

УДК 541.33:541.226

ИЗМЕРЕНИЕ СИЛЫ РАЗРЫВА СВЯЗИ С ПОМОЩЬЮ КВАРЦЕВОГО РЕЗОНАТОРА**Ф.Н. Дульцев***Институт физики полупроводников им. А.В. Ржанова СО РАН, e-mail: fdultsev@thermo.isp.nsc.ru**Статья поступила 28 июня 2011 г.**С доработки — 3 октября 2011 г.*

В работе рассмотрены методы измерения силы разрыва связи. Предлагается использовать кварцевый резонатор не просто как сенсор, а как активный элемент. При плавном нарастании амплитуды колебаний поверхности кварцевого АТ-резонатора (сканировании явлений отрыва) частица, прикрепленная к поверхности кварца, будет отрываться за счет инерционных сил, из значения которых легко получить силу разрыва связи. Данная методика позволяет с уверенностью измерять силу разрыва величиной порядка 10 пН. Так же, как и метод атомно-силовой микроскопии, сканирование явлений отрыва не использует электромагнитного излучения, но имеет более простое аппаратное исполнение. Процесс сканирования требует минимальной пробоподготовки, может осуществляться в разных средах (в вакууме, на воздухе, в жидкости), занимает лишь несколько минут.

Ключевые слова: кварцевые микровесы, сила разрыва связи.

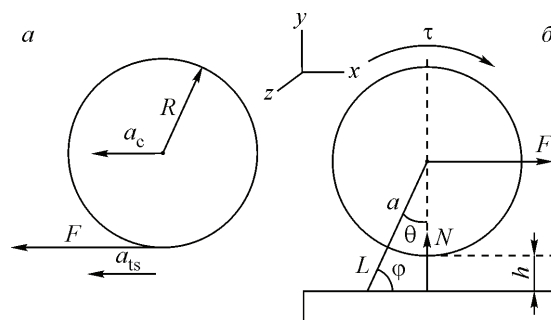
ВВЕДЕНИЕ

Какова сила связи между двумя молекулами или атомами? Такие вопросы появляются при изучении структуры и свойств молекул. Взаимодействие между атомами или молекулами является ключевым вопросом при рассмотрении динамики взаимодействий как на молекулярном уровне, так и в системе рецептор—агент (адсорбент—адсорбат), в том числе и в биологических системах. Эти взаимодействия традиционно рассматривались с применением термодинамического подхода. Но разрыв связей, возникающих при таких взаимодействиях, является динамическим процессом и поэтому зависит не только от химического сродства, но также и от скорости изменения силы, приложенной к взаимодействующим молекулам [1, 2]. В последние годы развиваются различные способы измерения сил связывания между молекулами. Разработаны различные приборы для исследования поверхности: "оптический пинцет" [3], атомно-силовой микроскоп (АСМ). Наибольшее применение получил АСМ, позволяющий проводить измерения при захвате и отрыве отдельной частицы [4—9].

Процессы образования и разрыва связей частицы с поверхностью исследуются уже много десятилетий. Именно непосредственные данные о силе связывания могут однозначно охарактеризовать процесс адсорбции на исследуемой поверхности. Традиционный подход заключается в воздействии (обычно электромагнитном) на систему, при этом ответ системы детектируется и расшифровывается (техника "импульс—отклик" с применением коротких световых импульсов). Проблема фундаментальной важности при этом — уменьшить возмущение изучаемой системы при сохранении информационного содержания ответа системы на воздействие. Уменьшить возмущение можно, исключив электромагнитное воздействие, например, для разрыва связи использовать механическое воздействие. Такая возможность была реализована с появлением метода АСМ. Первые работы по непосредственному измерению сил взаимодействий для случая водородных связей появились в 1992 г. [10].

Развитие этих исследований описано в работах [11—14]. Во всех этих исследованиях поверхность с прикрепленными частицами изучали при помощи метода АСМ. Были измерены силы связывания при специфических молекулярных взаимодействиях (от 10^{-11} до 10^{-9} Н), соответствующие энергии связи лежат в диапазоне от 1 до 500 кДж/моль. Промежуточным итогом многолетних исследований возможности непосредственного измерения силы одной связи частицы с поверхностью явилась работа [14]. Результат был достигнут благодаря развитию наноразмерных манипуляторов, или кантилеверов. Эта техника позволяет механически с высокой чувствительностью конвертировать процессы отрыва частиц в химических или биологических процессах в детектируемый сигнал. Наноразмерные кантилеверы используются как сенсоры на основе сил отрыва для изучения топографии поверхности [15]. Поверхность образца сканируется по параллельным линиям при помощи остроконечного кантилевера. Наконечник либо находится в постоянном контакте с поверхностью, либо осциллирует, касаясь поверхности лишь на короткое время. Возможности метода расширились при использовании массива кантилеверов с наконечниками, покрытыми чувствительным слоем для молекулярного распознавания. Такое устройство является чувствительным наномеханическим сенсором для детектирования химических и биологических реакций как в газовой фазе, так и в жидкости [16—22]. В газовой фазе такое устройство может использоваться как искусственный нос для детектирования летучих соединений [23—25], в жидкости — для молекулярного распознавания (взаимодействия антитело—антиген) [26—28]. В последние годы эта техника развивается и активно применяется для детектирования летучих соединений (в частности, НФ, растворителей) при помощи микрокантилеверов, работающих в статическом режиме [29—31], а также при помощи пьезорезистивных кантилеверов [32—34], в биохимических исследованиях, например, в качестве сенсора на глюкозу [35, 36]. Разрабатывается теория молекулярной адсорбции на кантилеверах [37, 38]. Техника кантилеверов позволяет изучать процессы физической и химической адсорбции, а также, например, определять изменения энтальпии при фазовых переходах. Авторы [39] развивают применение этой техники в биохимических исследованиях и в медицинской диагностике. Ближайшая цель — оптимизировать кантилеверы как сенсоры для наномеханического детектирования отдельных молекул. Применение этой техники сдерживается сложностью производства и высокой стоимостью таких прецизионных устройств, а также малым сроком службы с необходимостью регенерации. Предложенный нами метод [40], основанный на применении кварцевых резонаторов, имеет более простое аппаратное исполнение, но, тем не менее, позволяет получать достоверные данные о силе разрыва связи. Так же, как и метод атомно-силовой микроскопии, сканирование явлений отрыва не использует электромагнитного излучения. Этот метод регистрирует возбуждение колебаний, вызванное разрывом связей между частицей и подложкой. В отличие от обычных способов применения кварцевого резонатора (например, в качестве микровесов или резонансного сенсора в биохимии), в нашем методе кварцевый резонатор не только используется как сенсор, но и играет активную роль по отношению к прикрепленным к его поверхности частицам. Пьезоэлектрические свойства кварцевого резонатора позволяют детектировать возбуждение колебаний подложки, вызванных разрывом связи. Эти колебания конвертируются в электрический сигнал. Сигнал указывает не только на присутствие аналита (детектируемых частиц), но и на их количество, а также на их сродство к рецептору, прикрепленному к поверхности. Процесс сканирования требует минимальной пробоподготовки, может осуществляться в разных средах (в вакууме, на воздухе, в жидкости), занимает лишь несколько минут. Метод применим для измерения силы связи, поскольку частицы на поверхности резонатора, связанные с детектируемым аналитом, образуют схему усилителя. Чтобы метод стал рабочим инструментом химика, биолога или врача, необходимо математическое описание физики колебаний в резонаторах. В настоящее время еще не разработано математическое описание взаимодействий частицы малой массы с поверхностью кварцевого резонатора. В нашей работе мы использовали собственную полуэмпирическую модель, которая описана в работе [49].

