



# ДЕТЕКЦИЯ ВИРУСОВ С ПОМОЩЬЮ ПЬЕЗОЭЛЕКТРИЧЕСКИХ КАНТИЛЕВЕРОВ

## DETECTION OF VIRUSES USING PIEZOELECTRIC CANTILEVERS

Г.Киселев\*, П.Горелкин\*, А.Ерофеев\*, Д.Колесов\*, И.Яминский\* / [yaminsky@nanoscopy.ru](mailto:yaminsky@nanoscopy.ru)  
G.Kiselev\*, P.Gorelkin\*, A.Erofeev\*, D.Kolesov\*, I.Yaminsky\*

Быстрый прямой анализ вируса гриппа А в жидкой среде может выполняться с помощью пьезоэлектрического кантилевера с рецептором, модифицированным гликополимером, который содержит сиаловые группы, специфичные к белку оболочки вируса. При помещении кантилевера в раствор вируса в аллантаической жидкости наблюдался положительный сдвиг резонансной частоты продольной моды колебаний кантилевера. Положительный результат прямого измерения без использования меток был достигнут в течение 10 мин без длительной пробоподготовки, что говорит о простоте метода.

Rapid direct analysis of influenza A virus in a liquid medium may be performed using a piezoelectric cantilever with a glycopolymer-modified receptor containing sialic groups that are specific to the protein of the viral envelope. When placing a cantilever in the solution of a virus in allantoic fluid, a positive shift is observed in the resonance frequency of the longitudinal vibrations of the cantilever. A directly measured positive result without any labels was achieved within 10 min without a lengthy sample preparation, which indicates the simplicity of the method.

**К** современным сенсорным системам предъявляются экстремально высокие требования. К их критическим характеристикам можно отнести параметр предела чувствительности, линейные размеры датчика и скорость анализа. Во всем многообразии датчиков можно выделить активно развивающийся подкласс микроэлектромеханических систем (МЭМС) – различного рода резонаторов, наноамплитудные колебания в которых возбуждаются под действием переменного электромагнитного поля. Резонанс в таких системах напрямую зависит от их геометрической топологии. По своей сути МЭМС – это маятники, пружины, струны или мембраны, имеющие собственные частоты на различных гармониках.

Примером оригинального применения для получения научного результата хорошо известного из часовых механизмов резонатора кварцевой вилки может быть работа под руководством Франца Гизибла [1]. Нанокосебания, возникающие в кварцевой вилке, которая служит

для задания опорной частоты, очень пригодились сотрудникам университета Аугсбурга. Они предложили использовать вилку в качестве туннельного микроскопа, прикрепив на ее конец срез платиновой проволоки. Игла из проволоки служила щупом поверхности монокристаллического кремния (рис.1). Благодаря высокой добротности кварцевого резонатора атомную структуру кремния удалось разрешить с точностью до нескольких долей ангстрем.

### МЭМС В КОНТРОЛЕ БАКТЕРИЙ И ВИРУСОВ

Все чаще делаются попытки использовать МЭМС в качестве датчиков на бактерии и вирусы. Последние достаточно хорошо характеризуются различными методами микроскопии, ПЦР, а также рамановскими спектрометрами, однако применять эти методы в повседневной жизни и интегрировать в бытовую технику практически невозможно. У МЭМС в этом отношении есть несравненные преимущества: их размер, а также простая система

\* Химический факультет МГУ им. М.В.Ломоносова, НПП "Центр перспективных технологий" / Faculty of Chemistry of Lomonosov Moscow State University, Advanced Technologies Center

считывания электрического сигнала с датчика с применением широко используемых электронных компонентов.

Крайне актуальное направление для бытового применения микромеханических датчиков – контроль бактерий и вирусов, вызывающих распространенные заболевания, такие как грипп и пневмония.

