

ИЗБИРАТЕЛЬНОЕ ОБНАРУЖЕНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБЪЕКТОВ В ЧУВСТВИТЕЛЬНЫХ МИКРОПОЛОСТЯХ ОПТИЧЕСКИХ СЕНСОРНЫХ СИСТЕМ

А. В. Саечников, Э. А. Чернявская, В. А. Саечников, А. Остендорф

*Белорусский государственный университет
Минск, Беларусь
e-mail: anton.saetchnikov@gmail.com*

Предложен новый подход для формирования системы оптических сенсоров высокой плотности. Разработана методика избирательного обнаружения соединений в многокомпонентных биологических образцах с использованием сенсоров высокой плотности, основанных на принципе оптического резонанса мод шепчущих галерей.

Ключевые слова: моды шепчущих галерей; оптический резонанс; сенсор; 3D-печать; функционализация.

BIOLOGICAL AGENT SELECTIVE DETECTION IN SENSITIVE MICROCAVITIES OF OPTICAL SENSOR SYSTEMS

A. V. Saetchnikov, E. A. Tcherniavskaia, V. A. Saetchnikov, A. Ostendorf

*Belarusian State University
Minsk, Belarus
Ruhr Universität Bochum
Bochum, Germany*

New approach to construct a high-density optical sensor system has been proposed. Method for agent selective detection in multi-component biological samples using high-density whispering gallery mode optical resonance sensors has been developed.

Keywords: whispering gallery mode; optical resonance; sensor; 3D printing; functionalization.

ВВЕДЕНИЕ

Оптические методы широко используются для идентификации молекул и биологических компонент. Наиболее перспективными являются детектирование компонент с использованием техники, основанной на оптическом резонансе мод шепчущих галерей (WGM) на базе замкнутых кольцевых резонаторов, изготовленных из диэлектрического материала (полимер, стекло) [1, 5], и техники, основанной на плазмонном резонансе [4, 8], позволяющем детектировать отдельные молекулы. WGM-системы позволяют фиксировать изменения концентраций биологических соединений, однако их природа должна быть известна априори, поэтому определение отдельных компонент

из многокомпонентных соединений затруднительно. Возможность применения нейронных сетей для анализа экспериментальных данных была продемонстрирована в [5]. Текущие исследования направлены на создание матричных упорядоченных сенсоров [2, 7] и их последующую функционализацию [3, 9], хотя следует отметить, что существующие методики не решают проблемы анализа многокомпонентных соединений, которая требует как создания структуры сенсоров высокой плотности, так и высокой степени индивидуализации параметров сенсоров.

МАТРИЦЫ ЧУВСТВИТЕЛЬНЫХ ЭЛЕМЕНТОВ

Для создания матрицы оптических сенсоров резонанса мод шепчущих галерей была задействована технология 3D-печати для формирования на покровном стекле полимерной структуры (рис. 1, *a*), состоящей из набора ячеек, в которые могут быть помещены и пространственно разделены оптические резонаторы [7, 9]. Размеры ячеек выбирались в соответствии с диаметром используемых сенсоров (рис. 1. *б*, *в*).

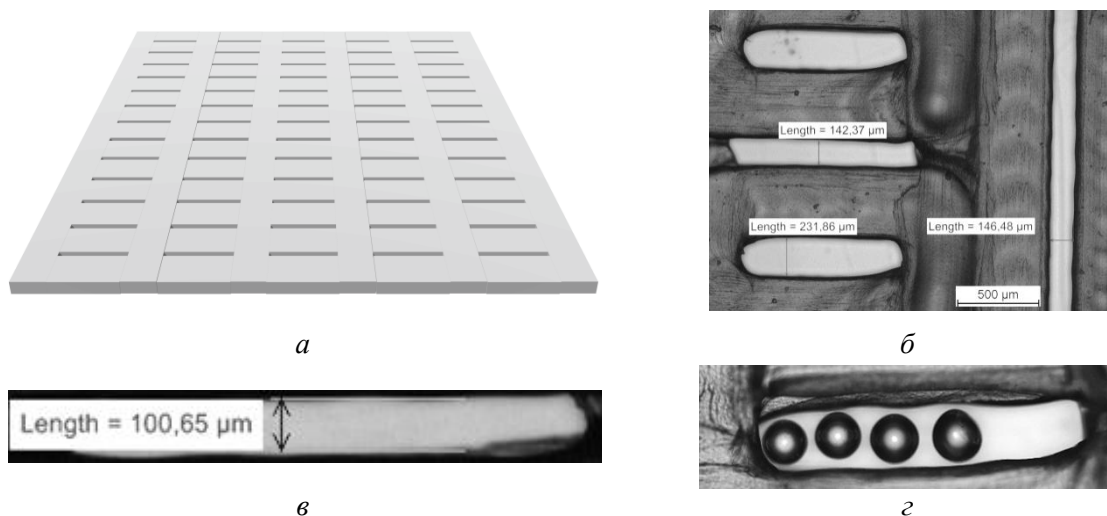


Рис. 1. Матрица чувствительных элементов: *a* – модель матрицы; *б* – структура матрицы; *в* – ячейка матрицы; *г* – сформированная ячейка чувствительных элементов (сферические резонаторы)

