

ОПИСАНИЕ ПОЛЕЗНОЙ МОДЕЛИ К ПАТЕНТУ

(12)

РЕСПУБЛИКА БЕЛАРУСЬ



НАЦИОНАЛЬНЫЙ ЦЕНТР
ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ
СОБСТВЕННОСТИ

(19) ВУ (11) 6049

(13) U

(46) 2010.02.28

(51) МПК (2009)

B 81B 1/00

B 82B 1/00

G 01N 33/543

C 12M 3/00

(54) ПОДДЕРЖИВАЮЩАЯ ПЛАТФОРМА ДЛЯ ФОРМИРОВАНИЯ ЛИПИДНОГО БИСЛОЯ В МЕМБРАННЫХ БИОСЕНСОРАХ

(21) Номер заявки: u 20090620

(22) 2009.07.15

(71) Заявители: Белорусский государственный университет; Учреждение образования "Белорусский государственный университет информатики и радиоэлектроники" (ВУ)

(72) Авторы: Драпеза Александр Иванович; Лабунов Владимир Архипович; Лобан Валерий Александрович; Ореховская Таиса Ивановна; Судник Юрий Михайлович; Лобко Эдвард Владимирович (ВУ)

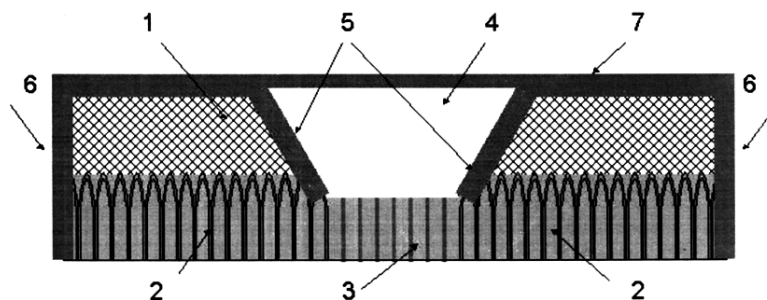
(73) Патентообладатели: Белорусский государственный университет; Учреждение образования "Белорусский государственный университет информатики и радиоэлектроники" (ВУ)

(57)

Поддерживающая платформа для формирования липидного бислоя в мембранных биосенсорах, содержащая сквозную нанопористую мембрану из оксида алюминия, отличающаяся тем, что поддерживающая платформа выполнена из алюминиевой фольги толщиной 200 мкм и содержит область сквозной нанопористости толщиной 10 мкм и диаметром 500 мкм, причем поверхность со стороны формирования липидного бислоя покрыта пленкой нанопористого оксида алюминия толщиной 10 мкм, а поверхность с обратной стороны алюминиевой фольги, содержащая стенки рабочего окна в области сквозной нанопористости, и торцы алюминиевой фольги по внешнему периметру поддерживающей платформы покрыты пассивирующей пленкой плотного анодного оксида алюминия толщиной 100 нм.

(56)

1. Mueller, P., D. O. Rudin, H. T. Tien, and W. C. Wescott. 1963. Methods for the formation of single bimolecular lipid membranes in aqueous solutions. J. Phys. Chem. 67:534-535.



Фиг. 1

BY 6049 U 2010.02.28

2. Peterman, M. C., J. M. Ziebarth, O. Braha, H. Bayley, H. A. Fishman, and D. M. Bloom. 2002. Ion channels and lipid bilayer membranes under high potential using microfabricated apertures. *Biomed. Microdevices*. 4:231-236.

3. Purrucker, O., H. Hillebrandt, K. Adlkofer, and M. Tanaka. 2001. Deposition of highly resistive lipid bilayers on silicon-silicon dioxide electrode and incorporation of gramicidin studied by AC impedance spectroscopy. *Electrochim. Acta*. 47:791-798.

4. Tien, H. T., and A. L. Ottova. 1998. Supported planar lipid bilayers (s-BLM) as electrochemical biosensors. *Electrochim. Acta*. 43:3587-3610.

5. Патент US 6863833, МПК В 81В 1/00; В 82В 1/00; В 82В 3/00, 2005.

6. Патент US 6306598, МПК С 12М 3/00; С 12М 3/00, 2006.

7. Baumgart, T., M. Kreiter, H. Lauer, R. Naumann, G. Jung, A. Jonczyk, A. Offenhausser, and W. Knoll. 2003. Fusion of small unilamellar vesicles onto laterally mixed self-assembled monolayers of thiolipeptides. *J. Colloid Interface Sci*. 258:298-309.