На данный момент технологии позволяют создавать МЭМС, способные измерять отдельные вирусные частицы с чувствительностью  $10^{-19}$  г/Гц [2] (рис.2а). В работе [3] было экспериментально продемонстрировано измерение массы вируса вакцины оспы величиной в 9,5 фг с использованием резонатора кантилеверного типа шириной 1,8 мкм и длиной 4 мкм (рис.2b).

За последнее десятилетие произошел критический прорыв в разработке микромеханических сенсорных систем с рекордными показателями чувствительности по массе [2] и количеству связавшегося анализируемого вещества [4]. Данные системы используют принципиально новый метод преобразования биохимических реакций в аналитический сигнал через статические деформации, возникающие

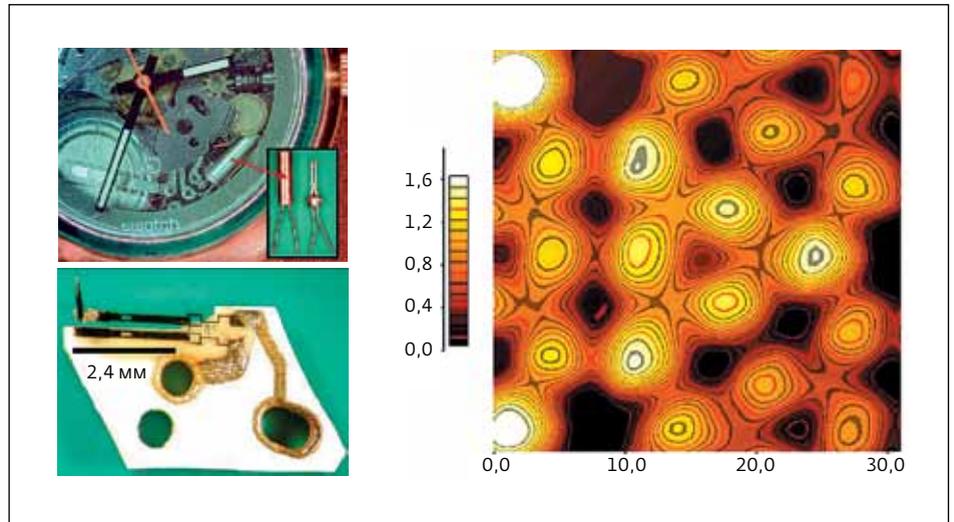


Рис.1. Кварцевая вилка из наручных часов с приклеенной проволокой (слева) дает возможность увидеть атомную структуру монокристалла кремния (справа)

Fig.1. Used in wristwatch quartz crystal resonator with glued wire (left) allows to see the atomic structure of monocrystalline silicon (right)

в результате тепловых, электростатических и энтропийных эффектов внутри рецепторного слоя и структур МЭМС. При широком спектре операционных режимов (статический, динамический, контроль добротности и амплитуды аналитического сигнала) МЭМС являются полноценным дополнением электрохимических, оптических и акустических датчиков. Кроме того, комбинации различных схем регистрации аналитического сигнала позволяют оптимизировать работу МЭМС практически в любой среде [5]: вакууме, газовых и жидких фазах вещества. Микроскопические размеры

**M**odern sensor systems must meet extremely high requirements. Their critical characteristics include such parameters as a detection threshold, linear size of the sensor and speed of assays. In all the variety of sensors, we make a special note of the rapidly growing subclass of microelectromechanical systems (MEMS) with different kinds of resonators, in which nano-amplitude vibrations occur due to the alternating electromagnetic field. The resonance in such systems directly depends on their geometric

topology. Essentially, MEMS are pendulums, springs, strings or membranes with their specific frequencies at different harmonics.

A good example of special application of the quartz resonator fork, which is well-known from the clock mechanisms, to obtain a scientific result is the experiment carried out under the guidance of Franz Giessibl [1]. The nano-vibrations occurring in a quartz fork, which were used for setting a reference frequency, appeared very useful for the employees of the University of Augsburg.

