

На правах рукописи



ЕСИКОВА Надежда Александровна

РАЗРАБОТКА МИКРОФЛЮИДНОГО УСТРОЙСТВА С ОПТИЧЕСКИМ
ИММУНОСЕНСОРНЫМ ЭЛЕМЕНТОМ НА ОСНОВЕ
НАТРИЕВОБОРОСИЛИКАТНОГО ПОРИСТОГО СТЕКЛА

Специальность:

01.04.01 – Приборы и методы экспериментальной физики

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени

кандидата технических наук

Санкт-Петербург – 2013

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте аналитического приборостроения Российской академии наук (ИАП РАН)

Научный руководитель:

доктор технических наук, доцент, заведующий лабораторией «Информационно-измерительных био- и хемосенсорных микросистем» ИАП РАН

Евстрапов
Анатолий
Александрович

Официальные оппоненты:

доктор физико-математических наук,
ведущий научный сотрудник ФГБУ науки
Физико-технического института им. А.Ф. Иоффе РАН

Ястребов
Сергей Гурьевич

доктор химических наук, доцент, заведующая лабораторией неорганического синтеза ФГБУ науки
Ордена Трудового Красного Знамени Институт химии силикатов им. И.В. Гребенщикова РАН

Шилова
Ольга Алексеевна

Ведущая организация: ЗАО «Научные приборы».

Защита состоится 13 декабря 2013 г. в 15.00 на заседании диссертационного совета Д002.034.01 на базе ИАП РАН по адресу 198095, Санкт-Петербург, ул. Ивана Черных, д. 31/33.

С диссертацией можно ознакомиться в научно-технической библиотеке ИАП РАН по адресу: 190103, Санкт-Петербург, Рижский пр., д. 26. Отзывы на диссертацию и автореферат направлять по адресу: 190103, Санкт-Петербург, Рижский пр., д. 26.

Автореферат разослан

«__» ноября 2013 г.

Ученый секретарь диссертационного совета
доктор физико-математических наук



А.Л. Буляница

Актуальность темы

Тенденция миниатюризации в области экспресс-анализа жидких биологических проб отобразилась в развитии двух подходов, связанных с созданием микрофлюидных устройств и биочипов. К преимуществам микрофлюидных устройств (МФУ) относятся широкие возможности манипуляций с жидкой пробой.

Высокоспецифичным методом обнаружения аналита в биопробе является постановка иммунных реакций. Иммунный анализ находит широкое применение в медицине, фармакологии, мониторинге окружающей среды, пищевой промышленности. Чувствительность обнаружения при этом, в частности, зависит от условий проведения реакции и характеристик системы детектирования. Гетерогенный количественный иммунный анализ, осуществляемый на микропланшетах, характеризуется высокой чувствительностью и производительностью, но требует значительного времени для проведения анализа (для инсулина от 4,5 ч.). А множество экспресс-тестов на основе иммунной реакции рассчитаны лишь на качественный или полуколичественный анализ. Конкурентный иммунный анализ позволяет обнаружить мелкие белки и сократить длительность анализа.

Постановка конкурентного иммунного анализа на МФУ дает возможность объединить преимущества иммунного анализа (высокая специфичность) и микрофлюидики (возможность проведения отдельных стадий или всего анализа в микромасштабе на одном устройстве за счет простоты манипуляции с пробой, экспрессность и т. д.). Наиболее чувствительным и простым для реализации в таких устройствах является флуоресцентный метод детектирования иммунных комплексов.

Использование пористых структур в качестве основы сенсорного элемента позволяет дополнительно повысить чувствительность за счет увеличения площади сенсорного слоя в малом объеме. Перспективным представляется пористое стекло (ПС), основными характеристиками которого являются развитая поверхностная структура (пористость до 50%, регулируемый

размер пор), оптическая прозрачность в широком спектральном диапазоне, физическая и химическая стойкость, высокая воспроизводимость характеристик образцов внутри одной серии.

На основании вышеизложенного можно сделать вывод об актуальности разработки микрофлюидного устройства с иммуносенсором на основе пористого стекла.

Цель работы

Разработка и создание микрофлюидного устройства с интегрированным биосенсорным элементом на основе натриевоборосиликатного пористого стекла для проведения иммунного анализа.

Основные задачи

1. Исследование натриевоборосиликатных двухфазных и полученных из них пористых стекол методами оптической спектроскопии и высокоразрешающей микроскопии.

2. Обоснование и выбор метода иммобилизации белка и адаптация его для пористого стекла.

3. Разработка, изготовление и исследование микрофлюидного устройства с интегрированным биосенсорным элементом на основе натриевоборосиликатного пористого стекла.

4. Аппробация метода иммунного анализа с применением отдельно биосенсорного элемента и на микрофлюидном устройстве с интегрированным сенсорным элементом (на примере инсулина).

Научная новизна

— Впервые обнаружена немонотонная зависимость интенсивности флуоресценции биосенсорного элемента на основе натриевоборосиликатного пористого стекла SBS-МАП от соотношения концентраций антигенов и антител ($C_{\text{FITC-Ins}}/C_{\text{IgG}}$) в диапазоне концентраций $C_{\text{FITC-Ins}}=(5,8 \cdot 10^{-7} \div 2,3 \cdot 10^{-6})$ М и $C_{\text{IgG}}=(3 \cdot 10^{-8} \div 2 \cdot 10^{-7})$ М.

