

К 55-ЛЕТИЮ ИНСТИТУТА СПЕКТРОСКОПИИ РАН (ИСАН)

ОБЗОРЫ АКТУАЛЬНЫХ ПРОБЛЕМ

Оптические методы детектирования единичных биомолекул: визуализация, сенсорика, секвенирование молекул ДНК

П.Н. Мелентьев, А.С. Калмыков, А.С. Гритченко, М.П. Шеметева, А.М. Сафонова, М.С. Марков, В.И. Балыкин, А.С. Букатин, Н.В. Ваулин, Д.А. Белов, А.А. Евстапов, Д.А. Баклыков, А.В. Андрияш, А.А. Барбашева, А.К. Кугук, В.В. Рыжков, И.А. Родионов, Д.С. Кудрявцев, В.А. Можаяева, Л.В. Сон, В.И. Цетлин, Б.Н. Хлебцов, М.С. Кобзев, Ю.О. Кузнецова, Б.Т. Шарипов, А.С. Яшкин, Я.И. Алексеев

*Представлен краткий обзор достигнутого уровня оптических методов детектирования единичных молекул в биомедицинских приложениях. Показано, что регистрация флуоресценции единичных молекул красителей, ковалентно связанных с антителами (биомолекулами), совместно с использованием современных методов наноплатоники может быть применена для решения различных задач в биологии и медицине: визуализации биомолекул, токсинов, вирусных частиц; определения ультрамалых концентраций аналитов на прямую во взятой пробе, без использования методов повышения концентрации аналита; оптического одномолекулярного секвенирования молекул ДНК. Приведено обсуждение существующих физических ограничений методов оптического детектирования и счёта единичных молекул, их влияние на решение существующих проблем биологии, медицины, генетики.*

**Ключевые слова:** наноплатоника, наноплатоника, сенсорика ультрамалых концентраций аналитов, детектирование единичных молекул, биовизуализация, волноводы нулевой моды, одномолекулярное секвенирование

PACS numbers: 07.60.-j, 32.50.+d, 87.64.-t

DOI: <https://doi.org/10.3367/UFNr.2024.07.039720>

П.Н. Мелентьев<sup>(1,\*)</sup>, А.С. Калмыков<sup>(1)</sup>, А.С. Гритченко<sup>(1)</sup>, М.П. Шеметева<sup>(1)</sup>, А.М. Сафонова<sup>(1)</sup>, М.С. Марков<sup>(1)</sup>, В.И. Балыкин<sup>(1)</sup>, А.С. Букатин<sup>(2)</sup>, Н.В. Ваулин<sup>(2)</sup>, Д.А. Белов<sup>(2)</sup>, А.А. Евстапов<sup>(2)</sup>, Д.А. Баклыков<sup>(3)</sup>, А.В. Андрияш<sup>(3)</sup>, А.А. Барбашева<sup>(4)</sup>, А.К. Кугук<sup>(4)</sup>, В.В. Рыжков<sup>(4)</sup>, И.А. Родионов<sup>(4)</sup>, Д.С. Кудрявцев<sup>(5)</sup>, В.А. Можаяева<sup>(5)</sup>, Л.В. Сон<sup>(5)</sup>, В.И. Цетлин<sup>(5)</sup>, Б.Н. Хлебцов<sup>(6)</sup>, М.С. Кобзев<sup>(7)</sup>, Ю.О. Кузнецова<sup>(7)</sup>, Б.Т. Шарипов<sup>(7)</sup>, А.С. Яшкин<sup>(7)</sup>, Я.И. Алексеев<sup>(2,7)</sup>

<sup>(1)</sup> Институт спектроскопии РАН, ул. Физическая 5, 108840 Троицк, Москва, Российская Федерация

<sup>(2)</sup> Институт аналитического приборостроения РАН, ул. Ивана Черных 31-33, лит. А, 198095 Санкт-Петербург, Российская Федерация

<sup>(3)</sup> Всероссийский научно-исследовательский институт автоматики им. Н.Л. Духова, Сушская ул. 22, 119017 Москва, Российская Федерация

<sup>(4)</sup> Московский государственный технический университет им. Н.Э. Баумана, 2-я Бауманская ул. 5/1, 105005 Москва, Российская Федерация

<sup>(5)</sup> Институт биоорганической химии имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, ул. Миклухо-Маклая 16/10, 117997 Москва, Российская Федерация

<sup>(6)</sup> Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов Саратовского научного центра РАН, просп. Энтузиастов 13, 410049 Саратов, Российская Федерация

<sup>(7)</sup> ООО Синтол, ул. Тимирязевская 42, корпус Б, офис 316, 127434 Москва, Российская Федерация

E-mail: (\*) melentiev@isan.troitsk.ru

Статья поступила 13 марта 2024 г., после доработки 16 июля 2024 г.

Содержание

1. Введение (1130).
  2. Оптические и наноплатонные технологии, используемые в оптических методах регистрации единичных молекул (1131).
  3. Детектирование единичных биомолекул на примере визуализации молекул тропонина в крови человека (1136).
  4. Детектирование вирулентных вирусных частиц на примере визуализации коронавируса SARS-CoV-2 (1137).
  5. Визуализация взаимодействия токсин – рецептор на одномолекулярном уровне (1138).
  6. Одномолекулярное секвенирование ДНК (1140).
  7. Заключение (1144).
- Список литературы (1144).

1. Введение

Обнаружение и визуализация одиночных атомов и молекул всегда являлись одними из приоритетных задач в различных областях знаний, представляя огромное научное и практическое значение: исследование эффектов квантовой электродинамики [1–3], разработка одноатомных/одномолекулярных устройств [4–7], визуализация биологических тканей [8, 9], наблюдение за кинетикой химических реакций внутри клетки [10], исследование внутриклеточной динамики биомолекул [11], измерение влияния флуктуаций локальной кон-

центрации молекул на рост клеток [12] и многие другие [13–16].

Помимо наблюдения за единичными молекулами, методы обнаружения и регистрации одиночных молекул нашли применение для определения макроскопических параметров — измерения концентраций веществ в тех случаях, когда концентрация искомого молекул в пробе (молекул аналита) оказывается чрезвычайно малой. При среднем расстоянии между молекулами аналита существенно больше длины волны света макроскопические оптические характеристики среды не зависят от присутствия в этой среде молекул аналита, поэтому традиционные (не основанные на счёте единичных молекул) оптические методы детектирования (сенсорика) оказываются нечувствительными. Такие низкие концентрации получили название ультралихих концентраций и для их определения напрямую, без использования методов прекоцентрации молекул аналита в пробе (накопление на функционализированной поверхности подложки или поверхности микро-/наночастиц, использование полимеразной цепной реакции [17]), применяются методы счёта единичных молекул (Single Molecules Counting Methods, SMCM) [17–19].

Возможности оптической регистрации единичных биомолекул при использовании подходов наноплазмоники, нанооптики, интегральной фотоники позволили реализовать наиболее точные методы секвенирования ДНК, соответствующие коммерчески выпускаемые приборы получили название "одномолекулярные секвенаторы". В таких секвенаторах последовательность нуклеотидов в молекуле ДНК устанавливается в реакции её репликации (копирования) с помощью фермента полимеразы на уровне единичной молекулы ДНК путём осуществления оптического контроля за единичными последовательными актами встраивания нуклеотидов и определения их типа. Коммерческие секвенаторы, построенные на оптических методах одномолекулярного секвенирования, позволяют реализовать одновременно высокую точность и большую длину прочтения последовательности нуклеотидов в молекуле ДНК, а также за минимальное время определять полный геном организмов.

В настоящей работе представлены результаты выполненных исследований, направленных на использование методов счёта единичных молекул, методов наноплазмоники и наноплазмоники в ряде научно и практически значимых задач: 1) визуализация и определение концентрации молекул тропонина-Т в крови человека, являющихся биомаркером начальной стадии сердечно-сосудистых заболеваний человека, 2) сенсорика и определение степени вирулентности коронавирусных частиц SARS-CoV-2, 3) измерение взаимодействия рецептор–токсин на одномолекулярном уровне, 4) оптическое одномолекулярное секвенирование молекул ДНК — создание первого на территории Евразии секвенатора такого типа.

## 2. Оптические и нанопотонные технологии, используемые в оптических методах регистрации единичных молекул

В настоящей работе рассматриваются способы обнаружения и счёта единичных молекул только оптическими методами [20] и не рассматриваются другие известные подходы [21]. Считается, что Мёрнер впервые продемонстрировал оптическое обнаружение одиночных молекул, что впоследствии стимулировало многочисленные исследования в этой области [22]. Отметим пионерские работы

российских авторов в области оптической регистрации и спектроскопии единичных атомов и молекул [23–26]. К сожалению, все методы обнаружения единичных молекул медленны. Без значительного увеличения скорости регистрации единичных молекул их применение при решении практически значимых задач оказывается невозможным, например, при измерении концентрации аналита — принципиально важного параметра в приложении сенсорики. Таким образом, для ряда приложений недостаточно только обнаружения отдельных молекул аналита.

Рассмотрим подробнее идею измерения концентрации аналита с использованием методов SMCM. Так, молекулы аналита последовательно обнаруживаются в образце одна за другой, при этом определяется количество  $N$  молекул в объёме пробы  $V$ , что позволяет измерить концентрацию молекул аналита  $n$  как  $n = N/V$ . Подсчёт отдельных молекул носит цифровой характер: каждая молекула генерирует сигнал, который можно зарегистрировать и подсчитать полное число молекул в известном объёме. Для наиболее точного определения концентрации аналита важно измерение наличия или отсутствия малых сигналов с высокой достоверностью (наличие/отсутствие молекулы), а не измерение абсолютного значения некоторого сигнала, пропорционального числу молекул в пробе и определения по калибровке искомого значения концентрации аналита. Другими словами, подсчёт отдельных молекул является более точным, чем интегральная оценка сигнала от них. Считается, что будущее всех аналитических измерений связано с использованием методов подсчёта единичных молекул [20].

Визуализация единичных молекул, а также датчики SMCM основаны на подсчёте событий, соответствующих обнаружению единичных молекул в объёме. В случае жидких сред молекулы аналита постоянно движутся за счёт броуновского движения и таким образом входят и выходят из объёма регистрации флуоресценции — физического объёма, находясь в котором, единичная молекула может быть зарегистрирована в оптическом микроскопе. Значение этого объёма зависит от типа использованной схемы оптической микроскопии (эпифлуоресцентная, конфокальная и т.д.) и является функцией от поля зрения в оптическом микроскопе, разрешения, эффективного значения глубины фокуса объектива [27]. Для задач детектирования единичных молекул целесообразно говорить о максимальном значении объёма регистрации, при попадании в который молекула может быть зарегистрирована. Как будет показано ниже, при регистрации флуоресценции единичной молекулы в известных оптических схемах микроскопии такой объём определяется разрешением выбранной оптической схемы. Задача значительного увеличения указанного объёма — критически важная для создания сенсорных платформ с быстрым определением концентрации молекул аналита, а также для возможности одновременного мониторинга большого числа единичных молекул. Данная задача может быть решена с использованием нанолокализованных источников излучения большой интенсивности или специальных наноструктур, позволяющих в обоих случаях эффективно увеличить отношение сигнал/шум при регистрации флуоресценции единичной молекулы.

Длительный мониторинг количества молекул, проходящих через объём регистрации, можно использовать для измерения концентрации аналита. Подсчёт связан с молекулярным дробовым шумом, который является

функцией выборки Пуассона. При этом точность измерений концентрации, ограниченная отношением сигнал/шум (Signal-to-Noise Ratio, SNR), определяется соотношением  $SNR = \sqrt{N}$ , в результате чего молекулярный дробовой шум оказывает значительное влияние на определяемое значение концентрации аналита [28]. Так, для достижения высокой точности обнаружения, соответствующей ошибке (определяемой как квадратный корень из числа измеренных молекул), равной 1%, в образце необходимо измерить не менее 10000 молекул аналита. При типичном времени регистрации единичной молекулы, равном одной секунде (экспозиция оптического детектора), соответствующие измерения займут не менее трёх часов.

При ультранизких концентрациях аналита время измерения оказывается ещё больше. Так, при концентрации аналита около  $10^7$  молекул  $\text{см}^{-3}$  (17 фМ) среднее расстояние между молекулами составляет около 45 мкм. Это расстояние на порядки превышает типичные размеры объёма регистрации единичной молекулы. Для обнаружения 10000 молекул в данном случае необходимо исследовать наличие молекул аналита в объёме не менее 1 мкл. Если для обнаружения одной молекулы аналита в объёме регистрации ( $\sim 1 \text{ фл} = 10^{-15} \text{ л}$ ) требуется около 1 с, то для анализа объёма 1 мкл (для обнаружения всех молекул в объёме пробы) потребуется около  $10^9$  с, т.е. десятилетия!

