

Цифровые биосенсоры для обнаружения вируса гриппа А



И.В. Яминский

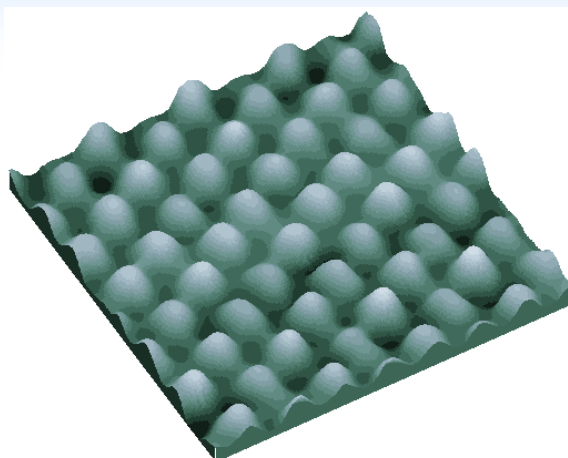
Физический и химический факультеты МГУ имени М.В.Ломоносова
Центр перспективных технологий

Форум «Цифровая экономика. Инновации и бизнес»
04 декабря 2017 года

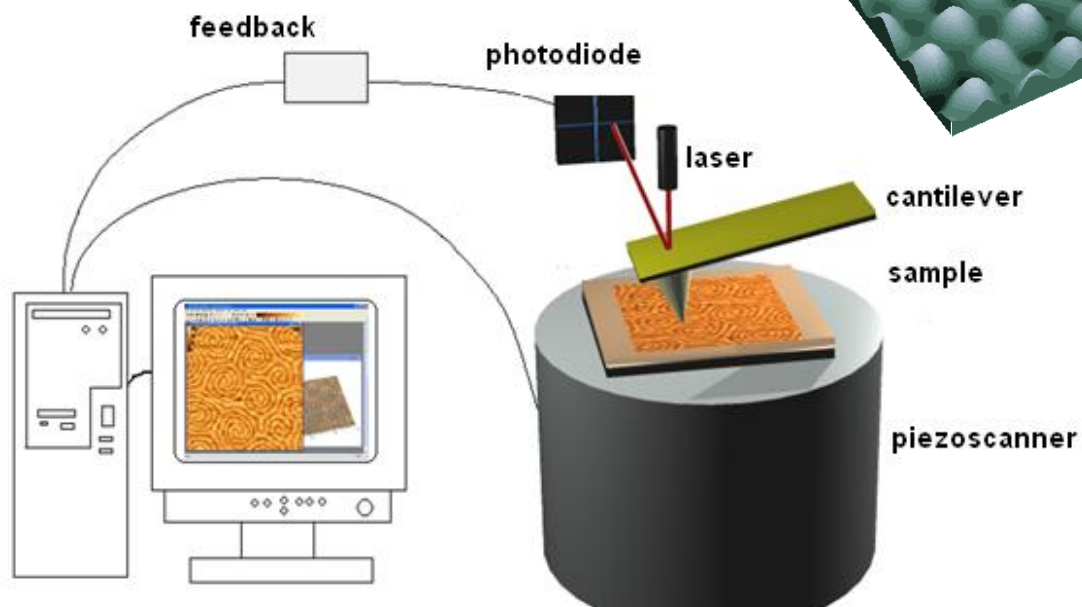


Сканирующий зондовый микроскоп ФемтоСкан

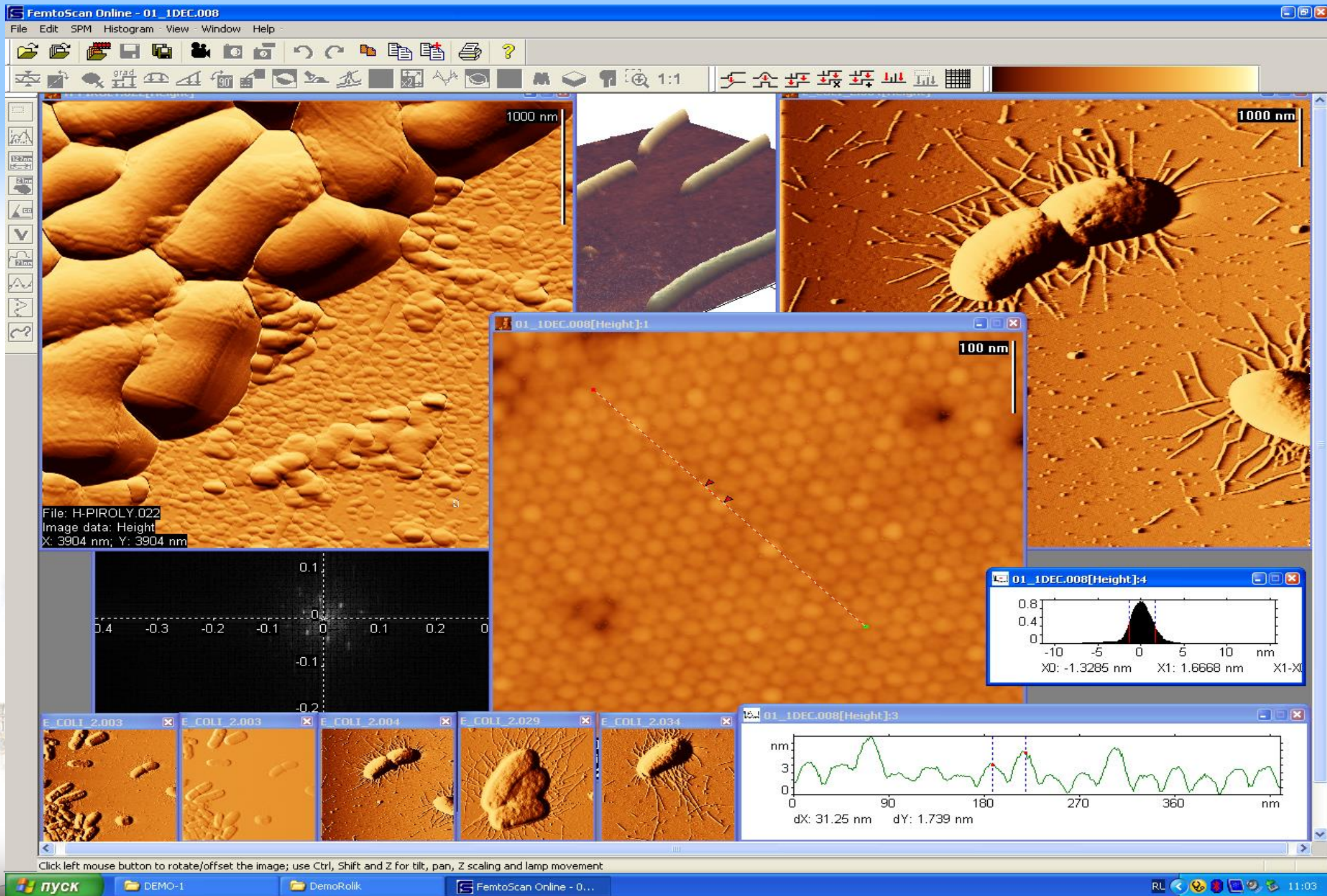
Атомная решетка на графите



Микроскоп ФемтоСкан