8. Terrettaz, S., M. Mayer, and H. Vogel. 2003. Highly electrically insulation tethered lipid bilayers for probing the function of channel proteins. *Langmuir*. 19:5567-5569.

9. Kaburaki T., Burnham M.R., Spencer M.G., Turner J., Xinquan Jiang, 2005. Fabrication of Nanoscale BLM Biosensors // 10705present.ppt (прототип).

Полезная модель относится к медицинской технике, а точнее к устройству поддерживающей платформы в мембранных биосенсорах, предназначенной для формирования липидных бислоев, обладающих долговременной стабильностью.

Известны поддерживающие платформы, на которых искусственно формируют липидные бислои мембраны, используемые для изучения механизмов функционирования плазматических мембран в модельных условиях [1-8].

В качестве поддерживающей платформы чаще всего используют тонкие пленки из тефлона [1], имеющие толщину, лежащую в пределах 5-25 мкм. Липидный бислой формируют на отверстиях, сделанных в данной пленке. Диаметр отверстий может лежать в диапазоне от 100 до 1000 мкм. На отверстие наносят каплю раствора липида в легколетучем растворителе (спирт, хлороформ, гептан и другие типы растворителей). Растворитель диффундирует из раствора в воду, и на отверстии остается пленка липида. Эта пленка спонтанно утончается практически до бимолекулярного слоя, средняя толщина которого составляет около 7 нм. Лишний липид собирается в виде ободка-торуса у краев отверстия. Электрическое сопротивление бислоиной липидной мембраны, сформированной в 0,5 моль/л KCl на такой поддерживающей платформе, составляет более 1 ГОм.

Однако в данной поддерживающей платформе возникают трудности создания отверстия для мембраны и эксплуатации тефлоновой пленки, в которой это отверстие проделано. Отверстие по краям должно быть тщательным образом отполировано, чтобы не возникало проблем при формировании на нем бислоя. Во время формирования липидного бислоя из капли раствора липида следует быть крайне осторожным, чтобы не повредить поверхность тефлоновой пленки. Кроме того, мембраны, сформированные на таких отверстиях, обладают крайне низкой прочностью. При малейших возмущениях водно-солевой среды ячейки, что обуславливается добавлением исследуемых реагентов, очень часто происходит разрыв мембраны, что повышает трудоемкость проводимых исследований при получении надежного результата.

Известны поддерживающие платформы для бислоиных липидных мембран на кремнии, поликарбонатной мембране, стекле, в которых методами микрообработки проделывают отверстия диаметром от 100 до 1 мкм [2].

Однако данные типы поддерживающих платформ обладают практически тем же набором недостатков, которые присущи поддерживающей платформе на основе тефлоновой мембраны.

Известны поддерживающие платформы на твердых подложках из стекла, кремния, слюды, платины и золота, на которые липидные бислои иммобилизуют либо осаждением монослоев, получаемых технологиями Ленгмюра-Блоджетт, либо осаждением, с использованием способов самосборки [3-6].

Принципиально липидные мембраны, поддерживаемые твердыми подложками, позволяют конструировать биосенсоры даже для скрининговых систем типа биочип. Однако практическая применимость этих мембран крайне ограничена их тесным соседством с поверхностью подложки, которая в большинстве случаев либо приводит к конформационным изменениям в структуре встраиваемого белка, изменяя его функциональные свойства, либо не позволяет встраивать в мембрану трансмембранные белки большого размера.

Известны поддерживающие платформы, которые расширяют функциональные возможности твердых подложек за счет использования буферных полимерных систем или гидрофильных прокладок, позволяющих увеличить расстояние между твердой подложкой и липидным бислоем [7].

Однако только увеличение расстояния не является достаточным условием для обеспечения свободы движения переносчикам заряда. Кроме того, в большинстве случаев не модифицированные белками фосфолипидные мембраны, сформированные на твердых подложках, имеют электрическую проводимость, обусловленную неравномерностью распределения плотности заряда на твердой поверхности поддерживающей платформы, что может быть вызвано механическими поверхностными деформациями. Этот факт практически исключает изучение очень слабой электрической проводимости, которая присуща одиночным каналам.