Все известные методы SMCМ решают проблему низкой концентрации, используя этап концентрирования перед этапом обнаружения. Таким образом, разбавленный раствор, содержащий несколько молекул, можно превратить в меньший объём с гораздо более высокой концентрацией. Наиболее распространённым подходом на этапе предварительного концентрирования является захват молекул аналита на поверхности с их последующим обнаружением (при этом поверхностная концентрация оказывается всё ещё малой, требуя обнаружения единичных молекул). Самая большая проблема такого подхода — длительное время, необходимое для захвата молекул. Динамика иммобилизации молекул аналита на поверхности определяется изотермой связывания Лэнгмюра [29]. Для концентраций молекул аналита 1 фМ процесс их связывания с поверхностью, функционализированной антителом, потребует около года, чтобы прийти к равновесию [30]. В коммерчески доступных аналитических наборах используется начальная часть кривой связывания — считается, что одного часа связывания достаточно для захвата достаточного количества молекул для измерения их концентрации в образце аналита, но до сих пор справедливость данного утверждения оспаривается [31]. Кроме того, следует отметить, что при использовании любого метода преконцентрирования наблюдается потеря аналита.

В схеме флуоресцентной микроскопии остросфокусированное лазерное излучение резонансно возбуждает флуоресценцию исследуемой молекулы. Флуоресценция молекулы происходит на смещённой частоте, что позволяет её детектировать на паразитном фоне, возникающем из-за большой мощности лазерного излучения, возбуждающего молекулу. Считается, что основная сложность оптической регистрации единичной молекулы заключается в наблюдении сигнала флуоресценции на фоне паразитной флуоресценции. Данная проблема становится доминирующей при работе с живыми объектами в биологических жидкостях или буферных растворах, обладающих высоким уровнем фоновой люминесценции.

Поток фотонов от одиночной возбуждённой флуоресцентной молекулы определяется двумя основными факторами. Первый — это скорость возбуждения молекулы лазерным излучением, которая напрямую зависит от интенсивности излучения и достигает максимума, когда интенсивность излучения равна интенсивности насыщения оптического перехода молекулы (перехода между её электронными подуровнями). Второй — это скорость релаксации возбуждённого состояния молекулы  $\gamma$ , определяемая строением электронных уровней молекулы. Максимальный поток фотонов от одной молекулы может достигать значений около  $10^5 - 10^6$  фотонов  $\text{с}^{-1}$ .

Отдельной сложной технической задачей является детектирование фотонов, испускаемых одиночной молекулой. Так, измеряемый сигнал включает три составляющие: 1) флуоресценцию молекулы, 2) люминесценцию среды, окружающей молекулу, 3) собственный шум фотодетектора. Основным источником фонового сигнала является люминесценция различных материалов (подложек, растворителей). Фоновая люминесценция имеет широкий спектр, что часто делает невозможным обнаружение флуоресценции молекул [32]. Фоновая люминесценция может существенно превышать флуоресценцию исследуемой молекулы при неправильно выбранных условиях возбуждения молекулы.

Общепринятым методом снижения фоновой люминесценции является использование сильной фокусировки лазерного излучения, а также конфокальное детектирование с помощью объективов микроскопа с числовой апертурой (Numerical Aperture, NA) до 1,49 [33]. При использовании таких подходов можно достичь объёма регистрации, примерно равного  $\lambda^3/30$ , где  $\lambda$  — длина волны лазерного излучения. Действительно, в случае классической микроскопии объём регистрации ограничен перетяжкой светового пучка с шириной перетяжки, равной диаметру дифракционно ограниченного пятна [27],

$$w_0 = \frac{r_{\perp}}{2} \approx 0,61 \frac{\lambda}{NA} \frac{1}{2}$$

и глубиной фокуса, определяемой длиной Рэлея:

$$\Delta z = 2z_R = \frac{2\pi w_0^2 n}{\lambda}$$

Для объёма регистрации  $V_{\text{det}}$  получим выражение

$$V_{\text{det}} = r_{\perp}^2 \Delta z \approx 0,069 \frac{\pi n \lambda^3}{NA^4}$$

При использовании конфокальной микроскопии для вычисления объёма регистрации флуоресценции единичной молекулы необходимо перемножить функции возбуждения и детектирования флуоресценции [27]. Поперечное разрешение в конфокальной микроскопии определяется выражением  $r_{\perp} = 0,61\lambda/(NA)$ , а осевое разрешение —  $r_{\parallel} = 2n\lambda/(NA^2)$ . При умножении гауссовых функций поперечное сечение получается равным

$$r_{\perp, \text{conf}} \approx \frac{0,61}{\sqrt{2}} \frac{\lambda}{NA},$$

а продольное

$$r_{\parallel, \text{conf}} \approx \frac{1}{\sqrt{1 + (0,093\pi)^2}} \Delta z.$$

Таким образом, объём регистрации в конфокальном случае равен

$$V_{\text{det}}^{\text{conf}} = \frac{V_{\text{det}}}{2\sqrt{1 + (0,093\pi)^2}} \approx \frac{V_{\text{det}}}{2}.$$

Если взять предельную числовую апертуру современных иммерсионных объективов, равную  $NA = 1,49$ , то объём регистрации при конфокальном детектировании можно оценить как

$$V_{\text{det}}^{\text{conf}} = \frac{1}{2} V_{\text{det}} \cong \frac{1}{2} \frac{\lambda^3}{15} = \frac{\lambda^3}{30}.$$

Регистрация флуоресценции происходит в спектральном окне шириной около 100 нм, расположенном в длинноволновой области спектра относительно линии лазера. Сечение флуоресценции молекул красителя на несколько порядков превышает сечение паразитной люминесценции, так что даже такой большой в сравнении с размером молекулы объём регистрации, как равный 0,01 фл, делает флуоресценцию молекулы значительно большей, чем фоновая люминесценция.

В задачах сенсорики ультранизких концентраций среднее расстояние  $L$  между молекулами аналита в растворе составляет величину, значительно превышающую длину волны излучения  $\lambda$ . Концентрация аналита  $n$  напрямую связана со средним расстоянием  $L$  между молекулами аналита как  $L = 1/\sqrt[3]{n}$ . В данном случае вероятность обнаружения молекулы пропорциональна величине

$$\frac{V_{\text{det}}}{L^3} = \frac{\lambda^3/30}{L^3} = 0,03 \left(\frac{\lambda}{L}\right)^3,$$

здесь  $V_{\text{det}} = \lambda^3/30$  — объём регистрации при использовании конфокальной схемы оптического детектирования. Так как мы рассматриваем случай  $L \gg \lambda$ , то получаем тривиальное следствие — вероятность обнаружения молекулы в объёме регистрации оказывается практически равной нулю. Такое ограничение сдерживает развитие методов измерения низких концентраций, основанных на подсчёте одиночных молекул, поскольку приводит к чрезвычайно длительному времени измерения для разумных значений объёмов аналита [20].

Наиболее эффективные методы оптического обнаружения единичных молекул основаны на флуоресценции. Однако большинство молекул не флуоресцируют, поэтому прямое оптическое обнаружение единичных молекул по флуоресценции становится невозможным. Общепринятый метод обнаружения основан на избиратель-

ном связывании молекулы с флуоресцентными метками, обычно с флуоресцентными молекулами красителей. Селективное мечение может быть достигнуто с помощью селективных взаимодействий со связыванием лигандов, например антитело к антигену. При этом яркость используемых нано локализованных источников излучения — нанопробников света — имеет принципиальное значение, так как позволяет применять объективы с малой числовой апертурой, увеличить область регистрации на образце, существенно уменьшить время детектирования флуоресценции единичной молекулы.

В задачах визуализации, сенсорики и детектирования [34, 35] в качестве нанопробников света широко используют органические красители [36], квантовые точки [37], наночастицы с ап-конверсией света [38], флуоресцентные белки [39]. Ведётся поиск альтернативных методов создания нано локализованных источников света. Так, активно развиваются спектрально-яркие источники света, в которых ширина линии излучения составляет величину существенно меньше 30 нм — минимального значения спектральной ширины квантовых излучателей при комнатной температуре, определяемой фонным уширением [40]. Один из развиваемых подходов — использование активной среды, размещённой вокруг плазмонной наночастицы в конфигурации ядро–оболочка в режиме сильной оптической связи для генерации света со спектрально узкой линией, около 5 нм (при применении сильной накачки активной среды [41]), а также в режиме слабой накачки [42]. Следует отметить успехи в создании нанопробников света на основе нанокластеров серебра со спектральной линией менее 5 нм [43], создание источников света, связанных с нановолноводами [44], возможность контроля флуоресценции с помощью метаматериалов [45].

При регистрации биомолекул, имеющих относительно большой размер и, соответственно, большое число аминокислот для присоединения антител, используется также и другой подход — увеличение потока фотонов в регистрации единичной молекулы. Впервые данный метод был применён в 1976 г. при оптической регистрации молекулы  $\gamma$ -глобулина [46]. В указанной работе детектирование единичной биомолекулы стало возможным благодаря присоединению к ней около 80–100 молекул красителей (рис. 1а). Таким образом, появление единичной молекулы в области оптической регистрации сопровождается яркой вспышкой света, регистрируемой на осциллографе сигналом в виде единичного пика. Это, в свою очередь, открывает принципиально новые возможности в SMCМ, а также в визуализации одиночных биомолекул, так как позволяет существенно, на несколько порядков, увеличить объём регистрации и, следовательно,

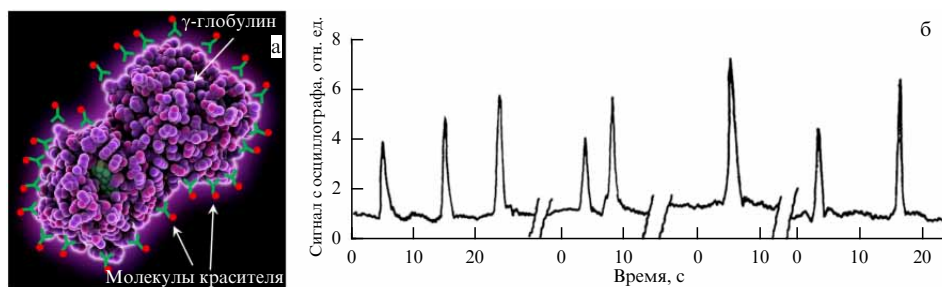
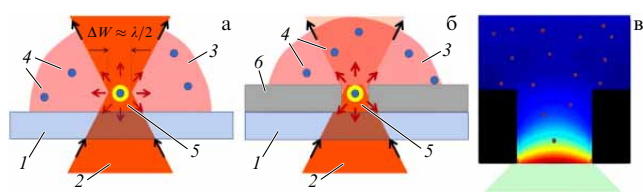


Рис. 1. Оптическое детектирование молекулы  $\gamma$ -глобулина: (а) схематическое изображение молекулы  $\gamma$ -глобулина с присоединёнными к ней ~ 80–100 молекулами красителей, (б) измеряемый оптический сигнал с осциллографа — единичный пик соответствует регистрации единичной молекулы  $\gamma$ -глобулина [46].



**Рис. 2.** Методы детектирования единичных молекул: (а) счёт единичных молекул в острогофокусированном лазерном пучке, (б) детектирование молекул в волноводах нулевой моды. Обозначения на схеме: 1 — кварцевая подложка, 2 — лазерное излучение, 3 — флуоресцентные молекулы в буферном растворе, 4 — единичные молекулы красителя, 5 — возбуждаемая и излучающая молекула красителя, 6 — тонкая плёнка алюминия, (в) распределение поля (электрическая компонента) внутри волновода нулевой моды.

но, резко сократить время анализа практически значимых объёмов аналита (рис. 1б).

Помимо низкой интенсивности флуоресценции единичной молекулы флуорофора, общее число фотонов, которое может быть зарегистрировано от единичной молекулы, ограничено процессом её фотодегradации [47]. Следует отметить, что использование сильной оптической связи молекул красителя с плазмонными наночастицами позволяет значительно уменьшить скорость фотодегradации за счёт уменьшения вероятности оптических переходов на триплетные уровни, ответственные за химическое разрушение молекулы при взаимодействии с кислородом [48, 49].

Основным подходом в улучшении регистрации слабых оптических сигналов является снижение паразитной засветки. В оптической микроскопии острая фокусировка и конфокальная микроскопия позволяют уменьшить объём регистрации и сбора сигнала до размеров порядка длины волны (рис. 2а). Дальнейшим шагом увеличения отношения сигнал/шум в оптической микроскопии единичных молекул является переход к субдифракционному объёму регистрации. Это можно реализовать с применением единичных металлических наноструктур [50, 51], используя методы наноплазмоники и плазмонной оптики для усиления локальных полей [52, 53]. Одними из наиболее подходящих для детектирования флуоресценции единичных молекул являются наноструктуры, изготовленные в непрозрачной металлической плёнке, — так называемые волноводы нулевой моды (Zero Mode Waveguide, ZMW). ZMW-наноструктуры представляют собой нанотверстия малого диаметра, порядка 100 нм, изготовленные в оптически непрозрачной металлической плёнке толщиной около 100 нм (рис. 2б). ZMW-наноструктура образует оптический волновод, который за счёт своих субволновых размеров блокирует распространение электромагнитного поля, что при облучении возбуждающим излучением позволяет локализовать энергию в области поверхности подложки, образующей дно в ZMW-наноструктуре, в объёме, много меньшем по сравнению с длиной волны света (рис. 2в). Данный нановолновод не поддерживает распространяющиеся моды, что объясняет использование для такой наноструктуры названия "волновод нулевой моды" [54].

