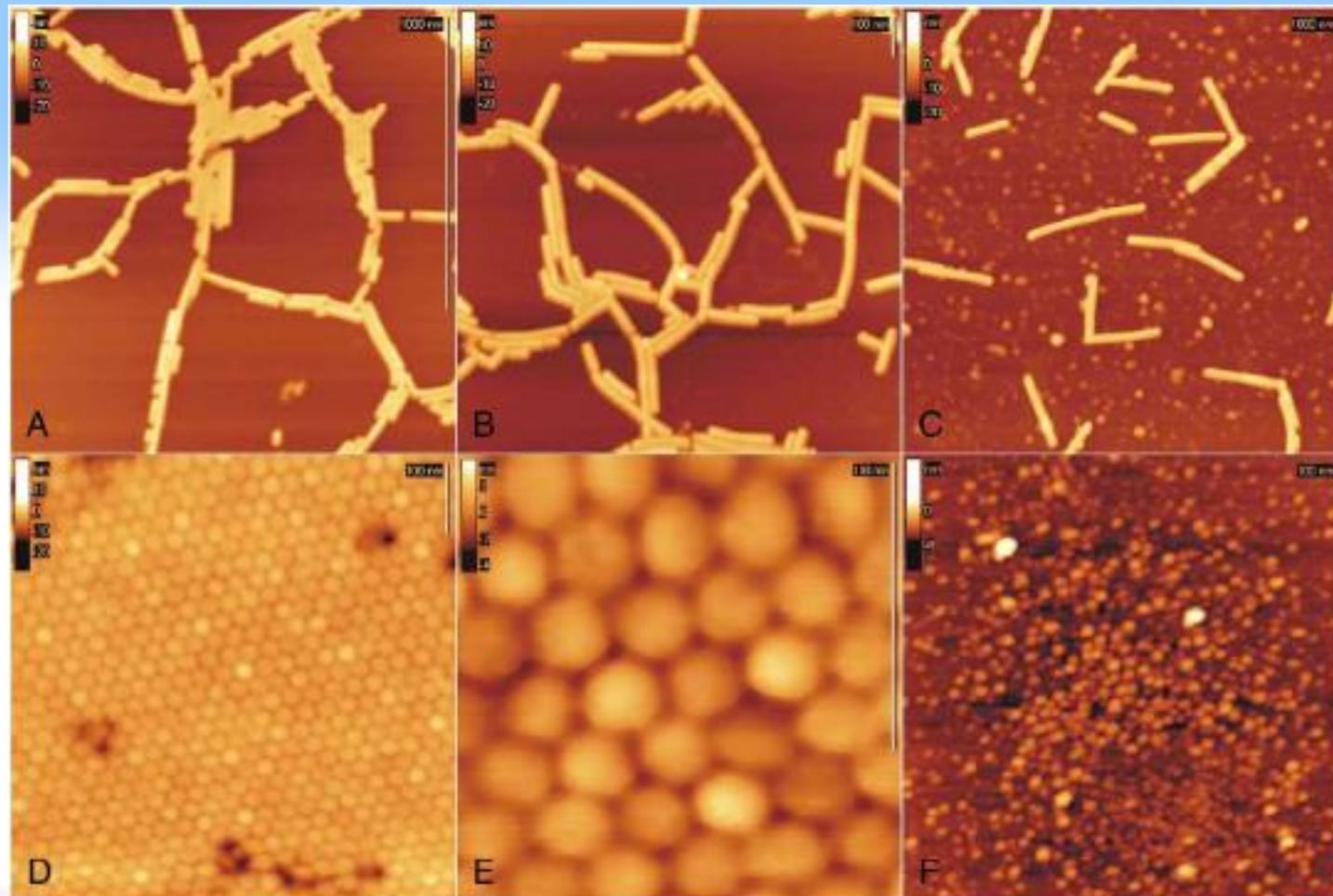
**FemtoScan X**

Скоростной  
сканирующий  
зондовый  
микроскоп

$\geq 1$  MHz



# Атомно-силовая микроскопия вирусов



АСМ изображения (A) роа semilattent virus, (B) barley stripe mosaic virus, (C) tobacco mosaic virus, (D and E) brome mosaic virus, and (F) alfalfa mosaic virus.

Размерный отрезок – 1 мкм (A and C) и 100 нм (B,D–F).

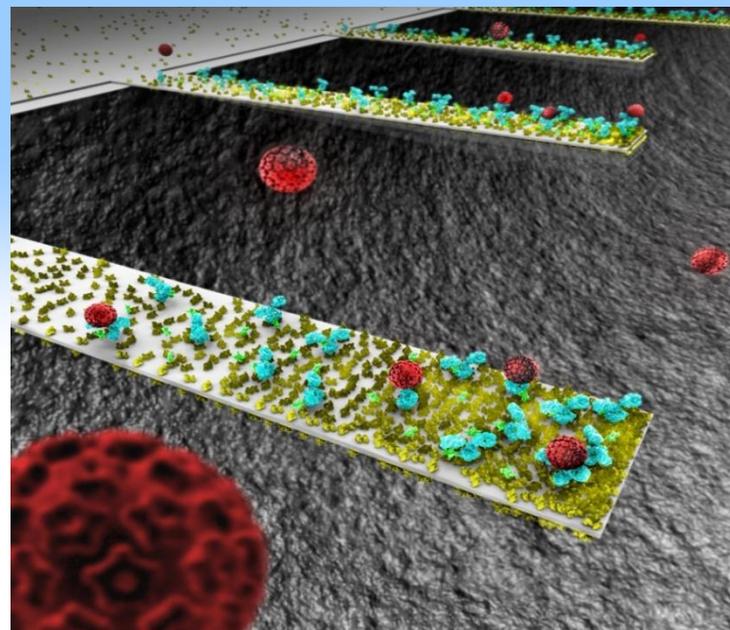
Dubrovin, Yu.F. Drygin, V.K. Novikov, I.V. Yaminsky. Atomic force microscopy as a tool of inspection of viral infection. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 3 (2007), 128-131

# Микроантилеверные преобразователи

Изменяют частоту при увеличении собственной массы

$$\Delta t \approx \frac{k}{4\pi} \left( \frac{1}{(F^{\text{после}})^2} - \frac{1}{(F_0^{\text{до}})^2} \right)$$

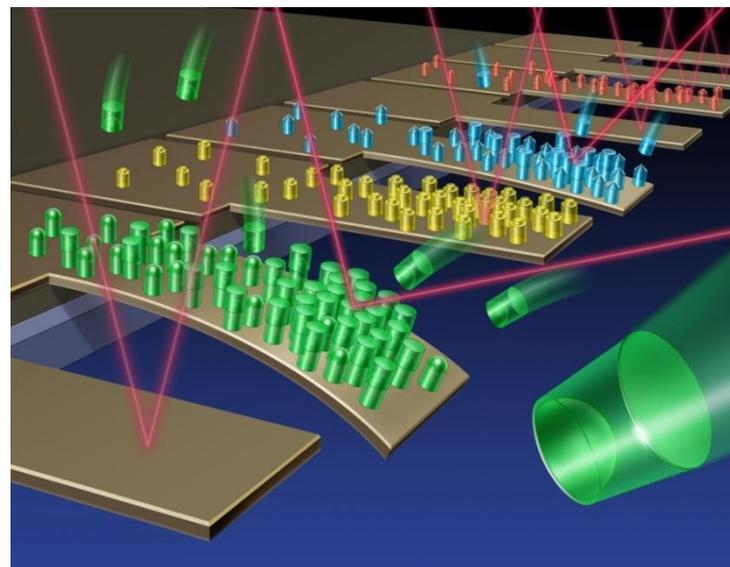
$k$  – константа жесткости,  $F_0$  и  $F$  – частоты до и после присоединения массы



