

Zero-Mode Waveguides: передовой инструмент для анализа единичных молекул

МАРКОВ МИХАИЛ

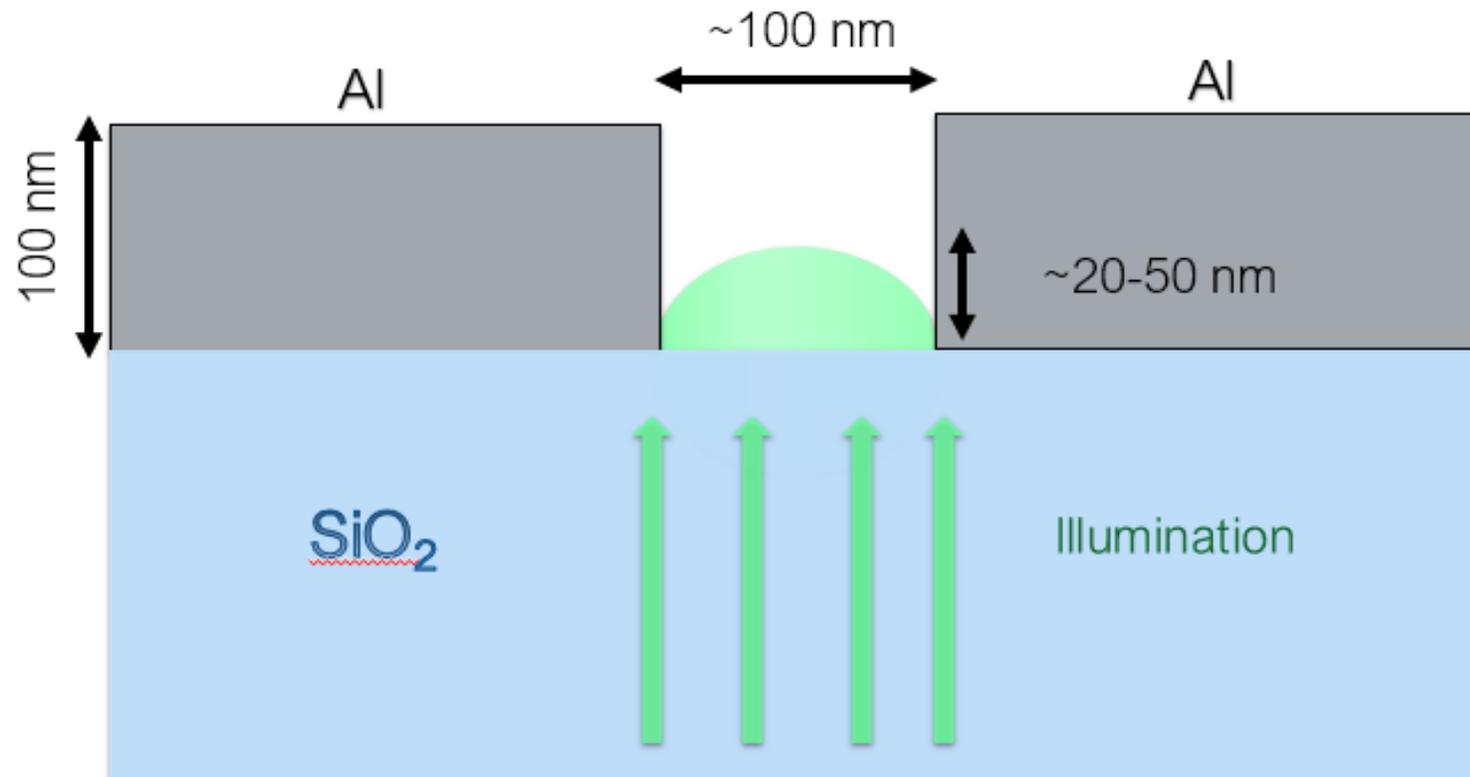
ФАКУЛЬТЕТ ФИЗИКИ

БАЗОВАЯ КАФЕДРА КВАНТОВОЙ ОПТИКИ И НАНОФОТОНИКИ

ИНСТИТУТА СПЕКТРОСКОПИИ РАН

Содержание

Zero-Mode Waveguide: краткое описание



Структура Zero-Mode Waveguide (ZMW), облучаемого зеленым лазером.

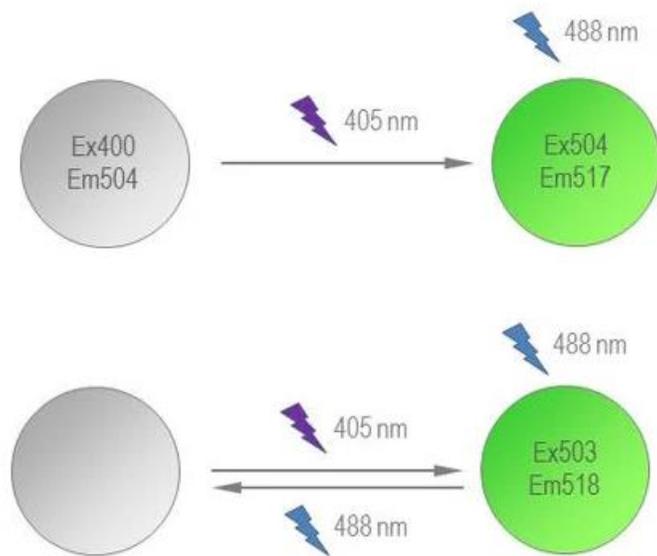
Методы одномолекулярного анализа

	Методы уменьшения концентрации	Методы уменьшения наблюдаемого объема
Локализация	PALM (FPALM) STORM	STED NSOM TIRF
Изучение динамики процессов	Разбавление раствора	Двухфотонное возбуждение ZMW

