

# О возможности использования массивов нанотверстий в кремниевой пленке в качестве биочипов ближнего поля\*

Х.Г.Эберле, К.Дресслер, Х.Оертел, Ю.Бойган, Г.Мюллер

*Анализируется возможность использования массивов нанотверстий в кремниевой пленке для тестирования биомолекул лазерным излучением. Показано, что такие массивы могут быть использованы для создания биосенсоров.*

**Ключевые слова:** нанотверстия, биочипы, биомедицина.

## 1. Введение

На современном этапе развития молекулярной генетики методы биомедицинского анализа все чаще и чаще комбинируются с методами нанотехнологий. Используемые в настоящее время технологии биочипов и микро-массивов имеют ряд недостатков: малая эффективность обработки данных, ограниченные функциональные возможности и высокая стоимость. В настоящей работе исследуется установка, в которой используется двумерный набор наносточников света, лишенная некоторых из перечисленных недостатков и позволяющая исследовать биологические образцы с высоким разрешением. Световые источники представляют собой массив отверстий диаметрами менее 200 нм, выполненных в тонкой кремниевой пленке. Массив, содержащий более 160000 отверстий, облучается сканирующим лазерным пучком, например пучком излучения сканирующего лазерного микроскопа (СЛМ).

Одно из преимуществ предлагаемой установки состоит в том, что она позволяет исследовать образцы, находящиеся в физиологической среде. Процесс накопления сигнала в такой установке происходит значительно быстрее, чем в традиционных, использующих технологию ближнего поля, что также является ее преимуществом. Все это позволяет исследовать кинетику специфических биологических реакций фактически в реальном масштабе времени.

В настоящее время интенсивные исследования ведутся в области функциональной геномики, детально изучающей особенности ДНК, что необходимо для полного понимания ее функции, и в области протеомики, изучающей вопрос о геномном контроле производства белков [1–2].

\*Перевел с англ. Н.Н.Брандт.

H.-G.Eberle, G.Müller Laser Medizin Technologie Berlin GmbH; Fabeckstr. 60-62, 14195 Berlin, Germany; tel.: +49 (0) 30 8449 2332, fax: +49 (0) 30 /8449 2399; e-mail: h.eberle@lmtb.de

C.Dressler, J.Beuthan, G.Müller Institut für Medizinische Physik/Laser-medicin, Freie Universität Berlin, Universitätsklinikum Benjamin Franklin, Fabeckstr. 60-62, 14195 Berlin, Germany  
H.Oertel Fraunhofer-Institut für Siliziumtechnologie (ISiT), Fraunhoferstr. 1, 25524 Itzehoe, Germany; e-mail: oertel@isit.fhg.de

Поступила в редакцию 4 июня 2002 г.

Биочипы являются основной технологической базой, с помощью которой различные биологические процессы могут быть проанализированы мощным миниатюризированным скринингом. Создание биочипов способно произвести революционные изменения во многих областях – как в науке о жизни и в медицинской диагностике, так и в разработке лекарственных препаратов [3–4]. На сегодняшний день биочипы могут быть подразделены на две основные группы. К первой относятся пассивные биочипы, на которых протекают диффузионно-зависимые биоаналитические реакции. Примерами пассивных чипов могут служить микромассивы из ДНК, белков и прикрепленных к биомолекулам частиц [5]. Активные биочипы принадлежат ко второй группе, в которой микроэлектроды или каналы способствуют протеканию биоаналитических реакций. Примером активных биочипов являются, в частности, биоэлектронные чипы для полевой гибридизации ДНК постоянным током и микрофлюидные капиллярные электрофоретические чипы, в которых постоянный ток используется для разделения и идентификации следовых количеств биологических веществ [6].

Основные ограничения использования биочипов связаны с их высокой стоимостью, трудоемкостью обработки информации и низким отношением сигнал/шум. Последнее ограничение обусловлено принципом считывания информации в современных CCD-чипах. Хотя отношение сигнал/шум может быть улучшено при охлаждении CCD-чипа, это может неблагоприятно влиять на состояние биологического образца.

Предлагаемый вариант пассивного биочипа не имеет некоторых из перечисленных недостатков и позволяет осуществлять анализ с повышенной избирательностью и чувствительностью; при этом решаются критические проблемы в фармацевтических исследованиях и разработках, клинической диагностике и биомедицинских исследованиях. Основным преимуществом данного биочипа является высокое отношение сигнал/шум и возможность его использования в имеющихся СЛМ.