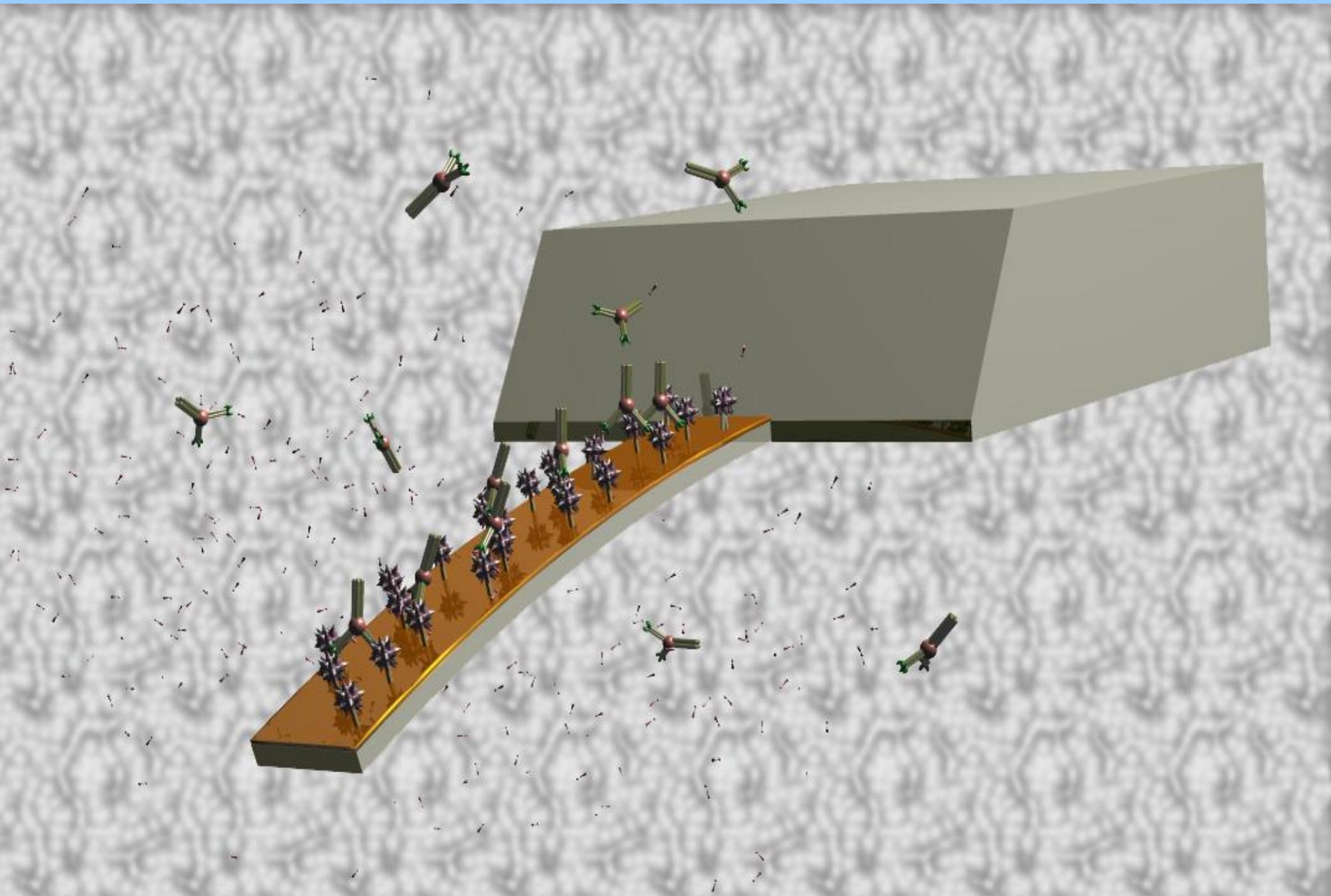
Преобразуют энергию реакции в рецепторе в энергию изгиба кантилевера

$$\Delta Z \approx 3 \frac{(1-\nu)L^2}{ET^2} \Delta\sigma$$

$\Delta\sigma$  - изменение поверхностного натяжения,  $\nu = 0.25$  - коэффициент Пуассона,  $E$  – модуль Юнга материала кантилевера,  $T$  и  $L$  – его толщина и длина



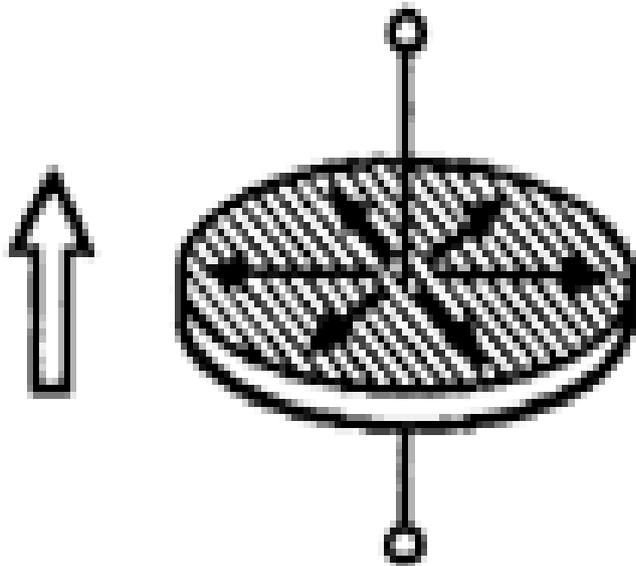
# Биосенсор без использования меток



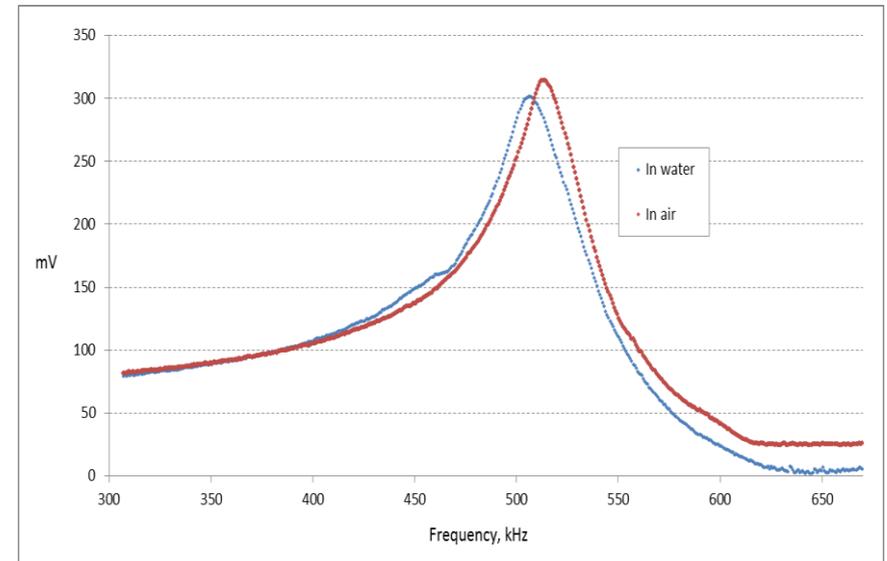
# Dynamic mode

## Radial oscillation of piezoelectric disks

Radial oscillations have advantages to bending modes due to higher Q-factor and sensitivity in liquid