Рис. 1. Геометрия отрыва частицы от поверхности: частица массой M и радиусом R , прикрепленная в точке поворота, и возникающая инерционная сила F , а также тангенциальное ускорение a_{ts} , приводящее к ускорению в центре частицы a_c (а); случай одиночной связи (б). Здесь a — радиус сферы; h — расстояние между сферой и поверхностью; L — длина связи; T — сила растяжения связи; N — сила, направленная по нормали; F — внешняя сила; τ — крутящий момент (рисунок б взят из работы [38])



ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ. ТЕОРИЯ. РЕЗУЛЬТАТЫ

Для того чтобы перейти к количественным измерениям силы связывания, рассмотрим некоторые теоретические вопросы отрыва частицы от поверхности кварца.

Амплитуда колебаний кварцевого резонатора A , задается выражением: $A = (QP/(2\pi^3 f^3 M))^{1/2}$. Это уравнение основано на энергетическом балансе в предположении 100 % эффективности конверсии электрической энергии в механическую работу. Здесь Q — коэффициент добротности; P — электрическая мощность, поглощаемая кварцевым резонатором; f — резонансная частота кристалла кварца; M — эффективная масса кварцевой пластины резонатора (с учетом того, что амплитуда больше в центре резонатора). Похожее эмпирическое выражение дается в работе Боровского [41]: $A = 1,4QU_d$, здесь U_d — амплитуда напряжения, подаваемого на кварц. В наших экспериментах на воздухе было определено, что Q составляет 5000—15 000 при 6 В, в зависимости от применяемого резонатора и от нагрузки. Принимая Q равным 10 000, получаем значение амплитуды колебаний в центре резонатора 150 нм (для напряжения возбуждения 6 В). Порядок полученной величины соответствует результатам более сложных расчетов, выполненных в работах [42—44], где получено значение смещения 132 нм для кварцевого резонатора с резонансной частотой 5 МГц и добротностью при отсутствии нагрузки 100 000, для напряжения 1 В.

Расчет сил инерции. Полагая, что сфера вращается или проворачивается около закрепленной точки (рис. 1, а), момент инерции сферы вокруг центра (оси) можно записать как

$$J_S = \int r^2 dm = 2\pi\rho \int r^4 \left(\sqrt{R_s^2 - r^2} \right) dr = \frac{2}{5} M_s R_s^2. \quad (1)$$

Здесь r — интегральный радиус; R_s — радиус сферы; M_s — ее масса; ρ — плотность сферы.

Ускорение в центре сферы a_c определяется как

$$a_c = F_t / M_s, \quad (2)$$

где F_t — полная приложенная сила.

Угловое ускорение сферы ε_s запишется как

$$\varepsilon_s = \frac{F_t R_s}{J_s} = \frac{F_t R_s}{\frac{2}{3} M_s R_s^2} = \frac{5a_c}{2R_s}, \quad (3)$$

откуда ускорение поверхности сферы a_s по отношению к ускорению в центре сферы a_c будет

$$a_s = \varepsilon_s R_s = \frac{5a_c}{2} \quad (4)$$

и, следовательно, общее ускорение поверхности сферы a_{ts}

$$a_{ts} = a_c + a_s = \frac{7a_c}{2}. \quad (5)$$

Другими словами, для сферы, поворачивающейся относительно точки прикрепления к поверхности, центр масс сферы проходит только 2/7 расстояния, проходимого поверхностью при полной амплитуде вокруг точки поворота. Таким образом, ускорение точки на поверхности ре-

зонатора задается соотношением

$$a = \frac{2}{7} A(2\pi f)^2. \quad (6)$$

Если считать сферу жесткой, то приложенную к частице силу можно вычислить по уравнению

$$F = \frac{2}{7} mA(2\pi f)^2. \quad (7)$$

Эта формула получена решением уравнения движения для шарика, как бы болтающегося на шарнире вокруг точки контакта с поверхностью резонатора и вращающегося при этом, а коэффициент $2/7$ учитывает тот факт, что центр масс сферы движется на меньшем расстоянии от точки поворота. Таким образом, мы определили формулы для вычисления силы отрыва.