## 2. Материалы и методы

Массивы, содержащие  $200 \times 200$  или  $400 \times 400$  конических отверстий, были получены в результате ряда последовательных литографических процедур и травлений с использованием в качестве первичного материала SOI

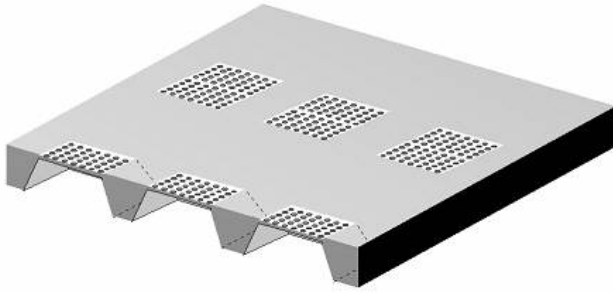


Рис.1. Наномассивы в кремниевом чипе размером 12 × 12 мм (9 мембранных массивов размером 1 × 1 мм); толщина мембраны 1.5–2.5 мкм, в каждом массиве находится 200 × 200 или 400 × 400 отверстий.

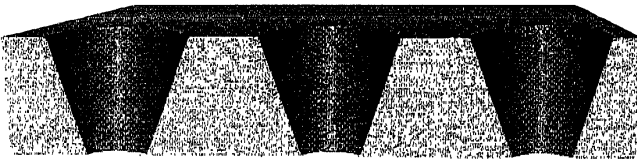


Рис.2. Примерная форма отверстий, вытравленных в кремниевой пластине.

кремниевых пластин толщиной 630 мкм. Затем пластины подвергались воздействию с обратной стороны, в результате которого их толщина уменьшалась до 2 мкм (рис.1). Отверстия имели коническую форму (рис.2), их входной диаметр всегда превышал 500 нм (500 – 2000 нм). Для увеличения отношения сигнал/шум при прохождении света через отверстия на образец наносилась тонкая (40 нм) пленка из Al или Ti. Таким образом, минимальная выходная апертура оказывалась равной 190 нм.

Для последующего уменьшения выходного диаметра отверстий на образец наносился тонкий слой Si<sub>3</sub>N<sub>4</sub>. Для увеличения оптического поглощения между отверстиями массивы дополнительно покрывались металлической

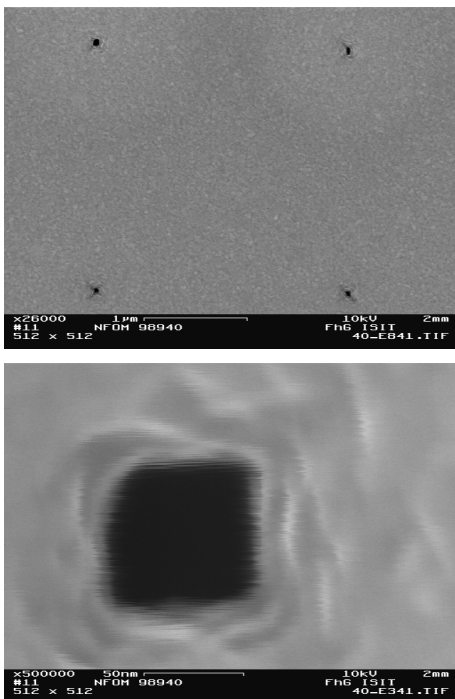


Рис.3. Фрагмент массива, содержащий 400 × 400 отверстий по 60 мкм в диаметре (а), и вид одного отверстия (б).

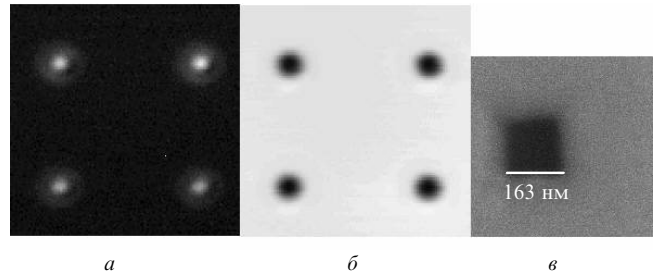


Рис.4. Фрагмент изображения, полученного при прохождении света через массив с отверстиями диаметром 163 нм (а), поле в дальней зоне (б) и изображение, записанное с помощью сканирующего лазерного микроскопа (в); длина волны возбуждающего излучения 543 нм, расстояние между отверстиями 5 мкм.

пленкой толщиной 80 нм. Минимальные апертуры отверстий были равны 60 нм (рис.3). При таких отверстиях пропускание света в дальнюю зону отсутствовало. Пропускание в дальнюю зону (без взаимодействия с образцом!) наблюдалось только при диаметрах отверстий, составляющих ~ 160 нм (рис.4).

