

НОВЫЕ НАНОПЛАТФОРМЫ ДЛЯ СИНТЕЗА БИОСЕНСОРОВ

Лукьяненко К.А., Денисов И.А. , Якимов А.С.

научный руководитель д-р физ.-мат. наук Белобров П.И.

Сибирский федеральный университет

В работе рассмотрена задача формирования новой платформы в аналитическом приборостроении. Создания новой платформы продиктовано полифункциональностью современных биосенсоров, необходимостью проведения анализа одиночных клеток, моделирования процессов в искусственных клетках. Современные инструменты и методики, необходимые для разрешения таких проблем, имеют междисциплинарный характер. Проведен анализ тенденций в исследованиях и разработках, направленных на создание гибридных технологических платформ из наносистем и наноматериалов. Новые наноплатформы расширяют область применений биосенсоров в различных областях промышленности.

Нанотехнологические платформы включают «дизайн, характеризацию, создание и применение структур, устройств и систем путем контролирования их формы и размера на масштабе < 100 нм» [1]. На рисунке 1 показано развитие методов работы с наночастицами и их применения в биологии.

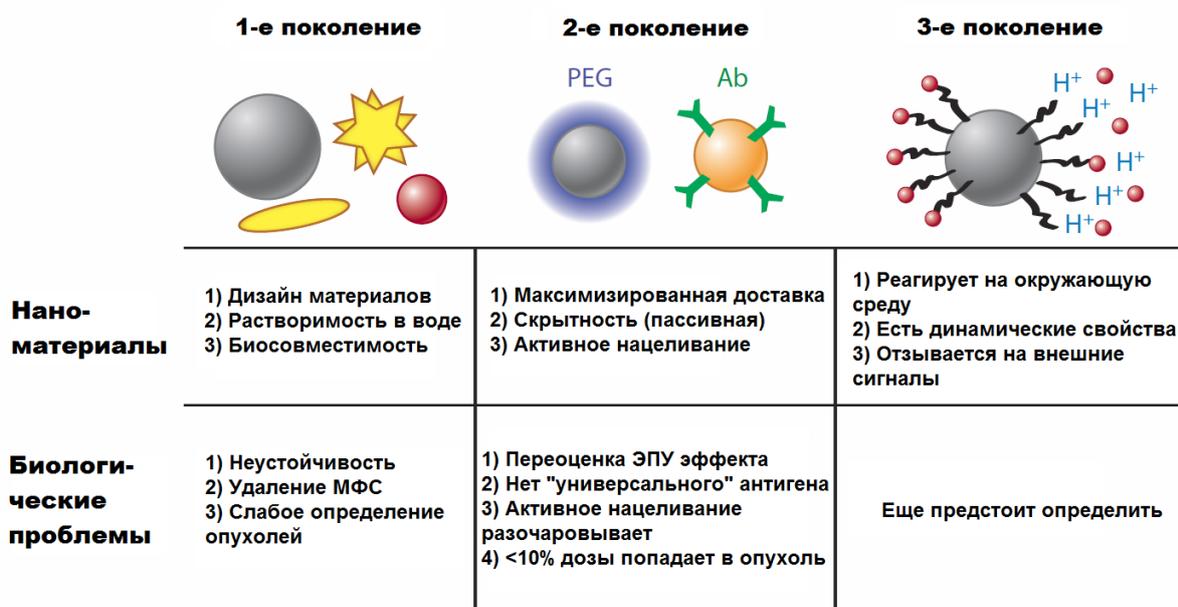


Рисунок 1 — Эволюция поколений наночастиц, подчеркивающая взаимосвязь между развитием дизайна наноматериалов и биологическими исследованиями. Сокращения:

Ab, антитело; ЭПУ, улучшенное проникновение и удержание; МФС, мономерная фагоцитарная система; PEG, полиэтилен гликоль. Заимствовано из [1].

В новых платформах для достижения большей эффективности комбинируются в различных сочетаниях методики, которые ранее использовались по отдельности. А используемые приборы при этом имеют соответствующие исследуемым образцам компартменты для хранения проб и аналитов, а также способность производить с ними различные манипуляции. Один их ярких примеров — это синтез микроэмульсионной и микрофлюидной платформ для массивного параллельного секвенирования [2].