Известны поддерживающие платформы, которые исключают влияние поверхностных деформаций за счет пассивации твердой подложки тонким слоем золота, на которую в последующем проводят гибридную иммобилизацию липидного бислоя к поверхности пленки из золота [8]. Гибридная иммобилизация значительно расширяет расстояние между встроенными в бислой белками и поверхностью твердой подложки. Такой способ гибридной иммобилизации позволяет получить такие значения удельного сопротивления липидной мембраны, которые дают возможность использовать данные структуры для регистрации электрической проводимости, обусловленной отдельными белками.

Однако такого рода поддерживающие платформы содержат драгметаллы (золото, платина), в силу чего для одноразовых применений не являются перспективными.

Известны поддерживающие платформы для формирования липидного бислоя в мембранных биосенсорах на основе нанопористой пленки оксида алюминия. Пленки оксида алюминия формируют на подложках из кремния или кварцевого стекла при различных технологических режимах [9]. Результаты исследования, приведенные в работе [9], показывают, что некоторые поддерживающие платформы на основе нанопористого оксида алюминия, имеющие в качестве основы кремниевый вафер, могут быть использованы при изучении механизмов электрической проводимости плазматических мембран. Такие поддерживающие платформы имеют удельное сопротивление на порядок выше, чем удельное сопротивление немодифицированной липидной мембраны.

В то же время существует ряд объективных трудностей изготовления поддерживающей платформы на основе кремниевого вафера, которые связаны с травлением кремниевого вафера. Во-первых, химическое травление в растворах плавиковой кислоты является изотропным, что ограничивает возможности данного метода при получении нужной структуры в области сквозной нанопористости за счет подтравливания кремния под маской. Во-вторых, сухое травление диоксида кремния SiO_2 имеет максимальную скорость травления 100 нм в минуту. Для травления диоксида кремния толщиной 500 мкм требуется время не менее 5000 минут, или около 3,5 суток.

Наиболее близким техническим решением к заявляемому устройству является поддерживающая платформа на основе кварцевого стекла [9], в котором с помощью лазера

продельывают сквозное отверстие диаметром 100 мкм. После этого берут кремниевую подложку, на одной из поверхностей которой методами вакуумного напыления создают тонкую алюминиевую пленку. Затем известными методами анодирования алюминия создают сквозную нанопористую структуру из оксида алюминия, вплоть до кремниевой поверхности. Затем со стороны полученной нанопористости наносят слой полиимида или клеящего воска, с помощью которого, путем нагревания и прижима, приклеивают полученную нанопористую структуру на кремниевой подложке к кварцевому стеклу. После чего, используя известные технологии сухого ионно-плазменного травления, удаляют кремниевую подложку и тонкий слой полимера с обратной стороны нанопористости в алюминиевой фольге. Тем самым создают для мембранного биосенсора область сквозной нанопористости, на которую методами самосборки или технологиями Ленгмюра-Блоджетт может наноситься липидный бислой со стороны поверхности алюминиевой фольги.

Однако полученная таким образом поддерживающая платформа, хотя и отличается повышенной надежностью при практическом использовании, имеет электрические параметры, удовлетворяющие требованиям изучения низких значений электрической проводимости через липидный бислой, но для одноразовых применений технология ее изготовления является достаточно трудоемкой и дорогостоящей. При этом качество изготовления такого рода поддерживающей платформы зависит не только от электрических свойств нанопористого оксида алюминия, но и от электрофизических свойств используемых побочных материалов и технологий сборки всей конструкции поддерживающей платформы на основе этих материалов.

Задачей полезной модели является создание поддерживающей платформы для формирования липидного бислоя в мембранных биосенсорах на основе алюминиевой фольги и технологий анодирования алюминия, значения электрической проводимости которой значительно ниже электрической проводимости немодифицированного липидного бислоя, а стоимость изготовления делает ее пригодной для одноразовых применений.

Поставленная задача реализуется тем, что поддерживающая платформа для формирования липидного бислоя в мембранных биосенсорах, содержащая сквозную нанопористую мембрану из оксида алюминия, выполнена из алюминиевой фольги толщиной 200 мкм и содержит область сквозной нанопористости толщиной 10 мкм и диаметром 500 мкм, причем поверхность со стороны формирования липидного бислоя покрыта пленкой нанопористого оксида алюминия толщиной 10 мкм, а поверхность с обратной стороны алюминиевой фольги, содержащая стенки рабочего окна в области сквозной нанопористости, и торцы алюминиевой фольги по внешнему периметру поддерживающей платформы покрыты пассивирующей пленкой плотного анодного оксида алюминия толщиной 100 нм.