Наномассивы разрабатывались с целью создания малогабаритных платформ для разнообразных биологических процессов и проведения глобального оптического скрининга. Такие массивы могут быть проанализированы с помощью промышленных СЛМ с использованием пропускательной и флуоресцентной спектроскопии одновременно. Их применение может упростить приготовление образцов и управление ими, а также чрезвычайно ус-

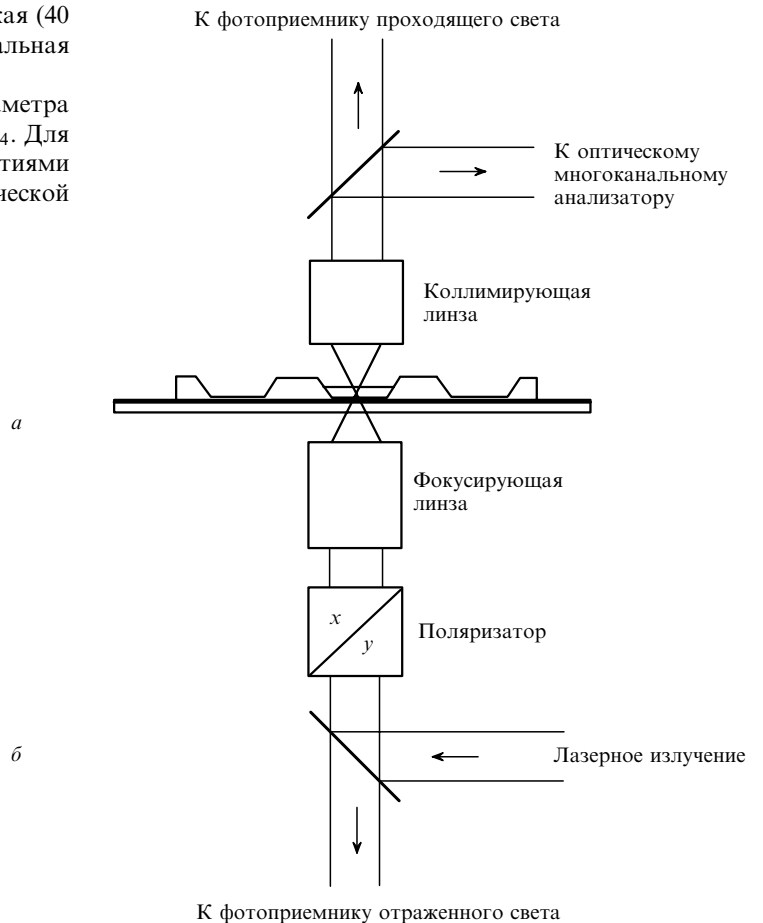


Рис.5. Схема возбуждения и регистрации на основе конфокального СЛМ (СЛМ 410 Carl Zeiss).

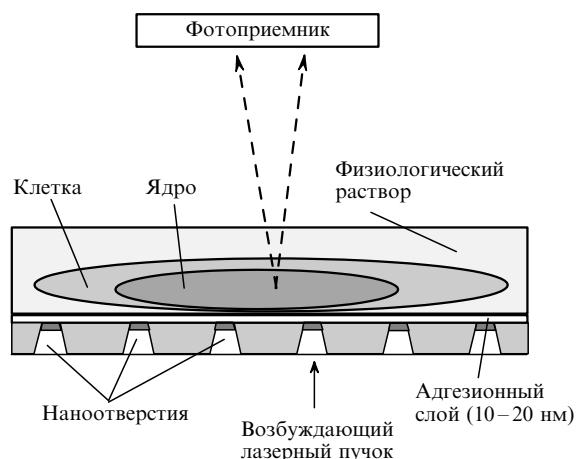


Рис.6. Схема наномассива, возбуждаемого лазерным излучением.

корить накопление экспериментальных данных в цифровой форме. На рис.5 показана схема экспериментальной установки.

Расстояние между отдельными отверстиями достаточно велико для того, чтобы обеспечить возбуждение лишь одной апертуры в данный момент времени. При использовании СЛМ 410 (Carl Zeiss, Йена, Германия) флуоресценция детектируется со стороны возбуждающего излучения, поэтому флуоресцентный оптический сигнал должен проникнуть в нанотверстия перед тем, как он будет зарегистрирован в области дальнего поля. В результате из-за сильного ослабления интенсивности света, прошедшего через конические наноканалы, диаметр выходной апертуры не превышает 200 нм. Интенсивность регистрируемого сигнала флуоресценции может быть увеличена путем увеличения угла конуса или при измерении флуоресценции во всем полупространстве образца. Это планируется осуществить на следующем этапе исследований.