Ранее было показано [7], что фиксация сенсоров без тонкого слоя клеевого раствора приводит к ухудшению контакта резонатора с подложкой, дополнительному воздействию на сенсор со стороны структуры и уменьшению временной стабильности. Нами была улучшена технология нанесения слоя клея в ячейки матрицы, которая обсуждалась в предыдущих статьях [5–8]. Кварцевая трубка (fused silica tube) с наружным диаметром 120 мкм была внедрена в иглу шприца, содержащего клей. Последний соединяется с цифровым дозирующим насосом для обеспечения постоянной скорости подачи клеящего вещества. Необходимый объем клея для каждой микрополости для текущей модели структуры (рис. 1, *a*) наполняется за 5 с работы насоса со скоростью 1 мкл/мин. Положение иглы относительно структуры изменяется после заполнения одной из ячеек, далее процедура повторяется для всех остальных ячеек матрицы. Система центрифугирования использовалась для достижения равномерно тонкого слоя клея, после чего в ячейки матрицы помещались микросферы (рис. 1, *г*) и в течение последующих 12 часов происходило испарение растворителя. Параметры

центрифугирования и объем клеевого состава были экспериментально оптимизированы для обеспечения надежного долговременного соединения покровного стекла с резонаторами. Большая часть поверхности микросфер находится в контакте с исследуемым раствором и, таким образом, может реагировать на изменения в растворе.

ЭКСПЕРИМЕНТ

Мы используем микросферы, изготовленные из кварцевого стекла, которые имеют отличную временную стабильность для резонансных частот в чистой водной среде по сравнению с ПММА-резонаторами. Временная стабильность важна для дальнейшего анализа спектральных изменений, связанных с анализируемой средой.

Оптические сенсоры могут быть функционализированы различными биологическими соединениями, агентами или с помощью золотых наночастиц (плазмонное улучшение) [8]. Функционализация биологическими агентами обеспечивает избирательную функцию (только ограниченное число компонентов, представленных в смеси, может взаимодействовать с функциональными группами резонатора и тем самым изменить резонансные спектры). Плазмонное улучшение для резонаторов может быть использовано для повышения чувствительности к изменениям показателя преломления смеси [8]. Оптические резонаторы помещаются в суспензию с золотыми частицами на несколько часов для обеспечения слоя золотых наночастиц на поверхности резонатора. Более подробная информация представлена в [8].

Метод для определения параметров растворов биологических веществ на основе оптического резонанса WGM был представлен в работах [5–9]. Тем не менее необходимо отметить некоторые важные особенности. Матрица с резонаторами (могут быть предварительно функционализированы) помещается в замкнутую ячейку (fluidic cell) и располагается на призме. Ячейка первоначально заполняется де-ионизированной водой, после чего раствор биологического агента или частиц постепенно добавляется в жидкостную ячейку с помощью цифрового шприца и происходит изменение условий формирования резонанса. Свет, рассеянный микросферой после прохождения через объектив микроскопа, регистрируется камерой. Камерой выбирается представляющая интерес область (ROI), включающая микрополость матрицы для обеспечения увеличения скорости захвата и, соответственно, улучшения чувствительности. Впоследствии каждый сенсор микрополости независимо обрабатывается, как описано в [5–9].

В эксперименте используется перестраиваемый лазер, который перестраивается в диапазоне 3 нм при скорости 0,1 нм/с. Лазерный луч фокусируется на выбранную микрополость для увеличения контраста и интенсивности рассеиваемого света в условиях возбуждения резонанса. Данные параметры обеспечивают детектирование трех резонансных частот для сферических резонаторов диаметром около 100 мкм. Изменения интенсивности, вызванные перестройкой частоты лазерной генерации, записываются в автоматическом режиме.

МЕТОДИКА ИЗБИРАТЕЛЬНОГО ОБНАРУЖЕНИЯ

Ранее разработанная методика [5–8] хорошо работает для обнаружения биологических агентов, а также для детектирования изменений концентраций вещества с известной природой, но для детектирования отдельных компонент в сложных соединениях она не может быть применена. Решением данной проблемы может быть индиви-

дуализация сенсоров путем функционализации для обеспечения выборочного взаимодействия с компонентами сложных соединений.