Кроме снижения объёма регистрации и уменьшения паразитного сигнала, волноводы нулевой моды позволяют реализовать ещё ряд преимуществ. Первым является то, что можно проводить исследования на одномолекулярном уровне при довольно высоких концентрациях аналита в растворе. Действительно, эффективный

объём регистрации и сбора флуоресценции оказывается на уровне 0,1 аттолитра (1 аттолитр =  $10^{-18}$  л), что позволяет регистрировать сигнал одиночных молекул при средней концентрации порядка  $10^{15}$  см $^{-3}$ . При использовании обычных оптических методов, например конфокальной микроскопии, сбор сигнала происходит с объёма, превышающего более чем на два порядка объём регистрации в волноводе нулевой моды, что не позволяет при высоких концентрациях аналита регистрировать единичные молекулы.

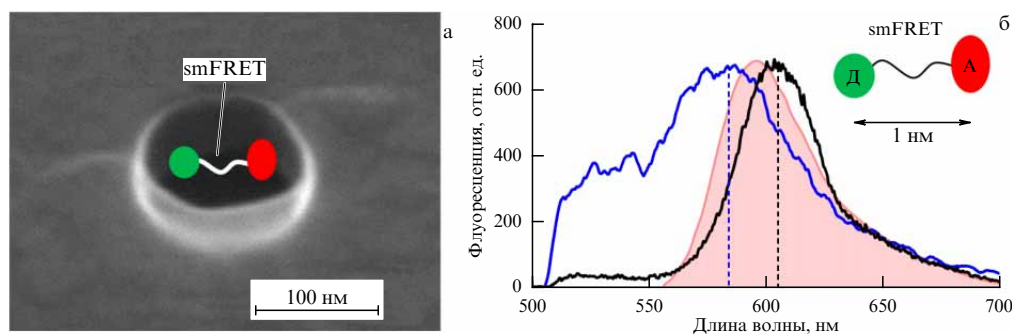
Впервые взаимодействие света с отверстием (апертурой) диаметром менее длины волны света рассмотрел Ханс Бете в своих работах в 1940-х годах [55]. Задача взаимодействия света с нанотверстием является фундаментальной и в современной нанооптике. В 2000-х годах с развитием методов создания наноструктур, таких как оптическая, электронная и ионная литография [56], удалось реализовать нанотверстия достаточно высокого качества и экспериментально продемонстрировать детектирование флуоресценции от единичных молекул в получаемых волноводах нулевой моды [57].

Измерение спектра и оптическое детектирование единичных молекул одновременно в большом числе ZMW-наноструктур оказалось чрезвычайно востребовано для поиска требуемых реакций и соединений, при разработке и проверке лекарств и различных химических соединений на их токсичность, где требуется произвести множество одинаковых измерений [58].

В настоящее время происходит бурное развитие данной области, связанное с созданием биосенсоров, основанных на массивах ZMW [56]. Реакционные ячейки, построенные с использованием волноводов нулевой моды, позволяют существенно увеличить чувствительность методов флуоресцентной сенсорики, дают возможность определять малые концентрации веществ. С другой стороны, ZMW позволяет исследовать химические процессы, включая биохимические с относительно большими, характерными для живых существ, концентрациями [54]. Так, ZMW используется для решения широкого круга задач, связанных с оптическим детектированием и спектроскопией: анализ химических и биохимических реакций [59], включая мультиплексное детектирование [60], анализ электрохимических процессов [61]. Благодаря малому объёму регистрации открылась возможность измерения динамики процессов, происходящих в мембранах живых клеток [62].

Размещение флуоресцентных объектов внутри волноводов нулевой моды приводит к существенному изменению их оптических и спектральных характеристик. Нанотверстие в металлической плёнке является плазмонным резонатором, размещение квантовых эмиттеров в поле такого резонатора позволяет увеличить скорость излучательных процессов. Степень усиления описывается фактором Парселла, который прямо пропорционален добротности резонатора и обратно пропорционален его объёму [63]. Малый объём волновода нулевой моды оказывает существенное влияние на скорость излучения, несмотря на низкую добротность таких резонаторов. Как показали наши недавние измерения, спектры флуоресценции гибридных донор–акцептор молекул (содержащих флуорофоры на расстоянии около 1 нм друг от друга и имеющих взаимно перекрывающиеся спектры излучения и испускания, образующих так называемую фёрстеровскую пару молекул, smFRET) в свободном пространстве и в ZMW сильно отличаются. В измерениях в качестве донора использовался флуоресцеин (FAM), имеющий высокий квантовый выход





**Рис. 3.** Флуоресценция smFRET (FAM-ROX) единичных молекул в единичном ZMW-наноотверстии: (а) схема расположения smFRET-молекулы в ZMW-наноотверстии, изображение которого получено с помощью электронного микроскопа, (б) измеренные спектры флуоресценции smFRET-молекулы в свободном пространстве (чёрная кривая) и внутри ZMW (синяя кривая). Розовым цветом показан спектр флуоресценции свободной молекулы ROX.

(Quantum Efficiency, QE):  $QE = 0,93$ ; в качестве акцептора — родамин X (ROX) с квантовым выходом  $QE = 1$ . Донорная и акцепторная молекулы соединены линкером длиной 1 нм (рис. 3а). Оценка значения фёрстеровского радиуса ( $R_0$ ) для рассматриваемых FAM-ROX smFRET-молекул в водном буферном растворе составляет  $R_0 \approx 6$  нм.

Для измерения флуоресценции smFRET-молекул использовался инвертированный микроскоп Nikon. На образец с ZMW-наноотверстиями наносился буферный раствор с smFRET-молекулами FAM-ROX, лазерный луч фокусировался на единичные ZMW-наноотверстия. Флуоресценция smFRET-молекул регистрировалась CCD-камерой и спектрометром.

Для проведения измерений на одномолекулярном уровне подбиралась определённая концентрация гибридных молекул таким образом, что при концентрации  $1,2 \times 10^{15} \text{ см}^{-3}$  smFRET-молекул в буферном растворе в одном ZMW-наноотверстии в среднем находилась одна smFRET-молекула. На рисунке 3 показано изображение единичного ZMW-наноотверстия, полученное в электронном микроскопе, а также схематическое расположение smFRET-молекулы (реальный размер гибридной молекулы несколько нанометров). При возбуждении флуоресценции smFRET-молекулы использовалось лазерное излучение длиной волны 480 нм (линия поглощения молекулы FAM), сфокусированное в пятно диаметром 1 мкм, что позволило освещать единичные ZMW-наноотверстия, так как расстояние между ZMW-наноотверстиями на образце составляло 10 мкм.

На рисунке 3б представлены измеренные спектры флуоресценции smFRET-молекулы в свободном пространстве (чёрная кривая) и внутри ZMW (синяя кривая). Розовым цветом показан спектр флуоресценции свободной молекулы ROX. Как видно из представленных данных, спектр флуоресценции smFRET-молекулы в свободном пространстве характеризуется наличием слабого сигнала флуоресценции в коротковолновой части, формируемого слабой флуоресценцией молекулы-донора smFRET-пары, в то время как основная доля излучения приходится на флуоресценцию молекулы-акцептора. Это свидетельствует о высокой эффективности FRET-процесса, что также хорошо согласуется с теорией, так как в smFRET-молекуле длина линкера (1 нм) существенно меньше значения фёрстеровского радиуса (6 нм). Следует отметить, что спектр флуоресценции smFRET-молекулы смещён в красную область относительно спектра флуоресценции молекулы ROX (спектр с

заливкой розовым цветом). Последнее связано с низкой эффективностью возбуждения высоких уровней энергии молекулы ROX при фёрстеровском механизме передачи энергии (уровень возбуждения молекулы-акцептора не может быть выше уровня возбуждения молекулы-донора).

При помещении smFRET-молекулы в ZMW-наноотверстии спектр флуоресценции сдвигается в коротковолновую область (синяя кривая на рис. 3б). Кроме того, значение длины волны света, соответствующее максимуму флуоресценции, имеет меньшее значение в сравнении с соответствующим значением спектра излучения отдельной свободной молекулы акцептора. Это свидетельствует о наличии процессов стимулированного ZMW заселения верхних электронных уровней энергии молекулы донора и акцептора соответственно. Проведённые измерения показывают, что ZMW может сильно влиять на флуоресцентные свойства единичных квантовых излучателей света, на примере донор-акцепторной пары.

Другим преимуществом волноводов нулевой моды является возможность проведения параллельных спектральных измерений с большим числом единичных молекул одновременно. При этом измерение спектра происходит от каждой индивидуальной молекулы! Такое преимущество ZMW-наноструктур позволило сделать революцию в одномолекулярном секвенировании молекул ДНК в реальном времени [64]. Основной вклад в развитие данных методов внесли научные группы, связанные с компанией Pacific Biosciences (Wanunu, Wenger).

Практическое решение задачи одновременного (но независимого!) проведения спектральных измерений флуоресценции большого числа единичных молекул красителей (больше 1 млн молекул) потребовало использования не только методов литографии наноотверстий, но и новых подходов интегральной оптики для одновременного облучения такого гигантского числа ZMW-наноструктур лазерным излучением для возбуждения флуоресценции молекул в каждом ZMW.

Для возбуждения молекулы красителя в ZMW необходимо обеспечить в области ZMW лазерное излучение интенсивностью около  $100 \text{ Вт см}^{-2}$ . В единичном ZMW это довольно просто реализовать прямым освещением сфокусированного лазерного луча в пятно малого диаметра. Однако при использовании 1 млн ZMW, расположенных даже на довольно малом (но достаточном для разрешения в оптическом микроскопе рядом стоящих ZMW) расстоянии друг от друга, равном 3 мкм, область с ZMW-наноотверстиями будет занимать пло-

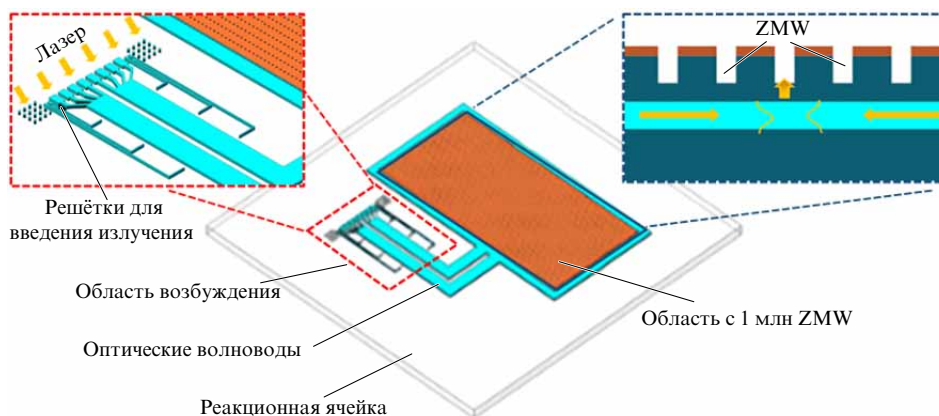


Рис. 4. Схема реакционной ячейки для одномолекулярного секвенирования ДНК с использованием волноводов нулевой моды (ZMW) и методов интегральной оптики (из работы [67]).

щадь  $9 \text{ мм}^2$ . Следовательно, для достижения интенсивности, равной  $100 \text{ Вт см}^{-2}$  в каждом ZMW, лазерное излучение должно иметь мощность около  $10 \text{ Вт}$ , что несовместимо с условиями проведения измерений, так как приведёт к значительному нагреву реакционной ячейки и с большой вероятностью к её физическому разрушению.

Единственно возможным решением проблемы возбуждения большого числа ZMW является использование планарных оптических волноводов, размещённых возле каждого ZMW в интегральной оптической схеме. Данный метод был предложен в патенте [65] и реализован в коммерческих секвенаторах Sequel, выпускаемых компанией Pacific Biosciences. Расположение волноводов нулевой моды в экспоненциально затухающем поле, выходящем из волновода, позволяет достичь необходимой интенсивности для возбуждения и регистрации флуоресценции единичных молекул внутри каждого ZMW используемой реакционной ячейки. Применение интегральных оптических схем стало эффективным решением, позволяющим "адресно", с использованием планарных волноводов, ввести возбуждающее излучение в ZMW. Задача создания планарных волноводов, ввод/вывод и управление излучением в таких волноводах были подробно изучены ранее [66]. Следует отметить, что реализация связи планарных волноводов с ZMW-наноотверстиями и изготовление конечных изделий требуют привлечения самых современных методов нанооптики и наноинженерии.

