

Диагностика вирусов с использованием интерференционных пленок Фабри-Перо макропористого кремния

© К.А. Гончар,¹ Н.Ю. Саушкин,² И.И. Циняйкин,¹ А.А. Елисеев,^{2,3} А.С. Гамбарян,⁴ Ж.В. Самсонова,² Л.А. Осминкина¹✉

¹ Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, физический факультет, 119991 Москва, Россия

² Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, химический факультет, 119991 Москва, Россия

³ Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, факультет наук о материалах, 119991 Москва, Россия

⁴ Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов имени М.П. Чумакова РАН, 108819 Москва, Россия

e-mail: osminkina@physics.msu.ru

Поступила в редакцию 28.04.2023 г.

В окончательной редакции 31.07.2023 г.

Принята к публикации 28.09.2023 г.

На примере вируса гриппа А продемонстрирована возможность обнаружения вирусов по изменениям в спектрах полного отражения пленок макропористого кремния (макро-ПК). Пленки макро-ПК с диаметром пор около 100 нм изготавливали электрохимическим травлением подложек кристаллического кремния. Пористость макро-ПК, рассчитанная с помощью модели эффективной среды Бруггемана, составила 75%. Методом электронной микроскопии показано, что такие высокопористые пленки адсорбируют 50–100 нм вирусы на своей поверхности и в порах. При этом эффективность адсорбции значительно увеличивается после функционализации поверхности наноструктур моноклональными антителами, обеспечивающими специфическое связывание вирусов. Спектры отражения макро-ПК демонстрируют серию интерференционных полос, амплитуда которых резко изменяется при адсорбции вирусов. Полученные результаты демонстрируют возможность простого и эффективного оптического метода диагностики вирусов с использованием интерференции Фабри-Перо в пленках макро-ПК.

Ключевые слова: пористый кремний, интерференция, сенсор, антитела, вирусы.

DOI: 10.61011/OS.2023.09.56617.4933-23

1. Введение

Оптическая биосенсорика имеет значительные преимущества по сравнению с другими аналитическими методами благодаря хорошей чувствительности, удобству и простоте использования, воспроизводимости и надежности. Для преобразования сигнала в оптических датчиках можно использовать приемы интерферометрии, поверхностного плазмонного резонанса, дифракционной решетки фотонных кристаллов, преобразователей на основе оптических волноводов, эллипсометрии и т. д. [1].

В настоящее время тонкие пленки пористого кремния (ПК), полученные электрохимическим травлением монокристаллического кремния, с их огромной площадью поверхности активно используются для создания различных оптических сенсоров [2]. Пористый кремний принято классифицировать в соответствии с принципом IUPAC (International union of pure and applied chemistry), который определяет тип пористого материала в зависимости от размера пор: микро-ПК для пор диаметром ≤ 2 нм, мезо-ПК для пор диаметром 2–50 нм, макро-ПК для пор диаметром ≥ 50 нм [3]. Принцип передачи сигнала может быть основан на таких важных харак-

теристиках ПК, как чувствительность его фотолуминесцентных свойств к составу поверхности [4], когда адсорбция химических [4,5] или биологических молекул [6] приводит к изменению интенсивности и времени жизни фотолуминесценции. Недавно было показано, что пористые кремниевые нанонити можно использовать в качестве чувствительного элемента оптического сенсора на кислород [7].

Однако наиболее распространенные оптические датчики основаны на интерференции света, возникающей в тонких пленках ПК различной морфологии [8]. Принцип действия такого датчика заключается в том, что освещение тонких пленок ПК белым светом приводит к отражению от границ раздела среда-ПК и ПК-кристаллический кремний (с-Si), создавая интерференционную картину, называемую полосами Фабри–Перо и определяемую эффективной оптической толщиной пленки [8,9]. Изменение эффективного показателя преломления слоя ПК после адсорбции биологических молекул и клеток проявляется в сдвиге интерференционных полос и/или изменении их интенсивности [8–12]. Одним из основных преимуществ ПК по сравнению с планарными оптическими преобразователями является их способность разделять