They proposed using the fork as a tunneling microscope by attaching a piece of platinum wire to its end. The needle made from the wire served as a probe of the surface of the monocrystalline silicon (fig.1). Due to the high quality factor of the quartz resonator, the atomic structure of the silicon was determined with a precision of a few fractions of an angstrom.

#### **MEMS IN THE CONTROL OF BACTERIA AND VIRUSES**

Increasingly, attempts are being made to use MEMS as sensors for

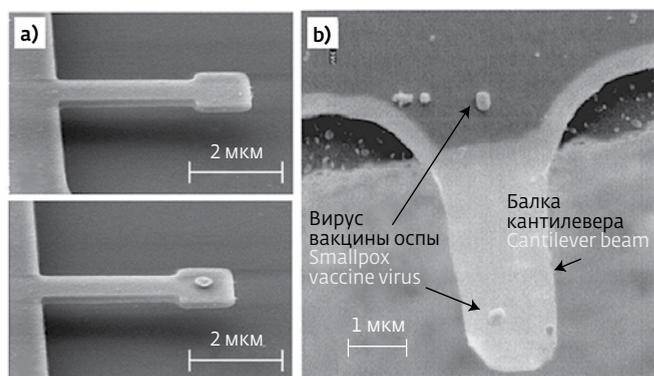


Рис.2. Слева – микрокантилеверы с чувствительностью измерения массы  $10^{-19}$  г/Гц [3], справа – кантилевер, способный измерить массу одной вирусной частицы [2]

Fig.2. Left – microcantilever with the sensitivity of the mass measurement  $10^{-19}$  g/Hz [3], right – cantilever, capable to measure the mass of a single virus particle [2]

сенсорных устройств дают возможность понизить предел их чувствительности до размеров отдельных бактерий [6] и вирусных частиц [2, 3].

В большом числе публикаций рассматривается использование для детекции вирусов резонансных датчиков различного типа. Самыми распространенными из них являются микровесы на основе кварцевого кристалла [7, 8, 9], а также датчик на основе эффекта поверхностных акустических волн в пьезокристалле [10]. В новых разработках также пред-

лагается использовать емкостные микромеханические ультразвуковые преобразователи [11] и мембранные пьезоакустические резонаторы [12]. Все эти методы эффективны и, как правило, сводятся к контролю резонансной частоты МЭМС. В самых простых случаях для МЭМС справедлива формула гармонического осциллятора, из которой следует, что уменьшение собственной частоты системы пропорционально корню из присоединенной массы. Однако в некоторых случаях чувствительность МЭМС зависит не только от эффекта присоединенной массы, но и от напряжений, возникающих в рецепторе датчика в результате присоединения аналита. Напряжения ведут к увеличению жесткости системы и являются альтернативой присоединению массы для регистрации изменения резонансной частоты [13].

#### АНАЛИЗ ВИРУСНЫХ ЧАСТИЦ С ПРИМЕНЕНИЕМ ПЬЕЗОКЕРАМИЧЕСКОГО КАНТИЛЕВЕРА

Совместной лабораторией LG Electronics и МГУ им. М.В.Ломоносова была проведена экспериментальная работа по анализу вирусных частиц в жидкой среде посредством пьезокерамического кантилевера (рис.3).

Кантилевер размерами  $2 \times 3$  мм был вырезан с помощью алмазного диска из композитной мембраны, состоящей из 60-микронного слоя латуни и 50-микронного слоя PZT-керамики, покрытого серебряной пленкой. Кантилевер на две минуты был помещен в раствор сер-

bacteria and viruses. The latter ones are quite well characterized by various methods of microscopy, PCR, and Raman spectrometers. However, applying these methods in everyday life and integrating them into small appliances is practically impossible. MEMS in this regard have unsurpassed advantages: they have a small size and a simple system of reading an electrical signal from the sensor with ordinary electronic components.