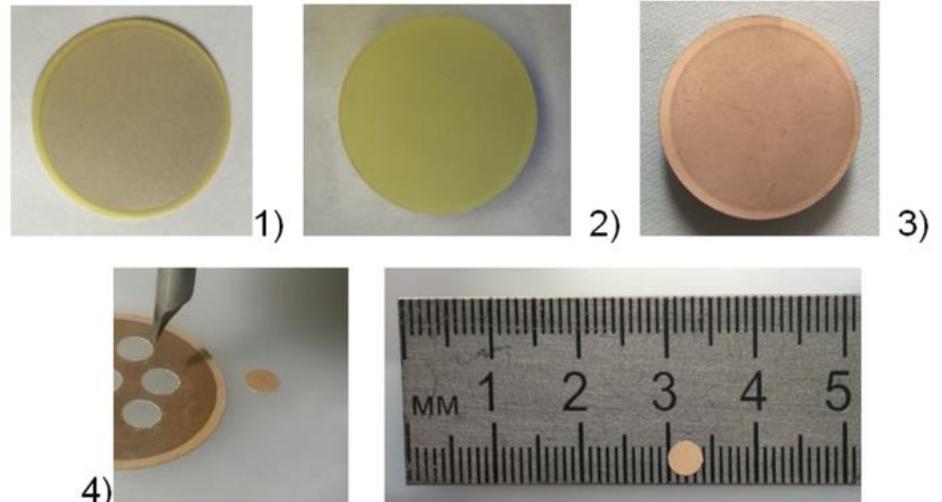


Schematic representation of a disks first radial mode

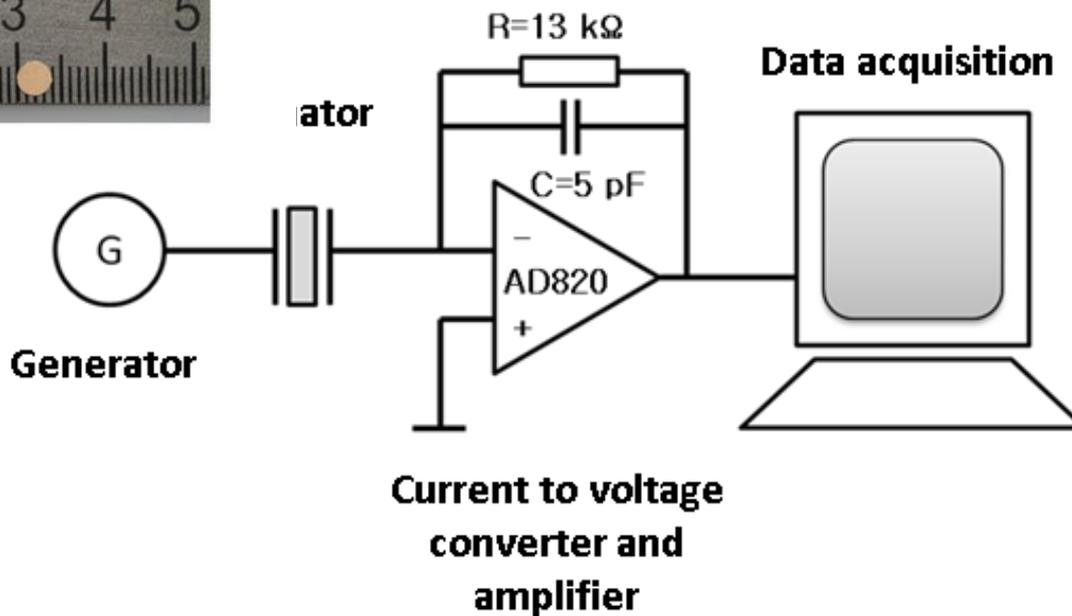


Typical resonance curves of piezodisk: red one – in air and blue one – in water

# Пьезоэлектрические диски для обнаружения вируса гриппа



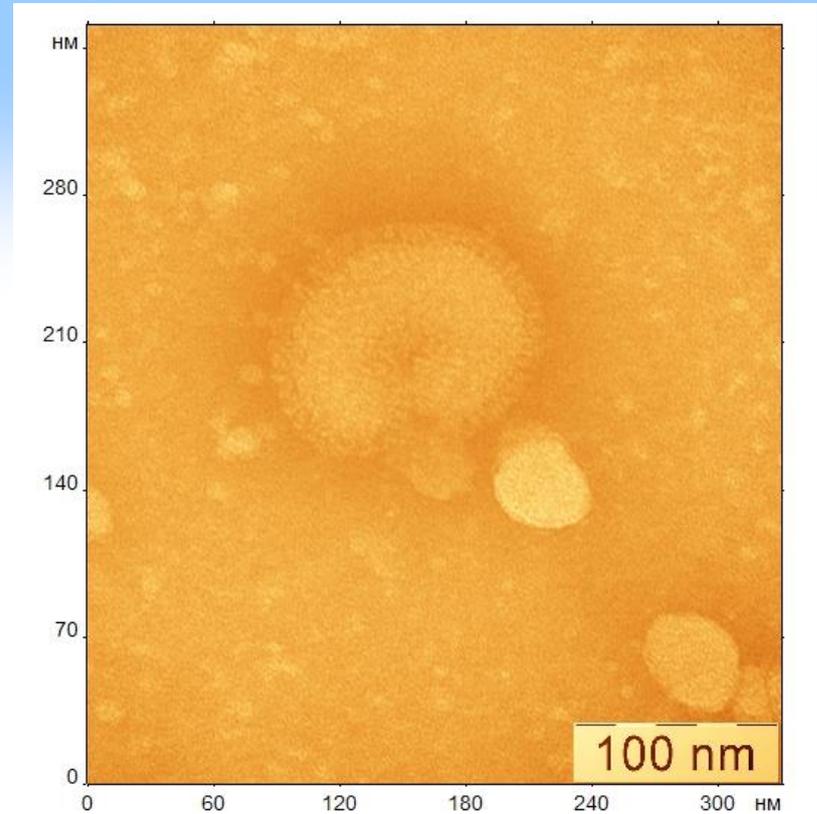
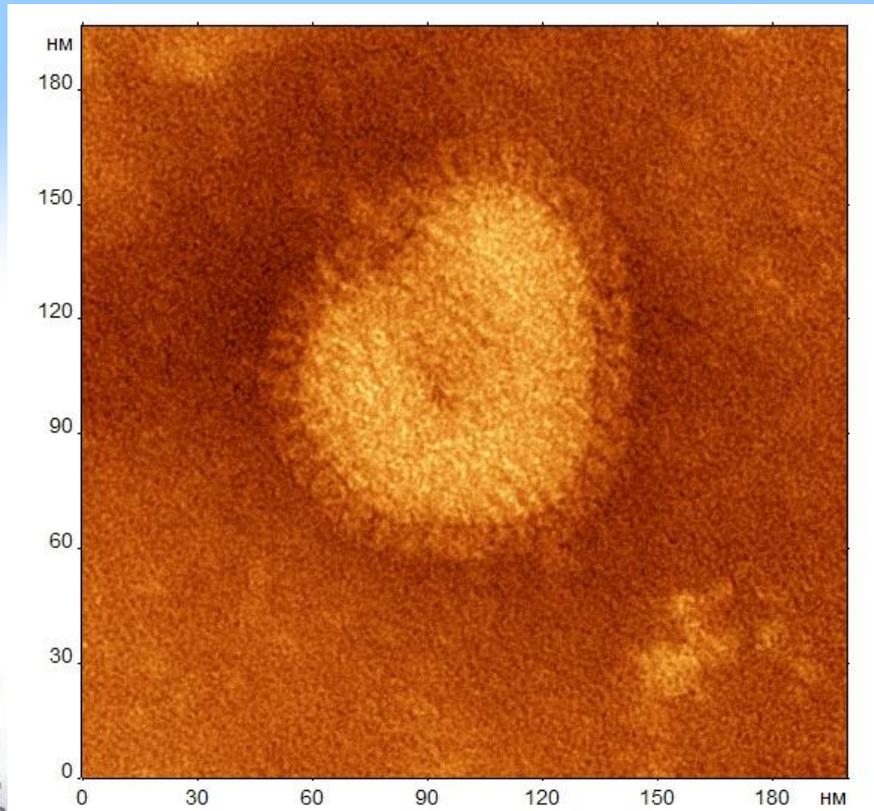
- 1) Исходная пьезокерамическая пластина с серебряными электродами
- 2) Пластина после травли серебра в азотной кислоте
- 3) Пластина с нанесенным слоем золота толщиной в 50 нм
- 4) Пьезокерамические диски диаметром в 4 мм



Электронная схема включает генератор сигналов, прецизионный усилитель и систему сбора данных, обработки и передачи данных по защищенным каналам

СВЯЗИ

# Вирус гриппа

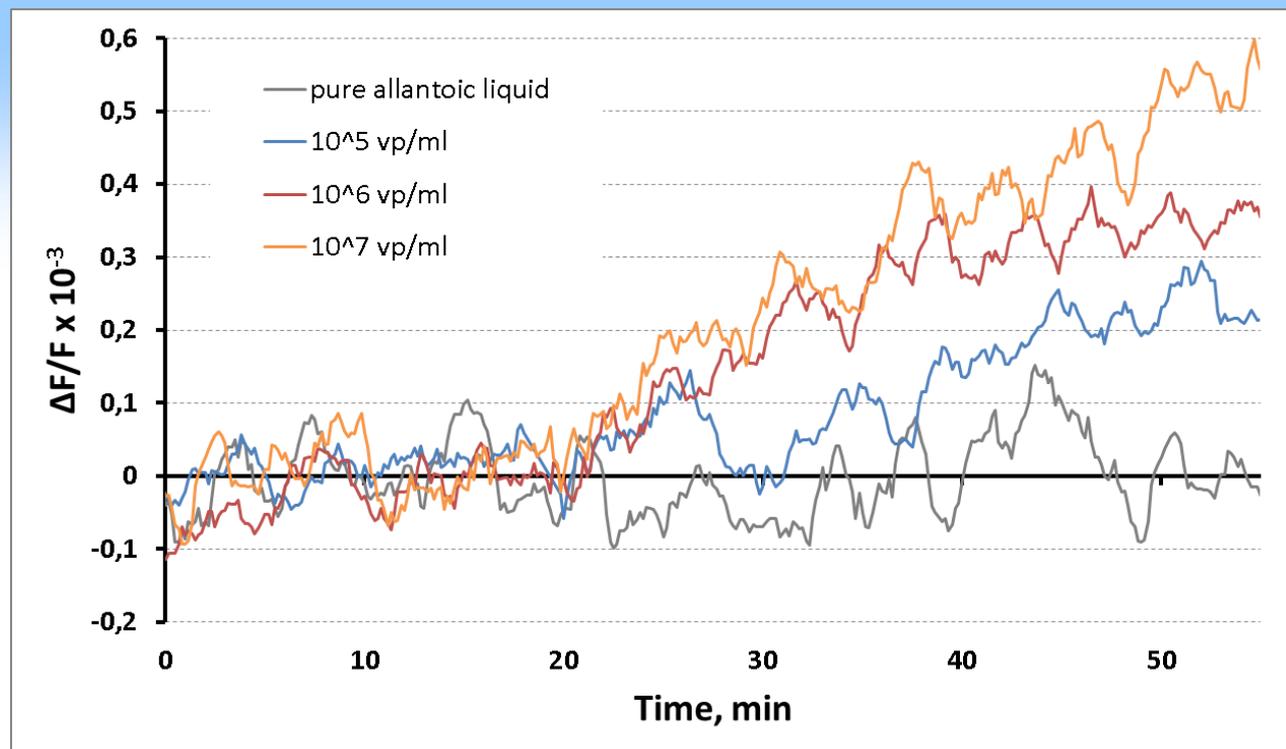


Изображение вируса гриппа H4N6 (слева) и H3N6 (справа).  
Изображения получены на просвечивающем электронном  
микроскопе LEO912AB.