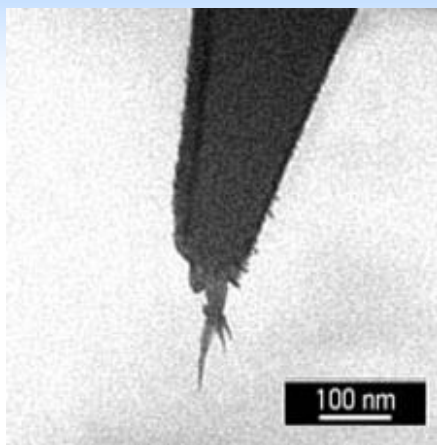
ПО ФемтоСкан Онлайн



Методы диагностики клеток крови

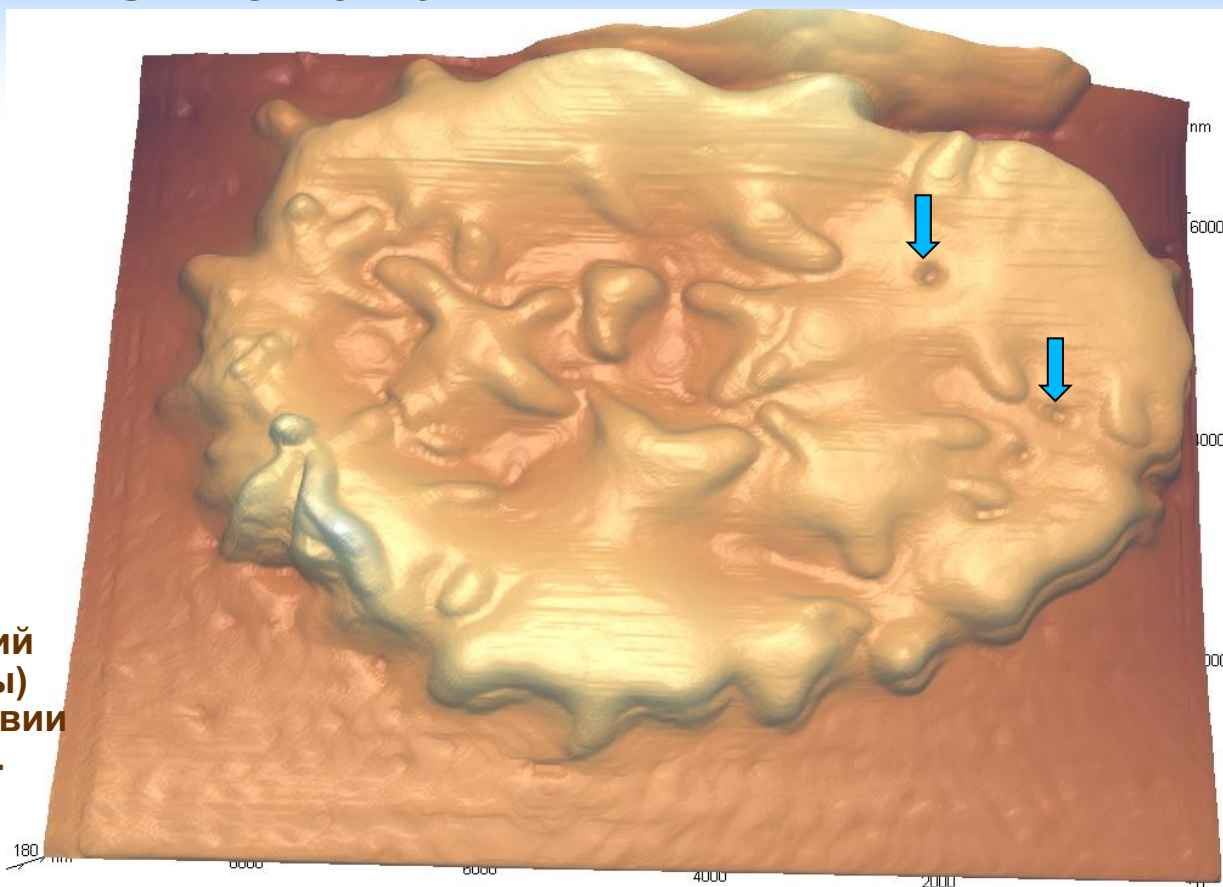
Совместно с группой академика Мороза В.В., Институт общей реаниматологии РАМН

Изображение эритроцита после электропорации,
СЗМ ФемтоСкан



Зонд

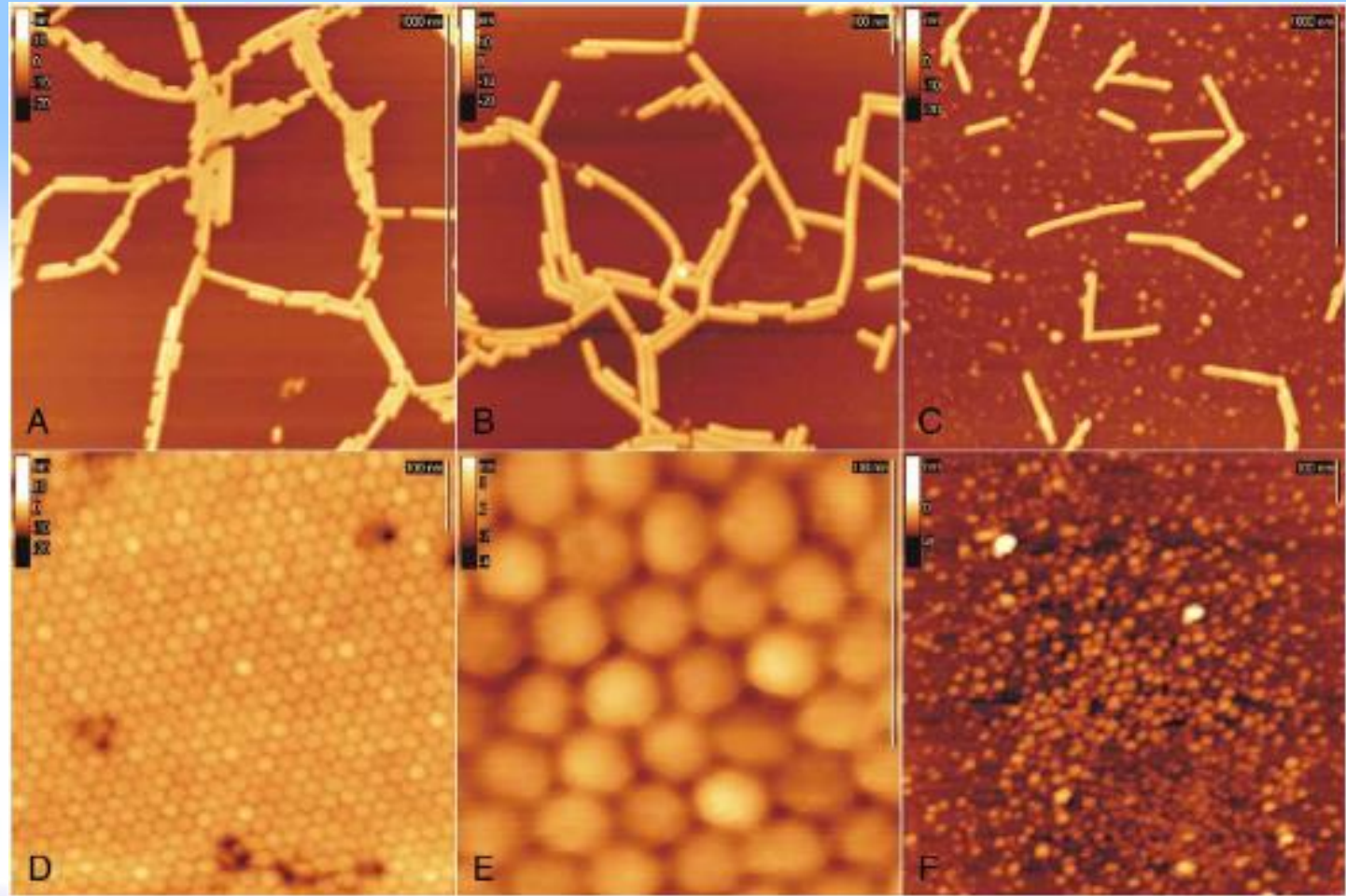
Впервые выявлены
распределение и
характер повреждений
мембраны (нанопоры)
клетки при воздействии
электрического поля.