различные аналиты, используя морфологические характеристики полученных пористых пленок. В то время как целые клетки и микроорганизмы не попадают в поры и могут быть иммобилизованы только на поверхности ПК, молекулы малых размеров проникают внутрь пор ПК [2]. Также была продемонстрирована возможность усиления оптического сигнала сенсора с помощью специальных квантовых точек, введенных в матрицу слоя ПК для обнаружения молекул биотина [13]. Было показано, что тонкие пленки ПК можно использовать в качестве оптического преобразователя для отслеживания изменений в спектре отражения при связывании определенных бактерий [14]. Установлена возможность использования конъюгированных с антителами окисленного ПК для оптического обнаружения бактерий с помощью подхода „прямого захвата клеток“ [14,15]. Кроме того, было впервые продемонстрировано неспецифическое связывание вирусов с поверхностью наноструктур из массивов кремниевых нанонитей и показана возможность использования этого эффекта для изготовления неспецифического оптического [16] и импеданс-сенсора [17] для диагностики вирусов.

Целью настоящей работы являлось изучение возможности детектирования вирусов на примере вируса гриппа А с использованием в качестве сенсорных элементов наноструктурированных пленок Фабри–Перо макро-ПК при неспецифическом и специфическом связывании вирусов. Для этого была разработана методика получения пленок макропористого кремния с порами диаметром около 100 nm, исследована морфология полученных наноструктур, разработана методика функционализации пленок моноклональными антителами к вирусам и исследовано изменение в спектрах интерференции после адсорбции вирусов на примере вируса гриппа А.

2. Методика эксперимента

2.1. Синтез наноструктур

Пленки макро-ПК были получены электрохимическим травлением подложек *c*-Si проводимости *p*-типа с кристаллографической ориентацией (100) и удельным сопротивлением 1–5 мΩ·см в растворе плавиковой кислоты (HF) и этанола (C₂H₅OH) в соотношении 1 : 3 в тефлоновой ячейке при плотности тока травления 50 mA/cm². Исходные пластины *c*-Si перед травлением были очищены от поверхностного оксида путём погружения в 5M HF. Для получения однородных пленок макро-ПК использовали метод „жертвенного травления“ [18]. Для этого первый протравленный в течение 30 с пористый слой удалялся с поверхности *c*-Si путем погружения подложки с пленкой в раствор 2M NaOH на 2 min. Затем подложка *c*-Si промывалась в дистиллированной воде и вновь травилась в растворе HF:C₂H₅OH в соотношении 1 : 3 2–3 min, где происходило итоговое формирование пленки макро-ПК.

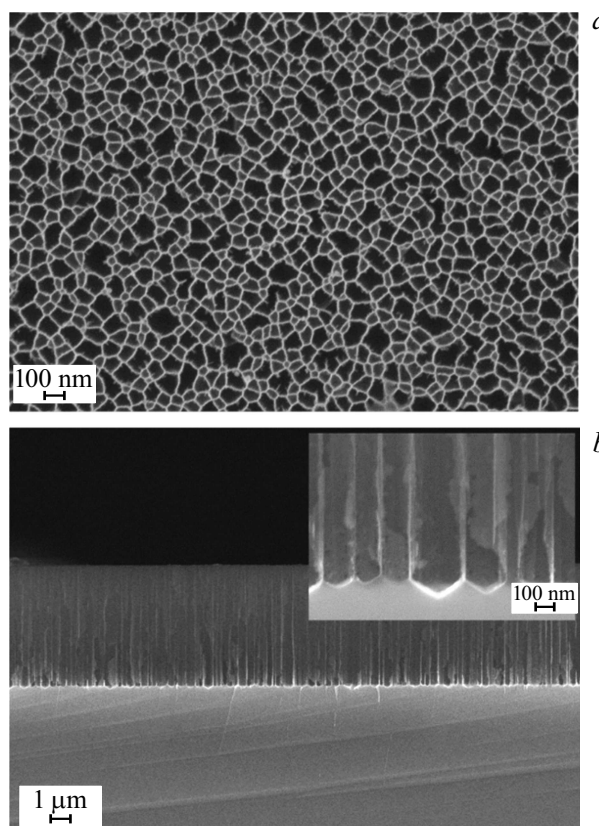


Рис. 1. Микрофотографии РЭМ образца ПК: (а) вид сверху, (б) вид сбоку (на вставке представлена увеличенная область).