Контрастирование фосфорновольфрамовой кислотой.  
Построение изображений в программе FemtoScan Онлайн

# Обнаружение вируса гриппа H3N4

Концентрация, вирусов/мл	$\Delta f/f$ 30 мин, $\times 10^{-3}$
0	$0.06 \pm 0.13$
$10^5$	$0.27 \pm 0.02$
$10^6$	$0.39 \pm 0.07$
$10^7$	$0.54 \pm 0.10$



Зависимость сдвига резонансной частоты кантилевера от времени для разных концентрация вируса

Образец – вирус в аллантаоисной жидкости

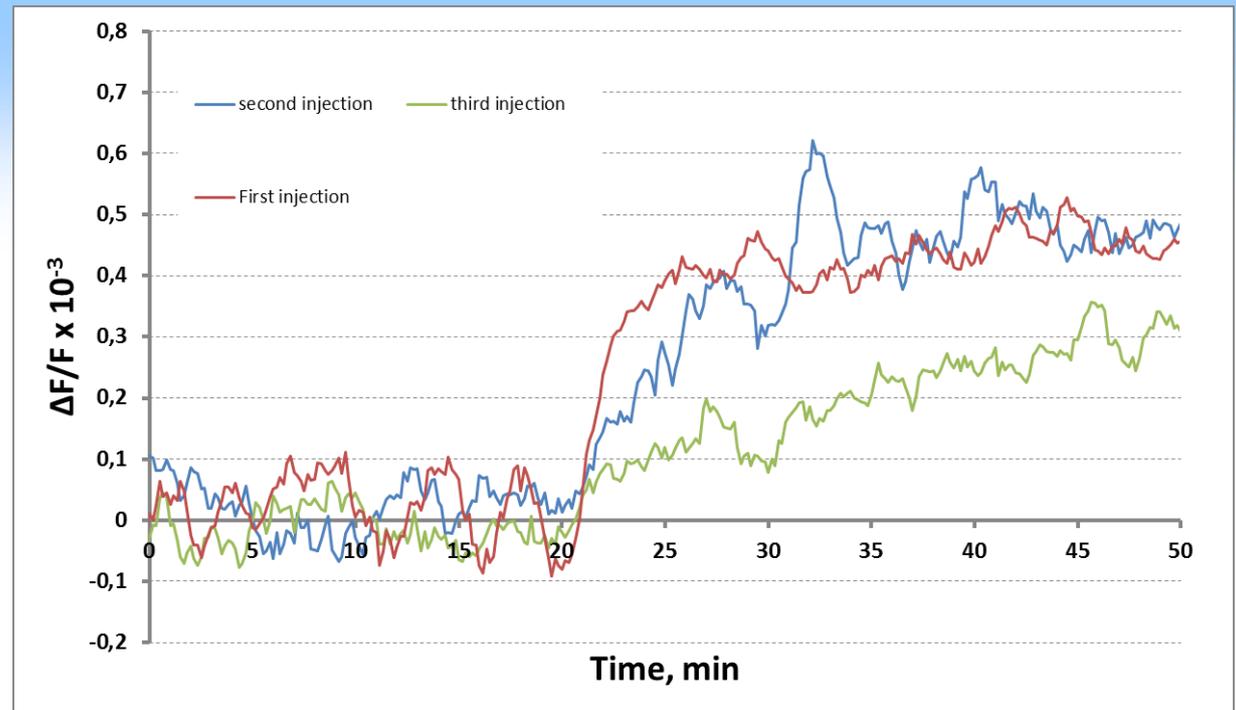
Измерения в потоке

Биочип – диск из ЦТС керамики с золотыми электродами с пришитыми полисахаридами с сialовыми кислотами

Резонансная частота механических колебаний диска ~ 500 кГц

# Регенерация биочипа

Инъекция	$\Delta f/f_{30 \text{ мин.}} \times 10^{-3}$
1 <sup>st</sup>	$0.44 \pm 0.07$
2 <sup>nd</sup>	$0.44 \pm 0.07$
3 <sup>rd</sup>	$0.35 \pm 0.07$

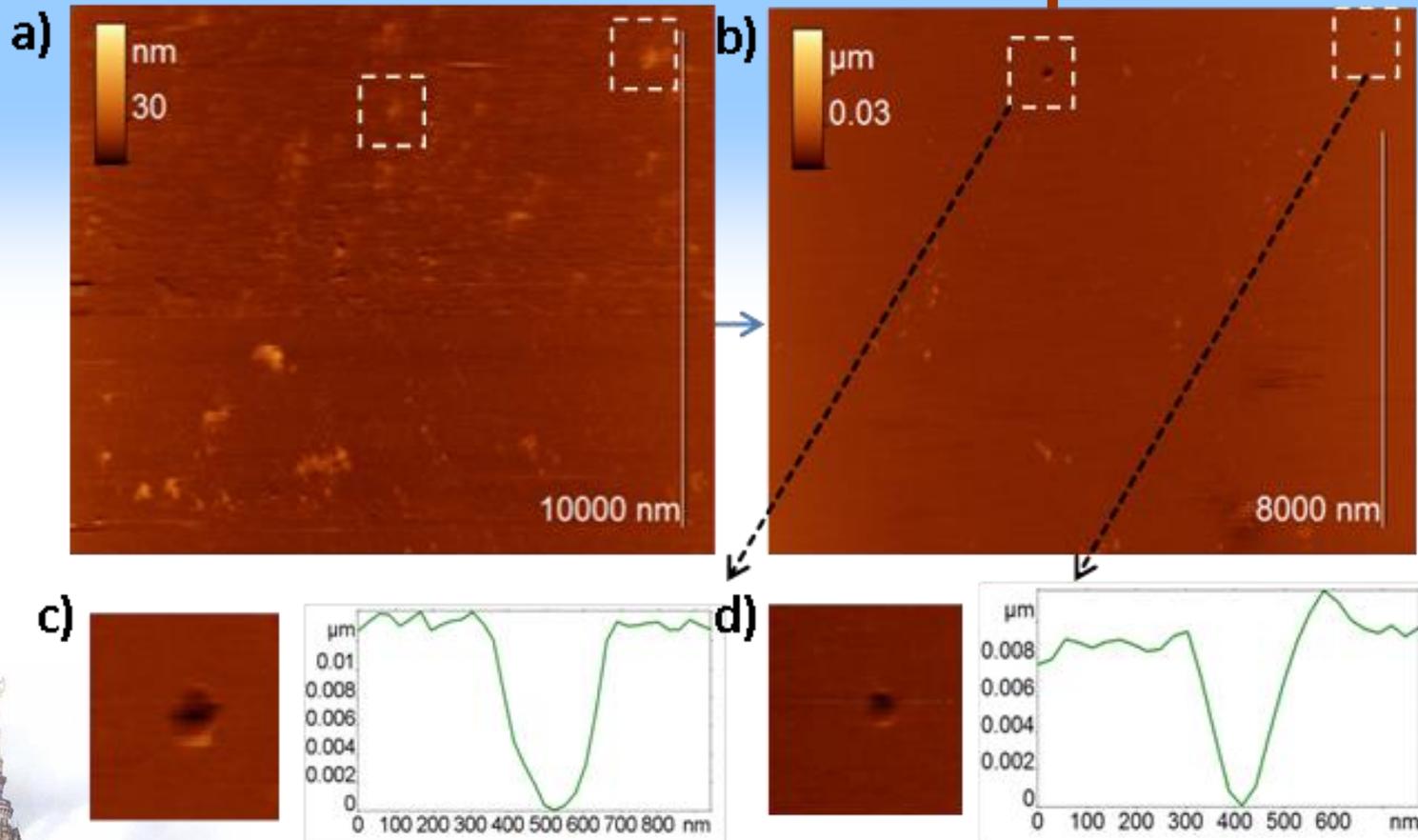


Три последовательных измерения с промежуточной отмывкой регенерирующим раствором

Образец – вирус в жидкости с концентрацией  $10^6$  вирусов/мл  
Жидкость для отмывки – 10 % раствор мочевины в воде  
Биочип – диск из ЦТС керамики с золотыми электродами с пришитыми полисахаридами с сиаловыми кислотами  
Резонансная частота механических колебаний диска  $\sim 500$  кГц



# Прямое наблюдение адсорбции вируса в атомно-силовой микроскоп



АСМ изображения сенсорного слоя после адсорбции на её поверхности вирусных частиц:

(a) вирусные частицы частично утоплены в сенсорном слое

(b) Вирусные частицы удалены с помощью зонда сканирующего зондового микроскопа.

