

Изучение возможности применения гравиметрического преобразователя для создания биосенсоров

С. В. Пацковский*, А. П. Солдаткин¹, А. В. Ельская¹

Киевский университет им. Тараса Шевченко
252017 Киев, ул. Владимирская, 64

¹Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины
252143 Киев, ул. Академика Заболотного, 150

В работе рассмотрены несколько различных подходов к использованию гравиметрических преобразователей на основе кристалла кварца в плане создания иммунных и хемо-биосенсоров. Исследованы условия работы пьезокристаллов в растворах и предложены практические схемы генераторов, позволяющие работать в средах с повышенной вязкостью. Показаны преимущества резонансного метода проведения гравиметрических измерений при работе в проточной системе. Обсуждены результаты, полученные при выполнении модельных экспериментов, и подтверждена перспективность развития данного метода для создания иммуносенсоров.

Введение. Схематически хемо-биосенсоры являются относительно простыми измерительными приборами, включающими в себя активный чувствительный материал и преобразователь. Сравнительная дешевизна, экспрессность и селективность проводимых с помощью сенсоров анализов ставят их в один ряд с общеприменимыми биохимическими методами, а создание малоразмерных сенсоров (при использовании микроэлектронной технологии) делает возможным широкое применение анализов *in vivo*. На практике исследователи продолжают поиски оптимальной комбинации активное вещество (ферменты, антитела, антигены, бактерии, клетки, различные типы полимеров) — и преобразователь (ионоселективные электроды, кондуктометрические, магнитные, оптические сенсоры). Необходимость повышения чувствительности преобразователей, чаще всего используемых при создании потенциометрических и емкостных иммуносенсоров, определила особое внимание к другим типам трансдюсеров, в том числе и к гравиметрическим сенсорам на основе пьезоэлектрических кристаллов.

Открытие пьезоэлектричества относится к 1880 году, когда Жак и Пьер Кюри исследовали механические характеристики кристалла кварца под воздействием напряжения. В последующем было открыто множество пьезоэлектрических материалов, среди которых кристалл кварца по чувствительности занимает далеко не первое место. Но относительная дешевизна производства, простота технологии и приемлемые физические характеристики кварца «АТ» среза обуславливают широкое использование кристаллов кварца (в основном как газовых сенсоров) в различных отраслях науки и промышленности [1—3]. Целью данной работы является исследование

*Correspondence address.

возможности использования пьезокристалла кварца в растворах как гравиметрического сенсора, а также создание методик и установок, позволяющих разрабатывать на этой основе различные типы химических и биологических сенсоров. Особенное внимание уделяется вопросу разработки системы для создания гравиметрического иммуносенсора.

Материалы и методы. В работе использовали промышленные кварцевые структуры фирмы «Filips» с различными основными частотами: 6, 9 и 10 МГц. Для работы в растворах в качестве материала электрода кварца в основном применяли золото и в некоторых случаях — серебро. Резонансная частота колебаний пьезокристалла кварца изменяется вследствие адсорбции вещества на поверхности электрода кристалла, поэтому ее измерение и составляет основу работы гравиметрического сенсора. Зависимость частоты от сорбируемой массы может быть выражена уравнением

$$\Delta F = -2,26 \cdot 10^{-6} F_b^2 \Delta m,$$

где ΔF — изменение частоты; F_b — основная частота кристалла; Δm — масса, адсорбируемая на поверхности на единицу площади электрода [4].

Чувствительность метода очень высокая, уменьшение частоты на 1 Гц соответствует адсорбируемой массе $5,46 \text{ нг/см}^2$ при основной частоте кристалла 9 МГц. С другой стороны, важную роль играет простота создания колебательных контуров на основе кристалла кварца и высокая точность существующих методов измерения частоты. Вследствие этого гравиметрический метод получил большое распространение при анализе состава газовых смесей. Однако при проведении гравиметрического анализа в жидкости, когда кристалл погружен в раствор, частота колебаний существенно зависит от природы исследуемой среды. Учет факторов, определяющих в данном случае частоту, важен с точки зрения как понимания механизма колебания кристалла в жидкости, так и возможности практического применения гравиметрических методов при создании сенсоров для проведения анализов в жидкости. Брукенштейн и Шей [5] предложили следующее уравнение для описания колебаний кристалла кварца в растворах:

$$\Delta F = -2,26 \cdot 10^{-6} n F_b^{3/2} (\rho \eta)^{1/2} \Delta m.$$

Здесь η — вязкость жидкости; ρ — плотность раствора и n — число поверхностей кристалла, контактирующего с раствором.