2.2. Неспецифическое и специфическое связывание вируса гриппа А с поверхностью наноструктур

В работе использовали вирус гриппа А (New Caledonia/20/99(H1N1)). При неспецифическом связывании вирусов с макро-ПК образцы инкубировали в физиологическом растворе (ФР, 0.9% раствор NaCl в воде), содержащем 50 μg/ml вируса гриппа А, в течение 1 h. Затем пленки промывали 3 раза по 1 min в ФР с 0.05% Твин-20 и высушивали в сушильном шкафу Binder при 37°C.

Для специфического связывания вирусов разработана методика функционализации макро-ПК моноклональными антителами. Использовали моноклональные антитела к гемагглютинину H1 вируса гриппа А (клон IA139) (Хайтест, Москва), 3-аминопропилтриэтоксисилан (APTES, Sigma-Aldrich) и глутаровый альдегид (25%, Sigma-Aldrich). Образцы макро-ПК инкубировали в течение 30 min в перекиси водорода (33%), тщательно промывали 3 раза дистиллированной водой, а затем инкубировали в 10% растворе APTES в этаноле в течение ночи при интенсивном перемешивании. После отмывки пористых пленок в этаноле (1 раз) и дистиллированной воде (5 раз) их инкубировали в течение 1 h в 2.5% растворе глутарового альдегида в ФР при перемешивании при комнатной температуре.

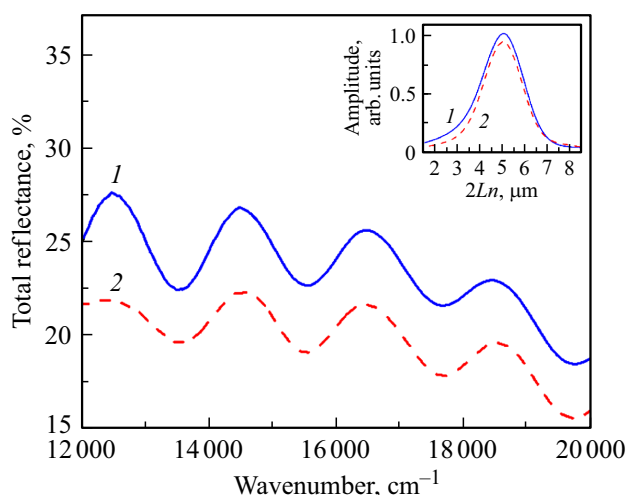


Рис. 2. Спектры полного отражения пленки макро-ПК до (1) и после (2) неспецифической адсорбции вируса гриппа А. На вставке представлено быстрое преобразование Фурье интерференционных спектров.

Затем образцы тщательно промывали дистиллированной водой (5 раз) и инкубировали в растворе 15 μg/ml специфических моноклональных антител в ФР (500 μl/plate 5 × 5 mm) в течение 1 h при комнатной температуре при перемешивании. Образцы промывали (3 раза в 650 μl ФР с 0.05% Твин-20/пластинка) и затем использовали для проведения иммунохимической специфической реакции с вирусом.

При специфическом связывании вирусов образцы макро-ПК, функционализированные антителами, инкубировали в ФР, содержащем 50 μg/ml вируса гриппа А, в течение 1 h. Затем пленки промывали 3 раза в ФР с 0.05% Твин-20 и высушивали в сушильном шкафу Binder при 37°C.

Для получения микрофотографий образцов с адсорбированными вирусами после их нанесения и высушивания в течение 5 min в сушильном шкафу Binder при 37°C проводили фиксацию в течение 1.5 h в глутаровом альдегиде (2.5% в ФР), затем по 10 min последовательно в 50, 70, 80 и 96% водных спиртовых растворах.