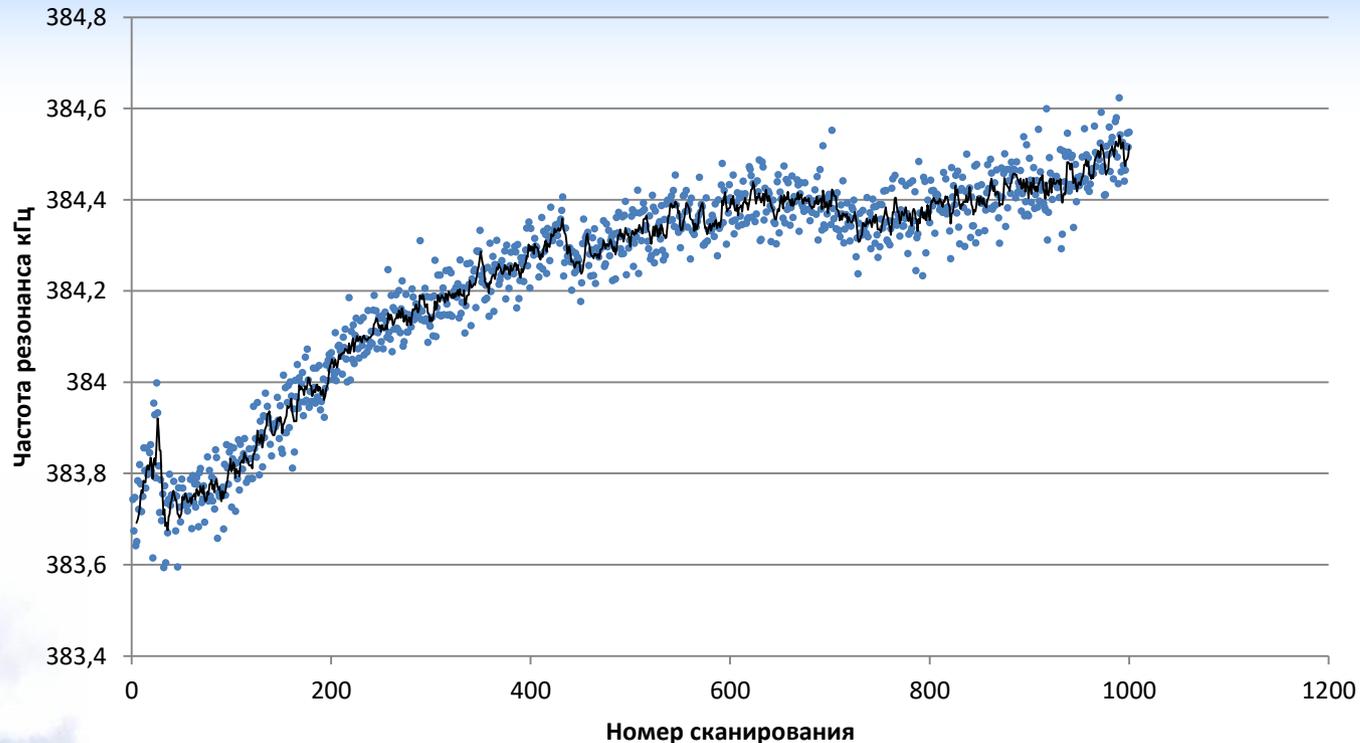
Места нахождения вирусов выделены пунктиром

(c, d) увеличенные области после удаления вирусов - слева, поперечные сечения – справа.

В местах нахождения вирусов после их удаления образовались видимые углубления.

# Обнаружение микроальбумина

Кривая связывания конъюгата антител козы против антител мыши с иммобилизованными антителами на поверхности биочипа.



Пьезокерамический диск (подложка золото+аминотиофенол+антитела Н-С15 к альбумину) помещен в проточную ячейку. В объем буфера PBST 0,75 мл добавлено 0,25 мл конъюгата с буфером с соотношением 1:1000000. За 1000 сек. сдвиг по частоте составил 0,8 кГц.

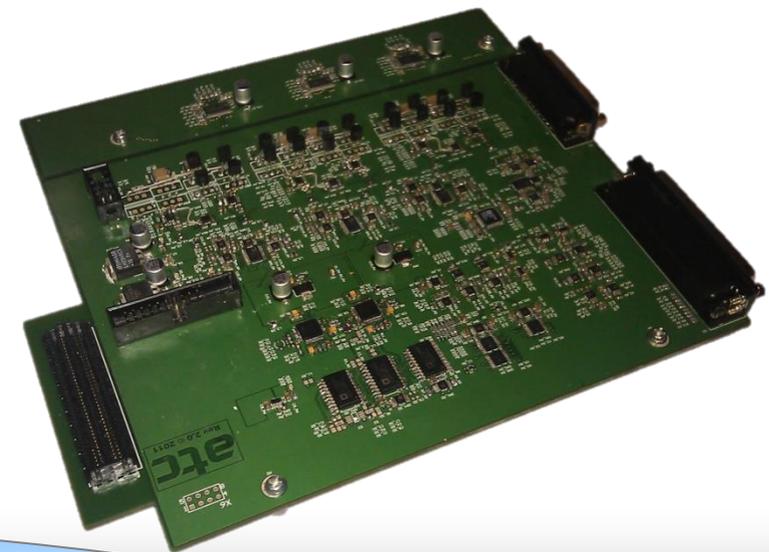


# Многоканальная система сбора экспериментальных данных и удаленного управления экспериментом

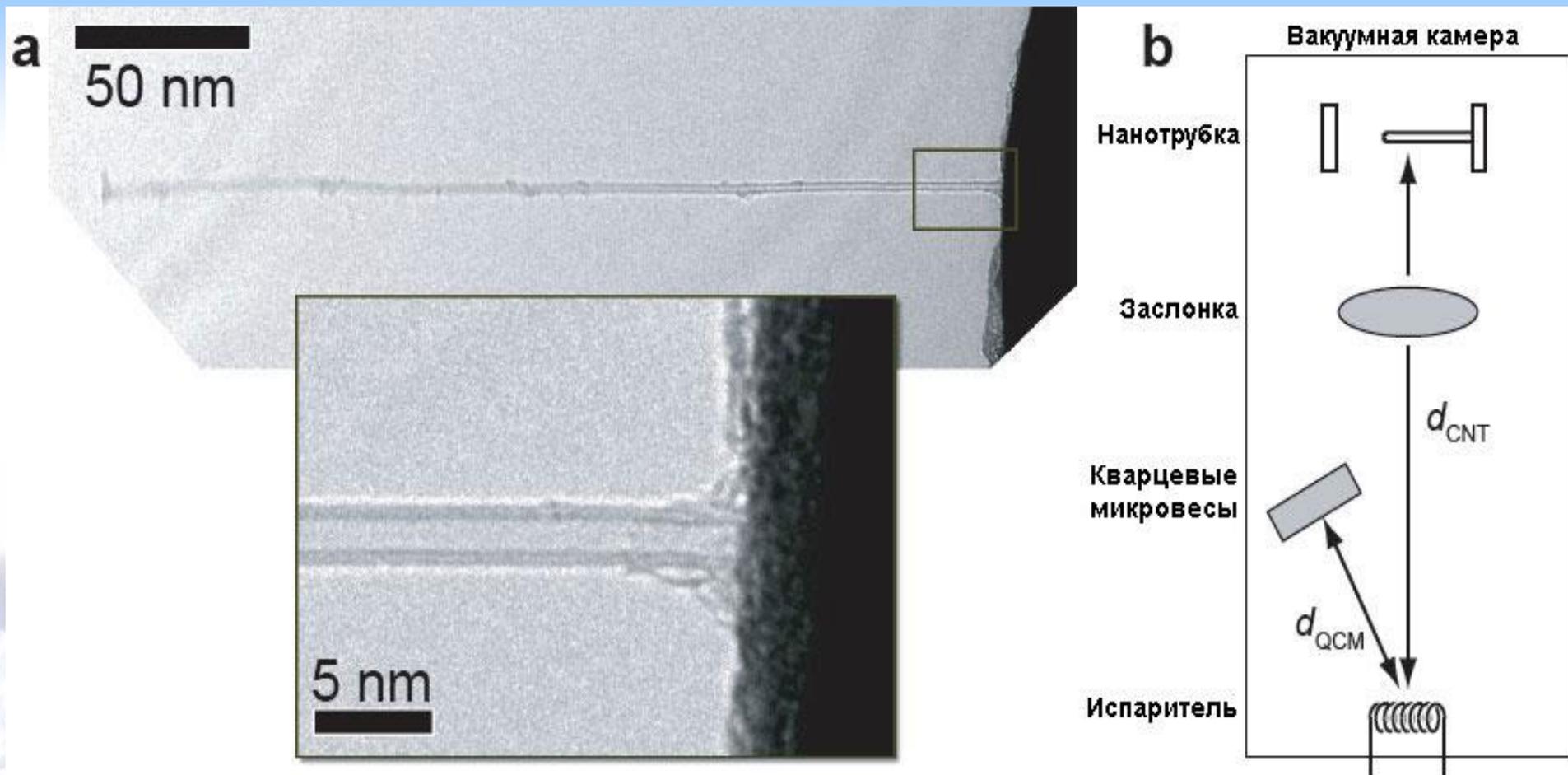
Плата на основе ПЛИС XC6SLX45T-3FGG484 Spartan-6 с логической емкостью 45000 слайсов. Тактовая частота до 400МГц.