Суть массивного параллельного секвенирования заключается в том, что используется чип размером 60×60 мм² с очень маленькими колодцами: объем одного

колодца составляет всего 75 пл, а плотность колодцев около 480 штук/мм². В каждом колодце происходит своя независимая реакция по амплификации кусочка ДНК. Такая высокая плотность колодцев позволяет проводить одновременно почти до двух миллионов реакций, отсюда и массивный параллельный процесс. Это пример микрофлюидной технологии. Амплификация происходит в микрокаплях, находящихся в каждом колодце. В каждой капле находится набор веществ, катализирующих присоединение нового нуклеотида. Это пример микроэмульсионной технологии. Что касается самого секвенирования (то есть определения последовательности нуклеотидов в участке ДНК), то оно происходит путем регистрации излучения в каждом колодце, которое возникает при присоединении очередного нуклеотида к каждой из микрокапель. Такой подход позволил не только стократно увеличить эффективность проводимой амплификации, но и существенно снизил стоимость процедуры. Без использования этих платформ вместе, такого эффекта достичь было бы невозможно.

В настоящее время используются различные биосенсоры, которые представляют собой устройства, содержащие три основных компонента: биоселективный элемент, преобразователь получаемого сигнала и электронные компоненты, которые отвечают за отображение измеренной информации. Современные подходы позволяют работать с малым количеством образцов, увеличивая чувствительность анализов, и развивать методики изучения каждой клетки в отдельности. Синтез микроэмульсионной и микрофлюидной платформ является примером такого подхода. Этот синтез называют капельной микрофлюидикой (droplet-based microfluidics). На недавней конференции кроме капельной, обсуждались другие микрофлюидные платформы, которые активно используются в биологических приложениях [3].

По сути, биологическая среда — это эмульсия. Используя микроэмульсии, можно создавать капли, которые по своим размерам будут порядка размеров клеток. Одним из интересных применений микроэмульсий является использование их в качестве переносчиков лекарств [4]. Задача использования микроэмульсий для создания микроэмульсионных моделей клеток была решена путем анализа фазовой диаграммы трехкомпонентной системы: вода, олеиновая кислота и лаурилсульфат натрия методом измерения электрического сопротивления эмульсии [5]. Результаты показаны на рис.2.

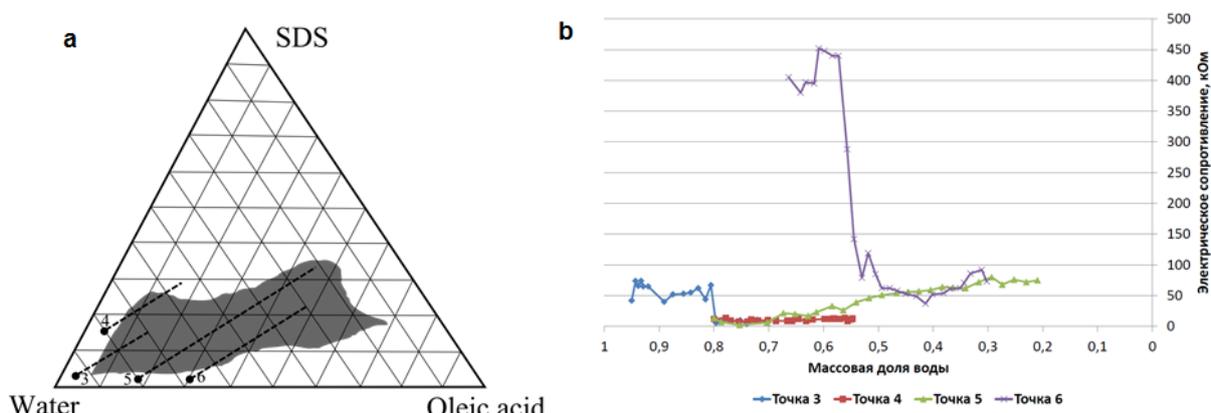


Рисунок 2 – а) Фазовая диаграмма эмульсии, пунктир - траектории выпаривания воды; б) зависимость электрического сопротивления эмульсии от массовой доли воды.

