



Библиотека «Наноинженерия»

А.И. Власов
А.А. Денисов
К.А. Елсуков

БИОНАНОИНЖЕНЕРИЯ

Издательство МГТУ им. Н.Э. Баумана

КОМПЛЕКТ
учебно-методических комплексов дисциплин
по тематическому направлению деятельности
национальной нанотехнологической сети
«НАНОИНЖЕНЕРИЯ»

БИБЛИОТЕКА «НАНОИНЖЕНЕРИЯ»

В семнадцати книгах

1. МЕТОДЫ МИКРОСКОПИИ
2. ТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ ПРОЦЕССЫ
В НАНОИНЖЕНЕРИИ
3. ВЫСОКОВАКУУМНЫЕ ТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ ПРОЦЕССЫ
В НАНОИНЖЕНЕРИИ
4. МНОГОКОМПОНЕНТНОЕ 3D-ПРОЕКТИРОВАНИЕ
НАНОСИСТЕМ
5. ПРОЕКТИРОВАНИЕ ЭЛЕКТРОННОЙ ЭЛЕМЕНТНОЙ БАЗЫ
НАНОСИСТЕМ
6. ПРОЕКТИРОВАНИЕ НАНОСЕНСОРОВ
7. ПРОЕКТИРОВАНИЕ ОПТИЧЕСКОЙ ЭЛЕМЕНТНОЙ БАЗЫ
НАНОСИСТЕМ
8. ФИЗИКО-МЕХАНИЧЕСКИЕ КОМПОНЕНТЫ НАНОСИСТЕМ
9. МЕТОДЫ ЛИТОГРАФИИ В НАНОИНЖЕНЕРИИ
10. ЭЛИОННЫЕ ПРОЦЕССЫ И НАНОТЕХНОЛОГИИ
11. ЭЛЕКТРОННАЯ МИКРОСКОПИЯ
12. ОПТИЧЕСКАЯ МИКРОСКОПИЯ
13. АВТОМАТИЗИРОВАННОЕ ПРОЕКТИРОВАНИЕ
НАНОСИСТЕМ
14. ОСНОВЫ МОДЕЛИРОВАНИЯ МИКРО-
И НАНОСИСТЕМ
- 15. БИОНАНОИНЖЕНЕРИЯ**
16. ФИЗИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ НАНОИНЖЕНЕРИИ
17. САПР НАНОСИСТЕМ

А. И. Власов, А. А. Денисов, К. А. Елсуков

БИОНАНОИНЖЕНЕРИЯ

Учебно-методический комплекс
по тематическому направлению деятельности
ННС «Наноинженерия»

Под редакцией заслуженного деятеля науки РФ,
члена-корреспондента РАН, профессора
В. А. Шахнова

*Допущено учебно-методическим объединением вузов
по университетскому политехническому образованию
в качестве учебного пособия для студентов
высших учебных заведений, обучающихся
по направлению 152200 «Наноинженерия»*



Москва 2011

УДК 361.3.06; 621.382
ББК 22.3
В58

УМК подготовлен в соответствии с заданием государственного контракта № 16.647.12.2008 на выполнение работ в рамках направления 2 федеральной целевой программы «Развитие инфраструктуры наноиндустрии в Российской Федерации на 2008–2011 годы»

Рецензенты:

кафедра «Вакуумная электроника» Московского физико-технического института (зав. кафедрой, академик РАН *А. С. Бугаев*);
кафедра «Электроника и информатика» Российского государственного технологического университета им. К. Э. Циолковского (зав. кафедрой, профессор *С. Б. Беневоленский*)

Власов А. И.

В58 Бионаноинженерия : учеб. пособие / А. И. Власов, А. А. Денисов, К. А. Елсуков. – М. : Изд-во МГТУ им. Н. Э. Баумана, 2011. – 224 с. : ил. (Библиотека «Наноинженерия» : в 17 кн. Кн. 15).

ISBN 978-5-7038-3506-7 (кн. 15)

ISBN 978-5-7038-3509-8

Конспект лекций по дисциплине «Бионаноинженерия» содержит краткое изложение курса, рекомендации по организации и проведению лекций, перечень учебных видео- и аудиоматериалов, слайдов, типовых плакатов и другие дидактические материалы для работы профессорско-преподавательского состава по данной дисциплине.

Для студентов, аспирантов и преподавателей высших технических учебных заведений по направлению подготовки «Нанотехнология» с профилем подготовки «Наноинженерия», а также всех, занимающихся вопросами нанотехнологий, наноинженерии, проектированием МЭМС и НЭМС, созданием электронных систем различного назначения.

УДК 361.3.06; 621.382
ББК 22.3

ISBN 978-5-7038-3506-7 (кн. 15)
ISBN 978-5-7038-3509-8

© Власов А. И., Денисов А. А.,
Елсуков К. А., 2011
© Министерство образования
и науки РФ, 2011
© Оформление. Издательство МГТУ
им. Н. Э. Баумана, 2011

ПРЕДИСЛОВИЕ

Успех в продвижении России по нанотехнологическому пути развития во многом будет зависеть от эффективности системы подготовки кадров, для создания и развития которой необходимо современное и качественное учебно-методическое обеспечение.

Основная особенность нанотехнологии – ее междисциплинарный характер, который требует особых методических приемов и подбора соответствующего научного и учебного материала. В настоящее время имеется существенная нехватка учебно-методического обеспечения такого характера. Поэтому адаптация учебно-методического обеспечения для подготовки кадров по программам высшего профессионального образования для тематических направлений ННС и его апробация на базе ведущих университетов Российской Федерации направлены на реализацию инновационной модели образования, подразумевающую тесную связь учебного и научно-исследовательского процесса на базе проектных методов обучения, современных экспериментальных методик и перспективных технологических процессов создания наноматериалов, наноструктур, приборов, устройств и систем на их основе. Современные образовательные программы должны обеспечивать приобретение студентами профессиональных навыков и компетенций, необходимых для эффективной и самостоятельной работы в nanoиндустрии.

В связи с этим актуальной задачей является разработка и издание УМК, которые обеспечат учебно-методическую поддержку подготовки бакалавров и магистров по основным образовательным программам высшего профессионального образования по тематическому направлению деятельности ННС «Наноинженерия» образовательными учреждениями высшего профессионального образования на территории Российской Федерации.

Целью создания данного комплекта УМК является повышение эффективности междисциплинарной подготовки бакалавров и магистров путем распространения передового опыта в разработке

УМО среди вузов, осуществляющих подготовку по тематическим направлениям ННС, и внедрения компонентов вариативного маршрутного обучения на базе адаптированного учебно-методического комплекса дисциплин по тематическому направлению деятельности ННС «Наноинженерия».

УМК разработаны коллективом авторов в рамках реализации федеральной целевой программы «Развитие инфраструктуры наноиндустрии в Российской Федерации на 2008–2011 годы».

На базе представленных УМК создана вариативная система маршрутного междисциплинарного обучения студентов по тематическому направлению деятельности ННС «Наноинженерия», обеспечивающая подготовку квалифицированных специалистов с соответствующими профилями. Разработаны электронные версии учебно-методических комплексов дисциплин на основе Web-версии, соответствующей стандарту SCORM 2004, 3rd edition (<http://nanolab.iu4.bmstu.ru>).

Глубокую благодарность авторы выражают рецензентам: А. С. Бугаеву – академику РАН, заведующему кафедрой Московского физико-технического института, и С. Б. Беневоленскому – профессору, заведующему кафедрой Российского государственного технологического университета им. К. Э. Циолковского, чьи замечания способствовали улучшению содержания УМК.

Разработанные УМК обеспечат учебно-методическую поддержку подготовки бакалавров и магистров по основным образовательным программам высшего профессионального образования по направлению подготовки «Нанотехнология» с профилем подготовки «Наноинженерия» образовательными учреждениями высшего профессионального образования на территории Российской Федерации.

Авторы будут признательны читателям за все замечания по содержанию УМК, которые следует направлять по адресу: 105005, Москва, 2-я Бауманская ул., МГТУ им. Н. Э. Баумана.

В. А. Шахнов

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АДФ	– аденозиндифосфат
АИВК	– автоматизированный измерительно-вычислительный комплекс
АИС	– автоматизированная измерительная система
АПК	– аппаратно-программный комплекс
АСА	– атомный спектральный анализ
АСМ	– атомно-силовая микроскопия; атомно-силовой микроскоп
АСУ	– автоматическая система управления
АТФ	– аденозинтрифосфат
АЧХ	– амплитудно-частотная характеристика
ВАХ	– вольт-амперная характеристика
ВИ	– виртуальный инструмент
ДНК	– дезоксирибонуклеиновая кислота
ЖК	– жидкие кристаллы
ЖХВР	– жидкостная хроматография высокого разрешения
ИВК	– измерительно-вычислительный комплекс
ИК	– инфракрасный свет
ИП	– источник питания
ИС	– измерительная система
ИС	– интегральная схема
ИТО	– исследуемый технический объект
КИП	– контрольно-измерительные приборы
КНИ	– кремний-на-изоляторе
ЛД	– лазерный диод
МГЭ	– метод граничных элементов
МК	– микроантилевер
МКР	– метод конечных разностей
МКЭ	– метод конечных элементов
МЛЭ	– молекулярно-лучевая эпитаксия
МПВ	– метод постоянной высоты
МПТ	– метод постоянного тока

мРНК	– матричная (информационная) РНК
МРС	– магнетронная распылительная система
МСА	– молекулярный спектральный анализ
МСМ	– магнитно-силовая микроскопия
МЭМС	– микроэлектромеханическая система
НПМ	– нанопористый материал
НРС	– наноразмерная структура
НЭМС	– наноэлектромеханическая система
ОИ	– объект испытаний
ОС	– оптическая система
п.о.	– пара оснований (пара нуклеотидов)
ПАВ	– поверхностно-активное вещество; поверхностные акустические волны
ПК	– персональный компьютер
ПЛИС	– программируемая логическая интегральная схема
ПММА	– полиметилметакрилат
ПО	– программное обеспечение
ПЦР	– полимеразная цепная реакция
ПЭМ	– просвечивающая электронная микроскопия; просвечивающий электронный микроскоп
РНК	– рибонуклеиновая кислота
РРА	– рентгенорадиометрический анализ
РСМА	– рентгеноспектральный микроанализ
РЭМ	– растровая электронная микроскопия
САПР	– система автоматического проектирования
СБИС	– сверхбольшие интегральные схемы
СБОМ	– сканирующая ближнепольная оптическая микроскопия
СВД	– спектрометр волновой дисперсии
СВЧ	– сверхвысокие частоты
СЗМ	– сканирующая зондовая микроскопия
СПЗ	– стеклозеркальная поверхность
СТМ	– сканирующая туннельная микроскопия
СЭМ	– сканирующая электронная микроскопия; сканирующий электронный микроскоп
ТП	– технологический процесс
тРНК	– транспортная РНК
УФ	– ультрафиолет
ФД	– фотодиод
ЧЭ	– чувствительный элемент

- ЭВМ – электронная вычислительная машина
- ЭСМ – электростатическая силовая микроскопия
- CAD – Computer Aided Design
- DDE – Dynamic Data Exchange
- DSP – Digital Signal Processing
- DXF – Data Exchange Format
- ELISA – Enzyme-linked Immunosorbent Assay – иммуноферментный анализ
- FEA – Finite Element Analyze
- FRET – Fluorescence Resonance Energy Transfer – флюоресцентный резонансный перенос энергии
- HRP – Horseradish Peroxidase – пероксидаза хрена
- IgG – иммуноглобулин G
- ISE – Ion-Sensitive Electrode – ионочувствительный электрод
- ISFET – Ion-Sensitive Field-Effect Transistor – ионочувствительный полевой транзистор
- ITO – Indium tin oxide – оксид на основе индия и олова
- MRI – Magnetic Resonance Imaging – магнитно-резонансная томография
- NAD – Nicotinamide Adenine Dinucleotide – никотинамидадениндинуклеотид
- NADH – NAD, reduced form – никотинамидадениндинуклеотид, восстановленный
- nDEP – Negative Dielectrophoresis – отрицательный диэлектрофорез
- PDMS – Polydimethylsiloxane – полидиметилсилоксан (полимер)
- PEG – Polyethylene Glycol – полиэтиленгликоль
- PGA – Polyglycolic Acid – полигликолевая кислота
- PLA – Polylactic Acid – полимолочная кислота
- PTG – Protein G
- QCM – Quartz Crystal Microbalance – кварцевые микровесы
- SAM – Self-assembled Monolayer – самособирающийся монослой
- SCE – Saturated Calomel Electrode – каломельный электрод (электрод сравнения)
- SNP – Single-nucleotide polymorphism – однонуклеотидный полиморфизм

ВВЕДЕНИЕ

Дисциплина «Бионанотехнология» является комплексной, вариативной дисциплиной в программе подготовки специалистов по профилю «Нанотехнология». Вариативность определяется конкретной специализацией подготовки, одним из базовых УМК по дисциплине является УМК «Исследования нанокластеров на молекулярном уровне», который охватывает основные вопросы по построению и практическому применению сенсорных и измерительных систем для исследования нанокластеров и органических соединений средствами зондовой микроскопии, а также построению сложных наносистем на их основе.

УМК «Бионанотехнология» строится на основе оптимального соотношения теоретических и прикладных вопросов с обязательным участием студентов в самостоятельном исследовании особенностей процессов исследования нанокластеров на молекулярном уровне. Программа дисциплины направлена на решение задач, которые ставятся перед специалистами в современных условиях разработки и производства сенсорных устройств, требующих широких знаний как в области проектирования и технологии производства ЭС, так и в методах их сертификации и измерений. Лабораторные работы, включенные в состав дисциплины, спланированы таким образом, чтобы студенты могли осознать, закрепить и расширить знания, полученные на предшествующих им лекциях, а также смогли сами провести исследование нанокластеров и органических соединений при помощи самых современных методов.

Учитывая большое разнообразие измерительных методов, методологий и приборов для проведения исследований, в состав курса «Исследования нанокластеров на молекулярном уровне» включены лабораторные работы по основным методам измерений. Лабораторные работы ориентируют студентов на решение типовых задач исследования и анализа нанокластеров и методик проведения измерений, обладающих максимальной эффективностью. Темы лабораторных работ и их содержание связаны с формировани-

ем и развитием у будущих специалистов практических навыков разработки сложных систем для исследования нанокластеров, анализа результатов измерений и формулирования выводов по наиболее эффективному применению методов и средств для проведения подобных исследований.

В составе дисциплины предусмотрены теоретические разделы (вариативно несколько УМК), изучаемые студентами самостоятельно под контролем преподавателя. Содержание этих разделов направлено на усиление роли фундаментальных знаний в теоретической и профессиональной подготовке студента и способствует формированию фундаментальных системных знаний и развитию творческих способностей.

1. КОНСПЕКТ ЛЕКЦИЙ

Основная цель дисциплины: изучение основных концепций и методологий исследования основ бионаноинженерии. Материал курса является основой для проектирования сложных сенсорных систем на основе ДНК-чипов и др. в курсе по проектированию сенсоров.

Задачи дисциплины: формирование теоретических и практических навыков работы с методами и средствами по исследованию молекулярных соединений методами оптической и зондовой микроскопии, а также разработка прикладных методик.

1.1. ОСНОВЫ БИОНАНОИНЖЕНЕРИИ

Многие из проблем, стоящих сегодня перед работниками здравоохранения, имеют инженерный характер в виду того, что они вовлекают фундаментальные аспекты анализа устройств и систем, проектирования и практического применения – все эти аспекты лежат в основе самых важных для инженерной практики процессов. С медицинской точки зрения, соответствующие проблемы проектирования могут колебаться от очень сложных крупномасштабных конструкций, таких как проектирование и реализация автоматизированных клинических лабораторий, многофазных мониторинговых услуг (то есть центры, которые проводят большое количество тестов) и информационных систем больницы, к созданию относительно маленьких и простых устройств, таких как регистрация значений электродов и преобразователей, которые используются для контроля деятельности определенных физиологических процессов или в исследовании. Они охватывают трудности удаленного контроля и телеметрии и включают требования к машинам скорой по-

мощи, рабочим зонам и отделениям интенсивной терапии. Так как биомедицинская разработка использует понятия, знания и подходы фактически всех технических дисциплин (например, электрической, механической и химической технологии) для решения различных проблем здравоохранения, то возможностей взаимодействия между инженерами и профессионалами здравоохранения много и они различны.

Биоинженерия обычно определяется как ориентируемая на фундаментальные исследования деятельность, близко связанная с биотехнологией и генной инженерией, т. е. модификацией клеток или частей клеток животного или растения для их улучшения или развития новых микроорганизмов. Ясно, что биоинженеры окажут в будущем огромное влияние на качество человеческой жизни. Полный потенциал этой специальности трудно вообразить. Типичные цели таковы:

- ◆ развитие улучшенных разновидностей растений и животных для производства пищи;
- ◆ изобретение новых медицинских диагностических тестов на болезни;
- ◆ производство синтетических вакцин из клеток клона;
- ◆ биоэкологическая разработка для защиты человека, животных и жизни на Земле от ядов и загрязнителей;
- ◆ исследование поверхностных белковых взаимодействий;
- ◆ развитие терапевтических белков и моноклональных антител.

Широта деятельности биомедицинских инженеров существенна. Область их интересов увеличилась от простой заинтересованности в развитии медицинских устройств в 1950-х и 1960-х гг. до расширения совокупности видов деятельности. Как показано на рис. 1.1, биомедицинские разработки теперь используются во многих новых областях.

Эти области включают:

- ◆ технический анализ системы;
- ◆ обнаружение, измерение и контроль физиологических сигналов (биодатчики и биомедицинский инструментарий);
- ◆ диагностическая интерпретация биоэлектрических данных с помощью методов, обрабатывающих сигнал;
- ◆ терапевтические и восстановительные процедуры;
- ◆ устройства для замены или улучшения физических функций (искусственные органы);

- ◆ компьютерный анализ связанных с пациентом данных и клиническое принятие решения (медицинская информатика и искусственный интеллект);
- ◆ медицинское отображение (графический показ анатомических деталей или физиологических функций);
- ◆ создание новых биологических продуктов (биотехнология и создание тканей).

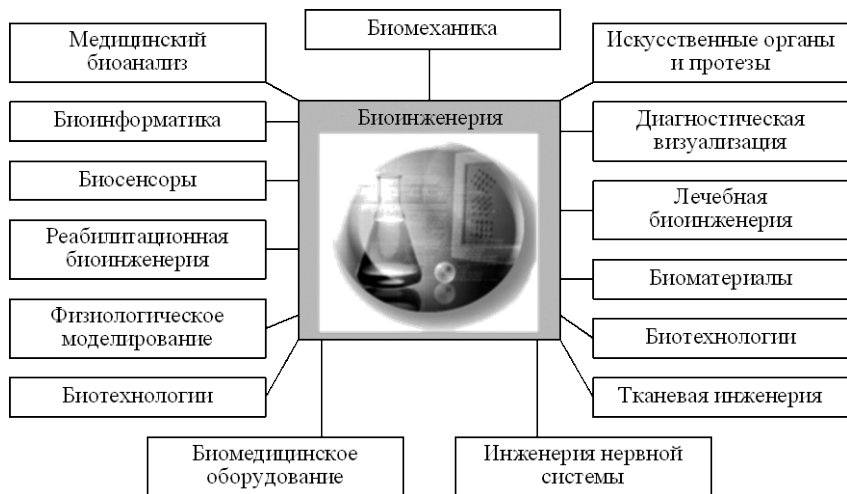


Рис. 1.1. Области применения биоинженерии

Основные цели биомедицинских инженеров включают:

- ◆ исследование новых материалов для внедрения и искусственных органов;
- ◆ развитие новых диагностических инструментов для исследования крови;
- ◆ программное обеспечение для анализа медицинских данных;
- ◆ медицинский анализ опасных веществ и соединений;
- ◆ развитие новых диагностических систем отображения;
- ◆ проектирование систем телеметрии для мониторинга пациентов;
- ◆ проектирование биомедицинских датчиков;
- ◆ развитие экспертных систем для диагноза болезней;
- ◆ проектирование систем управления с обратной связью для управления препаратами;

- ◆ моделирование физиологических систем человеческого тела;
- ◆ проектирование инструментов для спортивной медицины;
- ◆ разработка новых зубных материалов;
- ◆ исследование биомеханики человеческого тела;
- ◆ развитие материала, который будет использоваться как замена для человеческой кожи.

1.2. МЕТОДЫ ФОРМИРОВАНИЯ ОРГАНИЧЕСКИХ НАНОКЛАСТЕРОВ

В настоящее время при проведении молекулярной диагностики все чаще находят применение методы на основе взвешивания микрообъектов при помощи микроскопических чувствительных элементов. Однако часто существует необходимость перед проведением реальных измерений и исследований провести моделирование процесса в реальном времени. Подобная задача весьма сложна с технической точки зрения ввиду очень большого количества вычислений и недоступна для большей части лабораторий из-за отсутствия необходимой вычислительной техники и доступного ПО для реализации поставленной задачи. Однако сейчас стала доступна платформа, позволяющая при сравнительно небольшой цене получить достаточную мощность вычислений, – платформа на базе процессора Cell.

В настоящее время зондовая микроскопия становится одним из основных методов решения проблем молекулярной диагностики. С помощью атомно-силовых микроскопов задачи прямой визуализации ДНК (рис. 1.2), отдельных вирусов, белков, структуры и свойств клеточных мембран из категории высшего экспериментального искусства решаются максимально эффективно. В работах [18, 24, 42, 44, 52, 55, 68, 71, 80, 82] рассмотрены основные принципы построения аппаратно-программных комплексов на основе микрокантилеверов, но уделено мало внимания моделированию этого процесса. В работах [1, 4, 11, 13, 14, 23, 30, 32, 35, 39, 42, 45, 50–52, 55, 56, 59, 63, 64, 67, 69, 70–72, 78, 80, 87, 92, 93] приведены примеры моделирования процесса взвешивания, а также процесса биолого-химического взаимодействия между кантилевером и раствором исследуемого образца. Тем не менее остается достаточно важным вопрос о применимости метода молекулярной диагности-

ки на основе микрокантилеверов как наиболее подходящего для взвешивания таких микрообъектов, как ДНК, вирусы, токсины и т. д. В работах [2, 5, 9, 12, 15–17, 25–27, 36, 37] приведено подробное описание каждого из основных методов молекулярной диагностики, рассмотрены их преимущества и недостатки. В данной работе основное внимание уделено методу молекулярной диагностики на основе микрокантилеверов и его сравнению с основными методами диагностики, а также методам и средствам моделирования кантилеверов.

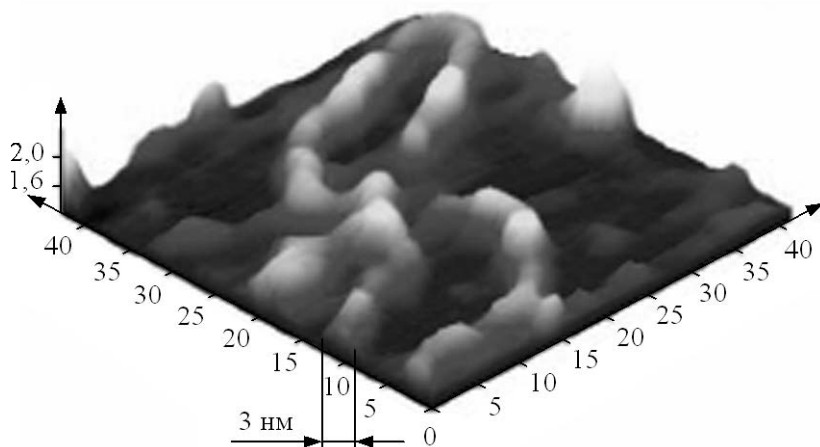


Рис. 1.2. СЗМ-изображение ДНК

(получено в Институте биоорганической химии, Москва, Россия)

Развитие атомно-силовой микроскопии (АСМ) и возникновение микро- и наномеханических систем привели к созданию сенсорных методов АСМ [68]. Атомно-силовой микроскоп исследует поверхность с помощью специального зонда, называемого кантилевером, который представляет собой микроскопическую иглу на гибкой балке. Длина балки составляет 0,1–0,3 мм, ее видно невооруженным глазом. В общем случае для регистрации положения кантилевера на него направляют луч лазера, отраженный луч падает на фотодиод. Такая лазерно-оптическая система позволяет отслеживать отклонение кантилевера с высокой точностью: смещение на 1 нм вызывает смещение пятна на фотодиоде, которое в типичных конструкциях в 500–1000 раз больше и составляет 0,5–1 мкм.

Фотодиод обычно состоит из четырех секций, разность сигналов от его верхней и нижней половин позволяет судить о величине отклонения кантилевера [80].

Для сенсорных приложений АСМ игла на конце кантилевера и система перемещения образца не важны. Существенна именно система контроля положения консоли (балки). С ее помощью могут быть зарегистрированы поверхностные механические напряжения, приводящие к изгибу кантилевера. В рамках такого подхода можно рассматривать систему для регистрации отклонений кантилевера как систему измерения натяжения тонких пленок.

Такая система, как, например, «Атомные весы», позволяет измерять натяжения сформированных на поверхности кантилевера пленок с точностью до 10^{-4} Н/м, в типичных экспериментах такая точность измерений обеспечивает относительную погрешность 10% [52].

На рис. 1.3 представлена функциональная схема устройства и фотография кантилевера, сделанная на сканирующем электронном микроскопе. В используемой нами конфигурации системы после отражения от кантилевера луч лазера падает на зеркало, и только потом на фотодиод, очевидно, это не влияет на суть физического процесса.

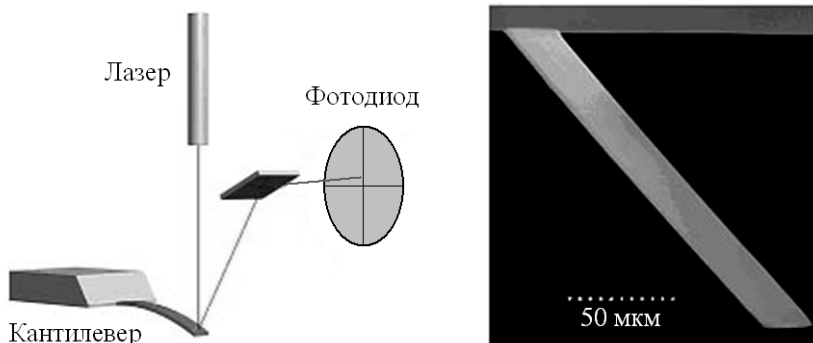


Рис. 1.3. Схема измерения статического изгиба кантилевера

Поверхностное натяжение σ вызывает смещение конца кантилевера на величину Δz , при этом выполняется закон Стоуни [83]:

$$\Delta z = \frac{3(1-\nu)L^2}{Et^2} \sigma,$$

где L и t – соответственно длина и толщина кантилевера; E – модуль упругости материала, из которого он изготовлен; ν – коэффициент Пуассона.

На одну из сторон кантилевера можно нанести соединение с функциональными группами, которые будут улавливать из раствора молекулы определенного вещества. Например, если на поверхности кантилевера иммобилизовать антитела, они будут селективно взаимодействовать с антигенами. При иммобилизации одноцепочечных ДНК они будут связываться с комплементарными цепями из раствора. Все процессы адсорбции, десорбции и химические реакции на поверхности кантилевера приводят к его изгибу, который регистрируется описанной выше системой.

Для регистрации малых масс были предложены исследователями из Massachusetts Institute of Technology микроскопические резонансные системы, которые, по оценкам, позволят достичь чувствительности в 1 дальтон = $1,66 \cdot 10^{-27}$ кг [93]. Общая идея резонансных весов состоит в измерении собственной частоты некоторой колебательной системы и ее изменения при присоединении массы. При этом сами резонансные системы могут основываться на различных физических принципах: могут использовать пьезокварцевые элементы, тонкие проволоки, углеродные нанотрубки или пленки.

В нашей работе резонатором являлась балка кантилевера атомно-силового микроскопа. Суть предлагаемого подхода заключается в динамическом измерении свойств этой балки. В этом случае в процессе измерения к кантилеверу прикладываются различные частоты с небольшим шагом, а относительная частота колебаний измеряется при помощи системы, схожей с системой измерения частоты АСМ. В данной работе предлагается разработать математическую модель колебаний консоли кантилевера для реализации моделирования резонансной системы. Такой подход позволяет использовать в модели только геометрические параметры балки, а также физические свойства материала, из которого она изготовлена.

На рис. 1.4 представлено изображение кантилевера с прикрепленной к нему частицей сорбента, полученное на сканирующем электронном микроскопе.

В случае применения кантилеверов для молекулярной диагностики с поверхностью взаимодействует острое зонда. Будем считать, что именно к его вершине приложена сосредоточенная сила, действующая со стороны исследуемого образца.

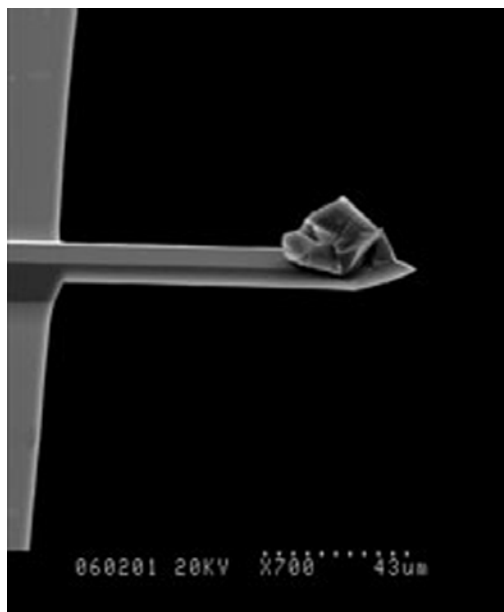


Рис. 1.4. Кантилевер с биомассой [91]

Сила, действующая на зонд, зачастую имеет не только вертикальную составляющую, но и компоненты, лежащие в горизонтальной плоскости. Поэтому острие кантилевера может отклоняться не только вдоль оси Oz , но и в двух других направлениях – Ox и Oy . Вертикальную составляющую F_z назовем *нормальной силой*, поперечную F_x и продольную F_y – *латеральными силами*.

Так как в АСМ о силе воздействия образца на кантилевер судят по деформации последнего, то для определения силы необходимо знать жесткость деформаций кантилевера в различных направлениях. Считаем, что вектор отклонения острия кантилевера Δ (имеющий компоненты Δ_x , Δ_y , Δ_z) связан с приложенной к зонду силой \mathbf{F} линейно, т. е. по закону Гука:

$$\Delta = \mathbf{C}^{-1}\mathbf{F}. \quad (1.1)$$

«Коэффициентом» пропорциональности служит тензор второго ранга \mathbf{C} , который назовем *тензором обратной жесткости* [69]. Эта величина содержит всю информацию об упругих свойствах кантилевера.

Чтобы найти компоненты тензора \mathbf{C} , необходимо решить задачу о статических деформациях кантилевера под действием сил, направленных по разным осям. Для наглядности запишем формулу (1.1) в матричном виде:

$$\begin{pmatrix} \Delta x \\ \Delta y \\ \Delta z \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} c_{xx} & c_{xy} & c_{xz} \\ c_{yx} & c_{yy} & c_{yz} \\ c_{zx} & c_{zy} & c_{zz} \end{pmatrix} \begin{pmatrix} F_x \\ F_y \\ F_z \end{pmatrix}. \quad (1.2)$$

Заметим, что оптическая система регистрирует не отклонение острия кантилевера, а наклон верхней поверхности кантилевера вблизи его свободного конца. Непосредственно измеряются два угла: отклонение нормали от вертикали в плоскости Oyz (угол α) и в ортогональном направлении – плоскости Oxz (угол β).

Для удобства расчетов можно вместо (1.2) записать матричное соотношение, связывающее углы α и β непосредственно с компонентами силы \mathbf{F} :

$$\begin{pmatrix} \alpha \\ \beta \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} b_{\alpha x} & b_{\alpha y} & b_{\alpha z} \\ b_{\beta x} & b_{\beta y} & b_{\beta z} \end{pmatrix} \begin{pmatrix} F_x \\ F_y \\ F_z \end{pmatrix}. \quad (1.3)$$

Однако введенная матрица, в отличие от тензора \mathbf{C} , не содержит полной информации об упругих свойствах кантилевера.

В данной работе решаются задачи построения многомасштабной модели резонансных характеристик кантилевера на основе аналитической модели его колебаний, что в дальнейшем позволит перейти к сеточным моделям, позволяющим получить большую точность, а также реализовать модель типа «объект–среда».

1.3. СИСТЕМАТИЗАЦИЯ И КЛАССИФИКАЦИЯ МЕТОДОВ ИССЛЕДОВАНИЯ НАНОКЛАСТЕРОВ

1.3.1. СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА МЕТОДОВ МОЛЕКУЛЯРНОЙ ДИАГНОСТИКИ

В настоящий момент существует достаточно много различных методов молекулярной диагностики, каждый из которых обладает

своими преимуществами и недостатками. Среди основных можно отметить: элементный анализ [18, 24, 25], спектральный анализ [42, 68, 80], гравиметрию [55, 71], титриметрию [30, 39, 52], активационный анализ [17, 26, 44, 51, 82], атомно-флюоресцентный анализ [37, 63], люминесцентный анализ [16, 56, 59, 93], спектроскопию [9], дифракционные методы [42, 69, 78], рентгенорадиометрический анализ [50, 87], электронную микроскопию [42, 72], комплексный метод на основе кантилеверов [5, 15].

Обобщенная классификация методов представлена на рис. 1.5, а их сравнительный анализ – в табл. 1.1.

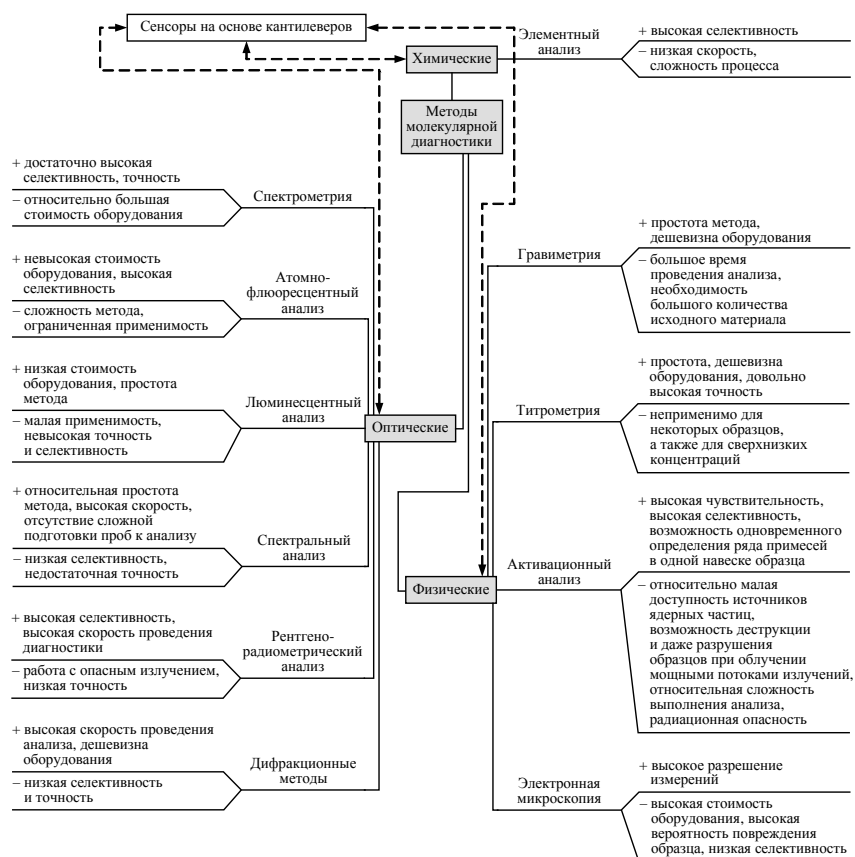


Рис. 1.5. Обобщенная классификация методов диагностики

Таблица 1.1

Сравнительный анализ методов диагностики

Метод	Преимущества	Недостатки
1	2	3
Химические методы		
<p><i>Элементный анализ</i> – качественное обнаружение и количеств. определение элементного состава объектов материального мира [25]. Количественный элементный анализ основан на измерении какого-либо физического свойства изучаемой пробы или продукта ее преобразования в зависимости от содержания определяемого элемента: интенсивности характерных спектральных линий, значения какой-либо ядерно-физической или электрохимической характеристики и т. п. Первыми методами количественного элементного анализа были гравиметрия и титриметрия, которые и сейчас по точностным характеристикам часто превосходят инструментальные методы. По точности с ними успешно конкурируют только кулонометрия и электрогравиметрия</p>	<p>Исследование любых веществ и соединений, недорогой, высокая селективность</p>	<p>Сложный и долгий для реализации, если вещество не известно</p>
Оптические методы		
<p><i>Спектральный анализ</i> – совокупность методов определения состава (например, химического) объекта, основанных на изучении спектров взаимодействия материи с излучением, включая спектры электромагнитного излучения, радиации, акустических волн, распределения по массам и энергиям элементарных частиц и др. Атомы каждого химического элемента имеют строго определенные резонансные частоты, в результате чего именно на этих частотах они излучают или поглощают свет. Это приводит к тому, что в спектроскопе на спектрах видны линии (темные или светлые) в определенных местах, характерных для каждого вещества. Интенсивность линий зависит от количества вещества и его состояния</p>	<p>Простота выполнения, высокая скорость, отсутствие сложной подготовки проб к анализу, незначительное количество вещества (10–30 мг), необходимого для анализа на большое число элементов</p>	<p>Недостаточная селективность при реализации молекулярной диагностики, низкая точность</p>
<p><i>Атомно-флуоресцентный анализ</i> – метод количественного элементного анализа по атомным спектрам флуоресценции [10]. Пробу анализируемого вещества превращают в атомный пар и облучают для возбуждения флуоресценции таким излучением, которое поглощают атомы только определяемого элемента (длина волны излучения соответствует энергии электронных переходов этих атомов). Часть возбужденных</p>	<p>Высокая селективность метода, простота автоматизации, невысокая стоимость аппаратуры</p>	<p>Недостаточная точность метода, сложность измерения микроскопических объектов</p>

Продолжение табл. 1.1

1	2	3
<p>атомов излучает свет – сигнал, регистрируемый спектрофотометрами. Обычно используют резонансную флюоресценцию, при которой длины волн поглощенного и излученного света одинаковы. Для возбуждения флюоресценции используют интенсивные лампы с линейчатым или непрерывным спектром, а также лазеры с перестраиваемой длиной волны. Для регистрации спектра флюоресценции применяют светосильные спектрофотометры с большим углом. Измеряют интенсивность излучения, распространяющегося под прямым углом к возбуждающему излучению (в этом направлении интенсивность рассеянного света обычно минимальна). Методом можно определять около 65 элементов; пределы обнаружения достигают 10^{-6}–$10^{-8}\%$ (в порошках) и 10–3 нг/мл (в растворах)</p>		
<p><i>Люминесцентный анализ</i> – совокупность методов анализа, основанных на явлении люминесценции [29]. Наибольшее распространение получил анализ, основанный на фотолюминесценции исследуемого вещества, возбуждаемой УФ-излучением. Источниками последнего служат кварцевые газоразрядные ртутные или ксеноновые лампы и УФ-лазеры. Регистрируют люминесценцию визуально, фотографически или фотоэлектрически с помощью спектрографов, фотометров и спектрофотометров</p>	<p>Невысокая стоимость, простота измерения и гибкость метода</p>	<p>Невысокая точность и селективность</p>
<p><i>Спектроскопия</i> – раздел физики, изучающий спектры электромагнитного излучения. Спектры возникают при переходах между уровнями энергии в атомах, молекулах и образованных из них макроскопических системах [75]. Различают спектры испускания (эмиссионные), поглощения (абсорбционные), отражения, рассеяния и люминесценции, которые изучают соответствующие виды спектроскопии. В зависимости от природы объекта исследования выделяют атомную и молекулярную спектроскопию, а также спектроскопию вещества в конденсированном состоянии, включая спектроскопию кристаллов. В соответствии с видами движения в молекуле молекулярную спектроскопию делят на электронную, колебательную и вращательную.</p>	<p>Гибкость, простота проведения эксперимента, скорость</p>	<p>Невысокая точность и селективность</p>

Продолжение табл. 1.1

1	2	3
<p>Аналогично различают электронную и колебательную спектроскопию кристаллов.</p> <p>По диапазону длин волн (или частот) электромагнитного излучения выделяют радиоспектроскопию, микроволновую спектроскопию, оптическую, рентгеновскую спектроскопию и γ-спектроскопию [75]. В каждом разделе спектроскопии используются свои приборы для получения, регистрации и измерения спектров</p>		
<p><i>Дифракционные методы</i> исследования структуры вещества основаны на изучении углового распределения интенсивности рассеяния исследуемым веществом излучения – рентгеновского (в том числе синхротронного), потока электронов или нейтронов и мессбауэровского g-излучения. Соответственно различают рентгенографию, электронографию, нейтронографию и мессбауэрографию. Во всех случаях первичный, чаще всего монохроматический пучок направляют на исследуемый объект и анализируют картину рассеяния. Рассеянное излучение регистрируется фотографически или с помощью счетчиков. Поскольку длина волны излучения составляет обычно не более 0,2 нм, т. е. соизмерима с расстояниями между атомами в веществе (0,1–0,4 нм), то рассеяние падающей волны представляет собой дифракцию на атомах. По дифракционной картине можно в принципе восстановить атомную структуру вещества. Теория, описывающая связь картины упругого рассеяния с пространственным расположением рассеивающих центров, для всех излучений одинакова. Однако, поскольку взаимодействие разного рода излучений с веществом имеет разную физическую природу, конкретный вид и особенности дифракционной картины определяются разными характеристиками атомов</p>	Высокая точность	Невысокая селективность метода
<p><i>Рентгенорадиометрический анализ (РРА)</i> – метод элементного анализа, основанный на измерении интенсивности характеристического рентгеновского излучения, возникающего в результате взаимодействия ионизирующего излучения радионуклидного источника с электронами внутренних оболочек атомов определяемых</p>		

Продолжение табл. 1.1

1	2	3
<p>элементов. Существуют два варианта рентгено-радиометрического анализа – флюоресцентный и абсорбционный. Первый получил более широкое распространение. В этом случае регистрируют характеристическое рентгеновское излучение (обычно K- или L-серии), испускаемое возбужденными атомами определяемого элемента. Энергия этого излучения зависит от атомного номера элемента, а интенсивность пропорциональна его концентрации. Для возбуждения характеристического рентгеновского излучения наиболее часто применяют источники низкоэнергетического g- или рентгеновского излучения. В некоторых случаях (например, при определении легких элементов) предпочтительнее применять источники α-частиц. Характеристическое рентгеновское излучение элементов пробы регистрируют детектором, преобразующим энергию рентгеновских квантов в электрические импульсы. Амплитудный анализатор выделяет импульсы с амплитудой, соответствующей энергии квантов характеристического рентгеновского излучения определяемого элемента. Количество импульсов, регистрируемых в единицу времени, пропорционально концентрации элемента</p>	<p>Метод позволяет проводить неразрушающий анализ, результаты которого не зависят от химического и агрегатного состояния анализируемого объекта</p>	<p>Невысокая точность и селективность метода применительно к органическим микрообъектам</p>
Физические методы		
<p><i>Гравиметрия</i> – совокупность методов количественного анализа, основанных на измерении массы веществ. Применяют для определения практически любых компонентов анализируемого объекта, если только они присутствуют в объекте не в следовых количествах. Из части исследуемого вещества известной массы (навески) определяемый компонент выделяют тем или иным способом в виде какого-либо соединения. Как правило, навеску твердого вещества переводят в раствор, из которого с помощью подходящего реагента выделяют определяемый компонент в виде практически нерастворимого вещества (форма осаждения); осадителем может служить вещество, образующееся в растворе в результате химической реакции (так называемое гомогенное осаждение). Осадок отделяют фильтрованием, декантацией или другими способами, отмывают от следов сорбированных</p>	<p>Один из самых первых методов молекулярной диагностики</p>	<p>Невысокая точность и селективность, сложность подготовки образцов, трудоемкость</p>

Продолжение табл. 1.1

1	2	3
компонентов, часто пересаждают. Затем его высушивают или прокаливают до образования устойчивого соединения строго определенного состава (весовая форма), массу которого измеряют		
<p><i>Титриметрия</i> – совокупность методов количественного анализа, основанных на измерении количества реагента, необходимого для взаимодействия с определяемым компонентом в растворе или газовой фазе в соответствии со стехиометрией химических реакций между ними [2, 9]. При проведении эксперимента можно контролировать либо объем, либо массу добавляемого титранта – раствора или газовой смеси с точно известной концентрацией реагента. Наибольшее распространение получила титриметрия для экспрессного определения высоких и средних концентраций веществ в растворах, в том числе неводных. Точно известный объем V анализируемого раствора с помощью пипетки помещают в коническую колбу и к нему прибавляют небольшими порциями титрант из бюретки (калиброванная стеклянная трубка с клапанным устройством, например краном, на оттянутом конце), тщательно перемешивая раствор в колбе. Эту операцию называют титрованием. Массовые титриметрические анализы обычно проводят с помощью титраторов</p>	Малая трудоемкость, простота аппаратного оформления; довольно высокая точность	Неприменимость для проведения молекулярной диагностики микробъектов
<p><i>Активационный анализ</i> – метод качественного и количественного элементного анализа вещества, основанный на активации ядер атомов и исследовании образовавшихся радиоактивных изотопов (радионуклидов) [15]. Вещество облучают ядерными частицами (тепловыми или быстрыми нейтронами, протонами, дейтронами и т. д.) или квантами. Затем определяют вид, т. е. порядковый номер и массовое число, образовавшихся радионуклидов по их периодам полураспада $T_{1/2}$ и энергиям излучения E, которые табулированы. Поскольку ядерные реакции, приводящие к образованию тех или иных радионуклидов, обычно известны, можно установить, какие атомы были исходными [5, 6, 15]</p>	Высокая чувствительность, возможность в ряде случаев проводить определение без разрушения образца, высокая избирательность, возможность одновременного определения ряда примесей в одной навеске образца	При работе с микробъектами существует опасность разрушить его в процессе измерения

Окончание табл. 1.1

1	2	3
<p>Электронная микроскопия – совокупность электронно-зондовых методов исследования микроструктуры твердых тел, их локального состава и микрополей (электрических, магнитных и др.) с помощью электронных микроскопов – приборов, в которых для получения увеличенных изображений используют электронный пучок.</p> <p>Электронная микроскопия включает также методики подготовки изучаемых объектов, обработки и анализа результирующей информации. Различают два главных направления электронной микроскопии: трансмиссионную (просвечивающую) и растровую (сканирующую), основанных на использовании соответствующих типов электронных микроскопов. Они дают качественно различную информацию об объекте исследования и часто применяются совместно. Известны также отражательная, эмиссионная, Оже-электронная, лоренцова и иные виды электронной микроскопии, реализуемые, как правило, с помощью приставок к трансмиссионным и растровым электронным микроскопам</p>	Высокая точность, гибкость	Существует опасность разрушить образец
Комплексные методы		
Метод на основе кантилеверов	Позволяет достичь точности до 10^{-27} кг, высокая селективность	Сложная технология получения кантилеверов

В общем случае все методы молекулярной диагностики можно поделить на 4 вида: химические, физические, оптические и комбинированные. Химические методы основаны на применении определенного набора реагентов для определения состава и массы вещества. Оптические методы используют свойства молекул, связанные с искажением параметров света, проходящего через них. Физические методы основаны на применении различных физических эффектов и явлений для получения информации об изучаемом объекте. Комплексные методы находятся на стадии развития, приборы создаются в исследовательских лабораториях для конкретных задач.

Каждый из указанных выше методов относится либо к физическим, либо химическим, либо оптическим методам диагностики. В работе рассматривается метод, объединяющий в себе преимуще-

ства всех трех методов молекулярной диагностики: используется химическая реакция на заданный объект, в процессе реакции измеряются физические свойства чувствительного элемента – кантилевера, а сам процесс измерения – оптический.

1.3.2. КОНЦЕПЦИЯ КОМПЛЕКСНОГО МЕТОДА И ЕГО ПРЕИМУЩЕСТВА

Как видно из рис. 1.6, метод диагностики на основе микрокантилеверов занимает особое положение ввиду того, что объединяет в себе преимущества всех видов методов диагностики. В случае применения метода молекулярной диагностики на основе зондовой микроскопии повышается как точность получаемых результатов, так и их достоверность. Это происходит за счет применения специальных зондов, точность которых заметно выше, а также полигонов, позволяющих значительно усилить принимаемый сигнал. На рис. 1.6 приведена схема использования комбинированного метода на основе зондовой микроскопии.

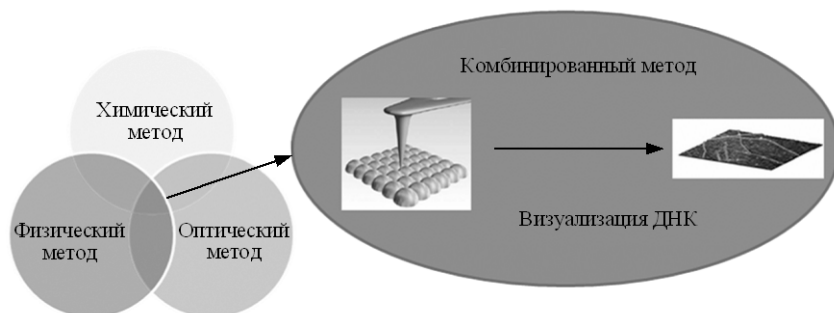


Рис. 1.6. Комплексный метод диагностики

Теоретические исследования, проведенные в [11, 13, 35, 45, 55, 92] показали, что при использовании данного метода можно достичь точности измерения пристыковавшейся к кантилеверу массы до 10^{-27} кг, что недостижимо ни для одного из методов из табл. 1.1. Более того, использование сильных сторон всех трех типов диагностики позволяет повысить не только точность и селективность, но и гибкость метода, которая позволяет решать задачи взвешивания микроскопических органических объектов в различных условиях.

1.3.3. ПРИНЦИПЫ ПОСТРОЕНИЯ АПК НА ОСНОВЕ КОМПЛЕКСНОГО МЕТОДА

Рассмотрим схему реализации аппаратно-программного комплекса на базе микрокантилеверов, где проводится измерение резонансной частоты (рис. 1.7). Измерения проводятся при помощи пьезостолика, находящегося в вакуумной камере. На кантилевер падает луч лазера, отражается от его поверхности и попадает на ПЗС. Для точного позиционирования лазера используется оптический микроскоп. При помощи генератора задающей частоты на столик подаются вибрации в заданном диапазоне и с заданным шагом изменения частоты. При достижении резонансной частоты кантилевер начинает совершать колебания с более высокой амплитудой, что регистрируется повышением напряжения на фотодетекторе. После прохождения биологической активации снова измеряется резонансная частота. При увеличении массы кантилевера его резонансная частота уменьшается, таким образом можно измерить пристыковавшуюся массу и точно идентифицировать присоединенное вещество.

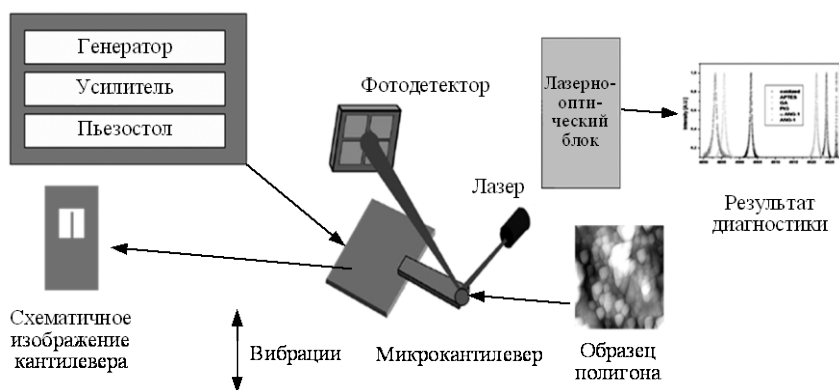


Рис. 1.7. Схема измерения резонансной частоты

Подобная схема измерения резонансной частоты применяется при работе с АСМ. Она позволяет косвенным методом найти резонансную частоту, при которой амплитуда колебаний, а следовательно, и напряжение на фотодетекторе максимальны. Однако для предельно точного нахождения резонансной частоты необходимо

провести моделирование с максимальной точностью частотных характеристик кантилевера.

1.3.4. АНАЛИЗ КОНСТРУКТИВНОЙ РЕАЛИЗАЦИИ КАНТИЛЕВЕРОВ

Общие положения конструктивно-технологической реализации кантилеверов. *Кантилевер* (калька с английского cantilever, буквально – консоль) – устоявшееся название наиболее распространенной в сканирующей атомно-силовой микроскопии конструкции микромеханического зонда [11]. Кантилевер представляет собой массивное прямоугольное основание, размерами примерно $1,5 \times 3,5 \times 0,5$ мм, с выступающей из него балкой (собственно кантилевером) шириной порядка 0,03 мм и длиной от 0,1 до 0,5 мм. Одна из сторон балки является зеркальной, что позволяет использовать оптическую систему контроля изгиба кантилевера. На противоположной стороне балки на свободном конце находится игла, взаимодействующая с измеряемым образцом. Радиус острия иглы промышленных кантилеверов находится в пределах 5–50 нм, лабораторных – от 1 нм. Как правило, вся конструкция, за исключением, быть может, иглы, является кремниевым монокристаллом. Также кантилеверы изготавливают из нитрида кремния (SiN) или полимеров. Процесс производства схож с производством кремниевых электронных приборов и включает сухое либо жидкофазное вытравливание подложки. Таким образом, кантилеверы удобны для массового производства. Прототипом для такого рода конструкции послужили иглы звукоснимателя. Ниже мы рассмотрим основные конструктивные реализации кантилеверов.

Классификация кантилеверов по принципу действия. Кантилеверы можно разделить по их применению в различных методах микроскопии. На рис. 1.8 представлена такая классификация.

Так, кантилеверы для сканирующей туннельной микроскопии должны быть проводящими. Часто кантилеверы покрывают специальным отражающим покрытием из золота или платины для повышения коэффициента отражения и, как следствие, повышения точности измерения их резонансной частоты. Для проведения бесконтактных методов измерения применяют кантилеверы без наконечника. Они также могут быть с отражающим покрытием и без него. Рассмотрим подробнее различные виды кантилеверов. В табл. 1.2 показаны их основные типы согласно схеме на рис. 1.8.

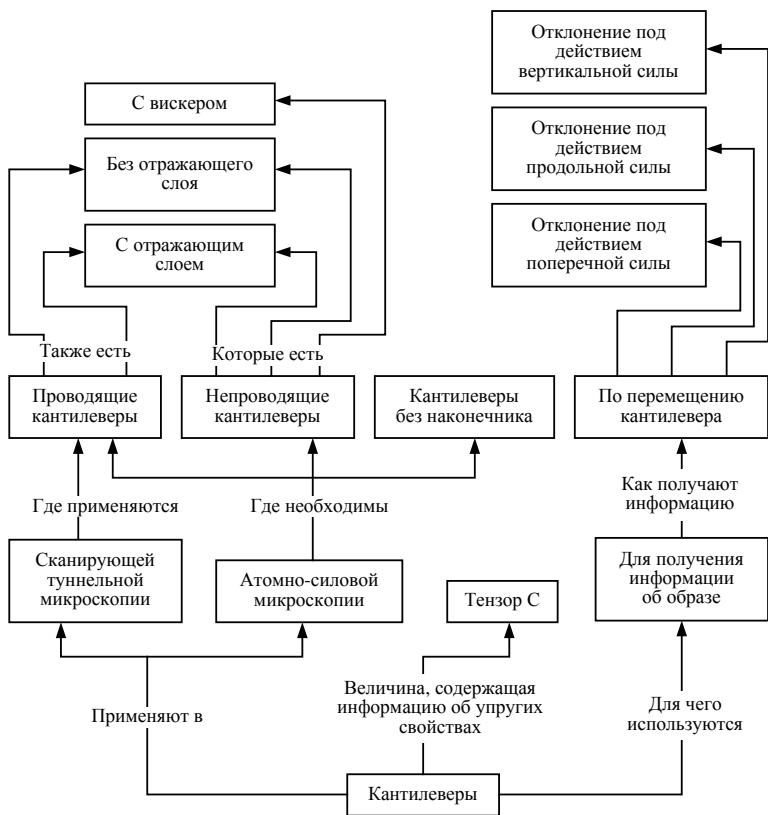
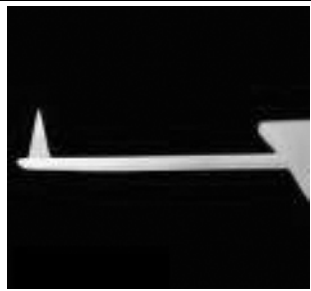
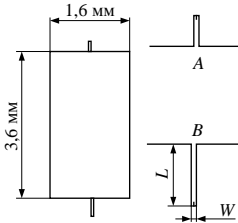
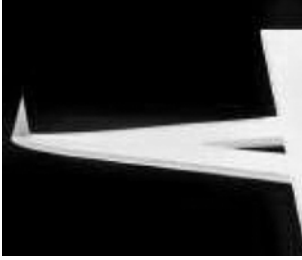
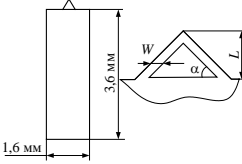
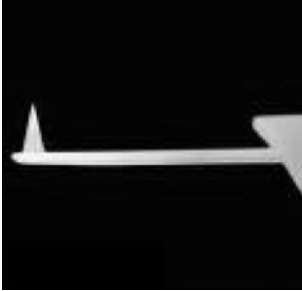
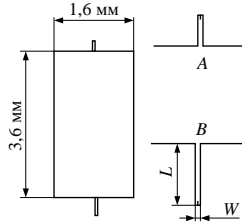
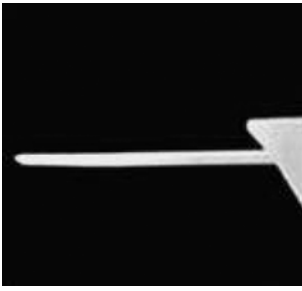
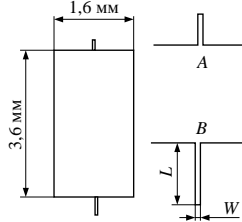
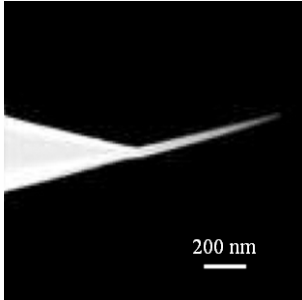
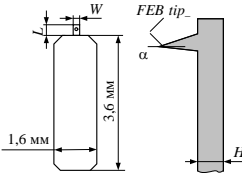


Рис. 1.8. Сводная классификация кантилеров

Таблица 1.2

Сводная таблица конструктивных реализаций кантилеров

Рисунок	Схема	Описание
1	2	3
		<p>Кантилер с прямоугольной балкой без отражающего слоя и наконечником</p>

1	2	3
		<p>Кантилевер с треугольной балкой без отражающего слоя и наконечником</p>
		<p>Кантилевер с прямоугольной балкой с отражающим слоем и наконечником</p>
		<p>Кантилевер с прямоугольной балкой без отражающего слоя и наконечника</p>
		<p>Кантилевер с прямоугольной балкой и вискером на конце наконечника</p>

Каждый из приведенных выше типов кантилеверов решает отдельные задачи зондовой микроскопии, для задач молекулярной диагностики применяют кантилеверы без наконечника. Такая конструкция позволяет избежать повреждения микрообъектов, а также существенно проще для моделирования.