Плата цифроаналоговой обработки данных

- Трехканальный контроллер шаговых двигателей с микрошагом 1/32 оборота.
- Три канала дифференциальных высоковольтных усилителей с диапазоном выходного напряжения +/- 200В
- Четыре канала цифро-аналоговых преобразователей с линейностью 20 бит и временем преобразования 1мкс
- Четыре канала дифференциальных цифро-аналоговых преобразователей с линейностью 16 бит, с временем преобразования 10мкс
- Два синхронизированных канала цифровых синтезаторов частоты с разрядностью управляющего слова 32 бит
- Два дифференциальных канала аналого-цифрового преобразования с частотой дискретизации 1 МГц и линейностью 18 бит
- Два дифференциальных канала аналого-цифрового преобразования с частотой дискретизации 1 МГц и линейностью 18 бит и входным аналоговым коммутатором на 8 входов
- Синхронный детектор, позволяющий проводить измерение амплитуды и фазы с погрешностью 5% во всем частотном диапазоне



# Измерение массы атома золота: использование нанотрубки в качестве измерительного элемента

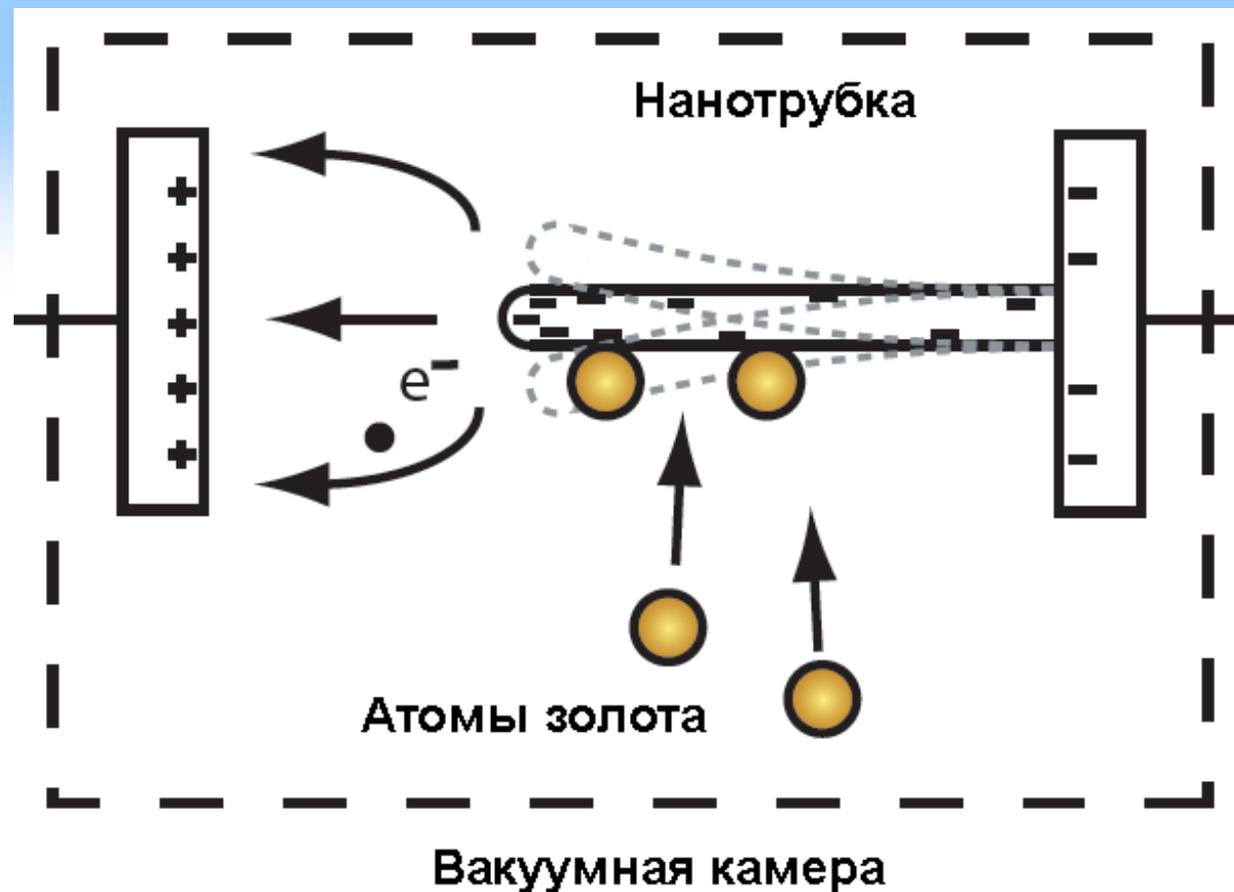


Устройство атомного сенсора массы

*Nature Nanotechnology* 3, 533 - 537 (2008)

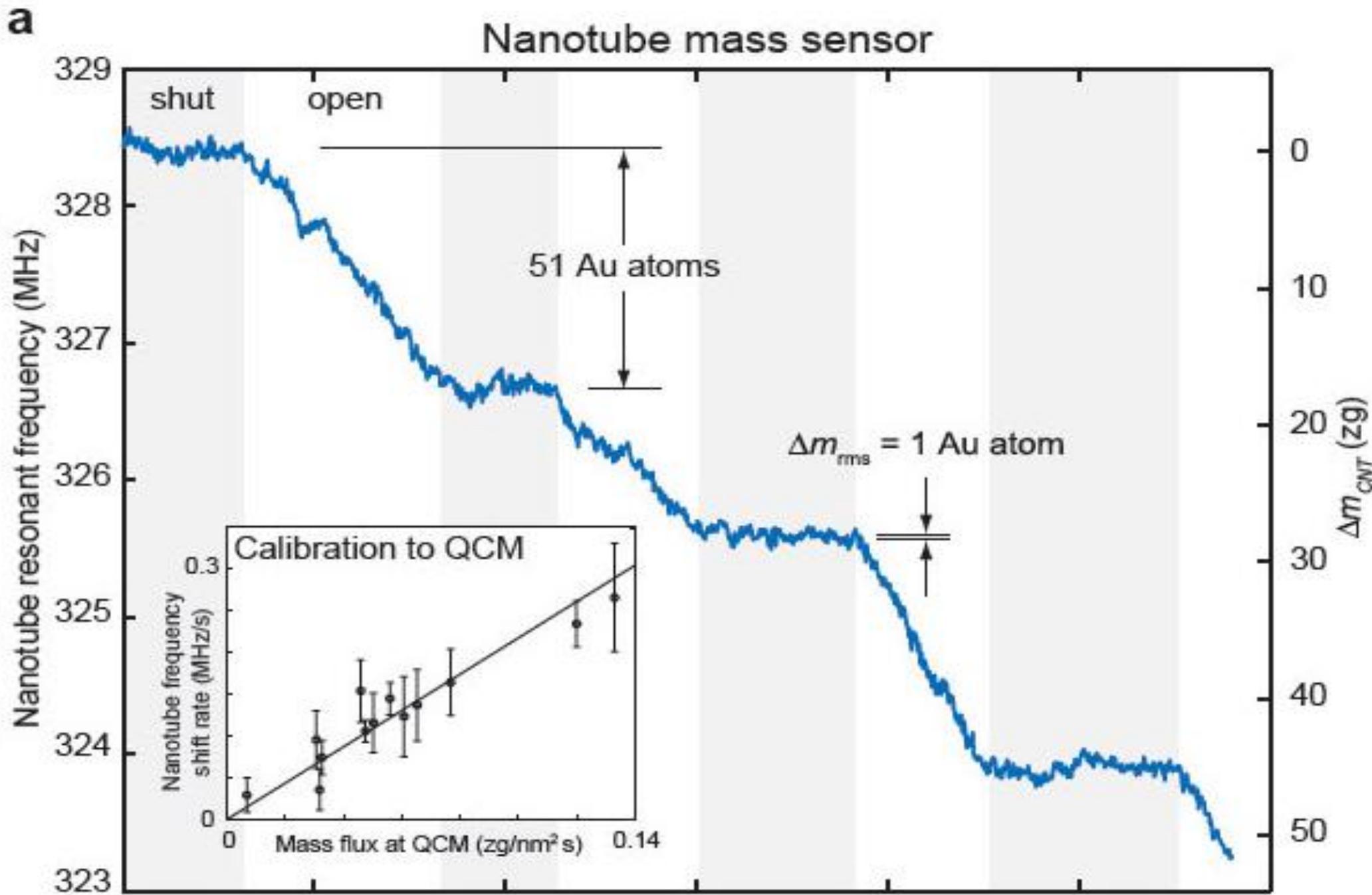
# Измерение массы атома золота: схема установки