На рисунке 4 схематически представлена оптическая часть реакционной ячейки с 1 млн ZMW, выполненной по описанному выше принципу [67]. Возбуждение флуоресценции внутри объёма ZMW с использованием элементов интегральной оптики позволяет освещать огромную площадь реакционной ячейки. Для ввода излучения в оптические волноводы реакционной ячейки используется массив дифракционных решёток. Далее, с помощью многокаскадных Y-образных делителей, излучение делится между большим количеством отдельных волноводов, в каждый из которых интегрированы тысячи ZMW. Каждый ZMW размещается вблизи сердцевины волновода, а эванесцентное поле, создаваемое волноводом, используется для возбуждения флуоресценции молекул в ZMW. Каждый волновод представляет собой структуру, образованную сердцевиной из нитрида кремния (показатель преломления  $n = 1,9$ ) и оболочкой из диоксида кремния (показатель преломления  $n = 1,46$ ). Прин-

ципально разделение оптической схемы на две отдельные зоны: первая — область возбуждения, вторая — область с ZMW-наноотверстиями, такая схема позволяет снизить паразитную засветку от возбуждающего лазерного излучения.

### 3. Детектирование единичных биомолекул на примере визуализации молекул тропонина в крови человека

Примером социально значимых приложений, в которых необходимо визуализировать и измерить концентрации аналита менее  $10^{10} \text{ см}^{-3}$ , является детектирование молекул тропонина. Концентрация тропонина в крови человека является маркером сердечно-сосудистых заболеваний человека. Молекулы тропонина вырабатываются в системе кровообращения человека при разрушении клеток сердечной мышцы (миоцитов сердца) в результате дисбаланса между потребностью и поступлением крови в сердечной ткани. Тропонин-С, тропонин-Т и тропонин-И контролируют сокращения сердечной мышцы в физиологических условиях. Мышечное сокращение развивается за счёт связывания ионов  $\text{Ca}^{2+}$  тропониновым комплексом и последующей активации АТФ-зависимого взаимодействия миозина с актином [68]. В сердце здоровых взрослых тропонина I и T представлены исключительно в специфических сердечных изоформах, не экспрессирующихся в других тканях. Разрушение клеток сердца приводит к попаданию этих внутриклеточных белков в плазму крови, что даёт возможность использовать специфичные для сердечной ткани изоформы тропонина в качестве высокоспецифичных маркеров повреждения кардиомиоцитов.

Обнаружение молекул тропонина в крови человека считается наиболее прямым способом выявления возникновения серьёзных сердечно-сосудистых заболеваний и борьбы с ними. Клинически уже показано, что уровень тропонина в крови около  $10^9 \text{ см}^{-3}$  ( $100 \text{ пг мл}^{-1}$ ) свидетельствует о необратимых изменениях в сердечной мышце [21]. При этом концентрация молекул тропонина в крови, отражающая деградацию сердечной мышцы, увеличивается с  $10^7 \text{ см}^{-3}$  до  $10^9 \text{ см}^{-3}$  ( $1-100 \text{ пг мл}^{-1}$ ) за сравнительно короткое время, около 6 ч, что делает сверхбыстрое измерение уровня тропонина в крови критически необходимым для диагностики и лечения сердечно-сосудистых заболеваний [69]. Так, согласно рекомендациям Национальной академии клинической биохии-

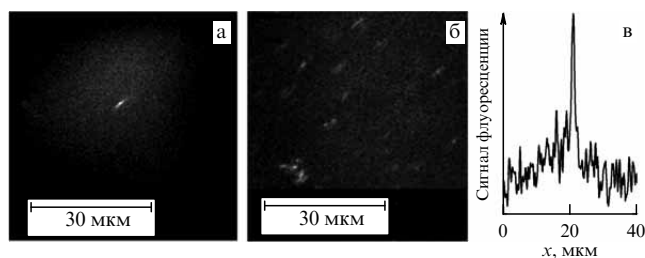


Рис. 5. Оптические изображения молекул тропонина-Т при различных концентрациях: (а)  $1 \text{ пг мл}^{-1}$  и (б)  $100 \text{ пг мл}^{-1}$ , (в) сечение изображения молекулы тропонина-Т, зарегистрированной в образце сыворотки крови человека [72].

мии, клиническое тестирование образцов сыворотки крови на сердечные биомаркеры должно проводиться в течение 1 ч [70]. Порог, при котором необходимо терапевтическое вмешательство, оценивается в  $10^7 \text{ см}^{-3}$  [71].

Коммерчески доступные тесты на тропонин имеют пределы обнаружения в диапазоне  $10\text{--}80 \text{ пг мл}^{-1}$ , время обнаружения 10 мин – 24 ч и объём аналита 17 мкл – 10 мл [21]. Все они используют методы преконцентрации перед измерением аналита. Напротив, использование методов SMCM позволяет измерить концентрацию молекул тропонина напрямую в крови человека. Молекула тропонина-Т (сTnT) имеет на своей поверхности достаточное число эпитопов для присоединения до 30 антител. В разработанном протоколе пробоподготовки в образец крови пациента добавляется раствор антител к сTnT, меченых молекулами красителя Су 7.5. После связывания антител с молекулами тропонина-Т к одной молекуле сTnT присоединяется в среднем около 27 таких антител. Не связавшиеся с молекулами сTnT антитела селективно удаляются из пробы. После этого подготовленный образец помещается во флуоресцентный микроскоп, в котором регистрируется флуоресценция молекул красителя Су 7.5, присоединённых к молекуле сTnT.

На рисунке 5 представлены изображения молекул сTnT, полученные при регистрации флуоресценции в оптическом чипе при различных их концентрациях в растворе: (а)  $1 \text{ пг мл}^{-1}$ , (б)  $100 \text{ пг мл}^{-1}$ . Присоединение большого количества молекул флуоресцентного красителя к молекуле сTnT сформировало яркий источник света, наблюдаемый в оптическом микроскопе при возбуждении лазерным излучением. На рисунке 5а показано изображение единичной молекулы сTnT, полученное при концентрации аналита  $1 \text{ пг мл}^{-1}$  ( $2 \times 10^7 \text{ см}^{-3}$ ). На изображении хорошо видно светлое пятно, соответствующее регистрации одиночной молекулы. CCD-камера регистрирует примерно  $3 \times 10^4$  фотонов  $\text{с}^{-1}$  от данной молекулы, что соответствует ожидаемому потоку фотонов от одной молекулы сTnT. Этот факт доказывает регистрацию одиночной молекулы сTnT. Оптическое изображение единичной молекулы сTnT, полученное в представленной схеме флуоресцентной микроскопии, вытянуто из-за аббераций оптического микроскопа, связанных с перекрытием части апертуры объектива микроскопа для блокировки возбуждающего лазерного излучения. На рисунке 5в показан срез типичного оптического изображения единичной молекулы сTnT, растворённой в сыворотке крови человека. На рисунке отчётливо видна паразитная люминесценция плазмы крови (широкий пьедестал) и узкий пик, соответствующий регистрации единичной молекулы сTnT. Как видно из рисунка, развитый метод флуоресцентной микроскопии позволяет регистрировать единичные биомолекулы с отношением сиг-

нал/шум, примерно равным 3. В данной схеме удалось реализовать детектирование единичных молекул в поле лазерного пучка диаметром 15 мкм (рис. 5а, б) за счёт увеличения яркости детектируемой частицы. Объём детектирования при таком методе регистрации увеличивается в  $10^4$  раз относительно метода счёта одиночных молекул в остросфокусированном пучке, за счёт чего удаётся существенно уменьшить время определения ультранизких концентраций тропонина.

Представленный метод позволяет определять концентрацию молекул сTnT в сыворотке крови пациента с минимальным уровнем определения концентрации, равным  $1 \text{ пг мл}^{-1}$ , и погрешностью в пределах 40 % [72] при времени измерения около 5 мин, что на порядок чувствительнее ( $1 \text{ пг мл}^{-1}$  при использовании счёта единичных молекул против  $10\text{--}80 \text{ пг мл}^{-1}$  в коммерческих тест-системах, использующих преконцентрацию пробы) и в 1000 раз быстрее, чем любой из методов, не использующих методики повышения концентрации молекул аналита в пробе [21]. Достигнутого уровня определения концентрации достаточно для проведения диагностики ранних сердечно-сосудистых заболеваний человека на ранних стадиях, что не было доступно ранее.

#### 4. Детектирование вирулентных вирусных частиц на примере визуализации коронавируса SARS-CoV-2

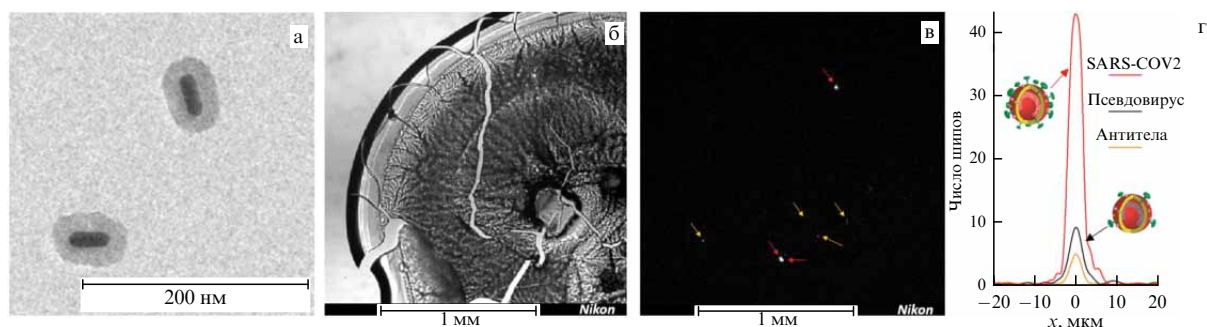
Другой социально значимой задачей, требующей использования методов SMCM, является быстрое определение степени вирулентности вирусных частиц в образце и измерение соотношения вирусных и псевдовирусных частиц [73]. Недавно нам удалось впервые решить эту проблему с использованием методов SMCM на примере вируса SARS-CoV-2 [74].

Золотым стандартом сбора образцов для проверки SARS-CoV-2 является мазок из носоглотки. Сложность обнаружения SARS-CoV-2 непосредственно в мазке связана с его низкой концентрацией. Самая высокая концентрация вирусных частиц, обнаруженная в образцах мазков из глотки, достигала  $2,4 \times 10^9$  вирусных частиц  $\text{л}^{-1}$  при примерно  $7,1 \times 10^8$  копиях РНК на мазок из глотки [75]. Однако количество вирусных копий в мазке составляет всего  $10^4\text{--}10^7$  вирусных частиц на 1 мл ( $10 \text{ аМ}\text{--}10 \text{ фМ}$ ) [76]. Это сильно затрудняет оптическое обнаружение, поскольку среднее расстояние между вирусными частицами в объёме образца взятого мазка составляет около 1 мм. Такая низкая концентрация вирусных частиц требует использования сверхчувствительных методов обнаружения на основе SMCM.

Оптическая диагностика вируса SARS-CoV-2 была реализована с использованием флуоресцентных наночастиц, образованных наноструктурами типа ядро – оболочка, изготовленных путём внедрения молекул красителя Су 7.5 в полидофаминовую оболочку наностержня Au при оптимальной концентрации красителя, соответствующей максимальному подавлению тушения полидофамина [74]. Такие наночастицы характеризуются яркой и стабильной флуоресценцией, подходящей для обнаружения одиночного вируса, а также: 1) низкой фотодеградацией, 2) нечувствительностью к концентрационному затуханию, 3) химической стабильностью и биосовместимостью. Такие флуоресцентные метки использовались для мечения моноклональных антител к S-белку SARS-CoV-2.

На рисунке 6а представлены изображения, полученные с помощью электронной микроскопии, двух нано-





**Рис. 6.** Обнаружение одиночных частиц вируса SARS-CoV-2 с использованием измерения флуоресценции наночастиц типа ядро – флуоресцентная оболочка, связанных с вирионами антителами к SARS-CoV-2: (а) ТЕМ-изображение флуоресцентных наночастиц; (б) изображение в белом свете высушенной капли с добавленными в неё наночастицами ядро – оболочка; (в) флуоресцентное изображение той же капли при возбуждении лазерным излучением с длиной волны 780 нм, оранжевые стрелки показывают агрегаты антител, красные стрелки — частицы вируса SARS-CoV-2; (г) поперечные сечения флуоресцентных изображений агрегата, образованного несвязавшимися антителами, мечеными наночастицами ядро – оболочка (оранжевая линия), псевдовиральной частицей (чёрная линия) и частицей вируса SARS-CoV-2 (красная линия) [74].

структур типа ядро – оболочка, используемых в качестве флуоресцентных меток в SMCM микроскопии вируса SARS-CoV-2. Изображение ПЭМ чётко показывает состав наноструктур, включая их ядра и оболочки. Наностержни имели размер 10 нм (диаметр) × 40 нм (длина), толщина оболочки составляла 10 нм. Оболочки содержат около 1000 молекул красителя, что соответствует объёмной концентрации около  $2,5 \times 10^{18} \text{ см}^{-3}$ .