На рис. 1 показана стандартная эквивалентная цепь пьезокристалла кварца, на рис. 2 — зависимость спектра проводимости от характеристик

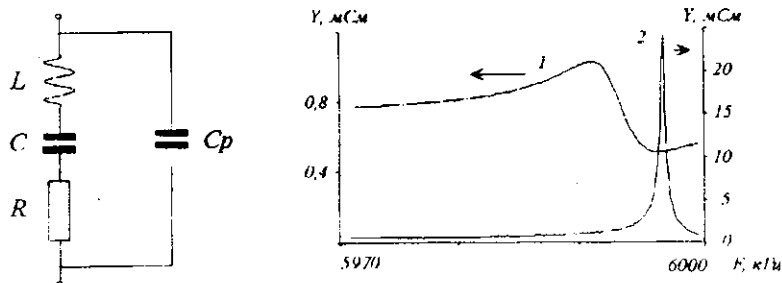


Рис. 1. АТ-резонатор, стандартная эквивалентная цепь

Рис. 2. Типичный спектр проводимости для пьезокристалла кварца: 1 — в биодистиллированной воде; 2 — на воздухе

окружающей среды, в данном случае при измерении на воздухе и в бидистиллированной воде. Можно отметить существенное смещение максимальной амплитуды резонансной кривой как по частоте, так и по абсолютной величине, что в конечном счете приводит к понижению добротности колебательного контура на основе кварца. Как следствие вышеизложенного, оказалось, что схемотехнические решения генераторов, используемые для измерения резонансной частоты при анализе в газовых средах, в растворах неприменимы, тем более для случая проводящих растворов при $n=2$ [6].

Одним довольно эффективным и простым решением данной проблемы является измерение электромеханических параметров кристалла кварца на воздухе до и после модификации поверхности пьезокристалла, проведенной в жидкости. Данный принцип применен при разработке прототипа гравиметрического иммуносенсора. В эксперименте использовали кристалл кварца с основной рабочей частотой 10 МГц и диаметром золотого электрода 3 мм. Первоначально золотой электрод промывали в 95 %-м растворе этанола, затем в бидистиллированной воде и высушивали при температуре 200 °С в инертной атмосфере.

Непосредственно после очистки кристалл погружали в 50 мМ калий-фосфатный буфер, содержащий 0,5 мг/мл протеина А на 2 ч для сорбции белка на поверхности электрода. Последующую промывку проводили в фосфатном буфере, рН 7,4, а затем в том же буфере, содержащем 5 % БСА, для блокировки неспецифических центров связывания рабочей поверхности. В дальнейшем эксперимент развивался по двум направлениям. В первом случае после высушивания измеряли основную частоту резонанса и максимальную амплитуду резонансной кривой. Во втором случае кристалл кварца помещали в раствор, содержащий 10 мкг/мл IgG кролика, на 1 ч и после промывки и высушивания регистрировали характеристики пьезокристалла. Полученные результаты представлены на рис. 3. Средняя величина сдвига резонансной частоты составила около 108 Гц, а уменьшение максимальной амплитуды резонансной кривой произошло на $4,9 \text{ Ом}^{-1}$. Несмотря на высокую чувствительность и экономичность, данный метод не является оптимальным, поскольку не позволяет осуществлять непрерывные измерения в растворах и, следовательно, исследовать кинетические характеристики прохождения биохимических реакций. Для иммуносенсоров это особенно актуально, так как достижение равновесного состояния в процессе образования комплекса антиген — антитело происходит за часы, а измерением начального участка кинетической кривой можно повысить на порядок экспрессность метода.

Для решения этой проблемы в лаборатории были рассчитаны схемы, позволяющие получать стабильную частоту и устойчивую работу в средах

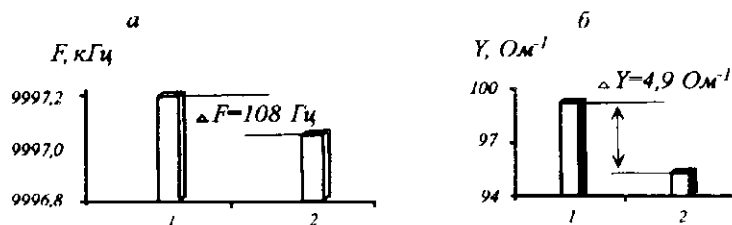


Рис. 3. Гравиметрические измерения системы протеин А — IgG кролика на воздухе: 1 — измерение параметров пьезокристалла с поверхностью электрода, модифицированного протеином А; 2 — после прохождения взаимодействия протеин А — IgG кролика (а — измерение основной частоты; б — измерение максимальной амплитуды резонансной кривой)

с повышенными коэффициентами вязкости и при этом достаточно простые для повторения и использования в биолaborаториях (рис. 4).