— На основании данных оптической спектроскопии в видимом диапазоне (коэффициент поглощения и показатель преломления) согласно

моделям эффективных сред получены оценки структурных характеристик (в частности, пористость) микро- и макропористых натриевоборосиликатных стекол (8В-МИП и 8В-МАП).

— Получены оценки размеров комплексов иммобилизованного на пористое стекло инсулина методом сканирующей ближнепольной оптической микроскопии, размер (0,4...1,3 мкм) и форма которых зависят от концентрации инсулина в растворе.

Практическая значимость

— Способ получения МФУ с интегрированным биосенсорным элементом на основе ПС для иммунного анализа позволяет оперативно изготавливать прототипы устройств со встроенными сенсорными элементами.

— Методика иммобилизации инсулина и IgG методом ковалентного связывания адаптирована для изготовления биосенсорного элемента на основе ПС SBS-МАП.

— Методологический подход к оцениванию структурных характеристик макропористых стекол 8В-МАП с высоким светопропусканием и низким релеевским светорассеянием, полученные по данным оптической спектроскопии, могут применяться для неразрушающего контроля ПС.

— Макет детектора для микрофлюидного устройства используется при проведении научно-исследовательских работ ИАП РАН (по НИР «Разработка принципов организации мультисенсорных систем и их информационного обеспечения в медико-биологических исследованиях» (2009-2012 гг) и грантам КНВШ за 2008-2013 гг).

Положения, выносимые на защиту

1. Способ изготовления биосенсорного элемента на основе пористого стекла методом иммобилизации белка (ковалентного связывания), для которого подобраны условия подготовки, активации и силанизации поверхности ПС.

2. Способ создания микрофлюидного устройства на основе биосенсорного элемента из пористого стекла и двухуровневой системы

подвода/отвода пробы к нему, реализованный в конструкции из полидиметилсилоксана.

3. Метод обнаружения содержания инсулина в 40 мкл пробы в диапазоне концентраций ($2,9 \cdot 10^{-7} \div 2,3 \cdot 10^{-6}$) М за время менее чем 2 ч при постановке конкурентного иммунного анализа на МФУ с биосенсорным элементом на основе пористого стекла.

4. Методология оценивания оптических (коэффициент поглощения, показатель преломления) и структурных (пористость, средний размер пор) характеристик пористых стекол с высоким светопропусканием ($\approx 90\%$) и низким релеевским светорассеянием при помощи моделей эффективных сред по данным оптической спектрометрии в диапазоне длин волн (360–420) нм.

Апробация работы: Основные результаты диссертации доложены на следующих международных и российских конференциях и семинарах: VIII and IX seminar on porous glasses – special glasses. PGL'2007 и PGL'2009 (Poland. Wroclaw); XVIII и XIX Менделеевских съездах по общей и прикладной химии. 2007 и 2010 гг. (г. Москва, г. Волгоград); VII и VIII международных конференциях «Прикладная оптика-2008» и «Прикладная оптика-2010» (г. Санкт-Петербург); IX Молодежной научной конференции, посвященной 60-летию Института химии силикатов РАН. 2008 (г. Санкт-Петербург); XX симпозиуме «Современная химическая физика» 2008 (г. Туапсе); «Актуальные проблемы биохимии и бионанотехнологии» II. 2011 (г. Казань); 5-й Международной научно-технической конференции «Сенсорная электроника и микросистемные технологии» (СЕМСТ-5). 2012 (Украина, г. Одесса).

Публикации: Основные результаты работы изложены в 17 печатных работах, из них 7 опубликованы в журналах, входящих в перечень ВАК.

Личный вклад автора: Автор участвовал: в постановке цели и задач исследований; в разработке методик иммобилизации белка на пористое стекло, создании микрофлюидного устройства с интегрированным сенсорным элементом; в планировании и проведении экспериментов, в том числе

постановке иммунной реакции на МФУ; анализе и интерпретации результатов. Подготовка публикаций проводилась совместно с соавторами.

Структура диссертации: Диссертация состоит из введения, двух глав, заключения, списка литературы из 89 наименований. Текст диссертации изложен на 118 страницах, содержит 39 рисунков и 4 таблицы.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Диссертация состоит из введения, обзора литературы (глава 1), экспериментальной части (глава 2), выводов и списка использованной литературы.

Во введении обоснована актуальность темы диссертации, сформулированы цель и задачи исследования, научная новизна и практическая значимость результатов выполненной работы, перечислены научные положения, выносимые на защиту.

Глава 1 представляет собой литературный обзор, посвященный микрофлюидным аналитическим системам и сенсорным элементам для них. Описаны используемые для микрофлюидных устройств материалы и методы их изготовления. Введено понятие микрофлюидных платформ и их классификация. Рассмотрены варианты постановки и детектирования иммунных реакций на чипе. Приведен краткий обзор методов иммобилизации белка на стеклянную поверхность. Для создания сенсорного элемента на основе ПС выбран метод ковалентного связывания антитела с поверхностью.