Процесс отрыва частицы от поверхности. Когда между частицей и поверхностью существует только одна связь, то перпендикулярные, касательные и сдвиговые силы, необходимые для разрыва связи, можно рассчитать аналитически [45]. Критическая перпендикулярная сила, необходимая для разрыва одной связи, равна силе связи, потому что связь и приложенная сила действуют вдоль одной прямой. Но если реакция между прикрепленной молекулой и подложкой обратима, то перед определением силы связи надо задать длительность приложения силы, поскольку "обратимая" связь разорвется без приложения сил, если подождать достаточно долго. Пусть T_{ap} — время, в течение которого к связи приложена внешняя сила F . Тогда критическая сила будет определена как сила, способная разорвать связь с вероятностью $1 - e^{-1}$ в течение времени T_{ap} . Поскольку разрыв связи рассматривается как Пуассонов процесс, мы получаем

$$\exp(-kT_{ap}) = e^{-1} \quad (8)$$

и, следовательно, $k_\tau = 1/T_{ap}$. Подставляя k_r в уравнение, которое приводится в [46], авторы [45] получили

$$k_r = k_r^0 \exp\left(\frac{(\sigma - \sigma_{ts})(x - \lambda)}{2k_b T}\right),$$

и, используя линейную зависимость силы от растяжения $F = \sigma(x - \lambda)$, получаем значение силы связи F , или, что эквивалентно, силы, необходимой для разрыва связи за время наблюдения T_{ap} . Рассматриваем два случая (см. рис. 1, б), когда к частице приложена сила по касательной или сдвиговая. Возникающее растяжение связи T можно рассчитать для механического равновесия силы в направлении x и вращения в направлении z :

$$F = T \cos \varphi, \quad (9)$$

$$\tau = -T a \cos(\theta + \varphi), \quad (10)$$

где τ — крутящий момент, приложенный извне (ноль для чисто касательной силы). Баланс сил по оси y опускаем, поскольку результирующая неспецифическая сила будет удерживать частицу для обеспечения равновесия сил перпендикулярно к поверхности.

Неспецифическая сила симметрична, и поэтому она не создает крутящего момента. Поскольку $a/L \gg 1$, то величину θ можно считать малой и использовать приближение $\cos \theta \sim 1 - \theta^2/2$, $\sin \theta \sim \theta$, $\cos \varphi \sim \pi/2 - \varphi = \alpha$, $\sin \varphi \sim 1 - \alpha^2/2$. Разделив уравнение (10) на произведение a и уравнения (9) и преобразуя, получаем

$$\theta = \alpha \left(1 + \frac{\tau}{aF}\right). \quad (11)$$

На рис. 1 видно, что α и θ геометрически взаимосвязаны:

$$L \sin \varphi = h + a(1 - \cos \theta). \quad (12)$$

Подставляя уравнение (11) в уравнение (12) в приближении $a \gg L$, получаем

$$\alpha = \sqrt{\frac{2(L-h)}{L + a\left(1 + \frac{\tau}{aF}\right)}} \approx \frac{1}{\left(1 + \frac{\tau}{aF}\right)} \sqrt{\frac{2(L-h)}{a}}. \quad (13)$$

Тогда из уравнения (9)

$$F = T \cos \varphi \approx \alpha T. \quad (14)$$

Уравнение (14) задает соотношение между растяжением связи T и приложенной касательной или сдвиговой массовой силой. Оно следует из принципа сохранения механической энергии и из геометрических соображений. Если приравняем T к $NCF(1)$ — критической силе для разрыва связи, то F представляет собой тангенциальную (касательную) критическую силу $TCF(1)$ или сдвиговую критическую силу $SCF(1)$ для отрыва сферы, привязанной единственной связью. Таким образом, α есть соотношение между тангенциальной и нормальной силами, необходимыми для отрыва частицы. При приложении к сфере тангенциальной силы ($\tau = 0$) уравнение (14) запишется как

$$F = T \sqrt{\frac{2(L-h)}{a}}. \quad (15)$$

Сделанные авторами [45] оценки показали, что для единственной связи сила, приложенная перпендикулярно, должна быть в 20 раз больше по величине, чем в случае силы, направленной по касательной. При высокой плотности рецепторов силы, направленные по касательной, могут быть в 56 раз более эффективными для отрыва частиц от поверхности, чем перпендикулярные силы. Силы, приложенные под углом к подложке от 0 (касательная) до 80°, столь же эффективны при отрыве сферы, как и касательные.

Измерение силы разрыва связи. Для этого мы использовали следующую процедуру. К поверхности кварцевого резонатора мы присоединяем сферу известного размера и веса, плавно увеличиваем амплитуду колебания поверхности, определяем величину напряжения, при котором происходит разрыв связи, соединяющей сферу с поверхностью. Кварцевые микровесы (QCM) были изготовлены из полированных кварцевых пластин (АТ-срез), срезанных под углом 35°, диаметром 8,25 мм. На центральную часть пластин с обеих сторон напыляли хром (10—20 нм), затем золото (100—120 нм) в виде круга диаметром 4 мм. Резонансная частота кварца составляла 14,3 МГц.

Рассмотрим различные типы связей между поверхностью и сферой. Связь сферы с поверхностью может быть физическая, водородная, ковалентная (химическая). Для этого мы выбрали сферы с разными функциональными группами. Для физической связи мы использовали стеклянные шарики размером 5 мкм без каких-либо дополнительных функциональных групп и помещали их на поверхность, покрытую золотом. В качестве системы с водородной связью мы выбрали стрептавидин—биотин, эта система давно и хорошо изучена [47, 48] и поэтому широко используется как тестовая; это наиболее сильная из нековалентных связей. Расчетная и экспериментальная энергия связи составляет порядка 15—25 ккал/моль и является наиболее сильной (из известных) водородной связью. Мы также использовали ее как тестовую систему.

Для получения системы стрептавидин—биотин мы растворяли биотинированный бычий сывороточный альбумин в буфере (10 мг/10 мл PBS) и 20 мкл этого раствора наносили на поверхность, затем поверхность промывали и сушили в токе азота. После этого на поверхность наносили раствор 20 мкл микросфер со стрептавидиновым покрытием (стрептавидин связывается с биотином водородными связями). Систему оставляли на 3—4 ч, затем промывали водой и сушили в токе азота.