Сущность полезной модели поясняется фиг. 1-6.

На фиг. 1 приведен поперечный разрез заявляемой полезной модели устройства поддерживающей платформы.

На фиг. 2 приведен технологический маршрут изготовления поддерживающей платформы для мембранного биосенсора.

На фиг. 3 приведено РЭМ-изображение фронтальной поверхности (а) и РЭМ-изображение поперечного скола (б) в области рабочего окна 4 изготовленной поддерживающей платформы.

На фиг. 4 приведено схематичное представление ячейки для мембранного биосенсора, работающую совместно с заявляемой поддерживающей платформой.

На фиг. 5 приведены типичные вольт-амперные характеристики (ВАХ) мембранного биосенсора, поддерживающая платформа которого в области сквозной пористости не модифицирована (зависимость 1) и модифицирована (зависимость 2) бислоем из амфифильных молекул стеариновой кислоты. ВАХ на сопротивлении 1 ГОм представлена зависимостью вида 3.

На фиг. 6 приведены типичные ВАХ мембранного биосенсора после смывки бислойной пленки с поддерживающей платформы (зависимость 1) и повторной модификации (зависимость 2) бислоем из амфифильных молекул стеариновой кислоты. ВАХ на сопротивлении 1 ГОм представлена зависимостью вида 3.

Заявляемая полезная модель поддерживающей платформы, представленная на фиг. 1, содержит алюминиевую фольгу 1, покрытую со стороны формирования липидного бислоя пассивирующей пленкой нанопористого оксида алюминия 2, область сквозной нанопористости 3, рабочее окно 4, при этом вся поверхность обратной стороны поддерживающей платформы, включая стенки 5 рабочего окна 4 и торцевые части 6 алюминиевой фольги 1, покрыта пассивирующей пленкой плотного анодного оксида алюминия 7.

Принципы создания заявляемой полезной модели поддерживающей платформы показаны на фиг. 2, где приведен технологический маршрут изготовления поддерживающей платформы. Для этого используют алюминиевую фольгу 1 (фиг. 2а) толщиной 0,2 мм и размером 1,4×1,4 см, в которой содержится не менее 99,99 % алюминия. Чистота поверхности доводится методом электрохимической полировки в смеси раствора, содержащего этиловый спирт и хлорную кислоту в соотношении 5 : 1, до значения не менее 13-го класса. При этом используются следующие режимы обработки алюминиевой фольги: температура 15 °С, плотность тока 300 мА/см², продолжительность времени до получения зеркальной поверхности составляет приблизительно 15 мин.

Область сквозной нанопористости в рабочем окне 4 поддерживающей платформы, имеющей диаметр 500 мкм, формируют следующим образом. Вначале проводят первое электрохимическое анодирование алюминиевой фольги (фиг. 2б). Анодирование выполняется в стационарном установившемся режиме в течение 60 мин со стороны формирования липидного бислоя. Технологические режимы анодирования: 0,5 моль/л водный раствор щавелевой кислоты, температура 12 °С, постоянное напряжение 63 В. При этом проводится контроль результирующего тока анодирования с помощью амперметра. Сформированный при данных режимах слой пористого анодного оксида алюминия затем удаляют (фиг. 2в), чтобы получить матрицу-шаблон при последующем формировании высокоупорядоченной нанопористой структуры. Технологические режимы удаления: 30 % водный весовой раствор фосфорной кислоты и 10 % водный весовой раствор хромовой кислоты, температура 80-90 °С, время травления 20 минут, промывка в дистиллированной проточной воде в течение 30 минут.

После этого проводят второе электрохимическое анодирование алюминиевой фольги 1 (фиг. 2г). Технологические режимы анодирования те же, что и при первом анодировании. После окончания процесса анодирования поддерживающую платформу промывают в проточной дистиллированной воде в течение 2 минут. Затем сушат в термостате при 200 °С в течение 10 минут. Полученная при этом высокоупорядоченная нанопористая пассивирующая пленка 2 анодного оксида алюминия имеет следующие усредненные параметры: диаметр пор - 63 нм, расстояние между порами - 155 нм, толщина пленки пористого анодного оксида алюминия - 10 мкм.