Классификация конструктивной реализации кантилеверов.

Игла звукоснимателя является первым звеном в канале воспроизведения грамзаписи. К этой детали подвижной системы звукоснимателя, находящейся в непосредственном контакте с микроскопическим рельефом канавки, предъявляются особые требования с тем, чтобы получить, возможно, более точное копирование иглой модуляции канавки в рабочем диапазоне частот и обеспечить достаточный срок службы самой иглы и пластинки.

В патефонах и звукоснимателях ранних конструкций применялись стальные конические иглы с рабочей частью в виде полусферы. Такие иглы были пригодны для непрерывного использования в течение примерно 5 мин, иными словами, к концу проигрывания одной стороны 30-сантиметровой пластинки на 78 об./мин игла имела заметные следы износа и во избежание порчи пластинки и искаженного звучания должна была заменяться. Кроме этого выпускались иглы для многократного проигрывания из твердых сплавов и корунда. Такие иглы требовали замены после 3–5 часов использования. Среди коллекционеров пластинок известны также бамбуковые, фибровые и другие «мягкие» иглы, применяющиеся из соображений сохранности пластинок и уменьшения помех при их проигрывании. На деле иллюзия уменьшения шума обуславливается неспособностью иглы воспроизводить высокие частоты из-за неудовлетворительной формы острия и его быстрой деформации. До появления легких магнитных звукоснимателей бамбуковые иглы использовались также при контроле металлических оригиналов.

С появлением LP встала необходимость разработки новых игл для звукоснимателей. Большая длительность проигрывания, малый уровень записи, миниатюрные линейные размеры канавки требовали подбора материала для игл, способного обеспечить длительный срок службы и допускающего обработку до высокой чистоты поверхности. Этим требованиям отвечали алмаз и сапфир.

Наиболее простыми в изготовлении и поэтому недорогими были и остаются сферические иглы (рис. 1.9). Радиус закругления острия игл первых звукоснимателей для долгоиграющих пласти-

нок был 15–20 мкм. По мере совершенствования записи и расширения ее частотного диапазона до 20 кГц и выше возникла необходимость уменьшения радиуса рабочей части, так как сферические иглы с большим радиусом просто не могли реализовать все возможности записи. Однако уменьшение радиуса приводит к уменьшению площади контакта игла–канавка и, следовательно, к повышенному давлению в месте контакта и к необратимым деформациям материала пластинки. К примеру, при прижимной силе звукоснимателя 0,03 Н (3 г) давление на стенку канавки может достигать более 100 кг/мм^2 .

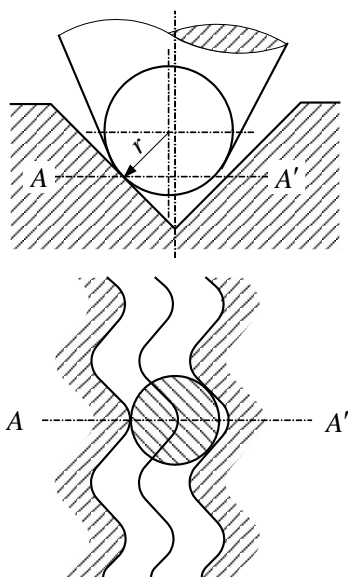


Рис. 1.9. Сферическая игла плохо отслеживает модуляцию канавки в местах с высоким уровнем записи [24]

К счастью, материал современных пластинок до определенной степени хорошо противостоит кратковременным деформациям, возникающим при проигрывании. Форма канавки восстанавливается немедленно или через небольшое время после снятия нагрузки (т. е. по прекращении контакта между иглой и канавкой). Пластмасса, из которой изготавливаются диски, состоит из синтетических смол с добавками, растворяющимися или плавящимися в них. Наиболее широкое применение получила винилитовая смола – сополимер винилхлорида с винилацетатом. Она составляет порядка

97% среди компонентов пластиночной массы, в которую в незначительных пропорциях добавляются различные стабилизаторы, смазки, красители и прочие присадки, в зависимости от рецептуры производителя.

Ограничение возможности уменьшения радиуса иглы, с тем чтобы избежать превышения допустимого давления на стенки канавки, рождает другую проблему. На пиках модуляции игла физически не может пройти по нужной траектории, отслеживая рельеф обеих стенок канавки. В сужениях, особенно при недостаточной прижимной силе, она выдавливается вверх (pinch effect), полностью теряя контакт с канавкой. Что происходит со звуком, я думаю, вы легко догадаетесь сами.

При недостаточной вертикальной гибкости подвижной системы звукоснимателя или при повышенной прижимной силе игла не выходит из канавки, а просто заклинивает в ней, что приводит к разрушению и оплавлению стенок канавки. Кроме этого уменьшение радиуса сферической иглы лимитируется еще и тем, что между иглой и дном канавки должен сохраняться зазор, чтобы игла касалась только стенок и не собирала шум со дна канавки.

Наличие этих недостатков, а также искажений, которые будут рассмотрены ниже, привело к необходимости разработки эллиптических или бирадиальных игл. В поперечном сечении, проведенном через точки контакта с канавкой, эти иглы имеют форму эллипса с радиусами (r) 5–8 мкм, а в продольном сечении, проведенном через те же точки, – с радиусами (R) 18–20 мкм.

Площадь контакта эллиптических игл (рис. 1.10, *a*) со стенками канавки больше, чем у сферических игл, к тому же они ближе по форме к резцу рекордера, поэтому дают меньшие искажения огибающих и имеют более широкий частотный диапазон. Появление в 1970 г. дискретных квадрофонических пластинок стандарта CD-4, совместимых с обычными стереозвукоснимателями, но содержащих запись сигнала с частотой до 45 кГц, потребовало разработки новых игл специального профиля и уменьшенной массы. Наиболее известная конструкция такой иглы (рис. 1.10, *b*), названная Shibata по имени ее изобретателя, инженера японской фирмы Victor Company of Japan, появилась в 1972 г. Отличительной особенностью иглы Shibata (по сравнению с обычной эллиптической) является увеличенный радиус (R) в продольном сечении, проведенном через точку контакта игла–канавка, равный 75 мкм (вместо

18 мкм), и большее сходство с резцом рекордера в поперечном сечении. Форма поперечного сечения с рабочим радиусом 7 мкм получена сошлифовкой фронтальной стороны заготовки по овалу, а тыловой ее стороны по двум симметричным плоскостям, пересекающимся под углом 120° . Минимальная масса иглы Shibata составляет 0,02 мг. Благодаря такой сложной форме площадь контакта иглы Shibata с канавкой в направлении ее глубины увеличивается примерно в 4 раза, пятно контакта приобретает форму линии. Конструкция Shibata оказалась настолько удачной, что стала широко использоваться во многих высококачественных стереозвукоснимателях. И на ее основе были разработаны другие иглы, в том числе Van Den Hul. В английском языке иглы подобной конструкции могут также называться *line-contact*, *fine-line*, *hyperelliptical*.

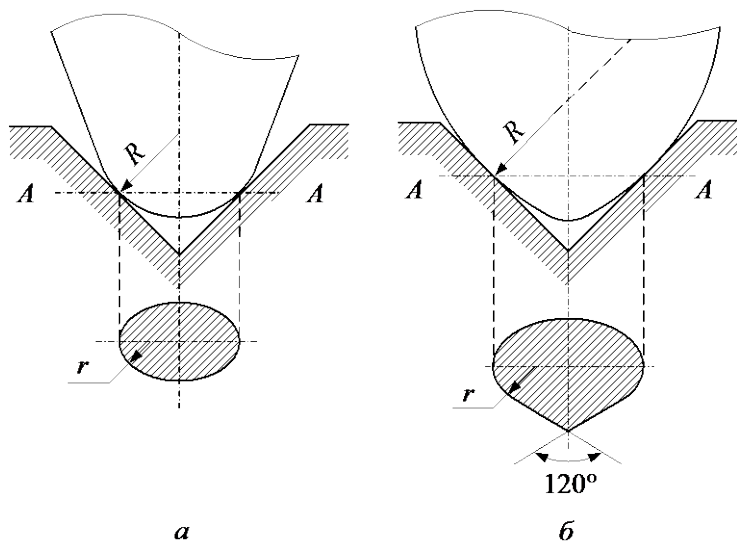


Рис. 1.10. *а* – эллиптическая игла; *б* – игла Shibata [24]

Следует упомянуть еще об одном виде игл, обозначаемых английским термином *microridge*. Дословно это можно перевести как «микробороздка», и название это происходит из особенностей заточки. По сути, это очередная вариация эллиптической иглы, но в определенных местах на поверхности действительно нанесены расширяющиеся от острия к основанию бороздки. Благодаря этому по мере износа иглы в контакт с канавкой вступают новые участки

ее поверхности, имеющие форму и радиусы, близкие к показателям новой иглы. Проще говоря, по мере износа форма иглы практически не меняется.

1.3.5. АНАЛИЗ ПРИМЕНЕНИЯ КАНТИЛЕВЕРОВ В МОЛЕКУЛЯРНОЙ ДИАГНОСТИКЕ

Отклонения под действием вертикальной (нормальной) силы. Под действием вертикальной отклоняющей силы возникает вертикальный изгиб z -типа. Выделим из балки двумя поперечными сечениями элемент длиной L и рассмотрим его деформацию (рис. 1.11). Так как этот элемент изогнут, то материал на внешней стороне изгиба растянут, а на внутренней стороне сжат. Но имеется нейтральная поверхность, которая и не сжата, и не растянута. Для упрощения вычислений будем считать, что поперечные сечения балки остаются плоскими и нормальными к ее деформированной оси (прямой чистый изгиб балки постоянного сечения). Последнее предположение справедливо при выполнении условия $l/t \geq 8$, которое выполняется в рамках рассматриваемого случая.

Для чистого изгиба нейтральная поверхность проходит через центр тяжести поперечного сечения, т. е. в нашем случае продольная ось симметрии параллелепипеда принадлежит нейтральной поверхности. Продольное удлинение материала ΔL пропорционально расстоянию z от нейтральной поверхности: $\Delta L/L = z/R$ (рис. 1.11). Таким образом, по закону Гука сила, действующая на единичную площадь в некоторой маленькой полоске площадью dS вблизи z , равна $dF = Ez \cdot dS/R$, где E – модуль Юнга; R – радиус кривизны балки.

Отклонение под действием продольной силы. Сила F_y , действующая в направлении оси кантилевера, создает момент $M = F_y l_{tip}$, вызывающий деформацию, которую назовем вертикальным изгибом y -типа.

Несмотря на внешнее сходство с вертикальным изгибом z -типа, в этом случае профиль деформации будем другим. Уравнение, описывающее изгиб y -типа, имеет следующий вид:

$$\frac{d^2 u}{dy^2} = \frac{F_y l_{tip}}{EJ_z}.$$

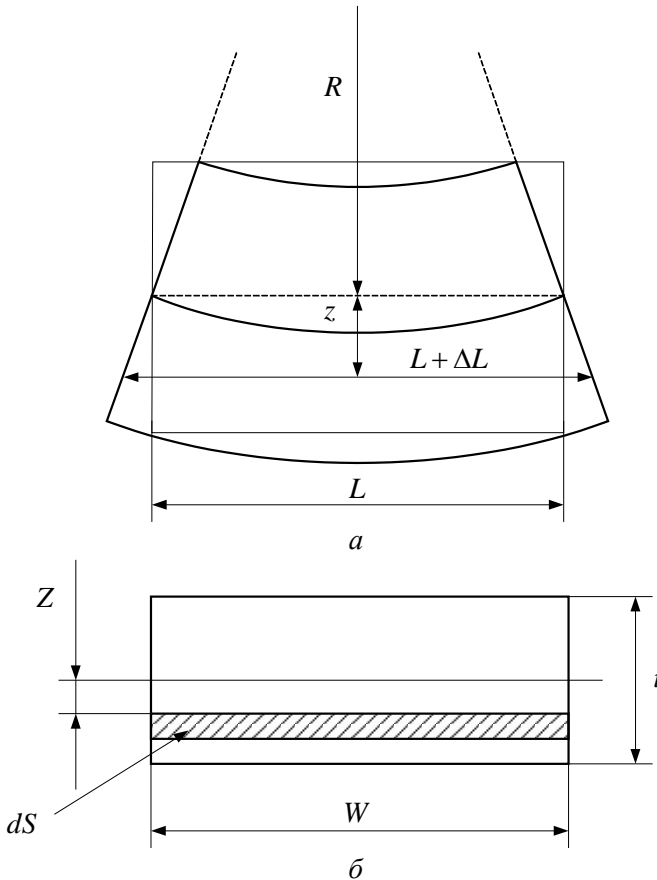


Рис. 1.11. a – маленький отрезок изогнутой балки;
 b – поперечное сечение балки

Отклонение под действием поперечной силы. Под действием поперечной силы возникает сложная деформация, которая является суперпозицией плоского изгиба и кручения. Обратную жесткость плоского изгиба найти просто. Данная деформация аналогична вертикальному изгибу z -типа с той лишь разницей, что в окончательном выражении для обратной жесткости надо поменять местами ширину и толщину балки кантилевера. Таким образом,

$$c_{bend} = \frac{4l^3}{Ew^3t} = \frac{t^2}{w^2}c.$$

Как видно из формулы, зависимость изгиба от параметров приложенной силы носит нелинейный характер и является сложной функцией, моделирование которой с точностью, необходимой для моделирования процесса молекулярной диагностики, является ресурсоемкой задачей.

1.3.6. ПРИМЕНЕНИЕ КАНТИЛЕВЕРОВ В БИОСЕНСОРАХ

Общие принципы работы биосенсоров. Сегодня биохимические сенсоры применяются как для биомедицинского анализа и медицинской диагностики, так и для экологического контроля или контроля качества для пищевой промышленности, где требуются устройства с меньшим размером, более высокой чувствительностью, улучшенной селективностью, более быстрым временем ответа и достаточно низкой ценой. Понятие химических датчиков охватывает два главных элемента [18]: физический преобразователь и химически восприимчивый и отборный слой. Химический слой обеспечивает определенные участки, необходимые для проведения анализа. Для реализации селективности восприимчивого слоя можно применить принципы молекулярной и биомолекулярной «выборки»; например закрепление антитела антигена (т. е. любые химикаты, бактерии, вирусы) или закрепление пыльцы с определенным белком.

Фактически, перед большинством сенсорных технологий стоят проблемы неопределенных взаимодействий, которые усложняют реакцию датчика, производят ложные положительные реакции, негативно влияют на воспроизводимость результатов и пригодность системы датчиков для специфических применений. Поэтому химический слой должен быть разработан так, чтобы максимизировать чувствительность датчика к определенному реагенту.

Как только объект зарегистрирован химическим слоем, чувствительный слой преобразовывает химическую реакцию в измеряемый сигнал, как показано на рис. 1.12. И химический слой, и физический преобразователь налагают ограничения на работу определенного класса датчиков. Чаще всего это физический преобразователь, который определяет пределы достижимого обнаружения. Каждый элемент, изображенный на рис. 1.12, влияет на работу датчика. От механизма, который ведет объект на датчик (например, активизированное распространение и т. д.) к инструменту, до сигнала преобразователя – все стадии являются предметом обширных исследований.

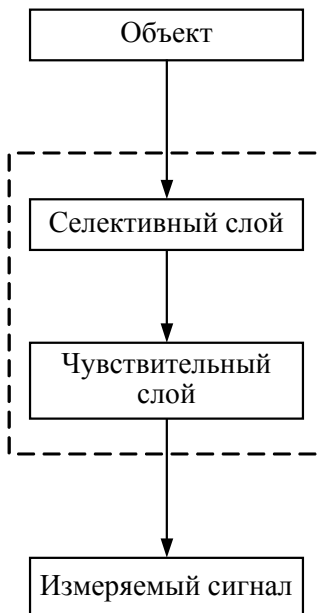


Рис. 1.12. Схема биосенсора

Химическая активация поверхности. Химическая активация заключается в подготовке поверхности микрокантилевера для присоединения белков и антител. Она заключается в термическом окислении лицевой поверхности, на которую наносится APTES и GA, а на тыльную часть – NaBH_3CN , как показано на рис. 1.13.

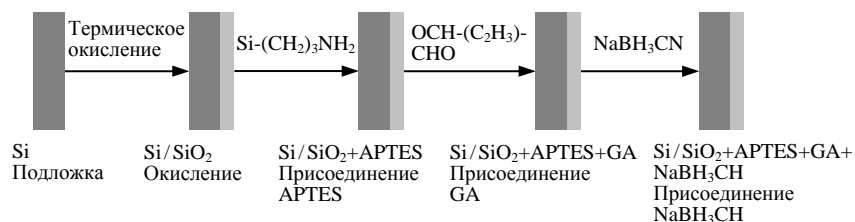


Рис. 1.13. Последовательность химической активации кантилевера

Как видно из рисунка, активация заключается в покрытии кантилевера несколькими веществами. Ввиду того что в настоящее время кантилеверы для проведения молекулярной диагностики

производятся штучно, активация проводится для каждого кантилевера отдельно, однако данный шаг подготовки кантилевера можно автоматизировать и упростить.

Технология изготовления кантилеверов. Одним из самых важных факторов, определяющих резонансные свойства кантилевера, является технология его изготовления. На рис. 1.14 представлена технология изготовления на основе SOI-подложек.

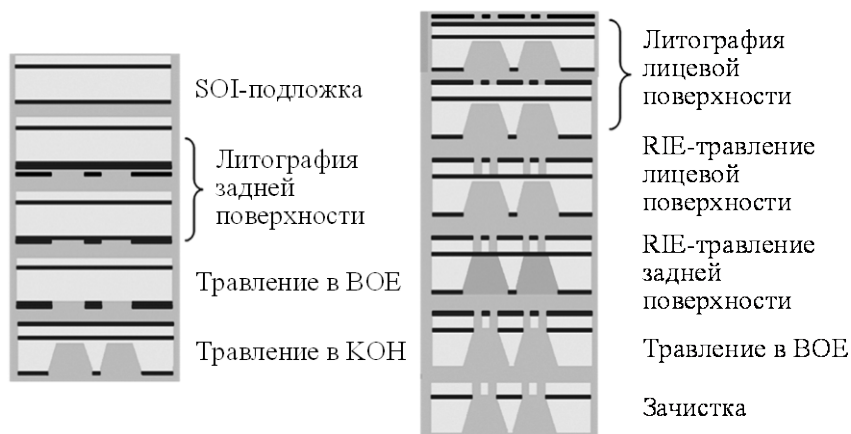


Рис. 1.14. Технология изготовления кантилеверов

Как видно из рис. 1.14, за основу взята SOI-подложка, в процессе изготовления она проходит шаги литографии и травления с двух сторон. Это необходимо для получения однородной структуры кантилевера, что положительно сказывается на его резонансных характеристиках. Синтез кантилеверов на основе композитных гетероструктур накладывает свои требования к возможностям методик их моделирования.

1.4. МАТЕМАТИЧЕСКОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ ПРОЦЕССА МОЛЕКУЛЯРНОЙ ДИАГНОСТИКИ

1.4.1. ВЗВЕШИВАНИЕ МИКРОСКОПИЧЕСКИХ ОБЪЕКТОВ

Для регистрации малых масс были предложены микроскопические резонансные системы, которые, по оценкам, позволят достичь чувствительности в 1 дальтон = $1,66 \cdot 10^{-27}$ кг [93]. Общая идея ре-

зонансных весов состоит в измерении собственной частоты некоторой колебательной системы и ее изменения при присоединении массы. При этом сами резонансные системы могут основываться на различных физических принципах: могут использовать пьезокварцевые элементы, тонкие проволоки, углеродные нанотрубки или пленки. В нашей работе резонатором являлся кантилевер атомно-силового микроскопа.

Очевидно, резонансная частота поперечных колебаний кантилевера изменяется, если к нему прикрепить микроскопический объект. Измерив резонансную частоту такого нагруженного кантилевера и зная частоту его колебаний в свободном состоянии, можно определить массу добавленного объекта [56, 59, 69]. Такой метод может применяться для создания сенсоров. Для этого на кантилевер прикрепляют микроскопическую частицу сорбента и, измерив ее массу до и после сорбции, определяют количество поглощенного вещества. Сама по себе процедура измерения резонансной частоты кантилевера отработана в атомно-силовой микроскопии, она используется при работе в резонансном режиме. Колебания кантилевера возбуждаются вмонтированной в держатель пьезокерамической пластиной, амплитуда колебаний определяется по амплитуде сигнала, поступающего с фотодиода. Резонансная частота прямоугольного кантилевера выражается формулой

$$\omega \approx \sqrt{\frac{Et^2}{L^4\rho}},$$

где E – модуль упругости материала; ρ – плотность; L и t – соответственно длина и толщина кантилевера. Более точно ряд собственных частот кантилевера задается формулой [56, 59, 69]

$$\omega_n = C_n^2 \sqrt{\frac{EI}{L^3m}},$$

где I – геометрический момент инерции сечения балки; m – ее масса; C_n – n -й положительный корень уравнения

$$1 + \cos C_n \operatorname{ch} C_n = 0.$$

При прикреплении микроскопического объекта массой M частота кантилевера уменьшается (обычно измерения проводятся на нижней гармонике), и добавленная масса вычисляется через жесткость k по формуле

$$M = \frac{k}{4\pi^2} \left(\frac{1}{\gamma^2} - \frac{1}{\gamma'^2} \right).$$

Хотя прикрепление микрочастицы к кантилеверу может показаться сложной процедурой, на самом деле это может быть осуществлено под оптическим микроскопом с системой микрометрических винтов [71].

1.4.2. АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ И РАСПОЗНАЮЩИЕ ЭЛЕМЕНТЫ БИОСЕНСОРОВ

Необходимость развития и совершенствования биосенсоров связана с множеством процессов в современной науке и технологии. Биологические и химические сенсоры применяются для контроля окружающей среды, для оценки уровня промышленных загрязнений в воздухе и воде, для контроля безопасности производств, в клинической диагностике и во многих других областях. В последние годы в связи с проблемой мирового терроризма возникла потребность в сенсорах, способных обнаруживать взрывчатые вещества. Медицинские биосенсоры в скором времени позволят проводить лабораторные анализы быстро и надежно даже при отсутствии специальных навыков [78].

Химические (биологические) сенсоры – это тип аналитических устройств, которые служат для качественного и количественного определения химических (биологических) веществ. Обычно сенсор состоит из следующих частей [50, 78] (рис. 1.15):

- ◆ распознающий элемент (он также может быть назван рецепторным слоем) представляет собой вещество, которое способно селективно взаимодействовать с аналитом;
- ◆ трансдюсер (англ. transducer – преобразователь, датчик) преобразует химическое или биологическое взаимодействие в электрический сигнал;
- ◆ система сбора и обработки данных служит для усиления и анализа сигнала и отображения результатов.

Биологические сенсоры отличаются от химических только тем, что они направлены на детектирование органических молекул, важных для живых организмов: высокомолекулярных, таких как белки, ДНК, и низкомолекулярных, например глюкозы и мочевины. В данном обзоре обсуждаются основные распознающие эле-

менты биологических сенсоров; как и в химических сенсорах, основное предъявляемое к ним требование – способность улавливать определенный аналит и не реагировать на посторонние вещества, присутствующие в образце.

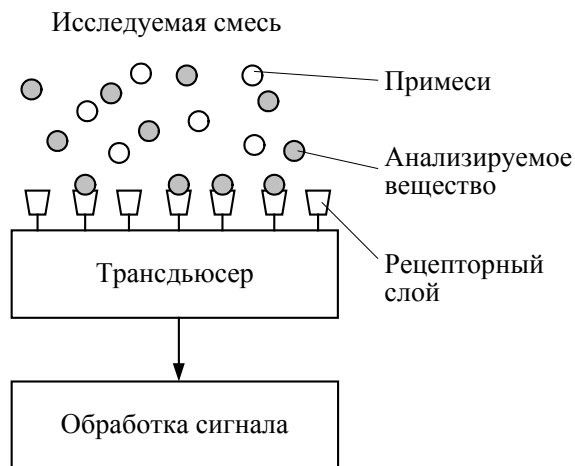


Рис. 1.15. Схема работы медицинского биосенсора

Необходимо отметить, что разработка сенсоров является междисциплинарной задачей, которая требует участия широкого круга специалистов: физиков, инженеров, химиков, биологов, врачей, экологов. Кроме очевидных требований, предъявляемых к новым сенсорам, таких как простота эксплуатации, дешевизна, высокая точность, селективность и скорость анализа, добавляются еще требования миниатюризации (это связано с развитием нанотехнологий), иногда возможность работать в непрерывном режиме, а иногда – возможность внедрения в человеческий организм [42].

Используемые в биосенсорах трансдюсеры чрезвычайно разнообразны. Возможно, наиболее часто применяются электрохимические преобразователи, в которых трансдюсером является электрод, помещенный в исследуемый раствор. Оптические биосенсоры используют явления полного внутреннего отражения и поверхностного плазмонного резонанса. Гравиметрические сенсоры используют изменение массы при связывании аналита, они обычно основаны на акустических волнах или пьезокварцевых микровесах. Для ознакомления с типами трансдюсеров авторы рекомендуют обратиться к обзорам [50, 71, 87].

1.4.3. ХАРАКТЕРИСТИКИ БИОСЕНСОРОВ

В данном разделе описаны параметры и характеристики биосенсоров как аналитических приборов. Все они используются и для описания химических сенсоров, которые чрезвычайно близки к биологическим по принципам действия и технической реализации.

Как и любой научный прибор, каждый сенсор имеет допустимый диапазон температур, давлений и рН. Кроме того, каждый сенсор, который не только констатирует наличие аналита, но и измеряет его концентрацию, очевидно, характеризуется такими параметрами, как точность и воспроизводимость. Также важны такие параметры, как рабочий диапазон (тот диапазон концентраций, в котором работает метод измерений) и линейный диапазон. Для их определения требуется построить калибровочную кривую – зависимость величины сигнала от концентрации аналита, ее линейный участок называется линейным диапазоном. В некоторых типах сенсоров (например, в потенциометрических) величина сигнала пропорциональна логарифму концентрации.

Чувствительность сенсора показывает отношение сигнала, выраженного, например, в вольтах, к концентрации аналита, которая вызвала этот сигнал. Более строго чувствительность определяется как максимальное значение производной величины отклика по концентрации [72]. Следует отличать чувствительность от предела обнаружения (detection limit) – той минимальной концентрации аналита (или минимального количества вещества), которая может быть детектирована и измерена. Для современных сенсоров это значение может быть чрезвычайно малым. Так, например, в работе [42] обсуждаются иммунологические сенсоры с пределом обнаружения 10^{-21} моль. В статье [67] описана резонансная система нанометровых размеров, способная зарегистрировать 1 аттограмм (10^{-18} г) вещества, основанная на пьезорезистивном эффекте.

Важнейшей характеристикой сенсора является селективность, она отражает способность детектировать определенный аналит и не реагировать на посторонние вещества. Для количественного определения селективности используются два основных метода. Первый предполагает построение калибровочных кривых не только для аналита, но и для посторонних примесей при одинаковых

условиях эксперимента. В этом случае селективность выражается как отношение величины сигнала, вызываемого аналитом, к величине сигнала, вызываемой примесью той же концентрации. При другом подходе в ячейку, уже содержащую аналит, вводят примеси в тех концентрациях, которые можно ожидать в реальных образцах, и выражают селективность как изменение сигнала в процентах. Второй метод дает более наглядное и практически удобное значение селективности, но он является более субъективным, так как зависит от диапазона концентраций, в котором производятся измерения.

К временным характеристикам сенсоров относятся следующие: время отклика, время жизни и время регенерации [78]. Время отклика необходимо для возникновения равновесия между анализируемым образцом и рецепторным слоем. Хотя оно должно быть сведено к минимуму, в некоторых методах оно составляет порядка нескольких часов. Время жизни – это срок воспроизводимой работы сенсора, он ограничен деградацией рецепторного слоя. Иногда (например, в коммерческих сенсорах для определения глюкозы) используются одноразовые распознающие элементы. Время регенерации – это время, которое требуется для восстановления работоспособности распознающего элемента. В заключение скажем, что для непрерывного мониторинга часто требуется изготавливать сенсоры с проточными ячейками или зондами, которые вносятся в поток анализируемого вещества. Такие сенсоры особенно важны для контроля на производстве и мониторинга окружающей среды, их проектирование представляет собой сложную инженерно-техническую работу.

1.4.4. РАСПОЗНАЮЩИЕ ЭЛЕМЕНТЫ

Ферменты. Выше было сказано, что одной из основных характеристик биосенсоров является селективность. Обычно (хотя не всегда) селективность определяется свойствами распознающего элемента. Ниже рассматриваются основные типы рецепторных слоев и их особенности [14, 78].

Наиболее часто распознающими элементами биосенсоров являются ферменты – высокоспецифичные катализаторы биохимических реакций. В состав фермента входит одна или несколько белковых молекул, иногда присутствует небелковая часть. Катали-

тическая активность ферментов значительно выше, чем у любых искусственных катализаторов, ферменты увеличивают скорость реакции в 10^3 – 10^7 раз. Классический пример биосенсора, использующего ферментативный рецепторный слой, – это амперометрический сенсор на глюкозу с глюкозооксидазой (GOD) [42, 50, 78]. Возможно, это один из самых первых биосенсоров. В нем глюкоза окисляется до глюконовой кислоты с образованием перекиси водорода:



В разных модификациях может регистрироваться либо уменьшение концентрации кислорода, либо увеличение концентрации перекиси. Фермент GOD является сравнительно недорогим, при правильной упаковке одноразовый распознающий элемент может храниться около 6 месяцев [78].

Иногда ферменты используются непосредственно в составе тканей организмов животных или растений. Например, в [50] обсуждается сенсор на дофамин (нейрогормон, биологический предшественник адреналина), использующий ткани грибов, иммобилизованные на электроде при помощи углеродной пасты. Преимущества использования тканей вместо очищенных ферментов состоят в следующем: ткани существенно дешевле, содержащиеся в них ферменты находятся в естественном окружении, поэтому они дольше и надежнее работают. Таким образом, использование тканей в биосенсорах решает проблемы деактивации и деградации ферментов при их иммобилизации, увеличивает стабильность ферментов. При этом существенным недостатком, который ограничивает спектр возможных применений тканей, очевидно, является их низкая селективность, связанная с присутствием большого количества посторонних ферментов. Тем не менее использование тканей в рецепторных слоях в некоторых случаях позволяет радикально снизить себестоимость биосенсоров.

К биосенсорам на основе тканей идеологически близки технологии с использованием клеток в качестве распознающих элементов. По мнению автора [70], клеточные биосенсоры наряду с ферментными занимают лидирующие позиции по степени разработки и внедрения. Необходимо отметить, что для многих клеток разработаны методы генной инженерии, позволяющие повысить выработку определенного белка и таким образом повысить эффективность работы сенсора.

Аффинные биосенсоры. В обзоре [80] рассматриваются клеточные биосенсоры, созданные с использованием технологий генной инженерии. При проникновении внутрь клетки аналит вызывает синтез легко детектируемого белка, например флуоресцентного белка GFP. В число достоинств таких биоиндикаторов входят следующие: способность проводить анализ с пространственным разрешением порядка размера клетки (например, для анализа химического состава почвы), возможность быстрого обнаружения токсичных веществ, возможность измерять концентрации веществ в естественной среде, а не в пробе.

Биосенсоры, использующие ферменты в рецепторном слое, иногда называют *каталитическими*. Существуют еще и аффинные биосенсоры (affinity biosensors), использующие антитела, нуклеиновые кислоты и рецепторы. Отличие между ними состоит в следующем (рис. 1.16). В ферментативных сенсорах происходит реакция по общей схеме

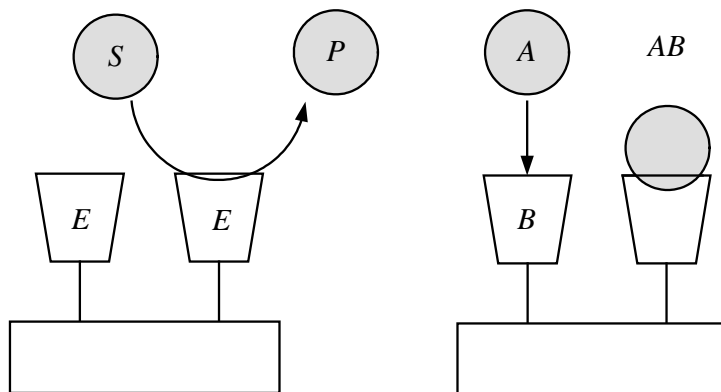
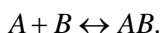


Рис. 1.16. Принцип работы аффинного биосенсора

Субстрат (S) связывается с ферментом (E), образуя комплекс ES , затем субстрат превращается в продукт (P) и высвобождается. Эта реакция описывается кинетикой Михаэлиса–Мэттен [78]. В случае аффинных биосенсоров в рецепторном слое происходит реакция вида



В таких реакциях не образуется новых продуктов, происходит связывание молекул А и В в комплекс АВ. Реакции этого типа также называют реакциями непродуктивного связывания [70]. В общем случае это приводит к ужесточению требований, предъявляемых к трансдьюсеру, так как акт связывания сложнее зарегистрировать. К аффинным биосенсорам относятся сенсоры на ДНК, на антигены и антитела и сенсоры с использованием рецепторов.

Детектирование молекул ДНК основано на взаимодействии между комплементарными цепями. Природа этого взаимодействия – водородные связи между парами нуклеотидов. В ДНК-сенсорах рецепторный слой состоит из иммобилизованных одноцепочечных ДНК, которые улавливают из раствора комплементарные цепи. По данным [4], рекордный предел обнаружения ДНК был достигнут с использованием метода электрохимической хемилюминесценции и составил 10 аМ (10^{-18} М).

Приготовление образцов ДНК для исследований является сложным и трудоемким процессом. После очистки пробы для увеличения количества молекул ДНК определенного типа используется процедура полимеразно-цепной реакции (ПЦР). По прогнозам авторов [64], развитие ДНК-биосенсоров позволит обходиться без специальных методов выделения ДНК из образца и ПЦР и детектировать отдельные цепи в течение часа. В последние годы была создана технология ДНК-биочипов, которая позволяет вести анализ большого числа генов одновременно. Развитие ДНК-биосенсоров представляется крайне важным, так как оно поможет в обнаружении патогенных микроорганизмов, мутаций, диагностике наследственных заболеваний и во многих других областях. Необходимо отметить развитие методов анализа ДНК с целью идентификации личности.

Антитела – это сложные белковые молекулы, построенные из нескольких субъединиц, вырабатываемые в организмах позвоночных в ответ на проникновение чужеродных агентов (антигенов), например токсинов, вирусов или чуждых организму макромолекул. Циркулирующие в крови антитела связываются с антигенами, деактивируют их и выводятся из организма. Кроме того, связанные антитела служат метками для микроорганизмов, подлежащих уничтожению. Взаимодействие антиген–антитело считается наиболее селективным для применения в биосенсорах. С точки зрения физики, это взаимодействие осуществляется теми же по природе силами, что и взаимодействие фермента с субстратом: вандерваальсовыми силами, ионными, гидрофобными и гидро-

фильными взаимодействиями, водородными связями [52]. Сложность применения антител в биосенсорах состоит в том, что акт связывания антигена часто тяжело зарегистрировать. Это является общим недостатком аффинных биосенсоров и требует применения специальных методов, например использования меток [71]. Другая сложность состоит в том, что аффинные взаимодействия часто имеют высокие значения константы ассоциации, т. е. слабо обратимы, и использующие их распознающие элементы часто являются одноразовыми или требуют специальных методов регенерации. Например, для разрушения связи антиген–антитело иногда используют 10–100 мМ HCl или глициновый буфер pH 1,7–2,2 [55].

Рецепторы – это мембранные белки, способные связывать определенные лиганды и вызывать определенный физиологический отклик в ответ на акт связывания. Рецепторы обычно используются в биосенсорах в составе клеток, так как в очищенном виде они недостаточно стабильны. Авторы [72] отмечают, что биосенсоры на основе рецепторов не получили широкого распространения. В работе [13] для изучения активности фермента одновременно использовались методы регистрации аффинного взаимодействия и каталитической реакции. Белок бета-лактамаза, который иногда ответственен за устойчивость бактерий к антибиотикам, был иммобилизован на поверхности, кинетика образования монослоя контролировалась методом поверхностного плазмонного резонанса. Далее в систему вводился субстрат – нитроцефин, который под действием бета-лактамаз гидролизировался с образованием окрашенного продукта. Он регистрировался спектроскопически по изменению спектра поглощения. В аффинных биосенсорах часто используется метод меток и конкурирующего связывания. Для анализа образца в сенсор специально вводится некоторое количество меченого аналита. Метки могут быть различной природы, например флуоресцентные или радиоактивные. Связывание меченого аналита, содержащегося в растворе в малой концентрации, очень чувствительно к концентрации немеченого аналита, которую требуется измерить. Между мечеными и немечеными молекулами аналита возникает конкуренция за связывание с рецепторным слогом. После того как в системе устанавливается равновесие, требуется измерить количество связанных и свободных меток и вычислить концентрацию аналита. Классический пример использования радиоактивных меток – радиоиммунологический анализ. В нем используется конкуренция между мечеными и немечеными анти-

генами за связывание с антителами [64]. Флюоресцентные метки часто используются в биосенсорах с оптическими трансдюсерами [78]. В иммуноферментном анализе метками являются ферменты, которые ковалентно пришиваются к антигенам или антителам, они обнаруживаются при добавлении в систему субстрата.

Авторы [78] приводят общие достоинства и недостатки использования меток в сенсорных технологиях. Прямые методы измерений, не использующие меток, часто работают быстрее и с большей точностью, чем косвенные. Введение меток в ряде случаев приводит к ухудшению связывания за счет возникновения стерических ограничений или нестабильности меток. В то же время при отсутствии меток требуется использовать дорогостоящее оборудование для регистрации актов связывания.

1.4.5. МОДЕЛИ КАНТИЛЕВЕРОВ И ИХ ОЦЕНКА

Моделирование частотных характеристик кантилеверов. Определим величину и направление деформации под действием *вертикальной* силы F_z . В [18] предложено следующее решение, которое позволит найти последний столбец тензора C :

$$\begin{aligned}\Delta x &= c_{xz} F_z; \\ \Delta y &= c_{yz} F_z; \\ \Delta z &= c_{zz} F_z.\end{aligned}\tag{1.4}$$

Если рассмотреть любое поперечное сечение, то действующие на нем силы направлены в одну сторону выше нейтральной поверхности и в другую – ниже ее. Получается пара сил, которая создает изгибающий момент M_z , под которым понимают момент сил относительно нейтральной линии:

$$M_z = \int_S z dF = \frac{E}{R} J_z.\tag{1.5}$$

Величину J_z называют осевым моментом инерции сечения балки относительно оси, проходящей через его центр масс. Для балки с прямоугольным поперечным сечением

$$J_z = \int_S z^2 dS = \frac{wt^3}{12}.\tag{1.6}$$

Обозначим отклонение в z -направлении точки балки на расстоянии y от закрепленного конца через $u(y)$. Кривизна кривой $u(y)$ при малых изгибах ($du/dy \ll 1$) задается выражением $1/R(y) = d^2u/dy^2$. Тогда с учетом (1.6) изгибающий момент сил M_z можно выразить следующим образом:

$$M_z(y) = EJ_z \frac{d^2u}{dy^2}. \quad (1.7)$$

С другой стороны, M_z является моментом сил относительно точки y , обусловленным действием силы F_z :

$$M_z = F_z(l - y),$$

и собственным весом балки:

$$M_{mg} = -\frac{mg}{l} \int_y^l p dp = -\frac{mg}{2l} (l^2 - y^2).$$

Таким образом, получаем уравнение

$$\frac{d^2u}{dy^2} = \frac{F_z}{EJ_z}(l - y) - \frac{mg}{2lEJ_z}(l^2 - y^2). \quad (1.8)$$

Интегрируя его с учетом граничных условий

$$u|_{y=0} = 0 \quad \text{и} \quad \left. \frac{du}{dy} \right|_{y=0} = 0,$$

получаем решение

$$u(y) = \frac{F_z}{6EJ_z}(3l - y)y^2 - \frac{mg}{24lEJ_z}(6l^2 - y^2)y^2. \quad (1.9)$$

Отклонение конца балки

$$\Delta z = u|_{y=l} = \frac{F_z l^3}{3EJ_z} - \frac{5mgl^3}{24EJ_z}. \quad (1.10)$$

Второе слагаемое – это прогиб под действием собственного веса. Для типичного кантилевера он составляет доли ангстрем и может быть опущен на фоне первого члена, который в АСМ-экспериментах в сотни раз больше. Зависимость (1.10) есть ни что иное, как соотношение (1.4), в котором надо положить

$$c_{zz} = \frac{l^3}{3EJ_z} = c. \quad (1.11)$$

Угол отклонения конца балки, посчитанный уже без учета второго члена в (1.10):

$$\alpha \approx \operatorname{tg} \alpha = \left. \frac{du}{dy} \right|_{y=l} = \frac{F_z l^2}{2EJ_z} = \frac{3}{2l} c F_z = \frac{3}{2} \cdot \frac{\Delta z}{l}. \quad (1.12)$$

Коэффициент обратной жесткости c_{zz} является наибольшим среди остальных компонент тензора \mathbf{C} . В формуле (1.11) для этого параметра введено специальное обозначение – c без индексов. Именно величина $1/c$ указывается в качестве жесткости в характеристиках кантилевера, являясь одним из его важнейших параметров. Ниже для наглядности будем выделять c в качестве общего множителя всех элементов матрицы \mathbf{C} . Для кантилевера с прямоугольным поперечным сечением можно переписать (1.11):

$$c = \frac{4l^3}{Ewt^3}. \quad (1.13)$$

Из формулы (1.12) и геометрии вертикального изгиба z -типа несложно найти отклонение острия зонда Δy , возникающее под действием F_z :

$$\Delta y = \alpha \cdot l_{ip} = \frac{3}{2} \cdot \frac{l_{ip}}{l} \Delta z. \quad (1.14)$$

Из (1.14) и (1.4) очевидно, что

$$c_{yz} = \frac{3}{2} \cdot \frac{l_{ip}}{l} c. \quad (1.15)$$

Учитывая, что $\Delta x = 0$, заметим:

$$c_{xz} = 0. \quad (1.16)$$

Наконец, запишем компоненты последней колонки матрицы (1.3). Из формул (1.10)–(1.12) можно получить

$$b_{\alpha z} = \frac{3}{2l} c. \quad (1.17)$$

Так как под действием силы F_z не происходит наклона верхней плоскости кантилевера в направлении Oxz , то

$$b_{\beta z} = 0. \quad (1.18)$$

Выводы

1. Под действием вертикальной отклоняющей силы возникает изгиб z -типа.

2. Для нахождения компонентов тензора обратной жесткости, соответствующих изгибу z -типа, необходимо решить задачу статического изгиба балки, которая сводится к обыкновенному дифференциальному уравнению второго порядка.

3. Вертикальная сила приводит к отклонению острия в вертикальном и продольном направлениях и появлению угла отклонения

$$\alpha = \frac{l^2}{2EJ_z} F_z = \frac{3}{2l} cF_z.$$

В вертикальном направлении, кроме силы реакции со стороны образца, на кантилевер действует сила собственной тяжести. Она приводит к прогибу свободного конца балки на фиксированную величину, незначительную по сравнению с минимальным регистрируемым отклонением.

Определим величину и направление деформации под действием *продольной* силы F_y . Решение этой задачи позволит найти средний столбец тензора \mathbf{C} :

$$\begin{cases} \Delta x = c_{xy} F_y; \\ \Delta y = c_{yy} F_y; \\ \Delta z = c_{zy} F_y. \end{cases} \quad (1.19)$$

Граничные же условия останутся прежними:

$$u|_{y=0} = 0 \quad \text{и} \quad \left. \frac{du}{dy} \right|_{y=0} = 0.$$

Найти решение просто:

$$u(y) = \frac{F_y l_{tip}}{2EJ_z} y^2. \quad (1.20)$$

Таким образом, отклонение острия по вертикали при данном типе деформации определяется по формуле

$$\Delta z = u(l) = \frac{F_y l_{tip} l^2}{2EJ_z} = \frac{3}{2} \frac{l_{tip}}{l} c F_y. \quad (1.21)$$

Сравнивая и вынося в полученном выражении общий множитель, получим:

$$c_{zy} = \frac{l_{tip} l^2}{2EJ_z} = \frac{3l_{tip}}{2l} c. \quad (1.22)$$

Угол отклонения конца балки будет равен:

$$\alpha = \left. \frac{du}{dy} \right|_{y=l} = \frac{F_y l_{tip} l}{EJ_z} = \frac{3l_{tip}}{l^2} c F_y = 2 \frac{\Delta z}{l}. \quad (1.23)$$

Из формулы (1.23) и геометрии вертикального изгиба у-типа несложно найти отклонение острия зонда Δy , возникающее под действием F_y :

$$\Delta y = \alpha \cdot l_{tip} = \frac{2l_{tip}}{l} \Delta z. \quad (1.24)$$

Легко получить:

$$c_{yy} = \frac{2l_{tip}}{l} c_{zy} = \frac{3l_{tip}^2}{l^2} c. \quad (1.25)$$

Учитывая, что $\Delta x = 0$, заметим:

$$c_{xy} = 0. \quad (1.26)$$

Наконец, запишем компоненты средней колонки матрицы (1.3). Из формул (1.21)–(1.23) можно получить

$$b_{\alpha y} = \frac{3l_{tip}}{l^2} c. \quad (1.27)$$

Так как под действием силы F_y не происходит наклона верхней плоскости кантилевера в направлении Oxz , то

$$b_{\beta y} = 0. \quad (1.28)$$

Выводы

1. Под действием продольной отклоняющей силы возникает изгиб у-типа.

2. Для нахождения компонентов тензора обратной жесткости, соответствующих изгибу у-типа, необходимо решить задачу статического изгиба балки, которая сводится к обыкновенному дифференциальному уравнению второго порядка.

3. Продольная сила приводит к отклонению острия не только в продольном, но и в вертикальном направлении:

$$\Delta z = \frac{3 l_{tip}}{2 l} c F_y,$$

а также к появлению угла отклонения

$$\alpha = \frac{l_{tip} l}{E J_z} F_y = \frac{3 l_{tip}}{l^2} c F_y.$$

Определим величину и направление деформации под действием *поперечной* силы F_x . Решение этой задачи позволит найти средний столбец тензора C :

$$\begin{cases} \Delta x = c_{xx} F_x; \\ \Delta y = c_{yx} F_x; \\ \Delta z = c_{zx} F_x. \end{cases} \quad (1.29)$$

Решение же задачи кручения балки прямоугольного сечения является непростым. Зависимость угла кручения β от прилагаемого к торцу балки момента силы M приведем без вывода:

$$\beta = \frac{3 l M}{G w l^3}, \quad (1.30)$$

где G – модуль сдвига.

Боковая сила F_x действует на конец зонда длиной l_{tip} , тогда закручивающий момент равен $M = F_x l_{tip}$. В свою очередь боковое смещение острия связано с углом кручения как $\Delta x_{tors} = \beta l_{tip}$. Соответственно, обратный коэффициент жесткости:

$$c_{tors} = \frac{\Delta x_{tors}}{F_x} = \frac{3l_{tip}^2 l}{Gwt^3}. \quad (1.31)$$

Зная, что $G = E/(2(1+\nu))$, а коэффициент Пуассона $\nu \approx 1/3$ (для большинства материалов), с учетом выражения для c запишем:

$$c_{tors} \approx \frac{8l_{tip}^2 l}{Ewt^3} = \frac{2l_{tip}^2}{l^2} c. \quad (1.32)$$

Чтобы найти результирующий сдвиг острия зонда при суперпозиции плоского изгиба и кручения при малых деформациях достаточно сложить соответствующие отклонения:

$$\Delta x = \Delta x_{bend} + \Delta x_{tors} = c_{bend} F_x + c_{tors} F_x = c_{xx} F_x. \quad (1.33)$$

Таким образом, результирующая обратная жесткость также будет являться суммой обратных жесткостей плоского изгиба и кручения:

$$c_{xx} = \left(\frac{2l_{tip}^2}{l^2} + \frac{t^2}{w^2} \right) c. \quad (1.34)$$

Обратим внимание на то, что для большинства кантилеверов обратная жесткость плоского изгиба c_{bend} оказывается много больше обратной жесткости кручения c_{tors} , поэтому обычно плоским изгибом можно пренебречь. Для стандартного АСМ-кантилевера CSC12 с параметрами $l = 90$ мкм, $l_{tip} = 10$ мкм, $w = 35$ мкм, $t = 1$ мкм и жесткостью $1/c = 0,52$ Н/м латеральные константы жесткости равны:

$$\begin{aligned} c_{tors} &\approx \frac{1}{40} c \approx 0,05 \frac{\text{М}}{\text{Н}}; \\ c_{bend} &= \frac{1}{1220} c \approx 0,0016 \frac{\text{М}}{\text{Н}}. \end{aligned} \quad (1.35)$$

Несложно заметить, что как при плоском изгибе, так и при кручении кроме отклонения Δx возникают деформации Δy и Δz соответственно. Однако величина этих смещений следующего порядка малости по сравнению с Δx , а связь отклонения с прило-

женной силой становится не линейной, а квадратичной, т. е. «негуковской». Покажем это, например, для кручения.

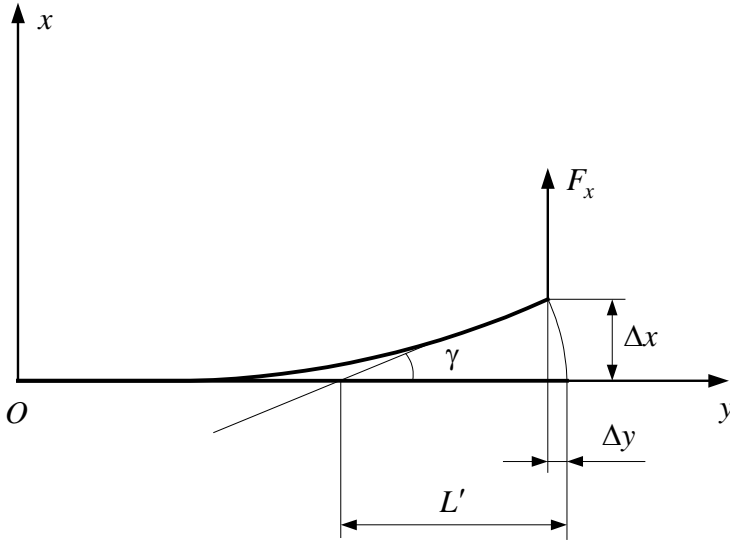


Рис. 1.17. К вычислению c_{yx} [18]

Из рис. 1.17 видно, что

$$\Delta z = l_{tip} (1 - \cos \beta) \approx l_{tip} \frac{\beta^2}{2}, \quad (1.36)$$

в то время как

$$\Delta x = l_{tip} \beta. \quad (1.37)$$

Так как $\beta \ll 1$, то и $\Delta z \ll \Delta x$. Аналогично при плоском изгибе $\Delta y \ll \Delta x$. Поэтому можно положить

$$c_{yx} = c_{zx} = 0. \quad (1.38)$$

Наконец, запишем компоненты первой колонки матрицы (1.3). Под действием поперечной силы F_x нормаль к верхней поверхности кантилевера наклоняется в плоскости Oxz , поэтому из (1.36)–(1.38) можно вывести:

$$b_{\beta x} = \frac{2l_{tip}}{l^2} c. \quad (1.39)$$

Соответственно, отклонение в направлении Oyz отсутствует и

$$b_{\alpha x} = 0. \quad (1.40)$$

Заметим, что отличный от нуля угол β создает только крутильная деформация. При плоском изгибе поверхность кантилевера остается горизонтальной. Таким образом, плоский изгиб никак не может быть зарегистрирован, его величину можно только вычислить по формулам. Однако для определения поперечной силы F_x в эксперименте вполне достаточно регистрировать только деформацию кручения. Поперечная сила приводит к сложной деформации, являющейся суперпозицией плоского изгиба и кручения балки кантилевера. Плоский изгиб аналогичен изгибу z -типа. Решение более сложной задачи о деформации кручения балки прямоугольного сечения дается в литературе.

Поперечная сила приводит в первом порядке малости (закон Гука) только к поперечному отклонению острия кантилевера.

Оптическая система регистрирует только деформацию кручения:

$$\beta = \frac{2l_{ip}}{l^2} c F_x.$$

Плоский изгиб не может быть измерен непосредственно.

Сведем полученные компоненты тензора обратной жесткости \mathbf{C} в единую матрицу, позволяющую сориентироваться в вычислениях:

$$\mathbf{C} = \begin{pmatrix} c_{xx} & c_{xy} & c_{xz} \\ c_{yx} & c_{yy} & c_{yz} \\ c_{zx} & c_{zy} & c_{zz} \end{pmatrix}. \quad (1.41)$$

Коэффициент обратной жесткости c_{zz} является наибольшим среди остальных компонент тензора \mathbf{C} . В формуле (1.11) для этого параметра введено специальное обозначение – c без индексов. Именно величина $1/c$ указывается в качестве жесткости в характеристиках кантилевера, являясь одним из его важнейших параметров. Ниже для наглядности будем выделять c в качестве общего множителя всех элементов тензора обратной жесткости:

$$\mathbf{C} = c \cdot \begin{pmatrix} \frac{2l_{tip}^2}{l^2} + \frac{t^2}{w^2} & 0 & 0 \\ 0 & \frac{3l_{tip}^2}{l^2} & \frac{3l_{tip}}{2l} \\ 0 & \frac{3l_{tip}}{2l} & 1 \end{pmatrix}. \quad (1.42)$$

Тензор симметричный. Так и должно быть. Левая часть выражения (1.41) является полярным вектором, такими же трансформационными свойствами должна обладать и правая часть формулы. Сила – полярный вектор, поэтому тензор должен быть симметричным, чтобы выражение (1.42) правильно преобразовывалось при отражениях системы координат.

Наличие недиагональных элементов приводит к различию в направлении приложенной силы и вектора отклонения острия, а также говорит об ограниченной применимости упрощенной модели упругого кантилевера на основе трех перпендикулярных пружин. Чтобы воспользоваться данной моделью, необходимо определить не только жесткости, но и правильные направления трех пружин, которые не будут совпадать с осями координат. Эта задача сводится к диагонализации тензора (1.42) для нахождения его собственных значений, а также направлений осей преобразованной системы координат, по которым и должны быть сориентированы модельные пружины.

Видно, что упругие свойства кантилевера полностью описываются пятью параметрами. Найти все компоненты тензора можно, зная геометрические характеристики кантилевера, а также его константу жесткости.

Исследования характеристик кантилевера. В АСМ помимо методик, основанных на измерении статического изгиба балки, существуют колебательные методики. Для их использования необходимо знать резонансную частоту кантилевера.