Основное преимущество при использовании двумерного массива нанотверстий состоит в том, что область возбуждающего лазерного пучка и исследуемый образец пространственно разделены. Это означает, что возбуждается и дает сигнал флуоресценции только та часть образца, которая находится в области ближнего поля по отношению к освещаемой лазером наноапертуре. Посколь-

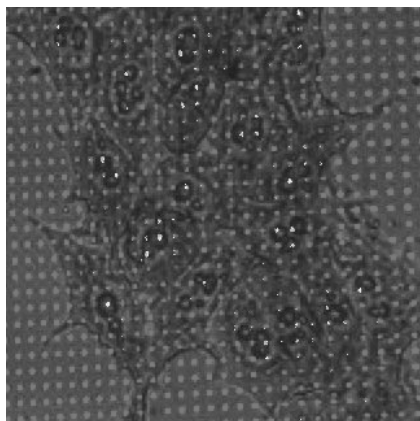


Рис.7. Изображение выращенных на наномассиве фибробластов, полученное с помощью конфокального СЛМ и представляющее собой наложение картин флуоресценции (белые пятна) и прошедшего света (серые пятна); размер изображения 112 × 112 мкм, клетки окрашены бромистым этидием.

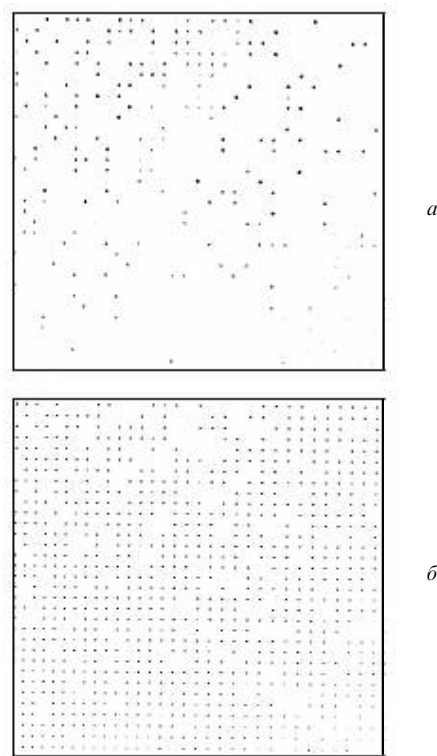


Рис.8. Полученные с помощью СЛМ картины флуоресценции фрагментов ДНК, окрашенных бромистым этидием (а), и распределение света, прошедшего через образец (б). Изображения контрастно инвертированы, размер изображений 96 × 96 мкм.

ку расстояние между отверстиями больше диаметра лазерного луча, это обеспечивает одновременное возбуждение лишь одного отверстия, что приводит к значительному увеличению отношения сигнал/шум в связи с очень низким уровнем фонового сигнала.

Перед использованием для биоаналитических приложений поверхности наномассивов должны быть тщательно подготовлены. Чтобы создать оптимальные условия ближнего поля, необходимо подготовить биосовместимые адгезионные субстраты для исследуемых клеток или других веществ. С этой целью была использована техника нанесения пленок Ленгмюра–Блоджетта [2]. Массивы покрывались монослоями толщиной менее 20 нм с шероховатостью менее 5 нм. На рис.6 изображен пример готового к исследованиям наномассива с нанесенным адгезионным слоем и образцом.

В качестве флуоресцентных маркеров сегодня широко применяются красители Alexa или Cy3 и Cy5. Они допускают спектрально-селективное возбуждение на длинах волн лазеров, используемых в СЛМ. Эти красители доступны также в виде химически активных модификаций, пригодных для специфических применений. Кроме того, измеряемые флуоресцентные сигналы могут быть спектрально разделены.

### 3. Результаты и их обсуждение

На приготовленных вышеописанным способом подложках были выращены фибробласты. Богатые РНК участки ядер фибробластов (ядрышки) селективно детектировались, будучи помеченными красителем нуклеиновой кислоты. На рис.7 показано наложение изображений флуоресцентного и прошедшего света, причем сигнал

флуоресценции в основном был обусловлен флуоресценцией ядрышек.