Используемые для создания матрицы чувствительных элементов резонаторы не идентичны, поэтому обладают различной чувствительностью. Простым решением данной проблемы может быть использование нескольких ячеек матрицы для функционализации идентичным веществом с последующим анализом спектральных изменений для подтверждения успешности функционализации. Данные ячейки должны быть пространственно разделены достаточно далеко друг от друга для уменьшения влияния фонового шума. На первом этапе сохраняются исходные спектры для каждого сенсора в выбранных ячейках, которые далее используются как эталонные для измерения спектральных изменений, вызванных исследуемым веществом, для не модифицированных сенсоров.

Далее производится функционализация выбранным агентом и анализируются временные спектральные изменения, значимость которых подтверждает успешность функционализации. Спектры для каждого сенсора в идентичных ячейках сохраняются после выполнения функционализации (обычно около часа) и далее используются как эталонные для детектирования с помощью функционализированных сенсоров. Спектральные изменения для функционализированного сенсора, вызванные анализируемым веществом, должны быть сохранены.

В результате будут сформированы два набора данных: один содержит спектральные изменения для исходных резонаторов, другой – изменения для функционализированных сенсоров. Необходимо сравнить эти наборы данных для анализа взаимодействия между компонентами или анализа многокомпонентных растворов. Если спектральное изменение для исходных сенсоров (обычно неспецифическое взаимодействие, может быть принято во внимание как шум) сравнимо или более выражено, чем для функционализированных, это значит, что не существует существенного взаимодействия между известными веществами, используемыми для функционализации, и исследуемыми агентами, соединениями. Для сложных растворов это означает, что раствор не содержит компонент, которые могут взаимодействовать с веществом, использованным для функционализации. Если спектральные изменения для функционализированных сенсоров значимы, это означает, что взаимодействие существует и может быть сделано предположение о природе исследуемого агента, так как известна природа функционализирующего вещества. Предположение корректируется после анализа спектральных изменений для различно функционализированных ячеек (анализа взаимодействия с другими известными функционализирующими веществами). Спектральные данные со всех ячеек собираются в базу данных и в дальнейшем, после предварительной обработки (нормализация и стандартизация), используются как входные данные для нейронной сети [6–8]. Алгоритм предложенной методики представлен на рис. 2.