Описан метод изготовления, приведена классификация и примеры применения пористых структур. Рассмотрены модели эффективной среды (стопы, Лоренц-Лоренца, Бруггемана – для ПС с высоким светопропусканием) позволяющие оценить оптические и структурные характеристики дисперсных сред по данным оптической спектрометрии. Для ПС с высоким диффузным светорассеянием используется четырехпоточковая модель и функция Гуревича-Кубельки-Мунка (ГКМ).

В **заключении** сделан вывод о целесообразности разработки биосенсорной системы на микрочиповой платформе для постановки конкурентного

иммунного анализа на ПС с флуоресцентным детектированием; поставлена цель и сформулированы задачи работы.

В главе 2 приведены результаты экспериментальных исследований. Раздел 2.1 посвящен изложению принципа работы сенсорного элемента, методу иммобилизации белка, описанию исследуемых образцов и оборудования (штатного и оригинальных разработанных макетов). Принцип работы сенсорного элемента основан на постановке конкурентной иммунной реакции:



где IgG – иммобилизованный на ПС иммуноглобулин G, Ins – инсулин, FITC-Ins – меченый изотиоцианатом флуоресцеина инсулин, (IgG-Ins-FITC) и (IgG-Ins) – образующиеся в ходе реакции меченый и немеченый иммунные комплексы.

Иммобилизация белка проводится в 4 стадии: активация поверхности 0.5М NaOH, силанизация APTES (3-аминопропилтриэтоксисилан), обработка глутаральдегидом и, собственно, иммобилизация белка.

В работе использовались образцы ПС в виде пластин 8x8 мм толщиной 0,5 мм полученные из стекла 8В и ДВ-1Ш (или SBS). Рассмотрены ПС двух типов обработки: при выщелачивании двухфазного стекла получают ПС типа МИП, их дальнейшая щелочная проработка приводит к образованию стеклокерамики типа МАП. Образцы ПС разработаны, изготовлены и охарактеризованы методом БЭТ в ФГБУ науки ИХС РАН. Средний диаметр пор ПС SBS-МИП - 5,1 нм, SBS-МАП – 490 нм, 8В-МИП - 2.4 нм, 8В-МАП – 34 нм.

Для исследования образцов использовалось стандартное оборудование, детектирование результатов проведения иммунной реакции проводилось на специально созданных макетах (макет 1 и макет 2). Макет 1 предназначен для измерения спектров флуоресценции (465÷800 нм) образцов в проходящем, отраженном или рассеянном свете. Он состоит из лазера DPBL-9010F (Photop Suwtech Inc, Китай) с длиной волны излучения 473 нм, столика для позиционирования образца, рамановского акусто-оптического спектрометра

РАОС-1 (НТЦ уникального приборостроения РАН, Россия) и волоконно-оптической системы, позволяющей изменять угол регистрации отраженного света в пределах от 5 до 180°. Макет 2 разработан и создан для детектирования результатов иммунной реакции на ПС или в МФУ. Источником излучения является сверхъяркий светодиод (Luxeon Star B, Philips Lumileds Lighting Company) мощностью (1÷3) Вт с максимумом излучения на длине волны 470 нм. МФУ или сенсорный элемент позиционируется на столике для фиксации. Для фокусировки возбуждающего излучения используется оптическая система. Выделение длин волн возбуждения ($\lambda=480$ нм) и детектирования флуоресценции ($\lambda=520$ нм) достигается при помощи светофильтров. Сигнал регистрируется лавинным фотодиодом С5460-01 (Hamamatsu, Япония).

Раздел 2.2 посвящен изучению оптических и структурных характеристик ПС. Обсуждено влияние сорбированной в поры воды на спектральные свойства ПС в ближнем ИК диапазоне длин волн, приведены спектры интенсивности флуоресценции исходных образцов. ПС можно условно разделить на образцы с высоким светопропусканием (из двухфазного стекла 8В) и с высоким диффузным рассеянием (из ДВ-1Ш). Для первых, в диапазоне преобладания релеевского рассеяния, можно провести оценку оптических и структурных характеристик по данным оптической спектрометрии, используя известные модели эффективной среды. Поэтому особое внимание уделяется определению этого спектрального диапазона для различных типов стекол. Диапазон преобладания релеевского рассеяния для ПС, полученных из 8В, составил (360÷420 нм). Для ПС 8Б-МИП наблюдается два участка (250÷280) нм и (350÷420) нм. Это, вероятно, связано с тем, что при изготовлении кремнезем удален из пор каркаса не полностью и образует вторичную структуру, т.е. имеются по крайней мере два характерных размера рассеивающих объектов.

Рассмотрены модели эффективной среды: 1) модель стопы, 2) Бруггемана и 3) Лоренц-Лоренца. В модели Лоренц-Лоренца не учитывается вклад наполнителя пор (пористой структуры, образованной вторичным кремнеземом).