В. В. Мороз, А. М. Черныш, И. В. Яминский, Е. К. Козлова, Г. А. Киселёв, А. С. Филонов, М. С. Богушевич, О.Е. Гудкова. *Перспективы применения методов атомной силовой микроскопии в реаниматологии* // Общая реаниматология, IV (2008), 4, 51-54.

FemtoScan Scanning Probe Microscope

Атомно-силовая микроскопия вирусов



АСМ изображения (A) роа semilatif 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).

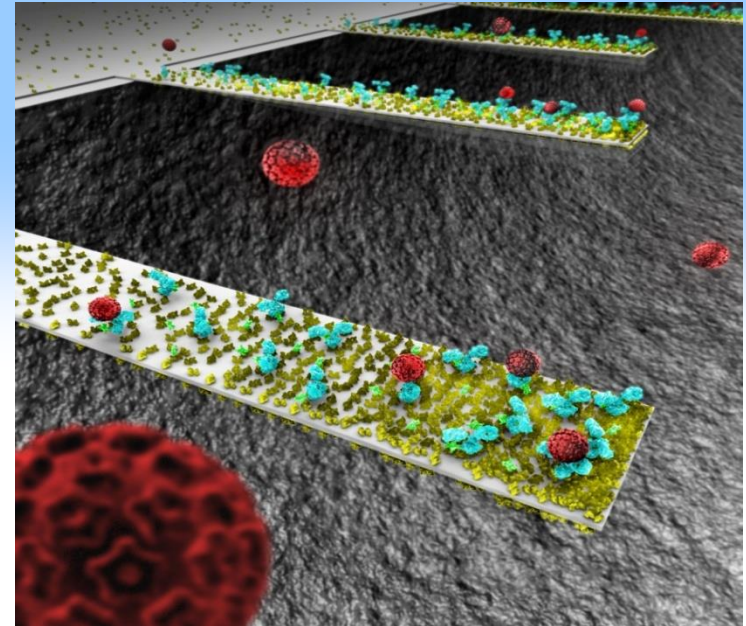
Dubrovina, Yu.F. Drygin, V.K. Novikov, I.V. Yaminsky. Atomic force microscopy as a tool of inspection of viral infection. Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine, 3 (2007), 128-131

Микрокантилеверные преобразователи

Изменяют частоту при увеличении собственной массы

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

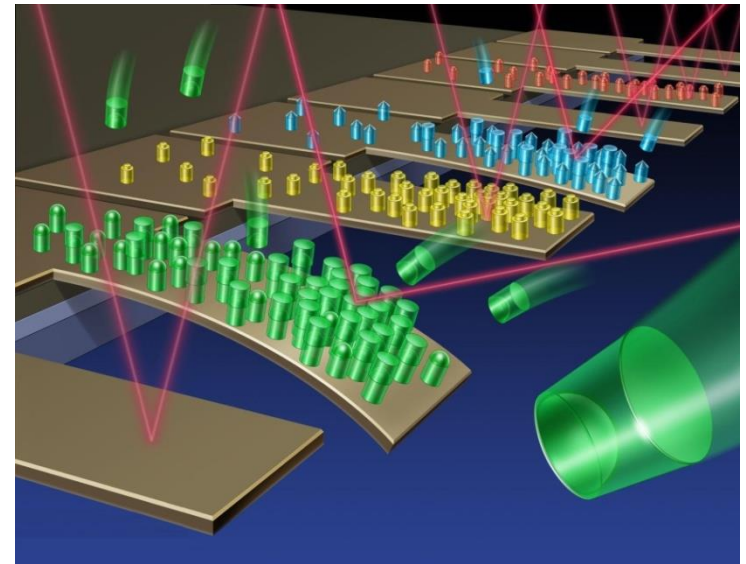
k – константа жесткости, F_0 и F – частоты до и после присоединения массы