После формирования высокоупорядоченной нанопористой пассивирующей пленки 2 из оксида алюминия со стороны формирования липидного бислоя на противоположной стороне поддерживающей платформы формируют рабочее окно 4 диаметром 500 мкм фотолитографическими методами (фиг. 2д) и химическим травлением алюминия в окне литографической маски (фиг. 2е). Технологические режимы вытравливания рабочего окна 4 в поддерживающей платформе следующие: 15 % водный весовой раствор соляной кислоты и 0,5 % весовых хлорной меди, температура 20 °С, продолжительность травления 20-25 минут, промывка в дистиллированной проточной воде в течение 2 минут, сушка в термостате при 200 °С в течение 10 минут.

После вытравливания в поддерживающей платформе рабочего окна 4 приступают к созданию сквозной нанопористости в рабочем окне 4 путем удаления барьерного слоя в

пассивирующей пленке 2 нанопористого анодного оксида алюминия методами ионно-лучевого травления (фиг. 2ж). Технологические режимы ионно-лучевого травления следующие: ток ионного пучка - 2 А, ускоряющее напряжение - 0,15 кВ, скорость травления 4-5 нм/мин, рабочий газ аргон, время травления - 15 минут.

После удаления в рабочем окне 4 поддерживающей платформы барьерного слоя с этой же стороны проводят плотное анодирование всей алюминиевой поверхности поддерживающей платформы, включая стенки 5 рабочего окна 4, кроме области сквозной нанопористости. Технологические режимы плотного анодирования следующие: 1 % водный весовой раствор лимонной кислоты, температура 20 °С, постоянное напряжение 110 В, время анодирования 3 минуты (фиг. 2з). После этого поддерживающую платформу промывают в проточной дистиллированной воде в течение 2 минут и сушат в термостате при 200 °С в течение 10 минут. РЭМ-изображения участка фронтальной поверхности и поперечного скола в области рабочего окна 4 поддерживающей платформы, которая изготовлена согласно приведенному на фиг. 2 технологическому маршруту, показаны на фиг. 3а б.

Для физического моделирования условий работы клеточной мембраны на основе разработанной полезной модели поддерживающей платформы 8 используют две фторопластовые полуячейки 11, находящиеся на дюралевом держателе 9, имеющем два поджимных винта 10. Поддерживающую платформу 8 помещают между двух фторопластовых полуячеек 11 и прижимают их с двух сторон к поддерживающей платформе 8 с помощью поджимных винтов 10, как схематично показано на фиг. 4.