An extremely relevant use of micromechanical sensors could be controlling bacteria and viruses that cause common

diseases, such as influenza and pneumonia.

The current technologies allow the creation of MEMS that can measure individual viral particles with a sensitivity of  $10^{-19}$  g/Hz [2] (fig.2a). The study [3] experimentally demonstrated the measurement of a virus mass of the vaccinia virus with a weight of 9.5 femtograms using a cantilever type resonator with a  $1.8 \mu\text{m}$  width and a  $4 \mu\text{m}$  length (fig.2b).

In the past decade, a critical breakthrough was made in the design of micromechanical sensor systems with the highest levels of sensitivity by the mass [2]

and amount of the attached analyte [4]. These systems use a fundamentally new method of converting biochemical reactions into analytical signals through a static deformation resulting from thermal, electrostatic and entropic effects inside the receptor layer and the MEMS structures. With a wide range of operating modes (static, dynamic, control of the Q-factor and amplitude of the analytical signal), MEMS are an excellent complement for electrochemical, optical and acoustic sensors. Besides, the combinations of various schemes for recording the analytical signal

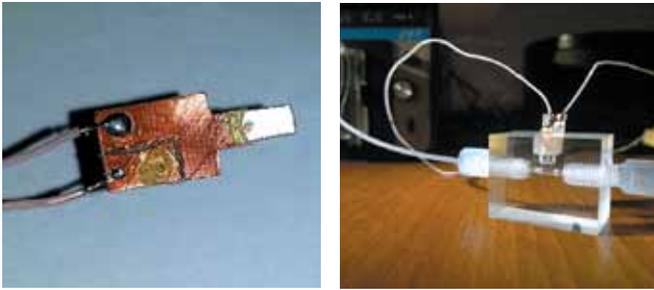


Рис.3. Слева – пьезокерамический кантилевер, справа – кантилевер, помещенный в проточную жидкостную ячейку, которая соединена замкнутым контуром трубок с перистальтическим насосом

Fig.3. Left – piezoceramic cantilever; right – cantilever, placed in a flow-through liquid cell, which is connected through a closed loop of tubing with a peristaltic pump

ной кислоты в 37% растворе перекиси водорода 1 : 1, промыт в 98% этаноле и в течение 16 час, инкубировался в растворе 4-аминотиофенола  $10^{-3}$  М в этаноле. После инкубации и последовательной промывки в этаноле и в воде он был помещен в водный раствор сиалового гликополимера на 12 час. Затем на поверхности рецептора была сформирована пленка, содержащая гликополимерные группы, специфичные гемагглютиниру – белку оболочки вируса гриппа А A/Duck/Moscow/4182/2008 (Институт полиомиелита и вирусного энцефалита РАМН, Москва), который использовался в данной работе.

Вирус гриппа А был получен путем 10-дневного инфицирования эмбриона цыпленка в курином яйце с последующим извлечением из яйца аллантоисной жидкости. Изначальная концентрация вируса в аллантоисной жидкости составляла около  $1 \cdot 10^8$  вирионов/мл. Тестовый раствор с концентрацией  $1 \cdot 10^6$  вирионов/мл был подготовлен путем разведения изначального раствора в 100 раз в неинфицированной аллантоисной жидкости.

Измерения проводились на продольной моде колебаний кантилевера в аллантоисной жидкости. Продольная мода, в отличие