На рисунке 6б показано оптическое изображение при освещении белым светом высушенной капли мазка из носоглотки пациента, страдающего коронавирусом SARS-CoV-2. В этот мазок, содержащий вирусные частицы, были добавлены антитела против S-белка SARS-CoV-2, связанные с флуоресцентными наночастицами. Перед оптическими измерениями концентрацию вирионов в образце измеряли путём титрования. На рисунке 6в показано изображение флуоресценции (в спектральном диапазоне 800 – 950 нм) того же образца, что и на рис. 6б, после облучения образца лазерным светом. Данное изображение получено с использованием схемы эпифлуоресцентной микроскопии при облучении образца лазерным излучением с длиной волны 780 нм и регистрацией в спектральном окне 800 – 950 нм [74]. На изображении можно увидеть несколько ярких и тусклых пятен (отмечены стрелками). Как показали измерения, слабые пятна (отмечены оранжевыми стрелками) представляют собой агрегаты используемых флуоресцентных наночастиц. Подобные пятна наблюдаются и в контрольных образцах с флуоресцентными наночастицами, но без частиц вируса SARS-CoV-2. Каждое яркое пятно на рис. 6в (отмечены красными стрелками) соответствует флуоресценции наночастиц, связанных через антитело с одной вирусной частицей SARS-CoV-2. При этом в каждом ярком пятне содержится примерно 40 флуоресцентных наночастиц. Такие яркие флуоресцентные пятна указывают на наличие вирусных частиц SARS-CoV-2 в образце.

Наличие большого количества шипов вирусной частицы SARS-CoV-2 позволяет образовывать яркий флуоресцентный агрегат, состоящий примерно из 40 флуоресцентных наночастиц. При этом яркость такого нанолокализованного источника света пропорциональна числу шипов на его липидной оболочке — признак вирулентности коронавирусных частиц. В отдельном эксперименте нами была показана возможность определения вирулентности коронавирусных частиц по подсчёту числа шипов с помощью развитой SMCM-микроскопии.

Для проведения сравнительного анализа мы использовали синтезированные псевдовиральные частицы, которые содержали в среднем всего 3 – 10 шипов по сравнению с 30 – 70 шипами на частице вируса SARS-CoV-2. В таких измерениях амплитуда сигнала флуоресценции от флуоресцентных наночастиц, связанных антителами в псевдовиральных частицах, была примерно в пять раз меньше, чем соответствующие сигналы при обнаружении частиц вируса SARS-CoV-2. Сечения соответствующих оптических изображений показаны на рис. 6г. Как видно из изображения, сигнал флуоресценции псевдовиральной частицы значительно меньше сигнала частицы SARS-CoV-2 и всего на 50 % превышает по амплитуде сигнал флуоресценции от агрегатов, образованных не связавшимися с вирусными частицами антителами.

Развитая методика сенсорики активных вирионов SARS-CoV-2 позволяет определять концентрацию вирусных частиц в образце. Продемонстрированный предел обнаружения разработанного метода составляет около 800 вирионов  $\text{мл}^{-1}$ . Это число ограничено довольно малым использованным объёмом образца, равным 1 мкл. При концентрации 800 вирионов  $\text{мл}^{-1}$  возможно обнаружить только один или несколько вирионов в таком небольшом объёме. Дальнейшее увеличение чувствительности развитого метода возможно при использовании микрофлюидных платформ и использовании образцов большего объёма.

## 5. Визуализация взаимодействия токсин – рецептор на одномолекулярном уровне

Методы SMCM, реализованные с использованием волноводов нулевой моды, позволяют проводить контроль за несколькими одномолекулярными реакциями одновременно. Одним из примеров является демонстрация визуализации взаимодействия токсин – рецептор, позволяющая изучать кинетику такого взаимодействия на одномолекулярном уровне. Метод реализован с применением ZMW-наноструктур, изготовленных в алюминии. Измерения были проведены с использованием синтетического высокоаффинного пептида, выступающего в роли рецептора и иммобилизованного на поверхности кварца, внутри ZMW-наноотверстия, и альфа-бунгаротоксина, меченного молекулой Alexa Fluor 555. Показано, что использование волноводов нулевой моды позволяет: 1) регистрировать связывание на одномоле-

кулярном уровне для большого числа пар рецептор–токсин одновременно, 2) измерять динамику связывания за счёт достигнутого высокого отношения сигнал/шум в регистрируемом оптическом сигнале. Кроме того, развитый подход функционализации образцов может быть использован для определения низких концентраций различных токсинов.

В качестве никотинового ацетилхолинового рецептора может быть использован не сам рецептор, а его аналог — синтетический высокоаффинный пептид (СВП). Он состоит из 13 аминокислот и обладает высокой аффинностью к альфа-бунгаротоксину. Данный токсин является одним из наиболее часто используемых инструментов для изучения никотинового ацетилхолинового рецептора и вырабатывается в ядовитых железах змеи *Bungarus multicinctus* [77]. При его выделении (при укусе змеи) этот токсин специфически связывается с никотиновым ацетилхолиновым рецептором, блокируя нейромышечную передачу.

СВП был получен в отделе молекулярной нейроиммунной сигнализации Института биоорганической химии РАН методом твердофазного пептидного синтеза. Его размеры составляют в высоту 14,5 Å, а в диаметре 12 Å (площадь поперечного сечения  $\sim 1 \text{ nm}^2$ ). При площади поверхности кварца в ZMW-наноотверстии, примерно равной  $10^4 \text{ nm}^2$ , на её поверхности может быть иммобилизовано (с использованием реакции "клик-химии")  $\sim 10^4$  СВП. Исследование взаимодействия токсин–рецептор проводилось по присоединению альфа-бунгаротоксина, меченного флюорофором Alexa Fluor 555 (Thermo Fisher Scientific). Степень мечения токсина равна единице (каждая молекула токсина связана с одной молекулой красителя).

Связывание токсин–рецептор регистрировалось по сигналу флуоресценции AF555. Измерения проводились в инвертированном микроскопе Nikon Eclipse Ti/U с помощью эпифлуоресцентной схемы с использованием объектива Nikon  $\times 40$ , NA = 0,6. Для возбуждения флуоресценции использовалось лазерное излучение с длиной волны 532 нм и интенсивностью  $200 \text{ Вт см}^{-2}$ . Регистрация производилась на смещённой длине волны в спектральном окне флуоресценции красителя (550–750 нм). Лазерное излучение спектрально отделялось от сигнала флуоресценции с помощью дихроического зеркала и интерференционного Notch-фильтра. Размер пятна лазерного излучения позволял исследовать реакцию присоединения одновременно в 40 волноводах нулевой моды, что дало возможность набирать статистику связываний рецептора с токсином.

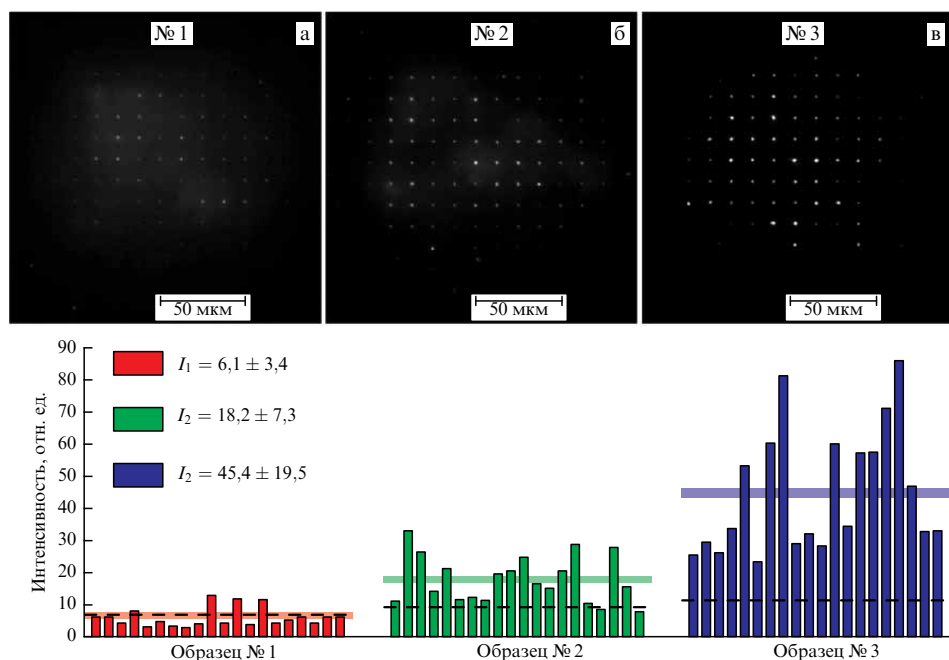
Добавление на образец токсина производилось путём нанесения на функционализированную подложку буферного раствора с растворённым в нём токсином в концентрации  $\sim 10^{13} \text{ см}^{-3}$ . Концентрация была подобрана таким образом, чтобы в среднем в одном ZMW-наноотверстии находилось меньше одной молекулы меченого токсина, среднее количество меченых токсинов в ZMW составляло  $\sim 10^{-2}$  молекул. Важно заметить, что связь между СВП и токсином без дополнительных внешних воздействий разорвать невозможно. Поэтому если связывание произошло, то молекула токсина за время проведения эксперимента уже не может выйти из ZMW-наноотверстия.

Измерения на уровне флуоресценции единичных молекул требуют тщательного контроля за паразитной флуоресценцией использованных образцов, материалов соответствующих реакционных ячеек, реагентов. В проведённых измерениях использовались три образца, для

осуществления контроля за уровнем паразитной флуоресценции — три одинаковые реакционные ячейки, образованные кварцевыми подложками с нанесёнными на них плёнками алюминия толщиной 100 нм, в которых с помощью электронной литографии были созданы матрицы с ZMW-наноотверстиями диаметром 100 нм. Пробоподготовка для первого образца заключалась только в использовании шага пассивации поверхности алюминия поливинилфосфоновой кислотой (ПВФК), необходимой для предотвращения адсорбции биомолекул на поверхности алюминия. Для второго образца был проведён протокол функционализации поверхности кварца для иммобилизации молекул СВП на поверхности кварца внутри ZMW-наноотверстия, но без добавления СВП. Для третьего образца был проведён полный протокол функционализации с иммобилизацией СВП. В процессе проведения измерений при добавлении раствора токсина для первого и второго образца ожидается, что токсин будет заплывать и выплывать из объёма ZMW-наноотверстия за характерные времена 10–100 мкс, и, таким образом, он не сможет дать значительный сигнал флуоресценции, эффективно регистрируемой только при нахождении молекулы токсина в ZMW-наноотверстии. Возможно лишь неспецифичное, с низкой вероятностью, прилипание к кварцевому дну и стенкам колодца. Для третьего образца ожидается, что заплывающие токсины будут связываться с СВП и давать значительный сигнал флуоресценции.

Для исследования взаимодействия токсин–рецептор предварительно подготовленные реакционные ячейки — образцы с массивом ZMW-наноотверстий — по очереди устанавливались в предметной плоскости оптического микроскопа. В каждую ячейку добавлялся раствор меченого токсина. Спустя время  $t = 4$  мин (характерное время, в течение которого происходит установление связи рецептора с токсином в ZMW) проводились измерения флуоресценции в образцах. На рисунке 7а–в показаны оптические изображения экспериментальных образцов, полученные на длине волны флуоресценции красителя AF555: (а) образец № 1 после шага нанесения поливинилфосфоновой кислоты, ПВФК; (б) образец № 2 после реакции "клик-химии"; (в) образец № 3 после полного протокола функционализации с присоединённым СВП. Яркие точки соответствуют сигналу флуоресценции, регистрируемому в области ZMW-наноотверстий. Этот сигнал формируется паразитной флуоресценцией для образцов № 1 и № 2 и только для образца № 3 — паразитной флуоресценцией и флуоресценцией токсинов, меченных молекулой AF555 и связавшихся с СВП на дне ZMW-наноотверстий.

На рисунке 7г гистограммами разных цветов показаны интенсивности флуоресценции 20 отдельных ZMW-наноотверстий для разных образцов: красным отмечены интенсивности флуоресценции ZMW-наноотверстий на образце № 1, зелёным — на образце № 2, синим — на образце № 3. Полупрозрачными горизонтальными линиями показаны средние сигналы флуоресценции: для образца № 1 средний сигнал составил  $6,1 \pm 3,4$ , для образца № 2 —  $18,2 \pm 7,3$ , для образца № 3 —  $45,4 \pm 19,5$ . Важно отметить что для образца № 1 (пассивация алюминия с помощью ПВФК) средний сигнал флуоресценции ( $6,1 \pm 3,4$ ) с точностью до ошибки не изменился по сравнению с уровнем паразитной флуоресценции ( $7,5 \pm 2,6$ ) после добавления меченого токсина. Причина состоит в низкой концентрации меченых токсинов в растворе. Так, в среднем на 100 ZMW-наноотверстий приходится один меченый токсин, и специфическое



**Рис. 7.** Изображение матрицы ZMW-наноотверстий, полученное на длине волны флуоресценции молекул красителя AF555, для трёх образцов при наблюдении связывания рецептор – токсин: (а) образец № 1 после шага нанесения ПВФК; (б) образец № 2 после реакции "клик-химии"; (в) образец № 3 после полного протокола функционализации с присоединённым СВП; г) гистограмма, показывающая уровень сигнала флуоресценции для всех трёх образцов, горизонтальными полупрозрачными линиями показаны средние сигналы флуоресценции, чёрные штриховые линии — это уровень паразитной флуоресценции до добавления токсина.