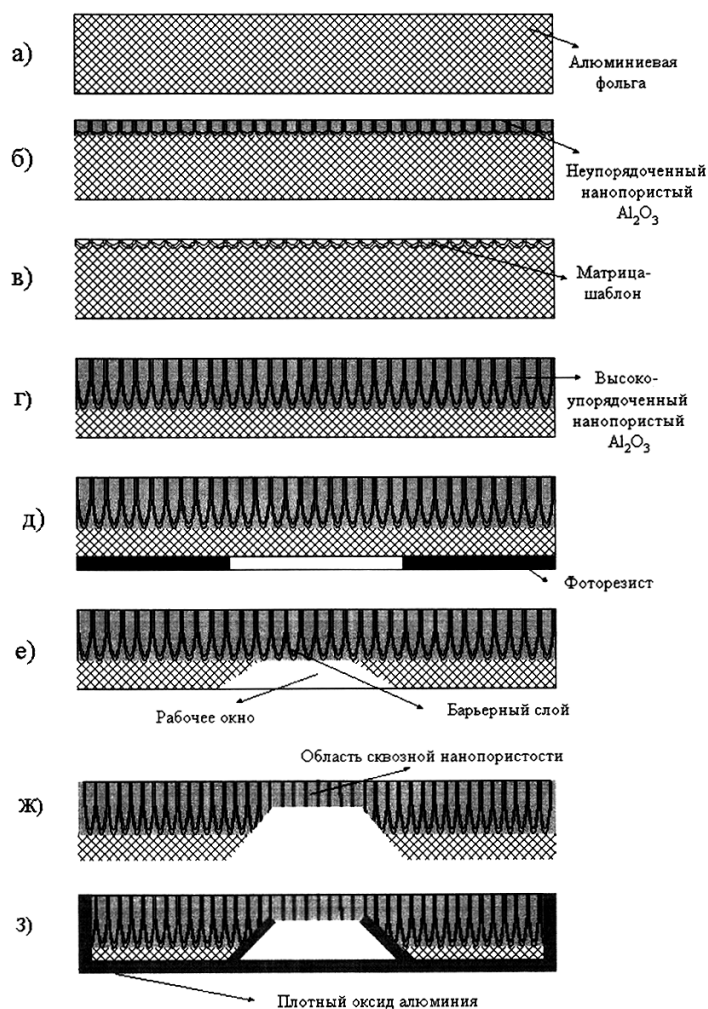
Работоспособность заявляемой поддерживающей платформы 8 была проверена следующим образом. Вначале была собрана конструкция мембранного биосенсора на основе поддерживающей платформы 8 без модификации ее поверхности бислойной пленкой 14 из амфифильных молекул стеариновой кислоты. С двух сторон поддерживающей платформы в ячейки был добавлен 0,15 М раствор NaCl, и с помощью платинированных электродов 12 и системы измерения вольт-амперных характеристик (ВАХ) 13 были зарегистрированы ВАХ в области измерения пикоамперных токов при изменении напряжения в течение 30 секунд от минус 300 до + 300 мВ. Результаты этих измерений представлены зависимостью 1 на фиг. 5. Из представленной на фиг. 5 зависимости 1 видно, что без модификации поддерживающей платформы бислойной пленкой из амфифильных молекул стеариновой кислоты наблюдается значительная проводимость мембраны, которая фактически выражается в выходе за пределы шкалы измерений значений тока на данной чувствительности прибора при изменении напряжения от минус 300 до + 300 мВ. При приближении изменяющихся значений напряжения в минусовой области к нулевому значению наблюдается кратковременный провал тока к нулевому значению, после чего скачкообразно происходит выход значения тока за пределы шкалы измерений. Кратковременный провал связан, очевидно, с отсутствием проводимости электрического тока через мембрану при данных значениях прикладываемого напряжения. Затем поверхность поддерживающей платформы 8 была модифицирована бислойной пленкой из амфифильных молекул стеариновой кислоты, которую формировали по технологии Лэнгмюра-Блоджетт на поверхности 0,15 М водного раствора NaCl из раствора стеариновой кислоты в нонане. Результаты этих измерений представлены зависимостью 2 на фиг. 5. Для оценки электрического сопротивления мембраны аналогичные измерения были проведены на калибровочном сопротивлении 1 ГОм, которые представлены зависимостью 3 на фиг. 5. Из полученных зависимостей видно, что электрическое сопротивление бислоя, состоящего из амфифильных молекул стеариновой кислоты, лежит в пределах 1 ГОм, что характерно для такого типа мембран.

После промывки в нонане и дистиллированной воде поддерживающей платформы 8 были проведены аналогичные измерения ВАХ, результаты которых приведены на фиг. 6. Из приведенных на фиг. 6 результатов измерений можно сделать вывод о том, что полученные результаты фактически аналогичны предыдущим, с той лишь разницей, что раз-

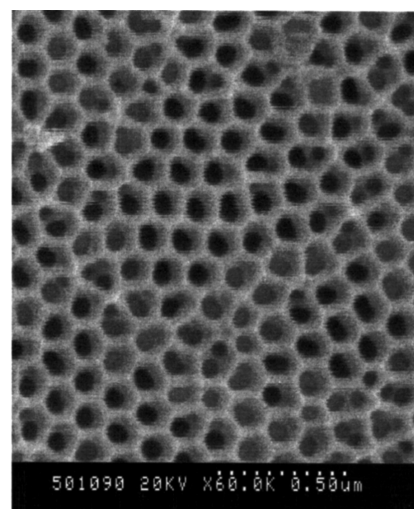
брос значений тока модифицированной поверхности незначительно выше при повторной модификации поверхности поддерживающей платформы 8 бислойной пленкой 14 из амфифильных молекул стеариновой кислоты.

Полученные в результате проведенных исследований высокие значения электрического сопротивления немодифицированных бислойных мембран, формируемые на разработанной конструкции поддерживающей платформы из амфифильных молекул стеариновой кислоты, показывают принципиальные возможности создания мембранных биосенсоров на основе липидного бислоя для изучения механизмов проводимости плазматических мембран.