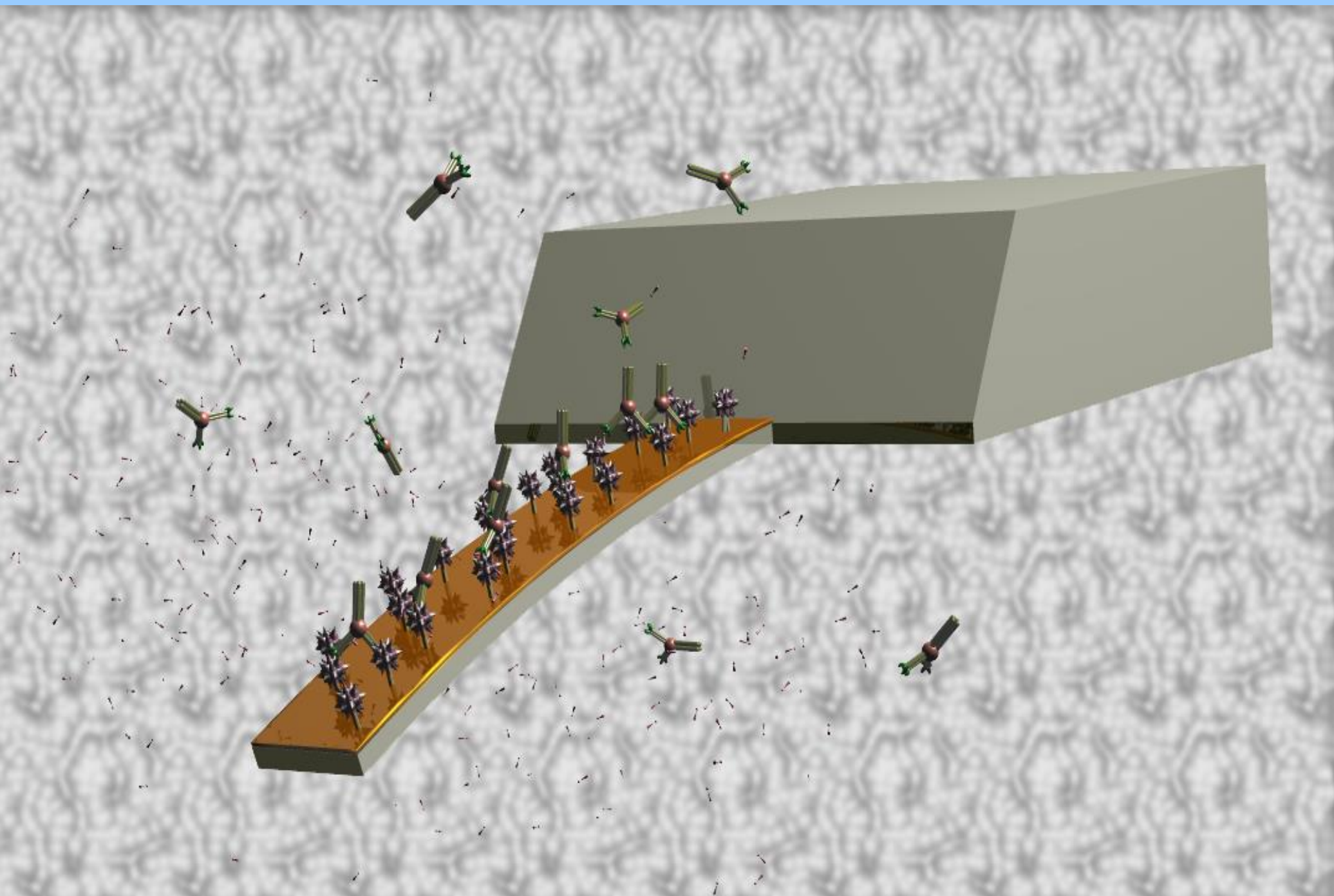
Преобразуют энергию реакции в рецепторе в энергию изгиба кантилевера

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

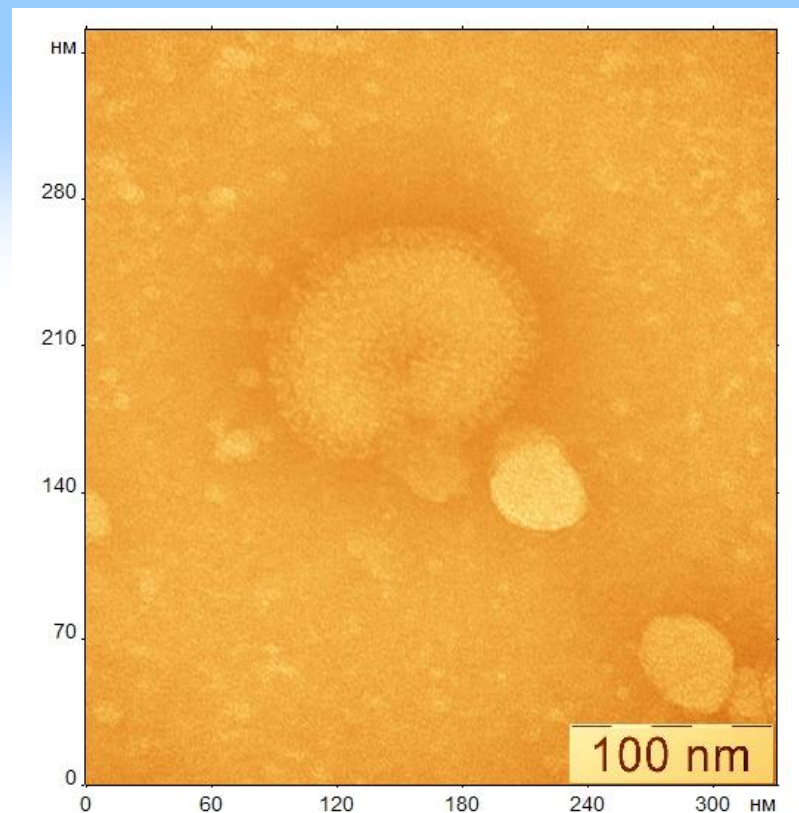
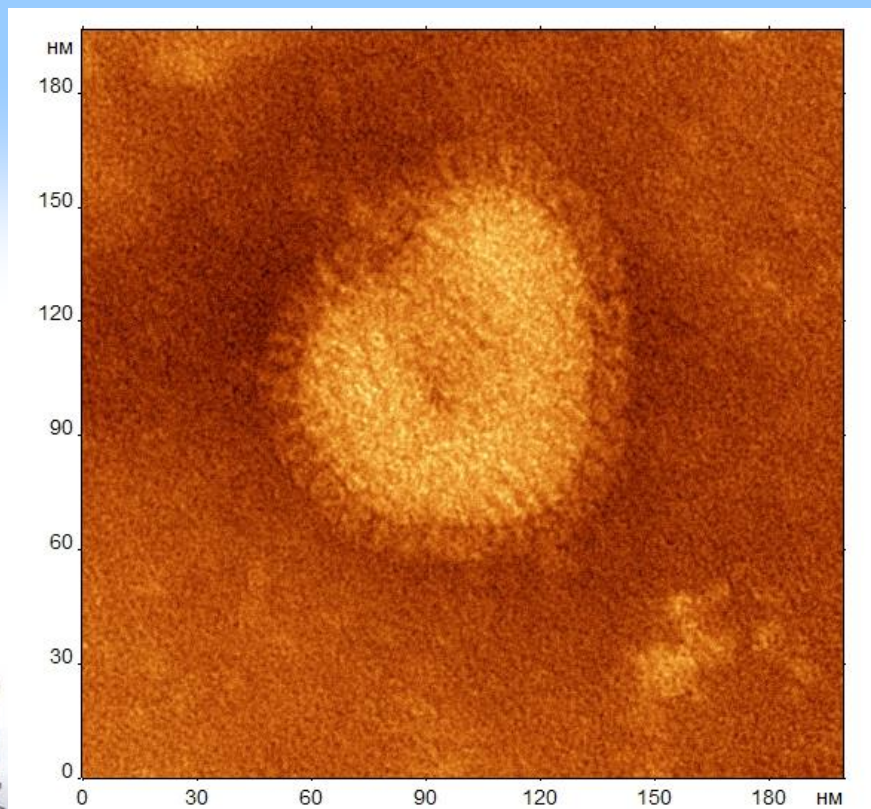
$\Delta\sigma$ – изменение поверхностного натяжения, $\nu = 0.25$ – коэффициент Пуассона, E – модуль Юнга материала кантилевера, T и L – его толщина и длина