связывание отсутствует. Для образца № 2 (образец после этапа "клик-химии", но без СВП) средний сигнал флуоресценции вырос примерно в два раза по сравнению с паразитной флуоресценцией, с  $9,4 \pm 3,0$  до  $18,2 \pm 7,3$ . Это объясняется тем, что в результате функционализации образца на дне ZMW были образованы комплексы из органических молекул для иммобилизации СВП, где молекулы токсина могут локализовываться. Для образца № 3 (образец с иммобилизованным СВП) средний сигнал при добавлении токсина вырос более чем в четыре раза, с  $10,9 \pm 5,5$  до  $45,4 \pm 19,5$ , что отражает специфичное связывание СВП с токсином.

На рисунке 8а представлено изображение матрицы ZMW-наноотверстий, полученное на длине волны флуоресценции молекул красителя AF555. Цветными кругами отмечены три ZMW-наноотверстия, для которых измерялась временная зависимость сигнала флуоресценции. На рисунках 8б–г показаны зависимости сигнала флуоресценции от времени для отмеченных цветными кругами ZMW-наноотверстий. На графиках виден ступенчатый рост сигнала с примерно одинаковой разностью амплитуды сигнала для каждой такой "ступеньки" — характерная динамика, наблюдаемая при регистрации событий с одномолекулярной точностью. Такая форма сигнала связана с единичными актами присоединения меченого токсина к иммобилизованному СВП. Амплитуда роста сигнала для каждого акта присоединения немного отличается, но остаётся сравнимой. Эти различия могут быть связаны с ориентацией молекул красителя относительно возбуждающего поля, а также с присоединением токсина к СВП, находящимся в разных точках ZMW-наноотверстия — возбуждающее поле сильно неоднородно внутри ZMW-наноотверстия (рис. 2в), что влияет на регистрируемый поток фотонов.

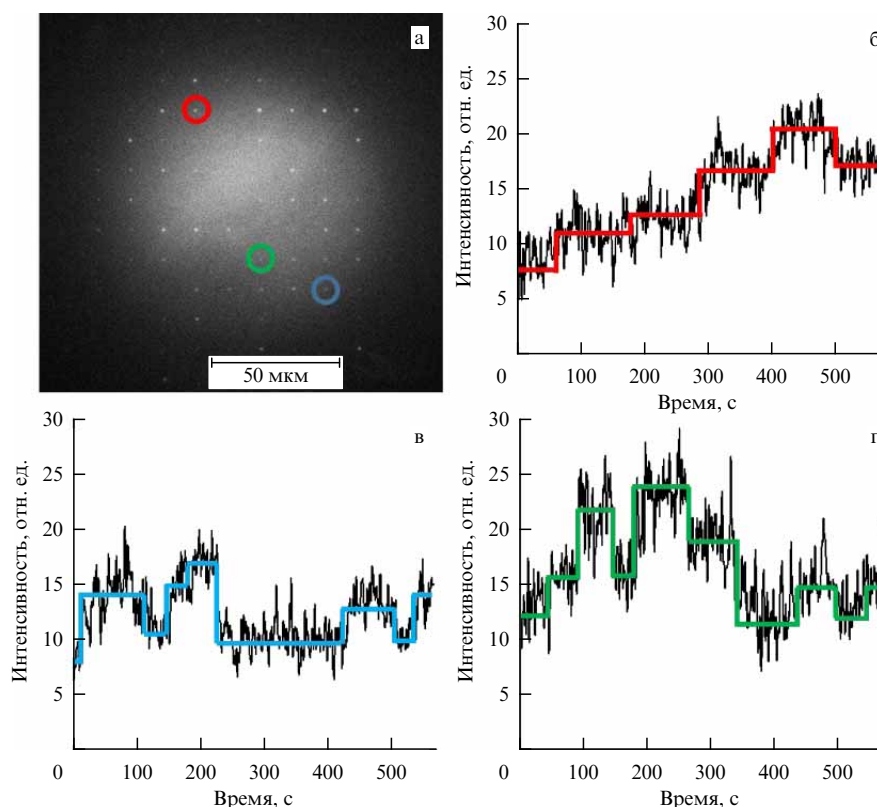
Полученные результаты показывают, что использование волноводов нулевой моды совместно с методами

SMCM позволяет регистрировать взаимодействие токсин – рецептор на уровне единичных молекул. Впервые была продемонстрирована принципиальная возможность наблюдать за одномолекулярной динамикой взаимодействия молекул рецептора и токсина.

## 6. Одномолекулярное секвенирование ДНК

Разработка методов одномолекулярного секвенирования является актуальной и довольно сложной научной задачей, имеющей высокую практическую и социальную значимость. Проекты, направленные на создание секвенаторов, позволяющих осуществлять полногеномное секвенирование, являются одними из центральных проектов государственного уровня в различных странах [78]. Прорывные технологии массового параллельного секвенирования ДНК (МПС), обеспечившие стремительный прогресс в последние годы, показали существенные ограничения: 1) невозможность точной расшифровки протяжённых участков ДНК, 2) процесс подготовки материала для исследования требует его амплификации, что связано с генерацией ошибок, а также с частичной потерей важной информации, 3) дороговизна приборов и сопутствующих реагентов существенно ограничивают их использование.

Экспоненциальный рост производительности секвенирования ДНК, наблюдавшийся в период с 2008 по 2013 гг., прекратился после 2016 г., когда стоимость расшифровки одного генома человека зафиксировалась на отметке около 1000 долларов США. Падение стоимости произошло благодаря существенному прогрессу технологий массового параллельного секвенирования ДНК, которые фактически достигли своего предела и по производительности, и по стоимости. Бутылочным горлышком на пути наращивания масштабов и спектра популяционных исследований в настоящее время является стоимость секвенирования, составляющая для домини-



**Рис. 8.** Измеренная одномолекулярная динамика связывания рецептор–токсин: (а) изображение матрицы ZMW-наноотверстий, полученное на длине волны флуоресценции молекул красителя AF555, при наблюдении связывания рецептор–токсин на единичном уровне (цветными кругами отмечены три ZMW-наноотверстия, для которых представлена временная зависимость сигнала флуоресценции); (б) временная динамика для ZMW-наноотверстия, отмеченного красным кругом; (в) временная динамика для ZMW-наноотверстия, отмеченного синим кругом; г) временная динамика для ZMW-наноотверстия, отмеченного зелёным кругом.

рующей на рынке геномных исследований на сегодня технологии массового параллельного секвенирования ДНК более 30000 рублей за 1 млрд нуклеотидов (1 Гб). Дальнейшее снижение стоимости секвенирования возможно только путём повышения производительности секвенирования ДНК.

Бурное развитие технологий секвенирования второго поколения предоставило колоссальные возможности для научных молекулярно-генетических исследований и открыло огромный рынок связанных с этим услуг. В то же время новые возможности породили и новые запросы. Всё более чётко проявляются задачи, которые трудно или невозможно решить, используя короткие прочтения ДНК. Так, изучение сложных микробных сообществ по фрагменту гена 16S рРНК с использованием коротких прочтений имеет ограниченную разрешающую способность, а метагеномные исследования на основе полногеномного секвенирования дороги и сложны. Между тем метагеномные исследования находят применение как в фундаментальной биологии, так и в медицине, биотехнологии, сельском хозяйстве, пищевой промышленности, криминалистике и даже в вопросах сохранения культурного наследия [79, 80]. В свете объявленной ВОЗ программы One Health ("одно здоровье") особое значение приобретает изучение виромов (вирусных компонентов микробиомов) у домашних и сельскохозяйственных животных [81].

Разработка новых методов одномолекулярного секвенирования актуальна как для мировой науки в целом, так и для российской науки в частности. Секвенирование единичных молекул ДНК — это сложная научная и техническая задача, остающаяся актуальной на протяжении

более чем 20 лет. Само по себе решение данной задачи выведет на новый уровень возможности молекулярной генетики, которая всё больше востребована как в фундаментальной биологии, так и в медицине, криминалистике, пищевой промышленности и других отраслях человеческой деятельности. Следует также отметить гигантский социальный аспект, связанный с развитием персонализированной медицины и новых методов диагностики и лечения ряда тяжёлых заболеваний человека (онкозаболевания, болезни иммунной и нервной систем), развития подходов существенного продления времени активной жизни человека и др.

Методы одномолекулярного секвенирования решают задачу по определению видового состава микробных сообществ за счёт прочтения всего рибосомального оперона целиком, что позволяет более точно идентифицировать микроорганизмы. Большей точности удаётся достичь также при полногеномном метагеномном секвенировании (mWGS) [82]. На фоне вспышек коронавирусной эпидемии и регулярных сезонных вспышек вирусных респираторных заболеваний для эпидемиологии становится актуальной задача быстрого секвенирования вирусов и вирусных квазивидов. На примерах нанопорового секвенирования и SMRT (Single Molecule Real Time sequencing — секвенирование единичных молекул в режиме реального времени) показана возможность секвенировать целые вирусные геномы, что позволяет различать вирусные гаплотипы в пределах вирома [83].

Следует отметить комплексный междисциплинарный характер задачи одномолекулярного секвенирования. Круг решаемых проблем относится к разным областям наук: геномика, биофизика, биохимия, физика, оптика,



материаловедение и др., а также задачи идентификации определённой последовательности нуклеотидов. В развитии методов одномолекулярного секвенирования необходимо решить ряд важных задач, направленных на совершенствование методов синтеза реагентов, ультрабыстрого детектирования флуоресценции меченых нуклеотидов, измерения свойств флуоресценции меченых нуклеотидов, манипуляции в пространстве (с нанометровым разрешением) единичных молекул полимераз и связанных с ними молекул ДНК. Это также существенно расширит научные знания и методы управления (химические, оптические, физические) на уровне единичных биомолекул, что, в свою очередь, позволит решить ряд важных проблем в области сенсорики, высокочувствительной диагностики, визуализации биообъектов, получить новые знания в области биохимических и биофизических процессов, геномики на уровне единичных биомолекул, а также развить новые методы управления (физические, химические, оптические) единичными биомолекулами на наномасштабе.

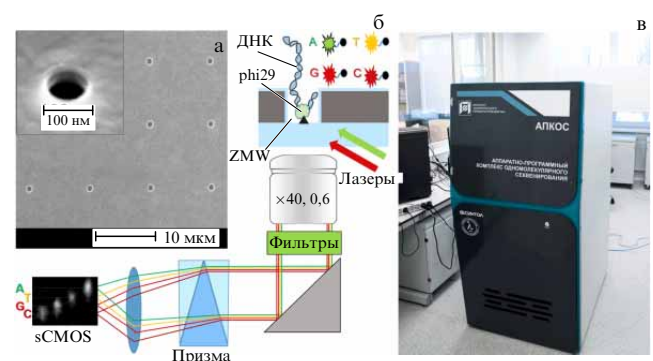
Доступные сегодня на мировом рынке секвенаторы третьего поколения не могут удовлетворить весь спрос на данные технологии. Наибольшая сложность на сегодня возникает с расходными материалами, имеющими довольно высокую стоимость из-за сложности их производства и совместимости с одномолекулярным уровнем чувствительности, что накладывает большие ограничения на чистоту и эффективность соответствующих реагентов и реакционных ячеек для секвенирования. Кроме того, они могут быть недоступны для работы в силу удалённости центров секвенирования или даже по политическим причинам: имеющиеся иностранные технологии секвенирования третьего поколения относятся к технологиям двойного назначения и поэтому имеют ограниченный доступ; обработка данных секвенирования ведётся на иностранных серверах, доступ к которым может быть ограничен; продажа реагентов для секвенирования может иметь санкционные ограничения для поставок в ряд стран; создание реакционных ячеек для секвенирования требует доступности к технологиям современной оптической нанолитографии (на момент написания настоящего обзора на территории РФ таких производств нет).

В Российской Федерации разработка оптического одномолекулярного секвенатора молекул ДНК была организована Институтом аналитического приборостроения РАН и выполнена совместно с ООО "Синтол" (разработка и изготовление реагентов для секвенирования), Институтом спектроскопии РАН (разработка и изготовление оптического детектора), а также Московским государственным техническим университетом им. Н.Э. Баумана (разработка и изготовление реакционных ячеек). На рисунке 9б представлена оптическая схема секвенатора, реализованная в соответствующем опытно образце прибора аппаратно-приборного комплекса одномолекулярного секвенирования (АПКОС) (рис. 9в).