В модели стопы структура представлена набором слоев плотно упакованных частиц или пор; учтены поглощение и отражение от границы раздела. Модель Бруггемана описывает пористую среду со сферическими пересекающимися между собой порами, а модель Лоренц-Лоренца - гетерогенную систему одинаковых сферических частиц. В данных моделях поглощение среды считается пренебрежимо малым. За показатель преломления матрицы при оценке показателя преломления ПС (рис. 1) по моделям Бруггемана и Лоренц-

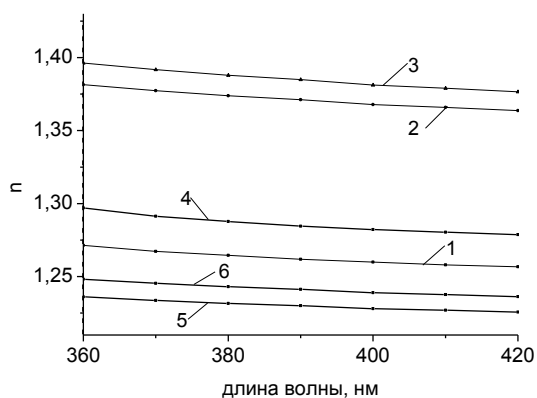


Рисунок 1. Дисперсия показателя преломления для ПС 8Б-МИП (1, 2, 3) и 8Б-МАП (4, 5, 6), 1, 4 – модель стопы; 2, 5 – модель Лоренц-Лоренца; 3, 6 – модель Бруггемана

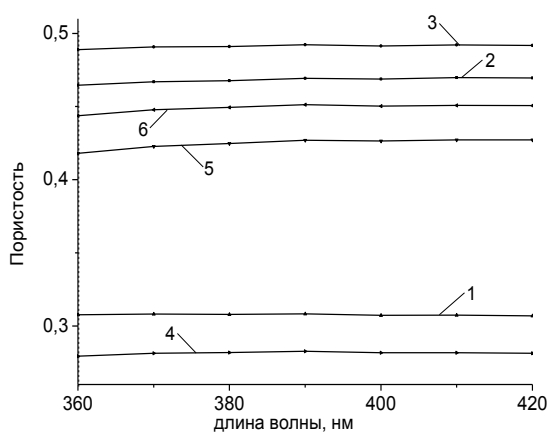


Рисунок 2. Оценки пористости для ПС 8Б-МИП (1-3) и 8Б-МАП (4-6): модель стопы (1,4), Лоренц-Лоренца (2,5) и Бруггемана (3,6).

Лоренца взят показатель преломления исходного двухфазного стекла (определенный по модели стопы).

Пользуясь оценками показателя преломления и коэффициента поглощения можно вычислить средний объем и количество пор (а также пористость). Оценки пористости приведены на рис. 2.

Для микропористых стекол применима модель стопы, а полученные оценки показателя преломления для 8Б-МИП находятся в интервале (1,271÷1,257). Для макропористых стекол 8Б-МАП наиболее подходит модель Бруггемана, оценка показателя преломления по которой составляет (1,236÷1,248), а пористости (47-49%), что несколько ниже, чем согласно методу БЭТ (53%).

Для ПС с высоким диффузным

светорассеянием SBS-МИП и SBS-МАП определена функция Гуревича-Кубельки-Мунка (ГКМ), минимум которой для ПС МИП лежит в диапазоне 520÷540 нм, для ПС МАП – в диапазоне 580÷600 нм. В этих спектральных диапазонах можно пренебречь поглощением матрицы.

Раздел 2.3 посвящен разработке сенсорного элемента на основе ПС. В предположении пренебрежимо низкого светопоглощения ПС по сравнению с FITC, проведена оценка диапазона детектирования флуоресцентной метки, сорбированной в ПС (концентрации меченого белка). Наибольшей чувствительности обнаружения FITC в ПС SBS-700-МАП толщиной 0,5 мм можно достичь в диапазоне концентраций 10^{-5} ÷ 10^{-3} моль.

Проведена адаптация метода иммобилизации белка для ПС. Исследованы разные режимы сушки образцов между стадиями активации поверхности и силанизации при использовании двух видов растворителей для (3-аминопропила)триэтоксисилана (APTES) (толуол и ацетон). На примере иммобилизации инсулина на ПС 8В-МАП выбран режим сушки 3ч. при 100°C; в качестве растворителя силана - ацетон.

Рассмотрено влияние концентрации раствора белка на его иммобилизацию на примере ковалентного связывания FITC-Ins с поверхностью ПС 8В-МАП.

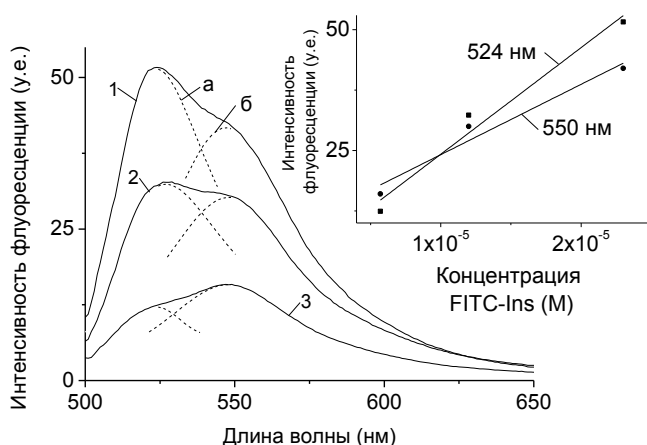


Рисунок 3. Спектральные зависимости интенсивности флуоресценции ПС 8В-МАП после иммобилизации FITC-Ins из раствора концентрации 1 – $2,3 \cdot 10^{-5}$ М, 2 - $1,2 \cdot 10^{-5}$ М, 3 - $5,8 \cdot 10^{-6}$ М.