Биосенсор без использования меток



Вирус гриппа

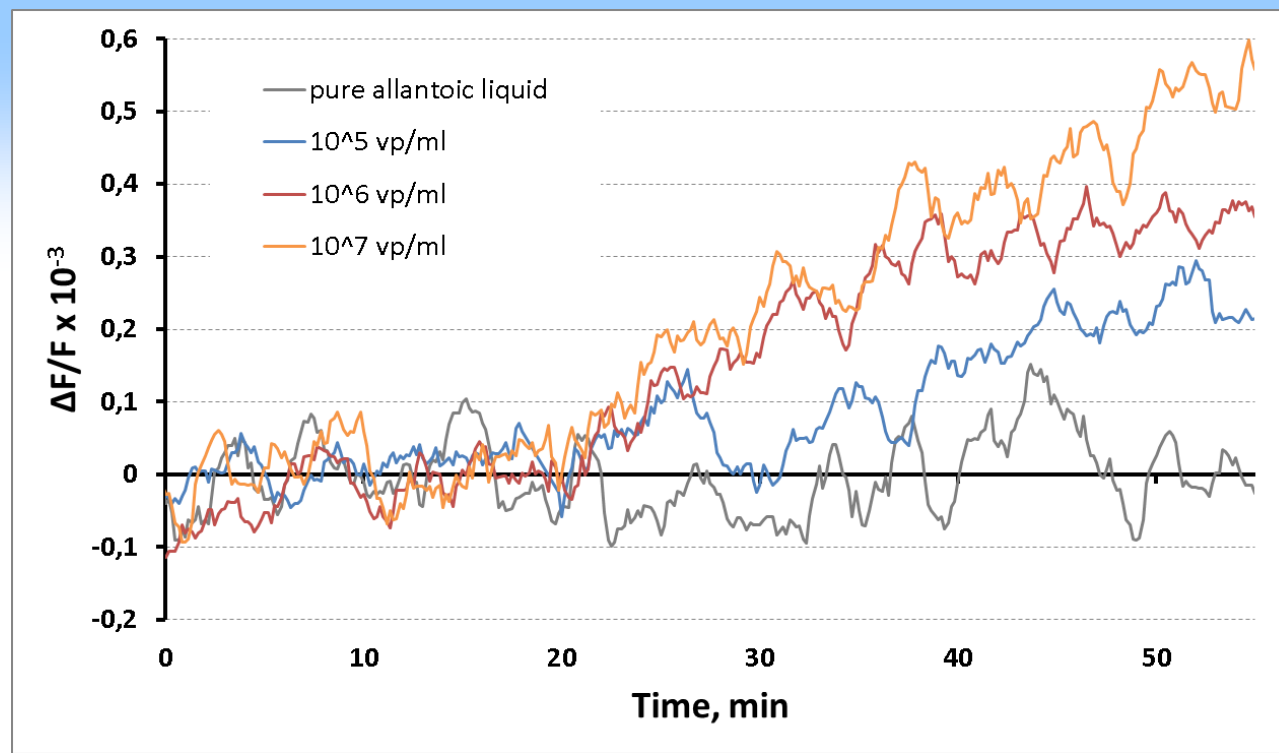


Изображение вируса гриппа H4N6 (слева) и H3N6 (справа).
Изображения получены на просвечивающем электронном
микроскопе LEO912AB.

Контрастирование фосфорновольфрамовой кислотой.
Построение изображений в программе FemtoСкан Онлайн

Обнаружение вируса гриппа H3N4

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



Зависимость сдвига резонансной частоты кантилевера от времени для разных концентрация вируса

Образец – вирус в аллантаоисной жидкости

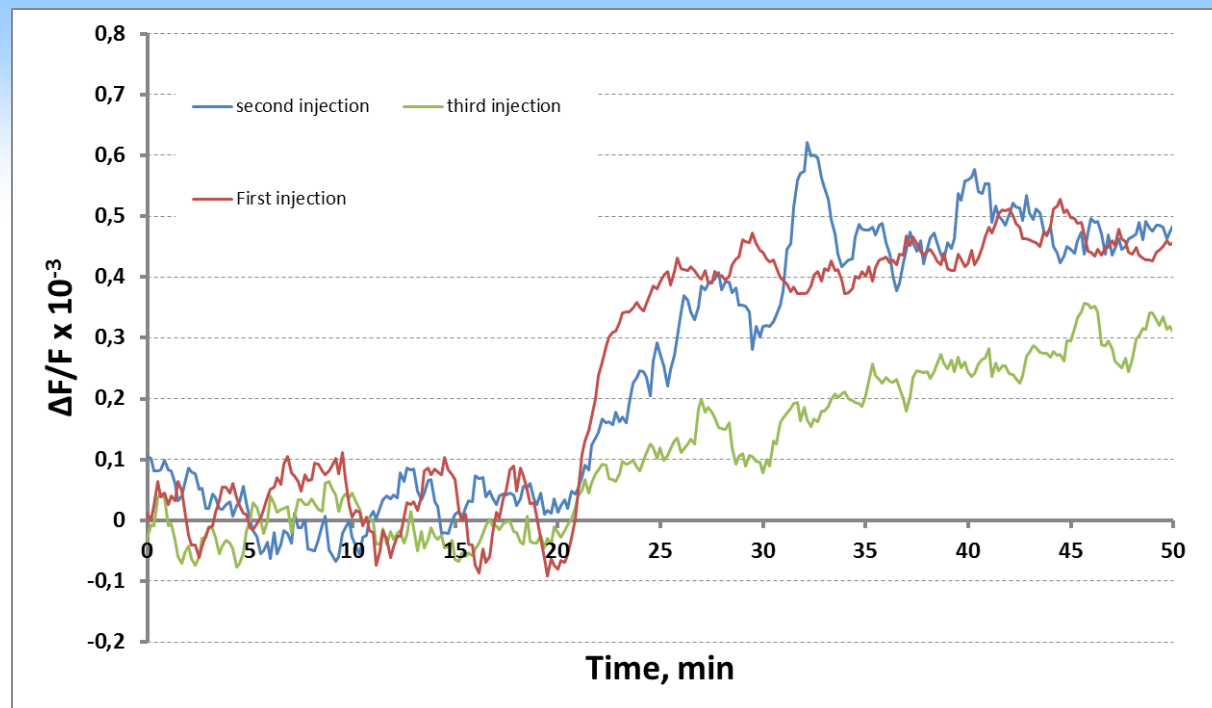
Измерения в потоке

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

Резонансная частота механических колебаний диска ~ 500 кГц

Регенерация биочипа

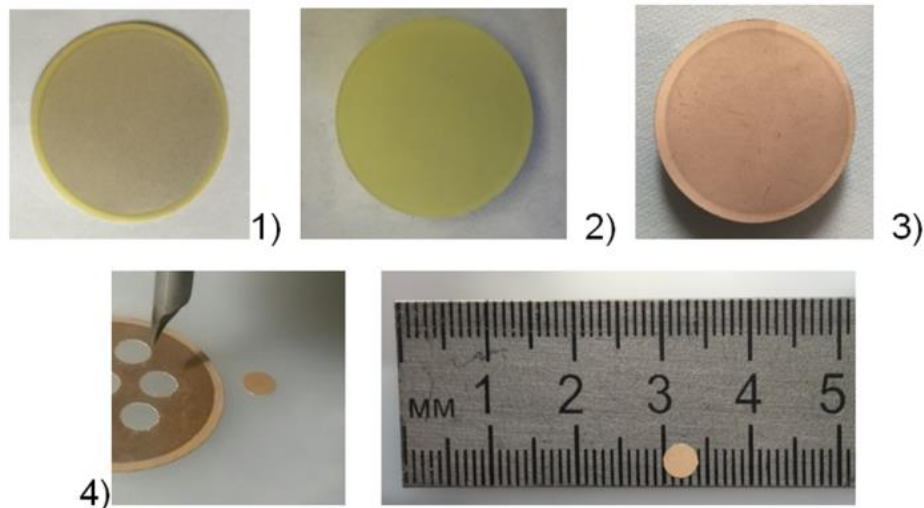
Инъекция	$\Delta f/f_{30 \text{ мин.}} \times 10^{-3}$
1 st	0.44 ± 0.07
2 nd	0.44 ± 0.07
3 rd	0.35 ± 0.07