Особый интерес для анализа представляет левый нижний угол на рис.2,а, потому что при таком соотношении компонентов эмульсия не содержит большого количества SDS и олеиновой кислоты, что не будет сильно вредить окружающим веществам.

Изменение фазового состояния можно оценить по резкому скачку в сопротивлении проводящей среды: ламеллярной или мицеллярной. Из рис.2,b видно, что фазовый переход был зарегистрирован в точках 3 и 6, в то время как в точках 4 и 5 проводящая среда не менялась. Расхождения с приведенной на рис.2,a диаграммой могут быть связаны с различиями в способах регистрации фазового перехода.

Однако использования одних только микроэмульсий для решения современных проблем биологии недостаточно. Так как капли в микроэмульсии имеют размеры порядка десятков нанометров, возникают новые требования к подготовке пробы, генерации капель, инкапсуляции, транспорту и сортировке капель. Наиболее эффективным решением будет являться комбинирование микроэмульсионной платформы с микрофлюидной. Особенность последней заключается в применении микроканалов для управления жидкостью. С помощью таких каналов можно эффективно перемешивать, разделять и управлять потоками, при этом объем расходуемых веществ очень мал.

В связи с этим возникла задача по определению оптимальных условий для перемешивания в микрофлюидном чипе. Были изучены и подобраны оптимальные условия для перемешивания реагентов в микрофлюидных люциферазных чипах [6]. Предложена идея нового биосенсора, который спроектирован для использования микрофлюидной и эмульсионной платформ [7].

Синтез двух платформ полезен для решения других задач. Одной из самых интересных является проблема моделирования в искусственных клетках процессов, происходящих в живых клетках. Первые искусственные клетки были созданы недавно [8], используя везикулы, которые представляют собой пузырьки, фазово обособленные при помощи липидной мембраны. В другой работе были использованы полимеросомы (разновидность везикул) в качестве искусственных клеток в микрофлюидном устройстве для экспрессии белка, агрегации и контролируемого высвобождения [9].