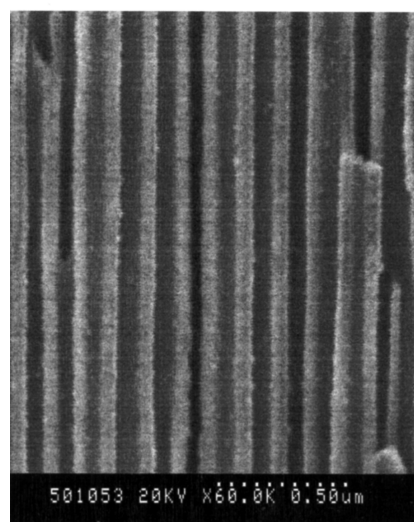
Таким образом, решена задача создания конструкции механически прочной поддерживающей платформы на основе алюминиевой фольги только технологиями анодирования алюминия, позволяющая значительно снизить ее стоимость, что дает возможность использовать такого рода платформы для одноразовых применений.



Фиг. 2

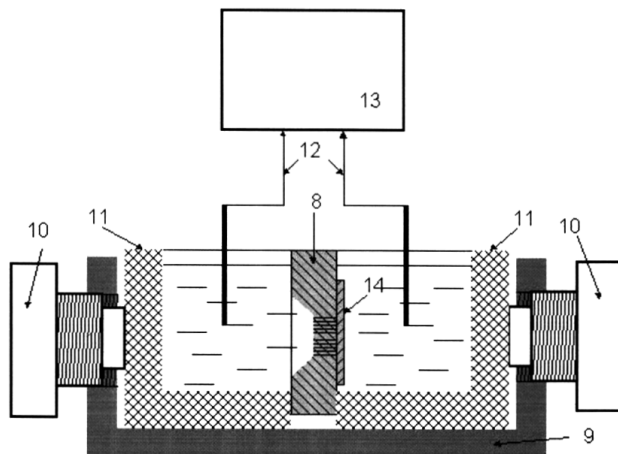


а)

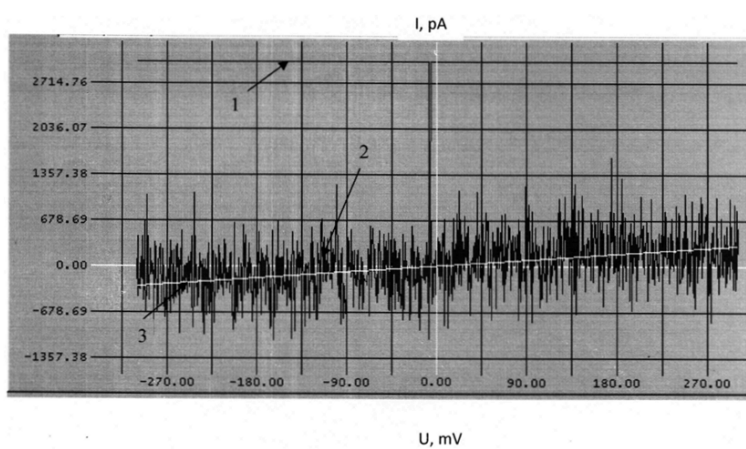


б)

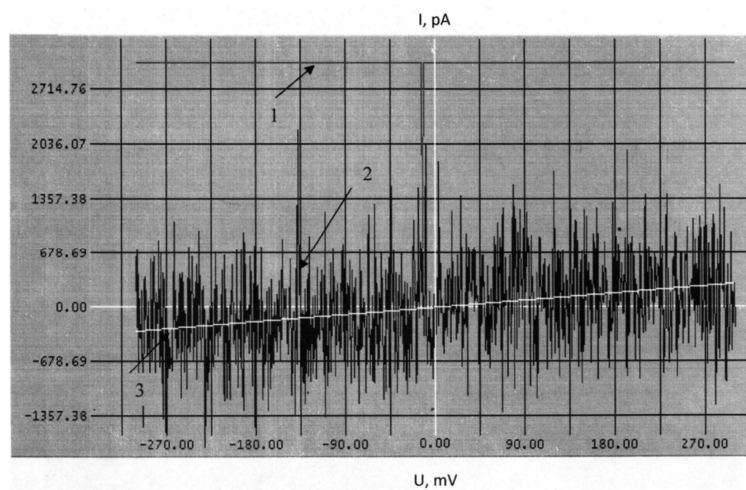
Фиг. 3



Фиг. 4



Фиг. 5



Фиг. 6