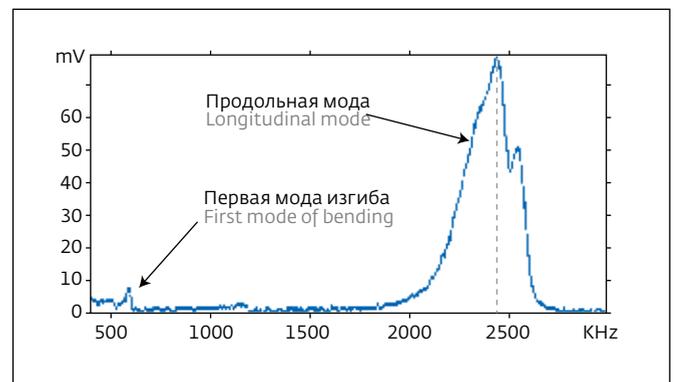


Рис.4. Амплитудно-частотная характеристика кантилевера, полученная с использованием электроники сканирующего зондового микроскопа "Фемтоскан"

Fig.4. The amplitude-frequency characteristic of the cantilever obtained using electronics of FemtoScan scanning probe microscope

help to optimize the performance of MEMS in practically any environment [5]: vacuum, gas and liquid phases of a substance. The microscopic size of sensing devices allows lowering the threshold of their sensitivity to the size of an individual bacteria [6] and a viral particle [2, 3].

Numerous publications describe the use of various resonant sensors for virus detection. The most common sensors are quartz crystal based microbalances [7, 8, 9] and sensors based on the effect of surface acoustic waves in a piezoelectric crystal [10]. In new developments,

it is also proposed to use capacitive micromechanical ultrasonic transducers [11] and membrane piezo-acoustic resonators [12]. All these methods are effective and, as a rule, are related to controlling the resonant frequency of MEMS. In the simplest case, MEMS follow the harmonic oscillator formula, in which the reduction of the system's own frequency is proportional to the square root of the attached mass. However, in some cases, the sensitivity of the MEMS depends not only on the effect of the attached mass, but also on the strain occurring in the receptor of the

sensor with the attachment of the analyte. Strains result in increasing stiffness of the system and can be used alternatively to attaching masses for recording resonant frequency changes [13].

#### ANALYSIS OF VIRAL PARTICLES USING A PIEZOELECTRIC CANTILEVER

The joint laboratory of LG Electronics and Lomonosov Moscow State University carried out experiments for analysis of viral particles in a liquid medium by means of a piezoelectric cantilever (fig.3).

A  $2 \times 3$  mm cantilever was cut out with the help of a diamond

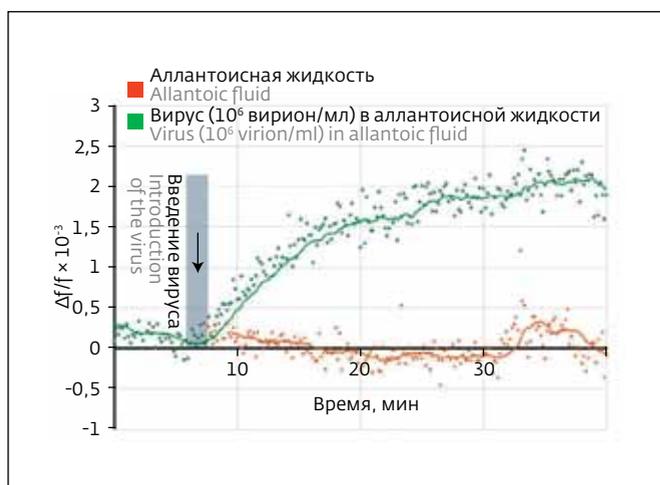


Рис.5. Изменение резонансной частоты продольной моды кантилевера во времени. Зеленая кривая соответствует системе, в которую был добавлен вирус, оранжевая кривая – нулевой пробе  
 Fig.5. The change in resonant frequency of the longitudinal mode of a cantilever in time. The green curve corresponds to the system infected with virus, the orange curve corresponds to the zero sample

от моды изгиба, имеет большую добротность в жидкости вследствие минимального трения кантилевера в среде. Частота продольной моды (рис.4) определялась с помощью электронного блока атомно-силового микроскопа "Фемтоскан" (НПП "Центр перспективных технологий", Москва, [www.nanoscopy.ru](http://www.nanoscopy.ru)).