Для создания ковалентной химической связи сферы к поверхности пришивали через аминную группу. Для получения амидного связывания сначала поверхность обрабатывали 1 мМ раствором 12-меркаптокаприновой кислоты в этаноле в течение 24 ч. В результате реакции тиольной группы с золотом на поверхности образуется монослой. Кислотную группу активировали EDC-NHS в течение 40 мин, затем раствор удаляли и прибавляли сферические частицы с концевыми аминными группами. После выдержки в течение 1 ч поверхность промывали водой, затем этанолом. Здесь необходимо отметить, что энергия связи аминной группы (73—86 ккал/моль) выше, чем связи золото—тиол (30—35 ккал/моль), поэтому силу разрыва связи мы можем определить именно для Au—S. На рис. 2 схематически показана структура изучаемых связей.

Метод измерения выбирали исходя из концентрации сфер на поверхности.

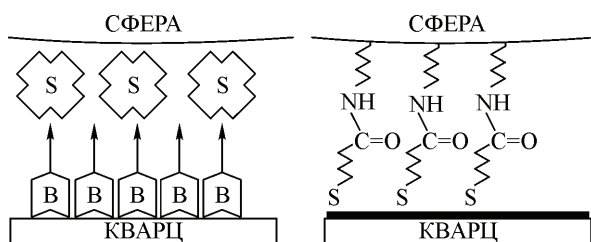


Рис. 2. Схематическое изображение структуры связи между сферой и поверхностью кварцевого резонатора, слева — для водородного связывания: S — стрептавидин на поверхности сферы, В — биотинированный бычий сывороточный альбумин; справа — для химического связывания

Рассмотрим способы измерения силы отрыва с помощью кварцевого резонатора. Если степень покрытия поверхности близка к монослою или выше, то для определения силы отрыва можно применить метод фиксирования изменения резонансной частоты при отрыве частицы. Такой метод имеет довольно простую схему измерения (рис. 3, а). На кварцевый резонатор подается частотно-модулированный (ЧМ) сигнал, частота увеличивается линейно. Диапазон сканирования частоты выбирается так, чтобы определить положение резонанса. Обычно для кварца 14—15 МГц эта величина составляет 20—30 кГц. С каждым шагом увеличиваем амплитуду переменного напряжения, подаваемого на кварцевый резонатор. С помощью АЦП записываем ток I , проходящий через кварцевый резонатор, и напряжение U . Для увеличения динамического диапазона и для детектирования сигнала используем логарифмический усилитель (AD8307). Для измерения тока используется трансформатор тока T . Управление генератором ГСС-40 и сбор данных проводили компьютером (PC) в среде CVI-LabWindows.

Второй способ применим для более низких концентраций, порядка 1 % монослоя. При таких заполнениях изменение частоты dF/F гораздо ниже, чем дает фон температурных неоднородностей материала, поэтому наличие объектов на поверхности по сдвигу частоты зафиксировать нельзя. Но момент отрыва может быть зафиксирован в виде акустического шума. Какова физическая картина возникновения сигнала отрыва? Присутствие объектов на поверхности резонатора приводит к незначительному искажению формы колебаний мембраны в виде характерной "воронки". В нашем случае принципиален сам факт искажения формы колебаний, потому что, как только объект покинет поверхность, форма колебаний вернется в состояние основной моды. В резонаторной пластинке возникнет переходный процесс с высшими гармониками, который и представляет собой сигнал отрыва.

На каких гармониках следует измерять сигнал отрыва? Согласно расчетам по предложенной нами модели [49], если нагрузку поместить в центр ($x = 0,5$), будут присутствовать лишь симметричные (четные) гармоники. Поскольку в искажении формы колебаний эти гармоники не участвуют, то сигнал на второй гармонике отсутствует вовсе. При смещении положения до значения $x = 0,55$ вторая и третья гармоники выравниваются, а при дальнейшем отклонении объекта ($x = 0,7$) вторая гармоника доминирует. При размещении объектов в центральной части резонатора измерения лучше всего проводить на третьей гармонике.

Упрощенная схема измерения показана на рис. 3, б. Для выделения акустического сигнала применен фильтр, настроенный на третью гармонику, измерения проводятся селективным усилителем (А). Максимально возможное напряжение в обеих экспериментальных установках составляет 10 В и определяется генератором сигналов ГСС-40.