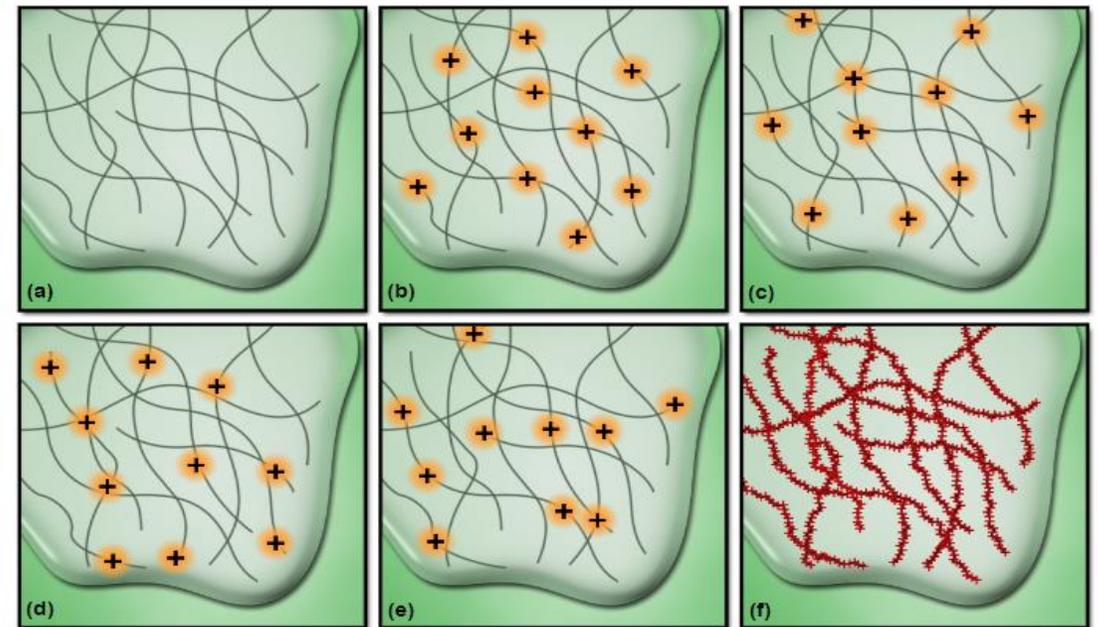
Аббревиатуры: **(F-) PALM** - (Fluorescently) Photoactivated Localization Microscopy, **STORM** - stochastic optical reconstruction microscopy; **STED** - stimulated emission depletion, **NSOM** - nearfield scanning optical microscopy, **TIRF** - total internal reflection fluorescence [1]

Методы PALM и STORM

Принцип работы фотоактивации белков, применяемых в методе PALM [c]

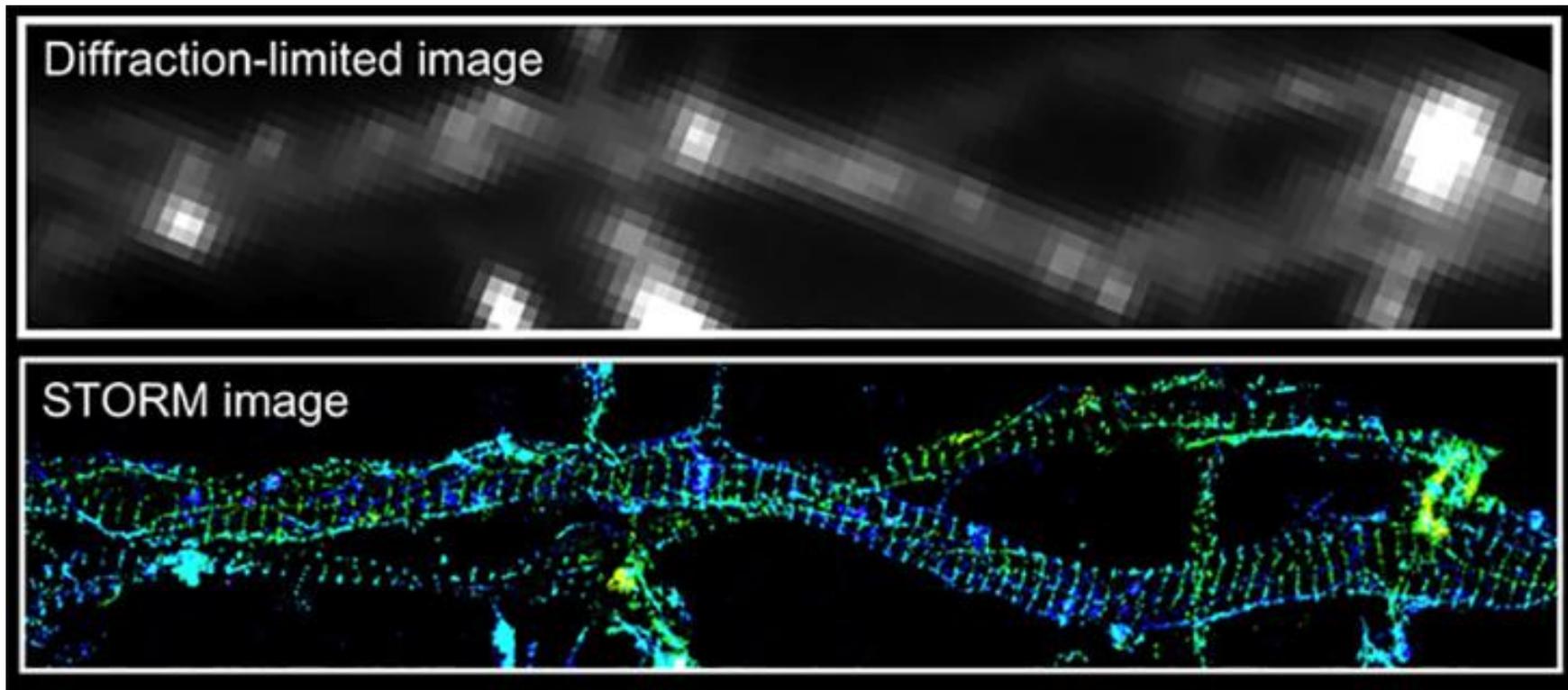


Базовый принцип работы STORM [c]