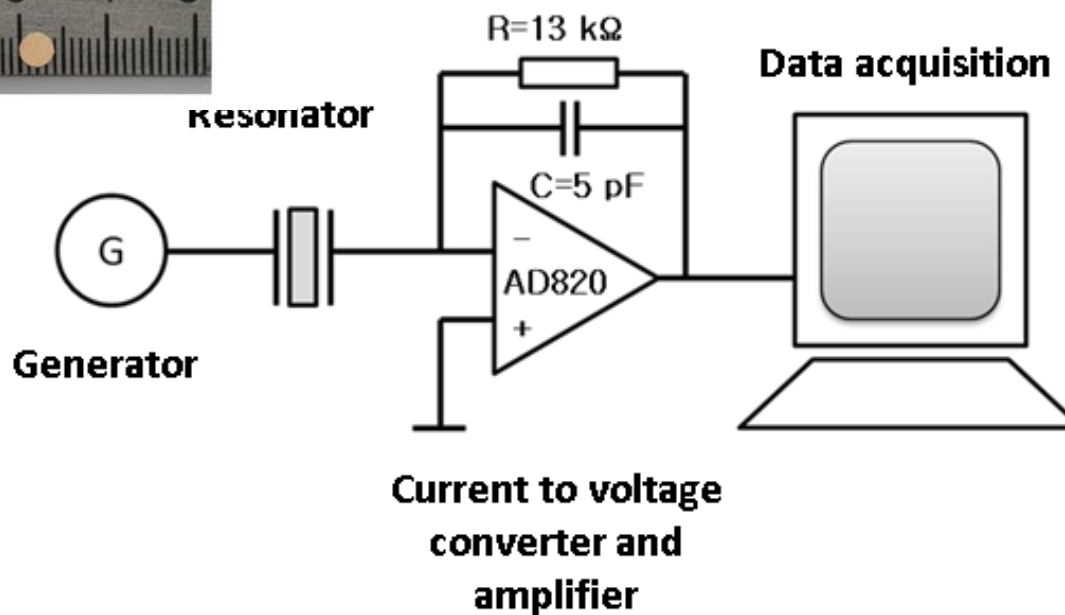
Три последовательных измерения с промежуточной отмывкой регенерирующим раствором

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 ~ 500 кГц

Пьезоэлектрические диски для обнаружения вируса гриппа



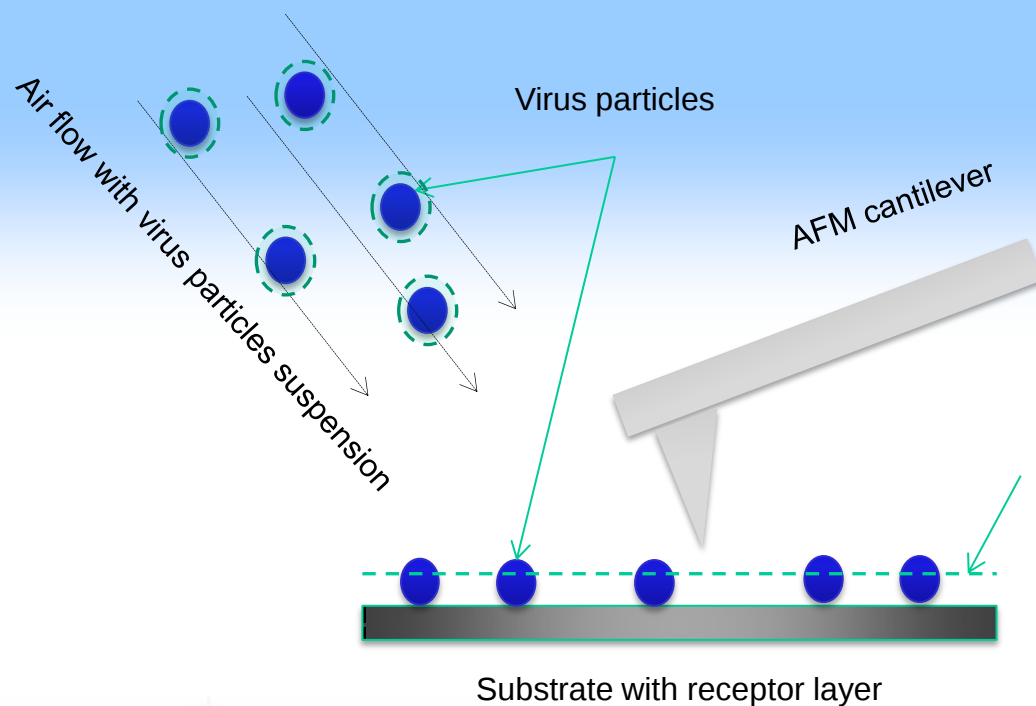
- 1) Исходная пьезокерамическая пластина с серебряными электродами
- 2) Пластина после травли серебра в азотной кислоте
- 3) Пластина с нанесенным слоем золота толщиной в 50 нм
- 4) Пьезокерамические диски диаметром в 4 мм