Вычислим резонансную частоту изотропного кантилевера массы m в виде балки в форме параллелепипеда длиной l , толщиной h ($h \ll l$) и шириной w ($w \ll l$), на свободный конец которого действует сосредоточенная вертикальная сила F (рис. 1.18).

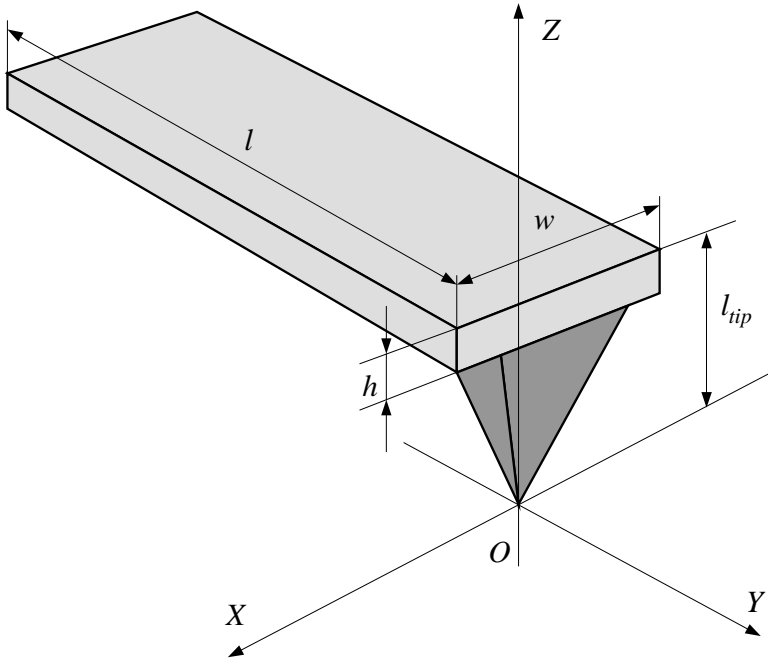


Рис. 1.18. Прямоугольный кантилевер с зондом [18]

Найдем кинетическую $E_{кин}$ и потенциальную $E_{пот}$ энергию кантилевера. Рассмотрим элемент балки длиной dy , находящийся на расстоянии y от закрепленного конца. Кинетическая энергия такого элемента

$$dE_{кин} = \frac{(\dot{u}(\tau, y))^2}{2} \cdot \frac{m dy}{l}, \tag{1.43}$$

где $u(\tau, y)$ – отклонение точек осевой линии балки на расстоянии y от закрепленного конца в момент времени τ . В соответствии с формулами (1.7), (1.8) $u(\tau, y)$ выражается через отклонение свободного конца балки $u(\tau, l)$ следующим образом:

$$u(\tau, y) = \frac{u(\tau, l)}{2} \left(3 \left(\frac{y}{l} \right)^2 - \left(\frac{y}{l} \right)^3 \right). \tag{1.44}$$

Тогда подставляя значение $u(\tau, y)$ в (1.43) и производя интегрирование по всей длине балки, получим, что

$$E_{\text{кин}} = \int_0^L \frac{(\dot{u}(\tau, y))^2}{2} \cdot \frac{m dy}{l} = \frac{33}{140} \cdot \frac{m}{2} (\dot{u}(\tau, l))^2. \quad (1.45)$$

Потенциальная энергия вычисляется проще. Так как по условию только на свободный конец действует сосредоточенная сила F , то очевидно, что $E_{\text{пот}}$ равна работе, затраченной на перемещение конца балки на расстояние $u(\tau, l)$:

$$E_{\text{пот}} = \int_0^{u(\tau, l)} F du = \int_0^{u(\tau, l)} \frac{1}{c} u du = \frac{u^2(\tau, l)}{2c}, \quad (1.46)$$

где $1/c$ – коэффициент нормальной жесткости, определяемый формулой (1.11).

Если считать, что колебания в системе происходят без диссипации полной энергии W , т. е. $W = E_{\text{кин}} + E_{\text{пот}} = \text{const}$, тогда, дифференцируя полную энергию по времени, получим уравнение движения свободного конца кантилевера:

$$\frac{33m\ddot{u}(\tau, l)}{140} + \frac{1}{c} u(\tau, l) = 0. \quad (1.47)$$

Следовательно, эффективная масса кантилевера

$$m_{\text{эфф}} = \frac{33}{140} m. \quad (1.48)$$

Таким образом, вычислив $m_{\text{эфф}}$ и зная коэффициент жесткости $1/c$, определяемый формулой (1.11), получаем, что собственная частота колебаний кантилевера выражается через его параметры следующим образом:

$$\omega_0 = \sqrt{\frac{1}{cm_{\text{эфф}}}} = \frac{1,029t}{l^2} \sqrt{\frac{E}{\rho}}, \quad (1.49)$$

где ρ – плотность кантилевера; E – модуль Юнга. Как видно из (1.49), ω_0 обратно пропорциональна квадрату длины балки. Дан-

ный факт необходимо учитывать при выборе кантилевера. Резонансная частота собственных колебаний кантилевера должна быть максимально высокой, иначе в нем легко будут возбуждаться собственные колебания за счет возвратно-поступательных перемещений зонда относительно образца при построчном сканировании поверхности или под действием внешних вибраций.

1.4.6. МОДЕЛИРОВАНИЕ ЧАСТОТНЫХ ХАРАКТЕРИСТИК КАНТИЛЕВЕРОВ

Для определения оптимальной геометрии кантилевера предлагается провести моделирование различных геометрий в пакете Ansys (рис. 1.19–1.47). При этом изменять стоит ширину и высоту, а толщину оставлять неизменной, что связано с технологическими ограничениями при изготовлении кантилеверов. При этом моделью кантилевера является прямоугольная балка с заданными размерами и закреплением в одном из торцов, с прикладываемым в середине пластины ускорением. При проведении моделирования вся балка разбивалась на элементарные элементы – параллелепипеды, для реализации метода конечных элементов.

При проведении моделирования вся балка разбивалась на элементарные элементы – параллелепипеды, для реализации метода конечных элементов.

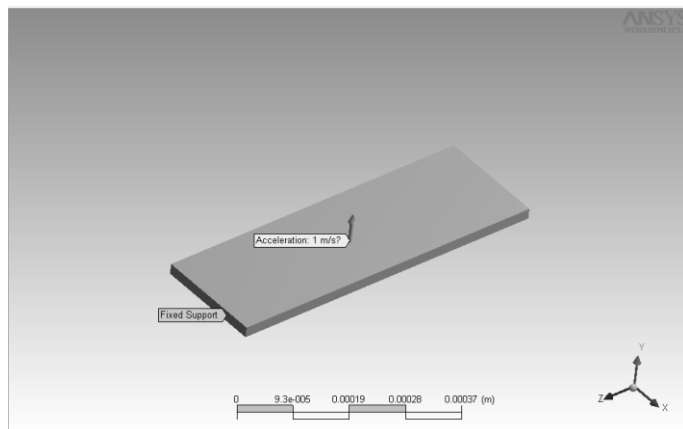


Рис. 1.19. Условия проведения моделирования (размер кантилевера 1000×200 мкм; толщина 2 мкм; ускорение 1 м/с^2)

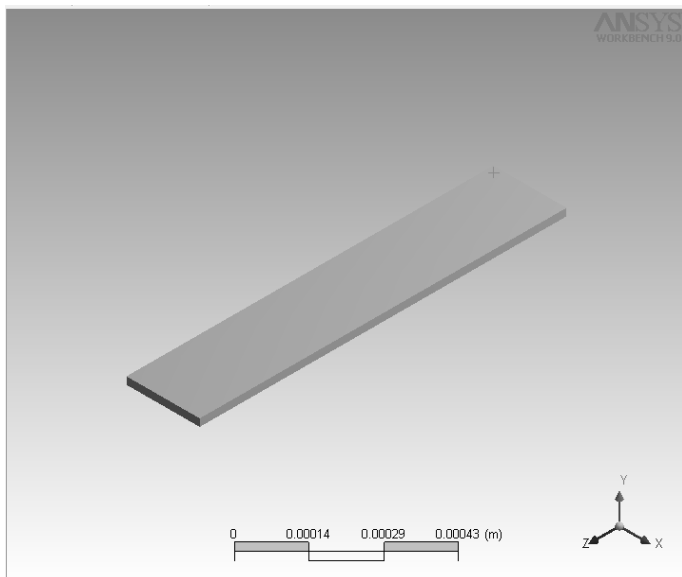


Рис. 1.20. Кантилевер геометрии $1000 \times 200 \times 2$ мкм
 (размер кантилевера 1000×200 мкм; толщина 2 мкм; ускорение 1 м/с^2)

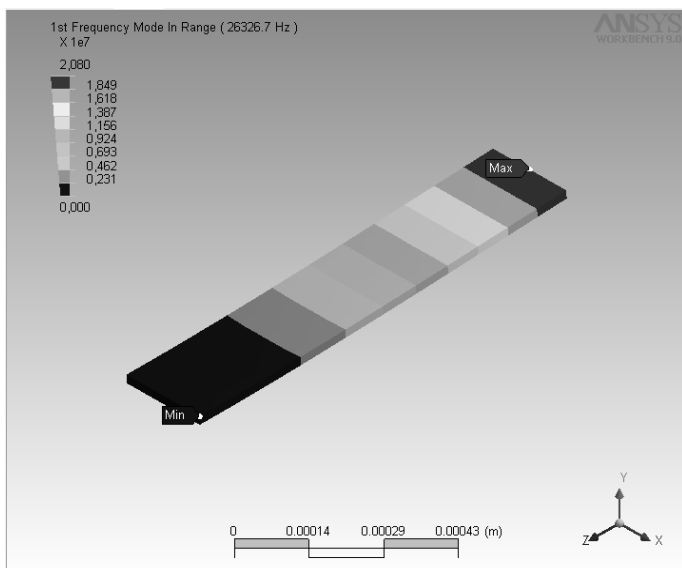


Рис. 1.21. Первая резонансная частота кантилевера

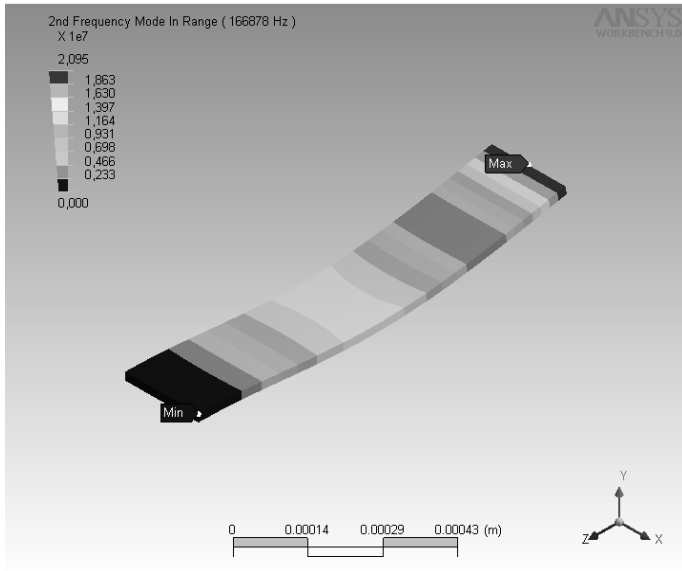


Рис. 1.22. Вторая резонансная частота кантилевера

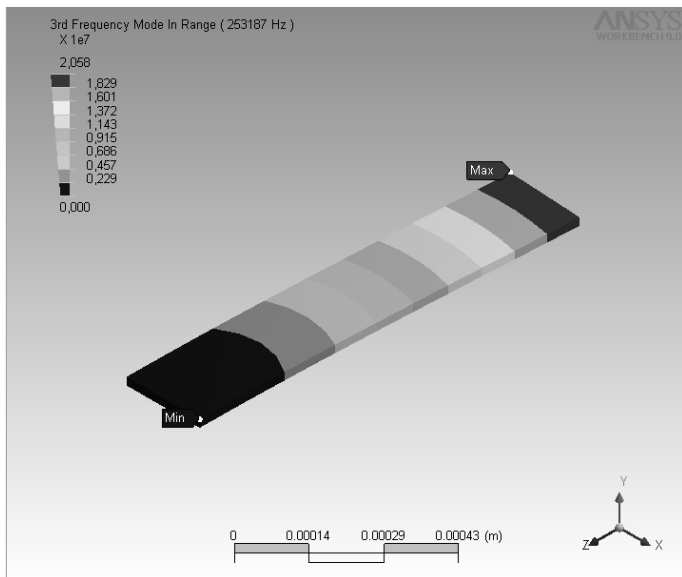


Рис. 1.23. Третья резонансная частота кантилевера

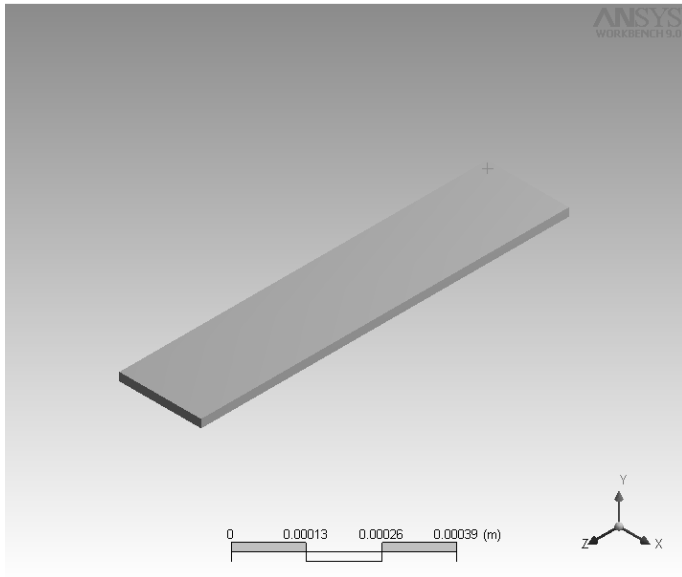


Рис. 1.24. Кантилевер геометрии $900 \times 200 \times 2$ мкм
 (размер кантилевера 900×200 мкм; толщина 2 мкм; ускорение 1 м/с^2)

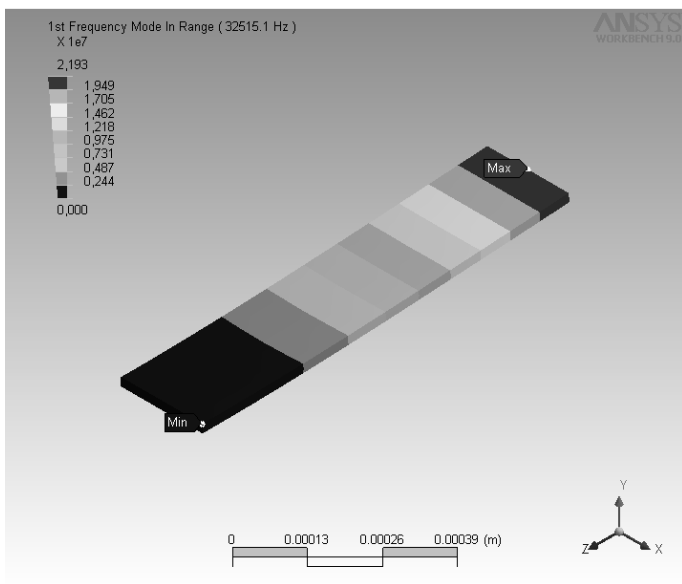


Рис. 1.25. Первая резонансная частота кантилевера

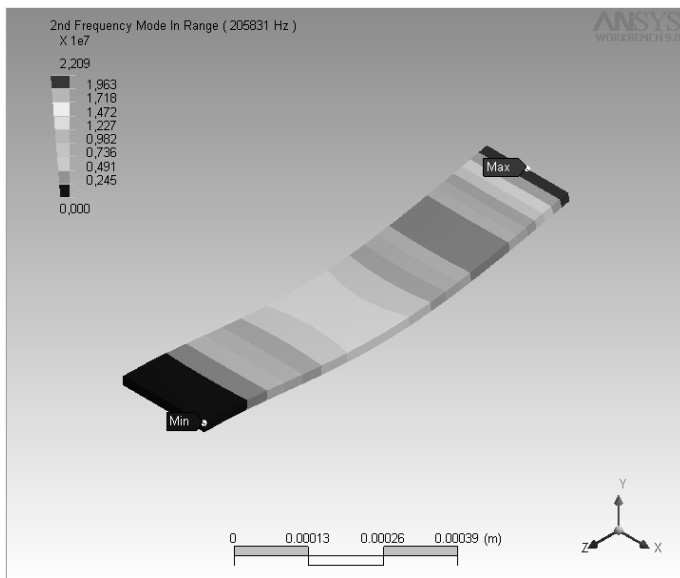


Рис. 1.26. Вторая резонансная частота кантилевера

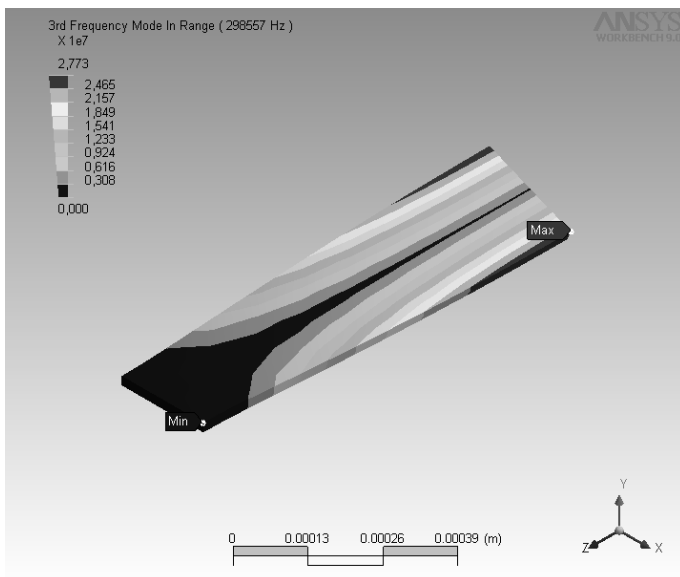


Рис. 1.27. Третья резонансная частота кантилевера

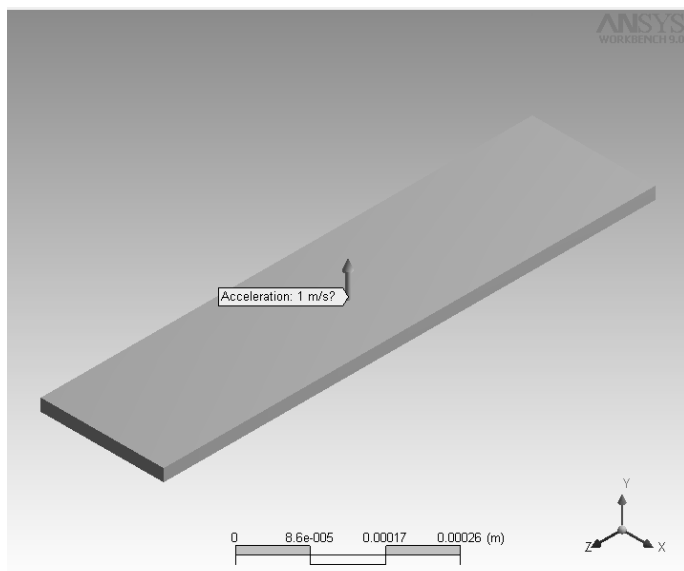


Рис. 1.28. Кантилевер геометрии $800 \times 200 \times 2$ мкм (размер кантилевера 800×200 мкм; толщина 2 мкм; ускорение 1 м/с^2)

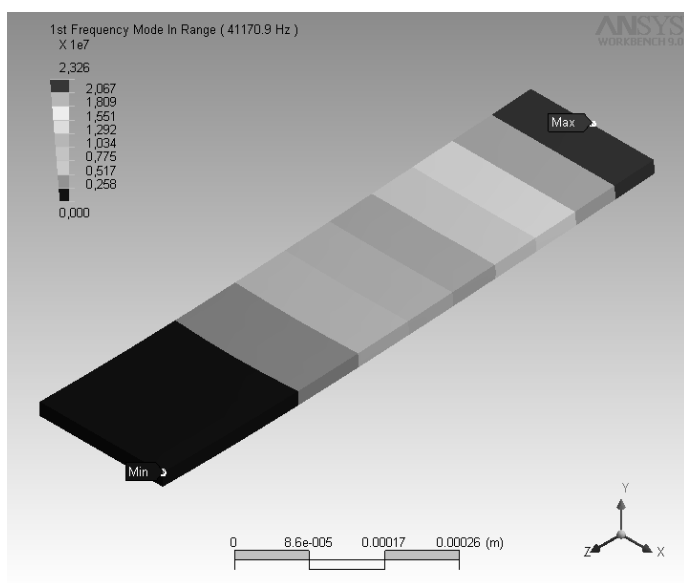


Рис. 1.29. Первая резонансная частота кантилевера

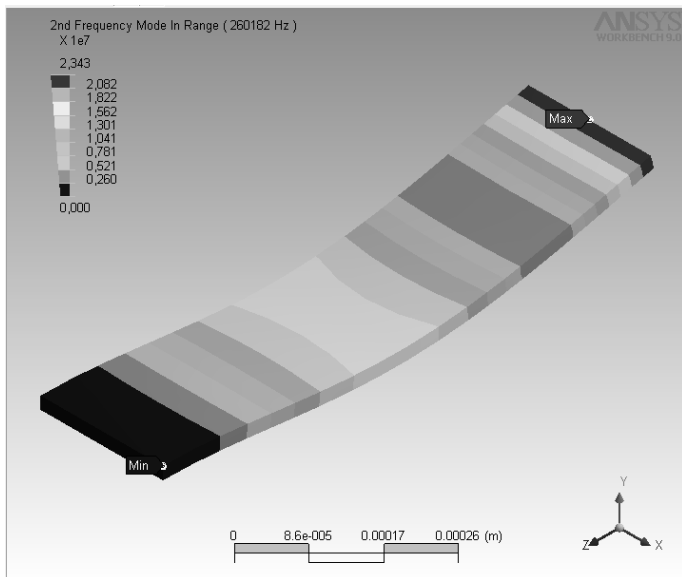


Рис. 1.30. Вторая резонансная частота кантилевера

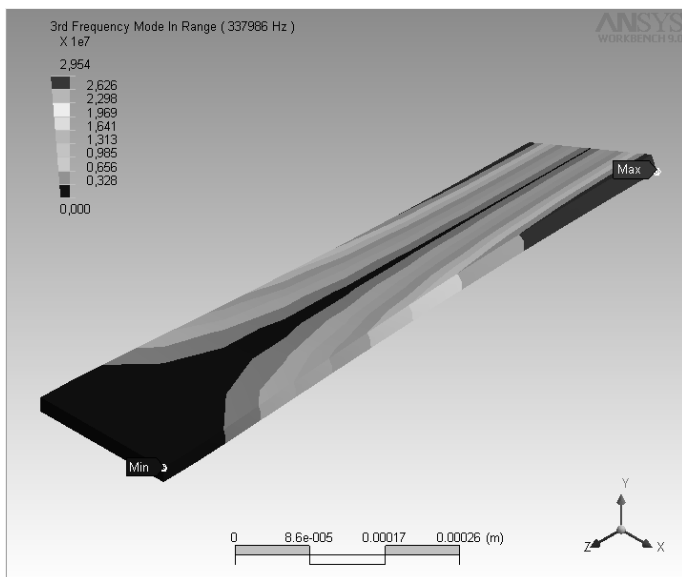


Рис. 1.31. Третья резонансная частота кантилевера

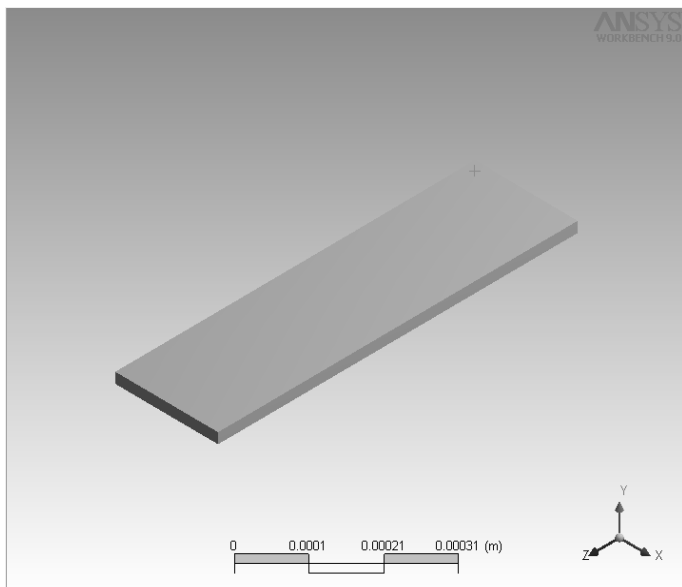


Рис. 1.32. Кантилевер геометрии $700 \times 200 \times 2$ мкм (размер кантилевера 700×200 мкм; толщина 2 мкм; ускорение 1 м/с^2)

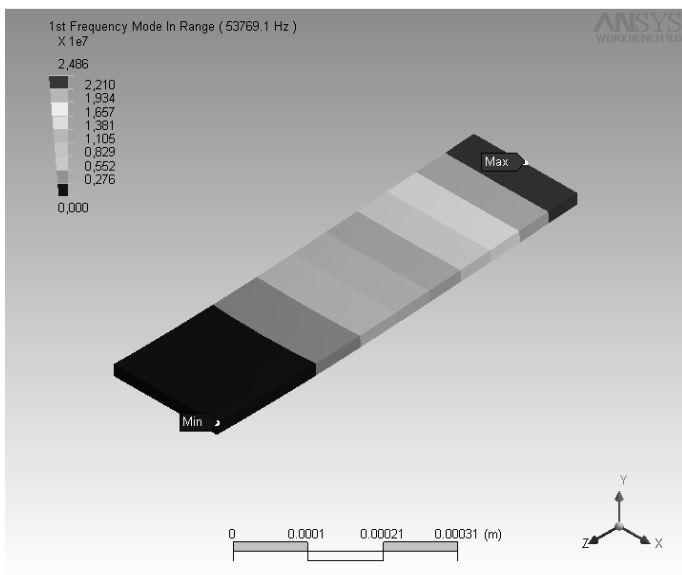


Рис. 1.33. Первая резонансная частота кантилевера

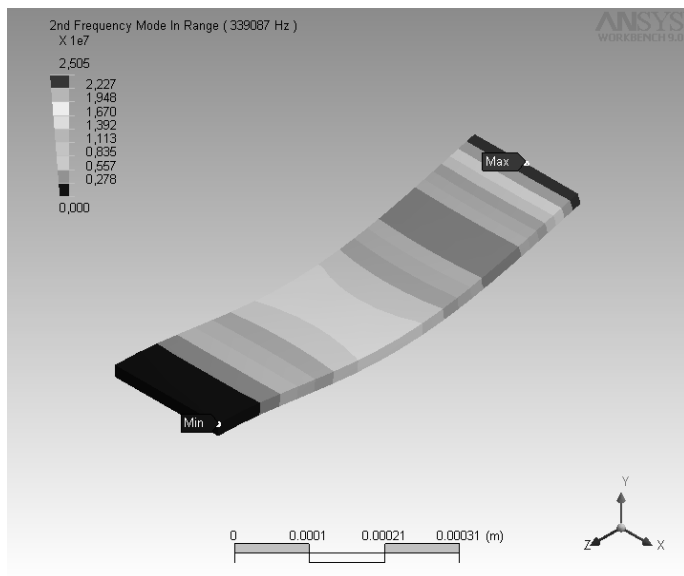


Рис. 1.34. Вторая резонансная частота кантилевера

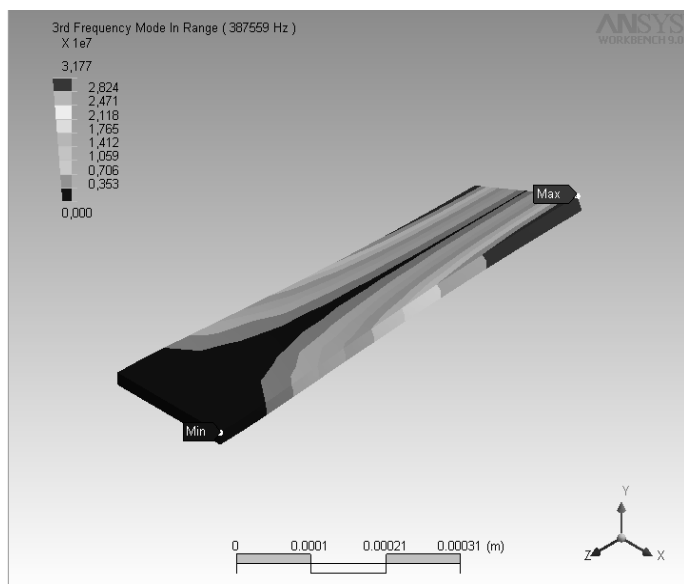


Рис. 1.35. Третья резонансная частота кантилевера

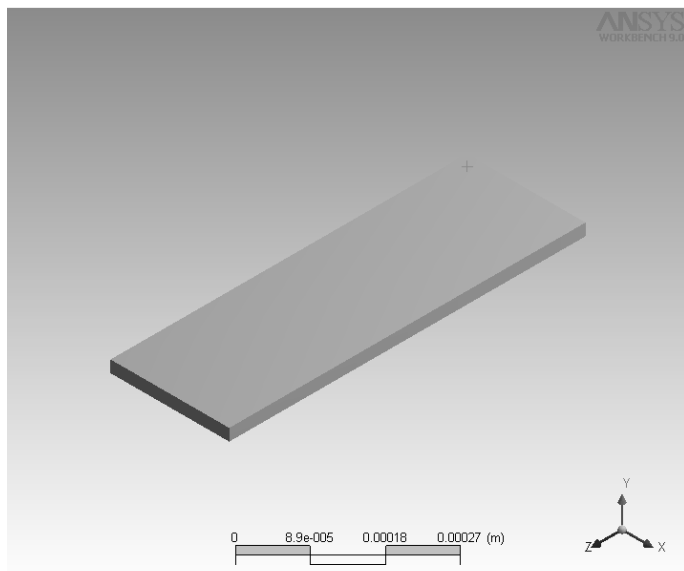


Рис. 1.36. Кантилевер геометрии $600 \times 200 \times 2$ мкм
(размер кантилевера 600×200 мкм; толщина 2 мкм; ускорение 1 м/с^2)

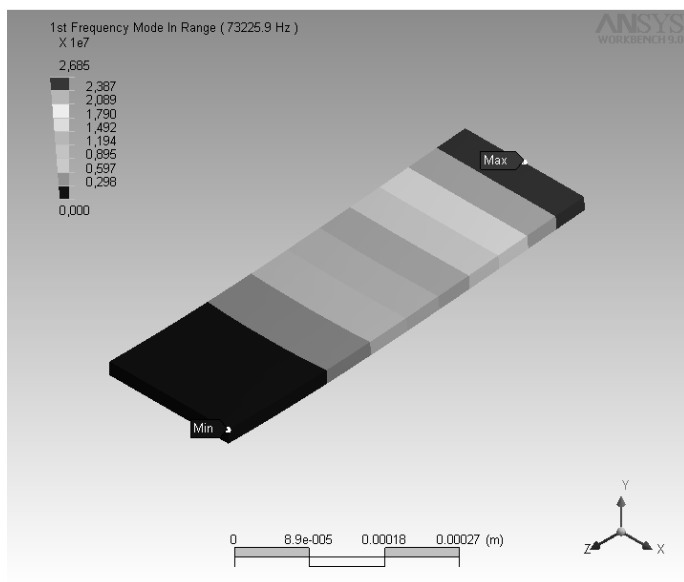


Рис. 1.37. Первая резонансная частота кантилевера

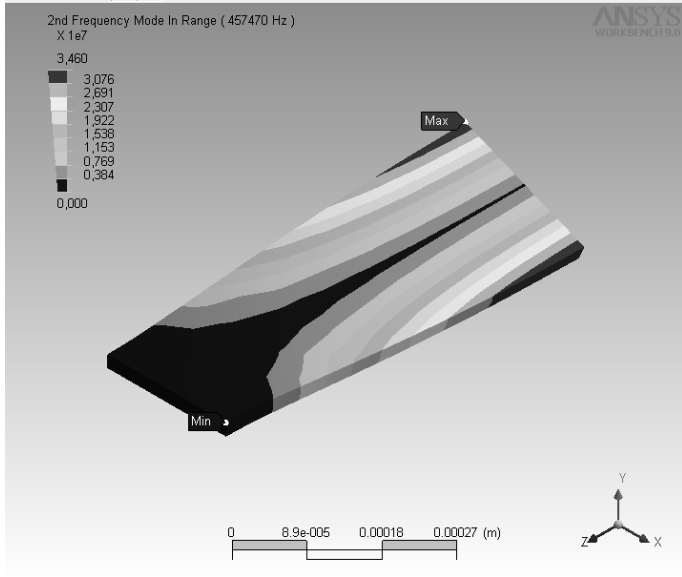


Рис. 1.38. Вторая резонансная частота кантилевера

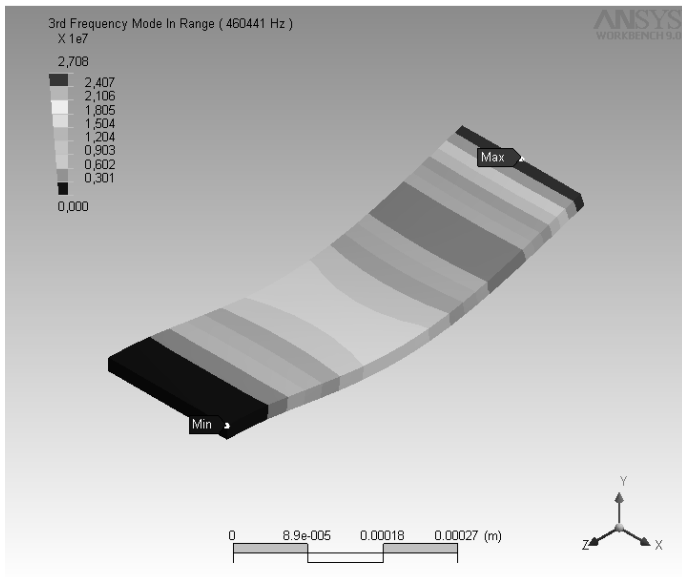


Рис. 1.39. Третья резонансная частота кантилевера

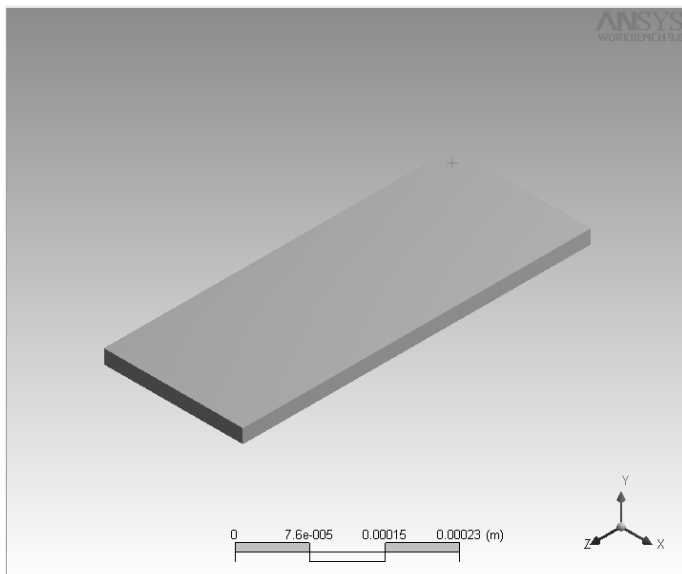


Рис. 1.40. Кантилевер геометрии $500 \times 200 \times 2$ мкм
(размер кантилевера 500×200 мкм; толщина 2 мкм; ускорение 1 м/с^2)

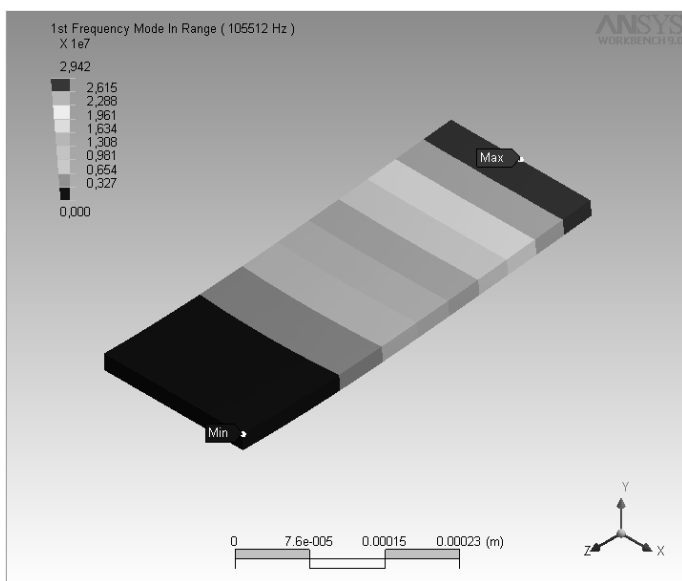


Рис. 1.41. Первая резонансная частота кантилевера

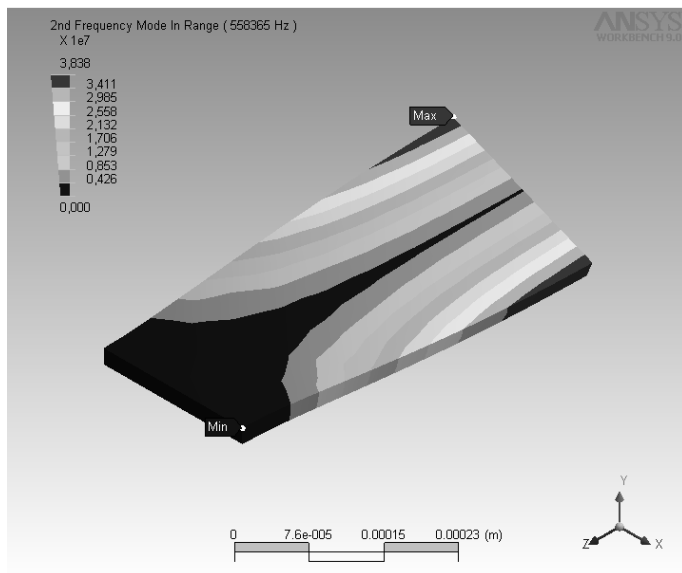


Рис. 1.42. Вторая резонансная частота кантилевера

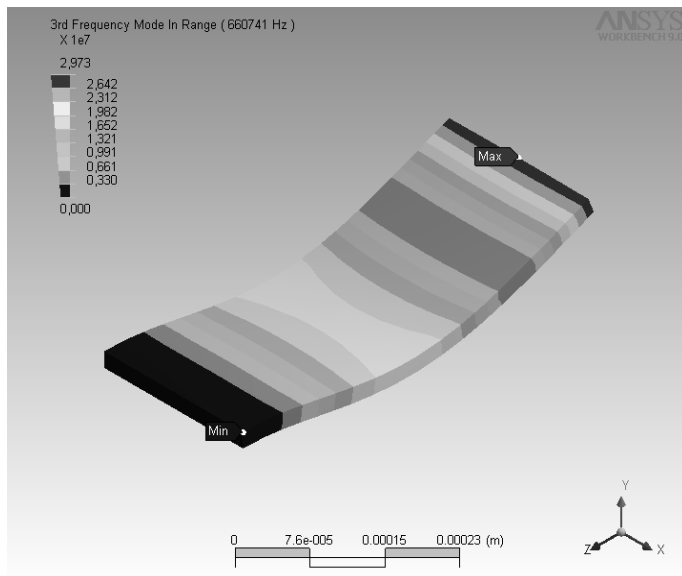


Рис. 1.43. Третья резонансная частота кантилевера

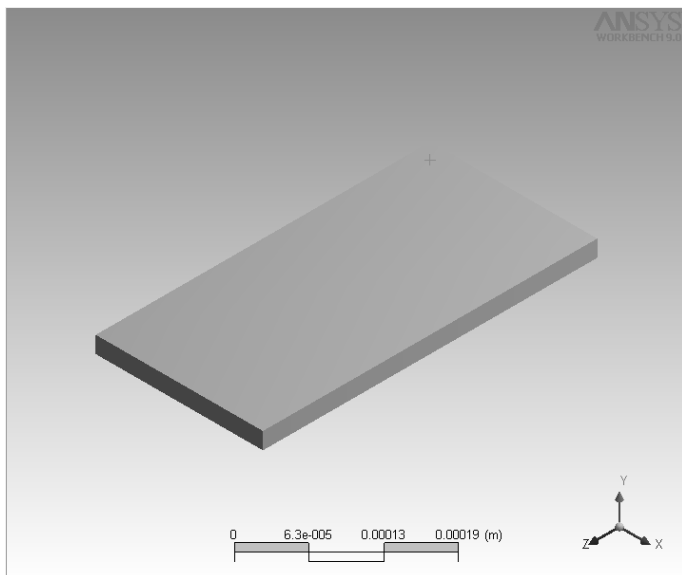


Рис. 1.44. Кантилевер геометрии $400 \times 200 \times 2$ мкм (размер кантилевера 400×200 мкм; толщина 2 мкм; ускорение 1 м/с^2)

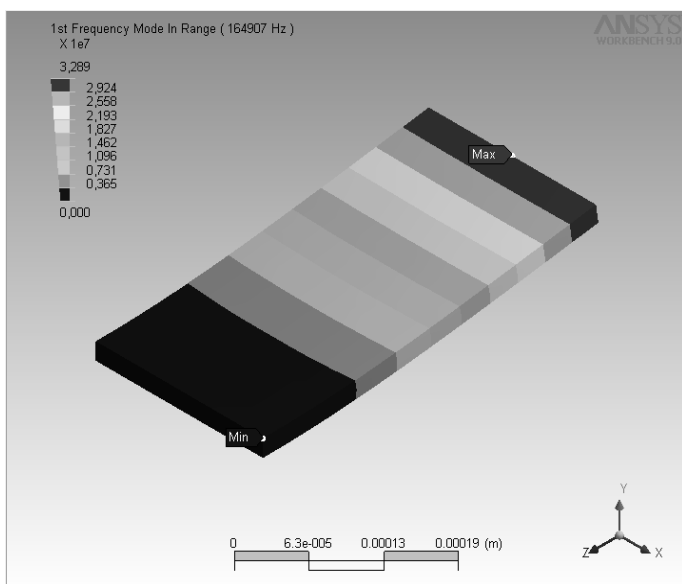


Рис. 1.45. Первая резонансная частота кантилевера

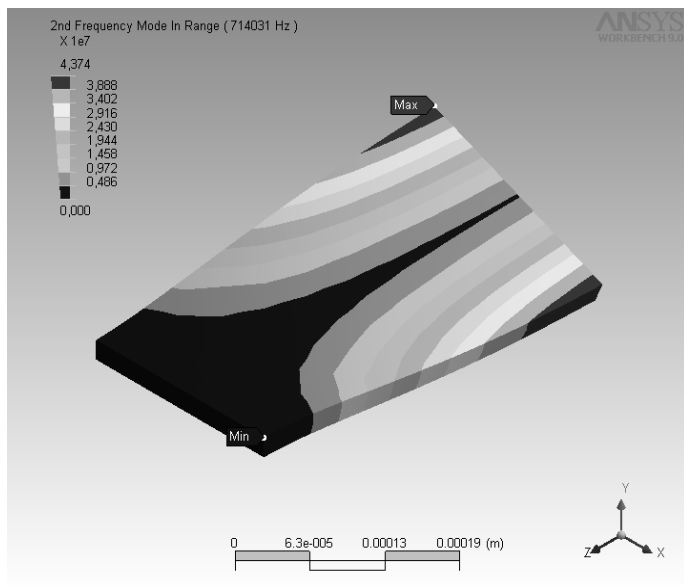


Рис. 1.46. Вторая резонансная частота кантилевера

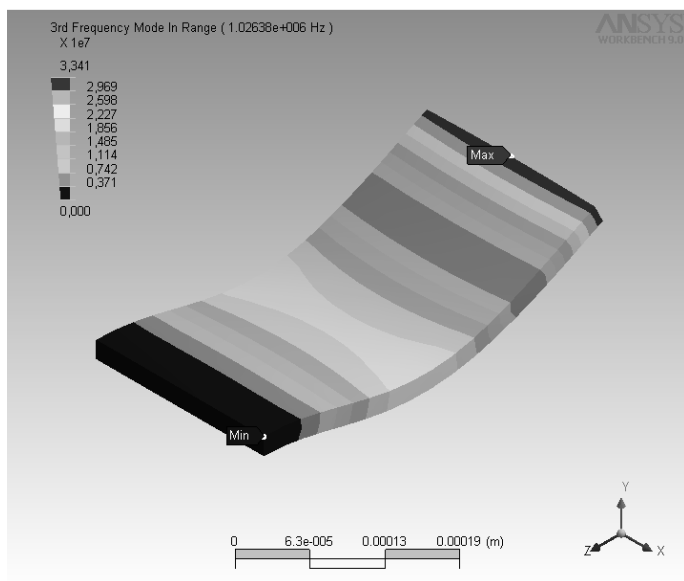


Рис. 1.47. Третья резонансная частота кантилевера

В табл. 1.3 приведены значения резонансной частоты каждого из режимов для каждой геометрии кантилевера.

Таблица 1.3

Сводная таблица значений резонансных частот кантилевера

Длина кантилевера, мкм	1-я гармоника	2-я гармоника	3-я гармоника
1000	26 326,7	166 878	253 187
900	32 515,1	205 831	298 557
800	41 170,9	260 182	337 986
700	53 769,1	339 087	387 559
600	73 225,9	457 470	460 441
500	105 512	558 365	660 741
400	164 907	714 931	1 026 380

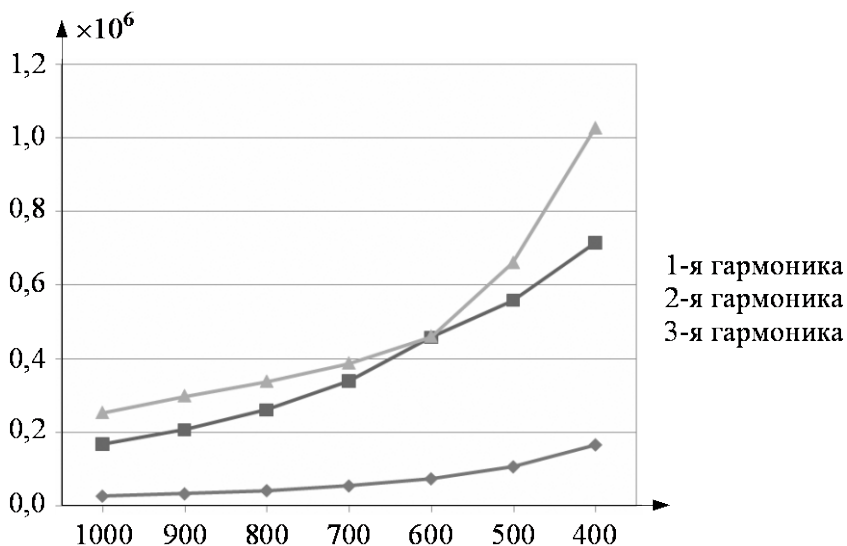


Рис. 1.48. График зависимости резонансной частоты от длины кантилевера

Как видно из рис. 1.48, при уменьшении длины кантилевера его резонансная частота возрастает. Это объясняется тем, что при уменьшении размеров уменьшается и масса. Однако стоит отметить, что 2-я гармоника для кантилеверов большой длины лежит ниже 3-й, а для коротких – наоборот. Это можно объяснить основным направлением колебаний, которое показано на рис. 1.19–1.47. Длинные кантилеверы во 2-й гармонике колеб-

лются в продольной плоскости, тогда как в 3-й они колеблются в поперечной плоскости.

1.5. БИОКОМПЬЮТЕРЫ

1.5.1. ДНК-вычисления

ДНК-вычисления – это раздел области молекулярных вычислений на границе молекулярной биологии и компьютерных наук. Основная идея ДНК-вычислений – построение новой парадигмы, создание новых алгоритмов вычислений на основе знаний о строении и функциях молекулы ДНК и операций, которые выполняются в живых клетках над молекулами ДНК при помощи различных ферментов.

Перспективы ДНК-вычислений – создание биологического нанокomпьютера, который будет способен хранить терабайты информации при объеме в несколько микрометров с производительностью порядка миллиарда операций в секунду при энергопотреблении не более одной миллиардной доли ватта.

Преимущества ДНК в компьютерных технологиях. Для современных процессоров и микросхем в качестве строительного материала используется кремний. Но возможности кремния не беспредельны. Молекулы ДНК могут оказаться тем самым материалом, который впоследствии заменит кремниевые транзисторы с их бинарной логикой. Достаточно сказать, что:

- ◆ один фунт (453 г) ДНК-молекул обладает ёмкостью для хранения данных, которая превосходит суммарную ёмкость всех современных электронных систем хранения данных;
- ◆ вычислительная мощность ДНК-процессора размером с каплю будет выше самого мощного современного суперкомпьютера;
- ◆ более 10 триллионов ДНК-молекул занимают объем всего в 1 см^3 , что достаточно для хранения объема информации в 10 Тбайт, при этом они могут производить 10 трлн. операций в секунду;
- ◆ все вычисления производятся не последовательно, а параллельно, что обеспечивает выполнение сложнейших математических расчетов за считанные минуты.

Строение молекул ДНК. Как известно, современные компьютеры работают с бинарной логикой, подразумевающей наличие всего двух состояний: логического нуля и единицы. Используя двоичный код, т. е. последовательность нулей и единиц, можно закодировать любую информацию. В молекулах ДНК имеется четыре базовых основания: аденин (А), гуанин (G), цитозин (С) и тимин (Т), связанных друг с другом в цепочку. То есть молекула ДНК (одинарная цепочка) может иметь, например, такой вид: АТТТАСGGCC – здесь используется не двоичная, а четверичная логика. И подобно тому, как в двоичной логике любую информацию можно закодировать в виде последовательности нулей и единиц, в молекулах ДНК можно кодировать любую информацию путем сочетания базовых оснований.

Базовые основания в молекулах ДНК находятся друг от друга на расстоянии 0,34 нм, что обуславливает их огромную информативную ёмкость:

- ◆ линейная плотность составляет 18 Мбит/дюйм;
- ◆ поверхностная информативная плотность, предполагая, что на одно базовое основание приходится площадь в 1 квадратный нанометр, составляет более 1 млн. Гбит/дюйм². Для сравнения отметим, что поверхностная плотность записи современных жестких дисков составляет порядка 7 Гбит/дюйм².

Другое важное свойство ДНК-молекул заключается в том, что они могут иметь форму регулярной двойной спирали, диаметр которой составляет всего 2 нм. Такая спираль состоит из двух цепей (последовательностей базовых оснований), причем содержание первой цепи строго соответствует содержанию второй.

Это соответствие достигается благодаря наличию водородных связей между направленными навстречу друг другу основаниями двух цепей – попарно G и С или А и Т. Описывая это свойство двойной спирали, молекулярные биологи говорят, что цепи ДНК комплементарны за счет образования пар G–С и А–Т.

К примеру, если последовательность S записывается как АТТАСGТCG, то дополняющая ее последовательность S' будет иметь вид ТААТGСAGC.

Процесс соединения двух одинарных цепочек ДНК путем связывания комплементарных оснований в регулярную двойную спираль называется ренатурацией, а обратный процесс, т. е. разъединение двойной цепочки и получение двух одинарных цепочек, – денатурацией (рис. 1.49).

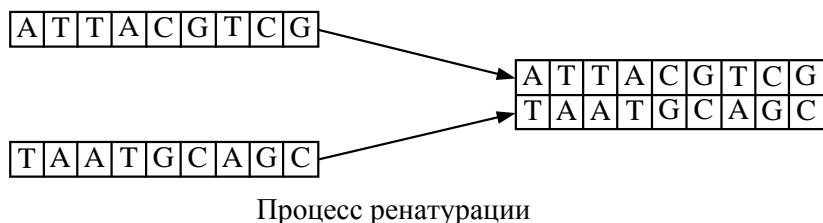
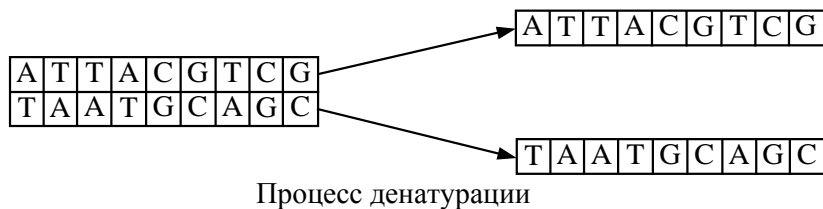


Рис. 1.49. Процессы ренатурации и денатурации

Комплементарная особенность строения ДНК-молекул может использоваться при ДНК-вычислениях. К примеру, на основе дополняющих друг друга последовательностей можно реализовать мощнейший механизм коррекции ошибок, который чем-то напоминает технологию зеркалирования данных RAID Level 1.

Базовые операции над ДНК-молекулами. Для различных манипуляций над ДНК-молекулами используются различные ферменты (ферменты). И точно так же, как современные микропроцессоры имеют набор базовых операций типа сложения, сдвига, логических операций AND, OR и NOT NOR, ДНК-молекулы под воздействием ферментов могут выполнять такие базовые операции, как разрезание, копирование, вставка и др. Причем все операции над ДНК-молекулами можно производить параллельно и независимо от других операций, к примеру дополнение цепочки ДНК осуществляется при воздействии на исходную молекулу ферментов – полимераз. Для работы полимеразы необходимо наличие одноцепочечной молекулы (матрицы), определяющей добавляемую цепочку по принципу комплементарности, праймера (небольшого двухцепочечного участка) и свободных нуклеотидов в растворе. Процесс дополнения цепочки ДНК показан на рис. 1.50.

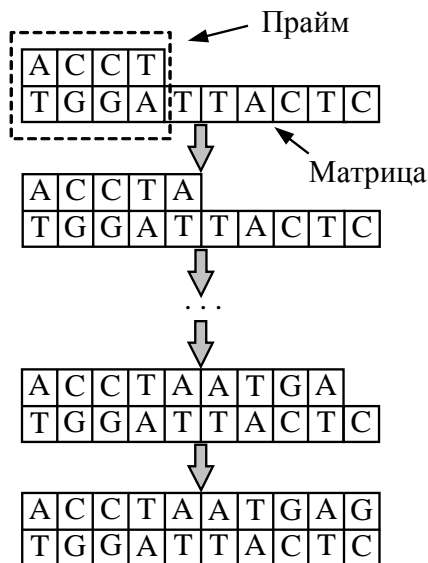


Рис. 1.50. Процесс дополнения цепочки ДНК при воздействии на исходную молекулу полимеразы

Существуют полимеразы, которым не требуются матрицы для удлинения цепочки ДНК. Например, терминальная трансфераза добавляет одинарные цепочки ДНК к обоим концам двухцепочечной молекулы. Таким образом, можно конструировать произвольную цепь ДНК (рис. 1.51).

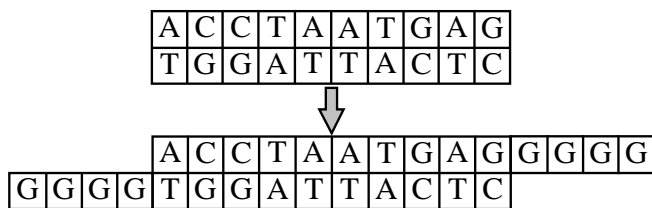


Рис. 1.51. Процесс удлинения цепочки ДНК

За укорачивание и разрезание молекул ДНК отвечают ферменты – нуклеазы. Различают эндонуклеазы и экзонуклеазы. Последние могут укорачивать и одноцепочечные, и двухцепочечные молекулы с одного или с обоих концов (рис. 1.52), а эндонуклеазы – только с концов.

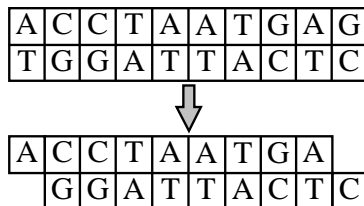


Рис. 1.52. Процесс укорачивания молекулы ДНК под воздействием экзонуклеазы

Разрезание молекул ДНК возможно под воздействием сайт-специфичных эндонуклеазов – рестриктазов, которые разрезают их в определенном месте, закодированном последовательностью нуклеотидов (сайтом узнавания). Разрез может быть прямым или несимметричным и проходить по сайту узнавания либо вне его. Эндонуклеазы разрушают внутренние связи в молекуле ДНК (рис. 1.53).

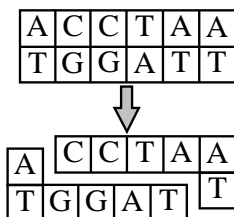


Рис. 1.53. Разрезание молекулы ДНК под воздействием рестриктазов

Сшивка – операция, обратная разрезанию, происходит под воздействием ферментов – лигазов. «Липкие концы» соединяются вместе с образованием водородных связей. Лигазы служат для того, чтобы закрыть насечки, т. е. способствовать образованию в нужных местах фосфодиэфирных связей, соединяющих основания друг с другом в пределах одной цепочки (рис. 1.54).