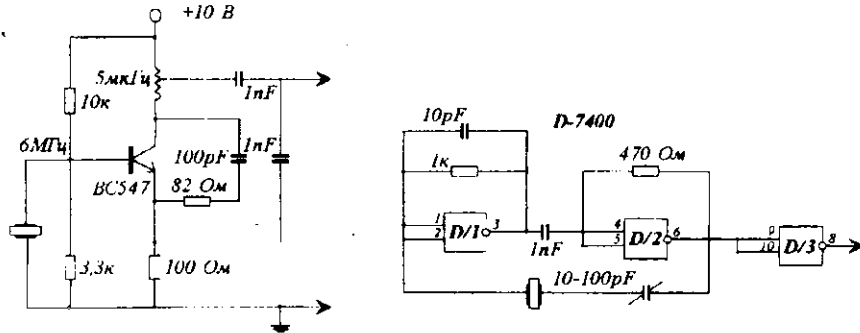


Рис. 4. Схемы кварцевых генераторов, позволяющие работать в средах с повышенной вязкостью

Поскольку для возбуждения кристалла кварца используются металлические электроды (серебро, золото, рис. 5), то при работе в проводящих растворах (например, при создании иммунобиосенсоров) появляется существенная паразитная емкость C_p (см. рис. 1), резко уменьшающая добротность системы. На рис. 5 изображены два способа закрывания нерабочей стороны кварца, устраняющие электрический контакт между электродами и при этом сохраняющие относительную механическую «свободу» колебаний. В первом случае применяли химически неактивную полимерную пленку, которая с помощью герметика закрывала один из электродов кварца. При этом необходимо отсутствие механического контакта между пленкой и поверхностью электрода. В противном случае резкое ухудшение электро-механических характеристик делает невозможной работу кристалла в жидкой среде. Другой, более перспективный метод, заключается в создании специ-

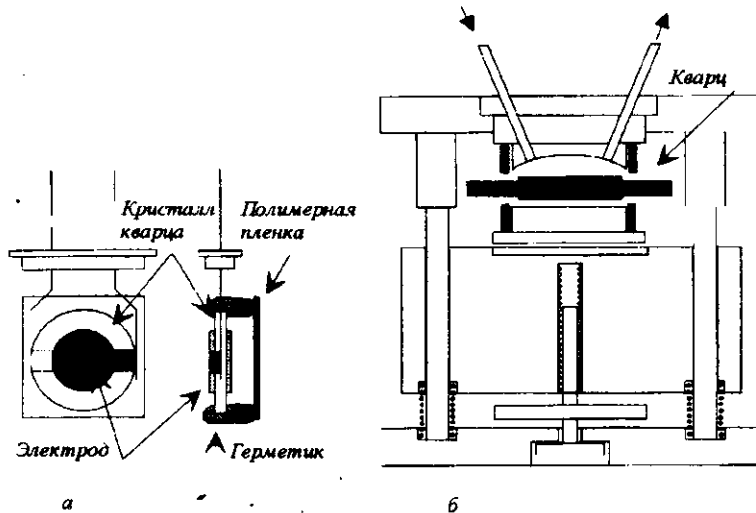


Рис. 5. Применение пьезокристалла кварца в растворах с повышенной проводимостью: а, б — в непроточной и проточной системах соответственно

альной системы, позволяющей производить оперативную смену пьезокристаллов, а также работать в режиме проточной системы (рис. 5, б).

Тем не менее, следует отметить, что в каждом конкретном случае работы над созданием сенсоров для анализа в жидкостях на основе гравиметрического метода необходимы либо соответствующая модификация и подстройка схемы генератора, либо применение других подходов измерения характеристик пьезокристаллов [7]. Одним из таких подходов является резонансный метод. В данном случае с помощью фазочувствительных нановольтметров измеряются параметры эквивалентной цепи пьезокристалла (в частности, проводимость) при сканировании частоты прикладываемого напряжения (см. рис. 2). Компьютерная обработка получаемой резонансной кривой позволяет в ходе эксперимента рассчитывать как дрейф основной резонансной частоты кристалла, так и изменение максимальной амплитуды сигнала, которая в некоторых случаях является основным информационным откликом системы.