Фрагменты ДНК размером от 200 до 9300 нм регистрировались после окрашивания бромистым этидием (рис.8). Сигнал флуоресценции заметен там, где отсутствует сигнал прошедшего света, и наоборот. Это свидетельствует о реализации условий ближнего поля, поскольку в традиционной оптической микроскопии ближнего поля одиночные фрагменты ДНК на картине поглощения не видны. Биологические взаимодействия в образцах могут быть причиной спектрального сдвига сигнала флуоресценции. С помощью схемы регистрации с выделением длины волны можно различать различные взаимодействия образцов. Использование метода, известного как сканирующая статистическая микроскопия, позволяет определить вероятность различных процессов взаимодействия [11]. Поперечную концентрацию (поверхностную плотность) отдельных молекулярных агрегатов можно определить без знания размеров частиц, применяя массивы с группами отверстий разного диаметра. Используемый в этом случае алгоритм обработки сигнала подробно описан в [11].

В рассматриваемой до сих пор процедуре применялось статистическое распределение образца по поверхности массива. На следующем этапе упорядоченные нанопоры совместно с молекулами исследуемых веществ могут быть рассмотрены с помощью известного метода, используемого в атомной силовой микроскопии (АСМ). В работах [12, 13] этот метод описан в задаче выделения высокоупорядоченных молекул образцов с нанометровой точностью. С помощью техники осаждения, применяемой в АСМ, могут быть созданы биочипы с переменным наноразрешением. Таким образом, при определении изменения исследуемых образцов вместо «механического» АСМ-сканирования, предложенного в [13], для быстрого накопления данных могут использоваться массивы нанопор. Достижимое при этом разрешение всего лишь немного хуже.

#### 4. Заключение

Возбуждаемые лазерным излучением массивы нанопор источников света были протестированы на примере исследования биомолекул и клеток с использованием диа-

метров отверстий вплоть до 280 нм. Полученные массивы с более чем  $1.6 \times 10^5$  отверстий имеют примерно одинаковые диаметры отверстий и расстояния между ними. Минимальный диаметр составлял 60 нм, а пропускание света в область дальнего поля наблюдалось при диаметрах, превышающих 160 нм. Возбуждаемые лазерным излучением массивы представляют собой многообещающий инструментарий для создания биосенсоров, работающих в области ближнего поля, однако для этого должны быть проведены спектроскопические исследования. С целью развития и интерпретации полученных результатов может использоваться работа [11], посвященная сканирующей статистической микроскопии. Накопление, обработка, многосторонний и быстрый анализ сигнала могут быть проведены с использованием СЛМ в качестве источника возбуждения. В дальнейшем для получения четко выраженной регулярной структуры предлагаемый метод должен быть объединен с описанной процедурой обработки, используемой в АСМ [5]. При этом станет возможным производство разнообразных биочипов с разрешением, характерным для ближнего поля, и быстрым накоплением данных.

Настоящая работа проводилась при поддержке Федерального министерства образования, науки, исследований и технологии (BMBF) (грант № 13N7510-13), Сената Берлина и Европейского сообщества.

1. Hebestreit H. F. *Current Opinions in Pharmacology*, **1**, 513 (2001).
2. Honore B. *Expert Rev. Mol. Diagn.*, **1**, № 3, 265 (2001).
3. Dhiman N., Bonilla R., O'Kane D. J., Poland G.A. *Vaccine*, **20**, 22 (2002).
4. *The San Diego Biotech. J.*, Oct/Nov., 18 (2001).
5. <http://www.bioarrays.com/techpapers/spie.pdf>
6. Cronin M. T., Boone T., Sassi A. P., Tan H., Xue Q., Williams S. J., Ricco A. J., Hooper H. H. *J. Assoc. Lab. Autom.*, **6**, № 1, 74 (2001).
7. Newton M.A., Kendziorski C.M., Richmond C.S., Blattner F.R., Tsui K.W. *J. Comput. Biol.*, **8**, 37 (2001).
8. Brown C.S., Goodwin P.C., Sorger P.K. *Proc.Natl.Acad.Sci.*, **98**, 8944 (2001).
9. Tseng G.C., Oh M.-K., Rohlin L., Liao J.C., Wong W.H. *Nucl. Acids Res.*, **29**, 2549 (2001).
10. Zasadinski J. A. *Science*, **263**, 1726 (1994).
11. Palanker D., Lewis A. *Biophys. J.*, **60**, 1147 (1991).
12. Piner R. D., Zhu J., Xu F., Hong S., Mirkin C. A. *Science*, **283**, 661 (1999).
13. Lee K.-B. *Science*, **295**, 1702 (2002).