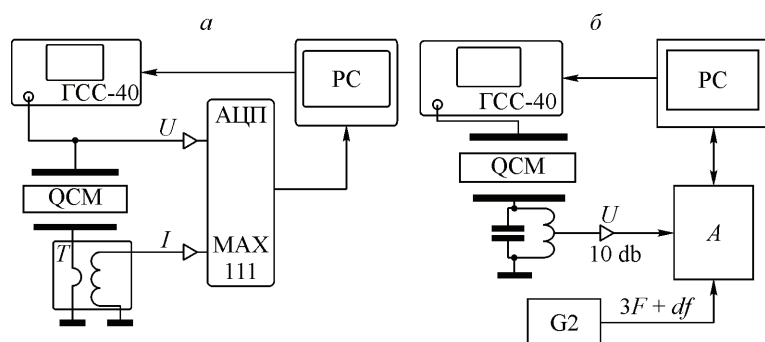


Рис. 3. Схемы экспериментальных установок для измерения силы отрыва

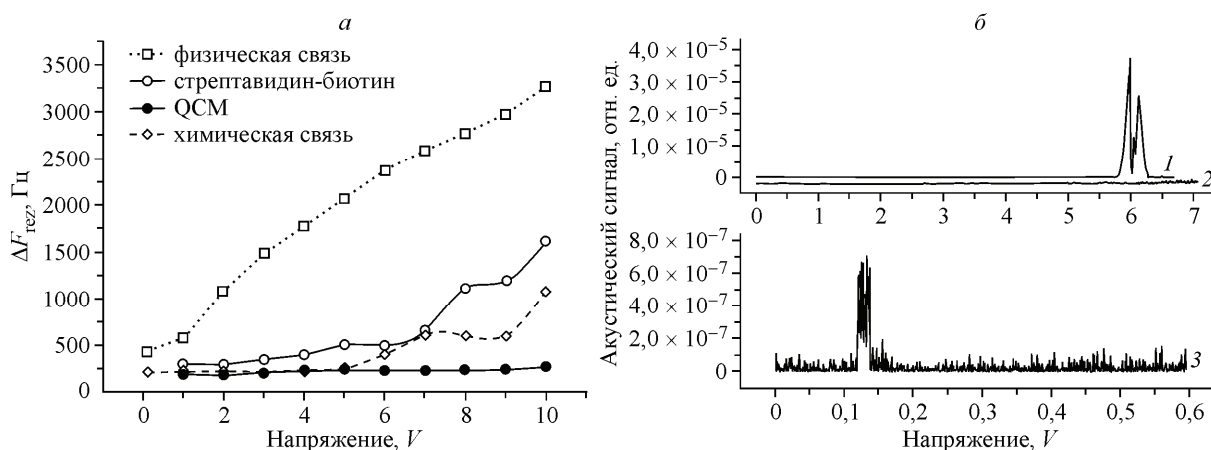


Рис. 4 Спектры сил отрыва в зависимости от приложенного напряжения для неспецифического взаимодействия (латекс—золото) (3), связи стрептавидин—биотин (стрептавидин связан водородными связями со сферами из латекса и биотинированным бычьим сывороточным альбумином на золоте) (1) и химической связи (амидная связь, образованная между тиоловым слоем с концевой карбоксильной группой и сферой из латекса, модифицированной аминами) (2) (а); сдвиг резонансной частоты кварцевого резонатора в зависимости от приложенного напряжения для неспецифического взаимодействия, связи стрептавидин—биотин и ковалентной связи [33] (б): 1 — стрептавидин—биотин, 5 мкм; 2 — химическая связь, 5 мкм; 3 — физическая связь, сферы 5 мкм

К недостаткам первого способа можно отнести то, что полученное значение силы отрыва может быть искажено из-за взаимного влияния шариков друг на друга. При концентрации порядка 1 % это влияние должно быть очень маленьким, поэтому значения силы, полученные вторым способом, более точны.

На рис. 4, а показано изменение резонансной частоты в зависимости от величины амплитуды для сфер размером 5 мкм для разных типов связей. На рис. 4, б показаны спектры силы отрыва. Данные получены в воздухе для неспецифического взаимодействия, взаимодействия стрептавидин—биотин и для амидной связи.

Спектр силы отрыва (см. рис. 4, б) для неспецифически адсорбированной сферы из латекса имеет пик около 0,1 В. Мы обнаружили, что интенсивность возникающего акустического сигнала линейно пропорциональна числу сфер на поверхности. Спектры для системы стрептавидин—биотин не имеют пиков вблизи этого значения, но содержат два пика около 6 В при большой нагрузке (покрытие поверхности 1 %) и один пик — при меньшей нагрузке (покрытие поверхности 0,1—0,2 %). Амидная связь вообще не дает пиков в спектре. Следует отметить, что пики в спектре силы отрыва резкие. Повторное сканирование в системе стрептавидин—биотин сразу за первым уже не дает пиков около 6 В, наблюдаются только слабые пики ниже 1 В, что говорит о том, что система не восстановилась.

Резонатор без сфер не изменяет частоту с изменением напряжения. Напротив, неспецифически адсорбированные сферы дают сдвиг резонансной частоты между 0 и 1 В, и величина сдвига возрастает с увеличением приложенного напряжения. Сферы стрептавидин—биотин начинают давать сдвиг частоты только при напряжении около 6 В. Этот сдвиг также возрастает с приложенным напряжением. Кварцевый резонатор с химически связанными сферами (амидная связь) дает сдвиг около 6 В и еще один — около 9 В, хотя ни при этих значениях напряжения, ни при других не наблюдается акустический сигнал. Мы объясняем эти изменения уменьшением массы из-за отрыва сфер от поверхности; затем сферы перекатываются по поверхности и со временем слетают с нее. При большой амплитуде мы наблюдаем, как это происходит за несколько секунд, а при меньшей амплитуде — медленнее. Удаление сфер с поверхности объясняет, почему мы наблюдаем восстановление частоты, в то время как авторы [50] наблюдали увеличение частоты в случае одиночной частицы, механически слабо прикрепленной к поверхности. Для того чтобы понять, почему в случае химической связи мы наблюдаем сдвиг частоты,

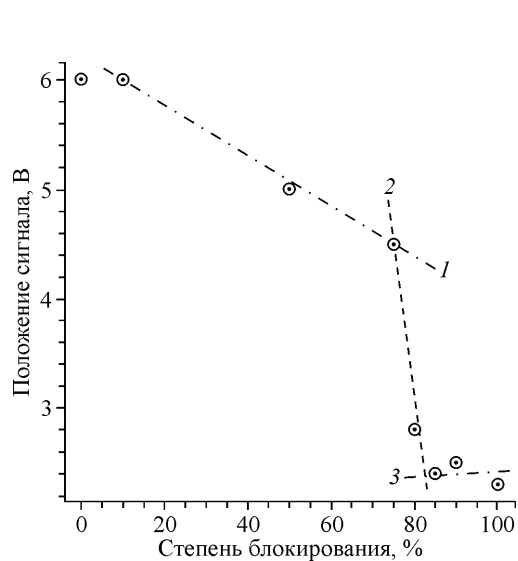


Рис. 5. Сдвиг положений первого и главного пиков в спектре силы отрыва при блокировании позиций стрептавидина на микросферах из латекса

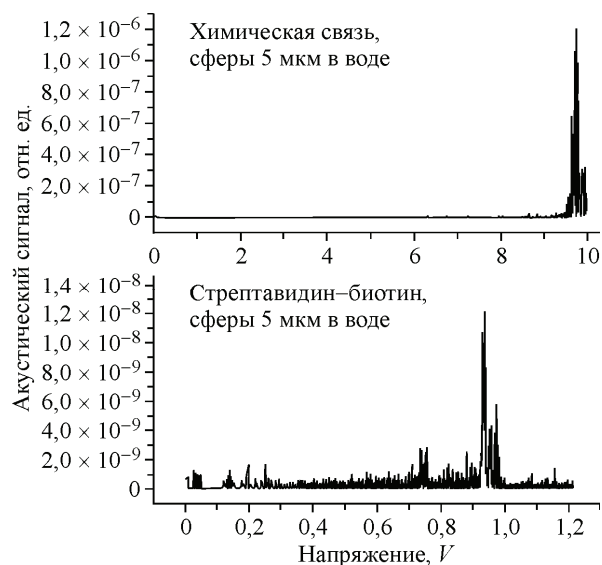


Рис. 6. Спектры сил отрыва в воде для взаимодействия стрептавидин—биотин и для химической (амидной) связи (аналогично рис. 4, а). Все сферы имеют диаметр 5 мкм