2.3. Исследование морфологии и оптических свойств образцов

Структурные свойства полученных образцов изучали с помощью растрового электронного микроскопа (РЭМ) Carl Zeiss Supra 40. Спектры полного отражения ПК в спектральной области от 12000 до 20000 cm⁻¹ измеряли на спектрометре Perkin Elmer Lambda 950, оборудованном интегрирующей сферой.

3. Экспериментальные результаты и их обсуждение

Микрофотографии РЭМ образца макро-ПК, вид сверху и сбоку, представлены на рис. 1. Видно, что диаметр пор составляет около 100 nm (рис. 1, а и вставка к рис. 1, b), а сами поры представляют собой вертикально ориентированные вдоль кристаллографического направления [100] каналы с гладкими стенками. Толщина пористого слоя составляет около 2 μm (рис. 1, b).

В спектрах полного отражения макро-ПК (рис. 2) наблюдаются полосы, связанные с интерференцией Фабри-Перо в тонких плёнках при отражении двух лучей от границы воздух–макро-ПК и макро-ПК–с-Si. Для исходного образца макро-ПК рассчитан эффективный показатель преломления ($n_{ef} = 1.3$) согласно [19] формуле

$$n_{ef} = \frac{1}{2L\Delta k}, \tag{1}$$

где L — толщина пленки макро-ПК, Δk — расстояние между интерференционными пиками на рис. 2 (кривая 1). Эффективную диэлектрическую проницаемость образцов (ϵ_{ef}) определяли по формуле

$$\epsilon_{ef} = n_{ef}^2. \tag{2}$$

Для расчёта пористости образца использовали модель эффективной среды Бруггемана [20]:

$$f_{air} \frac{\epsilon_{ef} - \epsilon_{air}}{\epsilon_{ef} + l(\epsilon_{air} - \epsilon_{ef})} + f_{Si} \frac{\epsilon_{ef} - \epsilon_{Si}}{\epsilon_{ef} + l(\epsilon_{Si} - \epsilon_{ef})} = 0 \tag{3}$$

где $\epsilon_{air} = 1$ — диэлектрическая проницаемость воздуха, $\epsilon_{Si} = 11.8$ — диэлектрическая проницаемость кремния, $l = 0.5$ — фактор деполяризации для цилиндра (поры в макро-ПК можно рассматривать как цилиндры), f_{air} — фактор заполнения воздуха (пористость макро-ПК), а f_{Si} — фактор заполнения кремния. При этом выполняется соотношение $f_{air} + f_{Si} = 1$. Пористость пленки макро-ПК, рассчитанная согласно представленной модели, составила 75%.

На вставке к рис. 2 представлены результаты быстрого преобразования Фурье (fast Fourier transform, FFT) полученных интерференционных спектров, где по оси абсцисс отложена эффективная оптическая толщина образца ($2Ln$), а по оси ординат — амплитуда сигнала [21]. Заметно незначительное уменьшение амплитуды сигнала после неспецифической адсорбции вирусов, что можно связать с рассеянием света при введении в пористую матрицу макро-ПК вирусных частиц.

На рис. 3 представлены спектры полного отражения модифицированной антителами пленки макро-ПК до (1) и после (2) адсорбции вирусов.

Отметим, что адсорбция вирусов в случаях как неспецифического, так и специфического связывания с поверхностью макро-ПК происходит без изменения эффективной оптической толщины образцов. Это можно