При изучении зависимости интенсивности флуоресценции образца от концентрации раствора иммобилизуемого белка (рис. 3) выявлены пики флуоресценции FITC на длине волны 524 нм (а) и глутаральдегида на 550 нм (б).

Изображения поверхности исследуемых образцов, полученные методом сканирующей ближнепольной

оптической микроскопии (СБОМ) в поперечно-силовом режиме показали, что при низкой концентрации раствора белка ($5,8 \cdot 10^{-6} \text{M}$) для иммобилизации образуется множество хаотично расположенных комплексов FITC-Ins размером (0,8...1,3) мкм и конгломератов из них. Повышение концентрации до $1,2 \cdot 10^{-5} \text{M}$ приводит к большему количеству мелких комплексов размером (0,4...0,6) мкм. При дальнейшем увеличении концентрации до $2,3 \cdot 10^{-5} \text{M}$ наблюдается укрупнение структур. Т.о. проявляется свойство белка формировать на поверхности стекол комплексы различных размеров. Возможно, это связано с неоднородным распределением зарядов на поверхности ПС.

Изучены спектральные зависимости флуоресценции образцов двухфазных стекол 8В и ДВ-1Ш, а также стекла К8, после иммобилизации меченого белка, показавшие, что в процессе обработки двухфазных стекол происходит вымывание нестойкой фазы и образование развитой поверхности. Уровень

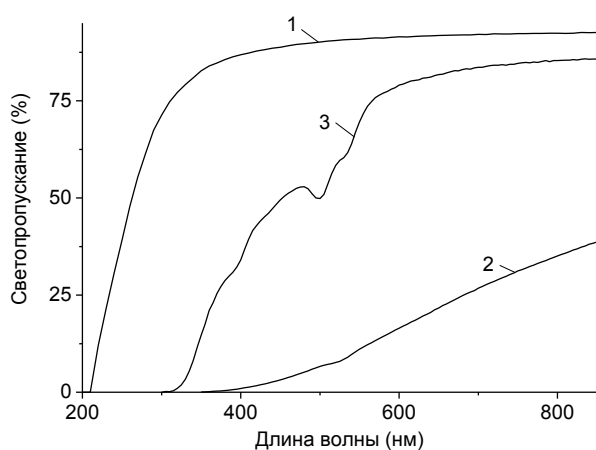


Рисунок 4. Спектральные зависимости пропускания ПС 8В-МАП: 1 – исходный образец, 2 – после иммобилизации IgG, 3 – после проведения иммунной реакции.

интенсивности флуоресценции двухфазного стекла ДВ-1Ш позволяет сделать вывод о его пригодности для создания сенсорных элементов.

Результаты измерений светопропускания ПС 8В-МАП приведены на рис. 4: 1 - исходного образца; 2 - ПС с иммобилизованным IgG; 3 - после проведения иммунной реакции. На спектральной

зависимости наблюдается полоса поглощения флуоресцеина с максимумом на 495 нм, что свидетельствует о факте образования иммунных комплексов. Иммобилизация IgG ведет к значительному снижению пропускания ПС, однако после проведения иммунной реакции светопропускание возрастает на ~45 %, что позволяет выдвинуть гипотезу о том, что образующийся в результате

реакции иммунный комплекс оптически более однороден и имеет меньшее светорассеяние, чем слой иммобилизованного IgG. Это также подтверждается данными со СБОМ: в режиме силовой микроскопии на образце 8В-МАП с иммобилизованным инсулином визуализированы отдельные частицы и группы частиц со средним радиусом 0.6 мкм. После проведения иммунной реакции на поверхности образца наблюдаются частицы более крупных размеров (от 2 до 5 мкм). В режиме отраженного света, кроме образовавшихся частиц, проявляется оптически неоднородная поверхностная структура. Такой эффект может быть обусловлен образованием на поверхности образца относительно равномерной пленки с более крупными элементами, чем поры самого стекла.

В связи с тем, что IgG представляет собой Y-образную молекулу размером примерно $(7 \times 10 \times 2) \text{ нм}^3$, а размеры пор стекла 8В-МАП и SBS-МАП составляют 34 и 490 нм соответственно, белок не может занять все активные сайты поверхности. Это приводит к неспецифичному связыванию более мелких белков с поверхностью ПС при анализе. Для устранения этого эффекта часто используется бычий сывороточный альбумин (БСА), не взаимодействующий с инсулином, но блокирующий его доступ к поверхности стекла. Поэтому для постановки конкурентной иммунной реакции и обнаружении более низких концентраций инсулина созданы образцы: 1) с иммобилизованным IgG и 2) с IgG и БСА. Это позволило продемонстрировать принципиальную возможность создания сенсорных элементов на основе ПС для конкурентного иммунного анализа. Однако, в некоторых случаях наблюдалась немонотонная зависимость интенсивности флуоресценции от концентрации пробы.