но не детектируем акустического сигнала и не наблюдаем отрыва сфер, необходимы дальнейшие исследования. Наши результаты наводят на мысль, что в то время как оба метода позволяют детектировать отрыв сфер от поверхности, регистрация шума является более чувствительным методом, чем измерение сдвигов резонансной частоты. Оба эти эксперимента показывают, что мы можем детектировать отрыв в случае неспецифических взаимодействий и в системе стрептавидин—биотин. Более сильное взаимодействие требует более высокого напряжения (примерно в 60 раз более высокого), а в данных экспериментах сила недостаточна для разрыва такой связи.

Масса сферы равна 69 пг, поэтому сила (в расчете на одну сферу) оценивается в 26 мкН (эта величина получена для напряжения 6 В). Сравнивая эту величину с силой, которая необходима для разрыва одного взаимодействия стрептавидин—биотин (160 пН) [51], получаем, что одновременно разрываются около 160 000 связей. По нашим стехиометрическим оценкам, это соответствует примерно геометрическому числу исходных связей стрептавидин—биотин между сферой и поверхностью, в предположении плотно упакованного слоя стрептавида на поверхности сферы. Это разумно соответствует "перевороту", наблюдаемому для степени блокирования взаимодействий стрептавидин—биотин около 75 % (рис. 5). Хотя это лишь приближенный расчет, он показывает, что большинство связей, удерживающих сферу на поверхности, рвется одновременно. Это может быть причиной наблюдения резких пиков в спектре силы отрыва и появления детектируемого сигнала при отрыве. Мы провели серию экспериментов, в которых блокировали позиции стрептавида на сфере биотином, а затем прикрепляли сферу к поверхности. Блокирование поверхности делается для того, чтобы уменьшить количество связей и выделить одиночную связь, поскольку поверхность сферы одновременно цепляется большим числом связей, причем их число зависит от размера сферы. Мы предполагаем, что блокирование является случайным процессом, так что доля позиций стрептавида, заблокированных в контактной области между микросферой и поверхностью, такая же, как доля позиций, заблокированных по всей микросфере. Зависимость от степени блокирования показана на рис. 5, здесь хорошо видно, что с увеличением блокирования уменьшается сила отрыва, причем линейно. При блокировании более 75—80 % наблюдается резкий скачок, и мы измеряем уже разрыв связей не стрептавидин—биотин, а биотин—блокированный стрептавидин. Для того чтобы расширить диапазон в сторону увеличения значений силы, мы проводили измерения в жидко-

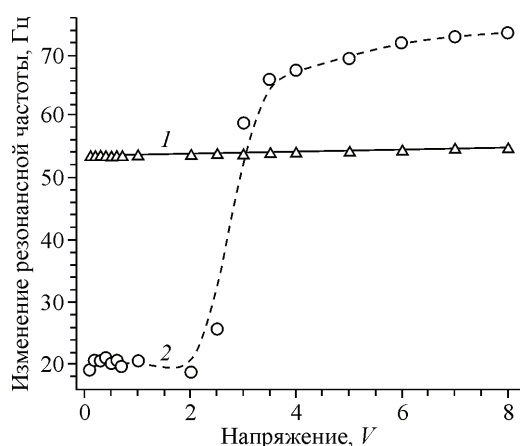


Рис. 7. Сдвиг резонансной частоты кварцевого резонатора в зависимости от приложенного напряжения для системы: 1 — чистая поверхность, 2 — C_2H_5OH/SiO_2

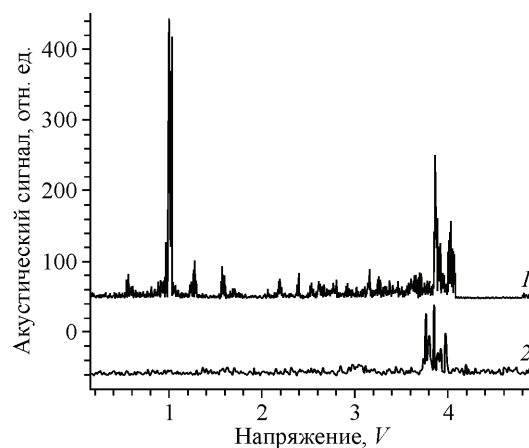


Рис. 8. Зависимость акустического сигнала от напряжения для различных концентраций паров воды: 1 — влажность 30 %, 2 — влажность 0,3 %

сти. На рис. 6 показаны результаты измерений в жидкости. Видно, что сигнал для водородной связи сместился в сторону меньших напряжений и появился сигнал для химически связанных сфер.

Предполагая одинаковую (поверхностную) плотность связей для неспецифического взаимодействия, системы стрептавидин—биотин и для химической связи, а также допуская, что сила отрыва не меняется при переходе от воздуха к воде, мы можем получить относительный масштаб силы отрыва. Это примерно 1:60:600 для неспецифической связи, связи стрептавидин—биотин, химической связи соответственно, хотя данные для неспецифического взаимодействия были записаны при меньшей скорости сканирования, чем для других связей, поэтому полученное значение его силы может быть несколько меньше действительного. Такое масштабирование кажется разумным и демонстрирует динамический диапазон метода. Опубликованные данные таковы: 160 пН для взаимодействия стрептавидин—биотин, $1,4 \pm 0,3$ нН для связи золото—сера. Таким образом, соотношение сил отрыва в наших экспериментах хорошо согласуется с известными данными, несмотря на тот факт, что мы прикладываем тангенциальную силу, тогда как в атомно-силовом микроскопе прикладываемая сила направлена по нормали, и прямое сопоставление не совсем корректно. Использование данного метода описано в наших работах [52—55]. Основное применение — это сенсоры, в том числе и биологические: например, по величине силы отрыва можно легко идентифицировать молекулу, фаг, бактерию, вирус. Чувствительность метода позволяет определять частицы вплоть до единичного вируса [53].