Перед измерением кантилевер инкубировался в не содержащей вируса аллантоисной

жидкости в условиях потока. После того как средний дрейф ( $\Delta f/f$ ) устанавливался на уровне  $0,5 \cdot 10^{-3}$ , в систему добавлялся раствор вирусных частиц с концентрацией  $1 \cdot 10^6$  вирионов/мл.

Известно, что взаимодействие между вирусом и рецепторным слоем на поверхности датчика обуславливает дополнительные напряжения в пленке [14] или повышение эффективной жесткости системы в целом [13]. Это как раз и приводит к увеличению резонансной частоты. На данный момент мы получили положительное изменение резонансной частоты кантилевера при сорбции на его поверхность вирусных частиц из концентрации  $10^6$  вирион/мл (рис.5). Соотношение сигнал/шум при этом составило 5:1, что говорит о перспективности использования пьезокерамических кантилеверов в подобных приложениях.

Таким образом, можно заключить, что будущее развитие нанотехнологических биосенсоров, способных измерять массу отдельных вирусных частиц, а также слабые изменения напряжений в молекулярных пленках, может быть основано на микроэлектромеханических системах, которые уже демонстрируют хорошую чувствительность, компактность и простоту прямого анализа.

Работа проведена в совместной лаборатории LC Electronics и МГУ имени М.В.Ломоносова в рамках договоров № JM-02/2014 и № JY-01/2014. Авторы выражают благодарность сотрудникам института Полиомиелита

disc of a composite membrane consisting of a 60-micron layer of brass and 50-micron layer of PZT-ceramics covered with silver foil. The cantilever was placed for two minutes in a solution of sulfuric acid in a 37% solution of hydrogen peroxide 1:1, washed in 98% ethanol and was incubated for 16 hours in a solution of 4-aminothiophenol  $10^{-3}$  M in ethanol. After the incubation and sequential rinsing in ethanol and in water, it was placed into an aqueous solution of sialic glycopolymer for 12 hours. Then, the surface of the receptor developed a film containing

glycopolymers groups that are specific to the hemagglutinin, i.e. the protein of the influenza A viral envelope A/Duck/Moscow/4182/2008 (Chumakov Institute of Poliomyelitis and Viral Encephalitides of RAMS, Moscow), which was used in this work.

The influenza A virus was obtained by a 10-day infection of a chicken embryo in the egg with further extraction of allantoic fluid from the egg. The initial concentration of the virus in the allantoic fluid was about  $1 \cdot 10^8$  virions/ml. The test solution with a concentration of

$1 \cdot 10^6$  virions/ml was prepared by 100-fold diluting of the original solution in an uninfected allantoic fluid.

The measurements were carried out in a longitudinal vibration mode of the cantilever in allantoic fluid. The longitudinal mode, in contrast to the bending mode, has a high quality factor in a liquid due to the minimal friction of the cantilever in the medium. The frequency of the longitudinal mode (fig.4) was determined using an electronic unit of the FemtoScan atomic force microscope (Advanced Technologies

и вирусного энцефалита РАМН А.Гамбарян и А.Тузикову, а также Н.Бовину (ИБХ РАН) за подготовку вируса и синтез гликополимера. Отдельно авторы благодарят К.Квака и И.Бородину (LG Electronics).