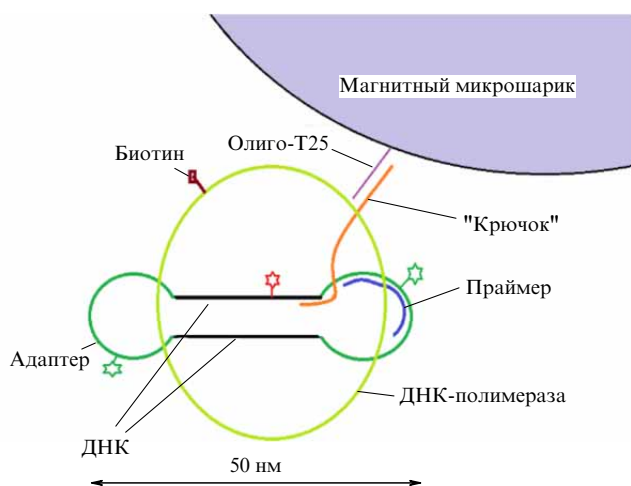
В созданном секвенаторе определение последовательности нуклеотидов молекулы ДНК происходит в процессе её репликации ферментом — полимеразой phi29, иммобилизованной внутри ZMW-наноотверстия на поверхности кварца (так называемое дно наноклодца, образованное ZMW-наноотверстием). Полимераза достраивает секвенируемую молекулу ДНК с использованием меченых (молекулами флуоресцентных красителей, см. далее) гексафосфатов, добавляемых с избытком в буферный раствор. Встраиваемый из гексафосфата нуклеотид является комплементарным нуклео-

тиду в секвенируемой в цепочке ДНК, находящегося в зоне активности полимеразы. При этом молекула флуоресцентного красителя высвобождается. Для определения типа встроенного полимеразой нуклеотида принципиально важно, чтобы гексафосфаты в буферном растворе имели индивидуальные метки. Например, гексафосфат с А-нуклеотидом помечен молекулой Cy 3, гексафосфат с Т-нуклеотидом — молекулой Cy 3.5, гексафосфат с G-нуклеотидом помечен молекулой Cy 5, а гексафосфат с С-нуклеотидом помечен молекулой Cy 5.5. Каждый тип приведённых молекул красителя имеет отличный характерный спектр флуоресценции. Идея одномолекулярного оптического секвенирования сводится к реализации безошибочного функционирования фермента и определения спектра флуоресценции метки гексафосфата, нуклеотид которого встраивается в цепь ДНК, комплементарную расшифровываемой.

Чтобы выполнить секвенирование ДНК и получить информацию о нуклеотидной последовательности, необходимо обеспечить проведение следующих действий: 1) пассивация поверхности реакционной ячейки с ZMW-наноотверстиями поливинилфосфоновой кислотой для подавления адгезии используемых в реакции секвенирования молекул на поверхность плёнки алюминия [84]; 2) функционализация поверхности кварца, расположенной внутри ZMW-наноотверстия — на данном этапе проводится химическая реакция, в результате которой с поверхностью кварца ковалентно связывается комплекс молекул биотин–стрептавидин, а с ним впоследствии связывается полимеразы phi29; 3) подготовка реакционной смеси с секвенируемой молекулой ДНК для создания кольцеобразного ДНК-комплекса, содержащего молекулу ДНК, праймер (необходим для связывания ДНК с полимеразой), биотинилированную ДНК-полимеразу phi29, используемые для создания кольцевой молекулы адаптеры (рис. 10); 4) проведение реакции связывания созданного на предыдущем шаге ДНК-комплекса с магнитным микрошариком; 5) установка реакционной ячейки в секвенатор; 6) загрузка ДНК-комплекса в реакционную ячейку с массивом ZMW-наноотверстий с использованием постоянного магнита, на этом шаге ДНК-комплекс оказывается иммобилизованным внутри ZMW-наноотверстия посредством связи биотин–стрептави-



**Рис. 9.** Одномолекулярный секвенатор молекул ДНК. (а) Изображение массива ZMW. (б) Упрощённая схема оптического детектора АПКОС, размещение молекулы ДНК с полимеразой phi29 в ZMW и мечеными гексафосфатами (А, Т, G, С), а также изображение с sCMOS (scientific Complementary Metal–Oxide–Semiconductor) камеры, используемой для регистрации слабых оптических сигналов. (в) Фотография опытного образца прибора АПКОС для одномолекулярного секвенирования ДНК.



**Рис. 10.** Структура загружаемого ДНК-комплекса. На рисунке схематически изображен состав комплекса, загружаемого в ZMW-наноотверстие с использованием магнитных микрошариков.

дин, которая значительно сильнее используемой связи ДНК-комплекса с магнитной микрочастицей (загрузка производится за счет длительных (до 20 мин) перемещений магнитных шариков с комплексами по поверхности реакционной ячейки — перемещения достигаются за счет использования сил магнитного притяжения к магниту, периодически меняющему положение); 7) введение в реакционную смесь флуоресцентно меченых гексафосфатов в буферном растворе; 8) включение источников лазерного излучения с длинами волн 532 нм и 640 нм; 9) регистрация по флуоресценции событий встраивания нуклеотидов в ДНК-комплекс в массиве ZMW-наноотверстий; 10) идентификация спектров флуоресценции молекул красителя, связанных со встроенным нуклеотидом; 11) формирование и анализ последовательности встроенных нуклеотидов.

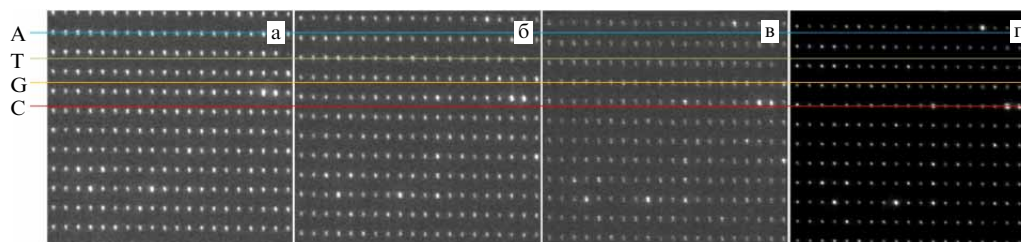
На рисунке 10 схематически изображен состав ДНК-комплекса, загружаемого в волновод нулевой моды с использованием магнитных микрошариков. Основу комплекса составляет кольцевая ДНК длиной от 266 до 20000 нуклеотидов, полимеразы phi29 на адаптерах (синтезированных последовательностях нуклеотидов для связи двух комплементарных цепочек части молекулы ДНК), в которых присутствуют метки красителями R6G и ROX для контроля эффективности загрузки в ZMW.

В созданном секвенаторе ДНК реализована спектроскопия единичных флуоресцентных молекул. Измерение

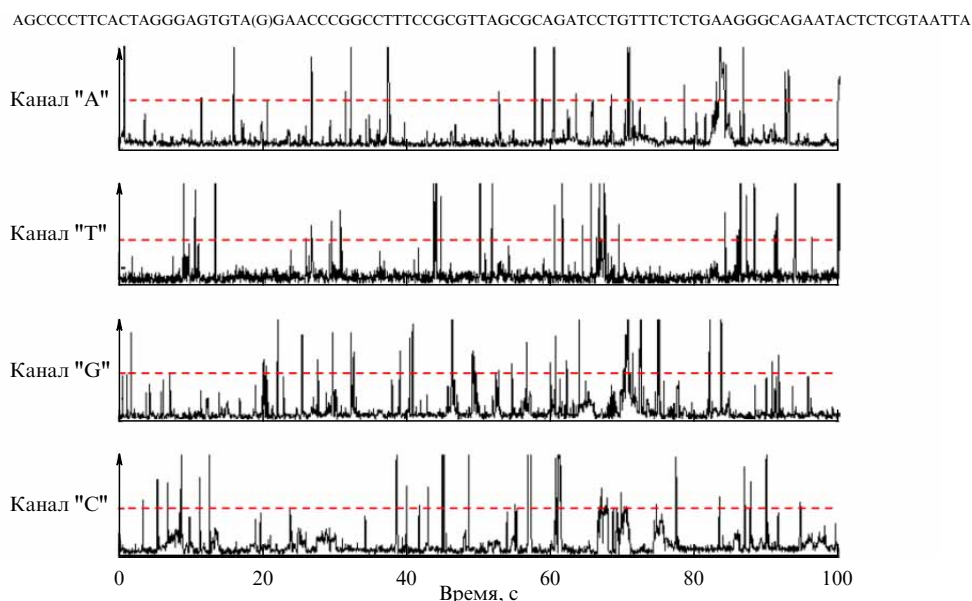
спектра проводится с использованием призмного спектрометра, который формирует одновременно флуоресцентное изображение реакционной ячейки с ZMW-наноотверстиями и спектры флуоресценции единичных молекул, находящихся в ZMW-наноотверстиях. Это так называемый спектрометр-микроскоп (imaging spectrometer). Одновременное получение оптического изображения и спектра флуоресценции становится возможным при использовании призмы с небольшой дисперсией (см. рис. 9), позволяющей на экране монитора получать изображение матрицы из ZMW-наноотверстий с небольшим смещением по одной из координат. Данное смещение, с одной стороны, зависит от длины волны излучения (из-за спектральной дисперсии используемой призмы), с другой — не очень велико по амплитуде, так что не происходит перекрытия изображений рядом расположенных ZMW-наноотверстий.

На рисунке 11 представлено спектральное разделение четырех каналов флуоресценции в оптическом детекторе секвенатора, показывающее принцип и возможность идентифицировать тип меченого нуклеотида по спектру флуоресценции единичной молекулы в ZMW-наноотверстии. На этом рисунке приведены изображения, полученные при пропускании света через ZMW-наноотверстия в реакционной ячейке, они образованы при использовании света с разной длиной волны: рис. 11а соответствует флуоресценции меченого нуклеотида А (связанного с молекулой Cy 3), рис. 11б соответствует флуоресценции меченого нуклеотида Т (связанного с молекулой Cy 3.5), рис. 11в соответствует флуоресценции меченого нуклеотида G (связанного с молекулой Cy 5), рис. 11г соответствует флуоресценции меченого нуклеотида С (связанного с молекулой Cy 5.5). Горизонтальные линии показывают ожидаемое расположение изображения волноводов нулевой моды для каждого из типов нуклеотидов.

На рисунке 12 представлены результаты работы созданного секвенатора, демонстрирующие формирование последовательности нуклеотидов по сигналам детектора из всех четырех его каналов регистрации при одномолекулярном секвенировании. Приведены результаты измерений последовательности нуклеотидов синтезированного олигонуклеотида с использованием ДНК-полимеразы phi29 за время 100 с при использовании возбуждения лазером 532 нм и 640 нм в ZMW-наноотверстии. Штриховая линия показывает уровень, выше которого регистрируются события встраивания нуклеотида полимеразой. В верхней части рисунка показана определенная последовательность нуклеотидов.



**Рис. 11.** Спектральное разделение четырех каналов флуоресценции в оптическом детекторе секвенатора. Представлены изображения, полученные при пропускании света с разной длиной волны через ZMW-наноотверстия в реакционной ячейке, образованные при использовании света: (а) флуоресценция меченого нуклеотида А, (б) флуоресценция меченого нуклеотида Т, (в) флуоресценция меченого нуклеотида G, (г) флуоресценция меченого нуклеотида С. Горизонтальные линии показывают ожидаемое расположение изображения волноводов нулевой моды для каждого из типов нуклеотидов.



**Рис. 12.** Регистрируемые временные сигналы одномолекулярного секвенирования. Представлены результаты измерений последовательности нуклеотидов модельной синтетической матрицы (искусственно синтезированная молекула ДНК с известной последовательностью нуклеотидов) с использованием ДНК-полимеразы phi29 за время 100 с при использовании возбуждения лазером 532 нм и 640 нм в ZMW-наноотверстии. Штриховая линия показывает уровень, выше которого регистрируются события встраивания нуклеотида полимеразой. В верхней части графика представлена определённая оптическим детектором последовательность нуклеотидов.

## 7. Заключение

Современный уровень развития методов регистрации флуоресценции единичных молекул, при одновременном использовании технологий нанопотоники, нанолитографии, интегральной оптики, реализует множество важных инструментов для задач сенсорики, биологии, вирусологии, генетики. Представленные в настоящем обзоре примеры отображают лишь небольшую часть полученных результатов в области приложения методов регистрации и счёта единичных молекул при регистрации флуоресценции молекул красителя, флуоресцентных нанообъектов.

Следует отметить большой прогресс других направлений одномолекулярного детектирования, основанных на регистрации значений рН, электрофоретических токов, применяемых не только в научных исследованиях, но и в коммерческих устройствах [78].