Еще одна интересная операция над ДНК-молекулами, которую можно отнести к числу базовых, – это модификация. Она используется для того, чтобы рестриктазы не смогли найти определенный сайт и не разрушили молекулу. Существует несколько типов модифицирующих ферментов – метилазы, фосфатазы и т. д.

Метилаза имеет тот же сайт узнавания, что и соответствующая рестриктаза. При нахождении нужной молекулы метилаза моди-

фиксирует участок с сайтом так, что рестриктаза уже не сможет идентифицировать эту молекулу.

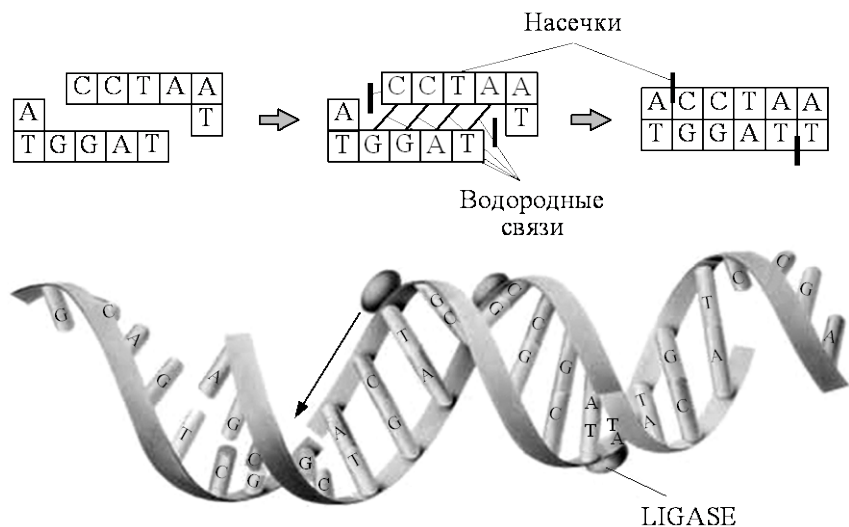


Рис. 1.54. Сшивка ДНК-молекул под воздействием лигаз

Копирование, или размножение, ДНК-молекул осуществляется в ходе полимеразной цепной реакции (Polymerase Chain Reaction, PCR) (рис. 1.55). Процесс копирования можно разделить на несколько стадий: денатурация, праймирование и удлинение. Он происходит лавинообразно. На первом шаге из одной молекулы образуются две, на втором – из двух молекул – четыре, а после n шагов получается уже два в степени n молекул.

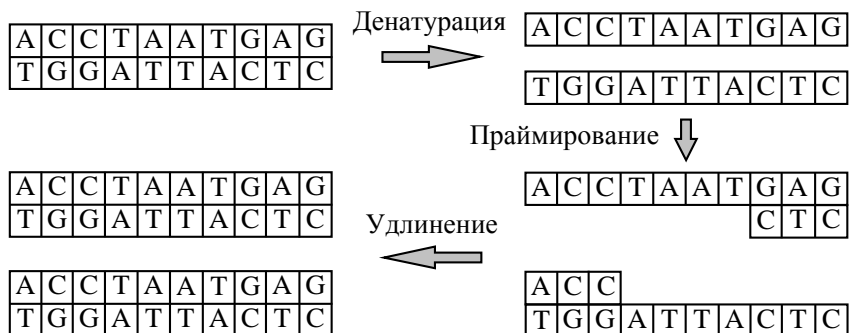


Рис. 1.55. Процесс копирования ДНК-молекулы

Еще одна операция, которую можно производить над ДНК-молекулами, – это секвенирование, т. е. определение последовательности нуклеотидов в ДНК. Для секвенирования цепочек разной длины применяют различные методы. При помощи метода праймер-опосредованной прогулки удастся на одном шаге секвенировать последовательность в 250–350 нуклеотидов. После открытия рестриктаз стало возможным секвенировать длинные последовательности по частям.

Ну и последняя процедура – это гель-электрофорез, используемый для разделения молекул ДНК по длине. Если молекулы поместить в гель и приложить постоянное электрическое поле, то они будут двигаться по направлению к аноду, причем более короткие молекулы будут двигаться быстрее. Используя данное явление, можно реализовать сортировку ДНК-молекул по длине.

ДНК-вычисления. ДНК-молекулы со своей уникальной формой строения и возможностью реализовать параллельные вычисления позволяют по-другому взглянуть на проблему компьютерных вычислений. Традиционные процессоры выполняют программы последовательно. Несмотря на существование многопроцессорных систем, многоядерных процессоров и различных технологий, направленных на повышение уровня параллелизма, в своей основе все компьютеры, построенные на основе фон-неймановской архитектуры, являются устройствами с последовательным режимом выполнения команд. Все современные процессоры реализуют следующий алгоритм обработки команд и данных: выборка команд и данных из памяти и исполнение инструкций над выбранными данными. Этот цикл повторяется многократно и с огромной скоростью.

ДНК-вычисления имеют в своей основе абсолютно иную, параллельную архитектуру и в ряде случаев именно благодаря этому способны с легкостью рассчитывать те задачи, для решения которых компьютерам на базе фон-неймановской архитектуры потребовались бы годы.

Эксперимент Эдлмана. История ДНК-вычислений начинается в 1994 г. Именно тогда Леонард М. Эдлман (Leonard M. Adleman) попытался решить весьма тривиальную математическую задачу абсолютно нетривиальным способом – с использованием ДНК-вычислений. Фактически это было первой демонстрацией прототипа биологического компьютера на основе ДНК-вычислений.

Задача, которую Эдлман выбрал для выполнения с помощью ДНК-вычислений, известна как поиск гамильтонова пути в графе

или выбор маршрута путешествия (traveling salesman problem). Смысл ее заключается в следующем: имеется несколько городов, которые необходимо посетить, причем побывать в каждом городе можно только один раз.

Зная пункт отправления и конечный пункт, необходимо определить маршрут путешествия (если он существует). При этом маршрут составляется с учетом возможных авиаперелетов и коннектов различных авиарейсов.

Итак, предположим, что имеется всего четыре города (в эксперименте Эдлмана использовалось семь городов): Атланта (Atlanta), Бостон (Boston), Детройт (Detroit) и Чикаго (Chicago). Перед путешественником ставится задача выбрать маршрут, чтобы попасть из Атланты в Детройт, побывав при этом в каждом городе только один раз. Схемы возможных сообщений между городами показаны на рис. 1.56.

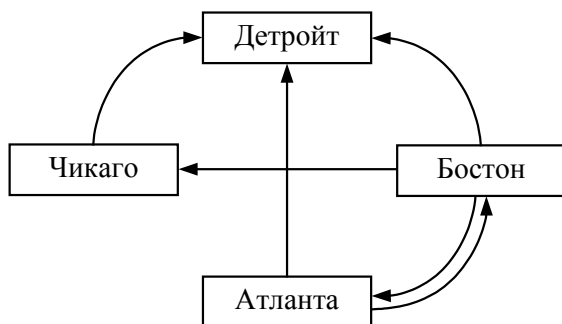


Рис. 1.56. Схемы возможных сообщений между городами

Нетрудно заметить (для этого требуется всего несколько секунд), что единственно возможный маршрут (гамильтонов путь) следующий: Атланта–Бостон–Чикаго–Детройт.

Действительно, при небольшом количестве городов составить такой маршрут довольно просто. Но с увеличением их числа сложность решения задачи экспоненциально возрастает и становится трудновыполнимой не только для человека, но и для компьютера.

Так, на рис. 1.57 показан граф из семи вершин с указанием возможных переходов между ними. Для поиска гамильтонова пути обычному человеку требуется не более одной минуты. Именно такой граф был использован в эксперименте Эдлмана. На рис. 1.58 представлен граф из 12 вершин – в этом случае поиск гамильтонова пути оказывается уже не такой простой задачей. Вообще, слож-

ность решения задачи поиска гамильтонова пути возрастает экспоненциально с ростом числа вершин в графе. К примеру, для графа из 10 вершин существует 10^6 возможных путей; для графа из 20 вершин – 10^{12} , а для графа из 100 вершин – 10^{100} вариантов. Понятно, что в последнем случае для генерации всех возможных путей и их проверки потребуется огромное время даже для современного суперкомпьютера.

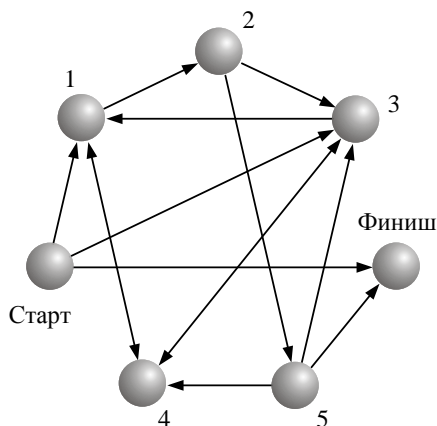


Рис. 1.57. Поиск оптимального маршрута путешествия

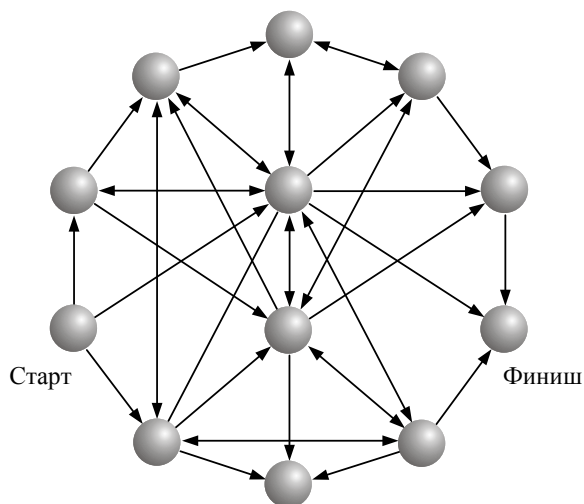


Рис. 1.58. Граф, состоящий из 12 вершин

Итак, вернемся к нашему примеру с поиском гамильтонова пути в случае четырех городов (рис. 1.56).

Для решения данной задачи с использованием ДНК-вычислений Эдлман закодировал название каждого города в виде одной цепочки ДНК, причем каждая из них содержала 20 базовых оснований. Для простоты мы будем кодировать каждый город ДНК-цепочкой из восьми оснований. ДНК-коды городов показаны в табл. 1.4. Обратите внимание, что цепочка длиной в восемь базовых оснований оказывается избыточной для кодирования всего четырех городов.

Таблица 1.4

ДНК-коды городов

Город	ДНК-код города	Комплементарный ДНК-код города
Атланта	ACTT GCAG	TGAA CGTC
Бостон	TCGG ACTG	AGCC TGAC
Чикаго	GGCT ATGT	CCGA TACA
Детройт	CCGA GCAA	GGCT CGTT

Отметим, что для каждого ДНК-кода города, который определяет одинарную ДНК-цепочку, существует и комплементарная цепочка, т. е. комплементарный ДНК-код города, причем и ДНК-код города, и комплементарный код абсолютно равноправны.

Далее с помощью одинарных ДНК-цепочек необходимо закодировать все возможные перелеты (Атланта–Бостон, Бостон–Детройт, Чикаго–Детройт и т. д.). Для этого использовался следующий подход. Из названия города отправления брались четыре последних базовых основания, а из названия города прибытия – четыре первых. К примеру, перелету Атланта–Бостон будет соответствовать следующая последовательность: GCAG TCGG (рис. 1.59).

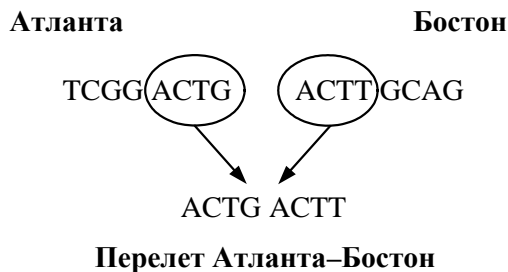


Рис. 1.59. Кодирование перелетов между городами

ДНК-кодирование всех возможных перелетов показано в табл. 1.5.

Таблица 1.5

ДНК-коды всех возможных перелетов

Авиаперелеты	ДНК-коды авиаперелетов
Атланта–Бостон	GCAG TCGG
Атланта–Детройт	GCAG CCGA
Бостон–Чикаго	ACTG GGCT
Бостон–Детройт	ACTG CCGA
Бостон–Атланта	ACTG ACTT
Чикаго–Детройт	ATGT CCGA

Итак, после того как готовы коды городов и возможных перелетов между ними, можно непосредственно переходить к вычислению гамильтонова пути. Процесс вычисления состоит из четырех этапов:

1. Сгенерировать все возможные маршруты.
2. Отобрать маршруты, которые начинаются в Атланте и заканчиваются Детройтом.
3. Выбрать маршруты, длина которых соответствует количеству городов (в нашем случае длина маршрута составляет четыре города).
4. Выбрать маршруты, в которых каждый город присутствует только один раз.

Итак, на первом этапе мы должны сгенерировать все возможные маршруты. Напомним, что правильный маршрут соответствует перелетам Атланта–Бостон–Чикаго–Детройт. Этому маршруту соответствует ДНК-молекула GCAG TCGG ACTG GGCT ATGT CCGA.

Для того чтобы сгенерировать все возможные маршруты, достаточно поместить в пробирку все необходимые и заранее заготовленные ингредиенты, т. е. ДНК-молекулы, соответствующие всем возможным перелетам, и ДНК-молекулы, соответствующие всем городам. Но вместо того, чтобы применять одинарные ДНК-цепочки, соответствующие названиям городов, необходимо использовать комплементарные им ДНК-цепочки, т. е. вместо ДНК-цепочки ACTT GCAG, соответствующей Атланте, будем применять комплементарную ДНК-цепочку TGAA CGTC и т. д., поскольку ДНК-код города и комплементарный код абсолютно равноправны.

Далее все эти молекулы (достаточно буквально щепотки, которая будет содержать порядка 10^{14} различных молекул) помещаем

в воду, добавляем лигазов, произносим заклинание и... буквально через несколько секунд получаем все возможные маршруты.

Процесс образования цепочек ДНК, соответствующих различным маршрутам, происходит следующим образом. Рассмотрим, к примеру, цепочку GCAG TCGG, отвечающую за перелет Атланта–Бостон. Вследствие высокой концентрации различных молекул данная цепочка обязательно встретится с комплементарной ДНК-цепочкой AGCC TGAC, соответствующей Бостону. Поскольку группы TCGG и AGCC комплементарны друг другу, то за счет образования водородных связей эти цепочки сцепятся друг с другом (рис. 1.60).

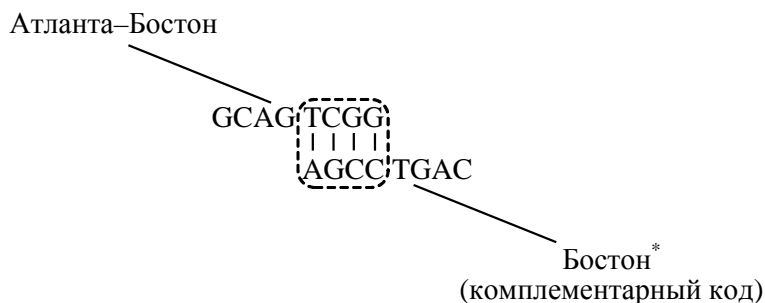


Рис. 1.60. Сцепление цепочек, соответствующих перелету Атланта–Бостон и Бостону

Теперь образовавшаяся цепочка неминуемо встретится с ДНК-цепочкой ACTG GGCT, соответствующей авиаперелету Бостон–Чикаго, и поскольку группа ACTG (первые четыре основания в этой цепочке) комплементарна группе TGAC (последние четыре основания в комплементарном коде Бостона), то ДНК-цепочка ACTG GGCT присоединится к уже образовавшейся цепочке. Далее к этой цепочке таким же образом присоединится ДНК-цепочка, соответствующая городу Чикаго (комплементарный код), а затем и цепочка авиаперелета Чикаго–Детройт. Процесс образования маршрута показан на рис. 1.61.

Здесь рассмотрен пример образования только одного маршрута (причем это именно гамильтонов маршрут). Аналогичным образом получают и все остальные возможные маршруты (например, Атланта–Бостон–Атланта–Детройт). Важно, что все маршруты формируются одновременно, т. е. параллельно. Причем время, требуемое для создания всех возможных маршрутов в данной задаче

и всех маршрутов в задаче с 10 или 20 городами, абсолютно одинаково (лишь бы хватило исходных ДНК-молекул). Собственно, именно в параллельном алгоритме ДНК-вычислений и заключается основное преимущество в сравнении с фон-неймановской архитектурой.

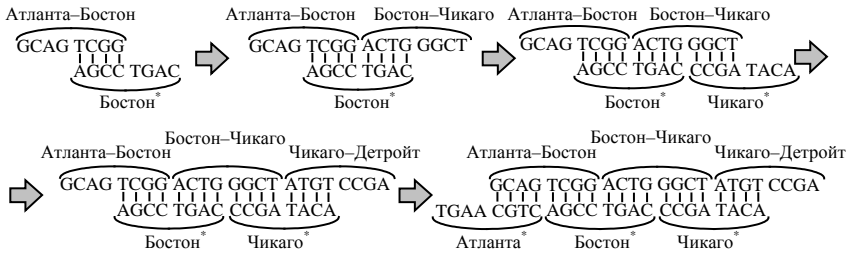


Рис. 1.61. Процесс образования ДНК-цепочки, соответствующей маршруту Атланта–Бостон–Чикаго–Детройт

Итак, в пробирке образованы ДНК-молекулы, соответствующие всем возможным маршрутам. Однако это еще не решение задачи – нам необходимо выделить ту единственную ДНК-молекулу, которая отвечает за гамильтонов маршрут. Поэтому на следующем этапе необходимо отобрать молекулы, соответствующие маршрутам, начинающимся в Атланте и заканчивающимся в Детройте.

Для этого используется полимеразная цепная реакция (PCR), в результате которой создается множество копий только тех ДНК-цепочек, которые начинаются с кода Атланты и заканчиваются кодом Детройта.

Для реализации полимеразной цепной реакции применяются два прайма: GCAG и GGCT. Процесс копирования ДНК-молекул, начинающихся с ДНК-кода Атланты и заканчивающихся ДНК-кодом Детройта, показан на рис. 1.62.

Отметим, что в присутствии праймов GCAG и GGCT будут копироваться и те ДНК-молекулы, которые начинаются с ДНК-кодов Атланты, но не заканчиваются ДНК-кодом Детройта (под действием прайма GCAG), а также ДНК-молекулы, которые заканчиваются ДНК-кодом Детройта, но не начинаются с ДНК-кода Атланты (под действием прайма GGCT). Понятно, что скорость копирования таких молекул будет гораздо ниже скорости копирования ДНК-молекул, начинающихся с ДНК-кода Атланты и заканчивающихся ДНК-кодом Детройта. Следовательно, после PCR-реак-

ции мы получим преобладающее количество ДНК-молекул в форме регулярной двойной спирали, соответствующих маршрутам, начинающимся в Атланта и заканчивающимся в Детройте.

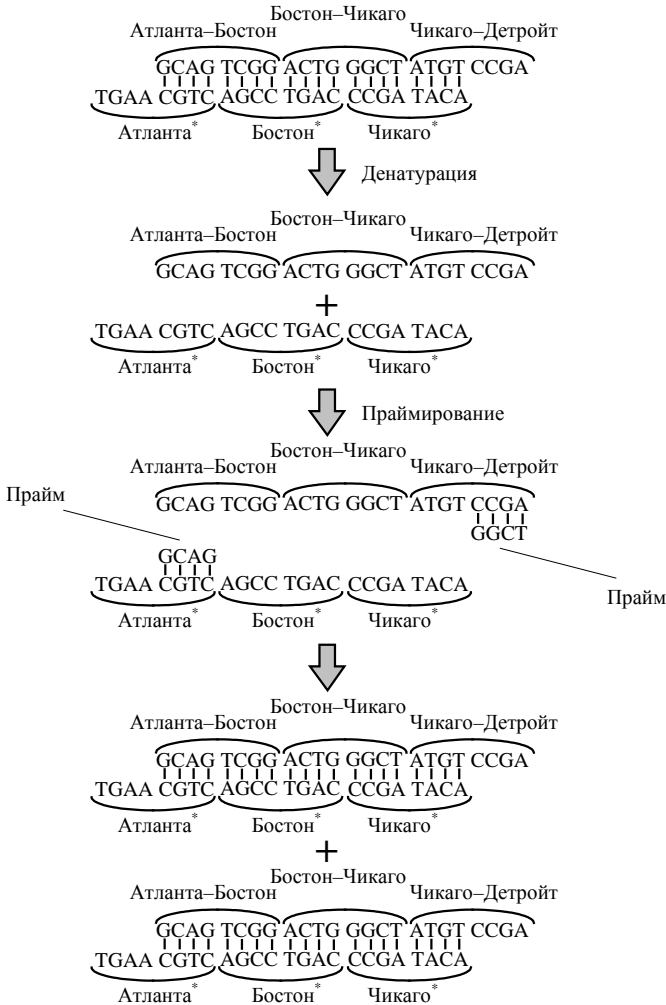


Рис. 1.62. Процесс копирования ДНК-молекул в ходе PCR-реакции

На следующем этапе необходимо выделить молекулы нужной длины, т. е. те, что содержат ДНК-коды ровно четырех городов. Для этого используется гель-электрофорез, что позволяет отсорти-

ровать молекулы по длине. В результате мы получаем молекулы нужной длины (ровно четыре города), начинающиеся с кода Атланты и заканчивающиеся кодом Детройта.

Теперь необходимо убедиться, что в отобранных молекулах код каждого города присутствует только один раз. Эта операция реализуется с применением процесса, известного как *affinity purification*. Для данной операции используется микроскопический магнитный шарик диаметром порядка одного микрона. К нему притягиваются комплементарные ДНК-коды того или иного города, которые выполняют функцию пробы. К примеру, если требуется проверить, присутствует ли в исследуемой ДНК-цепочке код города Бостона, то необходимо сначала поместить магнитный шарик в пробирку с ДНК-молекулами, соответствующими ДНК-кодам Бостона. В результате мы получим магнитный шарик, облепленный нужными нам пробами. Затем этот шарик помещается в пробирку с исследуемыми ДНК-цепочками – в результате к нему (за счет образования водородных связей между комплементарными группами) притянутся ДНК-цепочки, в которых присутствует комплементарный код Бостона. Далее шарик с отсортированными молекулами вынимается и помещается в новый раствор, из которого затем удаляется (при повышении температуры ДНК-молекулы отваливаются от шарика). Данная процедура (сортировка) повторяется последовательно для каждого города, и в результате мы получаем только те молекулы, в которых содержатся ДНК-коды всех городов, а значит, и маршруты, соответствующие гамильтонову пути. Фактически задача решена – осталось лишь просчитать ответ.

Выводы

Эдлман продемонстрировал решение задачи поиска гамильтонова пути на примере всего семи городов и потратил на это семь дней. Это был первый эксперимент, продемонстрировавший возможности ДНК-вычислений. Фактически Эдлман доказал, что, пользуясь вычислениями на ДНК, можно эффективно решать задачи переборного характера, и обозначил технику, которая в дальнейшем послужила основой для создания модели параллельной фильтрации.

Впрочем, многие исследователи не испытывают оптимизма по поводу будущего биологических компьютеров. Вот лишь маленький пример. Если бы подобным методом понадобилось найти га-

миллионов путь в графе, состоящем из 200 вершин, потребовалось бы количество ДНК-молекул, сопоставимое по весу со всей нашей планетой! Это принципиальное ограничение, конечно же, является своего рода тупиковой ситуацией. Поэтому многие исследовательские лаборатории (например, компания IBM) предпочли сфокусировать свое внимание на других идеях альтернативных компьютеров, таких как углеродные нанотрубки и квантовые компьютеры.

После эксперимента Эдлмана было проведено множество других исследований возможностей ДНК-вычислений. Например, можно вспомнить опыт Э. Шапиро: в нем был реализован конечный автомат, который может находиться в двух состояниях: S0 и S1 – и отвечает на вопрос: четное или нечетное количество символов содержится во входной последовательности символов.

1.5.2. БИОИНФОРМАТИКА

Вычислительная биология, она же биоинформатика, она же компьютерная генетика, – молодая наука, возникшая в начале 80-х годов на стыке молекулярной биологии и генетики, математики (статистики и теории вероятности) и информатики, испытавшая влияние лингвистики и физики полимеров. Толчком к этому послужило появление в конце 70-х годов быстрых методов секвенирования последовательностей ДНК. Нарастание объема данных происходило лавинообразно (рис. 1.63), и довольно скоро стало ясно, что каждая полученная последовательность не только представляет интерес сама по себе (например, для целей генной инженерии и биотехнологии), но и приобретает дополнительный смысл при сравнении с другими.

Традиционно к биоинформатике относятся:

- ◆ статистический анализ последовательностей ДНК;
- ◆ предсказание функции по последовательности (распознавание генов в последовательности ДНК, поиск регуляторных сигналов, предсказание функций белков – некоторые из этих задач рассмотрены в следующих разделах);
- ◆ анализ пространственной структуры белков и нуклеиновых кислот, в том числе предсказание структуры белка по последовательности; здесь биоинформатика граничит с биофизикой и физикой полимеров;
- ◆ теория молекулярной эволюции и систематика.

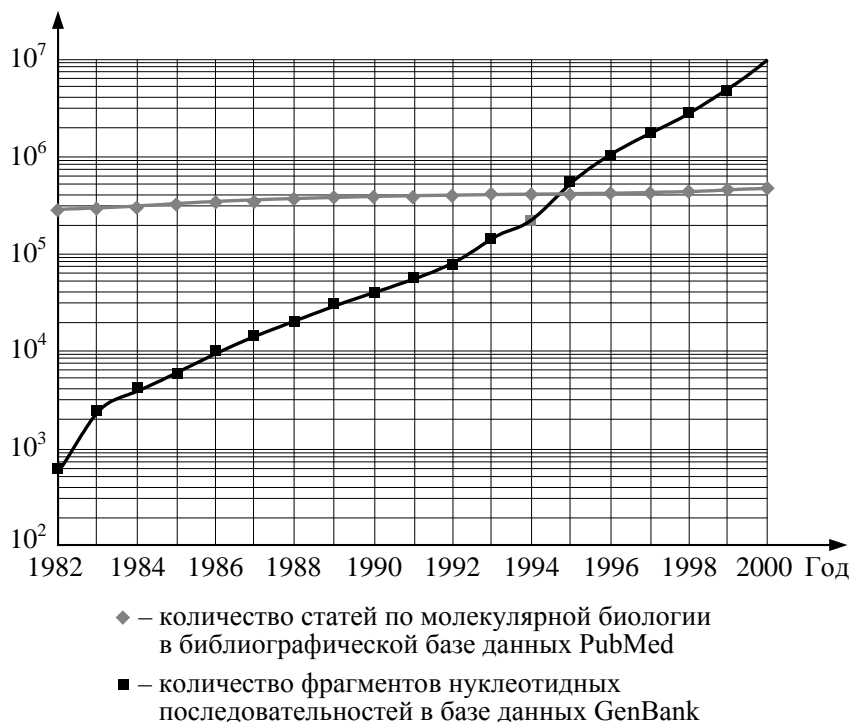


Рис. 1.63. Количество статей по молекулярной биологии в библиографической базе данных PubMed и количество фрагментов нуклеотидных последовательностей в базе данных GenBank по состоянию на 1982–2000 гг. (шкала – логарифмическая)

1.5.3. БИОАЛГОРИТМИКА

Биоалгоритмика, раздел биоинформатики, разрабатывающий алгоритмы анализа первичных структур (последовательностей) биополимеров. Биоалгоритмика находится на стыке прикладной теории алгоритмов и теоретической молекулярной биологии и, подобно другим разделам биоинформатики, бурно развивалась в течение 70–90-х гг. XX века.

Анализ биологических последовательностей имеет свою специфику – прежде всего с точки зрения постановок задач. Например, задача о распознавании «вторичной» структуры РНК. Она очень важна для молекулярной биологии и впервые была рассмот-

рена еще в конце 70-х годов. Молекула рибонуклеиновой кислоты (РНК) – однонитевой полимер, состоящий из четырех видов мономеров-нуклеотидов (аденин, гуанин, урацил, цитозин). А–У и Г–Ц могут образовывать водородные связи, стабилизирующие молекулу. Однако образование одних связей из-за стереохимических соображений делает невозможным образование других, т. е. не все комбинации межнуклеотидных связей в молекуле РНК допустимы (правила конфликтов между связями известны). Требуется для данной нуклеотидной последовательности найти наиболее стабильную вторичную структуру, т. е. допустимый набор межнуклеотидных связей, содержащий наибольшее возможное количество элементов (рис. 1.64). Эта задача может быть переформулирована как задача построения гиперграфа специального вида с максимально возможной суммой весов ребер (вершины соответствуют нуклеотидам, ребра – установленным связям) и решена с помощью метода динамического программирования. Однако появляющиеся ограничения на вид графа весьма экзотичны с точки зрения небактериологических приложений.

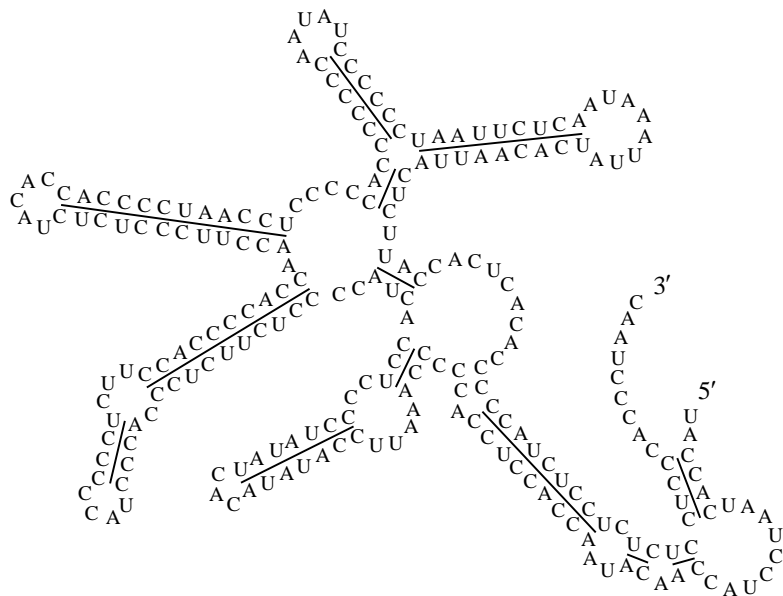


Рис. 1.64. Вторичная структура участка бактериофага Qβ (231 основание). Сплошные линии проведены между парами оснований, связанных водородными связями

Отметим следующие обстоятельства, характерные для многих важных задач биоалгоритмики:

- ◆ в описанной выше модели правильнее считать не количество связей, а их суммарную энергию, энергия каждой возможной пары считается известной. С алгоритмической точки зрения задача практически не меняется;
- ◆ модель, положенная в основу описанной выше задачи, упрощенная и во многих случаях не согласуется с экспериментом. Полезно учитывать и вклад нуклеотидов, не участвующих в образовании водородных связей. Ограничения на множество допустимых наборов связей, принятые ранее, слишком строгие. Различные формальные постановки задач, лучше отражающие биологическую реальность, приводят к существенному усложнению алгоритма;
- ◆ в реальности молекула РНК может принимать не ту структуру, которой мы приписали оптимальную энергию, а несколько иную, например, из-за того, что мы не знаем точных значений энергетических параметров. Поэтому полезно не искать одну «оптимальную» структуру, а проанализировать все возможные структуры и оценить вероятность образования каждой отдельной связи («статистический вес» связи). Это также можно решить методом динамического программирования;
- ◆ многие авторы пытаются выяснить вторичную структуру РНК, не сводя ее к какой-либо алгоритмической оптимизационной задаче, а путем моделирования реального процесса «сворачивания» молекулы РНК (т. е. установления и исчезновения водородных связей).

1.6. ВВЕДЕНИЕ В БИОМЭМС. МИКРОФЛЮИДИКА

Цель лекции: ознакомление с курсом, основными понятиями и определениями микрофлюидики, общее представление о биоинженерии и биоМЭМС.

Биомедицинская nanoинженерия – инженерная деятельность, связанная с разработкой наноразмерных объектов и систем биологического и медицинского назначения.

Примеры:

- ◆ тканевая инженерия и биоматериалы;
- ◆ генная инженерия;
- ◆ медицинская визуализация;
- ◆ биореакторы и фармацевтическое производство;
- ◆ протезирование;
- ◆ биоМЭМС.

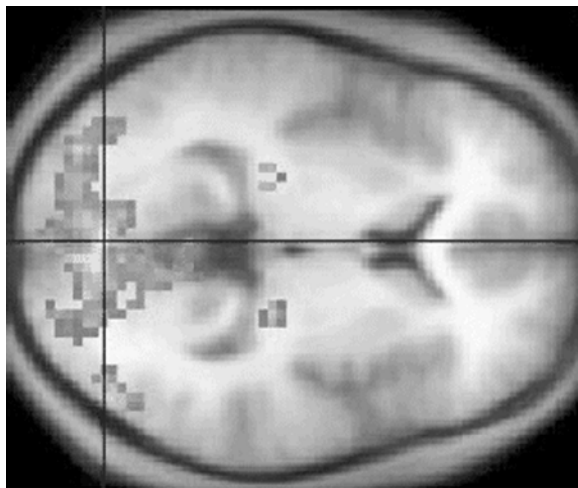


Рис. 1.65. MRI-скан, отображающий области стимуляции, включая первичную зрительную кору

Тканевая инженерия и биоматериалы – использование инженерных материалов совместно с соответствующими биологическими клетками и объектами для улучшения или замены естественных биологических функций.

Примеры:

- ◆ рассасывающиеся швы;
- ◆ биodeградируемые полимеры;
- ◆ платформы для обеспечения присоединения и переноса клеток и лекарств;
- ◆ биосовместимость.

Примеры медицинской визуализации:

- ◆ отображение магнитного резонанса (MRI) (рис. 1.65);
- ◆ ультразвук;
- ◆ томография.



Рис. 1.66. Кохлеарный имплант

Примеры нейропротезирования:

- ◆ кохлеарная имплантация (рис. 1.66);
- ◆ восстановление зрения;
- ◆ глубокая мозговая стимуляция.

Примеры биоМЭМС:

- ◆ микрофлюидные чипы;
- ◆ нейрозонды;
- ◆ ДНК-матрицы;
- ◆ микромиксеры.

На рис. 1.67 и 1.68 представлены размерности и масштабы некоторых микро- и наносистем.



Рис. 1.67. Размерности и масштабы некоторых микрофлюидных устройств



Рис. 1.68. Размерности и масштабы некоторых молекул и препаратов

Микрофлюидика – междисциплинарная наука, описывающая поведение малых (порядка микро- и нанолитра) объемов и потоков жидкостей. Микрофлюидика находится на стыке физики, гидравлики, динамики, химии, биологии и инженерных знаний.

В табл. 1.6 представлены основные *методы управления потоками жидкости* в МЭМС/НЭМС.

Таблица 1.6

Методы управления потоками жидкости

Механизм	Жидкости	Примечания
Давление	Водные и неводные	Не зависит от состава раствора. Зависит от вязкости и геометрии микроканалов
Электроосмос	Водные	Сильно зависит от состава буферного раствора. Требуется сильных электрических полей
Центробежные силы	Водные и неводные	Не зависит от состава раствора. Зависит от вязкости, плотности и геометрии микроканалов
Ультразвуковой	Водные и неводные	Требуется применения сложных интегральных структур
Капиллярные силы (силы поверхностного натяжения)	Водные и неводные	Пассивные: не требуют применения внешнего воздействия. Как только микроканал заполняется, движение жидкости прекращается

Ламинарный поток – форма потока жидкости, при котором части потока находятся в спокойном, параллельном соприкосновении, без смешивания и турбулизации.

Для характеристики режима потока жидкости используется число Рейнольдса – наиболее широко известное и наиболее часто используемое характеристическое число (рис. 1.69):

$$R_e = \frac{vL}{\nu}$$

где v – средняя скорость текучей среды; L – определяющий линейный размер (равен диаметру, если поперечное сечение круглое); ν – кинематическая вязкость текучей среды: $\nu = \mu/\rho$, μ – динамическая вязкость текучей среды, ρ – плотность текучей среды.

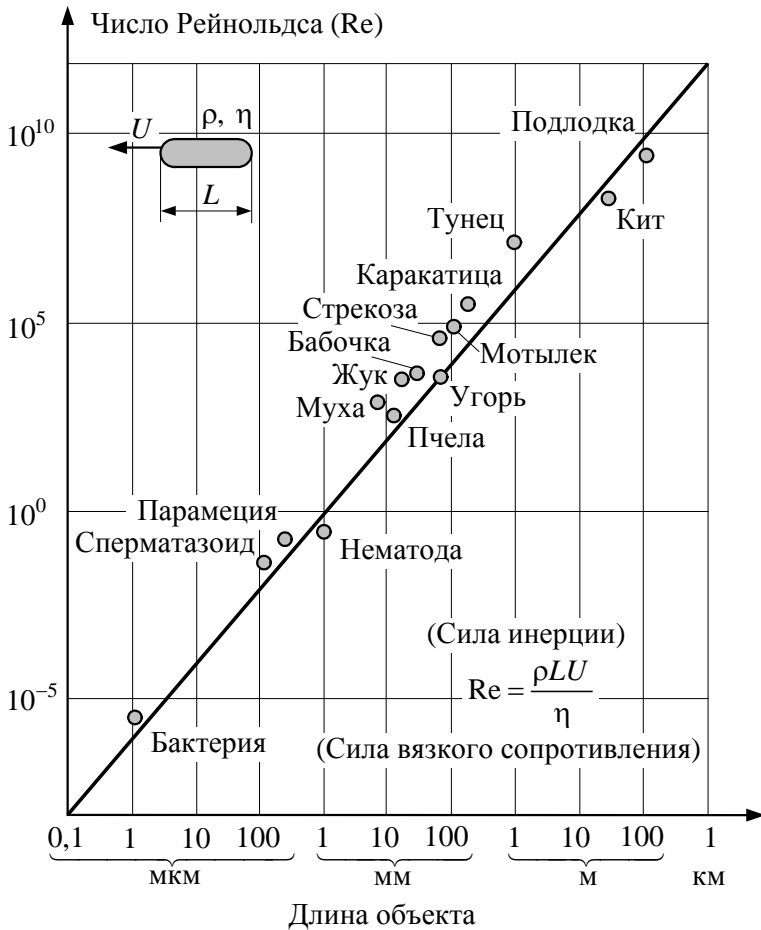


Рис. 1.69. Число Рейнольдса для некоторых объектов

Диффузия – процесс переноса материи или энергии из области с высокой концентрацией в область с низкой концентрацией.

Все виды диффузии подчиняются одинаковому закону. Плотность потока вещества пропорциональна градиенту концентрации и коэффициенту диффузии (*первый закон Фика*):

$$J = -D_c \frac{\partial C}{\partial x},$$

где J – поток частиц (в $1/\text{м}^2\text{с}$); C – концентрация; D_c – коэффициент диффузии (в $\text{м}^2/\text{с}$).

Коэффициент диффузии определяется так:

$$D_c = \frac{k_B T}{6\pi\eta r}.$$

Диффузионная длина и время определяются по следующим формулам:

$$x_D = \sqrt{2D_c t}; \quad t_D = \frac{l^2}{2D_c},$$

где l – длина микроканала; r – радиус микроканала (круглое сечение).

В табл. 1.7 представлены некоторые значения диффузионной длины и времени.

Таблица 1.7

Некоторые значения диффузионной длины и времени

Молекула/частица	Размер	Коэффициент диффузии в воде, $\text{мкм}^2/\text{с}$	Длина x_D через 1 с, мкм	Время t_D для 50 мкм
Ион растворенного вещества	0,1 нм	2000	45	0,6 с
Небольшой белок	5 нм	40	9	30 с
Вирус	100 нм	2	3	10 мин
Бактерия	1 мкм	0,2	0,6	104 мин
Клетка	10 мкм	0,02	0,2	1000 мин

Микромиксеры – микрофлюидные устройства, предназначенные для смешивания жидкостей.

Примеры микромиксеров:

- ◆ статические микромиксеры ламинарных потоков;
- ◆ импульсные ламинарные миксеры;

- ◆ микромиксеры фрагментированных потоков;
- ◆ микромиксеры с асимметричными стенками.

Процесс смешивания (рис. 1.70) характеризуется *показателем смешивания*:

$$N_{mix} = \frac{D_c t_m}{l^2},$$

где t_m – «время контакта»; l – длина линии контакта.

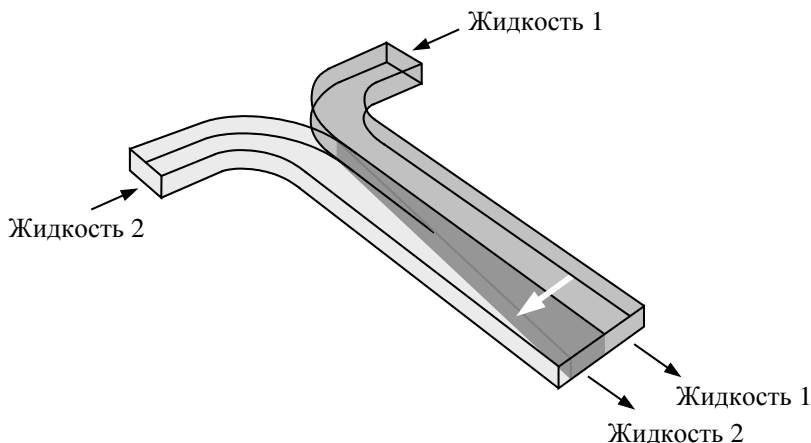


Рис. 1.70. Смешивание двух жидкостей (смешиваемых) в условиях ламинарных потоков

При низких значениях числа Рейнольдса смешивание осуществляется только *посредством диффузии*, при высоких (турбулентные потоки) – *посредством конвекции*.

Состояние с $N_{mix} = 1$ и $l = x_D$ характеризуется высокой степенью смешивания. Смешивание может быть улучшено применением ультразвуковых волн.

Микровентили (микроклапаны) – одни из наиболее важных микрофлюидных компонентов. Они предназначены для остановки потока или контролирования объема жидкости, протекающего через систему.

Микроклапаны бывают 2 типов:

- ◆ *пассивные* (обратные) – без актюатора, работающие под действием перепада давления;
- ◆ *активные* – с актюатором (внешним или встроенным).

Наиболее распространенные активные микроклапаны:

- ◆ с *магнитной актюацией* (с использованием соленоидов и микромоторов для приведения в движение мембраны или клапана; современные конфигурации микросолеоидов не могут обеспечить достаточной силы актюации для большинства применений);
- ◆ с *электростатической актюацией* (наиболее привлекательны для небольших структур, но имеют сложности с достижением высокого перепада давления);
- ◆ с *пьезоэлектрической актюацией* (свойства пьезоматериалов позволяют достичь высоких значений силы актюации, однако перемещение мало; сложная конструкция и высокое рабочее напряжение приводят к низкой коммерческой эффективности);
- ◆ с *термоактюацией* (привлекательны для небольших микросистем; существует несколько конфигураций, использующих линейное или объемное тепловое расширение материалов).

Поверхностное натяжение – термодинамическая характеристика поверхности раздела двух находящихся в равновесии фаз. *Сила поверхностного натяжения* направлена по касательной к поверхности жидкости, перпендикулярно к участку контура, на который она действует. Сила поверхностного натяжения пропорциональна длине того участка контура, на который она действует. Коэффициент пропорциональности γ – сила, приходящаяся на единицу длины контура – называется *коэффициентом поверхностного натяжения* и определяется по формуле

$$\gamma = dE_{pot} / dS.$$

Степень смачиваемости поверхности определяется *контактным углом* θ (рис. 1.71):

$$\cos \theta = \frac{\gamma_{sg} - \gamma_{sl}}{\gamma_{lg}},$$

где γ_{sg} – коэффициент поверхностного натяжения на границе «твердое тело–газ»; γ_{sl} – «твердое тело–жидкость»; γ_{lg} – «жидкость–газ».

Идеальная смачиваемая поверхность характеризуется $\theta = 0^\circ$, идеальная несмачиваемая – $\theta = 180^\circ$.

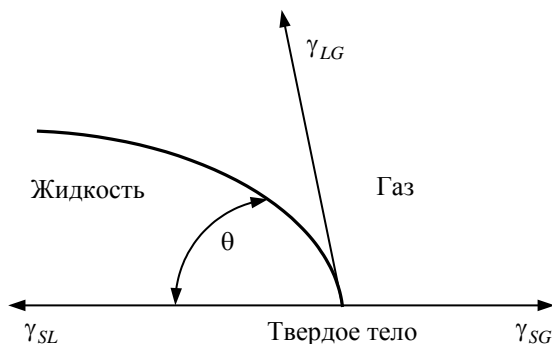


Рис. 1.71. К определению контактного угла

1.7. ОСНОВЫ ЖИЗНИ

Клетка – элементарная единица строения и жизнедеятельности всех живых организмов (кроме вирусов), обладающая собственным обменом веществ, способная к самостоятельному существованию, самовоспроизведению и развитию. Все организмы, кроме бактерий и археев, являются *ядерными*. Главное и крайне важное отличие прокариотов и эукариотов – *наличие у эукариотов ядра и мембраносвязанных органелл*.

Ядро – это часть клетки, окруженная у эукариот двойной мембраной и содержащая генетический материал: молекулы ДНК, «упакованные» в хромосомы (рис. 1.72).

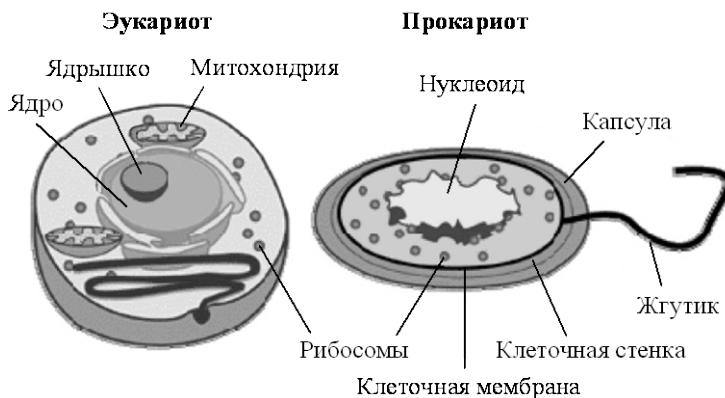


Рис. 1.72. Строение эукариот и прокариот

Эукариотические клетки намного крупнее прокариотических (в объеме – до 1000 раз). Человек, животные, растения, грибы, а также ряд организмов являются эукариотическими организмами.

Человеческий организм содержит:

- ◆ 210 различных видов клеток;
- ◆ общее число клеток – 10^{14} ;
- ◆ гаплоидный набор из 23 хромосом (+1);
- ◆ 80 000 генов, кодируемых $3,3 \cdot 10^6$ нуклеотидами (10^9 нуклеотидов).

Клеточная мембрана (цитолемма, плазмолемма или плазматическая мембрана):

- ◆ отделяет содержимое любой клетки от внешней среды, обеспечивая ее целостность;
- ◆ регулирует обмен между клеткой и средой;
- ◆ внутриклеточные мембраны разделяют клетку на специализированные замкнутые отсеки – компартменты или органеллы, в которых поддерживаются определенные условия внутриклеточной среды.

Клеточная мембрана представляет собой двойной слой (бислоем) молекул класса липидов (рис. 1.73), большинство из которых представляет собой сложные липиды – фосфолипиды.

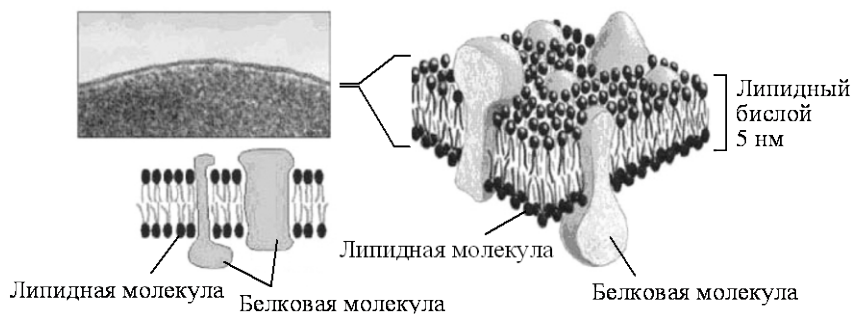


Рис. 1.73. Строение клеточной мембраны

Молекулы липидов имеют *гидрофильную* («головка») и *гидрофобную* («хвост») часть. При образовании мембран гидрофобные участки молекул оказываются обращены внутрь, а гидрофильные – наружу. Толщина мембраны составляет 7–8 нм.

Биологическая мембрана включает и различные белки:

- ◆ интегральные (пронизывающие мембрану насквозь);

- ◆ полуинтегральные (погруженные одним концом во внешний или внутренний липидный слой);
- ◆ поверхностные (расположенные на внешней или прилегающие к внутренней сторонам мембраны).

Некоторые белки являются точками контакта клеточной мембраны с цитоскелетом внутри клетки и клеточной стенкой (если она есть) снаружи. Некоторые из интегральных белков выполняют функцию ионных каналов, различных транспортеров и рецепторов.

Биомембраны выполняют 2 функции:

- ◆ *барьерная* (регулируемый, избирательный, пассивный и активный обмен веществ с окружающей средой);
- ◆ *транспортная* (транспорт веществ в клетку / из клетки).

Механизмы обмена клеточной информацией (рис. 1.74):

- ◆ паракринный;
- ◆ синаптический;
- ◆ эндокринный.

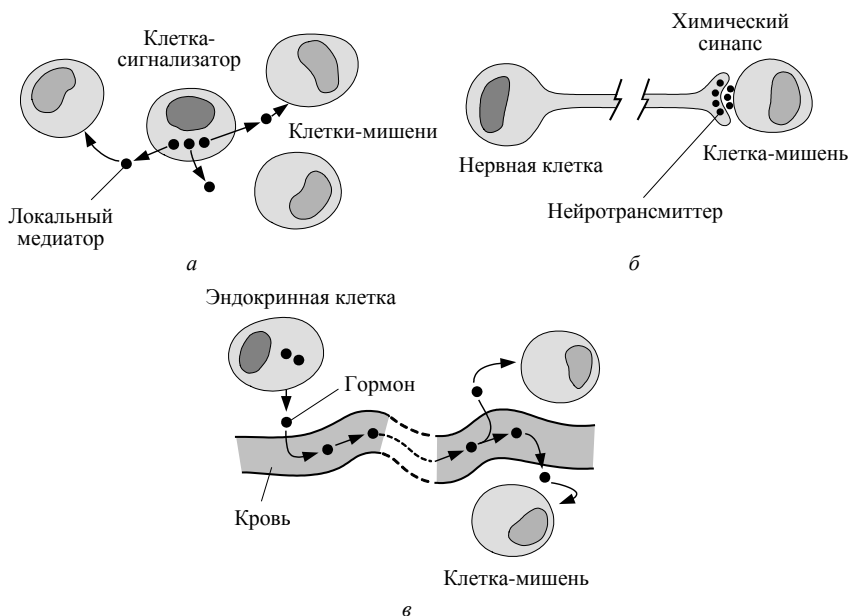


Рис. 1.74. Механизмы обмена информацией:
а – паракринный; б – синаптический; в – эндокринный

Ключевое отличие между данными механизмами состоит в скорости и селективности, с которой сигналы доставляются нужным клеткам-мишеням.

Примеры клеток в организме человека

Кровяные клетки. Кровь состоит из красных кровяных клеток (эритроцитов, 45% объема, рис. 1.75), белых кровяных клеток (лейкоцитов, 1% объема) и тромбоцитов.

Красные кровяные клетки содержат дыхательный пигмент гемоглобин и не содержат ядра.



Рис. 1.75. Реакция человеческих красных кровяных клеток на изменения осмотической концентрации внеклеточной жидкости

Белые кровяные клетки (лейкоциты):

- 1) зернистые лейкоциты (гранулоциты) – фагоцитоз и промежуточные воспалительные реакции;
- 2) незернистые лейкоциты (агранулоциты):
 - ◆ моноциты – фагоцитоз (попадая в ткани, превращаются в макрофагов);
 - ◆ лимфоциты – В-лимфоциты (вырабатывают антитела), Т-лимфоциты (регуляция иммунитета), НК-лимфоциты (осуществляют контроль над качеством клеток организма).

Кровяные клетки образуются из примитивных стволовых кроветворных клеток, локализованных в костном мозге. Данный процесс управляется гормоном *эритропоэтином*.

Мышечные клетки. Длинные многоядерные клетки (рис. 1.76). Сокращение осуществляется белком *миозином*, который при соединении с другим белком *актином* образует *актомиозин* – основной структурный элемент сократительной системы мышц. Другое важное свойство миозина – способность расщеплять аденозинтрифосфорную кислоту (АТФ). Среднее время сокращения – 15 мкм/с.

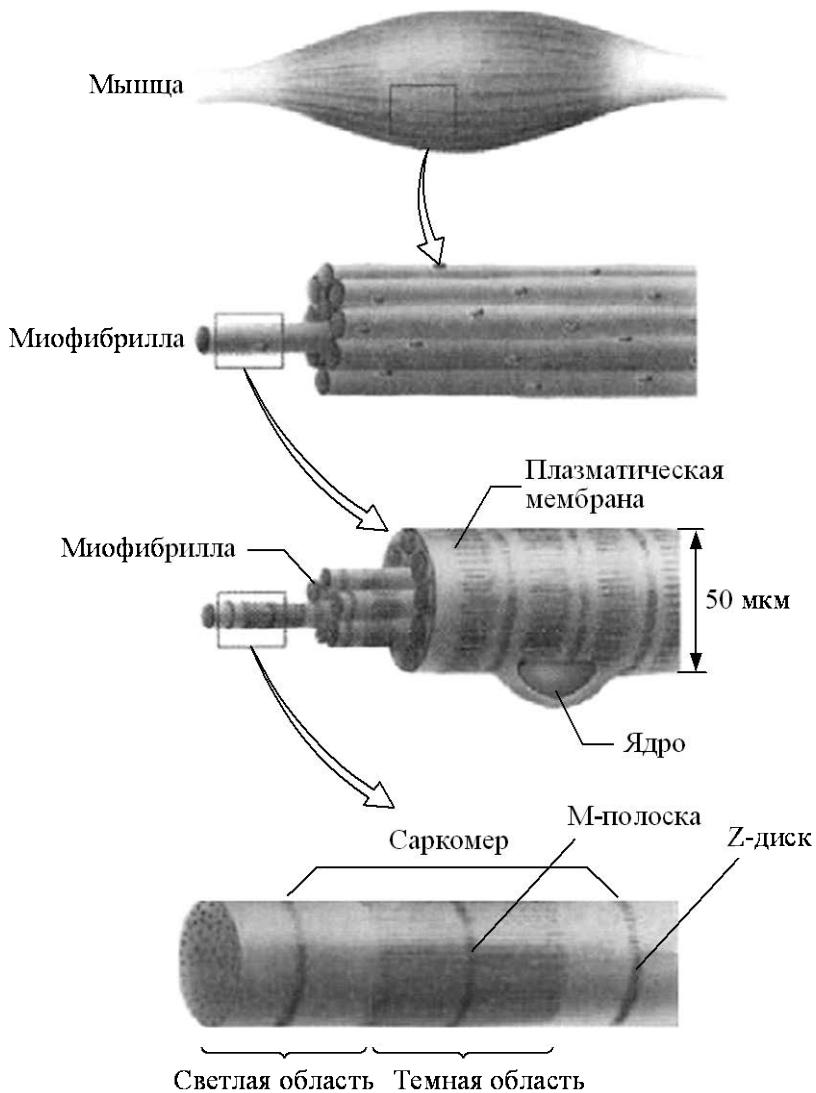


Рис. 1.76. Строение мышечных тканей

Нервные клетки (нейроны). Структурно-функциональные единицы нервной системы (рис. 1.77).

Нейрон состоит из тела диаметром от 3 до 100 мкм, содержащего ядро и другие органеллы.

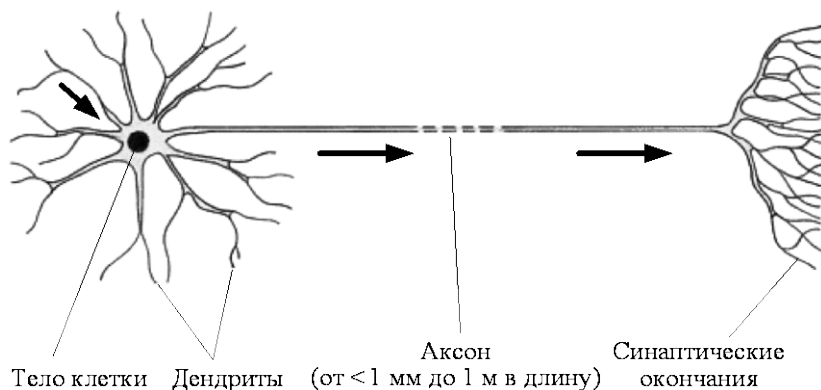


Рис. 1.77. Структура нервной клетки

Выделяют два вида отростков:

- ◆ *аксон* – длинный отросток, приспособленный для проведения возбуждения от тела нейрона;
- ◆ *дендрит* – короткие и сильно разветвленные отростки, служащие главным местом образования влияющих на нейрон возбуждающих и тормозящих синапсов.