#### ЛИТЕРАТУРА

1. **Giessibl F.J., Hembacher S., Bielefeldt H., Mannhart J.** Science 289, 422 (2000).
2. **Ilic B., Yang Y., Craighead H.G.** Virus detection using nanoelectromechanical devices // Appl. Phys. Lett. 2004. Vol. 85. No.13. P. 2604-2606.
3. **Gupta, Akin D., Bashir R.** Single virus particle mass detection using microresonators with nanoscale thickness // Appl. Phys. Lett. 2004. Vol. 84. No. 11. P.1976-1978.
4. **Yaminsky I., Gorelkin P., Kiselev G.** Concurrence of Intermolecular Forces in Monolayers // Japanese Journal of Applied Physics. 2006. Vol. 45. No. 3B. P. 2316-2318.
5. **Lavrik N.V., Sepaniak M.J., Datskos P.G.** Cantilever transducers as a platform for chemical and biological sensors // Rev. of Sci. Ins. 2004. Vol. 75. No. 7. P. 2229-2253.
6. **Ilic.** Using a nanomechanical cantilever and atomic force microscopy to measure bacterial cell mass // Microscopy and Analysis. 2003. P. 9.
7. **Peduru T.M. Hewa et al.** The detection of influenza A and B viruses in clinical specimens using a quartz crystal microbalance // Journal of Virological Methods 162 (2009) 14-21.
8. **Li et al.** A nanobeads amplified QCM immunosensor for the detection of avian influenza virus H5N1 // Biosensors and Bioelectronics 26 (2011) 4146-4154.
9. **Brockman L. et al.** QCM Aptasensor for Rapid and Specific Detection of Avian Influenza Virus // Open Journal of Applied Biosensor. 2013. 2. 97-103.
10. **Wang Y. et al.** Rapid detection of human papilloma virus using a novel leaky surface acoustic wave peptide nucleic acid biosensor // Biosensors and Bioelectronics 24 (2009) 3455-3460.
11. **Ramanaviciene Almira et al.** Capacitive micromachined ultrasound transducer (cMUT) for immunosensor design // Analyst. 2010. 135. 1531-1534.
12. **Nirschl Martin et al.** CMOS-Integrated Film Bulk Acoustic Resonators for Label-Free Biosensing // Sensors 2010. 10. 4180-4193; doi:10.3390/s100504180.
13. **Shih W.Y., Zhu Q., Shih W.-H.,** Length and thickness dependence of longitudinal flexural resonance frequency shifts of a piezoelectric microcantilever sensor due to Young's modulus change J. Appl. Phys. 2008 104, 074503.
14. **Godin M.; Tabard-Cossa V.; Miyahara Y.; Monga T.; Williams P.J.; Beaulieu L.Y.; Bruce Lennox R.; Grutter P.** Cantilever-based sensing: the origin of surface stress and optimization strategies. //Nanotechnology. 2010. 21(7). 75501.

Center, Moscow, [www.nanoscopy.ru](http://www.nanoscopy.ru)).

Before measurement, the cantilever was incubated in a flowing virus free allantoic fluid. After the mean drift ( $\Delta f/f$ ) was set at  $0.5 \cdot 10^{-3}$ , the system was injected a solution of viral particles with a concentration of  $1 \cdot 10^6$  virions/ml.

It is known that the interaction between the virus and the receptor layer on the sensor surface causes additional strain in the film [14] or an increased effective stiffness of the whole system [13]. This results in an increased resonance frequency.

By the moment, we have received a positive change in the resonant frequency of the cantilever during the sorption of viral particles on its surface from the solution with a concentration of  $10^6$  virion/ml (fig.5). The signal/noise ratio was 5:1, which means high prospects of using piezoelectric cantilevers in such applications.

Thus, we can conclude that the future development of nanotechnological biosensors measuring masses of individual virus particles and the small stress changes in molecular films can be based on microelectromechanical systems

that already demonstrate good sensitivity, compactness and simplicity of the direct analysis. ■

*The study was conducted in the joint laboratory of LG Electronics and Lomonosov Moscow State University in the framework of agreements No. JM-02/2014 and No. JY-01/2014. The authors thank the employees of the Chumakov Institute of Poliomyelitis and Viral Encephalitis of RAMS, A.Gambaryan and A.Tuzikov, as well as N.Bovin (IBCh of RAS), for the preparation of the virus and the synthesis of glycopolymer. Additionally, the authors thank K.Kvak and I.Borodina (LG Electronics).*