Приведенную методику вместе с традиционной (измерение резонансной частоты) применяли при исследовании прохождения неспецифической сорбции БСА на поверхности золотого электрода пьезокристалла (рис. 5, а). Временные зависимости основной частоты кварца и максимальной амплитуды резонансной кривой показаны на рис. 6. Измерения проводили в 5 ММ

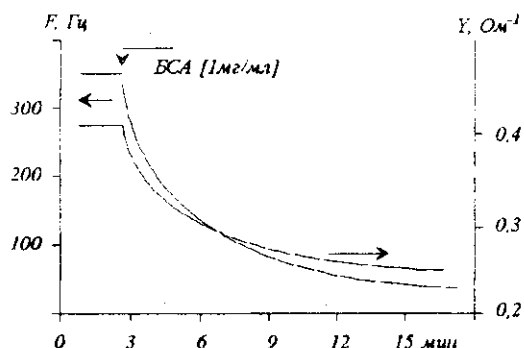


Рис. 6. Гравиметрические исследования неспецифической сорбции БСА на поверхность электрода кварца

натрий-фосфатном буфере при добавлении 1 мг/мл БСА. Результаты подтверждают высокую чувствительность методов и их перспективность в плане работы над биоиммуносенсорами при анализе в жидкостях. С другой стороны, проведенные измерения показали, что для повышения эффективности, снижения трудоемкости в процессе снятия калибровочных кривых, а также для возможности работы в составе автоматизированных измерительных систем необходимо применение проточной системы.

Проточная система, изображенная на рис. 5, б, была использована при работе над созданием химических сенсоров на органические соединения (например, хлороформ). При этом изначально поверхность электрода кварца покрывали полимером, способным специфически взаимодействовать с анализируемым веществом, затем пьезокристалл кварца помещали в проточную систему и измеряли резонансные кривые с помощью измерителя НР419. После покрытия полимером поверхности электрода происходил сдвиг измеренной на воздухе частоты на величину, равную 40 кГц для 6 МГц кварца. Последующий сдвиг частоты, а также максимальной амплитуды резонансной кривой наблюдался при помещении кристалла кварца в проточную систему (рис. 7).

На рис. 8 показаны результаты исследования сорбции хлороформа на поверхность электрода кварца, покрытого полимером. В этом случае изме-

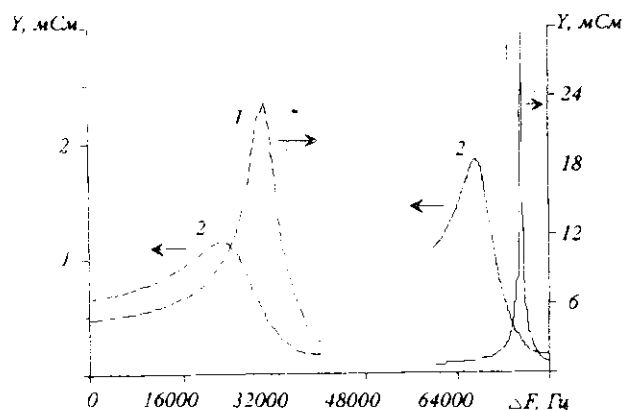


Рис. 7. Изменение спектра проводимости пьезокристалла кварца при покрытии электрода полимером полиэтеруретаном: 1 — измерения на воздухе; 2 — в бидистиллированной воде

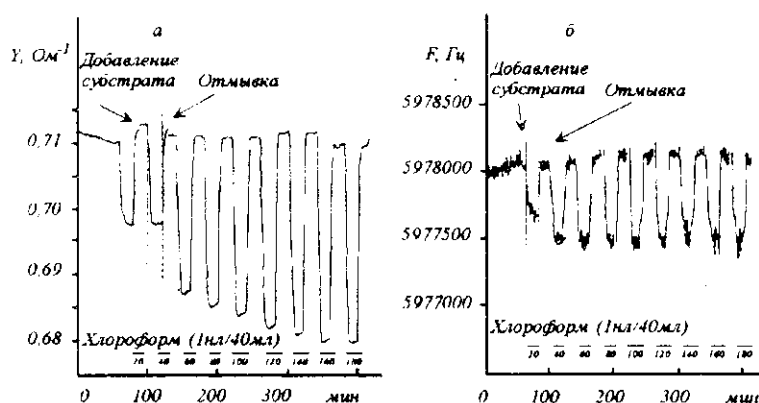


Рис. 8. Гравиметрические исследования сорбции хлороформа на поверхности кристалла кварца, покрытой полимером полиэтеруретаном (концентрационные зависимости: а — максимальной амплитуды резонансной кривой; б — основной частоты кварца)