$$\Delta f = -\frac{f_0}{2m_0} \Delta m,$$

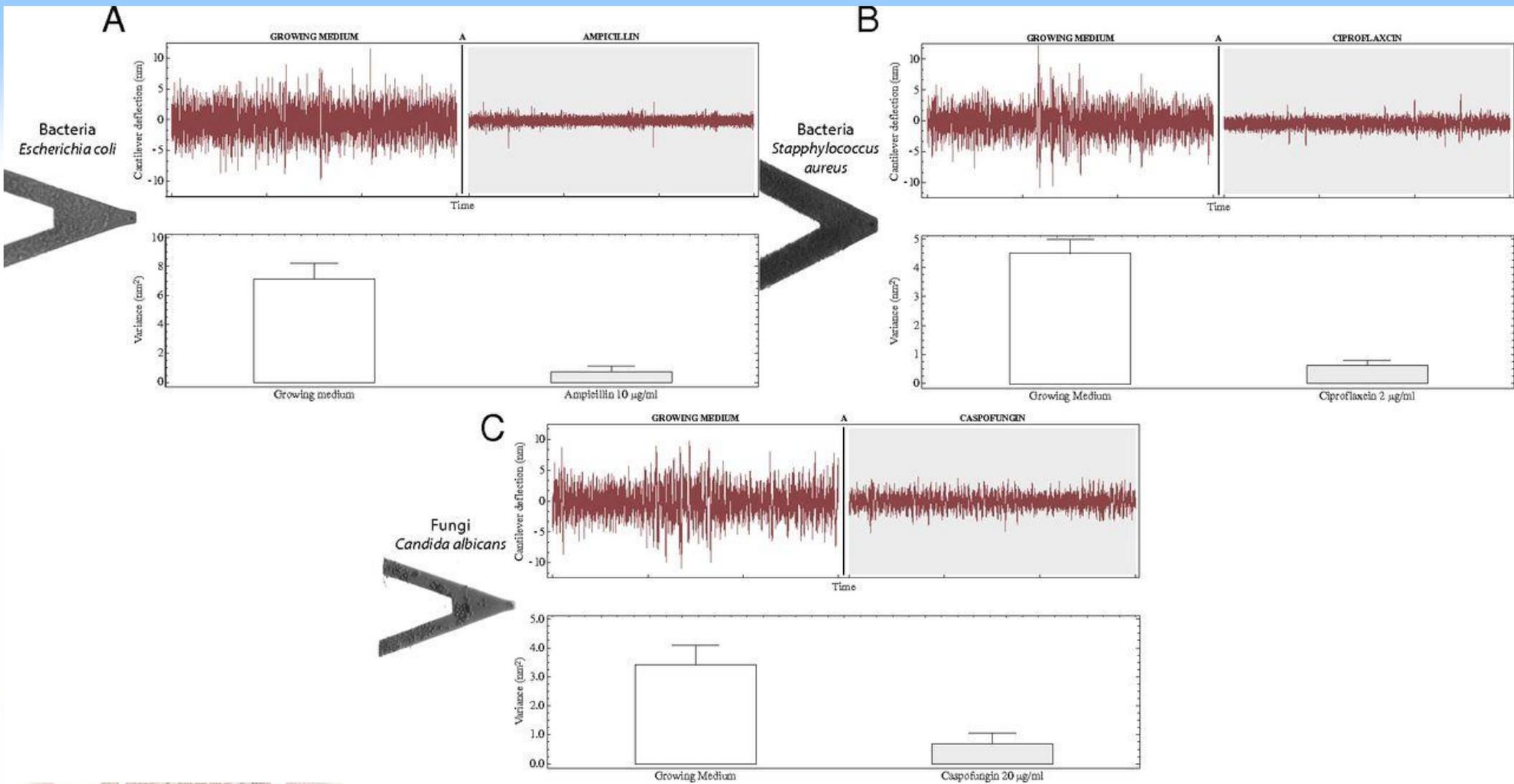


- Частота резонатора составила 328,5 МГц.
- Присоединение одного зептограмма массы (1 зептограмм (зг) =  $10^{-21}$  г) соответствует уменьшению частоты резонатора на  $\Delta f = 0,104$  МГц. Чувствительность резонатора равна 0,104 МГц/зг).

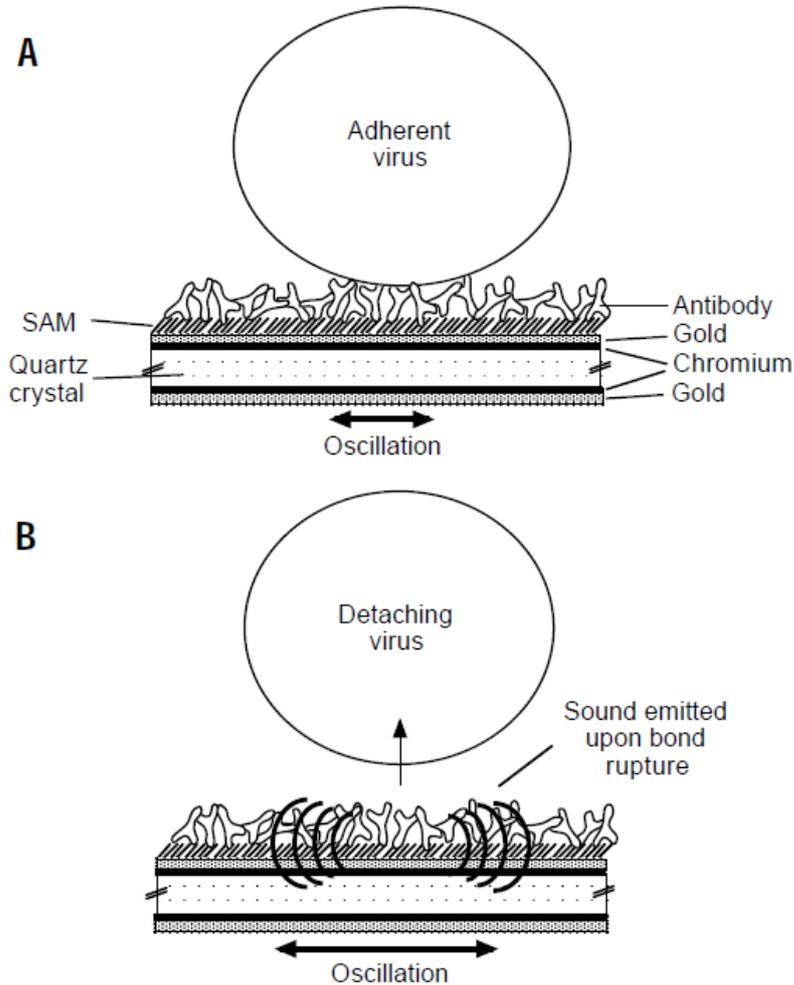
# Измерение массы атома золота: результаты



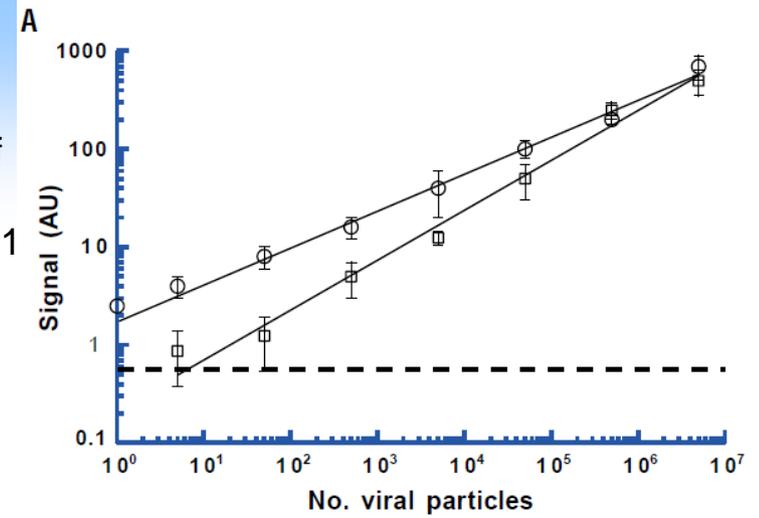
# Nanoscale vibrations as signature of life



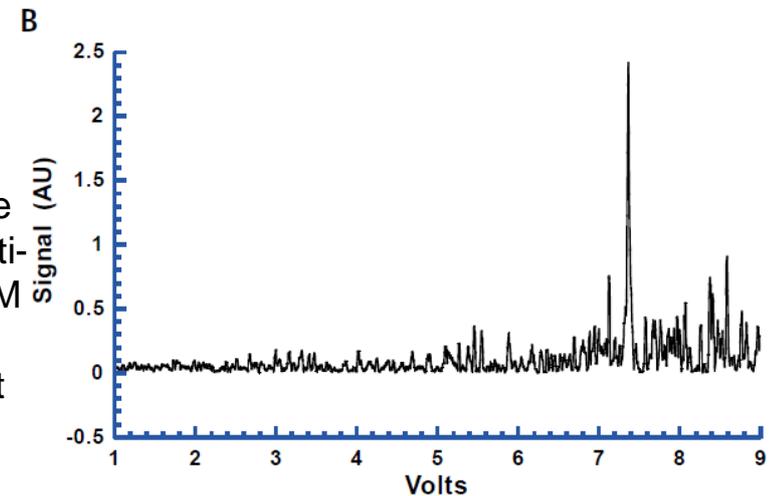
# Direct and sensitive detection of nanoparticles by rupture event scanning



(A) Signal linearity with particle numbers. (A) Serial 10-fold dilutions of HSV1 gD+ in PBS. A sample volume of either 1  $\mu\text{l}$  ( $\circ$ ) or 40  $\mu\text{l}$  ( $\square$ ) was incubated for 40 min at room temperature on a QCM disk coated with anti-gD IgG mAb. The dashed line represents the noise floor.