Кора головного мозга человека содержит 10–20 миллиардов нейронов.

Слуховые волосковые клетки. Механизм слуховой рецепции осуществляется волосками рецепторных клеток (стереоцилиями) (рис. 1.78).

Данный тип клеток не восстанавливается в течение жизни.

Клетки сетчатки. Сетчатка – внутренняя оболочка глаза, содержащая фоторецепторные клетки, обеспечивающие восприятие и преобразование электромагнитного излучения видимой части спектра в электрические импульсы, а также их первичную обработку.

Структура сетчатки (рис. 1.79):

- ◆ пигментированные эпителиальные клетки;
- ◆ фоторецепторы;
- ◆ интернейроны;
- ◆ ганглиозные клетки (нейроны).

В сетчатке имеются три радиально расположенных слоя нервных клеток и два слоя синапсов. Все слои сетчатки пронизаны радиальными глиальными клетками Мюллера. Сетчатка у человека

содержит около 6–7 млн. колбочек (дневной свет, центральное зрение) и 110–125 млн. палочек (ночной свет, периферийное зрение), распределенных неравномерно.

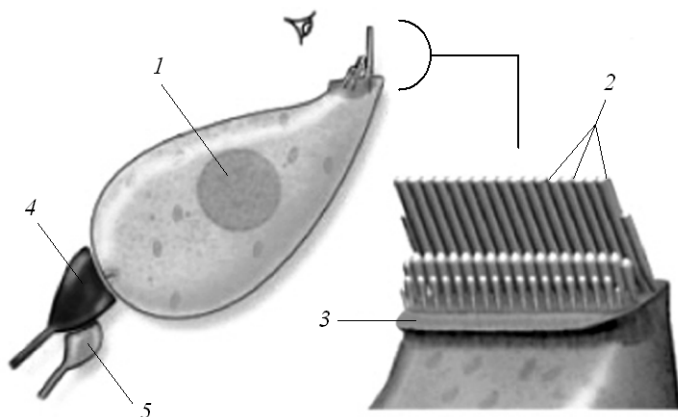


Рис. 1.78. Внутренние волосковые клетки:

1 – ядро; 2 – стереоцилия; 3 – базальное тельце; 4 – эфферентное нервное окончание; 5 – афферентное нервное окончание

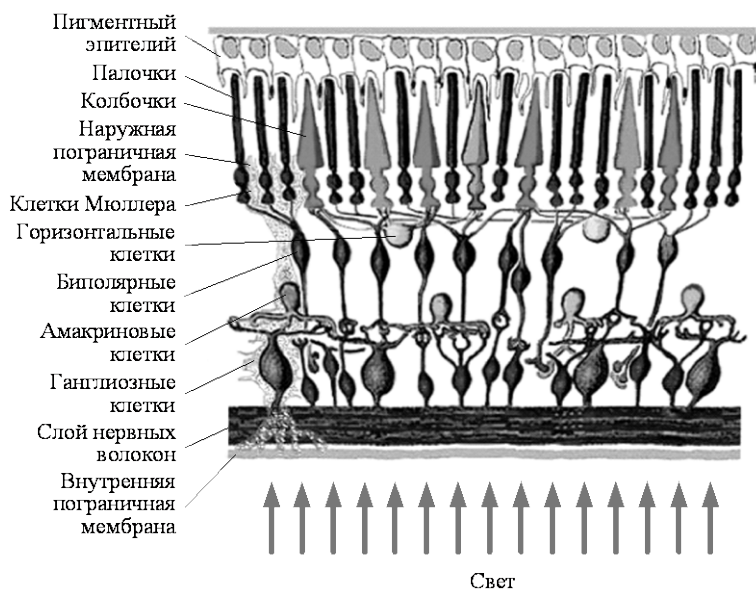


Рис. 1.79. Строение сетчатки

Белки (протеины) – высокомолекулярные органические вещества, состоящие из соединенных в цепочку пептидной связью аминокислот.

Аминокислоты – органические соединения, в молекуле которых одновременно содержатся карбоксильные ($-\text{COOH}$) и аминные группы ($-\text{NH}_2$).

Пептидная связь – вид амидной связи, возникающей в результате взаимодействия α -аминогруппы ($-\text{NH}_2$) одной аминокислоты с α -карбоксильной группой ($-\text{COOH}$) другой аминокислоты.

В живых организмах аминокислотный состав белков определяется *генетическим кодом*, при синтезе в большинстве случаев используется 20 стандартных аминокислот. Множество их комбинаций дают большое разнообразие свойств молекул белков.

Функции белков:

- ◆ катализ протекания биохимических реакций и обмен веществ (белки-ферменты);
- ◆ образование цитоскелета, поддерживающего форму клеток (структурная или механическая функции);
- ◆ участие в сигнальных системах клеток;
- ◆ участие в иммунном ответе;
- ◆ участие в клеточном цикле.

Уровни структур белка:

- ◆ *первичная структура* (рис. 1.80) – последовательность аминокислот, соединенных вместе ковалентными пептидными связями, которые образуются в процессе трансляции;
- ◆ *вторичная структура* – локальное упорядочивание фрагмента полипептидной цепи, стабилизированное водородными связями и гидрофобными взаимодействиями. Основные типы вторичной структуры белков: α -спирали и β -листы (складчатые слои);
- ◆ *третичная структура* – пространственное строение полипептидной цепи – взаимное расположение элементов вторичной структуры, стабилизированное взаимодействием между боковыми цепями аминокислотных остатков (посредством ковалентных, ионных, водородных связей и гидрофобных взаимодействий);
- ◆ *четвертичная структура* (рис. 1.81) – субъединичная структура белка – взаимное расположение нескольких полипептидных цепей в составе единого белкового комплекса.

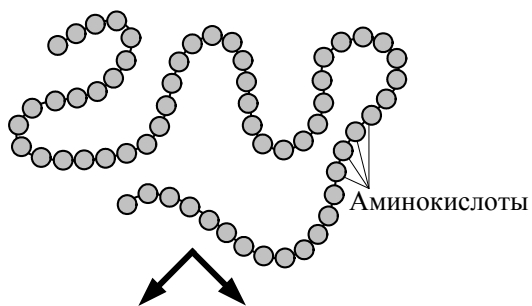


Рис. 1.80. Первичная структура белка

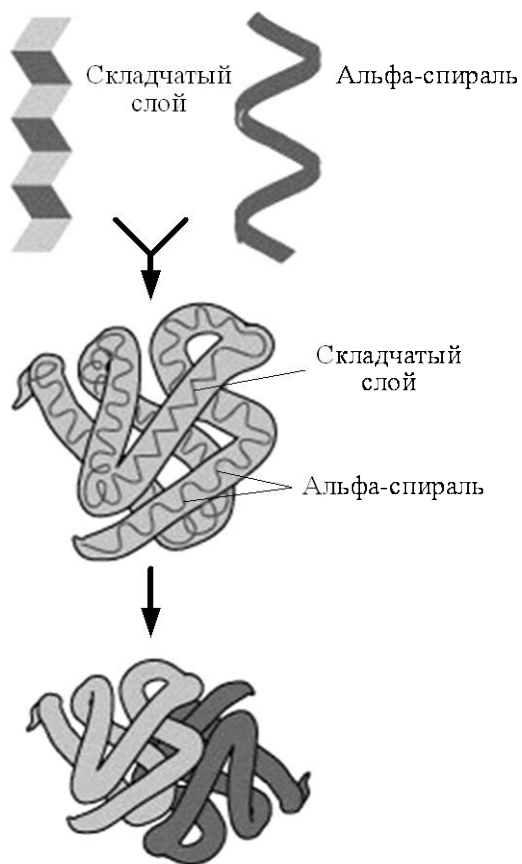


Рис. 1.81. Вторичная–четвертичная структуры белка

Селективное связывание белков:

- ♦ форма, в которую белок сворачивается, является его нативным состоянием;
- ♦ белки могут переходить к другим формам, «конформациям»; такие переходы называются *конформационными изменениями*. Каждая конформация обладает своей собственной биологической активностью и только одна является активной (или нативной).

На рис. 1.82 представлен процесс селективного связывания белка и молекулы.

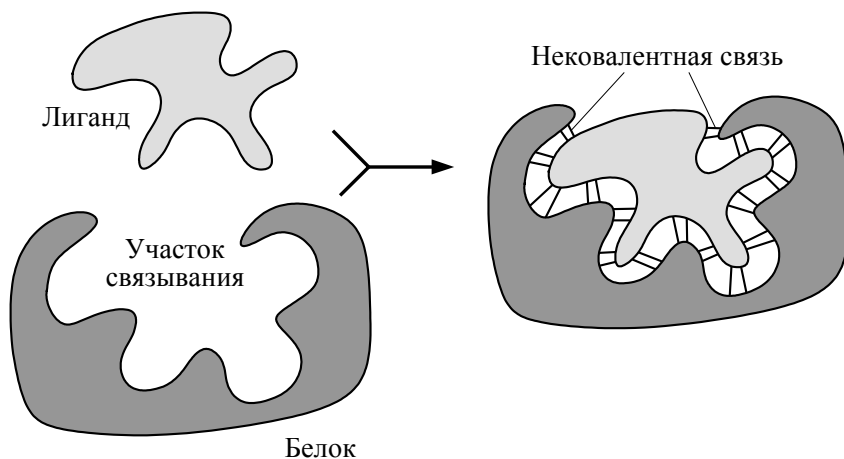


Рис. 1.82. Селективное связывание белка и молекулы

Для надежного связывания белка и молекулы (лиганда) требуется большое число слабых связей. Лиганд должен располагаться точно на участке связывания белка, тем самым способствуя образованию большого числа нековалентных связей между белком и лигандом.

ДНК (дезоксирибонуклеиновая кислота) – это цепь химически связанных нуклеотидов (рис. 1.83). Каждый нуклеотид состоит из сахара, фосфатной группы и одного из азотистых оснований: аденина (А), цитозина (С), гуанина (G) и тимина (Т). ДНК с химической точки зрения – это длинная полимерная молекула, состоящая из повторяющихся блоков, нуклеотидов. ДНК является носителем генетической информации, записанной в виде последовательности нуклеотидов с помощью генетического кода (например,

AAAGTCTGAC). Основная роль ДНК в клетках – долговременное хранение информации о структуре РНК и белков.

Азотистые основания одной из цепей соединены с азотистыми основаниями другой цепи водородными связями согласно принципу комплементарности: аденин соединяется только с тимином, гуанин – только с цитозином.

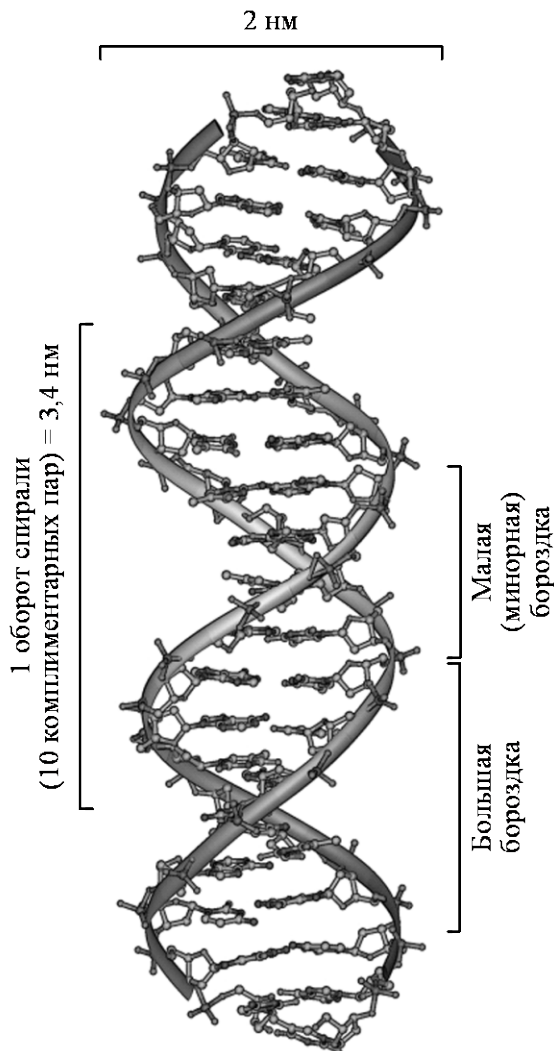


Рис. 1.83. Двойная спираль ДНК

Водородные связи между цепями двойной спирали ДНК достаточно слабы и могут быть модифицированы ферментами:

- ◆ *хеликазы* – белки, разрывающие водородные связи между основаниями, раскручивая двойную спираль на отдельные цепочки;
- ◆ *топоизомеразы* – белки, изменяющие степень суперскрученности в ДНК;
- ◆ цепи спирали ДНК также могут быть разрезаны посредством нагрева (применяется в ПЦР) при условии, что они содержат не более 10 000 пар оснований.

В клетках эукариот ДНК находится в ядре клетки в составе хромосом, а также в некоторых клеточных органоидах (митохондриях и пластидах).

Хромосома состоит из двух длинных цепей нуклеотидов, образующих молекулу ДНК.

Ген – структурная и функциональная единица наследственности, участок ДНК, несущий целостную информацию о строении одной молекулы белка или одной молекулы РНК.

Генотип – совокупность генов организма, характеризующая его как индивида (в отличие от генома, характеризующего вид).

Фенотип – совокупность внешних и внутренних признаков организма, приобретенных в результате его индивидуального развития.

Поток генетической информации (рис. 1.84):

- ◆ генетическая информация хранится в двойной спирали ДНК;
- ◆ транскрипция: кодирующие участки (гены) находятся в матричной (информационной) РНК (мРНК);
- ◆ трансляция: белки синтезируются согласно шаблону мРНК.

Экспрессия гена определяет, активен он (перенос информации от ДНК через РНК к полипептидам и белкам) или нет. Гены активируются и «отключаются» с помощью внутриклеточных сигналов (факторы транскрипции). Экспрессия генов меняется от одной клетки к другой, а также с течением времени.

Уровни контроля экспрессии:

- ◆ на уровне транскрипции (наиболее часто) с регуляторными белками в специальных коротких участках ДНК;
- ◆ на уровне обработки РНК и переноса / деградации;
- ◆ на уровне трансляции;
- ◆ на уровне активности белков.

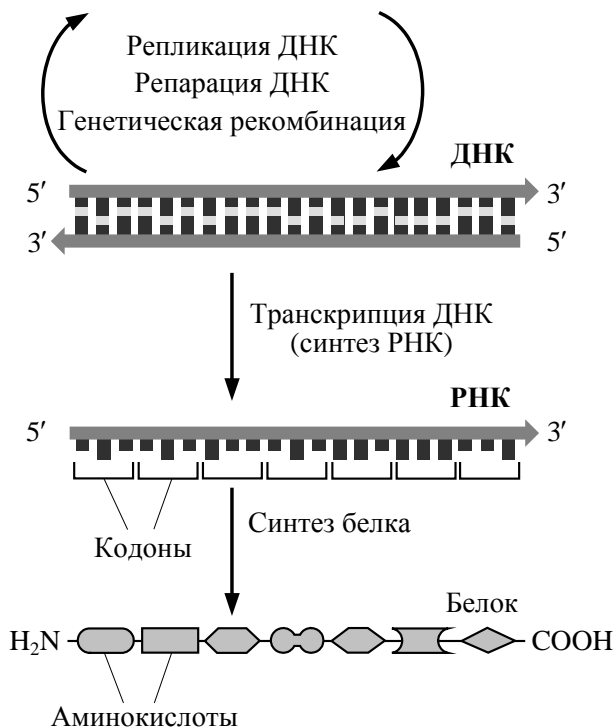


Рис. 1.84. Поток генетической информации

Генетические мутации приводят не только к нарушениям в работе организма и болезням, но и являются основой эволюции.

Мутации могут проявляться в виде:

- ◆ изменений простых пар нуклеотидов или небольших участков;
- ◆ инверсии участков;
- ◆ удаления участков;
- ◆ отщепления части ДНК и присоединения ее к другой хромосоме.

Синтез белков (рис. 1.85) осуществляется рибосомой.

По мере сборки белковой молекулы рибосома движется вдоль матричной (информационной) РНК и синтезирует белок, запрограммированный на данной мРНК. Один ген кодирует один белок. Аминокислоты, из которых синтезируется белок, попадают в рибосому с помощью подвижных транспортных РНК (тРНК).

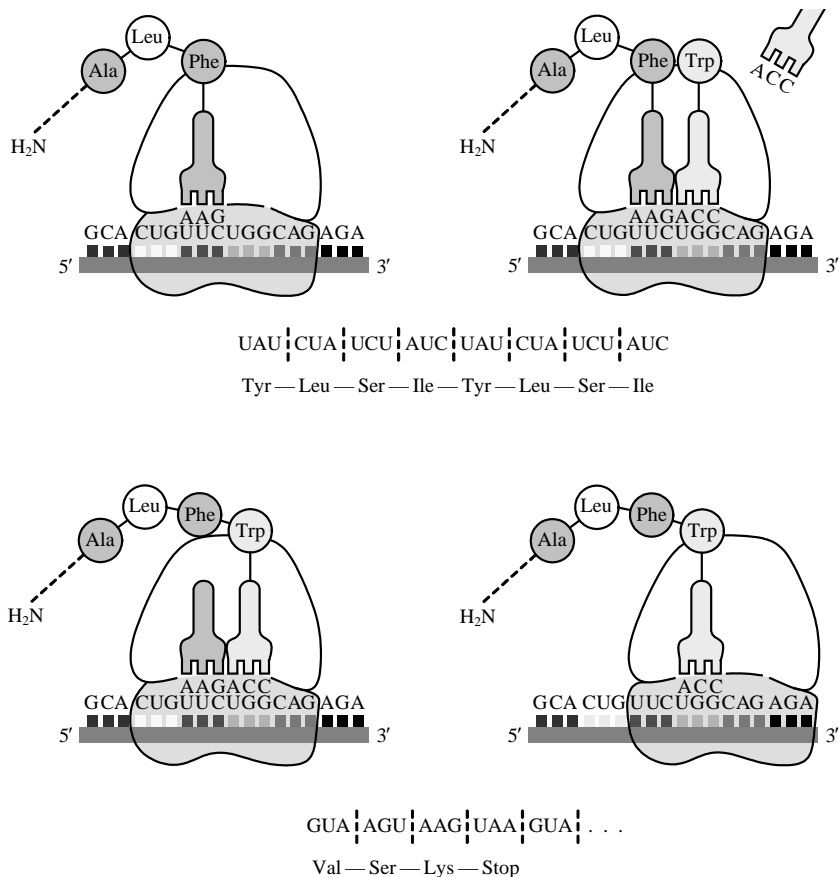


Рис. 1.85. Синтез белков рибосомой

Иммунная система – подсистема, защищающая организм от заболеваний, идентифицируя и уничтожая опухолевые клетки и патогены.

Антитело – это белок, используемый иммунной системой для обнаружения и нейтрализации чужеродных объектов (бактерий, вирусов).

Базовой единицей любого антитела является мономер.

Мономер – это молекула в форме «Y», которая состоит из двух идентичных тяжелых и легких цепей, соединенных дисульфидными связями (рис. 1.86).

Каждое антитело распознает специальный антиген, уникальный для его цели. Существует 5 классов антител – IgG, IgA, IgM, IgD, IgE, различающихся между собой по строению и аминокислотному составу тяжелых цепей.

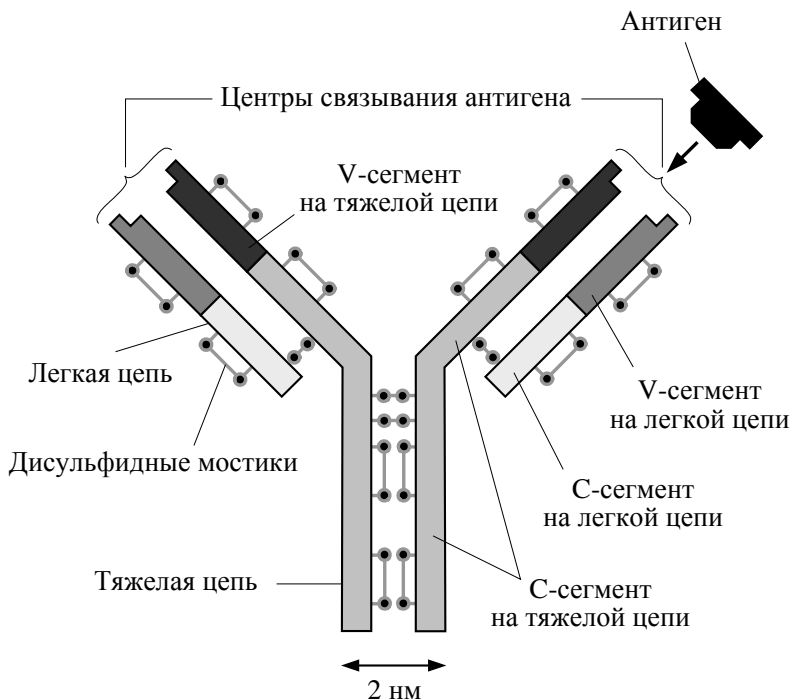


Рис. 1.86. Строение иммуноглобулинов

Антитела свободно существуют в потоке крови или связаны с клеточными мембранами. IgG является основным иммуноглобулином сыворотки здорового человека. Обнаружение отдельных антител является наиболее распространенной формой медицинской диагностики. Антитела используются для иммунологической идентификации белков.

Иммунная реакция бывает двух типов:

- 1) антитело–белок, связывающийся с антигеном особым образом;
- 2) клеточно-опосредованный иммунный ответ.

В-лимфоциты (В-клетки) вырабатывают антитела. Т-лимфоциты (Т-клетки) ответственны за клеточно-опосредованный иммунный ответ. Организм человека обладает иммунной памятью.

На рис. 1.87 представлено два основных класса адаптивных иммунных ответов.

Лимфоциты реагируют на вирусную инфекцию. Лимфоциты обеспечивают как гуморальный иммунитет, так и клеточный.

Гуморальный иммунитет заключается в выработке антител В-лимфоцитами для нейтрализации вируса.

Клеточный иммунитет представляет собой контактное взаимодействие Т-лимфоцитов с инфицированными клетками и их уничтожение.

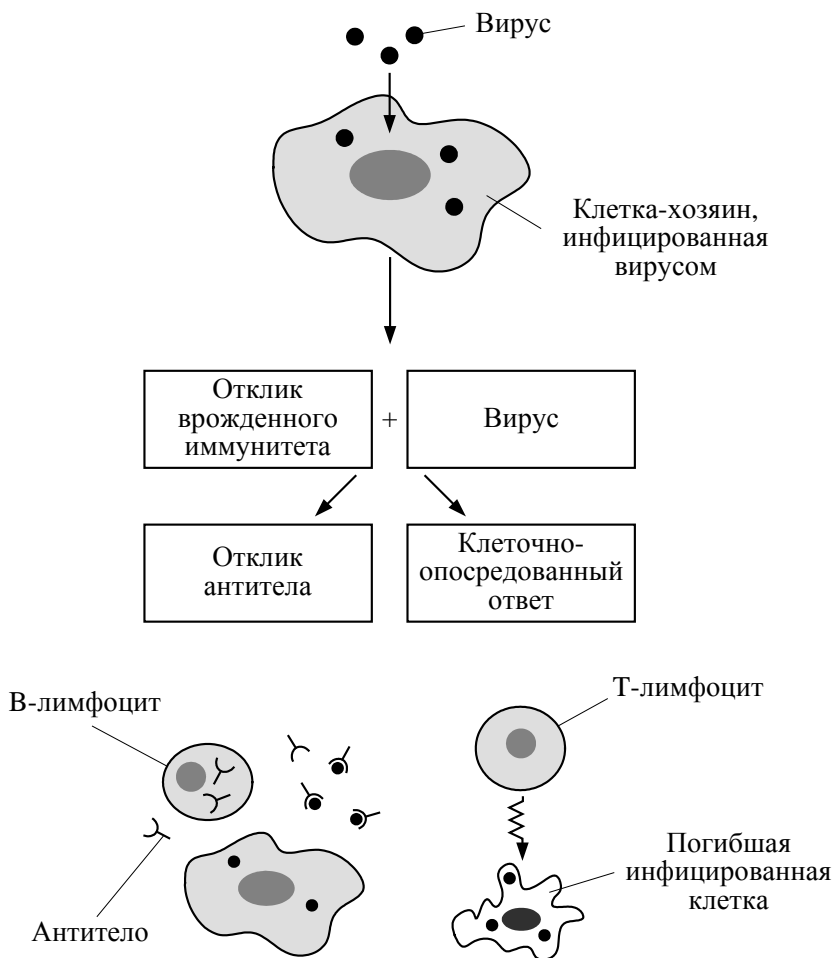
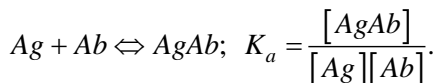


Рис. 1.87. Два основных класса адаптивных иммунных ответов

Антитела обладают очень *высокой аффинностью* – сродством (силой связи) к антигенам. Миллионы разнообразных антител в человеческом организме объединяет единая базовая структура: две тяжелые протеиновые цепи, связанные с двумя легкими (рис. 1.88):



Когда половина участков связана, т. е.

$$[Ag][Ab] = [AgAb], \text{ то } K_a = 1.$$

Обычно K_a изменяется в пределах от 10^5 до 10^{11} л/моль.

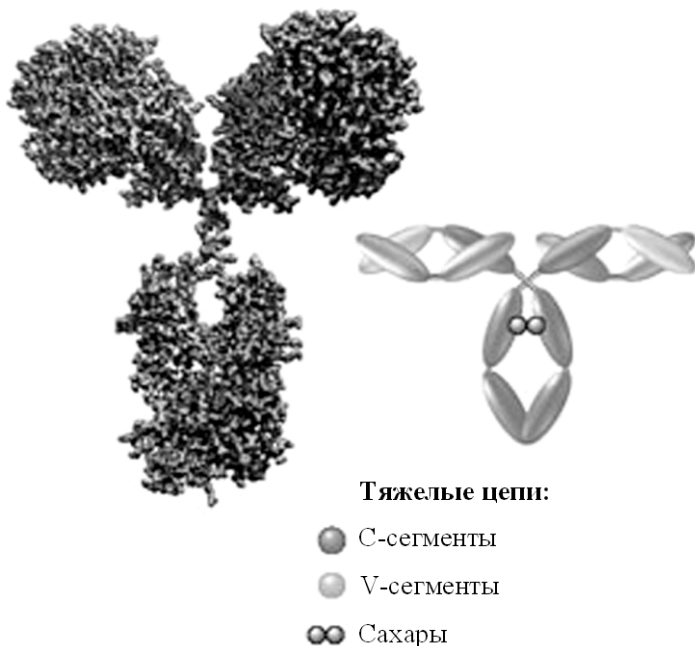


Рис. 1.88. Единая базовая структура антител

Пара V-сегментов (вариабельных сегментов) на концах цепей уникальна для каждого антитела и определяет антиген-цель, с которым антитело будет связываться.

Стволовые клетки – особые клетки живых организмов, каждая из которых способна впоследствии изменяться (дифференцироваться) особым образом (т. е. получать специализацию и далее развиваться как обычная клетка).

Кровеносные сосуды, пульпа зуба, пищеварительный эпителий, сетчатка, печень и даже мозг – все содержат стволовые клетки.

Стволовые клетки классифицируются в соответствии со своей возможностью к дифференцировке:

- ◆ *тотипотентные* – клетки, способные дифференцироваться в любые клетки организма. Из одной оплодотворенной клетки способен вырасти целый организм;
- ◆ *плюрипотентные* – клетки, способные образовывать множество различных клеток, но не целый организм;
- ◆ *мультипотентные* – клетки, способные образовывать клетки тканей, из которых они были взяты, и им подобные (например, кровяные клетки, такие как красные кровяные клетки, белые кровяные клетки и тромбоциты);
- ◆ *унипотентные* – клетки, дающие начало только одному типу клеток. Способны к самовосстановлению, что отличает их от не стволовых клеток.

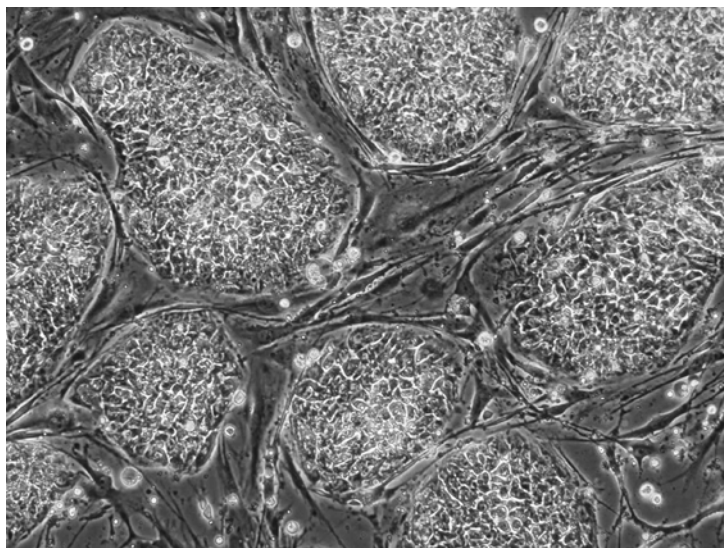


Рис. 1.89. Эмбриональные стволовые клетки человека под микроскопом [93]

Стволовые клетки также классифицируются в соответствии со своим источником:

- ◆ *эмбриональные* стволовые клетки – стволовые клетки, выделяемые из ранних эмбрионов (на этапе бластоцисты или из полового зачатка 5-недельных эмбрионов) или тератокарциномы (опухолевой линии) *in vitro* (рис. 1.89);
- ◆ *взрослые* стволовые клетки – недифференцированные стволовые клетки, выделяемые из дифференцированных клеток различных тканей. В большинстве случаев мультипотентные. В настоящее время находят широкое применение в лечении около 100 различных заболеваний.

1.8. ОСНОВЫ БИОДАТЧИКОВ

Датчик (сенсор) – это устройство, воспринимающее сигналы и внешние воздействия и реагирующее на них изменением электрических сигналов.

Биодатчик (биологический датчик) – устройство, обрабатывающее биологическую информацию или использующее биокomпоненты в качестве преобразователей. Биодатчик – это интеллектуальное, высокотехнологичное устройство, состоящее из биологически чувствительного элемента (*биорецептора*, рис. 1.91) и *преобразователя*.

Взаимодействие исследуемого вещества с биорецептором производит эффект, измеряемый преобразователем, который преобразует информацию в измеримый сигнал, такой как, например, электрический ток. На рис. 1.90 представлен общий состав биодатчиков.

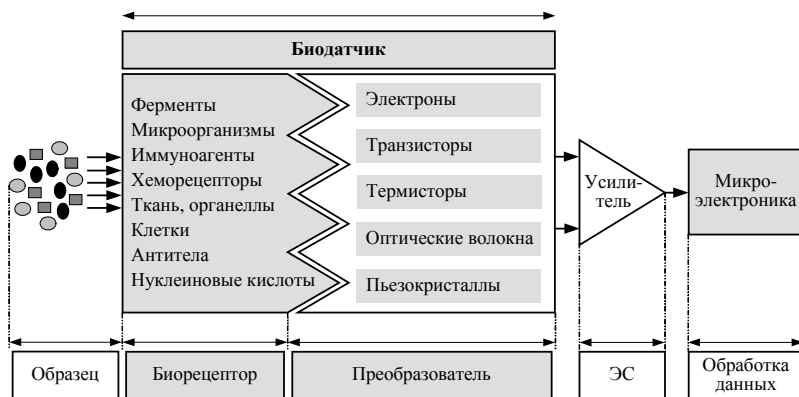


Рис. 1.90. Общий состав биодатчиков

Существует 4 основных вида биорецепторов, основанных на:

- 1) ферментных взаимодействиях (биокатализатор);
- 2) взаимодействиях антитело/антиген (биоаффинность);
- 3) взаимодействиях нуклеиновых кислот;
- 4) клеточных взаимодействиях (микроорганизмы, белки).

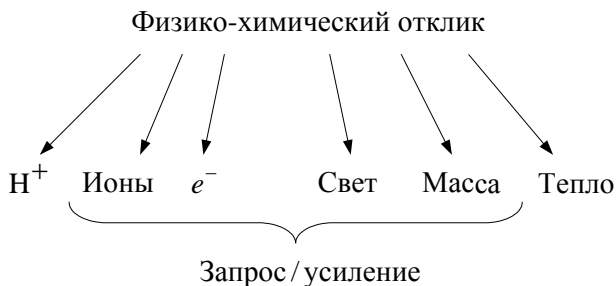


Рис. 1.91. Физико-химический отклик биорецептора

В *каталитических биодатчиках* такие биокатализаторы, как ферменты и микробиологические клетки, используются для распознавания, связывания и химического преобразования молекул. В *аффинных биодатчиках* такие молекулы-рецепторы, как антитела, нуклеиновые кислоты, лектины и гормональные рецепторы, используются для необратимого связывания молекул. На рис. 1.92 представлены основные виды преобразователей в биодатчиках.

Биологический компонент должен быть надежно соединен с преобразователем. Для этого существует несколько методов (*методов иммобилизации*):

1. Адсорбция к поверхности (наиболее простой метод).

2. Микроинкапсуляция – удержание компонентов полупроницаемой мембраной (один из самых ранних методов, биодатчики глюкозы и мочевины).

3. Удерживание. Биологический компонент удерживается в матрице из геля, пасты или полимера (широко распространенный метод).

4. Ковалентное связывание. Ковалентные химические связи формируются между биологическим компонентом и преобразователем.

5. Перекрестное шивание. Для химического связывания передатчика и биологического материала используется бифункциональный агент (метод часто используется совместно с другими: 1 или 3).

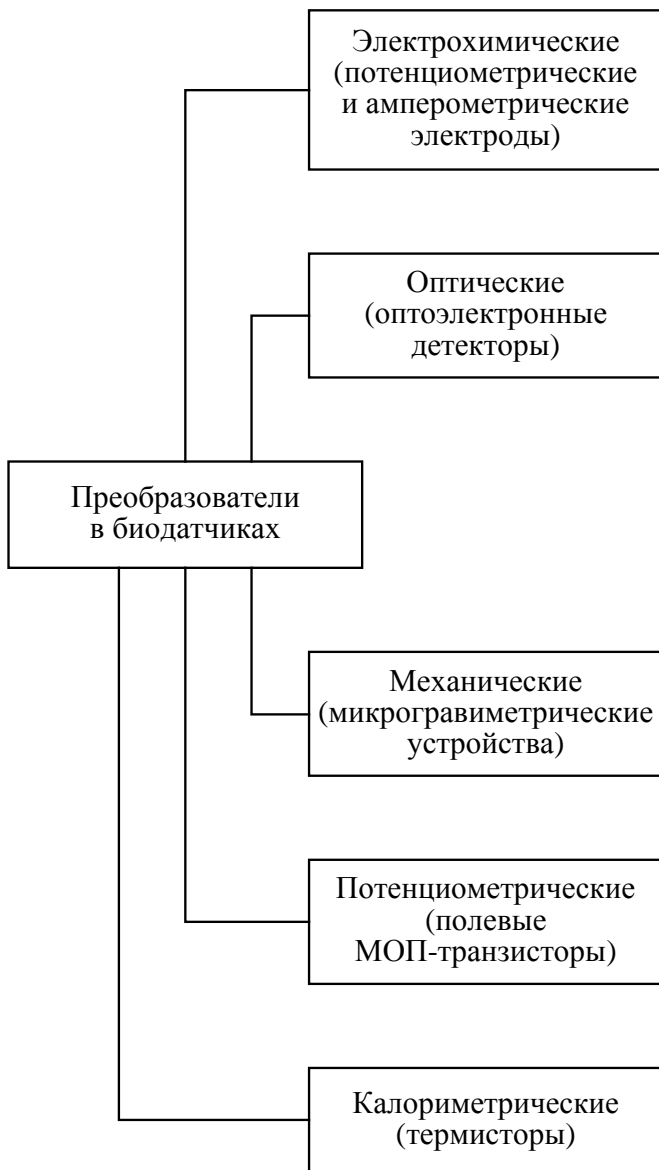


Рис. 1.92. Преобразователи в биодатчиках

В табл. 1.8 представлены интеллектуальные материалы, принципы преобразования и преобразователи в биодатчиках.

Таблица 1.8

**Интеллектуальные материалы, принципы преобразования
и преобразователи**

Интеллектуальные материалы	Принципы преобразования	Преобразователи
Организмы, ферменты, антитела, липосомы, мембраны	Потенциометрический	Ионочувствительные электроды (ISE), ионочувствительные полевые транзисторы (ISFET), μ -электроды
Ткани, системы ферментов, антитела, рецепторные молекулы, органеллы, целые клетки, родственные лиганды	Амперометрический	μ -электроды
Клетки, органеллы	Кондуктометрический / пьезоэлектрический	–
Органеллы	Импедиметрический / амперометрический	μ -электроды
Мембраны, ферменты, антитела, лектины, коферменты, рецепторы	Оптический / импедиметрический	μ -электроды, лазерные диоды, светочувствительные диоды, оптические волокна, оболочка оптоволоконна, фотодиодные детекторы
Ферменты, ткани	Калориметрический / оптический	Волоконные оптоды (оптические сенсоры), люминесценция
Компоненты ферментов, организмы	Акустический	–
Рецепторы, организмы	Механический / термический / калориметрический	Термисторы, термопары
Антитела	Молекулярная электроника / акустика	SAW-структуры (на основе ПАВ), микровесы на основе BAW-структур (Bulk Acoustic Wave, объемная акустическая волна), SPR-структуры (Surface Plasmon Resonance, поверхностный плазмонный резонанс), TIR-структуры (Total Internal Reflection, полное внутреннее отражение)
Нуклеиновые кислоты (ДНК, РНК)	–	–
Органические молекулы	–	–

В табл. 1.9 представлены основные методы иммобилизации биологических компонентов.

Таблица 1.9

Методы иммобилизации

Физическая адсорбция	Физическое удерживание	Ковалентное связывание
Силы Ван-дер-Ваальса. Электростатические силы. Аффинность. Адсорбция и перекрестное сшивание	Барьерные системы. Гидрогели. Дисперсные системы (матрицы)	Растворимые полимеры. Твердые поверхности. Гидрогели

Иммуносенсоры основаны на особых взаимодействиях между антигенами и антителами (взаимодействия антиген–антитело). Антитела обладают очень высокой *аффинностью* – сродством (силой связи) к антигенам. Механизм иммуноанализа представлен на рис. 1.93.

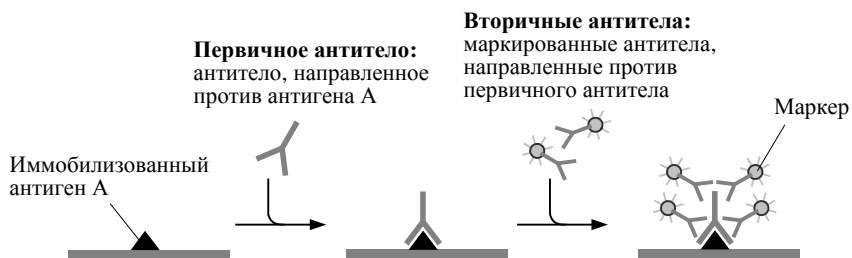


Рис. 1.93. Механизм иммуноанализа

Зонд обнаружения маркирован (флюоресцирующим маркером, радиоактивной меткой, ферментом и т. п.).

Существует несколько механизмов связывания (рис. 1.94):

- ♦ *прямой анализ* – антиген иммобилизован на поверхности, маркированные антитела соединяются напрямую с антигеном;
- ♦ *захват антигена* – антитела иммобилизованы, обнаружению подлежат присоединенные маркированные антитела;
- ♦ *многоступенчатый анализ* – антитело иммобилизовано, обнаруживаемый антиген соединяется с антителом, обнаружению подлежат вторичные маркированные антитела, которые связываются с антигеном.

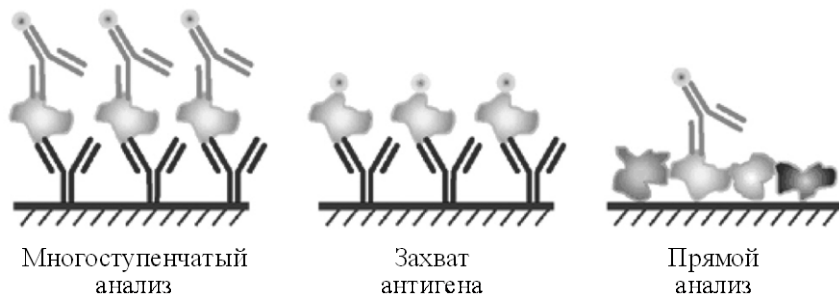


Рис. 1.94. Механизмы связывания

Существует несколько методов обнаружения:

- ◆ колориметрия;
- ◆ флюоресценция и хемилюминесценция;
- ◆ электрический и радиоактивный анализ.

Электрохимические биодатчики бывают нескольких типов.

1. Потенциометрические биодатчики. Потенциометрические измерения предполагают определение разности потенциалов между индикаторным электродом и электродом сравнения. Потенциометрические биодатчики (рис. 1.95) работают в условиях равновесия и отслеживают накопление заряда (при нулевом токе), вырабатываемого при избирательном связывании биологических компонентов на поверхности электрода. Преобразователь может быть выполнен в виде ионочувствительного электрода (ISE), представляющего собой электрохимический датчик с тонкими пленками или избирательными мембранами в качестве элементов распознавания.

2. Биодатчики на основе ионочувствительных электродов (ISE). Ионочувствительные электроды обнаруживают такие ионы, как F^- , Cl^- , CN^- , Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , H^+ , NH_4^+ , или газы (CO_2 , NH_3) в сложных биологических комплексах путем обнаружения изменения электродного потенциала в процессе связывания ионов и соответствующей ионообменной мембраны. Разность потенциалов между рабочим электродом и электродом сравнения пропорциональна логарифму активности ионов или концентрации газов и описывается уравнением Нернста.

3. Биодатчики на основе ионочувствительных полевых транзисторов (ISFET). Принцип: МОП-транзистор, в котором в роли затвора выступает химически чувствительная мембрана

(рис. 1.96). Ток через транзистор меняется в соответствии с концентрацией ионов в растворе (проводимость канала зависит от концентрации ионов H^+ (кислотная среда) или OH^- (щелочная среда) на границе раствор–изолятор).

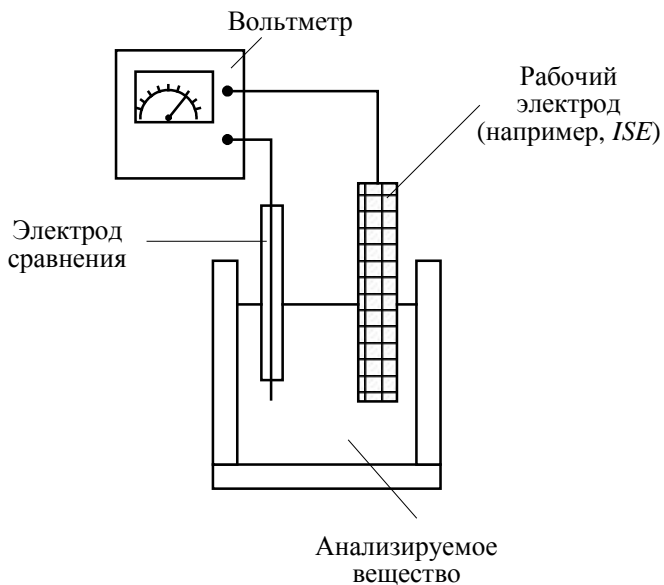


Рис. 1.95. Потенциометрический биодатчик

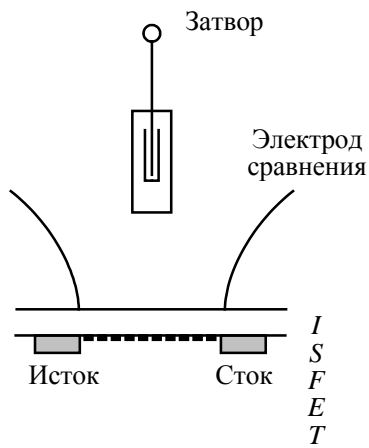


Рис. 1.96. Биодатчик на основе ISFET

4. Амперометрические биодатчики. Амперометрический способ основан на измерении тока, возникающего в результате электрохимического окисления или ослабления электроактивных компонентов, под воздействием постоянной разности потенциалов (рис. 1.97) на рабочем электроде из Pt, Au или С (или матрицы электродов) по отношению к электроду сравнения.

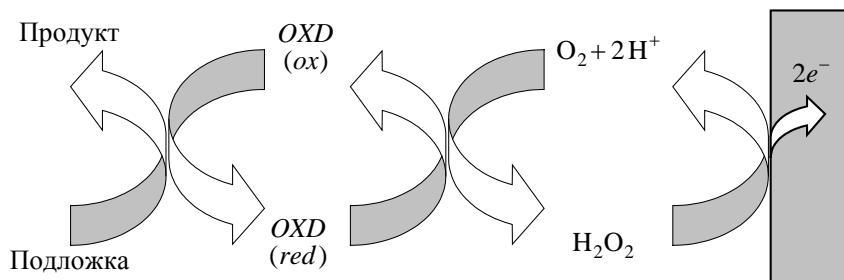


Рис. 1.97. Принцип работы амперометрических биодатчиков

Области применения:

1. Измерение уровня кислорода в крови.

Электрод Кларка измеряет парциальное давление кислорода (O_2) внутри электрохимической ячейки, состоящей из двух электродов, помещенных в фосфатный буфер: платиновый рабочий электрод и серебряный (или из хлорида серебра) встречный электрод.

2. Измерение уровня глюкозы в крови.

Глюкоза – главный источник энергии любого организма.

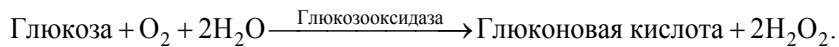
Сахарный диабет – группа метаболических нарушений углеводного обмена, характеризующихся использованием глюкозы не в полном объеме и приводящих к гипергликемии (повышенному содержанию глюкозы в крови).

Инсулин – белковый гормон поджелудочной железы, участвующий в регуляции углеводного обмена в организме и регулирующий уровень содержания глюкозы в крови.

При диабете инсулин:

- ◆ не вырабатывается (тип 1, необходимо введение инсулина);
- ◆ не распознается (тип 2, необходимо введение инсулина в тяжелых случаях).

Амперометрический датчик уровня глюкозы использует электрод, пропускающий O_2 , и фермент глюкозооксидазу, иммобилизованный на поверхности мембраны. Базовая реакция:



Принципы преобразования в оптических биодатчиках:

- ◆ спектры поглощения;
- ◆ флюоресценция (рис. 1.98);
- ◆ плазмоны (наночастицы и поверхность);
- ◆ хемилюминесценция.

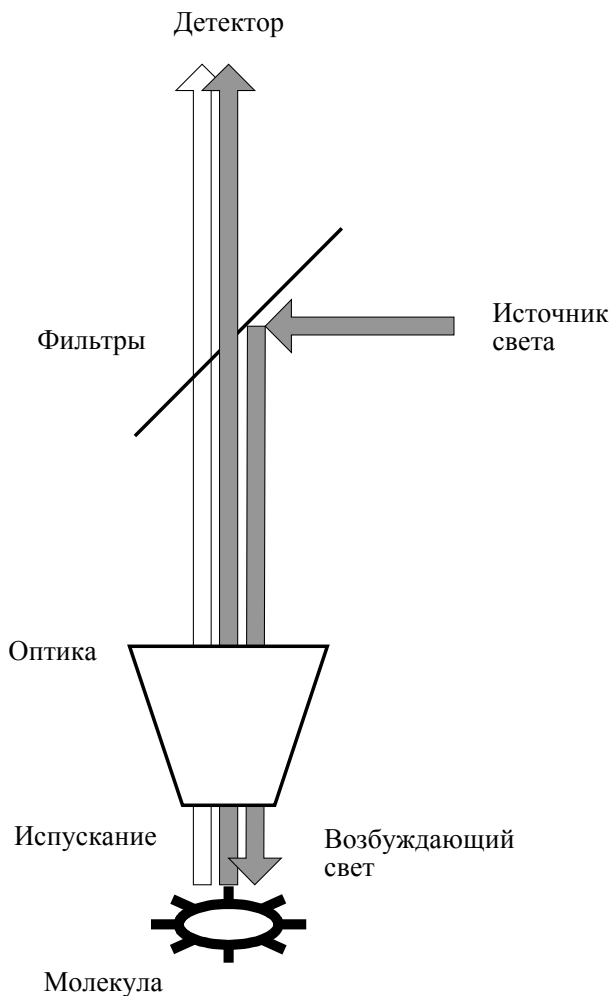


Рис. 1.98. Установка для исследования биологических объектов методом флюоресценции

Флюоресцентные маркеры – маркеры, излучающие свет на определенной длине волны.

Усиление (или ослабление, как в случае флюоресцентного резонансного переноса энергии, *FRET*) оптического сигнала означает протекание процесса связывания.

Металлические наночастицы:

- ◆ альтернатива флюоресценции;
- ◆ возможность «перестройки» цвета;
- ◆ отсутствие эффекта выцветания.

Хемилюминесценция – испускание света под действием высвобождения энергии в результате химической реакции. Хемилюминесценция бывает нескольких видов:

- ◆ *биолюминесценция* – испускание света живыми организмами;
- ◆ *электрохемилюминесценция* – испускание света, протекающее при пропускании электрического тока.

Электрохемилюминесценция находит широкое аналитическое применение в проточно-инъекционном анализе, ЖХВР (жидкостной хроматографии высокого разрешения), ПЦР (методе полимеразной цепной реакции) и ряде иммуноисследований. Несколько иммунодиагностических систем, основанных на электрохемилюминесценции окислительно-восстановительного типа комплекса $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$, уже доступны на рынке (компании IGEN и Boehringer-Mannheim).

Другим эффективным электрохемилюминесцентным комплексом является *люминол* (5-амино-1,2,3,4-тетрагидро-1,4-фталазиндион, гидразид 3-аминофталево́й кислоты, H_2L). Методы, основанные на электрохемилюминесценции данного комплекса, широко используются в высокочувствительном обнаружении пероксида водорода (рис. 1.99).

Аналитические инструменты, основанные на электрохемилюминесценции, состоят из:

- ◆ проточной кюветы;
- ◆ IDA-электродов (Interdigitated array);
- ◆ фотодетектора.

Другим классом устройств для биологического распознавания являются *массочувствительные детекторы*.

Кварцевые микровесы (QCM) – пьезоэлектрическое устройство, которое может быть использовано в качестве микрогравиметрического детектора для процессов биораспознавания (рис. 1.100).

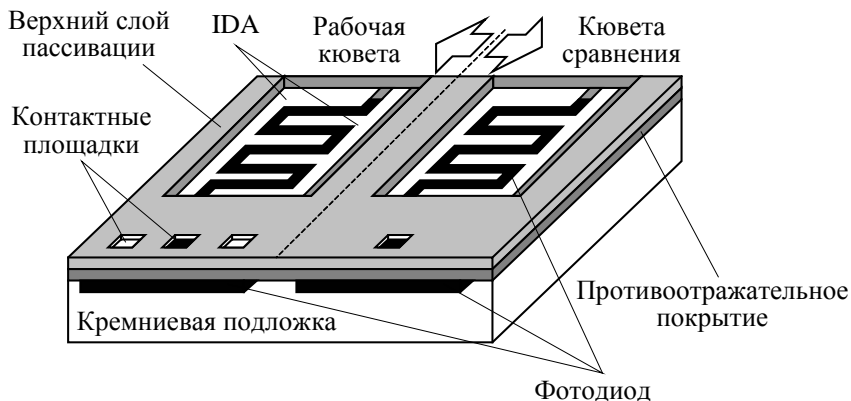


Рис. 1.99. Микрочип на основе электрохемилуминесценции [59]

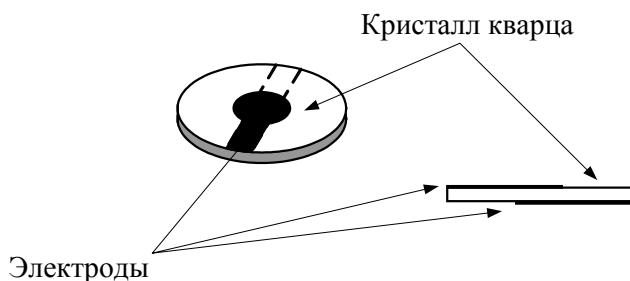


Рис. 1.100. Кварцевые микровесы

Поверхность резонатора активирована слоем биорецептора. Присоединение новых молекул приводит к изменению локальной плотности и к сдвигу частоты. Определение массы с помощью пьезоэлектрического материала также может быть достигнуто с использованием принципа ПАВ (поверхностных акустических волн). Чувствительность можно увеличить, используя резонансные моды более высоких порядков.

1.9. ПРОТЕИНОВЫЕ И ДНК-МИКРОЧИПЫ

Полимеразная цепная реакция (ПЦР) – экспериментальный метод молекулярной биологии, позволяющий добиться значительного увеличения малых концентраций (амплификации) опре-

деленных фрагментов ДНК в искусственных условиях (вне живого организма). Помимо амплификации ДНК, ПЦР позволяет производить множество других манипуляций с нуклеиновыми кислотами (введение мутаций, сращивание фрагментов ДНК). ПЦР широко используется в биологической и медицинской практике для диагностики заболеваний (наследственных, инфекционных), для установления отцовства, для клонирования генов, выделения новых генов.

Компоненты, необходимые для проведения ПЦР:

- ◆ ДНК-матрица, содержащая тот участок ДНК, который требуется амплифицировать;
- ◆ два праймера, комплементарные противоположным концам разных цепей требуемого фрагмента ДНК;
- ◆ термостабильная ДНК-полимераза – фермент, катализирующий реакцию полимеризации ДНК;
- ◆ дезоксинуклеозидтрифосфаты (dATP, dGTP, dCTP, dTTP) – источники нуклеотидов;
- ◆ ионы Mg^{2+} , необходимые для работы полимеразы;
- ◆ буферный раствор, обеспечивающий необходимые условия реакции (рН, ионную силу раствора).

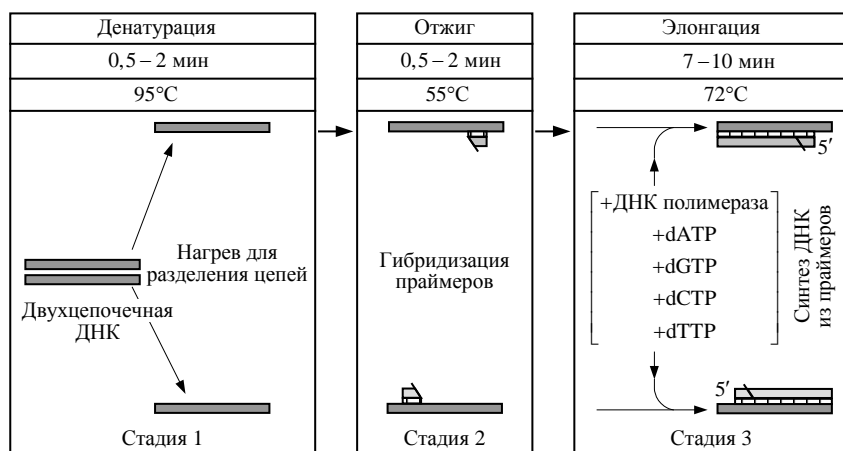


Рис. 1.101. Цикл ПЦР

Цикл ПЦР состоит из 3 стадий (рис. 1.101):

1. Денатурация. Двухцепочечную ДНК-матрицу нагревают до 95°C на 0,5–2 мин, чтобы разделить ДНК. Эта стадия называется

денатурацией, так как разрушаются водородные связи между двумя цепями ДНК.

2. Отжиг. Когда ДНК разделилась, температуру понижают, чтобы праймеры могли связаться с одноцепочечной матрицей.

3. Элонгация. ДНК-полимераза реплицирует матричную цепь, используя праймер в качестве затравки. Полимераза начинает синтез второй цепи от 3'-конца праймера, который связался с матрицей, и движется вдоль матрицы.

Обычно при проведении ПЦР выполняется 20–35 циклов. Способы проведения ПЦР с помощью микрочипов разделяются на 2 типа:

1. Временные. В данной конфигурации реакционная смесь неподвижна, а температура окружающей камеры изменяется ступенчато, согласно стадиям ПЦР.