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

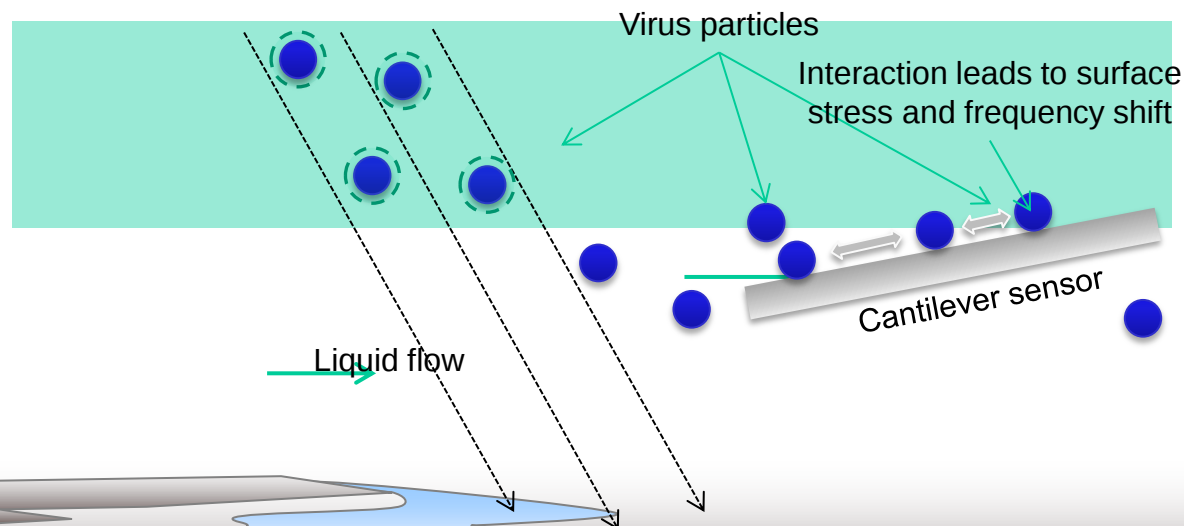
связи

Системы концентрирования вируса из воздуха

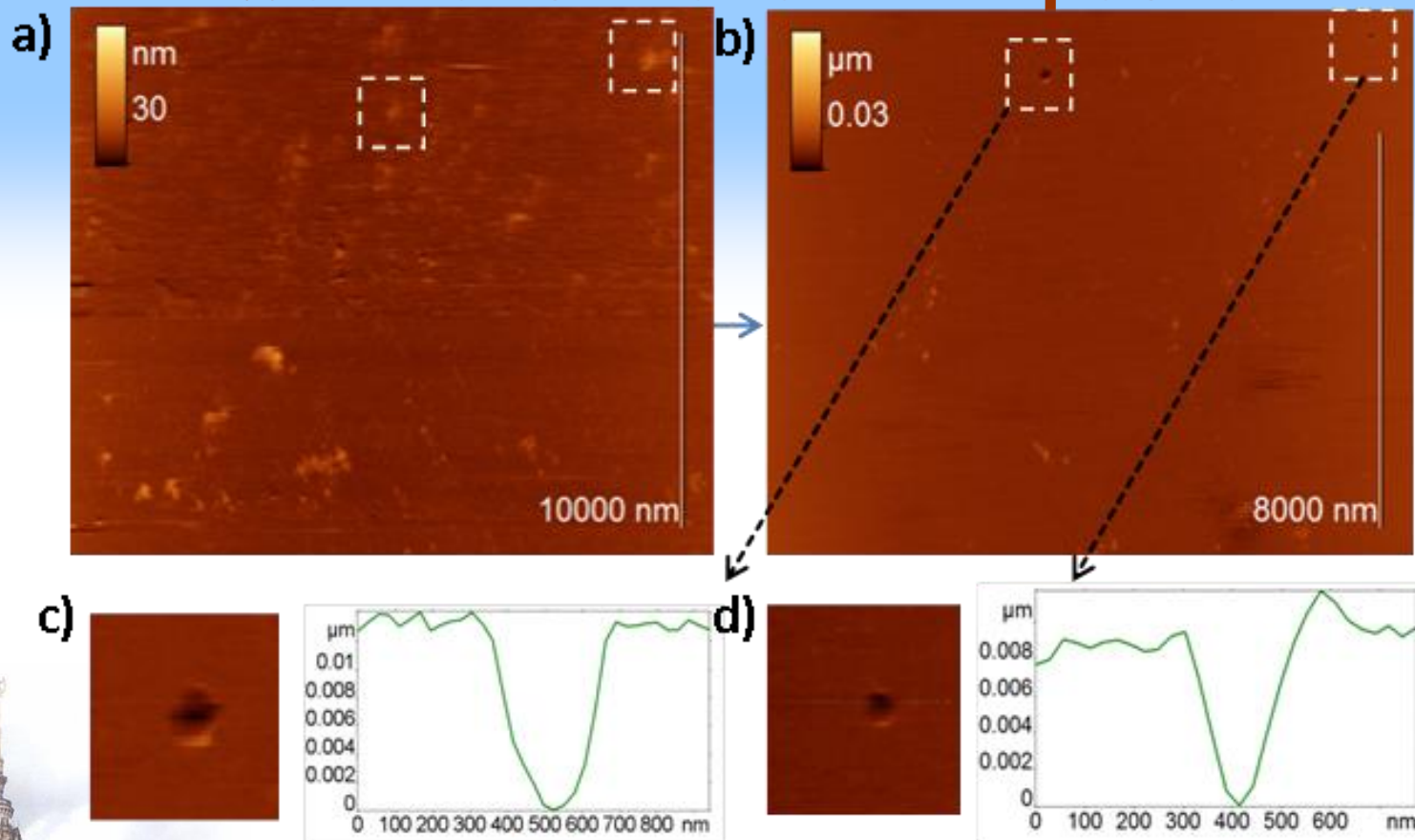


А. Непосредственно из воздуха на подложку

В. Из воздуха в буферный раствор, затем на подложку



Прямое наблюдение адсорбции вируса в атомно-силовой микроскоп



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

(а) вирусные частицы частично утоплены в сенсорном слое

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

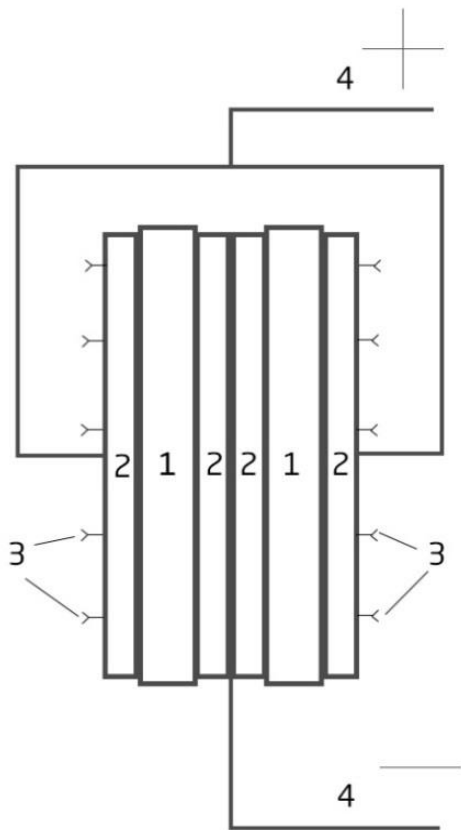
Места нахождения вирусов выделены пунктиром

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

В местах нахождения вирусов после их удаления образовались видимые углубления.