Использование возможностей современной нанолитографии позволяет значительно масштабировать число одновременно совершаемых одномолекулярных измерений. Так, современные платформы уже способны проводить мониторинг одномолекулярных реакций с 25 млн единичных молекул одновременно [85]. Активно развиваются методы обработки соответствующих изображений с привлечением искусственного интеллекта, благодаря чему можно существенно увеличить пространственную плотность оптических изображений [86, 87].

### Благодарности

Исследования проведены в рамках проекта FFUU-2024-0003 Института спектроскопии РАН. Часть исследований проведена при финансовой поддержке проекта РФФ № 23-42-00049. Работы по созданию одномолекулярного оптического секвенатора выполнены в рамках исследовательской программы Министерства науки и высшего образования РФ (проект № 075-15-2021-1057, головная организация — Институт аналитического приборостроения РАН).

## Список литературы

1. Nayak K P et al. *Opt. Express* **15** 5431 (2007)
2. Akimov A V et al. *Nature* **450** 402 (2007)
3. Xie X S, Dunn R C *Science* **265** 361 (1994)
4. Rossier J F *Nature Mater.* **12** 480 (2013)
5. Wallquist M et al. *Phys. Scr.* **2009** (T137) 014001 (2009)
6. Koch J et al. *Phys. Rev. B* **70** 195107 (2004)
7. Hugel T et al. *Science* **296** 1103 (2002)
8. Ritter J G et al. *PLoS ONE* **5** (7) e11639 (2010) <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0011639>
9. Liu Z, Lavis L D, Betzig E *Mol. Cell* **58** 644 (2015)
10. Yanagida T, Ishii Y (Eds) *Single Molecule Dynamics in Life Science* (Weinheim: Wiley-VCH Verlag, 2008)
11. Levi V, Gratton E *Cell Biochem. Biophys.* **48** 1 (2007)
12. Goodhill G J *Trends Neurosci.* **39** (4) 202 (2016)
13. Zlatanova J, van Holde K *Mol. Cell* **24** 317 (2006)
14. Miller H et al. *Rep. Prog. Phys.* **81** 024601 (2018)
15. Lu H P, Xun L, Xie X S *Science* **282** 1877 (1998)
16. Liang W et al. *Nature* **417** 725 (2002)
17. Todd J et al. *Clin. Chem.* **53** 1990 (2007)
18. Ma F et al. *Acc. Chem. Res.* **49** 1722 (2016)
19. Taylor A B, Zijlstra P *ACS Sensors* **2** 1103 (2017)
20. Walt D R *Anal. Chem.* **85** 1258 (2013)
21. Upasham S, Tanak A, Prasad S *Adv. Health Care Technol.* **4** 1 (2018)
22. Moerner W E *J. Phys. Chem. B* **106** 910 (2002)
23. Балькин В И и др. *Письма в ЖЭТФ* **26** 492 (1977); Balykin V I et al. *JETP Lett.* **26** 357 (1977)
24. Персонов Р И и др. *ЖЭТФ* **65** 1825 (1973); Personov R I et al. *Sov. Phys. JETP* **38** 912 (1974)
25. Наумов А В, Вайнер Ю Г *УФН* **179** 322 (2009); Naumov A V, Vainer Yu G *Phys. Usp.* **52** 298 (2009)
26. Ерёмчев И Ю и др. *УФН* **192** 663 (2022); Eremchev I Yu et al. *Phys. Usp.* **65** 617 (2022)
27. Novotny L, Hecht B *Principles of Nano-Optics* (Cambridge: Cambridge Univ. Press, 2012)
28. Chen D, Dovichi N J *Anal. Chem.* **68** 690 (1996)
29. Matthews J C *Fundamentals of Receptor, Enzyme, and Transport Kinetics* (Boca Raton, FL: CRC Press, 1993)
30. Karlsson R *Anal. Biochem.* **221** (1) 142 (1994)
31. Latour R A *J. Biomed. Mater. Res. A* **103** 949 (2015)
32. Zijlstra P, Paulo P M R, Orrit M *Nature Nanotechnol.* **7** 379 (2012)

33. Weiss S *Science* **283** 1676 (1999)
34. Yang Y et al. *Chem. Rev.* **113** 192 (2013)
35. Sun W et al. *Chem. Rev.* **116** 7768 (2016)
36. Baldo M A, Thompson M E, Forrest S R *Nature* **403** 750 (2000)
37. Michalet X et al. *Science* **307** 538 (2005)
38. Min Y et al. *Nanomaterials* **4** 129 (2014)
39. Chudakov D M et al. *Physiol. Rev.* **90** 1103 (2010)
40. Demtröder W *Laser Spectroscopy I: Basic Principles* 5th ed. (Berlin: Springer, 2014)
41. Wang J-H et al. *Laser Photon. Rev.* **16** 2100622 (2022)
42. Doronin I V et al. *Nanoscale* **16** 14899 (2024)
43. Gritchenko A S et al. *Nanoscale* **14** 9910 (2022)
44. Lebedev D V et al. *Adv. Opt. Mater.* **12** 2400581 (2024)
45. Beliaev L Yu, Takayama O, Melentiev P N, Lavrinenko A V *Opto-Electron. Adv.* **4** 210031 (2021)
46. Hirschfeld T *Appl. Opt.* **15** 2965 (1976)
47. Widengren J, Rigler R *Bioimaging* **4** (3) 149 (1996)
48. Munkhbat B et al. *Sci. Adv.* **4** eaas9552 (2018)
49. Doronin I V et al. *Nano Lett.* **22** 105 (2022)
50. Балькин В И, Мелентьев П Н *УФН* **188** 143 (2018); Balykin V I, Melentiev P N *Phys. Usp.* **61** 133 (2018)
51. Maier S A *Plasmonics: Fundamentals and Applications* (New York: Springer, 2007)
52. Мелентьев П Н, Балькин В И *УФН* **189** 282 (2019); Melentiev P N, Balykin V I *Phys. Usp.* **62** 267 (2019)
53. Klimov V *Nanoplasmonics* (New York: Jenny Stanford Publ., 2014) <https://doi.org/10.1201/b15442>
54. Levene M J et al. *Science* **299** 682 (2003)
55. Bethe H A *Phys. Rev.* **66** 163 (1944)
56. Crouch G M, Han D, Bohn P W *J. Phys. D* **51** 193001 (2018)
57. Rigneault H et al. *Phys. Rev. Lett.* **95** 117401 (2005)
58. Entzeroth M, Flotow H, Condron P *Curr. Protocols Pharmacol.* **44** 9.4 (2009) <https://doi.org/10.1002/0471141755.ph0904s44>
59. Miyake T et al. *Anal. Chem.* **80** 6018 (2008)
60. Chen J et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **111** 664 (2013)
61. Baek S et al. *Anal. Chem.* **94** 3970 (2022) <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.1c05091>
62. Punj D et al. *WIREs Nanomed. Nanobiotechnol.* **6** 268 (2014) <https://doi.org/10.1002/wnan.1261>
63. Jackson J D *Classical Electrodynamics* 3rd ed. (New York: Wiley, 1999)
64. Eid J et al. *Science* **323** 133 (2009)
65. Zhong C F et al. "Substrates and optical systems and methods of use thereof," CA2737505C (2009); <https://patents.google.com/patent/CA2737505C/>
66. Kogelnik H *IEEE Trans. Microwave Theory Tech.* **23** (1) 2 (1975); Пер. на русск. яз.: Когельник Г *УФН* **121** 695 (1977)
67. Pengfei Y et al. *Opt. Precision Eng.* **30** (1) 62 (2022)
68. Katrukha I A *Biochemistry Moscow* **78** 1447 (2013) <https://doi.org/10.1134/S0006297913130063>
69. Hamm C W et al. *Eur. Heart J.* **32** 2999 (2011)
70. Shah A S V et al. *Lancet* **386** 2481 (2015)
71. Babuin L, Jaffe A S *CMAJ* **173** 1191 (2005)
72. Melentiev P N et al. *ACS Sens.* **5** 3576 (2020)
73. Bhat T, Cao A, Yin J *Viruses* **14** 383 (2022)
74. Kudryavtsev D S et al. *Nanoscale* **16** 12424 (2024)
75. Wölfel R et al. *Nature* **581** 465 (2020)
76. Wang W et al. *JAMA* **323** 1843 (2020) <https://doi.org/10.1001/jama.2020.3786>
77. Tsetlin V I *Trends Pharmacol. Sci.* **36** 109 (2015)
78. Shendure J et al. *Nature* **550** 345 (2017)
79. Shendure J, Ji H *Nat. Biotechnol.* **26** 1135 (2008)
80. Frankish A et al. *Nucl. Acids Res.* **47** D766 (2019)
81. Djordjevic S P et al. *Nat. Rev. Genet.* **25** 142 (2024)
82. Thomas T, Gilbert J, Meyer F *Microbial Inform. Exp.* **2** 3 (2012) <https://doi.org/10.1186/2042-5783-2-3>
83. Rubio L, Galipienso L, Ferriol I *Front. Plant Sci.* **11** 1092 (2020) <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.01092>
84. Korlach J et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **105** 1176 (2008)
85. "25 million ZMW SMRT Cell." PacBio, <https://www.pacb.com/revio/>
86. Dias R, Torkamani A *Genome Med.* **11** 70 (2019)
87. Novakovsky G et al. *Nat. Rev. Genet.* **24** 125 (2023)

### Optical methods for detection of single biomolecules: visualization, sensorics, sequencing of DNA molecules

P.N. Melentiev<sup>(1,\*), A.S. Kalmykov<sup>(1), A.S. Gritchenko<sup>(1), M.P. Shemeteva<sup>(1), A.M. Safonova<sup>(1), M.S. Markov<sup>(1), V.I. Balykin<sup>(1), A.S. Bukatin<sup>(2), N.V. Vaulin<sup>(2), D.A. Belov<sup>(2), A.A. Evstrapov<sup>(2), D.A. Baklykov<sup>(3), A.V. Andriyash<sup>(3), A.A. Barbasheva<sup>(4), A.K. Kuguk<sup>(4), V.V. Ryzhkov<sup>(4), I.A. Rodionov<sup>(4), D.S. Kudryavtsev<sup>(5), V.A. Mozhaeva<sup>(5), L.V. Son<sup>(5), V.I. Tsetlin<sup>(5), B.N. Khlebtsov<sup>(6), M.S. Kobzev<sup>(7), Yu.O. Kuznetsova<sup>(7), B.T. Sharipov<sup>(7), A.S. Yashkin<sup>(7), Ya.I. Alekseev<sup>(2,7)</sup></sup></sup></sup></sup></sup></sup></sup></sup></sup></sup></sup></sup></sup></sup></sup></sup></sup></sup></sup></sup></sup></sup></sup></sup></sup></sup>

<sup>(1)</sup> Institute of Spectroscopy, Russian Academy of Sciences, ul. Fizicheskaya 5, 108840 Troitsk, Moscow, Russian Federation

<sup>(2)</sup> Institute for Analytical Instrumentation, Russian Academy of Sciences, ul. Ivana Chernykh 31-33, lit. A, 198095 St. Petersburg, Russian Federation

<sup>(3)</sup> Dukhov Research Institute of Automatics, ul. Sushchevskaya 22, 119017 Moscow, Russian Federation

<sup>(4)</sup> Bauman Moscow State Technical University, ul. 2-ya Baumanskaya 5/1, 105005 Moscow, Russian Federation

<sup>(5)</sup> Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, ul. Miklukho-Maklaya 16/10, 117997 Moscow, Russian Federation

<sup>(6)</sup> Institute of Biochemistry and Physiology of Plants and Microorganisms, Saratov Scientific Center, Russian Academy of Sciences, prosp. Entuziastov 13, 410049 Saratov, Russian Federation

<sup>(7)</sup> Syntol Ltd., Timiryazevskaya ul. 42, korp. B, office 316, 127434 Moscow, Russian Federation

E-mail: <sup>(\*)</sup> melentiev@isan.troitsk.ru

A brief overview of the state of the art in optical methods for detecting a single molecule in biomedical applications is presented. It is shown that the registration of fluorescence of single dye molecules covalently bound to antibodies (biomolecules), together with the use of modern nanophotonics methods, can be used to solve various problems in biology and medicine: visualization of biomolecules, toxins, and virus particles; determination of extremely low concentrations of analytes directly in a sample without using methods for increasing the analyte concentration; and optical single-molecule sequencing of DNA molecules. The existing physical limitations of the methods of optical detection and counting of single molecules and their impact on solving existing problems in biology, medicine, and genetics are discussed.

**Keywords:** nanophotonics, nanoplasmonics, sensorics of ultra-low concentrations of analytes, detection of single molecules, biovisualization, zero-mode waveguides, single-molecule sequencing

PACS numbers: **07.60. -j, 32.50. +d, 87.64. -t**

Bibliography — 87 references

*Uspekhi Fizicheskikh Nauk* **194** (11) 1130–1145 (2024)

DOI: <https://doi.org/10.3367/UFNr.2024.07.039720>

Received 13 March 2024, revised 16 July 2024

*Physics – Uspekhi* **67** (11) (2024)

DOI: <https://doi.org/10.3367/UFNe.2024.07.039720>