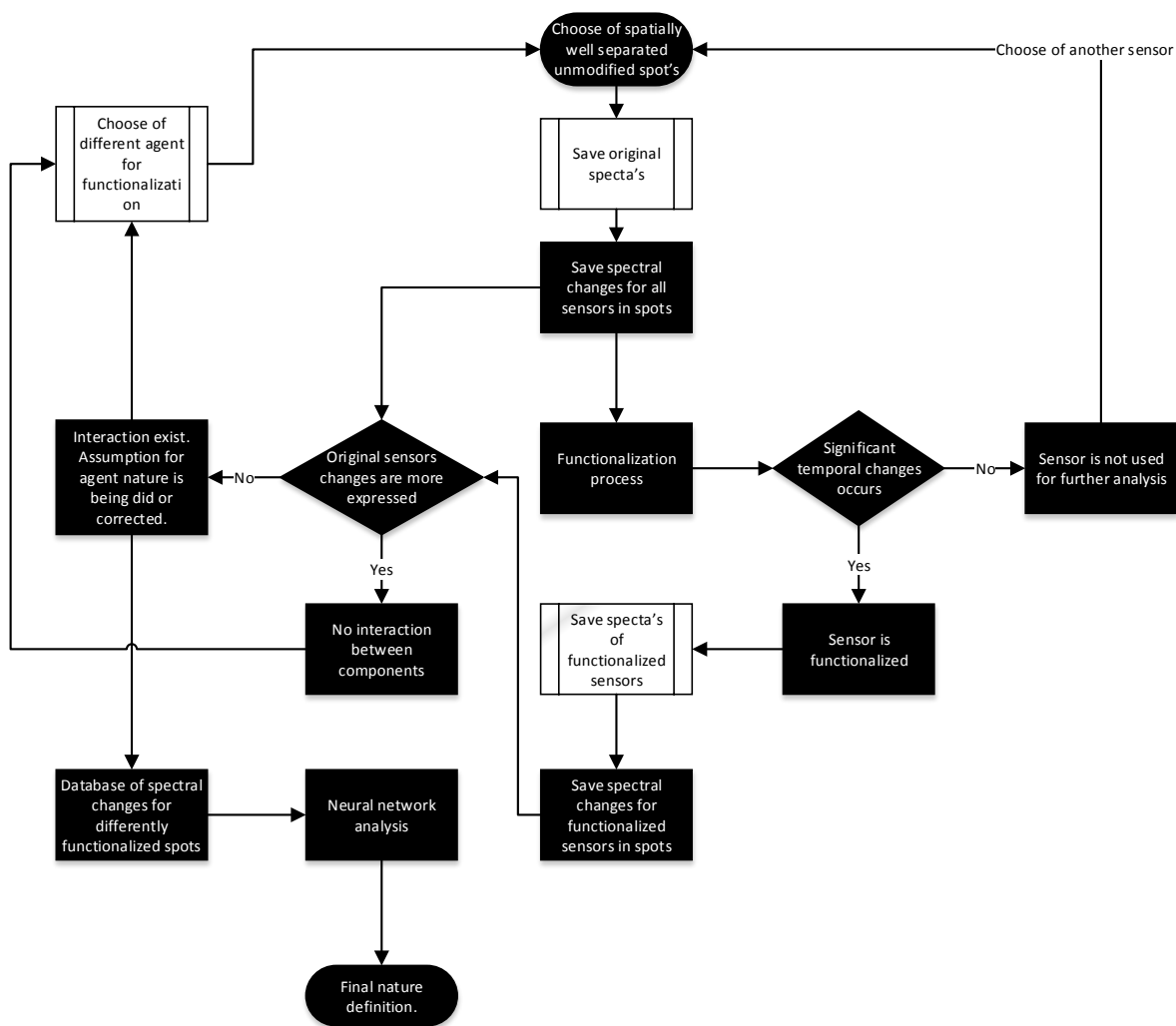


Рис. 2. Алгоритм анализа многокомпонентных соединений

Ключевые аспекты методики были протестированы с использованием связки биологических веществ биотин-стрептавидин. Функционализация стрептавидином чувствительных ячеек приводила к спектральному сдвигу в 0,28 единиц свободного спектрального интервала за 55 мин воздействия вещества. А функционализация биотином приводила к снижению эффективности возбуждения резонанса на 50 % за 67 мин воздействия. Для тестирования методики детектирования взаимодействия соединений с необработанными и функционализированными резонаторами были использованы полистирольные (PS) микросферы диаметром 0,9 мкм, обработанные стрептавидином и биотином. В результате анализа взаимодействия малых агентов с сенсорами было определено, что относительный спектральный сдвиг для функционализированных сенсоров в среднем в два раза больше, чем для исходных, что подтверждает детектирование взаимодействия между веществами.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Предложенный подход для формирования матриц оптических сенсоров резонанса мод шепчущих галерей, техника проведения эксперимента и методика анализа дан-

ных позволяют создать перспективное устройство, которое позволит обнаруживать различные компоненты и соединения в многокомпонентных растворах.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЕ ССЫЛКИ

1. Detection of Single Nanoparticles Using the Dissipative Interaction in a High-Q Microcavity / Bo-Qiang Shen [et al.] // *Phys. Rev. Applied* 2016. 5.2. P. 0240111–0240118.
2. All-polymer Whispering Gallery Mode Sensor System / A. B. Petermann [et al.] // *Opt. Express Optics Express* 2016. 24.6. P. 6052.
3. Large-Scale Parallel Surface Functionalization of Goblet-type Whispering Gallery Mode Microcavity Arrays for Biosensing Applications / Uwe Bog [et al.] // *Small* 2014. 10.19. P. 3863–3868.
4. Label-Free Detection of Single Protein Using a Nanoplasmonic-Photonic Hybrid Microcavity / V. R. Dantham [et al.] // *Nano Letters Nano Lett.* 2013. 13.7. P. 3347–3351.
5. Tcherniavskaia E. A., Saetchnikov V. A. Detection and identification of microparticles/nanoparticles and blood components using optical resonance of whispering-gallery modes in microspheres // *J. of Applied Spectroscopy*. 2010. № 77(5). P. 692–699.
6. Neural Network analysis of the resonance whispering gallery mode characteristics of biological agents / V. A. Saetchnikov [et al.] // *Nonlinear Phenomena in Complex Systems*. 2011. № 14(3). P. 253–263.
7. Array sensor: plasmonic improved optical resonance methods and instrument for biomedical diagnostics / V. A. Saetchnikov [et al.] // *Proceedings of SPIE 9540*. 2015. P. 954005.
8. Plasmon-Enhanced WGM-based biosensors for molecule detection / V. A. Saetchnikov [et al.] // *Nonlinear Phenomena in Complex Systems*. 2015. № 18(4). P. 443–455.
9. Long-term functionalization of optical resonance sensor spots / V. A. Saetchnikov [et al.] // *Proc. SPIE 9884, Nanophotonics VI 2016*. 98841T.