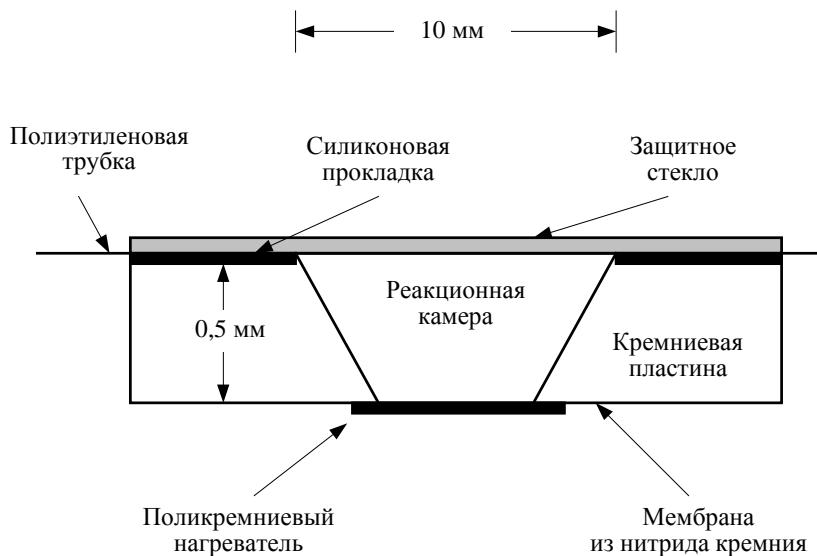


Рис. 1.102. Кремниевый микроколодец с интегрированным нагревателем для ПЦР [56]

2. Пространственные. В данной конфигурации реакционная смесь перемещается между различными фиксированными температурными зонами. Преимуществом данного подхода является отсутствие необходимости постоянного нагрева/охлаждения устройства, что увеличивает скорость реакции.

Пространственные ПЦР-микрочипы бывают двух конфигураций:

1. Поточные ПЦР-микрочипы (рис. 1.103). Используется змеевидная конфигурация микроканалов. Поток в данной ПЦР-системе движется через одиночный канал, преодолевая раз за разом три температурные зоны. Относительное время, в течение которого жидкость находится в каждой из температурной зон, задается топологией микрочипа. Топология также задает число циклов реакции n , выполняемых за один раз в микрочипе. Теоретический фактор амплификации составляет 2^n .

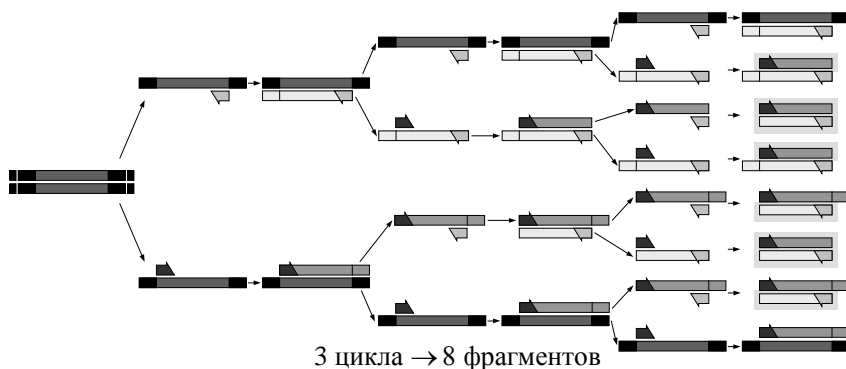


Рис. 1.103. Поточная пространственная ПЦР-система

2. Роторные ПЦР-микрочипы. Роторное устройство заставляет реакционную смесь непрерывно циркулировать между различными зонами нагрева (рис. 1.104). Под действием давления воздуха в воздушном канале мембрана отклоняется и останавливает поток жидкости. Три соединенных последовательно вентиля образуют перистальтический насос в случае последовательной подачи соответствующего давления (вкл./выкл.) воздуха.

Нагреватели, соответствующие стадиям ПЦР, расположены в следующем порядке (против часовой стрелки, начиная с верхнего правого): для денатурации, отжига и элонгации.

Сборка (роторный микрочип и нагреватели) состоит из:

- ◆ RTV-модуль (RTV – силиконовый каучук) с управляющими микроканалами на нижней поверхности;
- ◆ тонкий RTV-слой с микрофлюидным каналом на нижней поверхности;
- ◆ защитное стекло, нагреватели с проводниками (напыленными на поверхность стекла).

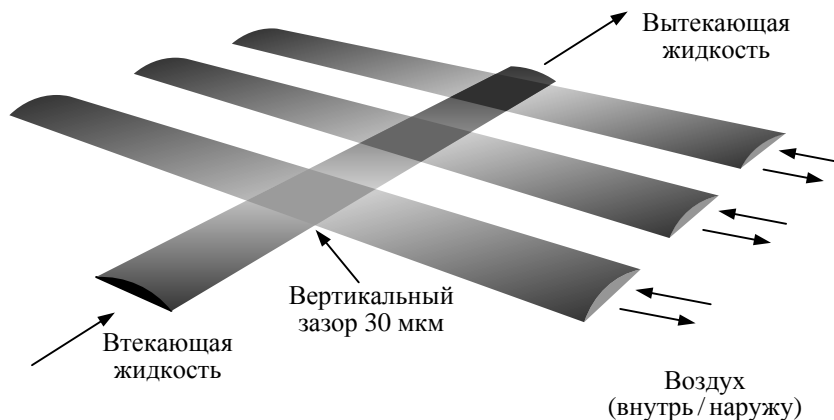


Рис. 1.104. Роторный ПЦР-микрочип [69]

Существует большое число методов разделения ДНК, в основе которых лежит:

1. Электрофорез. Аналитический метод, применяемый для разделения фрагментов ДНК по размеру (длине). Силы электрического поля, прикладываемого к образцам, заставляют фрагменты ДНК мигрировать через гель. Сахарофосфатный остов молекул ДНК заряжен отрицательно, и поэтому цепи ДНК двигаются от катода, заряженного отрицательно, к положительному аноду. Более длинные молекулы мигрируют медленнее, так как задерживаются в геле, более короткие молекулы двигаются быстрее.

2. Центрифугирование. Высокоэффективный метод разделения ДНК. В данном методе высокая ионная сила буферного раствора в центрифужных пробирках способствует диссоциации ДНК, и разделение макромолекул происходит на основании их различий в плавающей плотности.

3. Хроматография. Метод разделения и анализа смесей веществ, а также изучения физико-химических свойств веществ. Принцип жидкостной хроматографии состоит в разделении компонентов смеси, основанном на различии в равновесном распределении их между двумя несмешивающимися фазами, одна из которых неподвижна, а другая подвижна.

4. Различные методы выделения молекул (энтропийные методы, матрицы микростолбиков, ДНК-призмы и др.).

Электрофорез в свободном потоке – подготовительная операция, используемая для непрерывного разделения заряженных аналитов (исследуемых веществ) (рис. 1.105). После приложения электрического поля поперек канала заряженные аналиты разделяются в зависимости от их электрофорезной подвижности. Электрофорез в свободном потоке широко применяется для разделения клеток и клеточных компонентов, и только недавно начал применяться в протеомике.

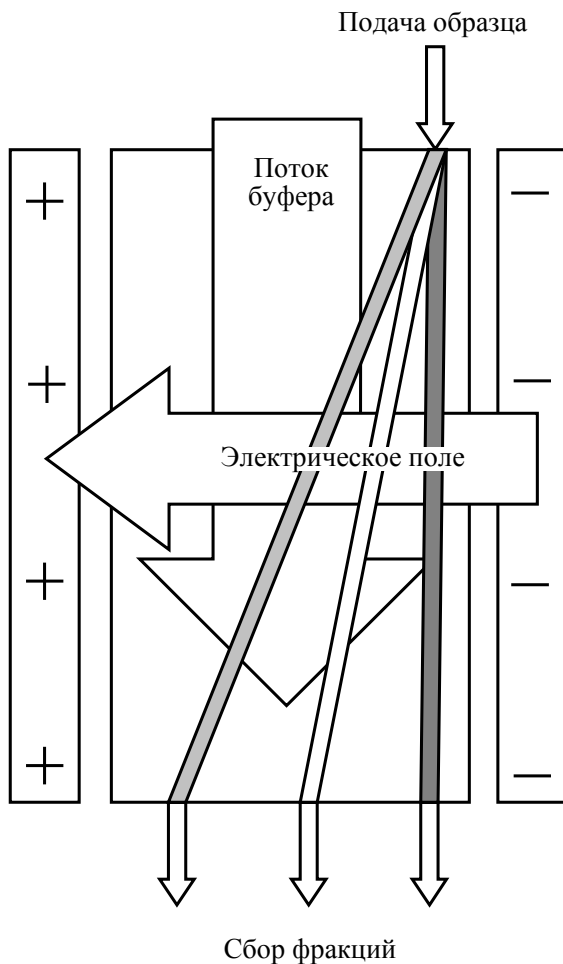


Рис. 1.105. Система электрофореза в свободном потоке [78]

Секвенирование ДНК – физическое картирование и определение нуклеотидной последовательности отобранного и клонированного ДНК-фрагмента.

Методология секвенирования заключается в том, чтобы получить серию комплементарных молекул ДНК, различающихся по длине на одно основание. Существует два основных метода секвенирования:

- ◆ *химическое* – метод Максама–Гильберта (в данном случае используют химическое расщепление ДНК по одному основанию);
- ◆ *дидезоксисеквенирование* – метод Сэнджера (в данном случае синтезируют нужную цепь ДНК *in vitro*, специфически останавливая синтез на заданном основании, рис. 1.106).

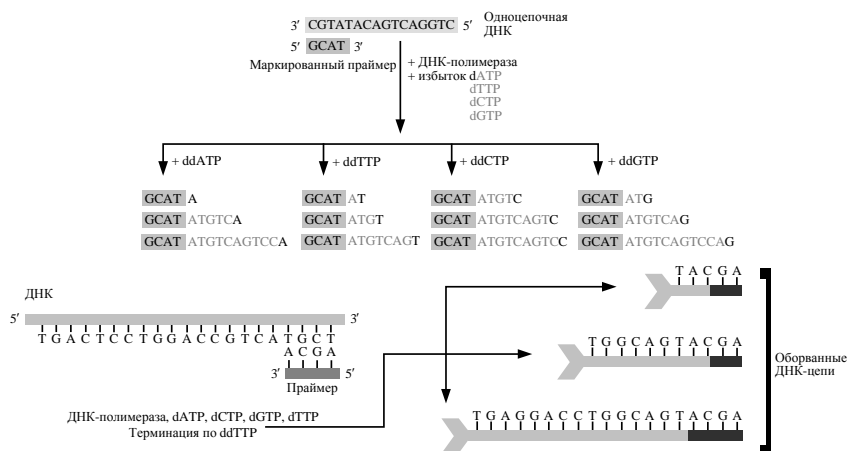


Рис. 1.106. Метод Сэнджера секвенирования ДНК

Чаще при секвенировании используют метод Сэнджера, так как он более надежен и прост в исполнении. ДНК-полимераза I используется для копирования определенной последовательности одноцепочечной ДНК. Процесс репликации останавливается терминаторами ddNTP (2',3'-дидезоксинуклеозидтрифосфатами), специфичными для каждого базового основания (dATP, dCTP, dGTP и dTTP). Синтез ведут в 4 параллельных пробирках, в каждую из которых добавляют один из специфических терминаторов (маркированных разными цветами). После секвенирования образцы помещают в гель для проведения разделения методом гелевого электрофореза.

Современные ДНК-матрицы являются высокочувствительным и точным аналитическим инструментом для научного исследования различных аспектов биологии клеток. Технология ДНК-матриц находит все более широкое применение в фундаментальных и прикладных исследованиях и может использоваться в диагностике.

ДНК-матрица – стеклянная поверхность с нанесенными на нее фрагментами ДНК, занимающими определенное положение, в котором фрагменты способны гибридизироваться (рис. 1.107). В табл. 1.10 представлено два вида ДНК-матриц.

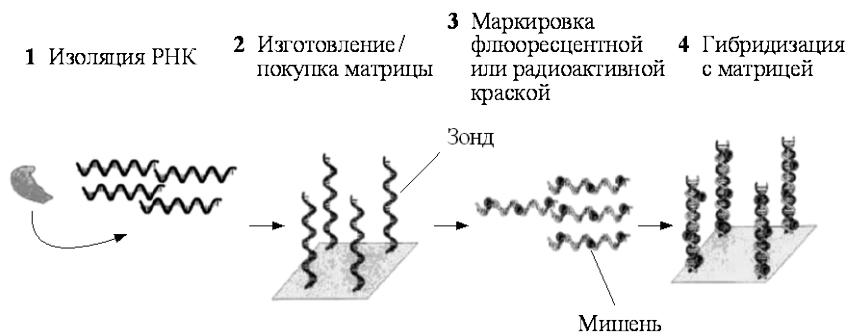


Рис. 1.107. Процесс подготовки ДНК-матрицы

Таблица 1.10

ДНК-матрицы

Геномные ДНК	Комплементарные ДНК (кДНК)
Разделение генома клетки и клонирование каждого фермента. Возможность производства большого числа фрагментов ДНК (около 1 млн. для генома млекопитающих)	ДНК, синтезированные из зрелой мРНК и отвечающие за перенос информации о первичной структуре белков. Извлечение мРНК (или очищенного фрагмента мРНК) из клеток и производство кДНК-копии каждой молекулы

ДНК-зонды (олигонуклеотиды или кДНК) на микрочипе гибридизуются со сложными комплексами исследуемых образцов, помеченных метками.

кДНК-матрицы обычно используются для мониторинга экспрессии генов в различных мРНК живых клеток или для обнаружения полиморфизмов или мутаций последовательностей в геномных ДНК. кДНК-матрицы изготавливают путем роботизированно-

го нанесения каплей раствора с ДНК (диаметром ~50–150 мкм) на стеклянную поверхность со специальным покрытием (подобно автоматизированному нанесению компонентов, монтируемых на поверхность печатной платы, в электронике, рис. 1.108).

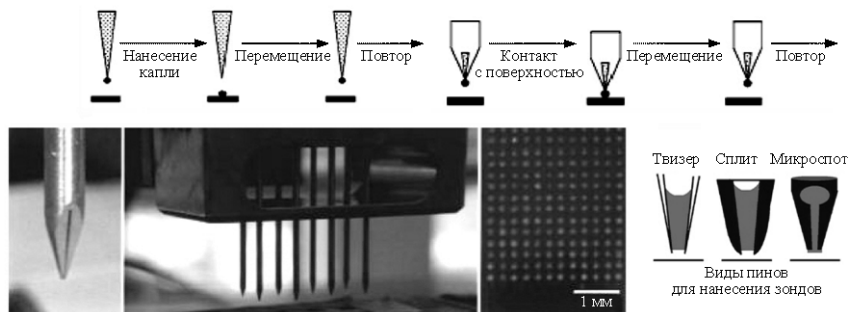


Рис. 1.108. Процесс и виды пинов для нанесения кДНК-зондов

Зонды обычно наносятся капельным способом (*бесконтактный метод*) или с помощью пинов различной формы (*контактный метод*).

Рассмотрим области применения ДНК-матриц.

1. Экспрессия генов. Наиболее широко микроматрицы применяются для анализа экспрессии генов (определения мРНК, транскрибированной из различных генов и кодирующей различные белки). РНК извлекается из множества клеток, в идеальном случае – из клеток каждого типа, после чего преобразуется в кДНК или кРНК. Копии могут быть амплифицированы методом ПЦР с обратной транскрипцией. кДНК/кРНК помечают флуоресцентными метками путем встраивания нуклеотидов в процессе ее синтеза или путем химического присоединения. Молекула кДНК/кРНК, содержащая последовательность, комплементарную одному из зондов, гибридизуется, формируя детектируемые ген-специфичные сигналы (паттерны гибридизации), которые считываются конфокальным микроскопом или лазерным сканером.

2. Экспрессионное профилирование (рис. 1.109). Ввиду того что функции многих белков неизвестны, и многие гены проявляют постоянную активность, ученые широко используют микроматрицы для проведения сравнительного анализа однотипных клеток.

Например, образцы РНК из опухолевых клеток мозга могут быть сравнены с образцами здоровых нейронов или глиоцитов.

Обычно в данном тесте два образца кДНК маркируют двумя различными цветами, после чего их легко различить на одном микрочипе. Ученые рассчитывают открыть различные белки, кодируемые «больными» генами, для улучшения методов доставки лекарств. Так как на одной матрице может находиться до 1000 различных зондов, каждый отдельный эксперимент эквивалентен 1000 генетических тестов, выполняемых параллельно. Подобные исследования позволяют выявить гены, ответственные за многие заболевания.

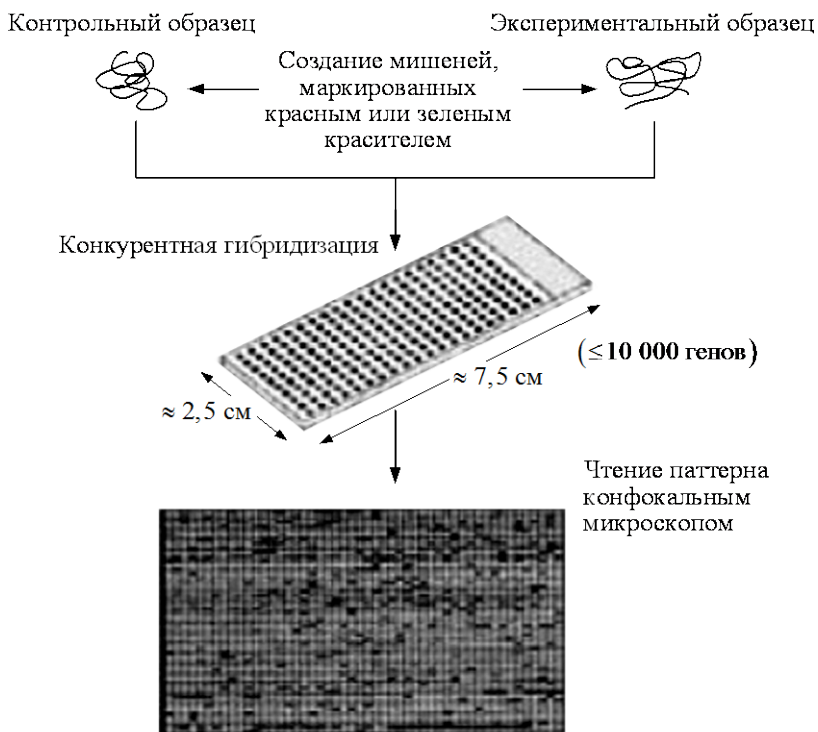


Рис. 1.109. Экспрессионное профилирование

3. Исследования генетических изменений. Микроматрицы находят применение в исследованиях генетических изменений индивидуальных организмов и внутри популяций. Для выявления однонуклеотидных полиморфизмов (SNP), ответственных за генетические изменения и болезни, встречающиеся только в определенных популяциях, используются короткие олигонуклеотидные матрицы.

4. Генотипирование. ДНК-микрочипы также могут быть использованы для проведения генотипирования: в криминалистике, при обнаружении генетической предрасположенности к заболеваниям, при обнаружении новых ДНК-лекарств.

Исследования строения и функций белков предполагают наличие высокоочищенных препаратов. Получение же белка в гомогенном состоянии – достаточно сложная задача. Как правило, биологический материал, являющийся источником выделения, содержит большое число белков, их комплексов друг с другом и другими биополимерами. Близкие свойства компонентов этой смеси требуют при выделении индивидуальных белков использования разнообразных методов и их различных сочетаний. Трудности получения чистого белка связаны также с лабильностью белков и опасностью их денатурации, что сужает круг возможных методов выделения.

Среди методов разделения белков следует выделить:

1. Изоэлектрическое фокусирование (рис. 1.110). Изоэлектрическое фокусирование (электрофокусирование) – один из самых эффективных современных методов разделения белков, основанный на перемещении их молекул под действием постоянного напряжения в область с величиной рН, соответствующей изоэлектрической точке (pI) данного белка (относительному содержанию кислотных и щелочных остатков).

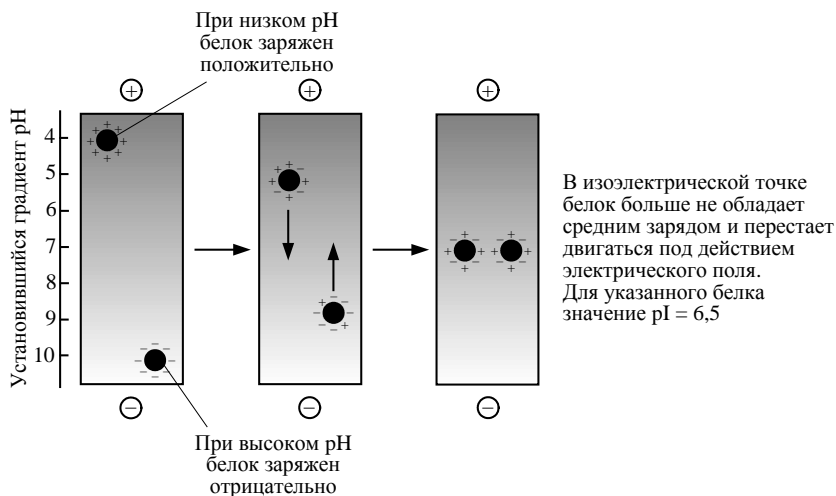


Рис. 1.110. Метод изоэлектрического фокусирования

Белки вводятся в гель, в котором установлен градиент рН или который способен установить такой градиент после приложения электрического поля. Для создания градиента могут применяться специальные полимеры с различными значениями рI (амфолиты-носители), которые помещают в стабилизированную среду и подвергают электрофорезу. Белки, введенные в гель, начинают двигаться, пока они не достигают в этой системе такой области, в которой значение рН равно значению их рI. Метод изоэлектрического фокусирования способен разделить белки, значение рI которых отличается всего на 0,01.

2. Электрофорез в полиакриламидном геле (рис. 1.111). Данный метод позволяет разделить белки в зависимости от значения только одного параметра – их молекулярной массы.

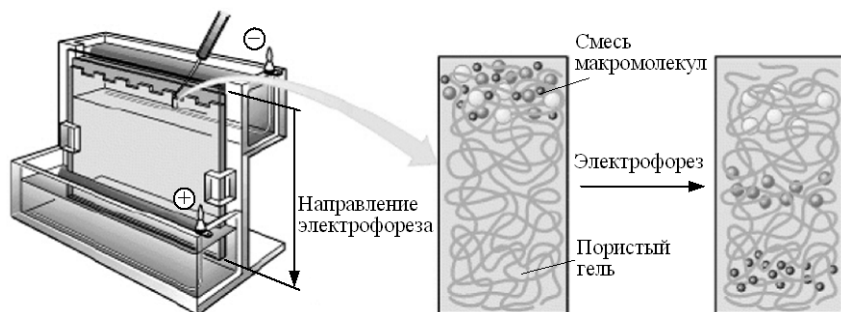


Рис. 1.111. Электрофорез в полиакриламидном геле

Белки обрабатывают специальным анионным детергентом, в результате чего денатурируется их вторичная структура и дисульфидные связи третичной структуры, а сам белок приобретает отрицательный заряд. Соотношение размер/заряд в присутствии детергента становится практически одинаковым для любого белка, и деление происходит по молекулярной массе. В геле белки будут двигаться к положительному электроду, при этом более крупные белки будут двигаться медленнее. Для присоединения белков к твердой подложке, ее поверхность должна быть модифицирована для достижения максимальной силы связывания.

Существует несколько механизмов присоединения белков:

1. Адсорбция (рис. 1.112). Поверхность подложки покрывается нитроцеллюлозой или поли-L-лизином, в результате чего белки могут быть адсорбированы благодаря неспецифическим взаимо-

действиям. Присоединенные белки располагаются на поверхности в произвольной ориентации.

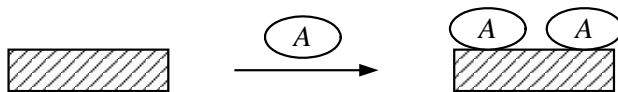


Рис. 1.112. Физическая адсорбция

2. Ковалентное перекрестное шивание (рис. 1.113). Более специфическое и сильное связывание может быть получено перекрестным шиванием (образованием поперечных связей) белков.

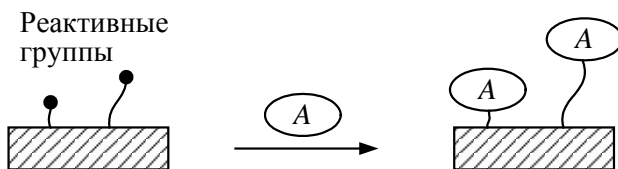


Рис. 1.113. Ковалентное шивание

В общем случае применяется бифункциональный «шиватель», который образует самособирающийся монослой с двумя функциональными группами: одна для взаимодействия с подложкой и вторая, свободная – с первичными аминогруппами белков. Присоединенные белки также могут располагаться в произвольной ориентации.

3. Аффинное связывание (рис. 1.114). Белки связываются с высокоаффинными метками, и их аминоконцы соединяются с поверхностью подложки.

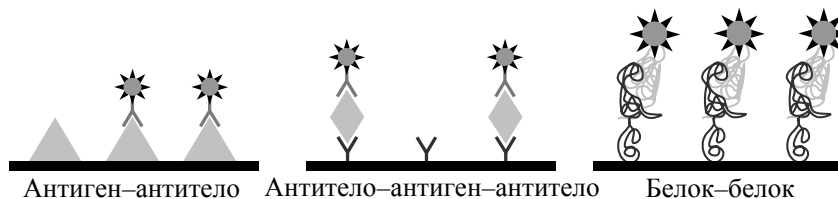


Рис. 1.114. Механизмы аффинного связывания

В данном случае все присоединенные белки ориентированы равномерно в направлении от поверхности. Используя данный метод, иммобилизованные белки/антитела в большей степени ос-

таются в своей стабильной (нативной) конформации. На рис. 1.115 представлен пример присоединения белка к небольшой молекуле.

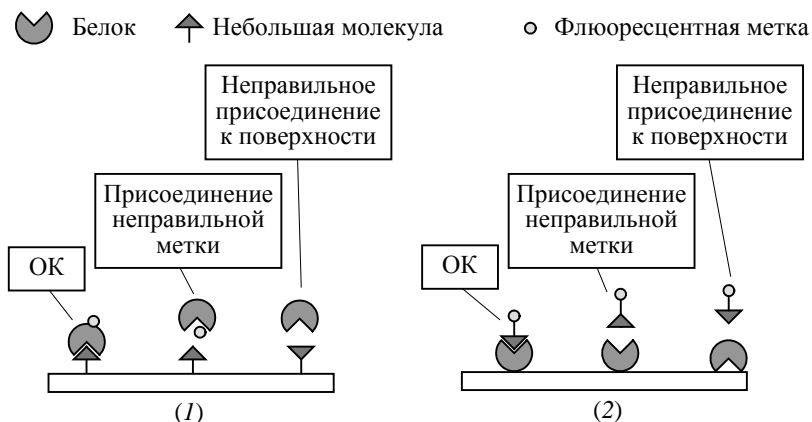


Рис. 1.115. Пример присоединения белка к небольшой молекуле

В случае (1) небольшая молекула присоединена к поверхности; в случае (2) – белок присоединен к поверхности. Пример иллюстрирует сложности в присоединении метки и присоединении к поверхности.

Матрицы для обнаружения белков. В данных матрицах в качестве зондов используются нативные белки (содержат все незаменимые аминокислоты, рис. 1.116).

В процессе эксперимента получается один или несколько лигандов (обозначены цифрой 1 на рис. 1.116), которые связываются с каждым белком с высокой аффинностью. Данные протеиновые лиганды наносятся на поверхность микрочипа и образуют матрицу. Микрочипы затем используются для протеомного профилирования. В примере на рис. 1.116 все белки двух биологических образцов, которые необходимо сравнить, обозначены различимыми маркерами (2 и 3). Паттерны, в которых преобладает один из цветов содержат одного белка больше, чем другого. Паттерны, обозначенные цифрой 4, свидетельствуют о примерно равном количестве белков.

Матрицы для функционального анализа белков. Нативные белки (изображены светло-серым цветом на рис. 1.117) получают из кДНК путем искусственной транскрипции/трансляции или с помощью других методов, после чего наносят на подходящую поверхность. Такие матрицы используются для функционального анализа или исследования свойств связывания нативных белков.

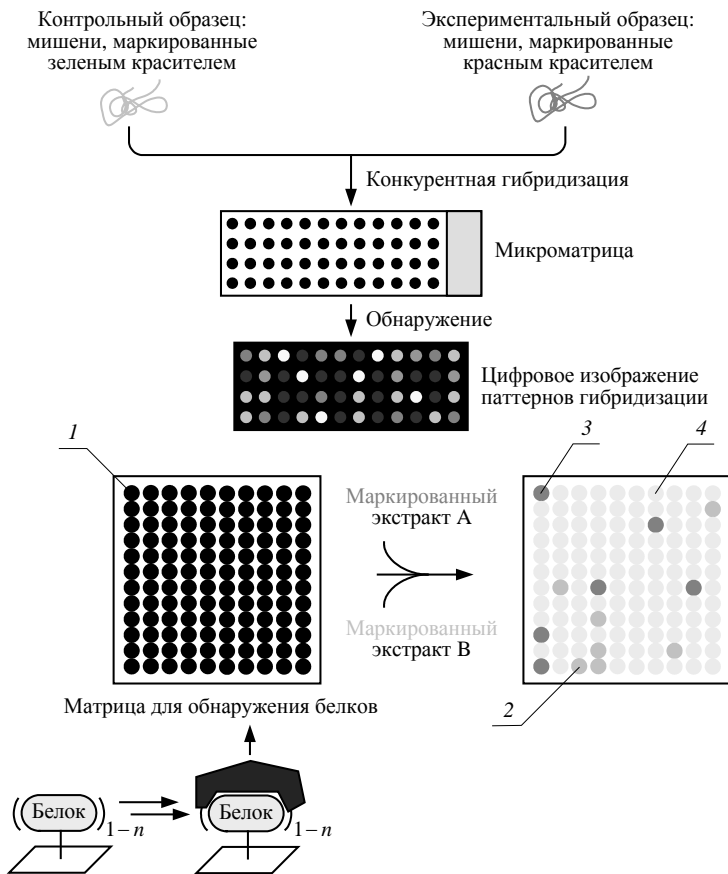


Рис. 1.116. Матрицы для обнаружения белков

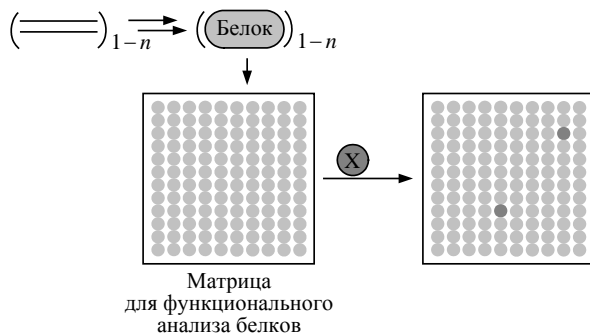


Рис. 1.117. Матрицы для функционального анализа белков [50]

В приведенном примере на рис. 1.117 на матрицу наносятся белки, способные связываться с определенным белком X, маркированным зеленым красителем (изображен темно-серым цветом на рис. 1.117), таким как флюоресцеин. «Светящиеся» места на матрице показывают наиболее подходящие протеины для связывания с X.

В табл. 1.11 представлены результаты сравнительного анализа ДНК- и протеиновых матриц.

Таблица 1.11

Сравнение ДНК- и протеиновых матриц

1	Гибридизация комплементарных зондов-олигонуклеотидов сравнительно проста по сравнению с разнообразием химических процессов, аффинностью и специфичностью белков	
	<p>ДНК: 4 различных нуклеотида. Последовательность нуклеотидов определяет функциональность</p>	<p>Белки: 20 различных аминокислот. Структура определяет функциональность и в значительной мере специфичность связывания</p>
2	Не существует аналога ПЦР для амплификации небольшого количества белка	
3	<p>ДНК-матрица: изготовление путем одновременного нанесения всего слоя нуклеотидов</p>	<p>Протеиновая матрица: не практически синтезировать пептиды из аминокислот на подложке</p>
4	<p>ДНК-зонды: однородные гидрофильные молекулы с отрицательно заряженным остовом</p>	<p>Белки: могут быть как гидрофильными, так и гидрофобными, с кислотными основаниями или с щелочными, поэтому взаимодействуют с окружающей средой множеством различных способов</p>
5	<p>Производительность протеиновых микроматриц и микроматриц на основе антител зависит от различных факторов. Использование подходящей поверхности для иммобилизации белков или антител. Белковые конформационные изменения в процессе иммобилизации могут изменить их функциональность или сделать неактивными. Поверхностные заряды, температура, уровень pH и растворители могут денатурировать некоторые белки</p>	
6	Нестабильность белков может неблагоприятно сказаться на их сроке хранения	

1.10. НАНОБИОТЕХНОЛОГИИ

Биодатчики на основе кантилеверов могут работать в двух режимах:

- ◆ деформация от статической нагрузки (рис. 1.118);
- ◆ смещение резонансной частоты (рис. 1.119).

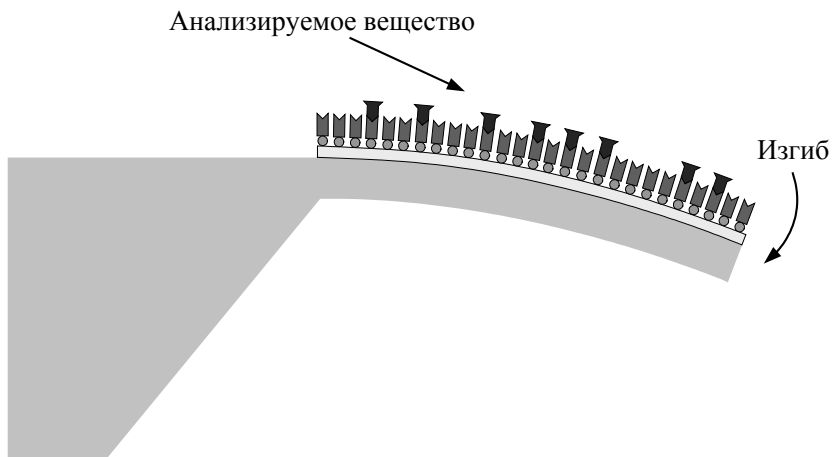


Рис. 1.118. Режим деформации от статической нагрузки

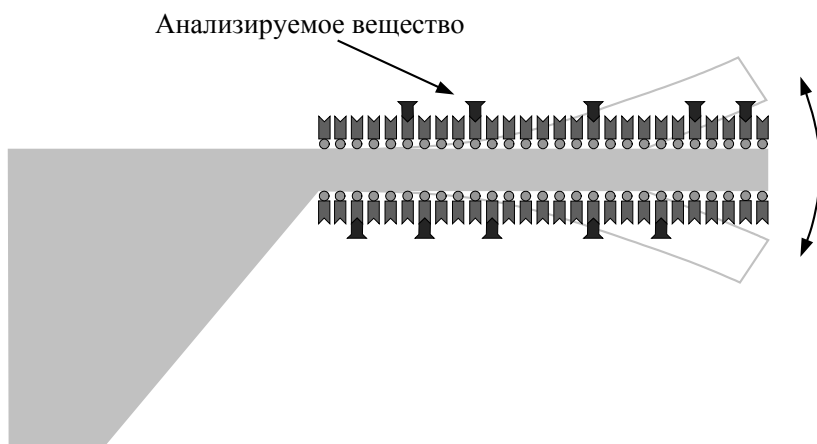


Рис. 1.119. Режим смещения резонансной частоты

Аффинные биодатчики – это биодатчики, использующие антитела, нуклеиновые кислоты и рецепторы.

Антитела – это сложные белковые молекулы, построенные из нескольких субъединиц, вырабатываемые в организмах позвоночных в ответ на проникновение чужеродных агентов (антигенов), например токсинов, вирусов или чуждых организму макромолекул. Сложность применения антител в биодатчиках состоит в том, что акт связывания антигена часто тяжело зарегистрировать. Это является общим недостатком аффинных биосенсоров и требует применения специальных методов, например использования мекток. Взаимодействие антиген–антитело считается наиболее селективным для применения в биодатчиках.

Рецепторы – это мембранные белки, способные связывать определенные лиганды и вызывать определенный физиологический отклик в ответ на акт связывания.

Массочувствительные кантилеверы (рис. 1.120) могут быть использованы в аффинных датчиках или для обнаружения отдельных частиц.

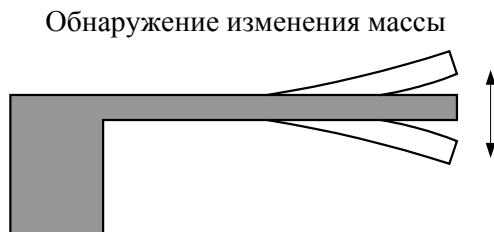


Рис. 1.120. Принцип работы массочувствительного кантилевера

Резонансная частота ненагруженного кантилевера

$$f_0 = \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{k}{m^*}},$$

где m^* – масса.

Динамическая жесткость прямоугольного кантилевера

$$k = \frac{Et^3w}{4l^3}.$$

Резонансная частота нагруженного кантилевера

$$f_1 = \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{k}{m^* + \delta m}},$$

где δm – присоединенная масса.

Кремниевый микрорезонатор в виде кантилевера может быть использован для детектирования массы отдельных частиц вирусов (рис. 1.121).

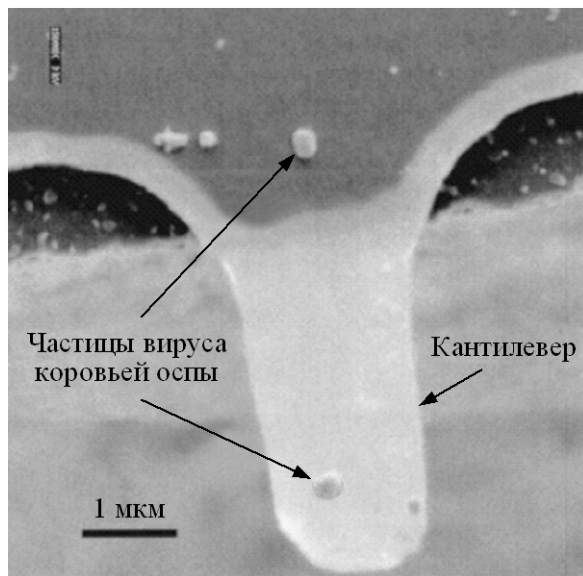


Рис. 1.121. Кремниевый микрорезонатор [42]

Размеры кантилевера на рис. 1.121 составляют 4–5 мкм в длину, 1–2 мкм в ширину при толщине 20–30 нм. Частотные спектры получают с помощью лазерного доплеровского виброметра в условиях окружающей среды. Изменение резонансной частоты является функцией массы частиц вируса, присоединенных к поверхности кантилевера. Микрорезонатор на рис. 1.121 способен детектировать массу отдельной частицы вируса коровьей оспы – 9,5 фг. В процессе прохождения (транслокации) одноцепочечной молекулы ДНК через наноканал возможно наблюдение изменения электрического потенциала или тока.

В качестве наноканалов могут использоваться:

- ◆ естественные (протеиновые) ионные каналы;
- ◆ искусственные нанопоры.

Использование нанопор позволит проводить секвенирование человеческого генома за несколько часов (в отличие от нескольких месяцев при использовании традиционных подходов) и значительно снизить его стоимость.

Другим потенциальным применением ДНК-нанопор является диагностика генетических заболеваний.

Оснадив наноканал различными протеинами, они начнут взаимодействовать с ДНК, находящейся в наноканале, и изменять силу протягивания биомолекулы. Величина данной силы будет свидетельствовать о каких-либо отклонениях от нормы в молекуле и, соответственно, выделять ее поврежденные участки.

Применение наноматериалов в биомедицинской отрасли обширно. Коммерческое применение находят следующие наноматериалы и технологии:

- ◆ полимерные наночастицы для доставки противоопухолевых лекарств через гематоэнцефалический барьер;
- ◆ биodeградируемые полимерные наночастицы для доставки лекарств;
- ◆ нанопористые керамические материалы для фильтрации эндотоксина, ортопедических и зубных имплантов, расщепления ДНК и белков;
- ◆ частицы гидроксиапатита для улучшения поверхности зубов;
- ◆ магнитные/углеродные композитные наноматериалы для экранирования медицинских приборов от ВЧ-полей;
- ◆ послойные полиэлектролитические покрытия толщиной 8–50 нм;
- ◆ полупроводниковые квантовые точки с амино- или карбоксильными группами на поверхности, спектр излучения 350–2500 нм;
- ◆ магнитные частицы, покрытые полимерным слоем с антителами для захвата клеток;
- ◆ наноматериал TiO_2 для разрушения болезнетворных микроорганизмов, распространяющихся по воздуху;
- ◆ противомикробные наноэмульсии;
- ◆ мицеллярные наночастицы для инкапсуляции лекарств, белков, ДНК;
- ◆ золотые биосоединенные наночастицы для просвечивающей и/или флуоресцентной микроскопии;

- ◆ ДНК-штрихкоды, присоединяемые к нанозондам для идентификации и ПЦР, используются для усиления сигнала; каталитическое нанесение серебра для усиления сигнала методом поверхностного плазмонного резонанса;
- ◆ легированные прозрачные наночастицы для эффективного поглощения вредного УФ-излучения и его преобразования в тепло;
- ◆ использование свойств наноструктурированного пористого силикона;
- ◆ использование высокотоксичного для патогенов нанокристаллического серебра;
- ◆ биосоединенные полупроводниковые квантовые точки.

Квантовые точки – нанометровые полупроводниковые кристаллы, изолированные нанообъекты, свойства которых существенно отличаются от свойств объемного материала такого же состава (рис. 1.122).

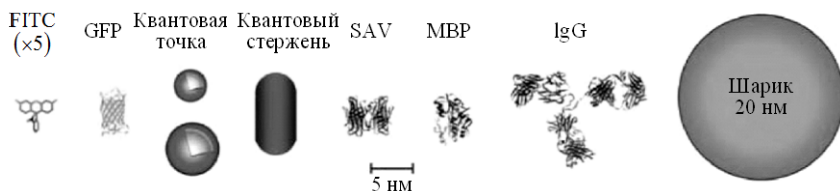


Рис. 1.122. Квантовые точки в сравнении с другими нанообъектами

Когда полупроводники подвергаются воздействию пучка света, некоторые электроны переходят в состояния с более высокой энергией. В процессе обратного перехода электронов в невозбужденное состояние, они испускают фотоны света определенной длины волны, характерной для материала. Когда электроны в полупроводнике находятся в возбужденном состоянии, они остаются связанными с положительными дырками посредством зарядовых взаимодействий и в любой момент могут перейти обратно и рекомбинировать.

Пару электрон–дырка называют *экситоном*, а фиксированное расстояние между электроном и дыркой – *радиусом экситона*. Для полупроводников, используемых для изготовления флуоресцирующих квантовых точек, радиус экситона составляет 5–10 нм.

Если размер кристалла меньше радиуса экситона, проявляется *эффект квантового ограничения*, который приводит к изменению

цвета испускаемого излучения в область более коротких длин волн. В подобных кристаллах для возбуждения электронов требуется больше энергии, чем обычно. Поэтому когда электроны возвращаются в основное состояние, они высвобождают больше энергии и, таким образом, испускают излучение более коротких длин волн. Существует простая линейная зависимость между размером кристалла и цветом: чем меньше размер, тем короче длина волны излучения. Изменяя размер кристаллов CdSe (селенида кадмия, одного из самых распространенных материалов для изготовления флуоресцентных квантовых точек) в пределах 2–6 нм, возможно покрыть весь видимый диапазон излучения (рис. 1.123).

На рис. 1.123, *а* представлены спектры излучения нескольких полупроводниковых нанокристаллов, покрытых ПАВ, для различных материалов и размеров. Кривые 3 иллюстрируют нанокристаллы CdSe различных размеров (диаметром 2,1; 2,4; 3,1; 3,6 и 4,6 нм справа налево). Кривые 2 – нанокристаллы InP диаметром 3,0; 3,5 и 4,6 нм. Кривые 1 – нанокристаллы InAs диаметром 2,8; 3,6; 4,6 и 6,0 нм. На рис. 1.123, *б* изображена серия квантовых точек CdSe разных размеров в водном растворе, подсвеченных ультрафиолетовой лампой.

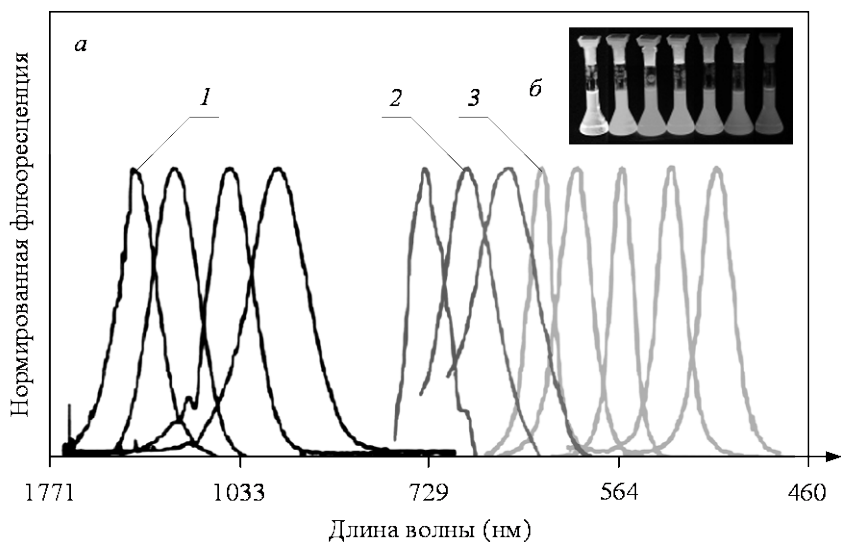


Рис. 1.123. Спектры излучения некоторых квантовых нанокристаллов

Квантовые точки могут быть функционализированы антителами для применения в качестве маркеров. Преимущества квантовых точек: они способны проникать через клеточную мембрану и обнаруживать отдельные биомолекулы внутри клетки (рис. 1.124).

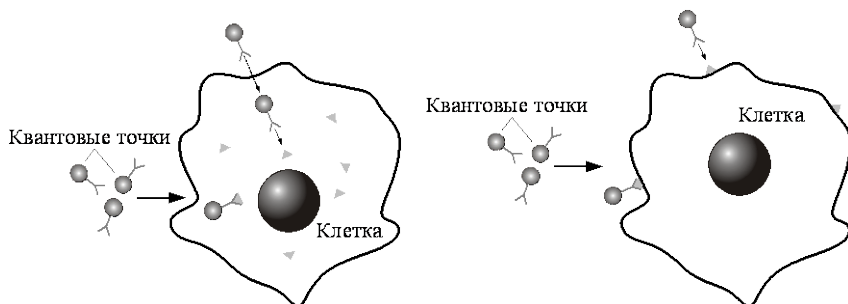


Рис. 1.124. Взаимодействие квантовых точек с клеткой

Наноманипулирование (управление отдельными атомами или молекулами) возможно с помощью следующих инструментов.

1. Магнитный пинцет. Принцип: присоединение активной биомолекулы (например, антитела) к одиночному шарикю. Данный маркер будет способен избирательно присоединяться к отдельным молекулам, присоединенным (с обратной стороны) к поверхности. Прикладывая силы и измеряя смещение магнитного шарика, становится возможным проведение механических экспериментов над отдельной молекулой (рис. 1.125). Силы определяются путем измерения смещения шарика. Простой способ экспериментальной калибровки магнитной силы: использовать силу сопротивления в потоке жидкости (ламинарный поток).

2. Оптический пинцет (также «лазерный пинцет» или «оптическая ловушка») – научный прибор, который позволяет манипулировать микроскопическими объектами с помощью лазерного света (рис. 1.126). Он позволяет прикладывать к диэлектрическим объектам силы от фН до наноньютонов и измерять расстояния от нескольких нанометров до микрометров. Области применения: изучение структуры и принципа работы белков.

3. АСМ – позволяет не только строить объемный профиль поверхности биологических объектов, но и управлять ими. При приближении зонда к поверхности на определенное расстояние возникают силы притяжения, которые заставляют отдельные атомы или

молекулы перейти на зонд. Биологические объекты также могут перемещаться под действием эффекта электрофореза вверх и вниз по зонду АСМ, причем скорость перемещения зависит от размеров объектов (рис. 1.127).

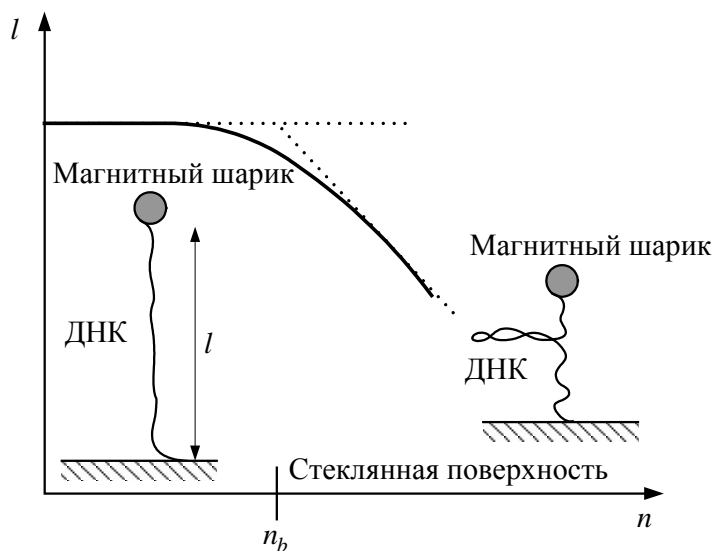
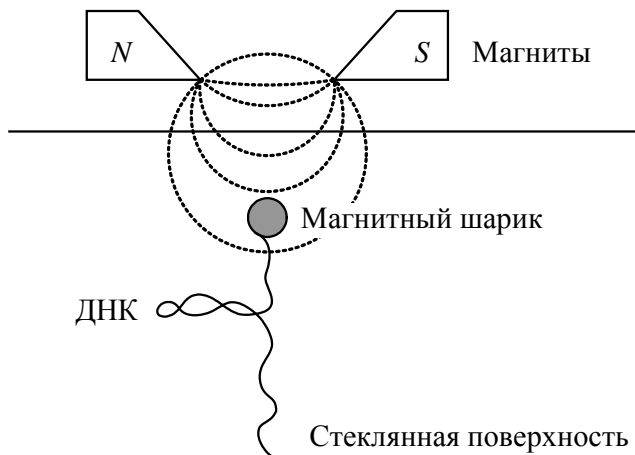


Рис. 1.125. Применение магнитных шариков для исследования ДНК-молекул [71]

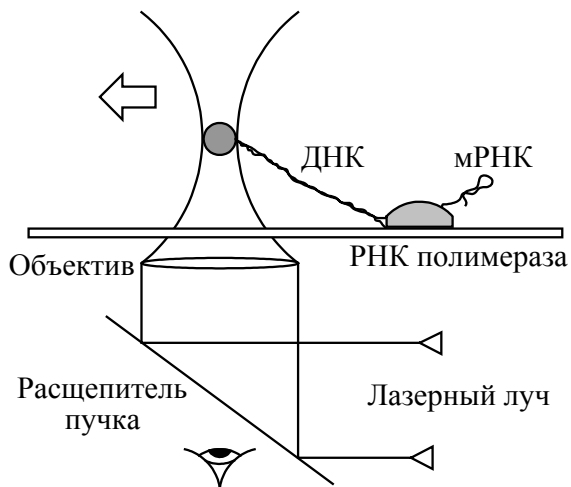


Рис. 1.126. Схема использования оптического пинцета в изучении РНК-полимеразы

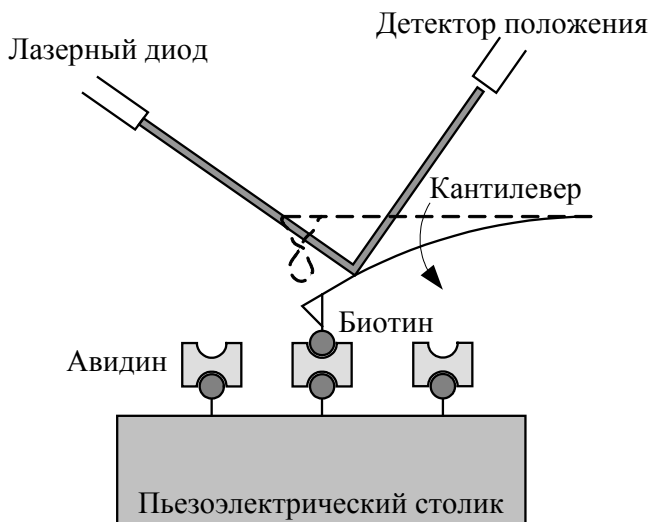


Рис. 1.127. Схема использования АСМ для управления биологическими объектами

В табл. 1.12 представлены результаты сравнительного анализа различных методов наноманипулирования.

Таблица 1.12

Методы наноманипулирования

Метод наноманипулирования	Диапазон изменения силы	Чувствительность	Пространственное разрешение
Оптический пинцет	0–50 пН	0,1 пН	Несколько нанометров
Магнитный пинцет (возможно приложение крутящего момента)	0–10 пН	0,1 пН	Несколько нанометров
АСМ	10 пН – 10 нН	1 пН	Субнанометровое

1.11. ДОСТАВКА ЛЕКАРСТВ И ИМПЛАНТИРУЕМЫЕ УСТРОЙСТВА

Методы доставки лекарств можно разделить на 3 основные группы:

1. Биокапсулы и микрочастицы для контролируемого и/или локального впрыскивания лекарств:

- ◆ глотаемые капсулы для доставки пептидов и протеиновых лекарств;
- ◆ биodeградируемые полимеры для непрерывного впрыскивания лекарств.

2. Микроиглы для трансдермальной доставки:

- ◆ позволяют избежать нарушений в работе желудочно-кишечного тракта (как в случае с глотаемыми капсулами);
- ◆ снижают болевые ощущения (по сравнению с внутривенной или внутримышечной инъекциями).

3. Имплантируемые микросистемы:

- ◆ системы непрерывного впрыскивания лекарств могут быть реализованы путем инкапсуляции лекарства в биodeградируемую микросферу или микро-/наночастицу;
- ◆ локальная доставка может быть осуществлена путем связывания лигандов с поверхностью микро-/наночастиц.

Наночастицы уже находят применение в некоторых областях доставки лекарств и косметики. На рис. 1.128–1.131 представлены наночастицы, используемые в доставке терапевтических молекул [87]. Они характеризуются размерами менее 100 нм и изготавли-

ваются путем образования нанокристаллов или комплексов лекарство–полимер или путем создания наномасштабных капсул (таких как липосомы), содержащих молекулы лекарства. Из-за своих малых размеров они принимаются клетками организма, в то время как более крупные частицы подверглись бы отторжению и удалению из организма.

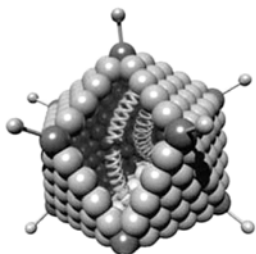


Рис. 1.128. Липосома и аденовирус

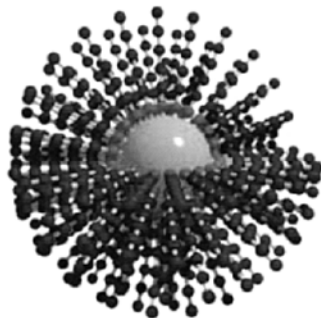


Рис. 1.129. Полимерная наноструктура

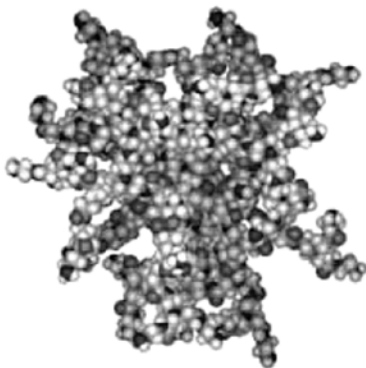


Рис. 1.130. Дендример



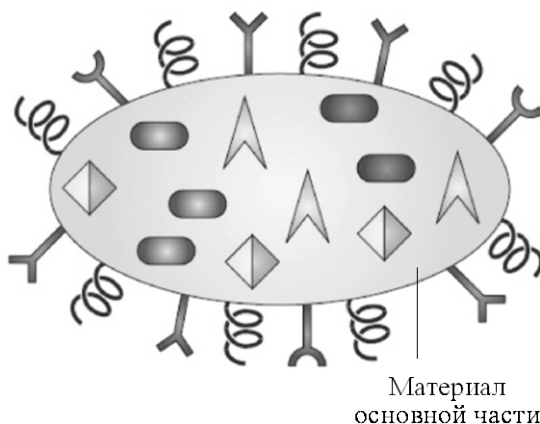
Рис. 1.131. Углеродная нанотрубка

Небольшие молекулы, пептиды, белки и нуклеиновые кислоты могут быть инкапсулированы в наночастицы, таким образом «прячась» от иммунной системы, и нацелены на лечение определенных типов тканей.

Для одновременного *таргетинга* (от английского *target* – мишень) нескольких мишеней с помощью отдельных частиц могут быть применены специальные методики, такие как комбинирование опосредованного рецепторами эндоцитоза и ядерной локализации отдельных пептидов для двухступенчатой ядерной доставки. Также может применяться методика адресации липосом и наночастиц в нестойкие клетки-мишени (например, неоантигены, образующиеся в опухолях под действием радиоизлучения).

Многофункциональные наночастицы (рис. 1.132) обладают способностью:

- ◆ переноса одного или более терапевтических агентов;
- ◆ биомолекулярного таргетинга посредством одного или более сопряженных антител или других распознающих агентов;
- ◆ визуализации усиления сигнала посредством инкапсулированных агентов-усилителей.