На рис. 7 показана зависимость резонансной частоты от амплитуды для системы C_2H_5OH/SiO_2 . Поверхность диоксида кремния гидрофильна, и молекула спирта образует водородную связь. Согласно работе [56], в такой системе образуются умеренно сильные (moderate) либо сильные (strong) водородные связи, энергия связи которых составляет 4—15 ккал/моль или 15—40 ккал/моль. Полученное значение силы разрыва составляет 25 ± 5 пН, эта величина на порядок меньше величины силы разрыва для ковалентной связи. На рис. 8 показан акустический сигнал при напуске паров воды в камеру. Характерная особенность спектра отрыва для паров воды — это наличие двух пиков при больших концентрациях: один пик при напряжении 1 В, второй — при напряжении 4 В. С уменьшением концентрации первый пик уменьшается и при малых концентрациях исчезает совсем. Поскольку молекулы воды образуют водородные связи, то можно предположить, что этот сигнал дают кластеры. Предполагая, что сигнал при больших напряжениях или при малых концентрациях соответствует одиночным молекулам, мы оценили размер кластера и получили, что он должен быть порядка четырех молекул. Это хоро-

шо согласуется с литературными данными, где показано (расчет), что энергетически выгодна должна быть частица, состоящая из четырех молекул воды [57].

ВЫВОДЫ

Предложенный нами метод имеет более простое аппаратное исполнение, но так же, как и метод атомно-силовой микроскопии, сканирование явлений отрыва не использует электромагнитного излучения. Поэтому данную методику можно использовать для исследования структуры биологических систем. Сигнал указывает не только на присутствие аналитов (частиц или молекул), соединенных связью с поверхностью, но и на количество этих разорванных связей (амплитуда сигнала), а также на величину силы этой связи (положение в зависимости от подаваемого напряжения). Данная методика позволяет с уверенностью измерять силу разрыва величиной порядка 10 пН. Процесс сканирования требует минимальной пробоподготовки, может осуществляться в разных средах (в вакууме, на воздухе, в жидкости), занимает лишь несколько минут.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Evans E.* // Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct. – 2001. – **30**. – P. 105 – 128.
2. *Evans E.* // Faraday Discuss. – 1998. – **111**. – P. 1 – 16.
3. *Juan M.L., Gordon R., Pang Y., Eftekhari F., Quidant R.* // Nature Phys. – 2009. – **5**. – P. 915 – 919.
4. *Duwez A.-S., Cuenot S., Jerome C., Gabriel S., Jerome R., Rapino S., Zerbetto F.* // Nature Nanotechn. – 2006. – **1**. – P. 122 – 125.
5. *Schmidt S.W., Beyer M.K., Clausen-Schaumann H.* // J. Amer. Chem. Soc. – 2008. – **130**. – P. 3664 – 3668.
6. *Sugimoto Y., Namikawa T., Miki K., Abe M., Morita S.* // Phys. Rev. B. – 2008. – **77**. – P. 195424.
7. *Menotta M., Crinelli R., Carloni E., Mussi V., Valbusa U., Magnani M.* // Biosensors and Bioelectronics. – 2011. – **28-1**. – P. 158 – 165.
8. *Han S.W., Mieda S., Nakamura C., Kihara T., Nakamura N., Miyake J.* // J. Mol. Recognit. – 2011. – **24**. – P. 17 – 22.
9. *Alsteens D., Garcia M.C., Lipke P.N., Dufrêne Y.F.* // PNAS. – 2010. – **107**. – P. 20744 – 20749.
10. *Hoh J.H., Cleveland J.P., Pratter C.B., Revel J.-P., Hansma P.K.* // J. Amer. Chem. Soc. – 1992. – **114**, N 12. – P. 4917 – 4918.
11. *Lee G.U., Kidwell D.A., Colton R.J.* // Langmuir. – 1994. – **10**. – P. 354 – 357.
12. *Izrailev S., Stepaniants S., Baisera M., Oono Y., Schulten K.* // Biophys. J. – 1997. – **72**. – P. 1568 – 1581.
13. *Evans E., Ritchie K.* // Biophys. J. – 1997. – **72**. – P. 1541 – 1555.
14. *Grandbois M., Beyer M., Rief M., Clausen-Schaumann H., Gaub H.E.* // Science. – 1999. – **283**. – P. 1727 – 1730.
15. *Binnig G., Quate C.F., Gerber Ch.* // Phys. Rev. Lett. – 1986. – **56**. – P. 930 – 933.
16. *Gimzewski J.K., Gerber Ch., Meyer E., Schlittler R.R.* // Chem. Phys. Lett. – 1994. – **217**, N 5/6. – P. 589 – 594.
17. *Barnes J.R., Stephenson R.J., Welland M.E., Gerber Ch., Gimzewski J.K.* // Nature. – 1994. – **372**. – P. 79 – 82.
18. *Thundat T., Warmack R.J., Chen G.Y., Allison D.P.* // Appl. Phys. Lett. – 1994. – **64**, N 21. – P. 2894 – 2896.
19. *Berger R., Delamarche E., Lang H.P., Gerber Ch., Gimzewski J.K., Meyer E., Güntherodt H.-J.* // Science. – 1997. – **276**. – P. 2021 – 2024.
20. *Berger R., Delamarche E., Lang H.P., Gerber Ch., Gimzewski J.K., Meyer E., Güntherodt H.-J.* // Appl. Phys. A. – 1998. – **66**, Suppl. 1. – P. S55 – S59.
21. *Craighead H.G.* // Science. – 2000. – **290**. – P. 1532 – 1535.
22. *Godin M., Tabard-Cossa V., Grütter P., Williams P.* // Appl. Phys. Lett. – 2001. – **79**, N 4. – P. 551 – 553.
23. *Lang H.P., Berger R., Andreoli C., Brugger J., Despont M., Vettiger P., Gerber Ch., Gimzewski J.K., Ramseyer J.P., Meyer E., Güntherodt H.-J.* // Appl. Phys. Lett. – 1998. – **72**, N 3. – P. 383 – 385.
24. *Lang H.P., Berger R., Battiston F., Ramseyer J.-P., Meyer E., Andreoli C., Brugger J., Vettiger P., Despont M., Mezzacasa T., Scandella L., Güntherodt H.-J., Gerber C., Gimzewski J.K.* // Appl. Phys. A. – 1998. – **66**, Suppl. 1. – P. S61 – S64.
25. *Battiston F.M., Ramseyer J.-P., Lang H.P., Baller M.K., Gerber Ch., Gimzewski J.K., Meyer E., Güntherodt H.-J.* // Sensors and Actuators B. – 2001. – **77**, N 1/2. – P. 122 – 131.
26. *Fritz J., Baller M.K., Lang H.P., Rothuizen H., Vettiger P., Meyer E., Güntherodt H.-J., Gerber Ch., Gimzewski J.K.* // Science. – 2000. – **288**. – P. 316 – 318.
27. *Lang H.P., Hegner M., Meyer E., Gerber Ch.* // Nanotechnology. – 2002. – **13**, N 5. – P. R29 – R36.