$$d = \frac{\lambda}{2NA}$$

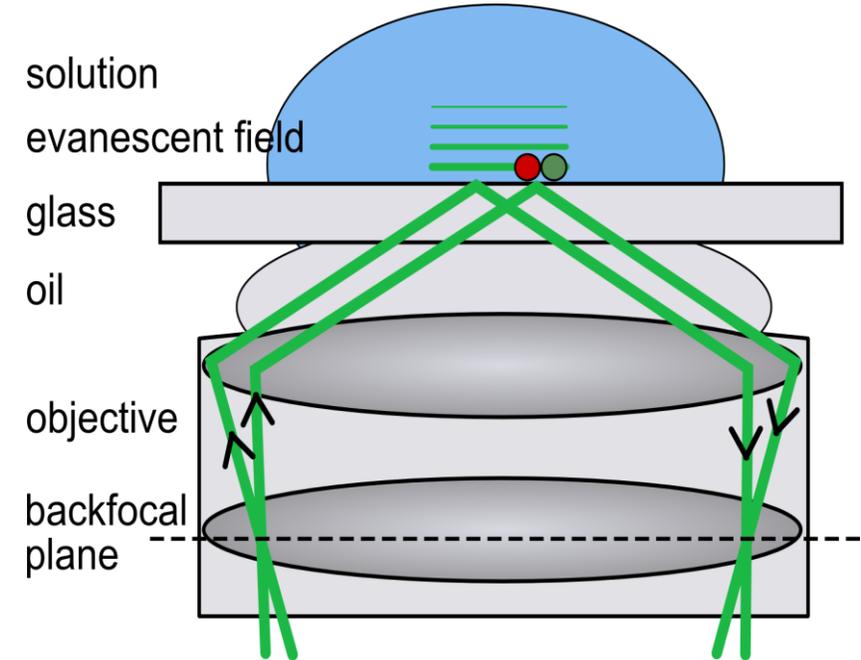
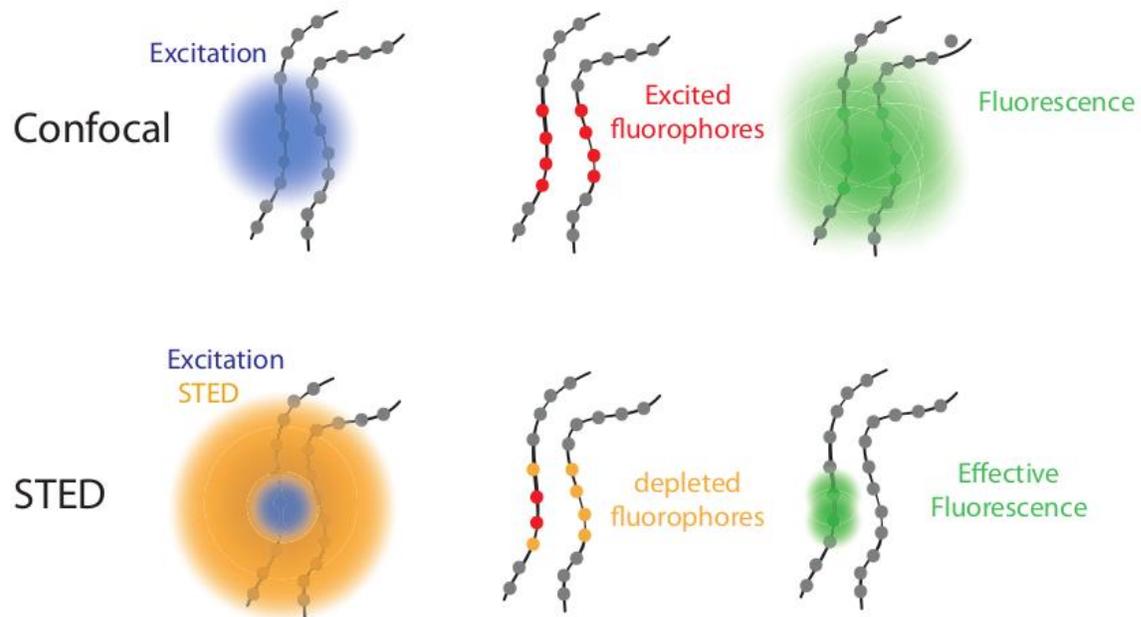
Дифракционный
предел



Изображение белка-актина, составляющего аксоны,
полученное с помощью конфокального микроскопа (вверху) и
STORM (внизу) [c]

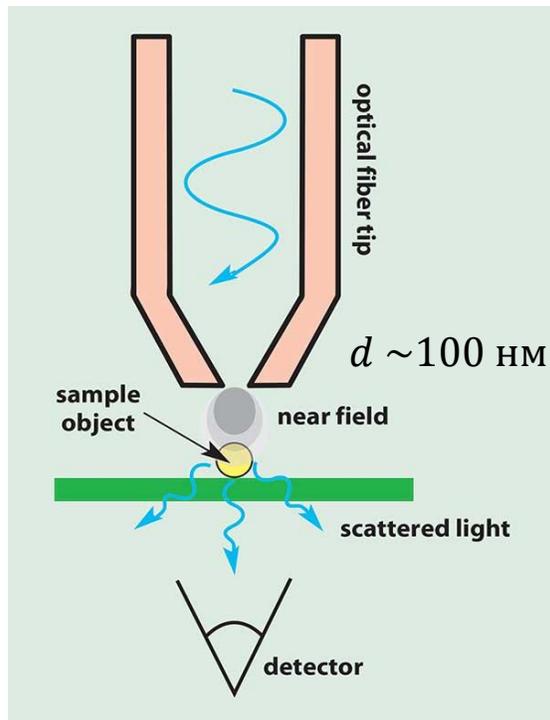
Методы STED и TIRF

Принцип работы STED (слева) [c] и TIRF (справа) [c]