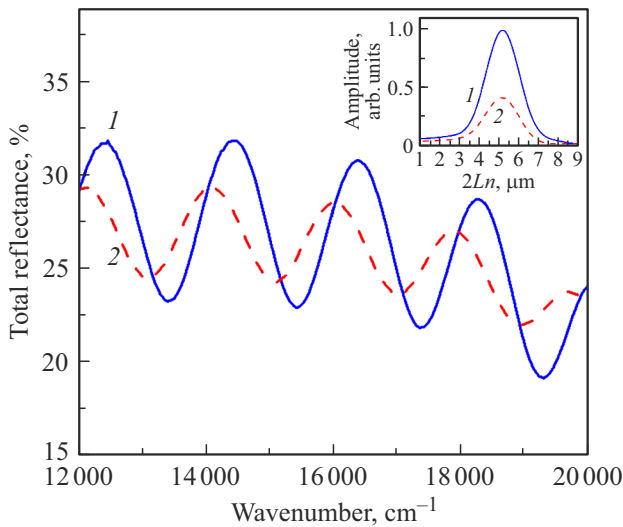


Рис. 3. Спектры полного отражения образца функционализированного антителами макро-ПК до (1) и после (2) адсорбции вируса гриппа А. На вставке представлено FFT интерференционных спектров.

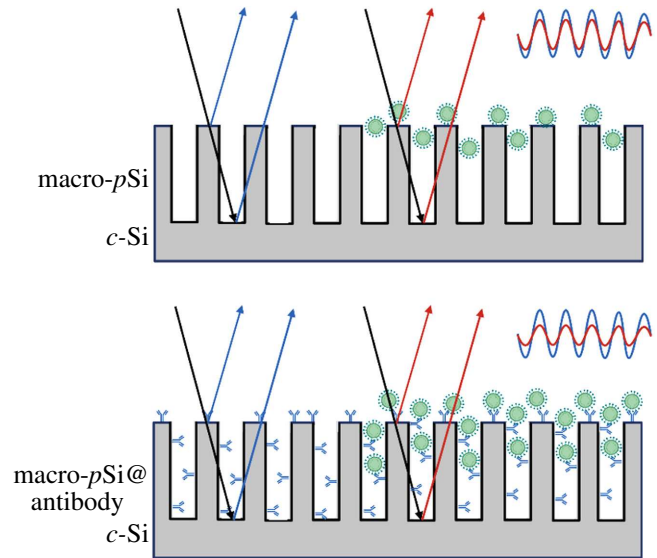


Рис. 5. Схематичное представление снятия оптического сигнала сенсорного отклика по изменению амплитуды интерференционных спектров пленок макро-ПК при неспецифическом и специфическом связывании вирусов с поверхностью наноструктур.

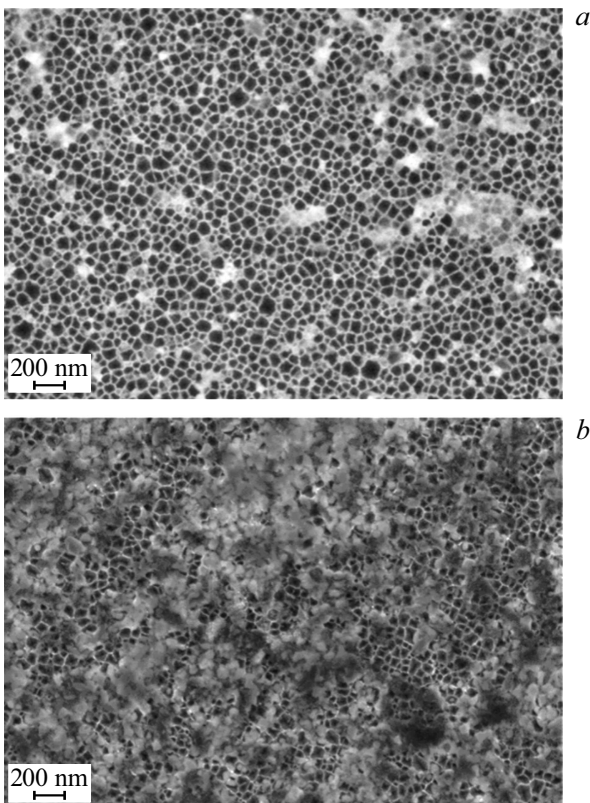


Рис. 4. Микрофотографии РЭМ, вид сверху, пленок макро-ПК при неспецифическом (а) и специфическом (б) связывании вируса гриппа А.