28. Arntz Y., Seelig J.D., Lang H.P., Zhang J., Hunziker P., Ramseyer J.P., Meyer E., Hegner M., Gerber Ch. // *Nanotechnology*. – 2003. – **14**, N 1. – P. 86 – 90.
29. Tang Y., Fang J., Xu X., Ji H.-F., Brown G.M., Thundat T. // *Analyt. Chem.* – 2004. – **76**, N 9. – P. 2478 – 2481.
30. Mertens J., Finot E., Nadal M.-H., Eyraud V., Heintz O., Bourillot E. // *Sensor and Actuators, B.* – 2004. – **99**, N 1. – P. 58 – 65.
31. Álvarez M., Carrascosa L.G., Moreno M., Calle A., Zaballos Á., Lechuga L.M., Martínez-A C., Tamayo J. // *Langmuir*. – 2004. – **20**, N 22. – P. 9663 – 9668.
32. Yum K., Wang Z., Suryavanshi A.P., Yu M.-F. // *J. Appl. Phys.* – 2004. – **96**, N 7. – P. 3933 – 3938.
33. Kooser A., Gunter R.L., Delinger W.D., Porter T.L., Eastman M.P. // *Sensor and Actuators, B.* – 2004. – **99**, N 2/3. – P. 474 – 479.
34. Fadel L., Dufour I., Lochon F., Francais O. // *Sensor and Actuators, B.* – 2004. – **102**, N 1. – P. 73 – 77.
35. Yan X., Ji H.-F., Lvov Y. // *Chem. Phys. Lett.* 2004. – **396**, N 1/3. – P. 34 – 37.
36. Pei J., Tian F., Thundat T. // *Analyt. Chem.* – 2004. – **76**, N 2. – P. 292 – 297.
37. Ryu W.H., Chung Y.-C., Choi D.-K., Yoon C.S., Kim C.K., Kim Y.-H. // *Sensor and Actuators, B.* – 2004. – **97**, N 1. – P. 98 – 102.
38. Tang Y., Fang J., Yan X., Ji H.-F. // *Sensor and Actuators, B.* – 2004. – **97**, N 1. – P. 109 – 113.
39. Lang H.P., Hegner M., Gerber Ch. // *Materials Today*. – 2005. – **5**. – P. 30 – 36.
40. Dultsev F.N., Ostanin V.P., Klenerman D. // *Langmuir*. – 2000. – **16**. – P. 5036 – 5040.
41. Borovsky B. // *J. Appl. Phys.* – 2000. – **88**. – P. 4017 – 4021.
42. Kanazava K.K. // *Faraday Discuss.* – 1997. – **107**. – P. 77 – 90.
43. Bahadur H., Parshad R. *Physical acoustics: principles and methods* / Ed. W.P. Mason, R.N. Thurston. – N. Y.: Academic Press, 1982. – Vol. 16. – P. 37 – 171.
44. Hillier A.C., Ward M.D. // *Anal. Chem.* – 1992. – **64**. – P. 2539 – 2554.
45. Chang K.-C., Hammer D.A. // *Langmuir*. – 1996. – **12**, N 9. – P. 2271 – 2282.
46. Dembo M., Torney D.C., Saxman K., Hammer D.A. // *Proc. R. Soc. London, Ser. B.* – 1988. – **234**. – P. 55 – 83.
47. Gonzalez M., Bagatolli L.A., Echabe I., Arrondo Jose L.R., Argarana Carlos E., Cantor Charles R., Fidelio Gerardo D. // *Biolog. Chem.* – 1997. – **272**, N 17, Issue of April 25. – P. 11288 – 11294.
48. Galarreta B.C., Norton P.R. // *Langmuir*. – 2011. – **27**(4). – P. 1494 – 1498.
49. Dultsev F.N., Kolosovsky E.A. // *Sensors and Actuators B.* – 2009. – **143**. – P. 17 – 24.
50. Dybwad G.L. // *J. Appl. Phys.* – 1985. – **58**. – P. 2789 – 2790.
51. Zhou J., Zhang L., Leng Y. // *J. Chem. Phys.* – 2006. – **125**. – P. 104905.
52. Dultsev F.N., Speight R.E., Fiorini M.T., Blackburn J.M., Abell C., Ostanin V.P., Klenerman D. // *Anal. Chem.* – 2001. – **73**. – P. 3935 – 3939.
53. Cooper M.A., Dultsev F.N., Minson T., Ostanin V.P., Abell C., Klenerman D. // *Nature Biotechnol.* – 2001. – **19**(9). – P. 833 – 837.
54. Dultsev F.N., Kolosovsky E.A. // *Langmuir*. – 2009. – **25**(20). – P. 12195 – 12200.
55. Dultsev F.N., Kolosovsky E.A. // *Analyt. Chim. Acta.* – 2011. – **687**. – P. 75 – 81.
56. Grabowski S.J. // *Annu. Rep. Prog. Chem., Sect. C.* – 2006. – **102**. – P. 131 – 165.
57. Lichtenberger O., Woltersdorf J. // *Mater. Chem. Phys.* – 1996. – **44**(1-3). – P. 222 – 232.