(B) Representative spectrum corresponding to dissociation of a single virion in PBS from an anti-gD IgG mAb-coated QCM disk. The peak can be seen at  $\sim 7.4$  V.



**HERPES-SIMPLEX VIRUS BIOSENSOR**

## Сотрудники группы

МГУ имени М.В.Ломоносова

Ахметова А.И., инженер

Белов Ю.К., инженер

Мешков Г.Б., старший научный сотрудник

Прохоров А.Н., мастер по точным приборам

Яминский И.В., д.ф.-м.н., профессор

**Студенты:**

Власов В.А., Гейдорф М.Ю., Гончарова Т.С.,

Зайцев М. Г., Корнилов Д.В., Прохоров В.В., Пылев

И.С., Советников Т.О, Трухова А.А.

ИНЭОС РАН

Синицына О.В., к.х.н., научный сотрудник

## Поддержка:

РФФИ:

проект 17-52-560001

проект 16-29-06290 офи-м

Фонд содействия инновациям

Центр перспективных технологий

## Партнеры

Virology Department at The Scottish Crop Research Institute, Invergowrie, Dundee, Scotland (Prof. M.Taliansky)

Imperial College London, United Kingdom (Prof Yu. Korchev)

University of Nebraska Medical Center (Prof. Yu. Lyubchenko)

Center of Nanotechnology, Muenster, Germany (Prof. L. Heinrich)

Institute of Pharmaceutical and Medicinal Chemistry, Muenster, Germany (Prof. Martina Duefer)

Институт полиомиелита и вирусных энцефалитов, Москва, Россия (Проф. А.С.Гамбарян)

ФГБУ НИИ гриппа Минздрава РФ, Санкт-Петербург, Россия (Проф. Сомина А.А.)

ФГБУ НИИ вирусологии им. Д.И.Ивановского, Москва, Россия (Проф. Смирнов Ю.А.)

Кафедра вирусологии МГУ имени М.В.Ломоносова (академик Атабеков И.Г., проф. Карпова О.В.)

Кафедра энзимологии МГУ имени М.В.Ломоносова (академик Егоров А.М., снс Рубцова М.Ю.)

Институт биомедицинской химии РАН (академик Арчаков А.И., проф. Иванов Ю.Д.)

ФГБУН Научно-исследовательский институт физико-химической медицины (в.н.с. Клинов Д.В.)

LG Electronics, Seoul, South Korea

Korean Institute of Science and Technology, Seoul, South Korea (Dr. Sang Kyung Kim)

**Спасибо Вам за внимание!**

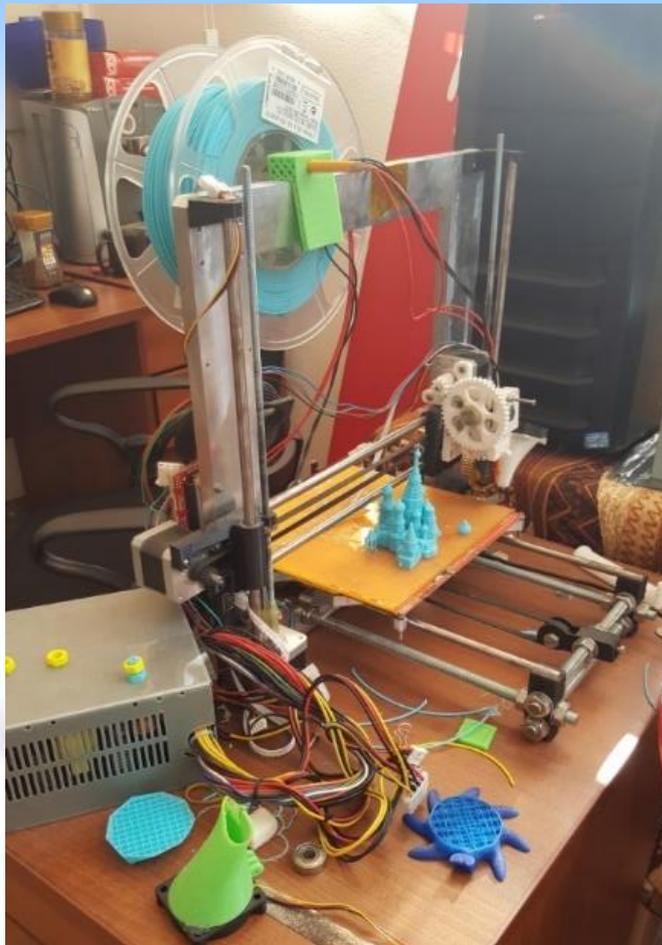
# ЦМИТ «Нанотехнологии»



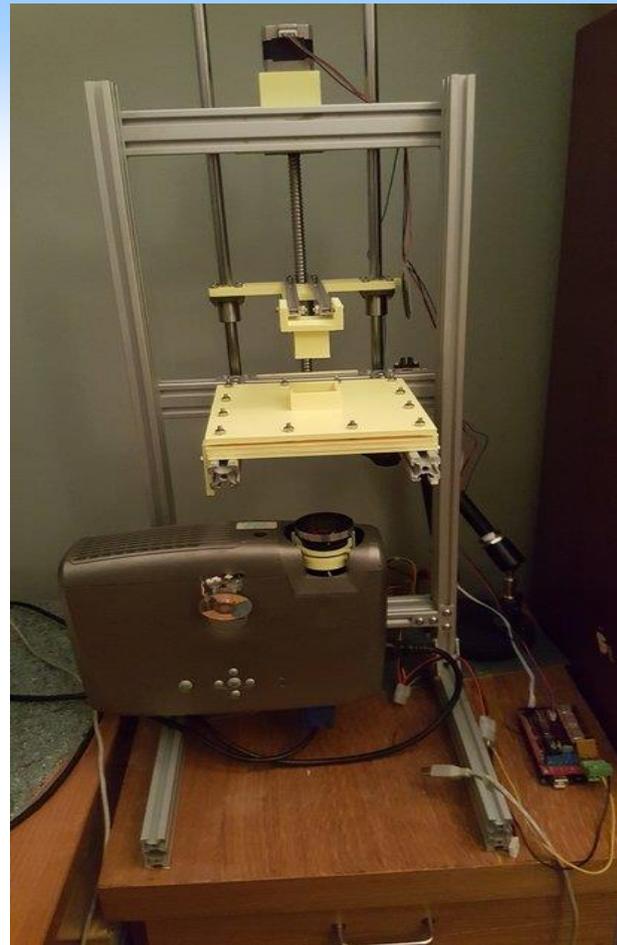
- Сканирующая зондовая микроскопия
- Обрабатывающие центры с ЧПУ
- Молекулярные 3D-принтеры
- 3D-дизайн (SolidWorks)
- Программирование



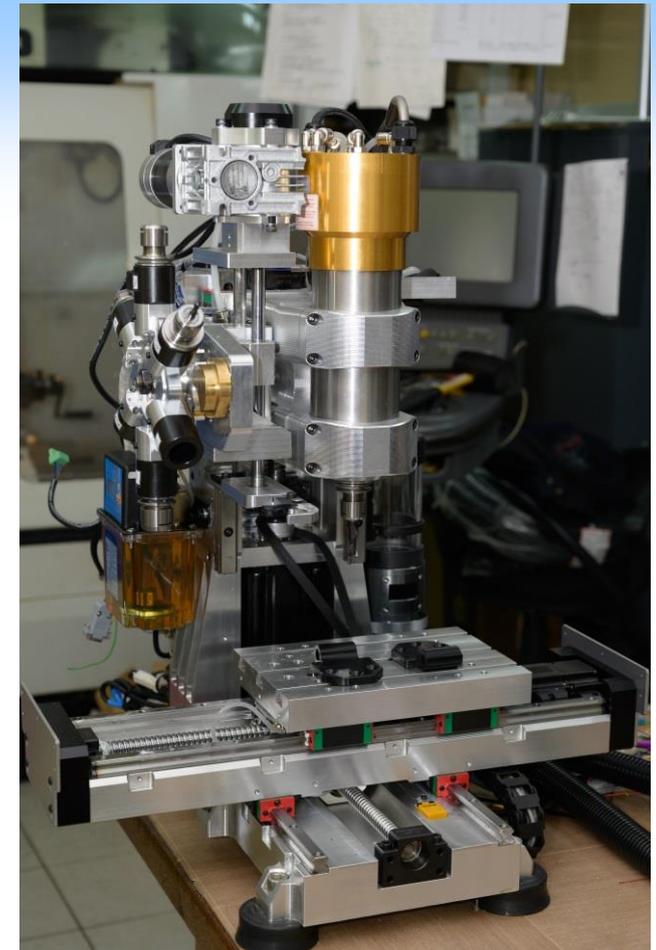
# 3D принтеры с печатью полимерами и биополимерами, Фрезерные обрабатывающие центры



3D принтер на ПЛА и АБС  
Физический факультет МГУ:  
исп. – студент Капытов Д.В.



Стереолитографический 3D  
принтер.  
Физический факультет МГУ:  
исп. – студент Капытов



Фрезерный обрабатывающий  
центр с автосменой инструмента  
АТС Индустрия 4.0