Проведено исследование равномерности иммобилизации белков на ПС методом атомно-силовой микроскопии (АСМ) в полуконтактном режиме. Измерена топология поверхности исходного образца, образцов на разных стадиях иммобилизации IgG и после проведения иммунной реакции. Полученные данные свидетельствуют об образовании достаточно равномерного сенсорного слоя на поверхности ПС.

Раздел 2.4 посвящен исследованию влияния концентраций белков (IgG, FITC-Ins, БСА) на интенсивность флуоресценции образца, теоретической оценке необходимых концентраций, оптимизации сенсорных элементов и постановке анализа на МФУ.

Предложен способ представления результатов измерений аналитического сигнала, заключающийся в построении зависимости интенсивности флуоресценции на длине волны 524 нм от соотношения концентраций FITC-Ins к IgG ($C_{\text{FITC-Ins}}/C_{\text{IgG}}$). При таком подходе все полученные зависимости приобретают единообразный вид (рис. 5). Зависимости не монотонны, имеют локальные экстремумы, что, вероятно, связано со сложными процессами взаимодействия инсулина с IgG и его иммобилизацией на оставшиеся свободными активные сайты поверхности стекла.

Результаты теоретической оценки количества активных сайтов на поверхности ПС ($162 \cdot 10^{15}$ для SBS-МАП) и количества молекул IgG, которое

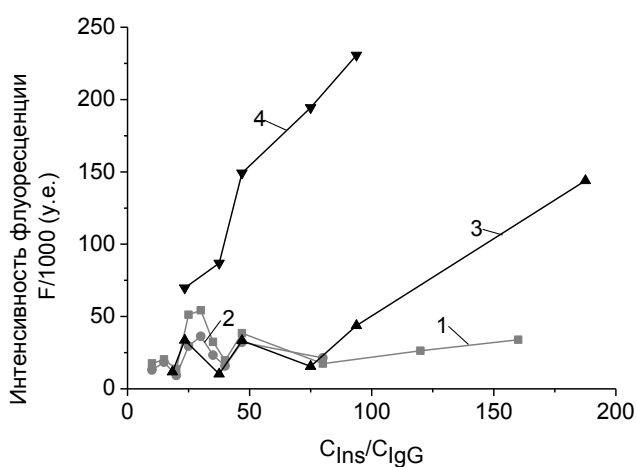


Рисунок 5. Зависимость интенсивности флуоресценции на длине волны 524 нм от соотношения концентраций белков

$C_{\text{FITC-Ins}}/C_{\text{IgG}}$. 1 - $C_{\text{FITC-Ins}}=4,6 \cdot 10^{-6}\text{M}$,
 C_{IgG} - переменная, 2 - $C_{\text{FITC-Ins}}=2,3 \cdot 10^{-6}\text{M}$,
 C_{IgG} - переменная, 3 - $C_{\text{IgG}}=3,1 \cdot 10^{-9}\text{M}$,
 $C_{\text{FITC-Ins}}$ - переменная, 4 - $C_{\text{IgG}}=4,6 \cdot 10^{-7}\text{M}$,
 $C_{\text{FITC-Ins}}$ - переменная.

может на них иммобилизоваться при учете Y-образной структуры и размера белка ($4,6 \cdot 10^{15}$ молекул) показали необходимость иммобилизации еще $157,4 \cdot 10^{15}$ мелких молекул (или 17,9 мг БСА на образец ПС) для исключения взаимодействия инсулина с поверхностью стекла при проведении реакции (обеспечения специфичности анализа). Экспериментальные исследования показали, что применение (22÷25) мг/мл БСА при объеме раствора 1 мл на образец позволяет получить монотонную

зависимость аналитического сигнала от концентрации аналита. Продемонстрирована возможность обнаружения инсулина концентрацией $(2,8 \cdot 10^{-7} \div 1,2 \cdot 10^{-6})$ М в 600 мкл реакционной смеси при детектировании на созданных макетах. Коэффициент вариации измерений составил $(0,5 \div 2,5)\%$.

В иммуноферментном анализе (ИФА) основной вклад в длительность анализа вносят стадии инкубирования: для иммобилизации белка, для протекания иммунной реакции с аналитом и для связывания с меченым вторичным антителом. Исследовано влияние длительности проведения иммунной реакции на величину аналитического сигнала, позволившее снизить время инкубирования до 30 мин. Поскольку сенсорный слой иммобилизуется на ПС заранее, а постановка конкурентной иммунной реакции исключает стадию связывания с меткой, то общее время анализа удалось снизить до 1 ч. 40 минут.

Исследования иммобилизации белка на ПС, изучение принципиальной возможности получения сенсорного элемента на основе ПС и оптимизация длительности анализа были проведены на сенсорных элементах в статическом режиме. При постановке иммунного анализа на МФУ применялась следующая последовательность операций: резервуар с верхней стороны сенсорного элемента заполнялся пробой, через 5 минут резервуар с другой (нижней) стороны сенсорного элемента заполнялся буферным раствором. Далее МФУ помещалось в термостат и выдерживалось при температуре 37°C в течение 30 мин., при этом проба в верхнем резервуаре находилась в статическом режиме, а через нижнюю часть устройства непрерывно подавался буферный раствор. После проведения иммунной реакции обе камеры промывались буферным раствором и проводились измерения интенсивности флуоресценции сенсорного элемента непосредственно в устройстве.