рение зависимости максимальной амплитуды резонансной кривой от концентрации субстрата является более эффективным методом, чем измерение частоты, как по соотношению сигнал — шум, так и по динамическому диапазону измеряемых концентраций. Поэтому следует отметить, что применение резонансного метода во многих случаях может быть единственным возможным и удобным вариантом гравиметрических измерений, несмотря на необходимость применения более сложной измерительной аппаратуры и обязательного компьютерного управления сбором и обработкой результатов. А совмещение данного подхода с кинетическим режимом проведения анализа (использование проточной системы) дает эффективную систему для исследования и разработки различных видов иммуносенсоров.

Заключение. В данной работе показано несколько подходов и методов проведения гравиметрического анализа в жидких средах, которые могут быть эффективно использоваться при создании различных типов биохемосенсоров и иммуносенсоров. Сравнивая полученные гравиметрическим методом результаты с соответствующими результатами, полученными потенциометрическим [8] и емкостным методами [9], можно сделать вывод о преимуществе и перспективности гравиметрического метода, в особенности при работе над иммуносенсорами. Актуальность данного метода заключается еще и в том, что существует целый ряд гравиметрических приборов,

использующих эффект распространения поверхностных акустических волн. Данные преобразователи работают на более высоких частотах (до 1 ГГц), что соответственно повышает и чувствительность метода. В то же время современная микроэлектронная технология позволяет создавать массивы чувствительных элементов на одной подложке, что дает возможность реализовать дифференциальный либо мультисенсорный подход для дальнейшего повышения селективности и чувствительности метода и расширения области его применения.

С. В. Пацковский, О. П. Солдаткин, Г. В. Ельська

Вивчення можливості застосування гравіметричного перетворювача для створення біосенсорів

Резюме

У роботі розглянуто декілька різних підходів щодо використання гравіметричних перетворювачів на основі кристала кварцу в плані створення імунних та хемо-біосенсорів. Досліджено умови роботи п'єзокристалів у розчинах та запропоновано практичні схеми генераторів, що дозволяють працювати в середовищах з підвищеною в'язкістю. Показано переваги резонансного методу проведення гравіметричних вимірів за роботи у проточній системі. Обговорено результати, отримані при здійсненні модельних експериментів, і підтверджено перспективність розвитку даного методу для створення імуносенсорів.

S. V. Patskovsky, A. P. Soldatkin, A. V. El'skaya

Investigation on possibility of gravimetric transducer application for biosensors creation

Summary

Several different approaches using gravimetric transducers based on quartz crystal for development of immuno and chemo-biosensors are presented. Conditions for oscillation of piezocrystals in liquids are discussed and practical oscillator circuits, which ensure work in high viscosity medium are offered. The resonance method of gravimetric measurement is shown to be advantageous in solution over the widely used conventional oscillation method. The results of model experiments confirm perspectivity of this method development for immunosensors creation.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Guilbault G. G. Application of piezoelectric quartz crystal microbalances.— New York: Elsevier, 1984.—Vol. 7.—P. 8—10.
2. Janata J., Bezech A. Chemical sensors // Anal. Chem.—1988.—60.—P. 62.
3. Schierbaum K. D., Gerlach F., Haug M., Gopel W. Selective detection of organic molecules with polymer and supramolecular compounds: application of capacitance, quartz microbalance and calorimetric transducers // Sensors and Actuators A.—1992.—31.—P. 130—137.
4. Sauerbrey G. Z. Use of a quartz vibrator for weighing thin films on a microbalance // Z. Physik.—1959.—155.—P. 206—210.
5. Bruckenstein S., Shay M. Mass sensitivity of the crystal microbalance in liquid media // Electrochim. Acta.—1985.—2.—P. 295.
6. Barnes C. Development of quartz crystal oscillators for under-liquid sensing // Sensors and Actuators A.—1991.—P. 59—69.
7. Kurosawa S. et al. Resonant frequency of a piezoelectric quartz crystal in contact with solutions // Anal. chim. acta.—1993.—274.—P. 209—217.
8. Schasfoort R. B. M., Bergveld P., Kooyman R. P. H., Greve J. Possibilities and limitations of direct detection of protein charges by means of an immunological field-effect transistor // Ibid.—1990.—28.—P. 323—329.
9. Bataillard P. et al. Direct detection of immunospecies by capacitance measurements // Anal. Chem.—1988.—60.—P. 2374—2379.