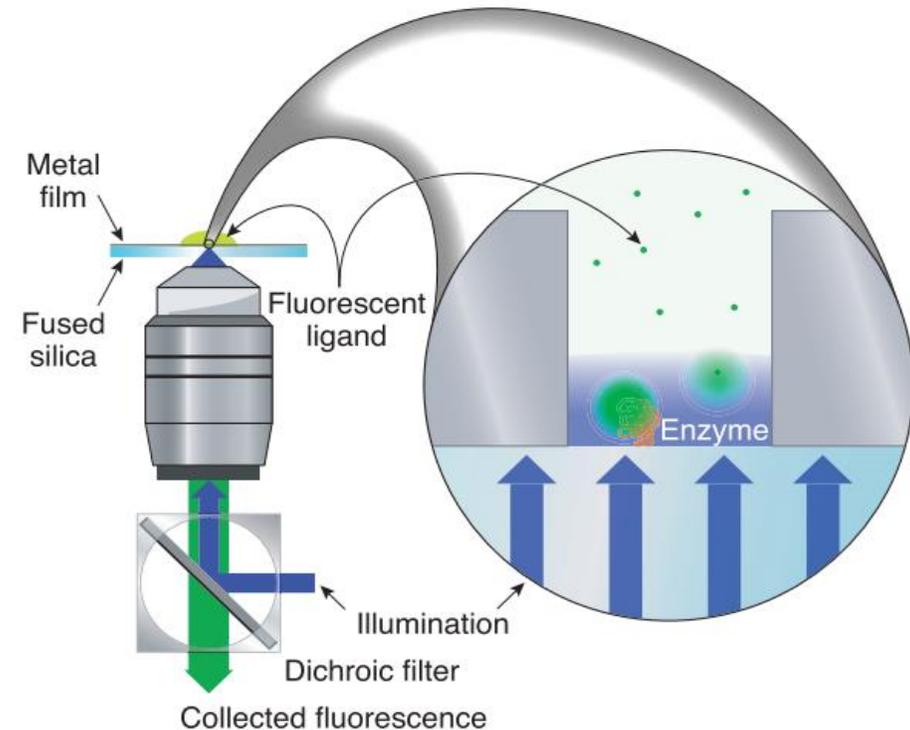


Метод NSOM и ZMW

Поле излучения в методе NSOM (с)



Установка для изучения белков с использованием ZMW [8]



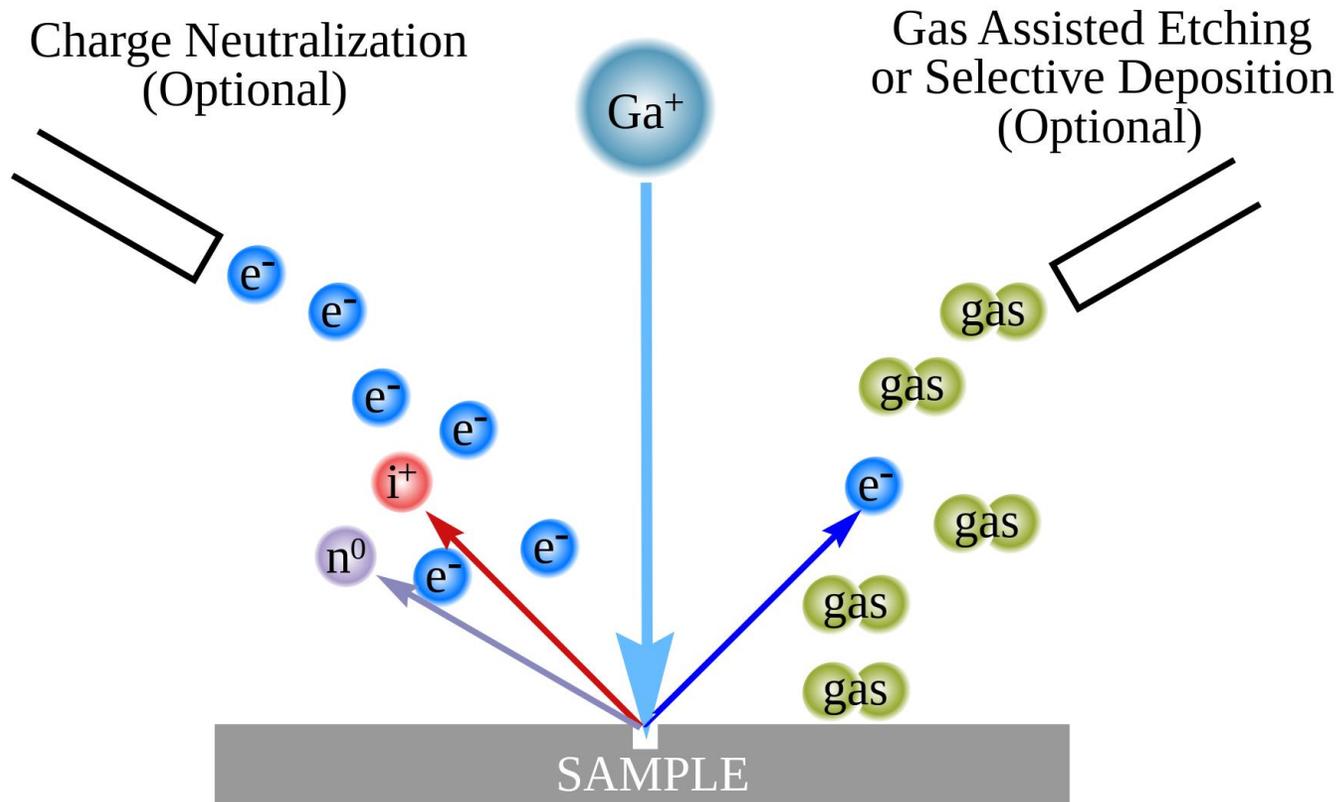
Преимущества ZMW при одномолекулярном анализе

- Возможность использования высоких концентраций аналита (до мМ)
- Уменьшение фонового шума
- Существенно малый детектируемый объем (менее 10^{-18} л)
- Усиление флуоресценции молекул, находящихся внутри ZMW (эффект Парселла, связывание с поверхностными плазмонами) [4], [5]
- Способность одновременного контроля большого числа параллельных реакций (использование матриц ZMW)
- Возможность интеграции в различные оптические системы

Изготовление ZMW

- Focused-Ion-Beam (FIB) Milling
- Self-Assembled Nano-Sized Beads
- Lift-Off method - Negative-Electron-Beam Resists
- Electron Litography

Focused-Ion-Beam Milling



Преимущества:

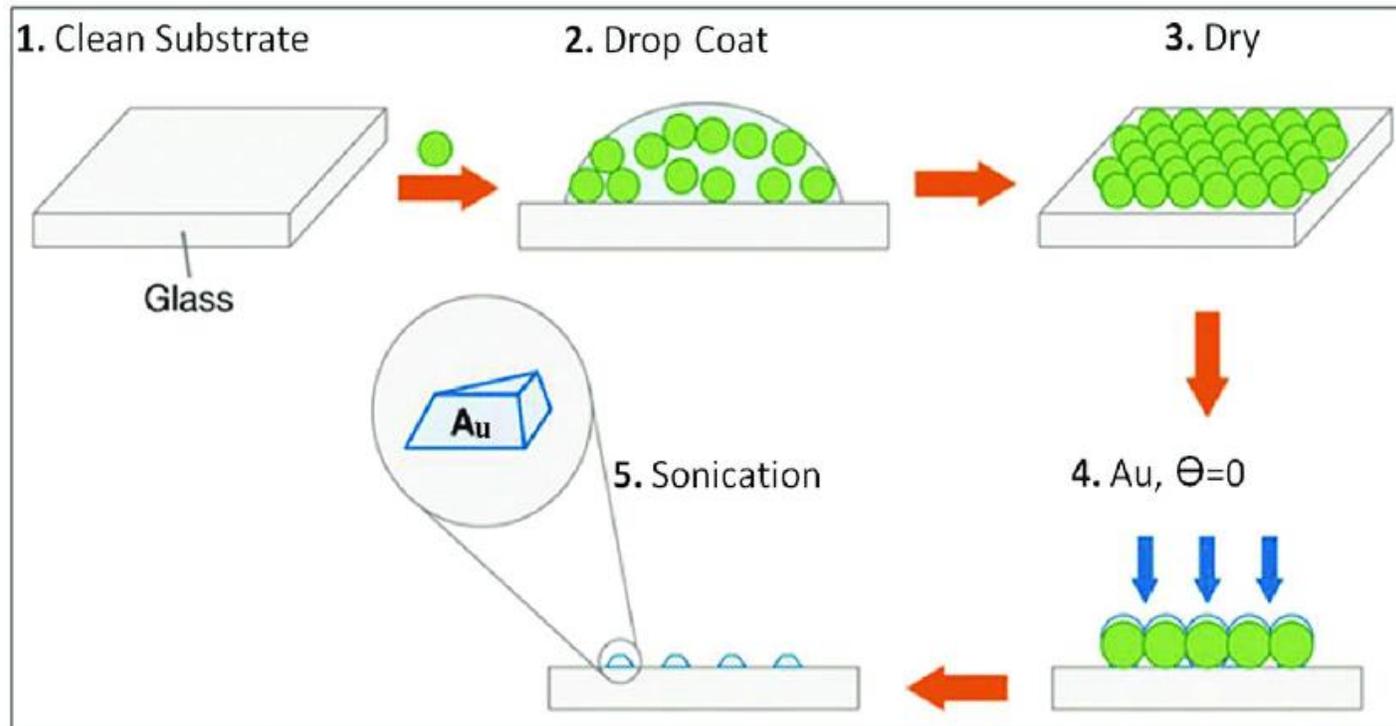
- Высокая точность (~ 5 нм)
- Создание отверстий любой формы и размера

Недостатки:

- Малая скорость
- Проблема создания апертур размером больше критического (размера пятна пучка в фокусе)
- Коническое сечение апертуры

Источники: [1], [6]

Nanosphere lithography



Преимущества:

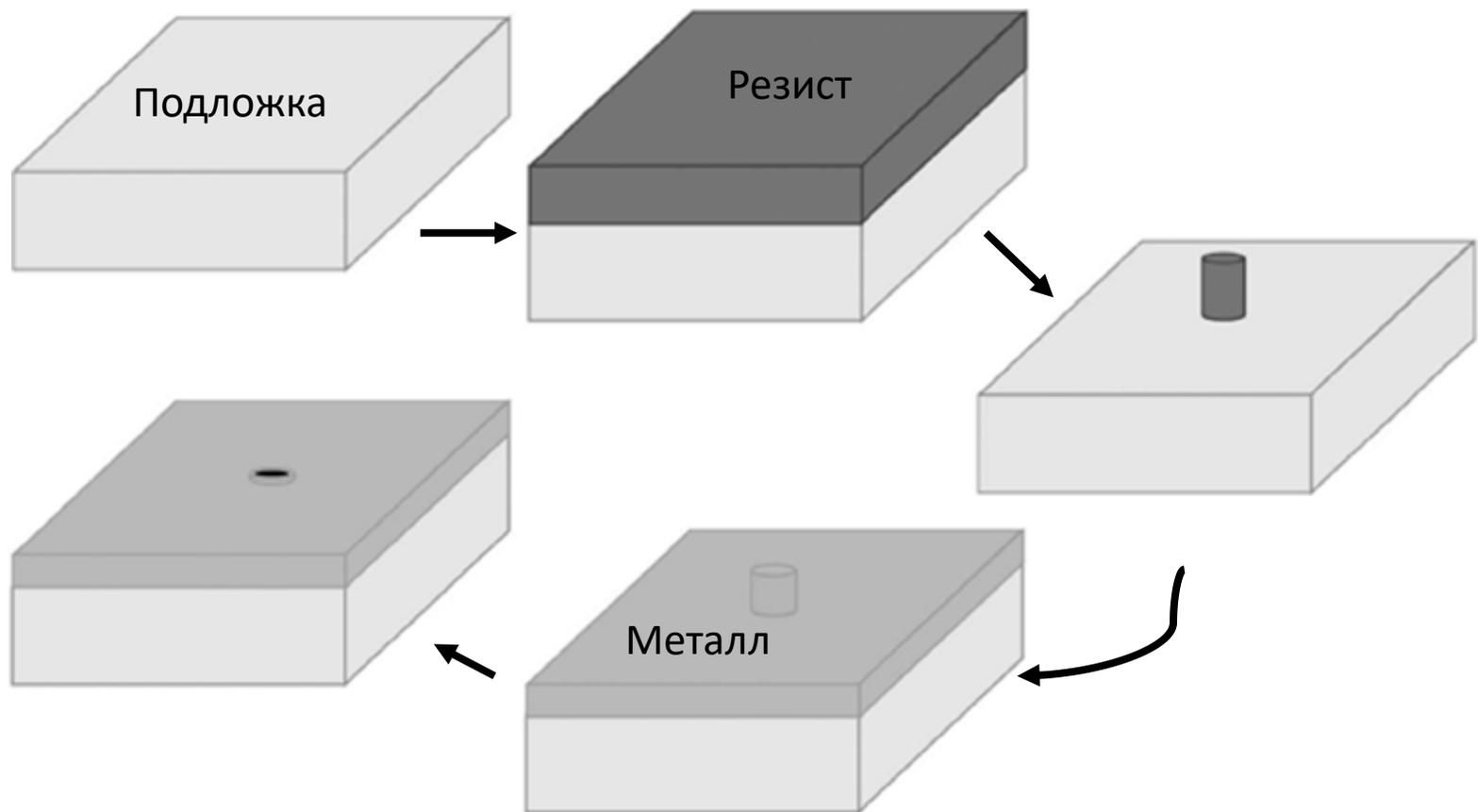
- Эффективность
- Дешевизна

Недостатки:

- Малая точность
- Гексагональная структура матриц

Источники: [1], [7], [8], [c]

Lift-Off method



Преимущества:

- Эффективность
- Предотвращение чрезмерного/недо-травления
- Универсальность по отношению к напыляемым материалам
- Позволяет вытравить гладкие и чистые поверхности (без дефектов)

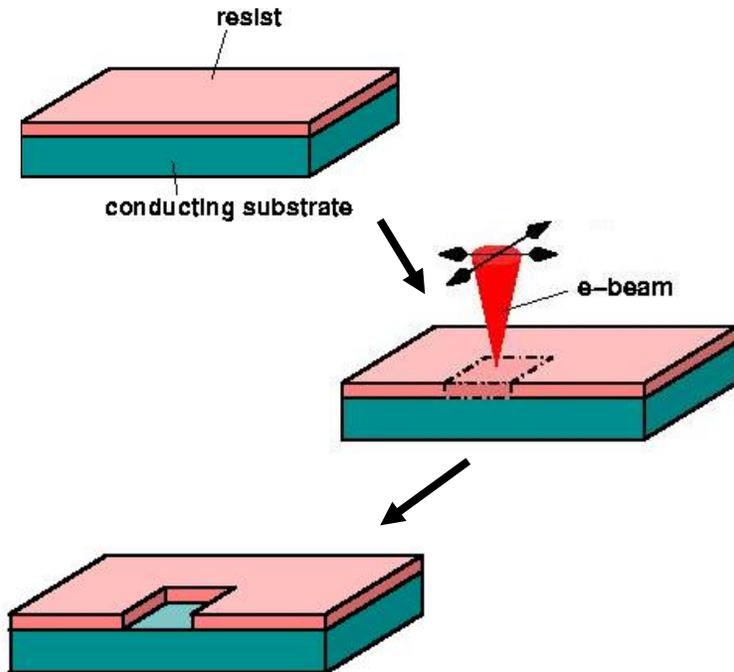
Недостатки:

- Ограничения по ширине слоя металла и расстоянию между отверстиями

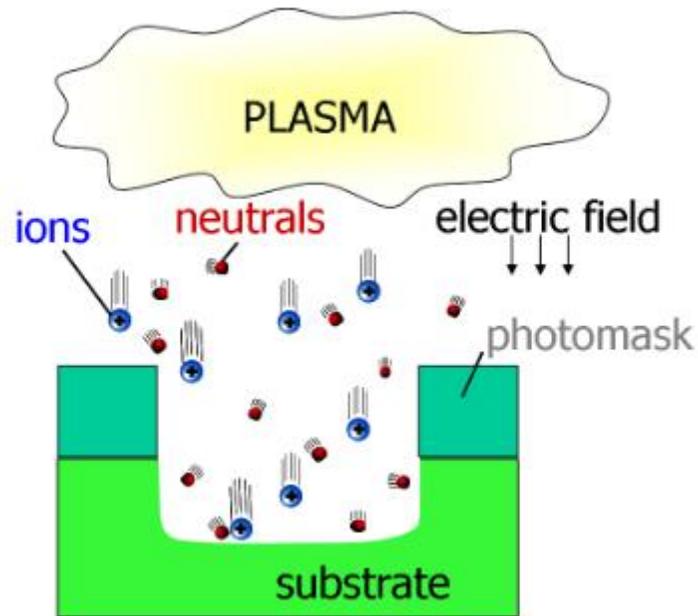
Источники: [1], [6]

Electron lithography

Электронная литография



Плазмохимическое травление



Преимущества:

- Эффективность
- Осаждение происходит до травления

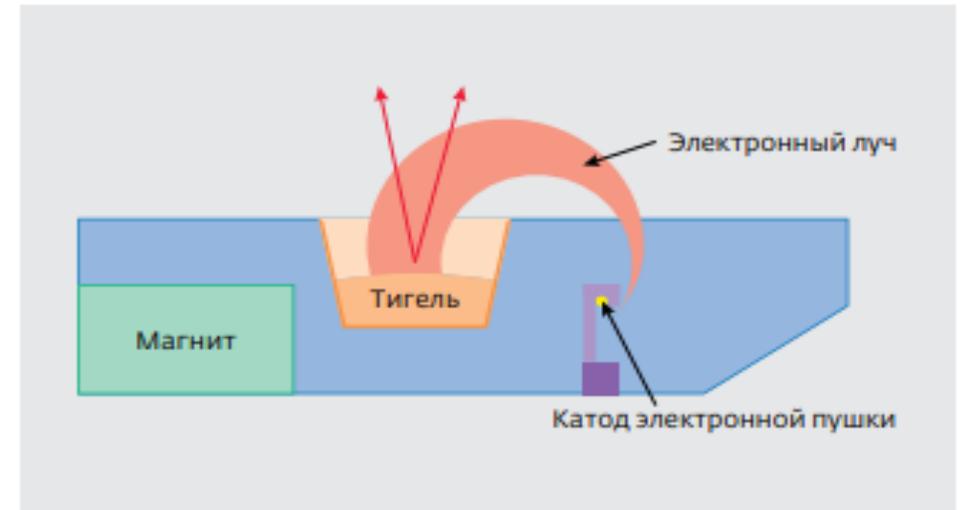
Недостатки:

- Необходимость подбирать реагенты для каждого материала
- Форма отверстия неравномерна по сечению