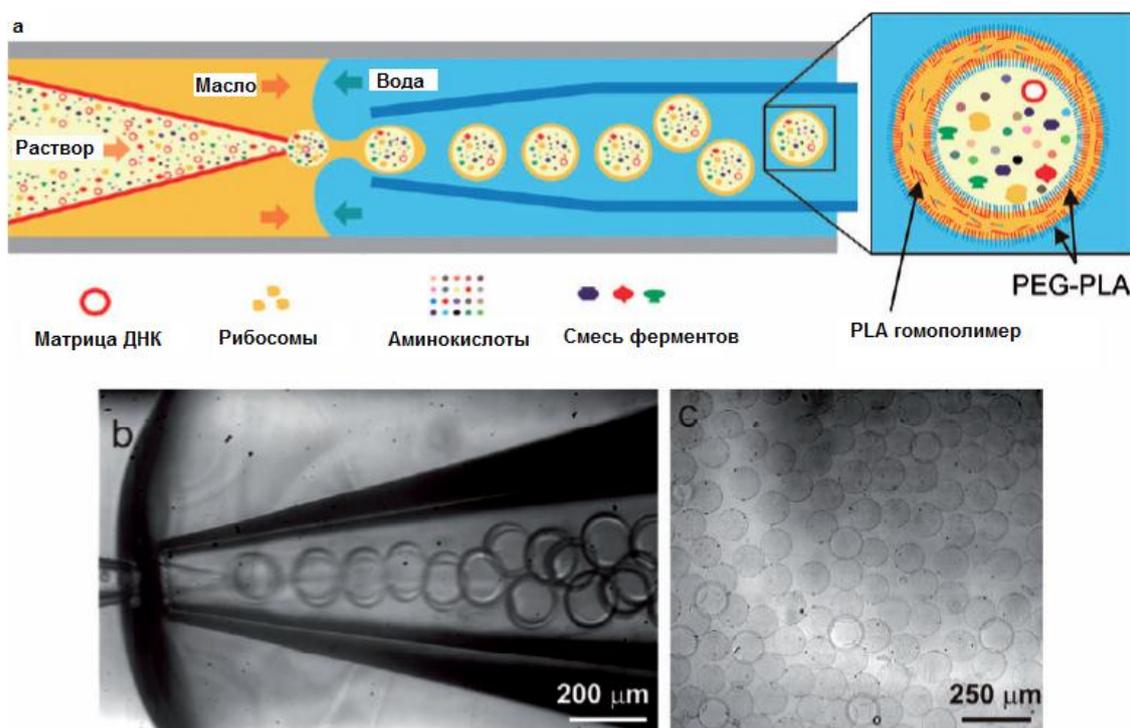


Рисунок 3 — а) схематичное изображение процесса формирования капли; б) процесс генерации эмульсионных капель; в) получившиеся монодисперсные полимеросомы. Заимствовано из [9].

Другие процессы, которые также можно имитировать в искусственных клетках, очень разнообразны. В этом плане одним из наиболее интересных является изучение поведения липидных рафтов и кластеров дифференцировки на поверхности такой клетки. Изучение липидных рафтов интересно тем, что в их состав входят гликофинголипиды, которые выполняют многие важнейшие сигнальные и регуляторные функции [10]. Изучено поведение липидных рафтов на поверхности больших липосом при внешнем стимулировании мембраны путем добавления ПАВа или изменением осмотического давления [11]. Рафты являются новой платформой для изучения смешиваемости различных липидов, белков и сахаров.

Наноплатформы были введены одновременно с рафтами в 2000 году. Теперь сами рафты рассматриваются как наноплатформы [12]. Мы рассмотрели новую платформу аналитического приборостроения, полезную для биологии и медицины. Метод формирования двухслойной эмульсии с липидными рафтами или кластерами дифференцировки в микрофлюидном устройстве является основой. Полученные везикулы применимы как исполнительное устройство (привод) при объединении микрофлюидной и микроэмульсионной платформ.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

- 1) Alexandre Albanese *et al.* The Effect of Nanoparticle Size, Shape, and Surface Chemistry on Biological Systems // The Annual Review of Biomedical Engineering, 2012. Issue 14, pages 1–16. DOI: 10.1146/annurev-bioeng-071811-150124
- 2) Marcel Margulies *et al.* Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors // nature, 2005, Vol 437, pages 376-380. DOI:10.1038/nature03959
- 3) Лукьяненко К.А. Report on the EMBL Microfluidics conference 2012 // Режим доступа URL: http://molpit.com/files/14_EMBL2012_report.pdf.
- 4) A. Kogan, N. Garti. Microemulsions as transdermal drug delivery vehicles // Adv Colloid Interface Sci. vol 123-126, p. 369-385 (2006).
- 5) Лукьяненко К.А. Возможности использования тройной системы вода/лаурилсульфат натрия/олеиновая кислота для микроэмульсионных моделей клетки // Бакалаврская работа, 68 стр, Красноярск, 2012.
- 6) Якимов А.С. Условия перемешивания реагентов в микрофлюидных люциферазных чипах // Дипломная работа, 56 стр, Красноярск 2012.
- 7) Denisov I.A. Disposable luciferase-based lab-on-a-chips for bioassay // Международный научный семинар «Биолюминесцентные биотехнологии», г. Красноярск, 13-14 июня 2012 г.
- 8) Irene A. Chen. The Emergence of Cells During the Origin of Life // Science 8 December 2006: Vol. 314 no. 5805 pp. 1558-1559.
- 9) Chiara Martino *et al.* Protein Expression, Aggregation, and Triggered Release from Polymersomes as Artificial Cell-like Structures // Angew. Chem. Int. Ed., 2012, Issue 51, pages 6416–6420. DOI: 10.1002/anie.201201443
- 10) Stephanie M. Pontier, *et al.* Glycosphingolipids in signaling and development: From liposomes to model organisms // Developmental Dynamics, Volume 241, Issue 1, pages 92–106, January 2012.
- 11) Tsutomu Hamada *et al.* Dynamic Processes in Endocytic Transformation of a Raft-Exhibiting Giant Liposome // J. Phys. Chem. B, 2007, 111 (37), pp 10853–10857.
- 12) Mario Brameshuber *et al.* Imaging of Mobile Long-lived Nanoplatfoms in the Live Cell Plasma Membrane // J. Biol. Chem. 2010 285: 41765-41771.