На рис. 6 представлена градуировочная зависимость, полученная при обнаружении инсулина в диапазоне концентраций ($5,7 \cdot 10^{-7} \div 2,3 \cdot 10^{-6}$) М в 20 мкл исходной пробы или ($2,9 \cdot 10^{-7} \div 1,2 \cdot 10^{-6}$) М в 40 мкл реакционной смеси за 1 ч. 40 мин. на макете 1 при концентрации $C_{\text{FITC-Ins}} = 4,6 \cdot 10^{-5}$ М. Зависимость аппроксимируется функцией $F = F_0 + A(1 - e^{-C/C_0})$, где $F_0 = 16111$ у.е. - интенсивность флуоресценции при отсутствии инсулина в пробе (величина фонового сигнала), C - концентрация аналита, $C_0 = 1,25 \cdot 10^{-6}$ М - характерная концентрация инсулина, $A = 8500$. Коэффициент корреляции между экспериментальными значениями и аппроксимацией составляет 0,9994. При $C \ll C_0$ зависимость близка к линейной, коэффициент чувствительности равняется A/C_0 ; при $C \gg C_0$ происходит насыщение. Аналогичные зависимости также были получены для концентрации $C_{\text{FITC-Ins}} = 4,6 \cdot 10^{-6}$ М по 10 образцам.

Раздел 2.5 посвящен разработке и созданию микрофлюидного устройства (рис. 7) для проведения иммунного анализа. Материалом для МФУ выбран полидиметилсилоксан (Sylgard-184, Dow Corning). Конструкция приспособления для отливки деталей, состоящая из мастер-формы для создания

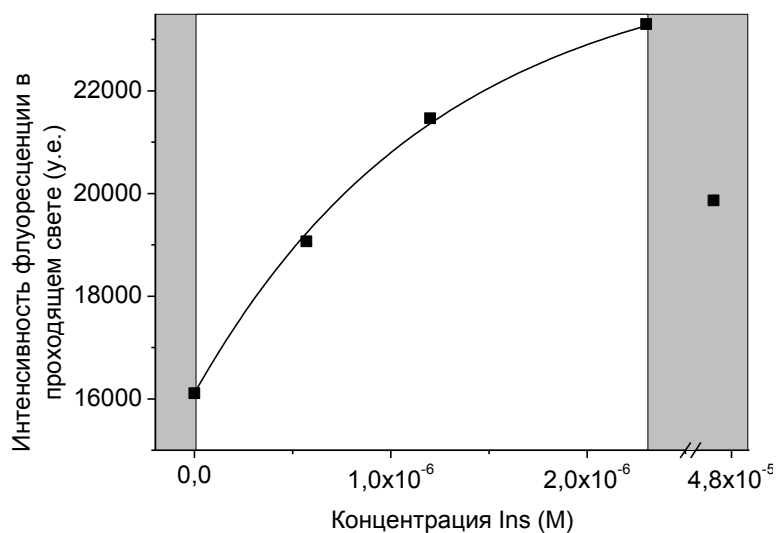


Рисунок 6. Градуировочная зависимость для обнаружения инсулина на МФУ. $C_{\text{FITC-Ins}} = 4,6 \cdot 10^{-5}$ М

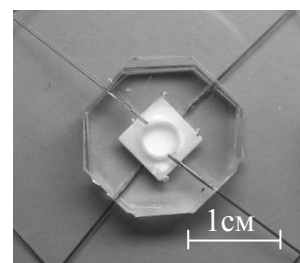


Рисунок 7. Изображение прототипа МФУ

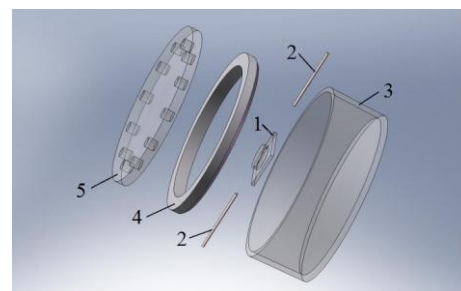


Рисунок 8. Конструкция устройства для отливки деталей МФУ из ПДМС

резервуара (1), проволоки для формирования подводящих каналов (2), чашки Петри (3), кольца, фиксирующего высоту детали (4) и крышки для формирования плоской поверхности (5), приведена на рис. 8. Интегрирование сенсорного элемента производилось при помощи более вязкого силикона Т4 (ООО «Пента Север»). Для соединения отвержденных деталей использовался полидиметилсилоксан.

В работе показана возможность создания по крайней мере четырех независимых сенсорных областей на одном образце размером (8x8) мм путем герметичного соединения ПС и пластины из ПДМС с заранее сформированными лунками диаметром 1,3 и 2,5 мм (методом «мягкой литографии»). Полученные данные позволяют организовать проведение параллельных анализов и повысить их точность, введя положительный и/или отрицательный контроль.