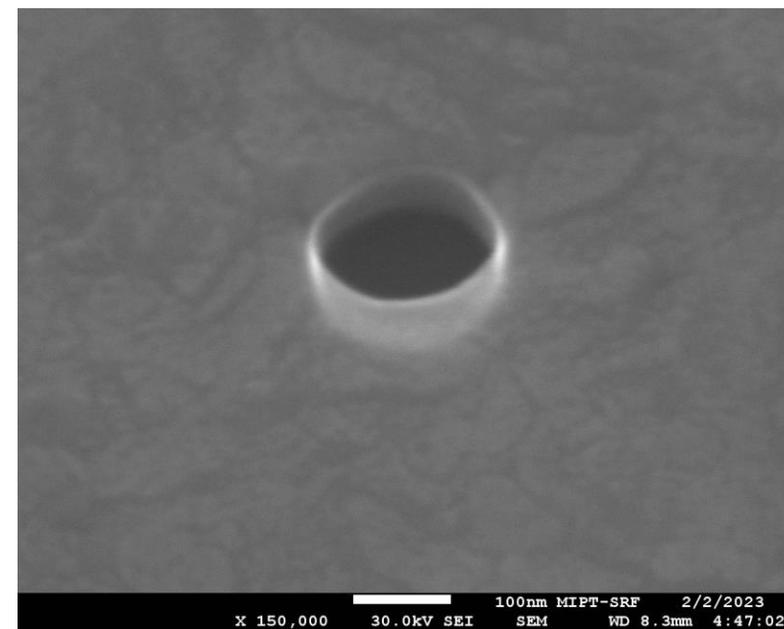
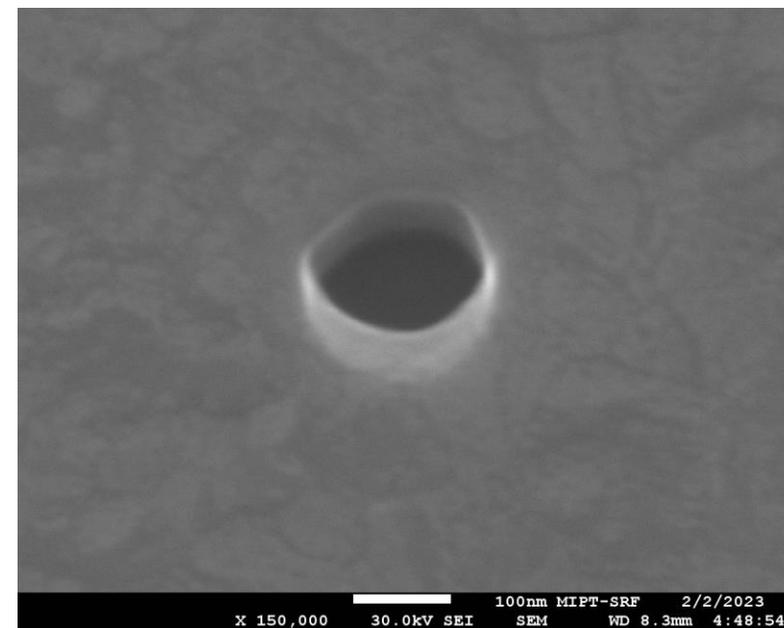
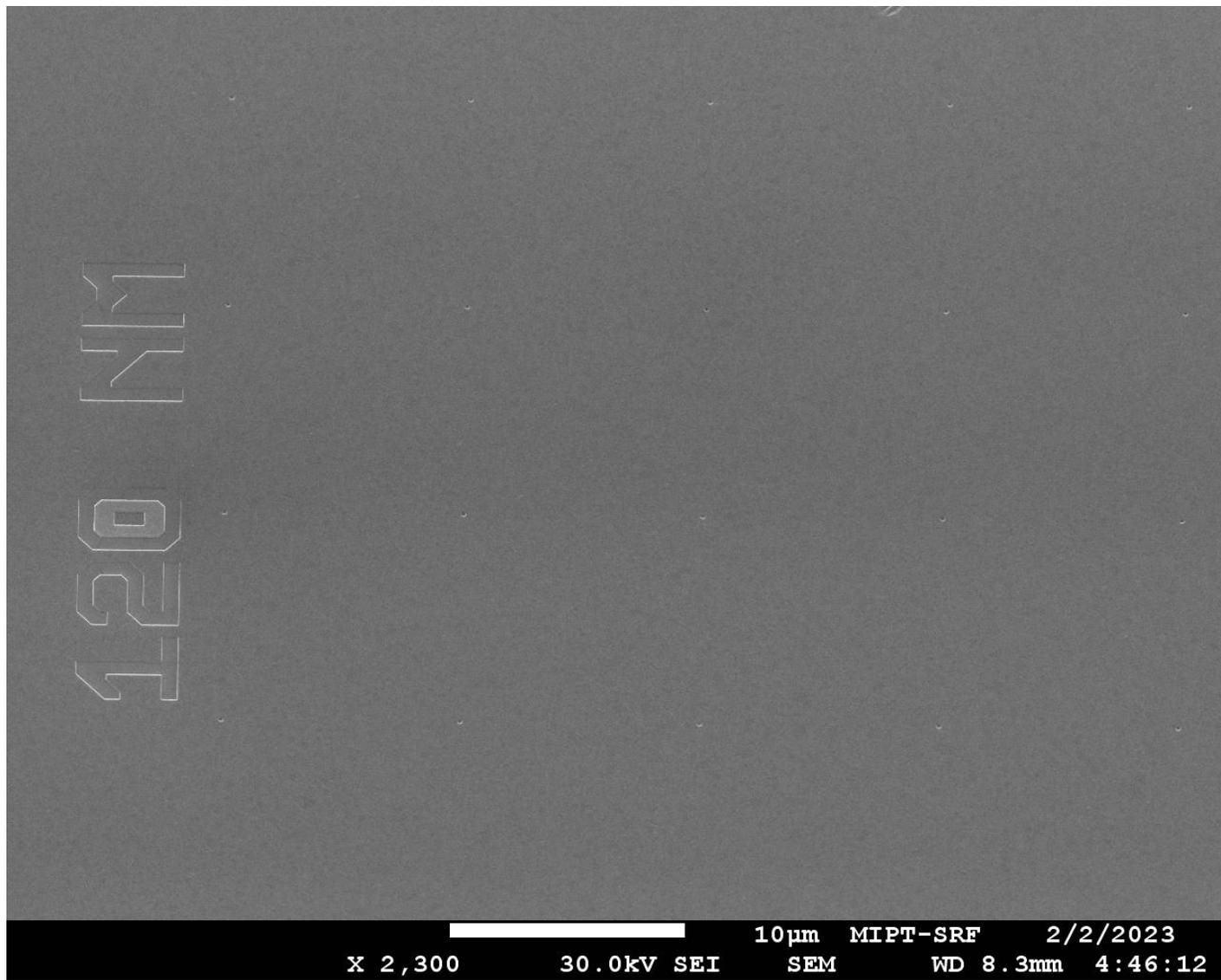
Источники: [1], [[c1](#)], [[c2](#)]

Изготовление ZMW

1. Осаждение алюминия путем испарения металла электронным лучом (electron beam evaporation), толщина $h = 100$ нм, скорость напыления 1 нм/с, Plassys MEB550S.
2. Нанесение центрифугированием слоя позитивного резиста, AR-P6200.04, затем электронная литография, Crestec CABL9500C, и проявка в AR600-546.
3. Плазмохимическое травление в смеси газов BCl_3/Cl_2 , установка Trion MLIII.
4. Удаление резиста в кислородной плазме, установка Corial 200I.