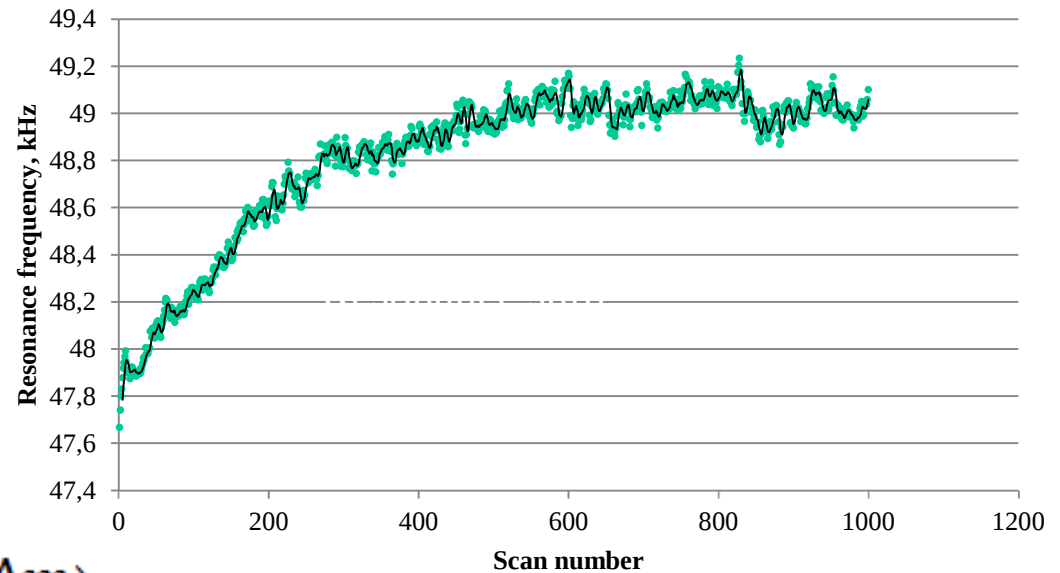
Biochip

- 1 - piezoelectric ceramics
- 2 - electroconductive layers
- 3 - sensor layers
- 4 - wires for AC power supply

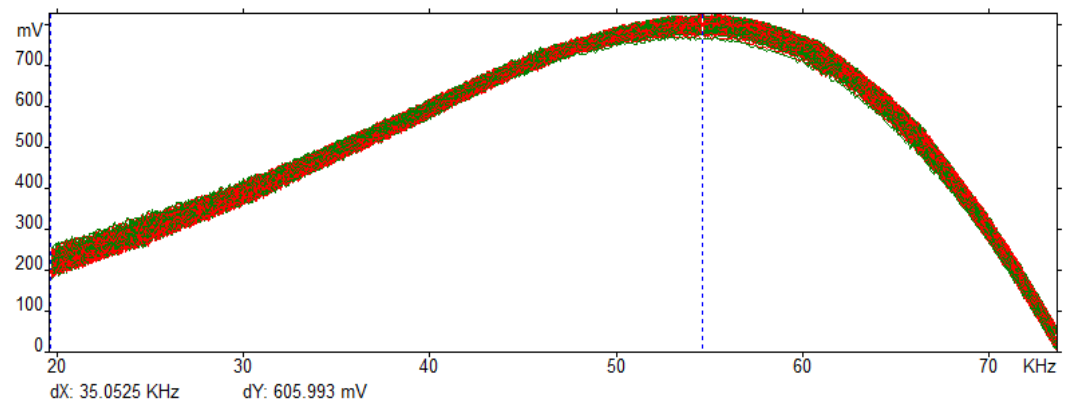


$$\Delta f = \frac{f}{2} \left(\frac{\Delta k}{k} - \frac{\Delta m}{m} \right)$$

Resonance frequency, kHz



Amplitude of resonance, kHz

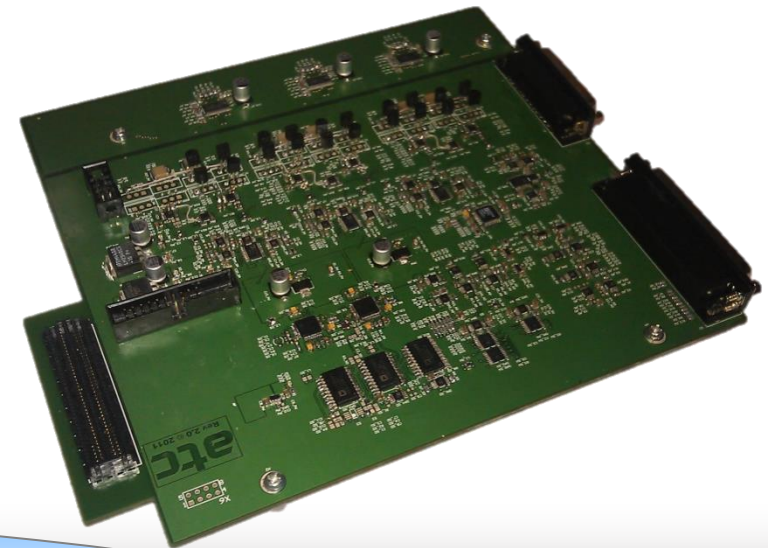
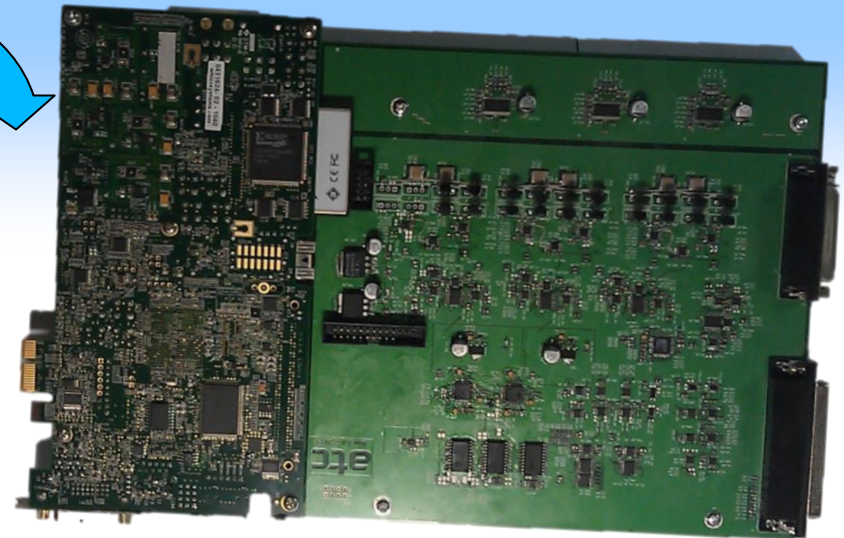


Многоканальная система сбора экспериментальных данных и удаленного управления экспериментом

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

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 1 мкс
- Четыре канала дифференциальных цифро-аналоговых преобразователей с линейностью 16 бит, с временем преобразования 10 мкс
- 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



Сотрудники группы

МГУ, физический факультет

Яминский И.В., д.ф.-м.н., профессор

Киселева О.И., к.ф.-м.н., старший преподаватель

Дубровин Е.В., к.ф.-м.н., научный сотрудник

Мешков Г.Б., к.ф.-м.н., научный сотрудник

Дудник А.О., аспирантка

Студенты:

Гончарова Татьяна – 3 курс

Пылев Иван – 4 курс

Смирнова Мария – 4 курс

Институт физико-химической биологии МГУ

Ахметова А.И., инженер

Белов Ю.К., инженер

МГУ, химический факультет

Большакова А.В., старший научный сотрудник

Яминский И.В., в.н.с

ИНЭОС РАН

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

Поддержка:

РФФИ

Минобрнауки

Фонд Бортника

Центр перспективных технологий

LG Electronics

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 (Dr. K.Kwak)

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

Спасибо Вам за внимание!