### 20

# Диагностика вирусов с использованием интерференционных пленок Фабри-Перо макропористого кремния

© К.А. Гончар,<sup>1</sup> Н.Ю. Саушкин,<sup>2</sup> И.И. Циняйкин,<sup>1</sup> А.А. Елисеев,<sup>2,3</sup> А.С. Гамбарян,<sup>4</sup> Ж.В. Самсонова,<sup>2</sup> Л.А. Осминкина<sup>1</sup>¶

<sup>1</sup> Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, физический факультет,

119991 Москва, Россия

<sup>2</sup> Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, химический факультет,

119991 Москва, Россия

<sup>3</sup> Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, факультет наук о материалах,

119991 Москва, Россия

<sup>4</sup> 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 nm 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 nm 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: 10.21883/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  $\leq 2$  nm, мезо-ПК для пор диаметром 2–50 nm, макро-ПК для пор диаметром  $\geq 50$  nm [3]. Принцип передачи сигнала может быть основан на таких важных харак-

теристиках ПК, как чувствительность его фотолюминесцентных свойств к составу поверхности [4], когда адсорбция химических [4,5] или биологических молекул [6] приводит к изменению интенсивности и времени жизни фотолюминесценции. 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 (c-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 определённых 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 A 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 с-Si проводимости *p*-типа с кристаллографической ориентацией (100) и удельным сопротивлением 1-5 mOm·cm в растворе плавиковой кислоты (HF) и этанола (C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH) в соотношении 1:3 в тефлоновой ячейке при плотности тока травления 50 mA/cm<sup>2</sup>. Исходные пластины с-Si перед травлением были очищены от поверхностного оксида путём погружения в 5М НF. Для получения однородных пленок макро-ПК использовали метод "жертвенного травления" [18]. Для этого первый протравленный в течение 30 s пористый слой удалялся с поверхности с-Si путем погружения подложки с пленкой в раствор 2M NaOH на 2 min. Затем подложка с-Si промывалась в дистиллированной воде и вновь травились в растворе HF:C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH в соотношении 1:3 2-3 min, где происходило итоговое формирование пленки макро-ПК.



**Рис. 1.** Микрофотографии РЭМ образца ПК: (*a*) вид сверху, (*b*) вид сбоку (на вставке представлена увеличенная область).

# 2.2. Неспецифическое и специфическое связывание вируса гриппа A с поверхностью наноструктур

В работе использовали вирус гриппа A (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  $50 \mu g/ml$  вируса гриппа A, 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  $37^{\circ}$ C.

Для специфического связывания вирусов разработана методика функционализации макро-ПК моноклональными антителами. Использовали моноклональные антитела к гемагглютинину H1 вируса гриппа A (клон IA139) (Хайтест, Москва), 3аминопропилтриэтоксисилан (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 тем-



**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.

пературе. Затем образцы тщательно промывали дистиллированной водой (5 раз) и инкубировали в растворе  $15 \,\mu$ g/ml специфических моноклональных антител в ФР (500  $\mu$ l/plate 5 × 5 mm) в течение 1 часа при комнатной температуре при перемешивании. Образцы промывали (3 раза в 650  $\mu$ l 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  $50 \,\mu$ g/ml вируса гриппа A, в течение 1 h. Затем пленки промывали 3 раза в ФР с 0.05% Твин-20 и высушивали в сушильном шкафу Binder при  $37^{\circ}$ 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 сm<sup>-1</sup> измеряли на спектрометре Perkin Elmer Lambda 950, оборудованном интегрирующей сферой.

Микрофотографии РЭМ образца макро-ПК, вид сверху и сбоку, представлены на рис. 1. Видно, что диаметр пор составляет около 100 nm (рис. 1, *a* 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  $2\mu$ m (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*<sub>eff</sub> = 1.3) согласно [19] формуле

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

где L — толщина пленки макро-ПК,  $\Delta k$  — расстояние между интерференционными пиками на рис. 2 (кривая I). Эффективную диэлектрическую проницаемость образцов  $\varepsilon_{\text{eff}}$ ) определяли по формуле

$$\varepsilon_{\rm eff} = n_{\rm eff}^2.$$
 (2)

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

$$f_{\text{air}} \frac{\varepsilon_{\text{eff}} - \varepsilon_{\text{air}}}{\varepsilon_{\text{eff}} + l(\varepsilon_{\text{air}} - \varepsilon_{\text{eff}})} + f_{\text{Si}} \frac{\varepsilon_{\text{eff}} - \varepsilon_{\text{Si}}}{\varepsilon_{\text{eff}} + l(\varepsilon_{\text{Si}} - \varepsilon_{\text{eff}})} = 0 \quad (3)$$

где  $\varepsilon_{air} = 1$  — диэлектрическая проницаемость воздуха,  $\varepsilon_{Si} = 11.8$  — 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. З 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. 4.** Микрофотографии РЭМ, вид сверху, пленок макро-ПК при неспецифическом (*a*) и специфическом (*b*) связывании вируса гриппа А.

объяснить отсутствием изменения  $n_{\rm eff}$  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



**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.

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 A 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 FFT 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

- M. Nirschl, F. Reuter, J. Vörös. Biosensors, 1(3), 70 (2011). DOI:10.3390/bios1030070
- 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).
   [Е.А. 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
- 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
- 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