объяснить отсутствием изменения n_{eff} пленки макро-ПК после адсорбции вирусов из-за близости показателя преломления вирусов, равного 1.5 [22], и показателя

преломления пористой пленки. Однако в спектрах FFT пленок макро-ПК, функционализированных антителами, наблюдается падение амплитуды сигнала в 2.2 раза после адсорбции вирусов. Это можно связать с эффективным взаимодействием вирусов с пористой поверхностью образцов, покрытой антителами.

На рис. 4 представлены микрофотографии РЭМ образцов макро-ПК, вид сверху, после неспецифического и специфического связывания вируса гриппа А с поверхностью пленок.

Видно, что при неспецифическом связывании наблюдаются лишь единичные вирионы на поверхности и в порах пленок макро-ПК, в то время как при специфическом связывании фактически вся поверхность пленок покрыта вирусными частицами. Данный результат можно объяснить тем, что при неспецифическом связывании вирус взаимодействует с поверхностью пористых пленок за счёт сил Ван-дер-Ваальса [23], и при промывании образца большая часть вируса смывается. При специфической адсорбции вирус прочно ковалентно связывается с антителами на поверхности макро-ПК и практически не удаляется при промывании. На рис. 5 приведено схематическое представление описанного выше взаимодействия вирусов с поверхностью макро-ПК при их неспецифическом и специфическом связывании, а также механизм получения оптического сигнала сенсорного отклика.

4. Заключение

Разработана методика получения пленок макропористого кремния с диаметром пор около 100 nm, а также

методика функционализации поверхности пленок моноклональными антителами к вирусам гриппа А. Показано, что в спектрах полного отражения образцов наблюдается серия интерференционных полос, амплитуда которых изменяется после адсорбции вирусов. Пористость образцов, рассчитанная с помощью модели эффективной среды Бруггемана, составила 75%. Анализ микрофотографий РЭМ показал, что такая морфология наноструктур обеспечивает эффективную неспецифическую и специфическую адсорбцию вирусов. Неспецифическое связывание может быть обусловлено взаимодействиями, возникающими между развитой пористой поверхностью наноструктур и поверхностью вирионов. При этом функционализация моноклональными антителами обеспечивает прочное связывание вирусов, что подтверждается резким падением амплитуды ФФТ интерференционных спектров пористых пленок. Представленные в работе сенсорные системы на основе макропористого кремния могут быть универсальными и использоваться для разработки сенсоров на разные типы вирусов.

Полученные результаты открывают возможность использования пленок макро-ПК в качестве эффективных интерференционных оптических датчиков для диагностики вирусов.

Благодарности

Использовалось оборудование Учебно-методического центра литографии и микроскопии МГУ имени М.В. Ломоносова.

Финансирование

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 22-72-10062, <https://rscf.ru/project/22-72-10062/>.