Терапевтическая или визуализационная полезная нагрузка	Биологический поверхностный модификатор
Лекарство А	Полиэтиленгликоль
Лекарство В	Функциональные группы против клеток-мишеней
Усилитель контраста	
Усилитель степени проникновения	

Рис. 1.132. Многофункциональные наночастицы [72]

Наночастицы могут быть инкапсулированы в пористые микро-частицы-носители для доставки аэрозолей, объединяя в себе простоту доставки и биодоступность наночастиц, впрыскиваемых в ткани легких. Особое внимание уделяется разработке полимерных наночастиц и липосом для доставки генов. Синтетические векторы представляют собой перспективную альтернативу вирусной доставке в экономическом и технологическом плане, а также в вопросах безопасности.

Биодеградируемые полимеры. Полигликолевая (PGA) и полимолочная (PLA) кислоты являются наиболее изученными и широко применяемыми биодеградируемыми полимерами (рис. 1.133).

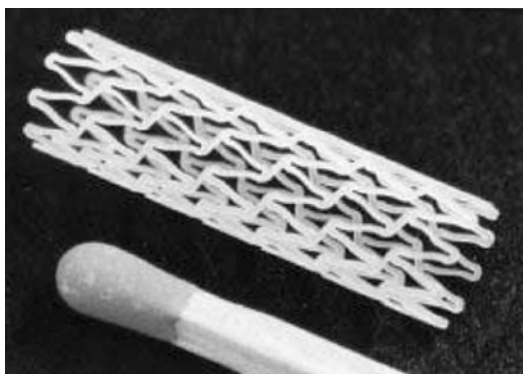


Рис. 1.133. Биодеградируемый полимерный стент

PGA:

- ♦ высококристаллическая – высокая температура плавления и низкая растворимость в органических растворителях;
- ♦ быстрое разложение.

PLA:

- ♦ более гидрофобная – ограничивает поглощение воды – более медленное разложение;
- ♦ две стереоизомерные формы: D-PLA и L-PLA, являющиеся полукристаллическими;
- ♦ D-PLA и L-PLA являются аморфными сополимерами PGA и PLA.

Трансдермальная доставка лекарств. Трансдермальная (чрескожная) доставка лекарств является эффективным, хорошо управляемым способом проведения лечения (рис. 1.134–1.139).



Рис. 1.134. Устройство безыгольного впрыскивания (Bioject)



Рис. 1.135. Трансдермальная бляшка для проведения терапии гормонозамещения (Novogyne Pharmaceuticals)



Рис. 1.136. Устройство для сонофореза (Sontra Medical)



Рис. 1.137. Микроигла (Alza)



Рис. 1.138. Устройство для ионофореза (Vyteris)

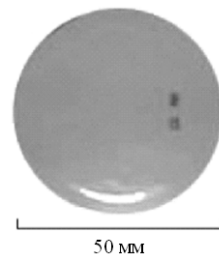


Рис. 1.139. Трансдермальная бляшка для бросания курения (Novartis)

По сравнению с традиционными методами (глотание лекарств или инъекции) трансдермальная доставка позволяет избежать нарушений в работе желудочно-кишечного тракта и значительно снизить болевые ощущения и неудобства, характерные для внутривенной и внутримышечной инъекций. Эффективность трансдермальной доставки лекарств в большой степени ограничена низкой проницаемостью человеческой кожи, в особенности внешним слоем в 10–20 мкм (роговой слой, *stratum corneum*). Для увеличения скорости переноса лекарств сквозь кожу применяются разные подходы, например химические усилители, ионтофорез, электропорация или ультразвук.

Методы доставки лекарств можно качественно разделить на 3 категории по эффективности: X (ограниченная), XX (умеренная), XXX (высокая) (табл. 1.13).

Таблица 1.13

Эффективность методов доставки лекарств

Метод доставки	Степень ускорения переноса лекарства	Непрерывная доставка	Отсутствие боли/неудобства	Низкая стоимость/сложность
Игла для подкожных инъекций	XXX	XX	X	XXX
Химические усилители	X	XXX	XX	XXX
Ионтофорез	XX	XXX	XXX	X
Электропорация	XX	XXX	XX	X
Ультразвук	XX	XXX	XXX	X
Микроиглы	XX	XXX	XXX	X
Безыгольное впрыскивание	XXX	X	X	X
Термопорация	XX	XXX	XXX	X

Микроиглы. Матрицы микроигл (рис. 1.140), изготовленные методами микрообработки, могут применяться для трансдермальной доставки лекарств. Они должны быть достаточно длинными и прочными для прохождения сквозь роговой слой, но также достаточно короткими, чтобы не возбудить нервные окончания в более глубоких тканях. Также возможна доставка генетического материала в растительные клетки и клетки млекопитающих.

Имплантируемые микросистемы. На рис. 1.141 представлена типичная конфигурация осмотической помпы.

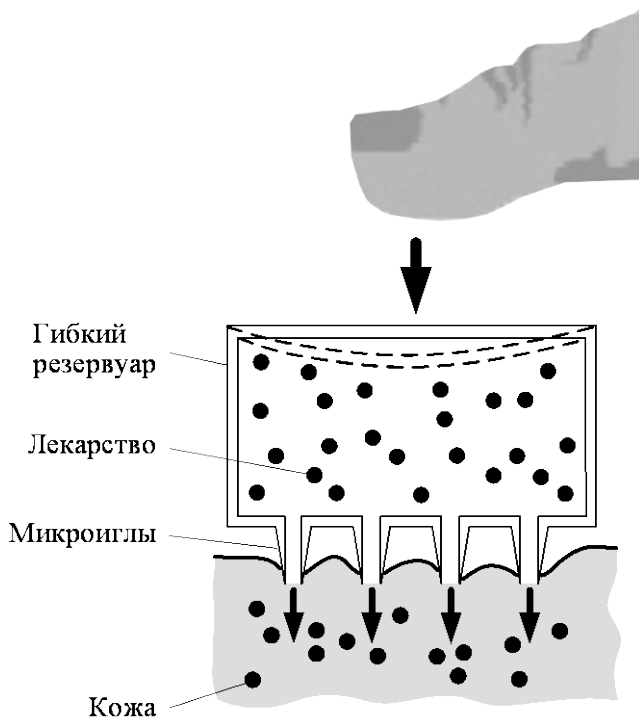
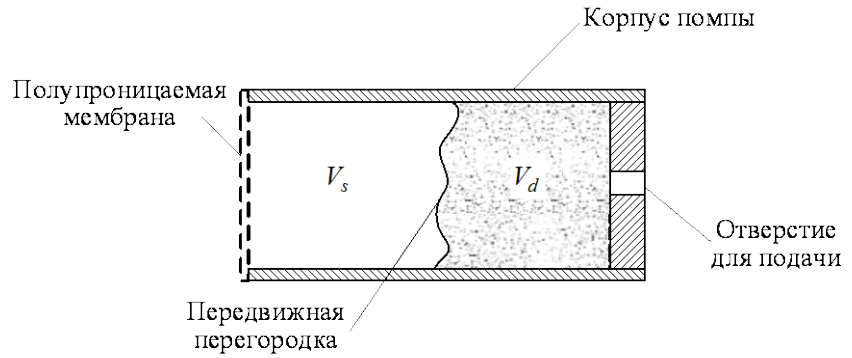


Рис. 1.140. Устройство матрицы микрогел



V_s – объем, занимаемый осмотическим агентом

V_d – объем, занимаемый лекарством

Рис. 1.141. Структура осмотической помпы

Принцип работы. Данные помпы работают благодаря осмотическому перемещению. Вода поступает в микропомпу через полупроницаемую мембрану благодаря высокой концентрации хлорида натрия в осмотической камере. Поступление воды приводит к расширению осмотической камеры и перемещению перегородки, таким образом обеспечивая сжатие камеры с лекарством и его подачу через выходное отверстие.

Осмотическое давление раствора прямо пропорционально его концентрации и абсолютной температуре:

$$\pi_s = S \cdot C_0 \cdot RT,$$

где S – растворимость осмотического агента (1 для разбавленных растворов); C_0 – молярная концентрация растворенного вещества в растворе; R – газовая постоянная; T – абсолютная температура.

На рис. 1.142 представлен пример осмотической МЭМС-помпы.

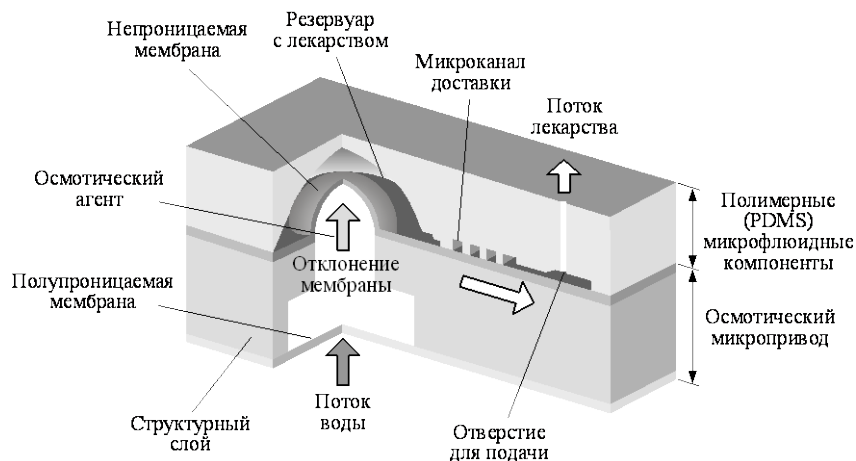


Рис. 1.142. Осмотическая МЭМС-помпа [67]

Вентильные устройства. Компания ChipRX (США) занимается разработкой интегрированных, саморегулируемых чувствительных терапевтических устройств. Устройства предназначены для восприятия физиологических уровней метаболитов, таких как глюкоза. В случае обнаружения изменений биодатчиком электронная схема управления посылает сигнал на чувствительный материал, благодаря чему впрыскивается нужный терапевтический агент (например, инсулин) (рис. 1.143).

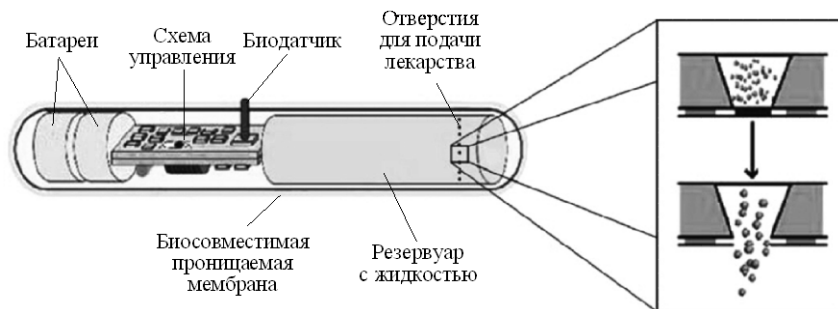


Рис. 1.143. Терапевтическое устройство для контроля уровня глюкозы в крови (ChipRX)

Когда уровень глюкозы нормализуется, электронная схема управления прекращает подачу агента, закрывая отверстия. Также была разработана внешняя помпа, регулирующая подачу инсулина посредством чрескожного катетера с микровентилем, чувствительным к глюкозе (рис. 1.144). Микровентиль располагается на кончике катетера и соединен с резервуаром инсулина, находящимся под небольшим давлением.

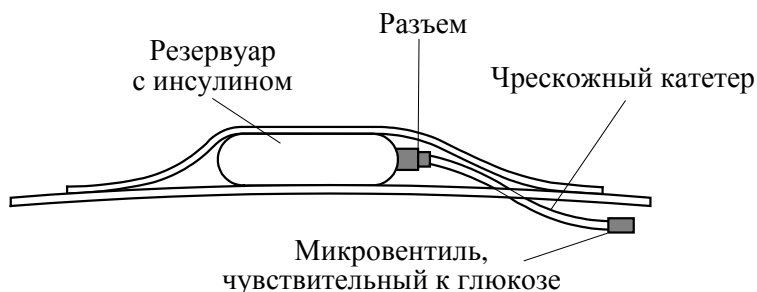


Рис. 1.144. Система подачи инсулина [14]

Устройство подает инсулин через микровентиль, в котором расход является функцией изменения объема гидрогеля, чувствительного к глюкозе. В случае имплантируемых мембранных систем длительная эксплуатация будет зависеть от конструктивной реализации, которая не будет подвержена засорению пор из-за биозагрязнения. Достижение необходимой (коммерциализуемой) степени точности дозировки в течение длительного времени – сложная техническая проблема.

Взаимодействие тканей и имплантатов. Проблемы биосовместимости, проявляющиеся в виде отслоения пленок и растворения защитных слоев из золота и диоксида кремния (SiO_2), связаны с изучением реакции тканей на имплантируемые устройства и различные материалы.

Одним из простых способов улучшения биосовместимости устройства доставки лекарств является модификация поверхностного межмолекулярного взаимодействия. Модификация такими гидрофильными агентами, как PEG (полиэтиленгликоль), снижает поверхностную адсорбцию таких белков, как фибриноген, альбумин и тромбин. Этот же подход используется для модификации поведения лекарств и частиц для их доставки *in vivo*. Например, PEG увеличивает время циркуляции липосом и способствует лучшей «маскировке» наночастиц от иммунной системы. В настоящее время проходят клинические испытания несколько полимер-протеиновых и полимер-лекарственных комплексов.

Многочанальные устройства впрыскивания лекарств. Механизм впрыскивания одного или нескольких химических веществ в твердотельных кремниевых микрочипах основан на электрохимическом растворении тонких золотых мембран-анодов, покрывающих микрорезервуары, заполненные химическими веществами в твердой/жидкой форме или в форме геля. Система MicroCHIPS (рис. 1.145) устроена подобным образом, однако использует локальный электротермический метод для разрушения мембран (состоящих их слоев платины и титана).

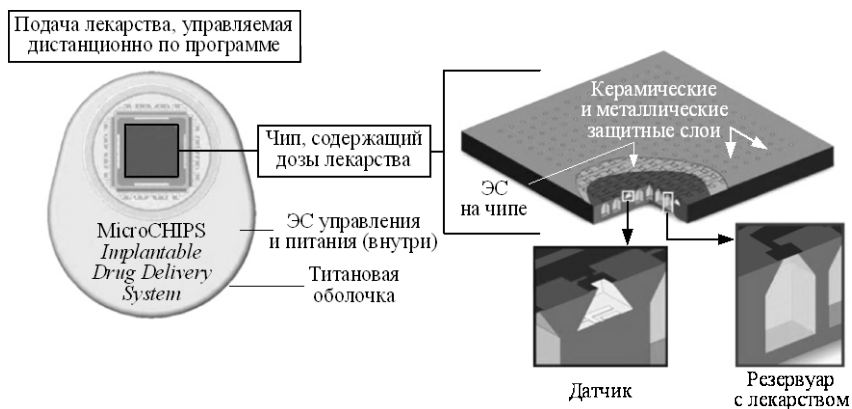


Рис. 1.145. Система MicroCHIPS [70]

Электротермический метод не зависит от химии окружающей среды и значительно быстрее, чем электрохимический. Каждый резервуар управляется отдельно, обеспечивая возможность разработки множества различных схем подачи лекарств.

Биодеградируемые матрицы резервуаров. Имплантируемая многорезервуарная система доставки лекарств в виде биодеградируемого полимерного микрочипа содержит матрицу резервуаров, покрытых рассасываемыми мембранами, отличающимися по толщине или химическому составу (рис. 1.146).

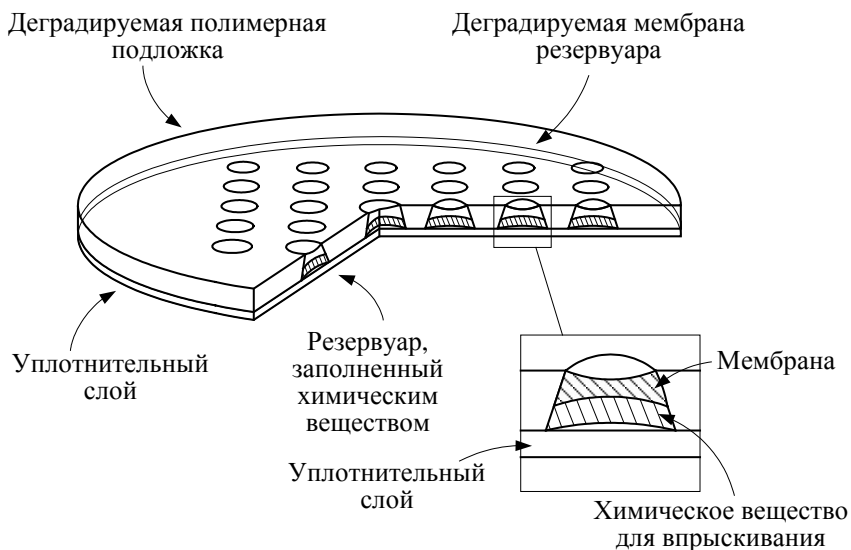


Рис. 1.146. Биодеградруемый полимерный микрочип [80]

Внутри каждого резервуара содержится определенное лекарство. Преимуществом биодеградруемой полимерной системы по сравнению с традиционными микрочипами является отсутствие необходимости проведения повторного хирургического вмешательства для ее удаления. Отсутствие элементов ЭС снимает ограничения на размер системы во время ее изготовления. Данные системы значительно более простые, чем системы на базе аналоговых микроэлектронных устройств, но они не способны обеспечить такую же точность.

Данные полимерные устройства изготавливаются методом формования под давлением полимолочной кислоты (PLA). Различные

конфигурации мембран достигаются за счет различного соотношения молочной и гликолевой кислот, а также полимеров различного молекулярного веса.

Пассивные устройства впрыскивания лекарств

1. Пористые мембраны для контролируемого впрыскивания лекарств. Управляемая доставка терапевтических агентов также может быть осуществлена, если барьер резервуара содержит *избирательную мембрану* (также подходит для инкапсуляции клеток). Для изготовления высокоточных диффузионных мембран с нанопорами (рис. 1.147) используются технологии поверхностной и объемной микрообработки.

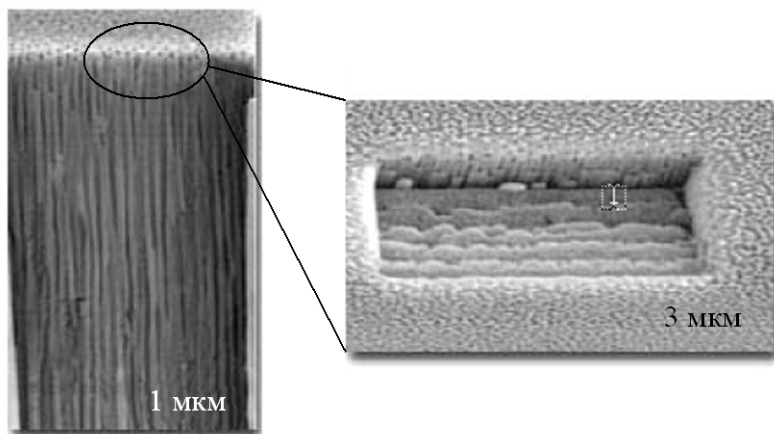


Рис. 1.147. Нанопоры для доставки лекарств

2. Пористые мембраны для инкапсуляции клеток (рис. 1.148). Параметры мембран могут быть оптимизированы для различных биомедицинских применений, таких как иммуноизоляция или фильтрация вирусов. Размеры пор определяют проницаемость, пропуская небольшие молекулы (кислород, глюкоза и инсулин) и задерживая крупные белки (иммуноглобулин).

Обнаружение клеток-мишеней требует инкапсуляции выделяющих инсулин панкреатических островков с применением мембраны, проницаемой для инсулина и глюкозы и непроницаемой для иммунологических клеток, антител и других иммунных молекул, которые могут разрушить трансплантированные клетки.

На данном методе основано также обнаружение болезни Паркинсона и дегенерации сетчатки.

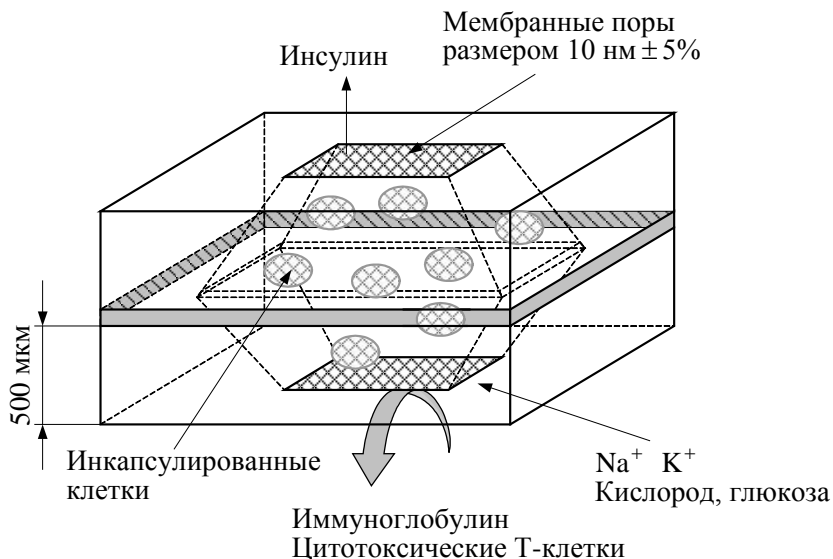


Рис. 1.148. Структура мембраны для инкапсуляции клеток

При сахарном диабете 1-го типа иммунная система образует антитела против островковых (инсулярных) клеток поджелудочной железы, производящих жизненно важный инсулин. Антитела разрушают инсулярные клетки, что приводит к недостатку инсулина.

Перспективным методом лечения данного заболевания является трансплантация островковых клеток из донорской поджелудочной железы в печень пациента. Клетки трансплантируются с расчетом на то, что сразу же после трансплантации они начнут вырабатывать инсулин. Пациентам с трансплантированными островковыми клетками требуется принимать иммуноподавляющие препараты, чтобы предотвратить отторжение донорских клеток. Таким образом, необходимо принятие мер для подавления иммунного ответа или обеспечения иммуноизоляции островковых клеток.

Принцип иммуноизоляции основан на применении полупроницаемого барьера между островковыми клетками и окружающей средой организма. Стимуляторы секреции кислорода и инсулин могут свободно проникать через барьер, в то время как антитела задерживаются.

Перспективными технологиями обеспечения иммуноизоляции являются:

- ◆ генная инженерия или клонирование островковых клеток со сниженной иммуногенностью;
- ◆ перегородки с нанопорами контролируемых размеров и оптимального распределения клеток;
- ◆ усилители переноса кислорода через материал капсул;
- ◆ применение транзиторного подавления иммунного ответа после имплантации;
- ◆ локальное впрыскивание противовоспалительных средств из капсул (по аналогии со стентами, впрыскивающими лекарства).

1.12. МИКРОЭЛЕКТРОДЫ

Передача нервных импульсов. Сложный процесс возбуждения и передачи нервного импульса основан на простых физических явлениях. Движение ионов объясняется с помощью процесса диффузии, а система «внешняя среда–клеточная мембрана–цитоплазма» представляет собой плоский конденсатор, где внешняя среда и цитоплазма играют роль пластин, а мембрана – диэлектрика.

Нервная система человеческого тела состоит из отдельных клеток – *нейронов*, которые принимают, проводят и передают электрические сигналы. Основными известными видами нейронов являются:

- ◆ *мотонейроны* (сигналы которых служат командами для сокращения определенных мышц);
- ◆ *сенсорные нейроны* (передающие информацию о каком-либо виде раздражителей: свете, механической силе или химическом веществе);
- ◆ *интернейроны* (сигналы которых представляют собой результат совместной переработки сенсорной информации из нескольких различных источников, приводящей к формированию адекватных двигательных команд).

На рис. 1.149 представлено строение нейронов (см. также п. 1.2).

Функция нейрона зависит от его формы – эта форма определяет, в каких местах возможен прием сигналов и к каким местам эти сигналы должны быть подведены. Несмотря на различные значе-

ния сигналов, природа их во всех случаях одинакова и состоит в изменении электрического потенциала на плазматической мембране нейрона.

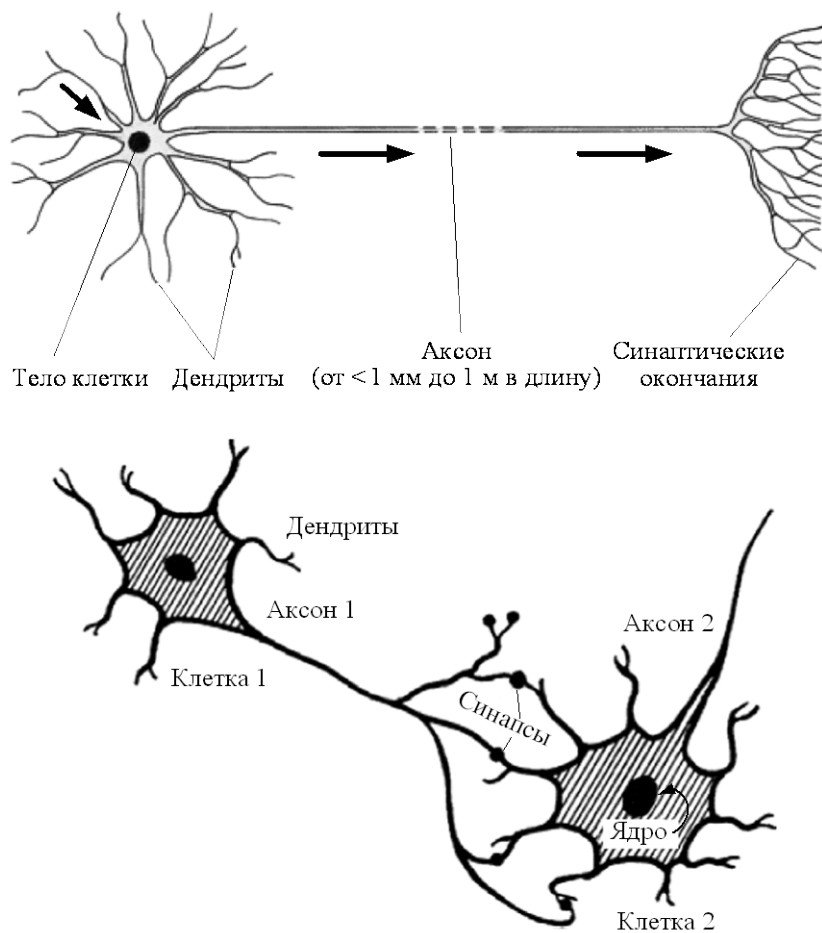


Рис. 1.149. Строение нейронов

Передача сигналов основана на том, что электрическое возмущение, возникшее в одном участке клетки, распространяется на другие участки. Если нет дополнительного усиления, эти возмущения затухают по мере удаления от их источников. На коротких расстояниях затухание незначительно, и многие нейроны проводят сигналы пассивно, без усиления. Однако для дальнейшей связи такого

пассивного распространения сигнала недостаточно. Поэтому у нейронов с длинными отростками в ходе эволюции выработался активный сигнальный механизм, представляющий собой одно из самых удивительных и характерных свойств нейрона.

Потенциал действия и потенциал-зависимые ионные каналы. Электрический стимул, сила которого превышает определенную пороговую величину, вызывает взрыв электрической активности, распространяющийся с большой скоростью вдоль плазматической мембраны нейрона. Эту бегущую волну возбуждения называют *потенциалом действия*, или *нервным импульсом*. Потенциал действия передает информацию с одного конца нейрона на другой без затухания со скоростью до 100 м/с, а в некоторых нейронах еще быстрее. Разность потенциалов между внутренней и наружной сторонами плазматической мембраны – так называемый *мембранный потенциал* – зависит от распределения электрического заряда. Заряд переносят через мембрану нервной клетки небольшие неорганические ионы, главным образом Na^+ , K^+ , Cl^- и Ca^{2+} , причем проходят они через липидный бислой только по специальным каналам. При открывании или закрывании ионных каналов распределение зарядов изменяется и происходит сдвиг мембранного потенциала (рис. 1.150, 1.151).

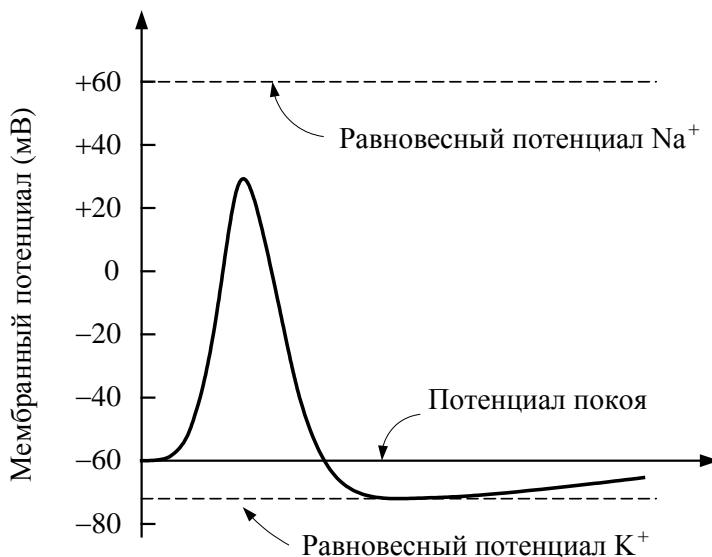


Рис. 1.150. Зависимость мембранного потенциала от времени

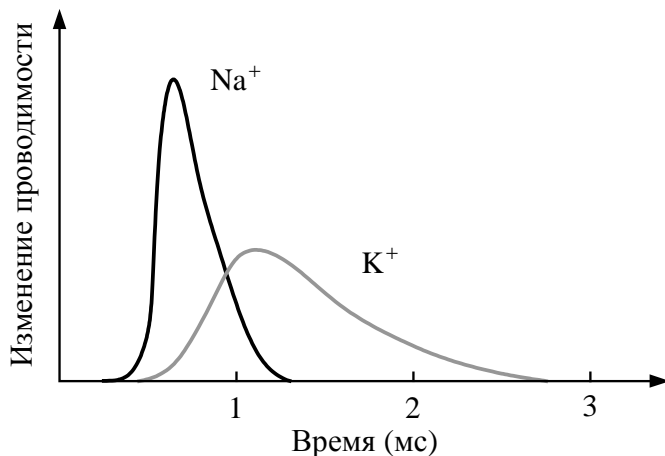


Рис. 1.151. Зависимость соответствующего изменения ионной проницаемости от времени

Таким образом, передача сигнала нервными клетками зависит от каналов с регулируемой проницаемостью – так называемых каналов с «воротами» (рис. 1.152).

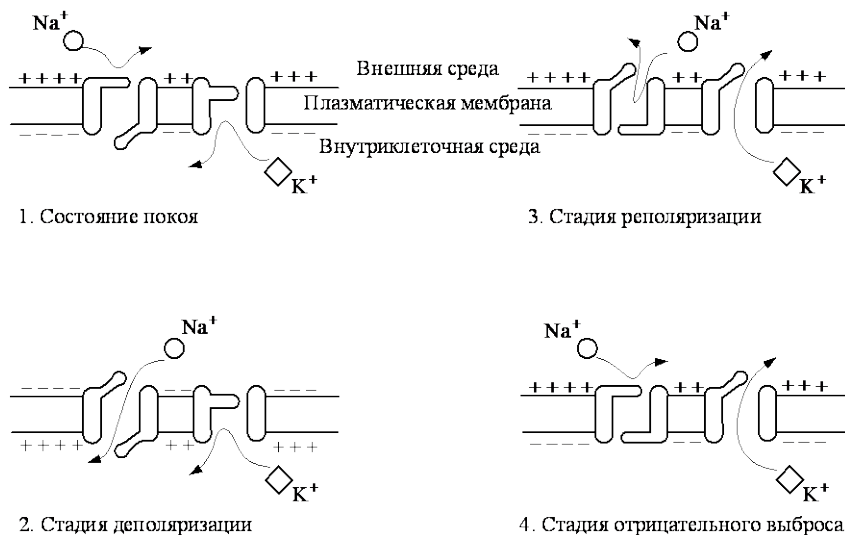


Рис. 1.152. Схема работы ионных каналов

Наиболее важны два типа каналов:

1. Ионные каналы с потенциал-зависимыми воротами. В особенности Na^+ -каналы, которые играют ключевую роль в возникновении взрыва электрической активности, приводящей к распространению потенциалов действия по отростку нейрона.

2. Ионные каналы с лиганд-зависимыми воротами. Данные каналы превращают внеклеточные химические сигналы в электрические и играют центральную роль в функционировании синапсов.

Эти два типа каналов свойственны не только нейронам, они найдены также и в других клетках, например в мышечных волокнах, где выполняют сходные функции.

Нейротрансмиттеры – химические передатчики сигналов между нейронами и от нейронов на эффекторные (исполнительные) клетки (рис. 1.153).

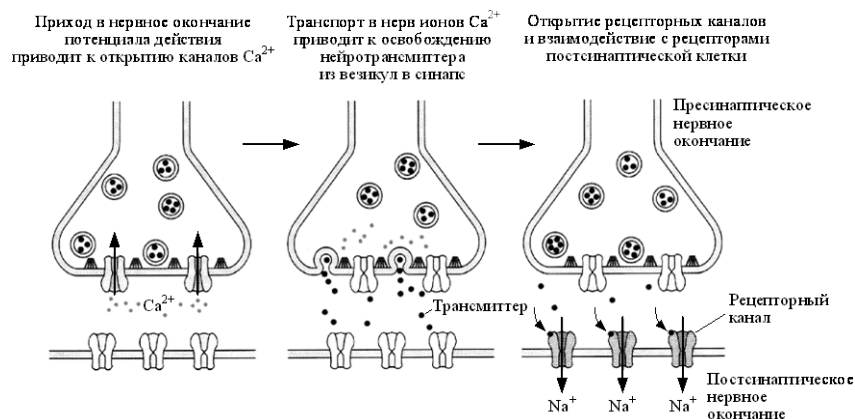


Рис. 1.153. Принцип работы нейротрансмиттеров

Нейротрансмиттеры делятся на:

- ◆ *нейромедиаторы* – прямые передатчики нервного импульса, дающие пусковые эффекты (изменение активности нейрона, сокращение мышцы, секрецию желез);
- ◆ *нейромодуляторы* – вещества, модифицирующие эффект нейромедиаторов.

По химической структуре нейротрансмиттеры делятся на пять классов:

- 1) аминокислоты;
- 2) амины и их производные;

- 3) нейропептиды;
- 4) нуклеозиды и нуклеотиды;
- 5) стероиды.

Планарные микроэлектродные матрицы. Области применения:

- ◆ мониторинг активности нейронных сетей *in vitro*;
- ◆ длительная неинвазивная запись или стимуляция электрической активности нейронов.

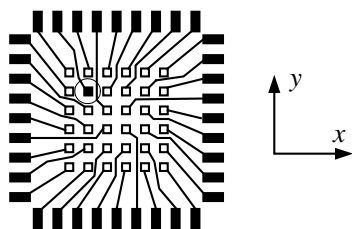
Микроэлектродные матрицы могут быть реализованы с помощью:

- ◆ диссоциированных клеточных культур;
- ◆ органотипических срезов.

Микроэлектродные матрицы изготавливают методами фотолитографии на стеклянной или кремниевой подложках. Прозрачные микроэлектродные матрицы могут быть изготовлены из оксидов на основе индия и олова (ИТО). Планарные микроэлектродные матрицы обычно состоят из 10–100 электродных участков (с размерами, сопоставимыми с размерами клеток, т. е. в диапазоне от нескольких микрометров до десятков микрометров), расположенных на расстоянии 100–200 мкм друг от друга. Принципы измерения в микроэлектродных матрицах бывают трех типов:

1. Прямое измерение напряжения (рис. 1.154).
2. Измерение тока, перпендикулярного области пространственного заряда (рис. 1.155).
3. Измерение сопротивления канала полевого транзистора (рис. 1.156).

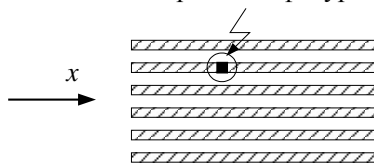
Двумерная конфигурация



Микроэлектродная матрица

$$N_{leads} \propto N_{sites}$$

Одномерная конфигурация



Светоадресуемая
микроэлектродная
матрица

$$N_{leads} \propto N_{sites}^{1/2}$$

Рис. 1.154. Принцип прямого измерения напряжения

Возможен мониторинг нейроактивности отдельными полевыми транзисторами и матрицами на их основе. В данной конфигурации

нейроны располагаются на неметализированных затворах транзисторов, оказывая влияние на ток между стоком и истоком посредством ёмкостной связи, образующейся при изменении мембранного потенциала нейрона. Также возможно ёмкостное стимулирование нейронов (рис. 1.157).

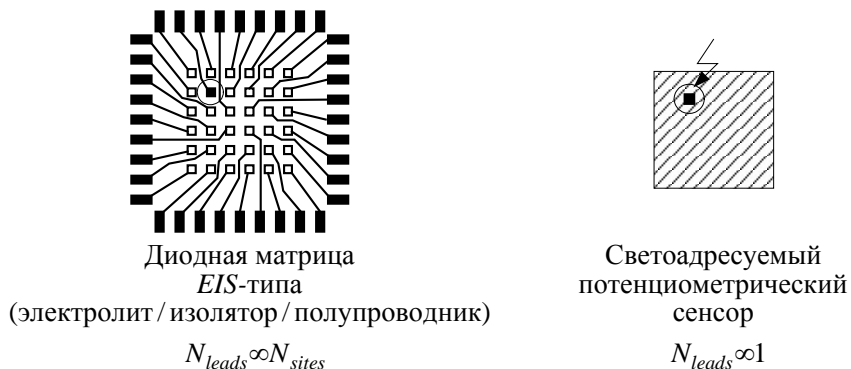


Рис. 1.155. Принцип измерения тока, перпендикулярного области пространственного заряда

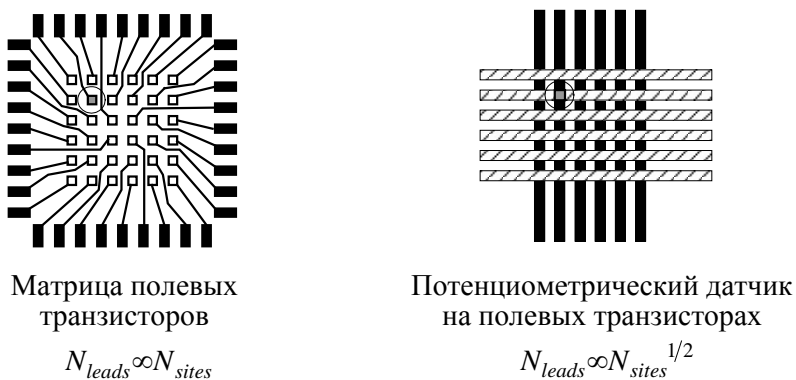


Рис. 1.156. Принцип измерения сопротивления канала полевого транзистора

Имплантируемые электроды. Нейрозонды (рис. 1.158):

- ◆ мониторинг активности и стимулирование;
- ◆ комбинирование с химической стимуляцией.

Кремниевые зонды:

- ◆ вытравливание иглы из объемного кремния;

- ◆ встроенные ЭС (без ЭС крайне низкая стоимость);
- ◆ возможность интеграции флюидных микроканалов.

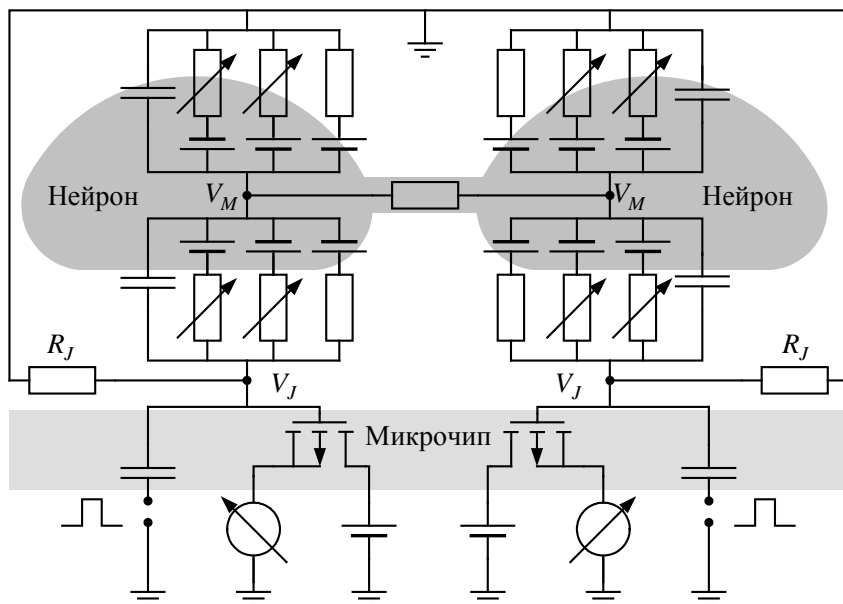


Рис. 1.157. Структура микрочипа для ёмкостного стимулирования нейронов



Рис. 1.158. Базовая структура многоэлектродного микрозонда для записи и/или стимулирования ЦНС

На рис. 1.159 представлен пример *беспроводной имплантируемой микросистемы* для записи и/или стимуляции деятельности нейронов.

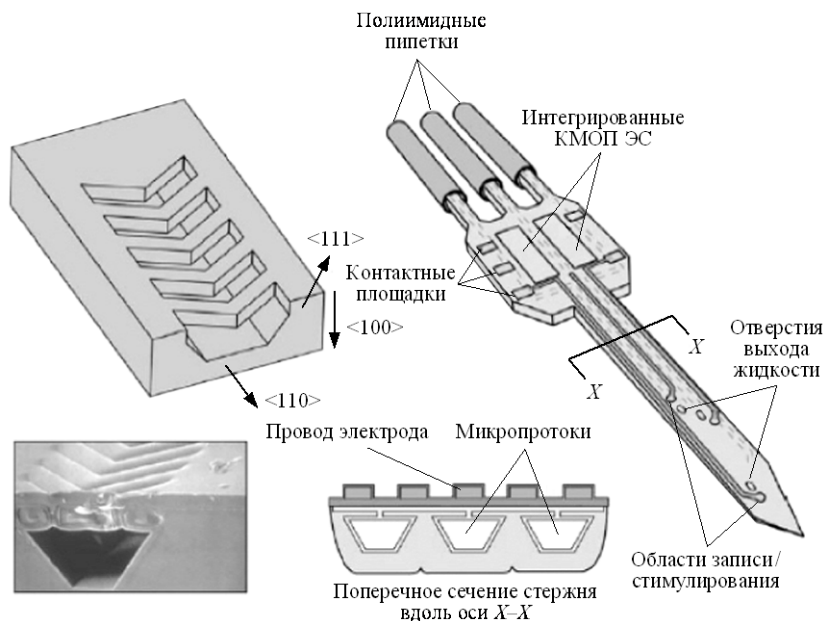


Рис. 1.159. Беспроводная имплантируемая микросистема [4]

Одной из перспективных технологий являются *полиимидные зонды*, для которых характерны:

- ◆ высокая гибкость;
- ◆ более простая технология изготовления (по сравнению с кремнием), менее хрупкий материал;
- ◆ возможность интеграции флюидных микроканалов.

Области применения микроэлектродов для восстановления зрения. Цель – восстановить зрение (или частичное восприятие) отдельной категории слепых людей. Стимуляция на уровне:

- ◆ сетчатки;
- ◆ зрительного нерва;
- ◆ зрительной зоны коры головного мозга.

Стимуляция зрительной зоны коры головного мозга. Первые шаги в данной области были предприняты еще 30 лет назад. Первые исследования продемонстрировали, что образцы фосфенов

(и даже шрифт Брайля) могут быть вызваны электрической стимуляцией коры головного мозга. Ни одно из научных исследований не привело к практической разработке глазных протезов на тот момент, в большей степени из-за невозможности достижения достаточной фокальной стимуляции поверхностными электродами. По этой причине были разработаны новые виды проникающих микроэлектродов, подходящих для безопасной внутренней стимуляции, подогревая интерес к практической реализации глазных протезов. Тем не менее современные достижения в данной области основываются на поверхностных электродах, разрабатываемых с 1978 г., однако используют более совершенные системы обработки [64].

Стимуляция зрительного нерва. Возможно восстановление зрения путем прямой электрической стимуляции зрительного нерва. Исследования в данной области базируются на разработке специальных самоподстраивающихся (по размеру) электродов (изначально предназначенных для избирательного управления мышечной активностью) (рис. 1.160).

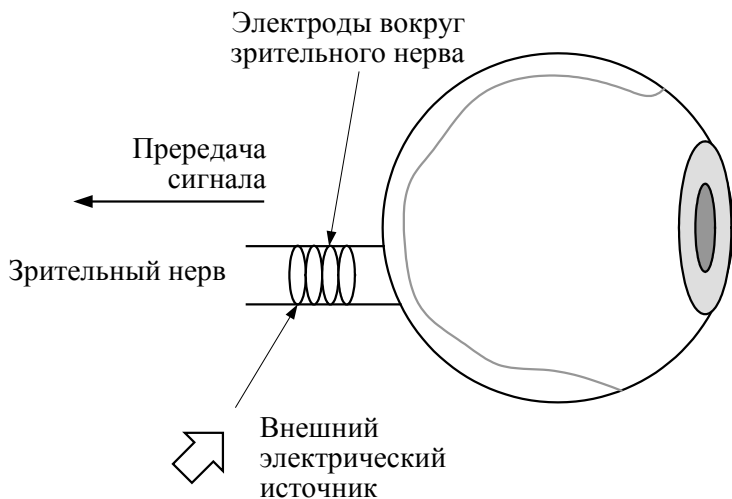


Рис. 1.160. Электроды для стимуляции зрительного нерва [52]

В 1998 г. слепому добровольцу был имплантирован такой электрод вокруг зрительного нерва. Первые результаты продемонстрировали восприятие кластеров фосфенов, распределенных по всему полю зрения [52]. Данный подход подразумевает сохранение ганглиозных клеток сетчатки.

Стимуляция сетчатки. Импланты сетчатки могут быть использованы для восстановления зрения в случае повреждения фоточувствительных клеток. Микроэлектродные матрицы располагаются на поверхности сетчатки и стимулируют прилегающие нервные клетки в соответствии с изображением (рис. 1.161).

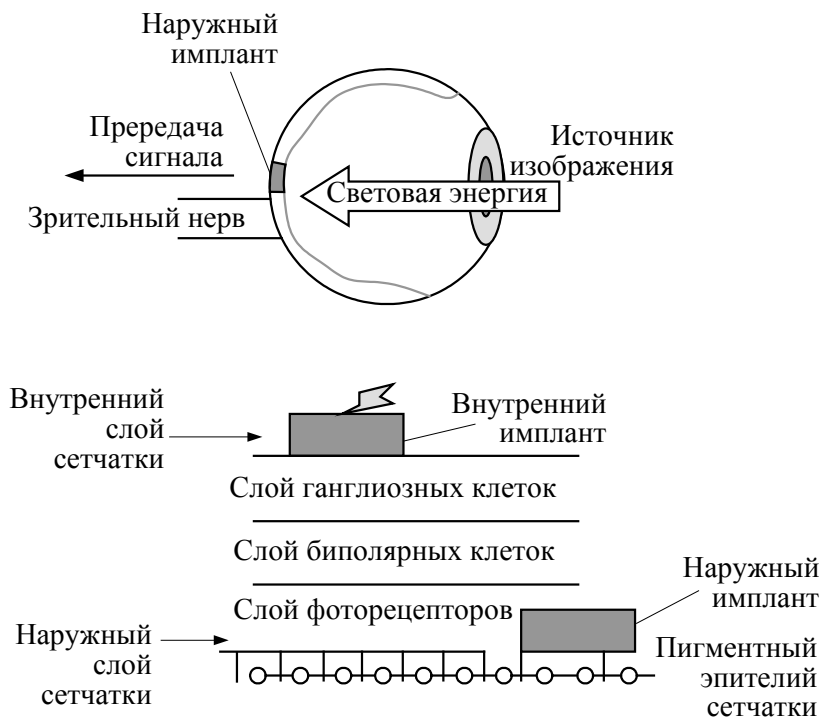


Рис. 1.161. Импланты сетчатки [55]

Для успешного распознавания лиц и чтения может потребоваться до 600–1000 пикселей. Возможно лечение заболеваний:

- ◆ *пигментная дистрофия* – генетическое заболевание, влияющее на сетчатку и приводящее к потере периферического зрения (повреждение фоторецепторов);
- ◆ *макулодистрофия* – группа заболеваний, характеризующихся потерей центрального зрения (повреждение клеток макулы).

При выступлении необходимо стремиться избегать всяческих канцеляризмов, сорных слов типа «значит», «так сказать» и т. д., жаргонных выражений. Живости, ясности выступления способст-

вуют народные поговорки и пословицы, цитаты из литературных произведений и «крылатые слова» великих людей. Но и здесь необходимо знать меру. Считается, что при получасовом выступлении возможно использование 2–3 цитат и до 5 округленных цифр. Текст выступления рекомендуется подготавливать за 2–3 дня, в черновом варианте, а затем снова вернуться к нему.

Психологи отмечают, что внимание аудитории к лектору постепенно начинает снижаться уже через 15 минут после начала. В связи с этим не рекомендуется слишком затягивать свое выступление. Доказано также, что восприятие материала возрастает при комплексности воздействия на органы чувств человека. Поэтому желательно демонстрировать на лекции цветные слайды, видеофильмы, образцы, красочные плакаты и т. п.

2. МЕТОДИЧЕСКИЕ МАТЕРИАЛЫ

2.1. НОРМАТИВНАЯ ДОКУМЕНТАЦИЯ ПО ДИСЦИПЛИНЕ

2.1.1. УЧЕБНО-МЕТОДИЧЕСКИЙ КОМПЛЕКС ПО ДИСЦИПЛИНЕ

БИОНАНОИНЖЕНЕРИЯ
Направление «Нанотехнология» с профилем подготовки «Наноинженерия»
Кафедра ИУ-4
Канд. техн. наук, доцент Андрей Игоревич Власов, тел. (499) 263-65-52, e-mail: vlasov@iu4.bmstu.ru; Алексей Алексеевич Денисов, тел. (499) 263-65-52; Кирилл Андреевич Елсуков, тел. (499) 263-65-52, e-mail: kirill.elsukov@gmail.com
Основная цель дисциплины: изучение основных концепций и методологий исследования основ бионаноинженерии. Материал курса является основой для проектирования сложных сенсорных систем на основе ДНК-чипов в курсе по проектированию сенсоров.
Планируемые результаты изучения дисциплины Задачи дисциплины: получение теоретических и практических навыков работы с методами и средствами по исследованию молекулярных соединений методами оптической и зондовой микроскопии, а также разработка прикладных методик. Форми-

рование знаний, умений и навыков по следующим направлениям деятельности:

- ◆ классификация и сравнение различных методов и средств молекулярной диагностики;
- ◆ этапы и последовательность проектирования бионаносистем;
- ◆ основы применения измерительных методик для исследования органических нанокластеров – как элементной базы бионаноинженерии;
- ◆ средства для моделирования функциональных свойств бионаносистем.

В результате изучения дисциплины приобретаются следующие профессиональные знания, умения и навыки.

Студент должен знать:

- ◆ методы и средства молекулярной диагностики;
- ◆ этапы проектирования и методы разработки комплексных бионаносистем;
- ◆ методологии функционального моделирования разрабатываемых систем.

Студент должен уметь:

- ◆ проводить измерения нанокластеров и молекул органических соединений при помощи методик измерения на микро- и наноуровне;
- ◆ проводить исследования ДНК-чипов и систем на их основе.

Студент должен приобрести навыки:

- ◆ проведения измерений бионаноструктур;
- ◆ моделирования бионаноструктур;
- ◆ применения бионаноструктур.

Место дисциплины в учебном плане специальности

Дисциплина способствует формированию навыков конструкторского проектирования микро- и наносистем, решению системных задач, решаемых при курсовом и дипломном проектировании.

Дисциплина требует активного применения ранее полученных знаний и умений по работе с САПР, основам сенсоров, методам микроскопии, технологическим процессам в наноинженерии.

Структура

1. Основы бионанотехнологии (2 ч).

Основные понятия и термины. Бионанотехнология как направление нанотехнологий. Элементная база бионанотехнологии. Классификация базовых измерительных методик в бионанотехнологии.

2. Теория и практика нанокластеров (2 ч).

Методы формирования органических нанокластеров. Физические и химические методы формирования нанокластеров. Основы формирования нанокластеров органических соединений. Применение белков, ДНК и РНК в качестве органических соединений нанокластеров для проведения измерений.

3. Методы исследования нанокластеров.

3.1. Оптические методы (2 ч).

Спектроскопия нанокластеров. Применение конфокальной оптической микроскопии для визуализации органических соединений. Сканирующая ближнепольная оптическая микроскопия. Раман-спектроскопия нанокластеров. Методы усиления рамановского излучения: SERS, TERS.

3.2. Зондовые методы (2 ч).

СЗМ как основной метод визуализации нанокластеров. Методы повышения разрешающей способности микроскопов при проведении микроскопии органических соединений. Сканирующая туннельная микроскопия в исследовании нанокластеров.

3.3. Физические методы (2 ч).

Особенности применения электронных микроскопов при визуализации органических соединений. Применение ионных микроскопов.

3.4. Химические методы (2 ч).

Применение химических методов для проведения молекулярной диагностики. Преимущества, недостатки и особенности использования химических методов для проведения исследований нанокластеров.

4. Методы построения комплексных систем (2 ч).

Применение различных методов исследования нанокластеров. Средства для моделирования систем для сенсорных приложений.

5. Биоконвертеры (3 ч).

Элементная база биоконвертеров. Реализация классических вычислительных процедур на базе биовычислителей. Сравнение

методов представления данных и программ в традиционном компьютере и биокомпьютере. Свойства биокомпьютеров. Хранение информации в биокомпьютерах. Дополнение Ватсона–Крика. Модель биовычислителя на основе машины Тьюринга. «Шинная организация» в биокомпьютере. Преимущества и недостатки биомолекулярных вычислений.

Организация учебных занятий по дисциплине

Дисциплина построена по модульному принципу, изучение модулей завершается выполнением студентами контрольных работ. Отдельные вопросы предлагаются для самостоятельного ознакомления. Все практические занятия проходят в компьютерном классе с использованием специализированного компьютерного программного обеспечения и мультимедийных средств.

Задание к ДЗ: разработать и провести моделирование системы для исследования нанокластеров или органических соединений согласно варианту задания на основе изученных методов исследования.

Семестр – 8-й (зачет)

Методическое обеспечение

Литература

1. *Вудраф Д., Делчар Т.* Современные методы исследования поверхности. – М. : Мир, 1989.
2. *Ельяшевич М. А.* Атомная и молекулярная спектроскопия. – М., 2001.
3. *Моррисон С.* Химическая физика поверхности твердого тела. – М. : Мир, 1989.
4. *Эггинс Б.* Химические и биологические сенсоры. – М. : Техносфера, 2005.
5. Series «Methods of Experimental Physics». Volume 22. Solid State Physics: Surfaces / Edited by P. L. Park, M. G. Lagally. – Academic Press, 1985.

Мультимедийные и интерактивные средства, электронные учебники

Для информационно-методического обеспечения курса разработан интерактивный портал <http://nanotech.iu4.bmstu.ru/>. На портале в электронном виде размещены методические материалы для

лекций и самостоятельного изучения разделов курса, электронная рабочая тетрадь по практическим занятиям, подсистема электронного тестирования. Представлены дополнительные справочные материалы, библиотека литературы и глоссарий терминов.

Объем. Всего 51 ч, в том числе лекции – 17 ч, лабораторные работы (практические семинары) – 17 ч, самостоятельная проработка разделов курса, подготовка к контрольным мероприятиям – 17 ч.

Приложения (на CD-диске)

- ◆ Конспект лекций по курсу.
- ◆ Рабочая тетрадь для проведения практических занятий по курсу.
- ◆ Билеты по курсу.
- ◆ Контрольная работа по курсу.
- ◆ Примеры ДЗ.
- ◆ Дополнительные методические материалы.

2.1.2. ПРИМЕРНАЯ БАЗОВАЯ ПРОГРАММА ДИСЦИПЛИНЫ

Государственное образовательное учреждение
высшего профессионального образования



«Московский государственный технический
университет имени Н. Э. Баумана»
(МГТУ им. Н. Э. Баумана)

УТВЕРЖДАЮ
Первый проректор –
проректор по учебной работе
МГТУ им. Н. Э. Баумана
_____ Е. Г. Юдин
«__» _____ г.

Дисциплина для учебного плана специальности(ей): бакалавров
по направлению «Нанотехнология» с профилем подготовки «Наноинженерия»
Факультета(ов) – **Информатика и системы управления (ИУ)**
БИОНАНОИНЖЕНЕРИЯ

Автор(ы): доцент А. И. Власов, А. А. Денисов, К. А. Елсуков
Кафедра ИУ-4 «Проектирование и технология производства
электронной аппаратуры»

Виды занятий	Объем занятий, зач. ед.			
	Всего	8-й семестр 17 недель		
Лекции	0,5	0,5		
Семинары	0,5	0,5		
Лабораторные работы	–	–		
Самостоятельная работа	0,5	0,5		
Итого:	1,5	1,5		
Проверка знаний:		зачет		

Виды самостоятельной работы и контрольных мероприятий	Объем, зач. ед./выполнение, неделя выдачи-сдачи			
	Всего	8-й семестр 17 недель		
Домашнее задание № 1 № 2	0,33	0,3 / 10–13		
Рубежный контроль № 1 № 2 № 3	–	–		
Контрольная работа № 1 № 2	–	–		
Курсовой проект	–	–		
Курсовая работа	–	–		

Москва, _____

Программа составлена на основании Государственного образовательного стандарта высшего профессионального образования. Содержит государственные требования к минимуму содержания и уровня подготовки **бакалавра** по направлению подготовки «Нанотехнология» с профилем подготовки «Наноинженерия».