В **заключении** представлены основные результаты работы и выводы.

Основные результаты и выводы

1. Определены оценки структурных (пористость, средний размер пор) характеристик пористых стекол с высоким светопропусканием ($\approx 90\%$) и низким релеевским светорассеянием на основании данных оптической спектрометрии в диапазоне длин волн (360÷420) нм при использовании моделей эффективной среды, что дает возможность проводить неразрушающий контроль и оценку пористости ПС. Оценки коррелируют с данными, полученными методом БЭТ.

2. Осуществлена адаптация метода и условий иммобилизации белка (иммуноглобулина G, инсулина) для пористого стекла SBS-700/48-МАП методом ковалентного связывания с целью формирования чувствительного слоя и создания сенсорного элемента. Подобраны временные и температурные условия для активации поверхности ПС; выбран растворитель для силанизации АРТЕS, что позволило создать равномерный чувствительный слой для проведения иммунной реакции.

3. Выявлена немонотонная зависимость интенсивности флуоресценции образца биосенсорного элемента размером (8x8x0,5) мм после проведения

иммунной реакции от соотношения концентраций $C_{\text{FITC-Ins}}/C_{\text{IgG}}$, имеющая несколько экстремумов. Выбрана концентрация БСА (22мг/образец), обеспечивающая блокирование активных сайтов поверхности ПС, оставшихся свободными после иммобилизации IgG, что позволило получить монотонную зависимость аналитического сигнала, необходимую для количественной оценки результатов иммунного анализа.

4. Разработаны и изготовлены методом «мягкой литографии» (отливки из полидиметилсилоксана) герметичные прототипы МФУ, представляющие собой двухуровневую систему подвода/отвода пробы и реagens к интегрированному в устройство биосенсорному элементу, позволяющие проводить иммунный анализ проб объемом до 40 мкл.

5. Продемонстрирована возможность обнаружения инсулина в диапазоне концентраций $2,9 \cdot 10^{-7} \div 1,2 \cdot 10^{-6}$ М менее чем за 2 ч на созданных прототипах МФУ. Предел обнаружения и чувствительность анализа могут быть изменены под конкретные диагностические цели путем подбора концентрации белков при создании чувствительного слоя.

6. Разработан и создан макет детектора для МФУ, позволяющий проводить измерения люминесценции в отраженном или проходящем свете. Показания детектора коррелируют с результатами измерений на стандартном оборудовании.

Благодарности:

Автор выражает благодарность научному руководителю д.т.н. Евстрапову А.А. за помощь в планировании работ и обсуждении полученных данных; д. хим. н. Антроповой Т.В. (ИХС РАН им. И.В. Гребенщикова) за предоставление образцов ПС, оценки их характеристик методом БЭТ и консультации по вопросам, связанным с поведением пористых стекол в различных условиях; ведущему инженеру Цымбалову А.И. за консультации и изготовление деталей макетов и составу лаборатории 232 ИАП РАН.

Основные результаты диссертации опубликованы в работах:

1. Evstrapov A.A., **Esikova N.A.**, Antropova T.V. Spectral characteristics and structure of porous glasses // *Optica Applicata*. 2005. V.35, № 4, p.753-760.
2. **Есикова Н.А.** Пористые стекла как функциональный элемент микрофлюидных чипов // *Научно-технический вестник СПбГУ ИТМО*. 2006. №26; С.303-311.
3. **Есикова Н.А.** Оптические свойства пористых стекол // *Научно-технический вестник СПбГУ ИТМО*. 2007. №37, С.109-117.
4. Evstrapov A.A., **Esikova N.A.**, Rudnitskaja G.E., Antropova T.V. Application of porous glasses in microfluidic devices // *Optica Applicata*. 2008. V.38, №1, P. 31 - 38.
5. Евстрапов А.А., **Есикова Н.А.**, Антропова Т.В. Исследование пористых стекол методами оптической спектроскопии // *Оптический журнал*. 2008. Т.75, №4, С. 71-77.
6. Evstrapov A., **Esikova N.**, Rudnitskaja G., Antropova T., Porous glasses as sensor elements for microfluidic chips // *Optica Applicata* 2010. V.40, №2, P.333-340.
7. Евстрапов А.А., **Есикова Н.А.**, Рудницкая Г.Е., Антропова Т.В., Анфимова И.Н. Разработка оптического сенсорного элемента для микрофлюидных чипов на основе натриевоборосиликатного пористого стекла // *Научное приборостроение*. 2010. Т.20, №1. С. 52-58.
8. **Есикова Н.А.**, Евстрапов А.А., Рудницкая Г.Е., Антропова Т.В. Оптический биосенсорный элемент для микрофлюидных устройств на основе пористых стекол // Тезисы докладов 5-ой Международной научно-технической конференции «Сенсорная электроника и микросистемные технологии» (СЕМСТ-5), Украина, Одесса, 4-8 июня 2012 г. – С.85.
9. Разработка принципов организации мультисенсорных систем и их информационного обеспечения в медико-биологических исследованиях: отчет о НИР / Кисляков Ю.Я., Евстрапов А.А., **Есикова Н.А.**, Титов Ю.А. и др. – СПб: ИАП РАН, 2013. – 58 с.