Конфликт интересов

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

Список литературы

- [1] M. Nirschl, F. Reuter, J. Vörös. *Biosensors*, **1**(3), 70 (2011). DOI:10.3390/bios1030070
- [2] G. Shtenberg, E. Segal. *Porous silicon optical biosensors. Handbook of Porous Silicon* (Springer International Publishing, Cham, Switzerland, 2014). DOI:10.1007/978-3-319-71381-6_87
- [3] J. Rouquerol, D. Avnir, C.W. Fairbridge, D.H. Everett, J.M. Haynes, N. Pernicone, J.D.F. Ramsay, K.S.W. Sing, K.K. Unger. *Pure & Appl. Chem.*, **66**(8), 1739 (1994). DOI:10.1351/pac199466081739
- [4] A.G. Cullis, L.T. Canham, P.D.J. Calcott. *J. Appl. Phys.*, **82**, 909 (1997). DOI:10.1063/1.366536
- [5] Е.А. Константинова, Ю.В. Рябчиков, Л.А. Осминкина, А.С. Воронцов, П.К. Кашкаров. *ФТП*, **38**(11), 1386 (2004). [E.A. Konstantinova, Y.V. Ryabchikov, L.A. Osminkina, A.S. Vorontsov, P.K. Kashkarov. *Semicond.*, **38**(11), 1344 (2004). DOI:10.1134/1.1823072].
- [6] M.J. Sailor, E.C. Wu. *Adv. Funct. Mat.*, **19**(20), 3195 (2009). DOI:10.1002/adfm.200900535
- [7] V.A. Georgobiani, K.A. Gonchar, E.A. Zvereva, L.A. Osminkina. *Phys. Stat. Sol. A*, **215**(1), 1700565 (2018). DOI:10.1002/pssa.201700565
- [8] A. Jane, R. Dronov, A. Hodges, N.H. Voelcker. *Trends in biotech.*, **27**(4), 230 (2009). DOI:10.1016/j.tibtech.2008.12.004
- [9] V.S. Lin, K. Motesharei, K.P. Dancil, M.J. Sailor, M.R. Ghadiri. *Science*, **278**(5339), 840 (1997). DOI:10.1126/science.278.5339.840
- [10] M.B. Gongalsky, A.A. Koval, S.N. Schevchenko, K.P. Tamarov, L.A. Osminkina. *J. Electr. Soc.*, **164**(12), B581 (2017). DOI:10.1149/2.1821712jes
- [11] N. Massad-Ivanir, G. Shtenberg, E. Segal. *J. Vis. Exp.*, **81** (2013). DOI:10.3791/50805
- [12] N. Massad-Ivanir, G. Shtenberg, N. Raz, C. Gazenbeek, D. Budding, M.P. Bos, E. Segal. *Sci. Rep.*, **6**, 38099 (2016). DOI:10.1038/srep38099
- [13] G. Gaur, D.S. Koktysh, S.M. Weiss. *Adv. Funct. Mat.*, **23**(29), 3604 (2013). DOI:10.1002/adfm.201202697
- [14] N. Massad-Ivanir, Y. Mirsky, A. Nahor, E. Edrei, L.M. Bonanno-Young, N.B. Dov, A. Sa'ar, E. Segal. *Analyst*, **139**, 3885 (2014). DOI:10.1039/C4AN00364K
- [15] N. Massad-Ivanir, G. Shtenberg, E. Segal. *Adv. Exp. Med. Biol.*, **733**, 37 (2012). DOI:10.1007/978-94-007-2555-3_4
- [16] K.A. Gonchar, S.N. Agafilushkina, D.V. Moiseev, I.V. Bozhev, A.A. Manykin, E.A. Kropotkina, A.S. Gambaryan, L.A. Osminkina. *Mater. Res. Express*, **7**, 035002 (2020). DOI:10.1088/2053-1591/ab7719
- [17] M.B. Gongalsky, U.A. Tsurikova, J.V. Samsonova, G.Z. Gvindzhiliiia, K.A. Gonchar, N.Yu. Saushkin, A.A. Kudryavtseva, E.A. Kropotkina, A.S. Gambaryan, L.A. Osminkina. *Res. Mat.*, **6**, 100084 (2020). DOI:10.1016/j.rinma.2020.100084
- [18] J. Li, M.J. Sailor. *Biosens. Bioelectron.*, **55**, 372 (2014). DOI:10.1016/j.bios.2013.12.016
- [19] B. Rossi. *Optics* (Addison-Wesley, Reading, MA, USA, 1957).
- [20] D.A.G. Bruggeman. *Ann. Phys. (Leipzig)*, **416**(7), 636 (1935). DOI:10.1002/andp.19354160705
- [21] M.J. Sailor. *Porous Silicon in Practice: Preparation, Characterization and Applications* (Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Germany, 2012).
- [22] S.Wang, X.Shan, U.Patel, X. Huang, J. Lu, J. Li, N. Tao. *PNAS*, **107**, 16028 (2010). DOI:10.1073/pnas.1005264107
- [23] L.A. Osminkina, S.N. Agafilushkina, E.A. Kropotkina, N.Yu. Saushkin, I.V. Bozhev, S.S. Abramchuk, J.V. Samsonova, A.S. Gambaryan. *Bioact. Mat.*, **7**, 39 (2022). DOI:10.1016/j.bioactmat.2021.06.001