Раздел 1. Цели и задачи дисциплины

Цель дисциплины: изучение основ бионаноинженерии, базовых положений, концепций и методик исследования органических образований (нанокластеров) и органических соединений на молекулярном уровне. Материал курса является основой для проектирования сложных сенсорных систем на основе ДНК-чипов, биокомпьютеров и т. п.

Задачами дисциплины является изучение:

- ◆ классификации и сравнения различных методов и средств молекулярной диагностики;
- ◆ этапов и последовательности проектирования бионаносистем;
- ◆ основ применения измерительных методик для исследования органических нанокластеров;
- ◆ средств для моделирования принципа работы бионаносистем.

Примечание. Изучение данной дисциплины базируется на следующих курсах (разделах курсов):

- ◆ «Основы нанотехнологий».
- ◆ «Физика».
- ◆ «Математическое моделирование МЭМС/НЭМС».
- ◆ «Методы микроскопии».
- ◆ «Технологические процессы наноинженерии».

После освоения данной дисциплины студент подготовлен для изучения следующих курсов учебного плана:

- ◆ «Технологические процессы формирования микро- и наноструктур»;
- ◆ «Проектирование наносенсоров»,

а также для исследовательской части курсового проекта, курсовых работ, квалификационной работы бакалавра.

Раздел 2. Знания, умения и навыки, получаемые после освоения дисциплины

Студент должен знать:

- ◆ методы и средства молекулярной диагностики;

- ◆ этапы проектирования и методы разработки комплексных бионаносистем;
- ◆ методологии функционального моделирования разрабатываемых систем.

Студент должен уметь:

- ◆ проводить измерения нанокластеров и молекул органических соединений при помощи методик измерения на микро- и наноуровне;
- ◆ проводить исследования ДНК-чипов и систем на их основе.

Студент должен приобрести навыки:

- ◆ проведения измерений бионаноструктур;
- ◆ моделирования бионаноструктур;
- ◆ применения бионаноструктур.

Раздел 3. Содержание дисциплины

№ п/п	Раздел дисциплины	Лекции, ч	Семинары, ч	Лабораторные работы, ч	Литература
	8-й семестр	17	–	17	
3.1	Основы бионанотехнологии	2	–	–	[18, 24, 80]
3.2	Методы формирования органических нанокластеров	2	–	4	[18, 24, 80]
3.3	Оптические методы исследования нанокластеров	2	–	3	[18, 24, 80]
3.4	Зондовые методы исследования нанокластеров	2	–	4	[18, 24, 80]
3.5	Физические методы исследования нанокластеров	2	–	4	[24]
3.6	Химические методы исследования нанокластеров	2	–	–	[24, 42]
3.7	Методы построения комплексных бионаносистем	2	–	2	[24, 71]
3.8	Биокомпьютеры	3	–	–	[24]

Содержание

1. Основы бионанотехнологии (2 ч).

Основные понятия и термины. Бионанотехнологии как направление нанотехнологий. Элементная база бионанотехно-

рии. Классификация базовых измерительных методик в бионанотехнологии.

2. Методы формирования органических нанокластеров (2 ч).

Физические и химические методы формирования органических нанокластеров. Основы формирования нанокластеров органических соединений. Применение белков, ДНК и РНК в качестве органических соединений нанокластеров для проведения измерений. Понятие ДНК-зондов.

3. Оптические методы исследования нанокластеров (2 ч).

Спектроскопия нанокластеров. Применение конфокальной оптической микроскопии для визуализации органических соединений. Сканирующая ближнепольная оптическая микроскопия. Раман-спектроскопия нанокластеров. Методы усиления рамановского излучения: SERS, TERS.

4. Зондовые методы исследования нанокластеров (2 ч).

СЗМ как основной метод визуализации нанокластеров. Методы повышения разрешающей способности микроскопов при проведении микроскопии органических соединений. Сканирующая туннельная микроскопия в исследовании нанокластеров.

5. Физические методы исследования нанокластеров (2 ч).

Особенности применения электронных микроскопов при визуализации органических соединений. Применение ионных микроскопов.

6. Химические методы исследования нанокластеров (2 ч).

Применение химических методов для проведения молекулярной диагностики. Преимущества, недостатки и особенности использования химических методов для проведения исследований нанокластеров.

7. Методы построения комплексных систем (2 ч).

Применение различных методов исследования нанокластеров. Средства для моделирования систем для сенсорных приложений.

8. Биокомпьютеры (3 ч).

Элементная база биокомпьютеров. Реализация классических вычислительных процедур на базе биовычислителей. Сравнение методов представления данных и программ в традиционном компьютере и биокомпьютере. Свойства биокомпьютеров. Хранение информации в биокомпьютерах. Дополнение Ватсона–Крика. Модель биовычислителя на основе машины Тьюринга. «Шинная ор-

ганизация» в биокомпьютере. Преимущества и недостатки биомолекулярных вычислений.

Раздел 4. Семинары

№ п/п	Тема семинара	Объем, ч	Литература
8-й семестр		–	

Раздел 5. Лабораторные работы

№ п/п	Тема лабораторной работы	Объем, ч	Литература
8-й семестр		17	
5.1	Численное моделирование комбинированного метода для исследования характеристик нанокластеров	4	[18, 24, 80]
5.2	Практическое исследование органических объектов при помощи комплексного метода	2	[18, 24, 80]
5.3	Применение СЗМ при проведении исследований нанокластеров	4	[18, 24, 80]
5.4	Применение эллипсометрии и других оптических методов при исследовании нанокластеров	3	[18, 24, 42]
5.5	Исследование нанокластеров химическими методами	4	[24, 71]

Содержание

Лабораторная работа № 1. Численное моделирование комбинированного метода для исследования характеристик нанокластеров.

Лабораторная работа № 2. Практическое исследование органических объектов при помощи комплексного метода.

Лабораторная работа № 3. Применение СЗМ при проведении исследований нанокластеров.

Лабораторная работа № 4. Применение эллипсометрии и других оптических методов при исследовании нанокластеров.

Лабораторная работа № 5. Исследование нанокластеров химическими методами.

Раздел 6. Самостоятельная работа

№ п/п	Тема самостоятельной работы	Объем, ч	Литература
8-й семестр			
6.1	Самостоятельная проработка курса лекций	10	[18, 24, 42, 71, 80]
6.2	Домашнее задание № 1. Разработка программы и плана проведения эксперимента по исследованию нанокластеров или органических соединений согласно варианту задания	10	[24, 42]

Содержание

1. Самостоятельная проработка курса лекций. Самостоятельная проработка курса лекций проводится по литературе, приведенной в разделе 8.

2. Домашнее задание № 1. Разработка программы и плана проведения эксперимента по исследованию нанокластеров органических соединений по варианту задания

Выдача – 9-я неделя, сдача – 15-я неделя.

Раздел 7. Курсовой проект, курсовая работа

№ п/п	Тема курсового проектирования, курсовой работы	Объем, ч	Литература
8-й семестр		–	

Раздел 8. Учебно-методические материалы

Литература

1. *Вудраф Д., Делчар Т.* Современные методы исследования поверхности. – М. : Мир, 1989.
2. *Ельяшевич М. А.* Атомная и молекулярная спектроскопия. – М., 2001.
3. *Моррисон С.* Химическая физика поверхности твердого тела. – М. : Мир, 1989.
4. *Эггинс Б.* Химические и биологические сенсоры. – М. : Техносфера, 2005.
5. Series «Methods of Experimental Physics». Volume 22. Solid State Physics: Surfaces / Edited by P. L. Park, M. G. Lagally. – Academic Press, 1985.

**Для демонстрации на лекциях используются
следующие пособия**

1. Плакаты с изображением функциональных диаграмм методов и методик проведения измерительных экспериментов.
2. Комплект мультимедийных презентаций по темам лекций и лабораторных работ.
3. Проведение всех практических занятий осуществляется в компьютерном классе с использованием учебных и демонстрационных версий прикладного ПО.

Методические указания по изучению дисциплины

1. Изучение бионаноинженерии строится как изучение системной, многовариантной проблемы, объектам которой (технологическим процессам, методам проектирования и синтеза новых конструкторско-технологических решений) свойственны:
 - а) многообразие связей элементов, отражающих объективную реальность;
 - б) специфическая методология моделирования и проектирования;
 - в) особый научный и практический аппарат.
2. Методологически дисциплина строится на основе оптимального соотношения теоретических и прикладных вопросов с обязательным участием студентов в самостоятельном исследовании оригинальных частных задач синтеза типовых технологических процессов путем разработки концептуальных моделей.
3. Теоретические основы излагаются в такой мере, чтобы показать общие принципы применения современных методов микроскопии к решению конкретных задач. Содержание соответствующих тем разделов направлено на усиление роли фундаментальных знаний в теоретической и профессиональной подготовке студента, способствует формированию у студента фундаментальных системных знаний, развивает творческие способности будущего специалиста.
4. Прикладные вопросы ориентируют студентов на решение типовых задач моделирования и проектирования бионаносистем, выбор адекватных физическим процессам моделей, методов, алгоритмов, прикладных пакетов и технических средств, обладающих максимальной эффективностью. Во всех разделах предусмотрены темы, содержание которых связано с формировани-

ем и развитием у будущих специалистов практических навыков решения задач с использованием ЭВМ, САПР.

Программа составлена:

доцент А. И. Власов _____

А. А. Денисов _____

К. А. Елсуков _____

2.2. СТРУКТУРА И СОСТАВ ФОНДОВ ОЦЕНОЧНЫХ СРЕДСТВ ПО ДИСЦИПЛИНЕ

Фонды оценочных средств по дисциплине представляют собой: варианты экзаменационных билетов, перечень вопросов для рейтинговых и контрольных мероприятий.

2.2.1. ПЕРЕЧЕНЬ ВОПРОСОВ ДЛЯ РЕЙТИНГОВЫХ И КОНТРОЛЬНЫХ МЕРОПРИЯТИЙ

1. Бионаноинженерия: понятие и элементная база.
2. Сравнительная характеристика методов молекулярной диагностики.
3. Концепция комплексного метода и его преимущества.
4. Классификация кантилеверов с точки зрения бионаносенсоров.
5. Отклонение под действием вертикальной (нормальной) силы.
6. Отклонение под действием продольной силы.
7. Отклонение под действием поперечной силы.
8. Общие принципы работы биосенсоров.
9. Технология изготовления кантилеверов-биосенсоров.
10. Взвешивание микроскопических объектов.
11. Характеристики биосенсоров.
12. Распознающие элементы.
13. Моделирование частотных характеристик кантилеверов.
14. Биокomпьютеры. Свойства. Элементная база биокomпьютеров. Преимущества и недостатки биомолекулярных вычислений.
15. Биокomпьютеры. Реализация классических вычислительных процедур на базе биовычислителей.
16. Биокomпьютеры. Хранение информации в биокomпьютерах.
17. Биокomпьютеры. Модель биовычислителя на основе машины Тьюринга.
18. Биокomпьютеры. «Шинная организация» в биокomпьютере.

2.2.2. ВАРИАНТЫ ЭКЗАМЕНАЦИОННЫХ БИЛЕТОВ

Московский государственный технический университет имени Н. Э. Баумана	
ЭКЗАМЕНАЦИОННЫЙ БИЛЕТ № 1	
по курсу «Бионаноинженерия»	
1. Сравнительная характеристика методов молекулярной диагностики. 2. Отклонения под действием вертикальной (нормальной) силы. 3. Биокомпьютеры. Свойства. Элементная база биокомпьютеров. Преимущества и недостатки биомолекулярных вычислений.	
Утверждаю	В. А. Шахнов
Билет рассмотрен и утвержден на заседании кафедры «__» _____ г.	

Московский государственный технический университет имени Н. Э. Баумана	
ЭКЗАМЕНАЦИОННЫЙ БИЛЕТ № 2	
по курсу «Бионаноинженерия»	
1. Концепция комплексного метода и его преимущества. 2. Отклонение под действием продольной силы. 3. Биокомпьютеры. Реализация классических вычислительных процедур на базе биовычислителей.	
Утверждаю	В. А. Шахнов
Билет рассмотрен и утвержден на заседании кафедры «__» _____ г.	

Московский государственный технический университет имени Н. Э. Баумана

ЭКЗАМЕНАЦИОННЫЙ БИЛЕТ № 3

по курсу «Бионаноинженерия»

1. Классификация кантилеверов по принципу действия.
2. Отклонение под действием поперечной силы.
3. Биокомпьютеры. Хранение информации в биокомпьютерах.

Утверждаю

В. А. Шахнов

Билет рассмотрен и утвержден на заседании кафедры «__» _____ г.

Московский государственный технический университет имени Н. Э. Баумана

ЭКЗАМЕНАЦИОННЫЙ БИЛЕТ № 4

по курсу «Бионаноинженерия»

1. Общие принципы работы биосенсоров.
2. Характеристики биосенсоров.
3. Биокомпьютеры. Модель биовычислителя на основе машины Тьюринга.

Утверждаю

В. А. Шахнов

Билет рассмотрен и утвержден на заседании кафедры «__» _____ г.

2.3. СПЕЦИФИКАЦИЯ УЧЕБНЫХ ВИДЕО- И АУДИОМАТЕРИАЛОВ, СЛАЙДОВ, ЭСКИЗОВ ПЛАКАТОВ И ДРУГИХ ДИДАКТИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

2.3.1. СПЕЦИФИКАЦИЯ СЛАЙДОВ – КОНСПЕКТОВ ЛЕКЦИЙ

Название раздела	Число слайдов
1. Основы бионаноинженерии. Основные понятия и термины. Бионаноинженерия как направление нанотехнологий. Элементная база бионаноинженерии. Классификация базовых измерительных методик в бионаноинженерии	10
2. Методы формирования нанокластеров. Физические и химические методы формирования нанокластеров. Основы формирования нанокластеров органических соединений. Применение белков, ДНК и РНК в качестве органических соединений нанокластеров для проведения измерений	10
3. Оптические методы. Спектроскопия нанокластеров. Применение конфокальной оптической микроскопии для визуализации органических соединений. Сканирующая ближнепольная оптическая микроскопия. Раман-спектроскопия нанокластеров. Методы усиления рамановского излучения: SERS, TERS	12
4. Зондовые методы. СЗМ как основной метод визуализации нанокластеров. Методы повышения разрешающей способности микроскопов при проведении микроскопии органических соединений. Сканирующая туннельная микроскопия в исследовании нанокластеров	8
5. Физические методы. Особенности применения электронных микроскопов при визуализации органических соединений. Применение ионных микроскопов	6
6. Химические методы. Применение химических методов для проведения молекулярной диагностики. Преимущества, недостатки и особенности использования химических методов для проведения исследований нанокластеров	10
7. Методы построения комплексных систем. Применение различных методов исследования нанокластеров. Средства для моделирования систем для сенсорных приложений	8
8. Биокомпьютеры. Элементная база биокомпьютеров. Реализация классических вычислительных процедур на базе биовычислителей. Сравнение методов представления данных и программ в традиционном компьютере и биокомпьютере. Свойства биокомпьютеров. Хранение информации в биокомпьютерах. Дополнение Ватсона–Крика. Модель биовычислителя на основе машины Тьюринга. «Шинная организация» в биокомпьютере. Преимущества и недостатки биомолекулярных вычислений	10

2.3.2. ПРИМЕР ОФОРМЛЕНИЯ ДИДАКТИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ ПО ЛЕКЦИЯМ

В разделе приведен типовой пример оформления дидактического материала по дисциплине «Бионанотехнология» – конспект материалов лекций, содержащих основные определения, теоретические основы физических принципов, а также примеры. Методологически курс лекций строится на основе оптимального соотношения теоретических и прикладных вопросов с реализацией проектных методов обучения. Структура материала отличается реализацией блочно-вариативной концепции и внедрением проектных методов подготовки специалистов по «Нанотехнологии».

ИССЛЕДОВАНИЕ НАНОКЛАСТЕРОВ НА МОЛЕКУЛЯРНОМ УРОВНЕ

Цель курса: изучение основных концепций и методологий исследования образований нанокластеров и молекул органических соединений на молекулярном уровне. Материал курса является основой для проектирования сложных сенсорных систем на основе ДНК-чипов и др. в курсе по проектированию сенсоров.

Решаемые задачи: получение теоретических и практических навыков работы с методами и средствами по исследованию молекулярных соединений методами оптической, зондовой микроскопии, а также разработка прикладных методик на основе уже существующих методов измерения.

Программа курса: предмет по выбору, 8 семестр

Лекции: 17 часов

Семинары: 17 часов

Домашние задания: Разработка программы и плана проведения эксперимента по исследованию нанокластеров органических соединений по варианту задания
Выдача – 9 неделя, сдача – 15 неделя.

Лабораторные работы: 17 часов

Цель лекции:

Познакомить слушателей с методами вычислений на основе ДНК, показать суть метода вычислений, а также продемонстрировать достоинства и недостатки данного метода вычислений на основе классических примеров: конечного автомата Шапиро и биокомпьютера Элдмана.

Введение

ДНК-компьютер — вычислительная система, использующая вычислительные возможности молекулы ДНК.

ДНК впервые была использована в вычислительной технике для решения «проблемы пути Гамильтона», частного случая NP-полной задачи. ДНК-компьютер имеет преимущества относительно электронных компьютеров, поскольку теоретически требует меньше электричества, занимает меньше места и более эффективен из-за возможности одновременных подсчетов. Другие задачи, например, «абстрактных машин», задача выполнимости булевых формул и вариант задачи коммивояжера были проанализированы с помощью ДНК-компьютеров. Из-за компактности ДНК она теоретически может найти применение в криптографии, где она может использоваться для конструирования одноразовых шифроблокнотов.

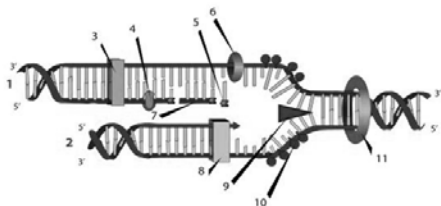
Суть метода вычислений

Основой всей системы хранения биологической информации, а стало быть, и ДНК-компьютеров, является способность атомов водорода, входящих в азотистые соединения (аденин, тимин, цитозин и гуанин), при определенных условиях притягиваться друг к другу, образуя невалентно связанные пары. С другой стороны, эти вещества могут валентно связываться с сочетаниями молекулы сахара (дезоксирибозы) и фосфата, образуя так называемые нуклеотиды. Нуклеотиды, в свою очередь, легко образуют полимеры длиной в десятки миллионов оснований. В этих супермолекулах фосфат и дезоксирибоза играют роль поддерживающей структуры (они чередуются в цепочке), а азотистые соединения кодируют информацию.

Молекула получается направленной: начинается с фосфатной группы и заканчивается дезоксирибозой. Длинные цепочки ДНК называют нитями, короткие — олигонуклеотидами. Каждой молекуле ДНК соответствует еще одна ДНК — так называемое дополнение Ватсона — Крика. Она имеет противоположную направленность, несли оригинальная молекула. В результате притяжения аденина к тимину и цитозина к гуанину получается знаменитая двойная спираль, обеспечивающая возможность удвоения ДНК при размножении клетки. Задача удвоения решается с помощью специального белка-фермента — полимеразы. Синтез начинается только если с ДНК прикреплен кусочек ее дополнения. Данное свойство активно используется в молекулярной биологии и молекулярных вычислениях. По сути своей полимеразы — это реализация машины Тьюринга, состоящая из двух лент и программируемого пульта управления. Пульта считывает данные с одной ленты, обрабатывает их по некоторому алгоритму и записывает на другую ленту. Полимераза также последовательно считывает исходные данные с одной ленты (ДНК) и на их основе формирует ленту с результатами вычислений (дополнение Ватсона — Крика).



Репликация ДНК



Схематическое изображение процесса репликации, цифрами отмечены: (1) запаздывающая нить, (2) лидирующая нить, (3) ДНК полимеразы (Pol α), (4) ДНК лигаза, (5) РНК праймер, (6) ДНК праймаза, (7) фрагмент Оказаки, (8) ДНК полимеразы (Pol δ), (9) хеликаза, (10) одиночная нить со связанными белками, (11) топоизомераза



Биокомпьютер Элдмана

В 1994 году Леонард Эдман, профессор университета Южной Калифорнии, продемонстрировал, что с помощью пробирки с ДНК можно весьма эффективно решать классическую комбинаторную «задачу о коммивояжере» (кратчайший маршрут обхода вершин графа). Классические компьютерные архитектуры требуют множества вычислений с опробованием каждого варианта.

Метод ДНК позволяет сразу сгенерировать все возможные варианты решений с помощью известных биохимических реакций. Затем возможно быстро отфильтровать именно ту молекулу, в которой закодирован нужный ответ.

Проблемы, возникающие при этом:

Требуется чрезвычайно трудоемкая серия реакций, проводимых под тщательным наблюдением.

Существует проблема масштабирования задачи.

Биокомпьютер Эдмана отыскивал оптимальный маршрут обхода для 7 вершин графа. Но чем больше вершин графа, тем больше биокомпьютеру требуется ДНК-материала.

Было подсчитано, что при масштабировании методики Эдмана для решения задачи обхода не 7 пунктов, а около 200, вес ДНК для представления всех возможных решений превысит вес нашей планеты.

Производительность данного вычислительного устройства – 100 Тфлокс.



Задача о коммивояжёре



20-mer oligonucleotide representing cities

② 5' TATCGGATCGGTATATCGGA 3'

③ 5' GCTATTCCGAGCTTAAAGCTAG 3'

④ 5' GGCTAGGTAGCCAGCATGCTT 3'

20-mer oligonucleotide representing paths between cities

②→③ 5' GATATTCGGA GCTATTCCGAG 3'

③→④ 5' CTTAAAGCTAGGCTAGGTAG 3'

DNA representation of the path from city 2 → city 3 → city 4

②→③ ③→④

5' GATATTCGGA GCTATTCCGAGCTTAAAGCTAGGCTAGGTAG 3'

3' GGATAAGGTCCTAATTCGAT 5'

③ complement of ③

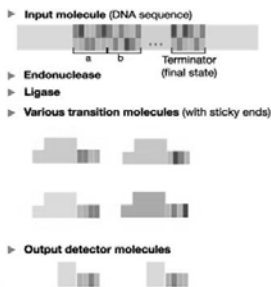


Конечный биоавтомат Шапиро

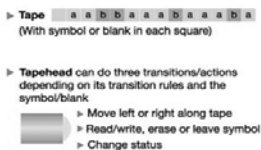
Конечный биоавтомат Шапиро — технология многоцепочечного ДНК-компьютера, разработанная израильским профессором Эхудом Шапиро из Вейцмановского института.

Его основой являются уже известные свойства биомолекул, таких как ДНК и ферменты. Функционирование ДНК-компьютера сходно с функционированием теоретического устройства, известного в математике как «конечный автомат» или машина Тьюринга.

Molecular finite automaton



Turing machine



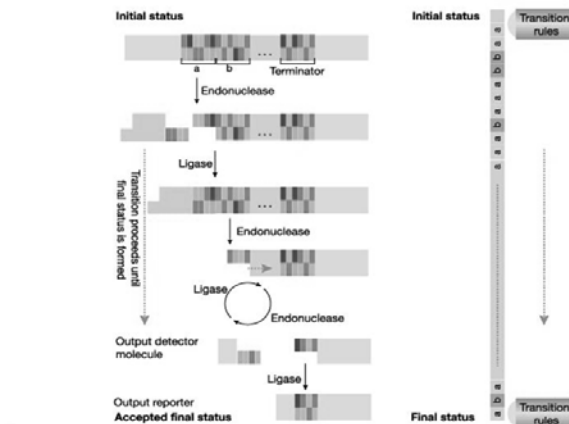
► Transition rules or action table

Example

Status	Symbol	Transition rules
Status 0	A	Move right, change to status 1
Status 0	B	Move right, ...
Status 1	A	..., ...
..., Halt

MITU
на ИСЭ. Бузунак

Конечный биоавтомат Шапиро



MITU
на ИСЭ. Бузунак

«Исследование нанокластеров на молекулярном уровне»

Лекция №1 Вычисления на основе ДНК

Основные выводы:

Главным свойством биокомпьютеров является то, что каждая их клетка - миниатюрная химическая лаборатория. Если биоорганизм запрограммирован, то он просто производит нужные вещества.

Результат = синтезированное вещество

Преимущества:

- огромная параллельность
- малые габаритные размеры
- высокая производительность

Недостатки:

- Сложность и трудоемкость выполняемых операций
- Ошибки в вычислениях
- Тенденция ДНК к распаду

"We shouldn't be looking for competition with traditional machines, we should be looking outside the box for a niche for other applications." - Martyn Amos, University of Exeter, UK

«Исследование нанокластеров на молекулярном уровне»

Лекция №2 Комплексный метод исследования нанокластеров

Цель лекции:

На данной лекции рассматриваются основные принципы построения комплексного метода исследования нанокластеров, показываются его преимущества и недостатки.

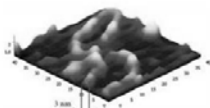
Освещены вопросы построения интеллектуального комплекса на базе этого метода.



Рабочая камера прибора



Кантильвер



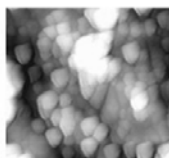
СЗМ изображения ДНК

Объектом исследования в данной работе является биологическое взаимодействие между поверхностью кантильвера и раствором исследуемого биологического объекта, а также методы взвешивания пристыкованной массы с точностью 10^{-11} кг.

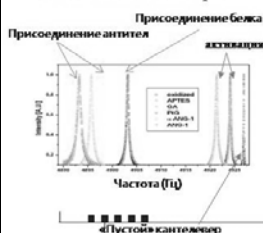
Цель работы – создание интеллектуального аппаратно-программного комплекса на основе зондовой микроскопии для решения задач молекулярной диагностики:

- прямой визуализации белков, структуры и свойств клеточных мембран
- прямой визуализации ДНК
- прямой визуализации отдельных вирусов.

Возможности и применение комплекса



Исследуемый образец в виде полигональных нанокластеров



АПК клеточной диагностики может быть использован:

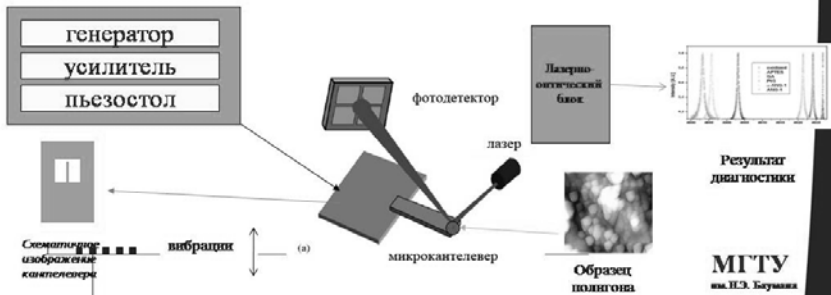
- для диагностики рака и других злокачественных образований
- проведения исследования органических соединений
- исследования свойств зубной эмали и микропленок
- определения вирусов в реальном времени.

Например: При проведении рамановской спектроскопии вирусной ДНК или РНК на поверхности полигонов нанокластеров сдвиг частот отличается для каждой конкретной последовательности ДНК или РНК, что даст возможность провести идентификацию вируса с использованием его генетического кода.

В дальнейшем предполагается расширить возможности метода и освоить идентификацию бактерий, токсинов и других веществ.

Принципы построения АПК

Измерения проводятся при помощи пьезостолка, находящегося в вакуумной камере. На кантилевер падает луч лазера, отражаясь от его поверхности и попадая на ИГС. Для точного позиционирования лазера используется оптический микроскоп. При помощи генератора задающей частоты на столлик подаются вибрации в заданном диапазоне и с заданным шагом изменения частоты. При достижении резонансной частоты кантилевер начинает совершать колебания с более высокой амплитудой, что регистрируется повышенным напряжением на фотодетекторе. После прохождения биологической активации снова измеряется резонансная частота. При увеличении массы кантилевера его резонансная частота уменьшается, таким образом при можно измерить пристыкованную массу и точно идентифицировать присоединенное вещество.

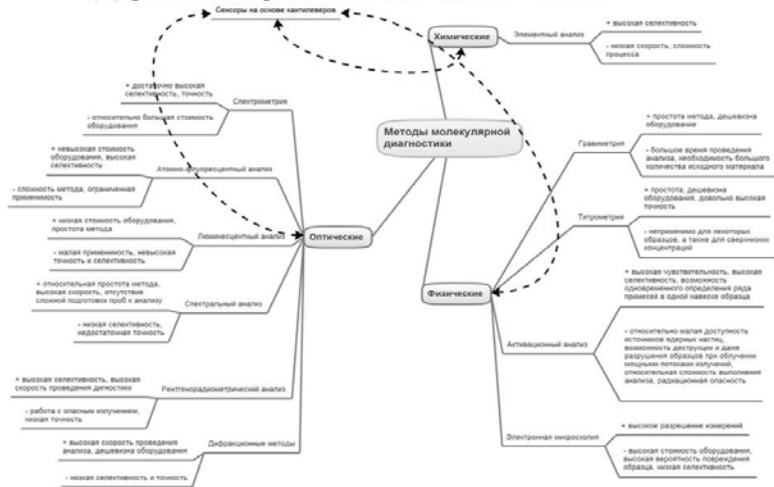


Методы молекулярной диагностики

Методы молекулярной диагностики

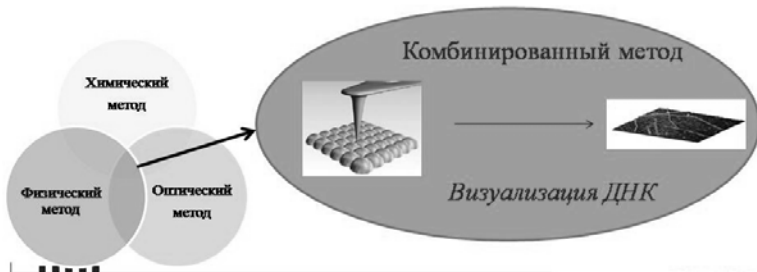
Химические	Оптические	Физические	Комбинированный метод
<p><i>Наборы реагентов</i> <i>ДНК-зонды</i></p> <p>Химические методы основаны на применении определённого набора реагентов для определения состава и массы вещества</p>	<p><i>Профилетры</i> <i>Спектрометры</i></p> <p>Оптические методы используют свойства молекул, связанные с искажением параметров света, проходящих через них</p>	<p><i>Зондовые микроскопы</i> <i>Электронные микроскопы</i></p> <p>Физические методы основаны на применении различных физических эффектов и явлений для получения информации об изучаемом объекте</p>	<p><i>Единичные лабораторные приборы</i></p> <p>Данный метод находится на стадии развития, приборы создаются в исследовательских лабораториях для конкретных задач.</p>

«Дорожная карта» методов диагностики



Преимущества комплексного метода

Важным свойством представленного в проекте АПК является комбинирование физических, оптических и химических методов. В случае применения метода молекулярной диагностики на основе зондовой микроскопии повышается как точность получаемых результатов, так и их достоверность. Это происходит за счет применения сигнальных зондов, точность которых заметно выше, а также полигонов, позволяющих значительно усилить принимаемый сигнал.



Химическая активация

Химическая активация заключается в подготовке поверхности микрокантеливера для присоединения белков и антител. Она заключается в термическом окислении лицевой поверхности, на которую наносится APTES и GA, а на тыльную часть - NaBH_3CN .

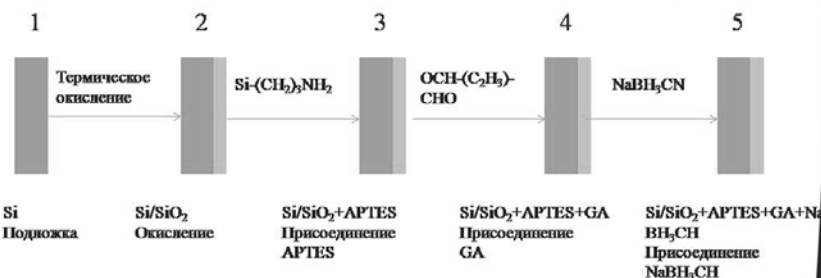
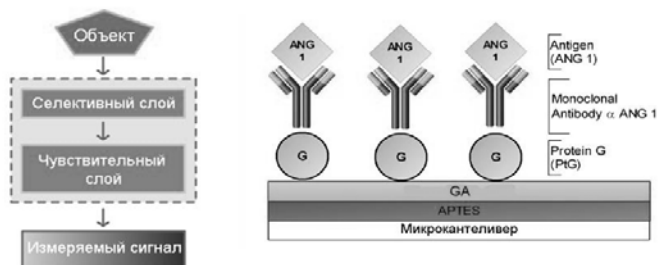
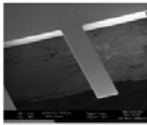


Схема взаимодействия

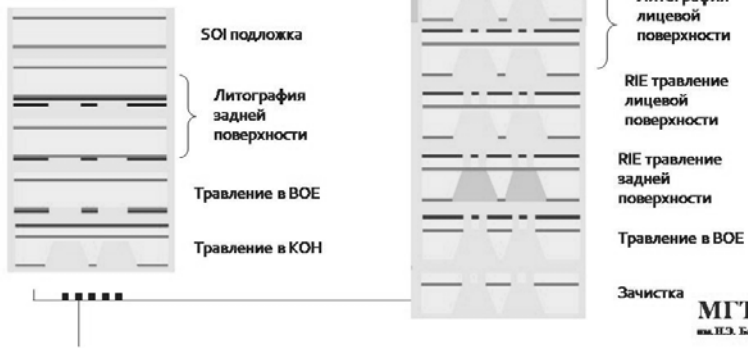
На рисунке представлена схема взаимодействия белка и антитела. Суть эксперимента заключается в создании таких условий присоединения антител, при которых будет проходить реакция лишь на исследуемое антитело, что позволит с высокой точностью определять его массу.



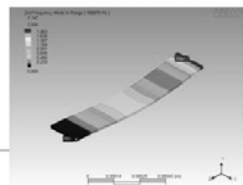
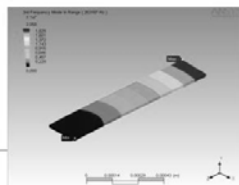
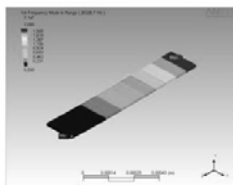
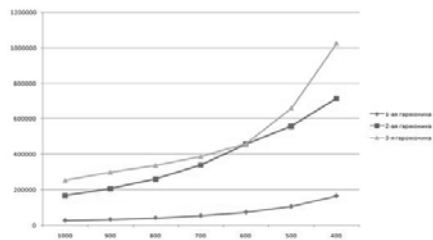
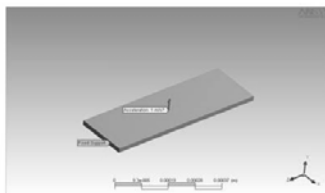
Микрокантеливеры



Ниже приведена схема получения массива микрокантеливеров. Применяется литография, химическое травление и реактивно-ионное травление.



Моделирование



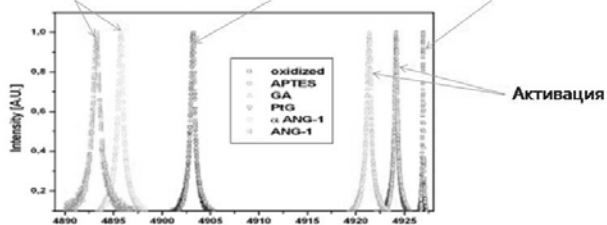
Измерения

В данном проекте ставится цель получить надёжный метод измерения биологической массы, вступившей в реакцию с известным веществом. В проекте в качестве известного вещества использовался белок, к которому присоединились антитела. При помощи данного метода возможно измерить массу до 10^{-11} кг.

Присоединение антител

Присоединение белка

«Пустой» кантилевер



Активация

$$M = \frac{1}{4\pi} \left(\frac{1}{4903^2} - \frac{1}{4927.5^2} \right) = 1,6 \times 10^{-11} \text{ кг}$$

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В рамках проекта, руководствуясь единой концепцией, созданы методические материалы по дисциплине «Бионанотехнология», которые содержат нормативную базу дисциплины, рекомендации по организации и проведению лекций и лабораторных работ, перечень слайдов, типовых плакатов и другие дидактические материалы для работы профессорско-преподавательского состава по данной дисциплине.

Цель дисциплины – изучение основных вопросов, связанных с биотехнологиями и биоМЭМС/биоНЭМС, их функциональным составом, принципом работы и областями применения. Материал курса является основой для изучения и применения методов разработки биоМЭМС/биоНЭМС при выполнении исследовательской части курсового проекта, квалификационной работы и дипломного проекта.

Задачи дисциплины – получение теоретических и практических навыков, направленных на понимание принципов работы наносистем биомедицинского назначения и биоконструкций, лежащих в их основе.

Методологически дисциплина должна строиться на основе оптимального соотношения теоретических и прикладных вопросов с обязательным участием студентов в самостоятельном исследовании различных видов биоМЭМС/биоНЭМС путем проектирования с целью выбора типа устройства, в наибольшей степени отвечающего заданным требованиям эксплуатации, и определения его технических параметров и режимов работы и моделирования с целью проведения анализа функциональности и оптимизации конструкции на ранних этапах проектирования.

Содержание соответствующих тем разделов разработано таким образом, что теоретические основы работы биоконструкций наносистем, а также физических явлений, лежащих в основе биоМЭМС, показаны в общем виде с приведением ссылок на дополнительные материалы в случае необходимости. Таким образом,

с одной стороны, материал не перегружен сложными теоретическими обоснованиями тех или иных процессов, а с другой – наличие дополнительных материалов способствует формированию у студента фундаментальных системных знаний, развивает в нем творческие способности будущего специалиста.

Прикладные вопросы должны ориентировать студентов на решение типовых задач анализа конструктивных реализаций и функционального состава современных биоМЭМС/биоНЭМС; проведения качественной оценки и выбора оптимальных биокомпонентов наносистем, удовлетворяющих заданным требованиям; применения принципов проектирования и моделирования МЭМС/НЭМС для систем биомедицинского назначения, а также оптимизации конструкции и поиска альтернативных решений задачи проектирования биокомпонентов наносистем по критерию выходных параметров и функциональному назначению. Поэтому во всех разделах предусмотрены темы, содержание которых связано с формированием и развитием у будущих специалистов практических навыков решения задач с использованием ЭВМ, САПР.

В основу методических материалов по дисциплине «Бионаноинженерия» положены курсы, читаемые авторами в МГТУ им. Н. Э. Баумана.

Материалы учебно-методического комплекса соответствуют программам подготовки по специальности «Наноинженерия и микросистемная техника», реализуемым в МГТУ им. Н. Э. Баумана. Они разработаны с привлечением и в кооперации с НИИСИ РАН, ИРЭ РАН, РНЦ «Курчатовский институт», ФТИАН РАН и другими предприятиями ННС. Структура и состав учебно-методического обеспечения соответствует требованиям федеральных законов от 10.07.1992 г. № 3266-1-ФЗ «Об образовании» (с изменениями и дополнениями) и от 22.08.1996 г. № 125-ФЗ «О высшем и послевузовском профессиональном образовании» (с изменениями и дополнениями), а также Типового положения об образовательном учреждении высшего профессионального образования (высшем учебном заведении), утвержденного постановлением Правительства РФ от 14 февраля 2008 г. № 71.

ЛИТЕРАТУРА

1. Автоматизированный расчет поля электрических аппаратов методом вторичных источников / А. К. Александров [и др.]. – М. : МЭИ, 1994.
2. *Алексеева Т. А., Теплицкая Т. А.* Спектрофлуориметрические методы анализа ароматических углеводородов в природных и техногенных средах. – Л., 1981.
3. *Андриевский Р. А., Рагуля А. В.* Наноструктурные материалы. – М. : Академия, 2005. – 192 с.
4. *Варфоломеев С. Д.* // СОЖ. – 1997. – № 1. – С. 45–49.
5. *Власов А. И., Елсуков К. А., Шахнов В. А.* Интеллектуальный комплекс молекулярной диагностики // Альманах современной науки и образования. Математика, физика, строительство, архитектура, технические науки и методика их преподавания. – 2008. – № 7(14). – С. 43–45.
6. *Власов А. И., Елсуков К. А., Шахнов В. А.* Программно-технический комплекс молекулярной диагностики // VII Международная конференция «Неразрушающий контроль и техническая диагностика в промышленности»: Тезисы докладов. Москва. 11–13 марта 2008 г. – М. : Машиностроение, 2008. – С. 165–167.
7. *Вудраф Д., Делчар Т.* Современные методы исследования поверхности. – М. : Мир, 1989.
8. *Головин Ю. И.* Введение в нанотехнологию. – М. : Машиностроение-1, 2003. – 112 с.
9. *Головина А. П., Левшин Л. В.* Химический люминесцентный анализ неорганических веществ. – М., 1978.
10. *Елсуков К. А., Елсукова А. А.* Интеллектуальный комплекс молекулярной диагностики // Международная молодежная научно-техническая конференция «Наукоемкие технологии и интеллектуальные системы – 2008»: Сборник научных трудов. Москва. 16 апреля 2008 г.
11. *Ельяшевич М. А.* Атомная и молекулярная спектроскопия. – М., 2001.

12. *Зайдель А. Н.* Атомно-флюоресцентный анализ. Физические основы метода. – М., 1980.
13. Иммунология / Под ред. У. Пол. – М. : Мир, 1989.
14. *Карякин А. А.* [и др.] // Сенсор. – 2002. – № 1. – С. 16–23.
15. *Карякин А. В.* p-Электроны гетероатомов в водородной связи и люминесценции. – М., 1985.
16. *Кузнецов Р. А.* Активационный анализ. – М., 1967.
17. *Мейтис Я.* Введение в курс химического равновесия и кинетики / Пер. с англ. – М., 1984.
18. Методики СЗМ // NT MDT (Электронный документ по адресу <http://www.ntmdt.ru/spm-basics/view/cantilever>).
19. Методы количественного органического элементного микроанализа / Под ред. Н. Э. Гельман. – М., 1987.
20. *Миронов В. Л.* Основы сканирующей зондовой микроскопии. – Нижний Новгород : РАН ИФМ, 2004. – 114 с.
21. *Моррисон С.* Химическая физика поверхности твердого тела. – М. : Мир, 1989.
22. *Неволин В. К.* Зондовые нанотехнологии в электронике. – М. : Техносфера, 2005. – 152 с.
23. *Нестеров Ю. И., Власов А. И., Першин Б. Н.* Виртуальный измерительный комплекс // Датчики и системы. – 2000. – № 4. – С. 12–22.
24. *Остапенко М.* Что делать с винилом? (Электронный документ по адресу <http://v-nagaev.narod.ru/DOCUM/vimag.htm>).
25. *Паркер С.* Фотолюминесценция растворов / Пер. с англ. – М., 1972.
26. *Петерс Д., Хайес Дж., Хифтье Г.* Химическое разделение и измерение. Теория и практика аналитической химии / Пер. с англ. – Кн. 1, 2. – М., 1978.
27. *Плаксин И. Н., Старчик Л. П.* Ядерно-физические методы контроля вещественного состава. Ядерные реакции и активационный анализ. – М., 1966.
28. *Полянский А. А.* Через кожу? – Нет проблем! Несколько слов о косметике будущего // Косметика и медицина. – 2008. – № 2. – С. 20–24.
29. *Помогайло А. Д., Розенберг А. С., Уфлянд И. Е.* Наночастицы металлов в полимерах. – М. : Химия, 2000. – 672 с.
30. Применение методов МКЭ и МГЭ при сеточном моделировании объектов типа среда–структура / В. А. Барат [и др.] // Молодежная научно-техническая конференция «Наукоемкие технологии и интеллектуальные системы в XXI веке»: Сборник научных трудов. Москва. 16–17 марта 2000 г. – С. 130–145.

31. Рыков С. А. Сканирующая зондовая микроскопия полупроводниковых материалов и наноструктур. – СПб. : Наука, 2001.
32. Сабоннадьер Ж.-К., Кулон Ж.-Л. Метод конечных элементов и САПР. – М. : Мир, 1989.
33. Сергеев Г. Б. Нанохимия. – М. : МГУ, 2003. – 288 с.
34. СЗМ методики (Материалы сайта ru.ntmdt.ru - <http://ru.ntmdt.ru/SPM-Techniques/>).
35. Сильвестр П., Феррари Р. Метод конечных элементов для радиоинженеров и инженеров-электриков. – М. : Мир, 1986.
36. Скуг Д., Уэст Д. Основы аналитической химии / Пер. с англ. – Т. 1. – М., 1979.
37. Тейлор Д. Нейтронное излучение и активационный анализ / Пер. с англ. – М., 1965.
38. Тейлор Д., Грин Н., Стаут У. Биология. В 3-х томах / Пер. с англ. Ю. Амченков, И. Еланская, Н. Фомина. – М. : Мир, 2006.
39. Тихомиров Ю. Программирование трехмерной графики. – СПб. : БХВ-Санкт-Петербург, 1999.
40. Физика наноразмерных систем / А. Я. Шик [и др.] // Под. ред. А. Я. Шика. – СПб. : Наука, 2001. – 160 с.
41. Фрайден Дж. Современные датчики. Справочник / Пер. с англ. Ю. А. Заболотная; ред. пер. Е. Л. Свинцов. – М. : Техносфера, 2006.
42. Эггинс Б. Химические и биологические сенсоры / Пер. с англ. М. А. Слинкин, Т. М. Зиминая, В. В. Лучинин. – М. : Техносфера, 2005.
43. Adv. Drug Deliv. – 2004. – Rev. 56: 145.
44. Albers J. [et al.] // Anal. Bioanal. Chem. – 2003. – P. 521–527.
45. Andersson K., Hämmäläinen M., Malmqvist M. // Anal. Chem. – 1999. – № 71. – P. 2475–2481.
46. Appl. Phys. Lett. – 2004. – V. 84. – № 11.
47. Biomedical Nanotechnology / Edited by N. H. Malsch. – CRC Press, 2005.
48. BioMEMS and Biomedical Nanotechnology. Volume 3. Therapeutic Micro/Nanotechnology / Edited by M. Ferrari. – Springer, 2006.
49. BioMEMS: Technologies and Applications / Edited by W. Wang, S. A. Soper. – CRC Press, 2007.
50. Braun T. [et al.]. Micromechanical mass sensors for biomolecular detection in a physiological environment // Phys. Rev. E. – 2005. – № 2.

51. *Brockman J. M., Frutos A. G., Corn R. M.* // J. Am. Chem. Soc. – 1999. – № 121. – P. 8044–8051.
52. *Campàs M., Katakis I.* // Trends Anal Chem. – 2004. – V. 23. – № 1. – P. 49–62.
53. Chemistry & Biology. – 2001. – № 8. – P. 105–115.
54. *Dobelle W. H.* Artificial vision for the blind by connecting a television camera to the visual cortex // ASAIO Journal. – 2000. – № 46. – P. 3–9.
55. *Drummond T. G., Hill M. G., Barton J. K.* // Nature Biotechnology. – 2003. – V. 21. – № 10. – P. 1192–1199.
56. *Ekinci K. L., Yang Y. T., Roukes M. L.* Ultimate limits to inertial mass sensing based upon nanoelectromechanical systems // J. Appl. Phys. – 2004. – V. 95. – № 5.
57. Electrophoresis. – 2002. – № 23. – 1531–1536.
58. *Enderle J., Blanchard S. M., Bronzino J.* Introduction to Biomedical Engineering, Second Edition. – Elsevier Academic Press, 2005.
59. EURASNET Consortium Evaluates the Performance of Different Microarrays for Studying Alternative Splicing (электронный документ по адресу www.affymetrix.com).
60. *Ferrari M.* // Nature. – 2005. – № 5. – P. 161.
61. *Fiaccabrino G. C.* [et al.] // Analytica Chimica Acta. – 1998. – № 359. – P. 263–267.
62. *Goodsell D. S.* Bionanotechnology. Lessons from Nature. – Wiley-Liss, Inc., 2004.
63. *Greiner A.* [et al.] // Appl. Microbiol Biotechnol. – 2006. – № 71. – P. 387–393.
64. *Harms H., Wells M. C., Meer J. R.* // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 2006. – № 70. – P. 273–280.
65. *Hossain* [et al.]. Artificial means for restoring vision // BMJ. – 2005. – V. 330.
66. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pbio.0030234>.
67. *James D.* [et al.] // Microchim. Acta. – 2005. – № 149. – P. 1–17.
68. *Junhui Z., Hong C., Ruifu Y.* // Biotechnology Advances. – 1997. – V. 15. – № 1. – P. 43–58.
69. *Lang H. P.* [et al.]. GuEntnerodt An artificial nose based on a micromechanical cantilever array // Analytica Chimica Acta. – 1999. – № 393. – P. 59–65.
70. *Li M., Tang H. X., Roukes M. L.* // Nature Nanotechnology. – № 2. – P. 114–128.

71. *Lojou É., Bianco P.* // J. Electroceram. – 2006. – № 16. – P. 79–91.
72. *Marco M.-P., Barcel D.* // Meas. Sci. Technol. – 1996. – № 7. – P. 1547–1562.
73. MEMS/NEMS – Handbook Techniques and Applications. Volume 5. Medical applications of MEMS/NEMS and MOEMS / Edited by C. T. Leondes. – Springer, 2006.
74. Nanomaterials and Nanosystems for Biomedical Applications / Edited by M. R. Mozafari. – Springer, 2007.
75. Nanomaterials. Synthesis, Properties and Applications / Eds. A. S. Edelstein, R. C. Cammarata. – Bristol : Institute of Physics Publishing, 1998. – 596 p.
76. Nat. Mater. – 2003. – № 2. – P. 767–772.
77. Nature. – 1999. – № 397. – P. 335–338.
78. *Ono T.* [et al.]. Mass sensing of adsorbed molecules in sub-picogram sample with ultrathin silicon resonator // Rev. Sci. Instrum. – 2003. – V. 74. – № 3. – P. 1240–1243.
79. *Saliterman S. S.* Fundamentals of BioMEMS and Medical Microdevices // SPIE Publications, 2006.
80. *Scouten W. H., Loung J. H. T., Brown R. S.* // Trends in biotechnology. – 1995. – V. 13. – P. 178–185.
81. Series «Methods of Experimental Physics». Volume 22. Solid State Physics: Surfaces / Edited by P. L. Park, M. G. Lagally. – Academic Press, 1985.
82. *Steel A. B., Herne T. M., Tarlov M. J.* // Anal. Chem. – 1998. – № 70. – P. 4670–4677.
83. *Stoney G. G.* // Proc. R. Soc., Lond. Ser. – 1909. – A. 82.
84. *Strick T. R.* [et al.] // Science. – 1996. – № 271(5257). – P. 1835-7.
85. *Su Y.* [et al.]. A Water-Powered Micro Drug Delivery System // JMEMS. – 2004. – V. 13. – № 1.
86. The Biomedical Engineering Handbook. Second Edition / Edited by J. D. Bronzino. – CRC Press, 1999.
87. *Turner P. F.* // Science. – 2000. – V. 290. – № 5495. – P. 1315–1317.
88. *Varaart C.* [et al.]. Visual sensations produced by optic nerve stimulation using an implanted self sizing spiral cuff electrode // Brain Res. – 1998. – № 813(1). – P. 181–186.
89. *Wise K. D.* [et al.]. Wireless Implantable Microsystems: High-Density Electronic Interfaces to the Nervous System // Proceedings of the IEEE. – 2004. – V. 92. – № 1.

90. Woolley [et al.] // *Anal. Chem.* – 1996. – № 68(23). – P. 4081-6.
91. www.biosensoracademy.ru.
92. Xu F. [et al.] // *J. Am. Chem. Soc.* – 2005. – V. 9. – № 38. – P. 13084–13085.
93. Yarin L. [et al.] // *Journal of Materials Chemistry.* – 2007. – № 17. – P. 2585–2599.
94. Zhang, Manz // *Anal. Chem.* – 2003. – № 75. – P. 5759–5766.

СОДЕРЖАНИЕ

ПРЕДИСЛОВИЕ	5
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	7
ВВЕДЕНИЕ	10
1. КОНСПЕКТ ЛЕКЦИЙ	12
1.1. ОСНОВЫ БИОНАНОИНЖЕНЕРИИ	12
1.2. МЕТОДЫ ФОРМИРОВАНИЯ ОРГАНИЧЕСКИХ НАНОКЛАСТЕРОВ	15
1.3. СИСТЕМАТИЗАЦИЯ И КЛАССИФИКАЦИЯ МЕТОДОВ ИССЛЕДОВАНИЯ НАНОКЛАСТЕРОВ	20
1.3.1. Сравнительная характеристика методов молекулярной диагностики	20
1.3.2. Концепция комплексного метода и его преимущества.....	28
1.3.3. Принципы построения АПК на основе комплексного метода	29
1.3.4. Анализ конструктивной реализации кантилеверов.....	30
1.3.5. Анализ применения кантилеверов в молекулярной диагностике.....	37
1.3.6. Применение кантилеверов в биосенсорах.....	39
1.4. МАТЕМАТИЧЕСКОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ ПРОЦЕССА МОЛЕКУЛЯРНОЙ ДИАГНОСТИКИ	41
1.4.1. Взвешивание микроскопических объектов.....	41
1.4.2. Аналитические характеристики и распознающие элементы биосенсоров	43
1.4.3. Характеристики биосенсоров.....	45
1.4.4. Распознающие элементы	46
1.4.5. Модели кантилеверов и их оценка.....	51
1.4.6. Моделирование частотных характеристик кантилеверов.....	63
1.5. БИОКОМПЬЮТЕРЫ	79
1.5.1. ДНК-вычисления.....	79
1.5.2. Биоинформатика.....	94
1.5.3. Биоалгоритмика.....	95
1.6. ВВЕДЕНИЕ В БИОМЭМС. МИКРОФЛЮИДИКА.....	97
1.7. ОСНОВЫ ЖИЗНИ.....	105

1.8. ОСНОВЫ БИОДАТЧИКОВ	123
1.9. ПРОТЕИНОВЫЕ И ДНК-МИКРОЧИПЫ.....	133
1.10. НАНОБИОТЕХНОЛОГИИ	149
1.11. ДОСТАВКА ЛЕКАРСТВ И ИМПЛАНТИРУЕМЫЕ УСТРОЙСТВА	158
1.12. МИКРОЭЛЕКТРОДЫ.....	171
2. МЕТОДИЧЕСКИЕ МАТЕРИАЛЫ.....	183
2.1. НОРМАТИВНАЯ ДОКУМЕНТАЦИЯ ПО ДИСЦИПЛИНЕ	183
2.1.1. Учебно-методический комплекс по дисциплине.....	183
2.1.2. Примерная базовая программа дисциплины.....	188
2.2. СТРУКТУРА И СОСТАВ ФОНДОВ ОЦЕНОЧНЫХ СРЕДСТВ ПО ДИСЦИПЛИНЕ.....	195
2.2.1. Перечень вопросов для рейтинговых и контрольных мероприятий	195
2.2.2. Варианты экзаменационных билетов	196
2.3. СПЕЦИФИКАЦИЯ УЧЕБНЫХ ВИДЕО- И АУДИОМАТЕРИАЛОВ, СЛАЙДОВ, ЭСКИЗОВ ПЛАКАТОВ И ДРУГИХ ДИДАКТИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ	198
2.3.1. Спецификация слайдов – конспектов лекций.....	198
2.3.2. Пример оформления дидактических материалов по лекциям	199
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	211
ЛИТЕРАТУРА.....	213

Учебно-методический комплекс
по тематическому направлению деятельности
ННС «Наноинженерия»

Андрей Игоревич **Власов**
Алексей Алексеевич **Денисов**
Кирилл Андреевич **Елсуков**

БИОНАНОИНЖЕНЕРИЯ

Редакторы *С. Н. Капранов, К. Ю. Савинченко*
Технические редакторы *М. Р. Фишер, А. Л. Репкин*
Корректор *Т. В. Тимофеева*
Компьютерная графика *М. Р. Фишер, Т. Н. Нечиталюк,*
К. Ю. Савинченко, А. Ю. Тимофеев
Дизайн обложки *М. Р. Фишер*

Оригинал-макет подготовлен
в редакционно-издательском отделе КФ МГТУ им. Н. Э. Баумана.
Тел. 8-4842-57-31-87

Подписано в печать 22.06.2011. Формат 60×90/16. Бумага офсетная.
Усл. печ. л. 14. Тираж 500 экз. Заказ №

Издательство МГТУ им. Н. Э. Баумана
105005, Москва, 2-я Бауманская, 5.
E-mail: press@bmstu.ru
<http://www.press.bmstu.ru>

Отпечатано в типографии МГТУ им. Н. Э. Баумана
105005, Москва, 2-я Бауманская, 5.
Тел.: 8-499-263-62-01