Испарение металла в тигле путем бомбардировки электронным пучком



Используемые материалы

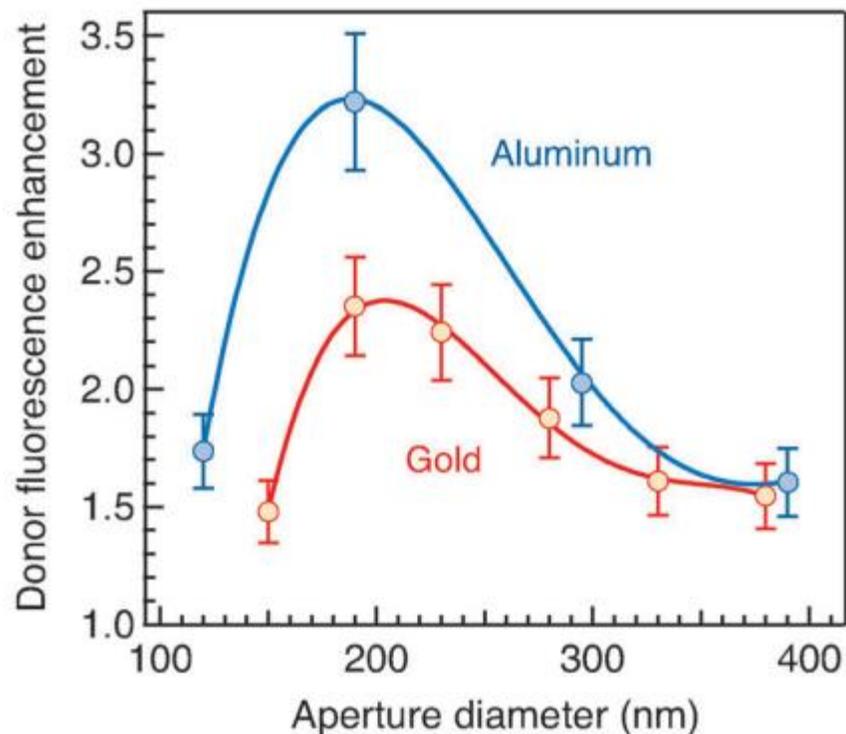
Подложка: плавленый кварц – очень высокая прозрачность

Металлы [1], [9] - [11]:

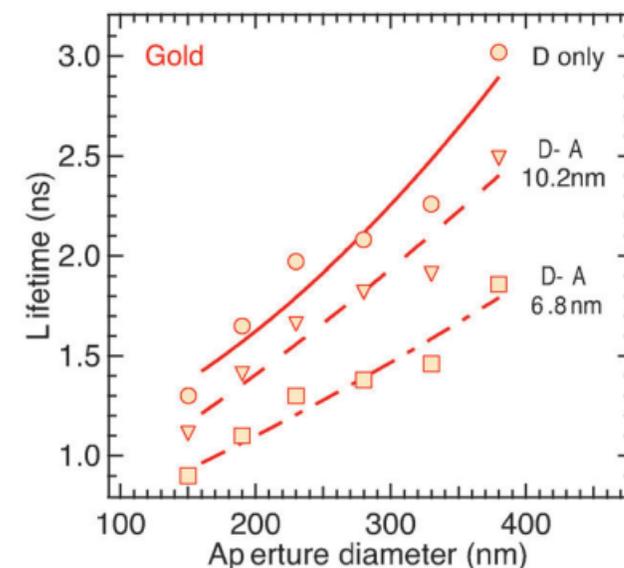
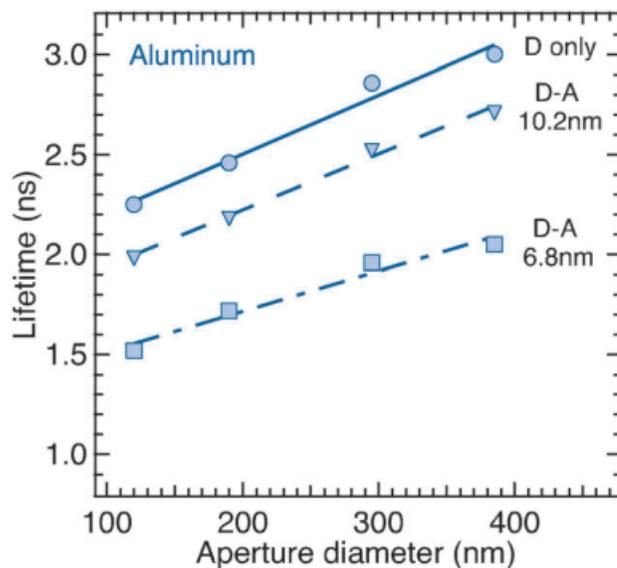
- **Алюминий (Al)** – обладает необходимыми оптическими свойствами в видимом диапазоне (высокое отражение/малая глубина проникновения), но присутствует оксидный слой - высокая адгезия анализа на поверхности, более дешевый
- **Золото (Au)** – более химически стабилен, но плохие оптические свойства (низкая отражательная способность – $R = 0.79$ при $\lambda = 550$ нм, возбуждение плазмонных резонансов)
- **Серебро (Ag)** – необходимые оптические свойства, тонкие пленки легко окисляются и чернеют
- **Хром (Cr)** – малая реакционная способность, но высокое пропускание в видимом спектре ($R = 0.55$ при $\lambda = 550$ нм)
- **Палладий (Pd)** – по результатам работы [9] является наиболее оптимальным вариантом

Сравнение Al и Au

Усиление флуоресценции.
Молекула: Atto550 [10]

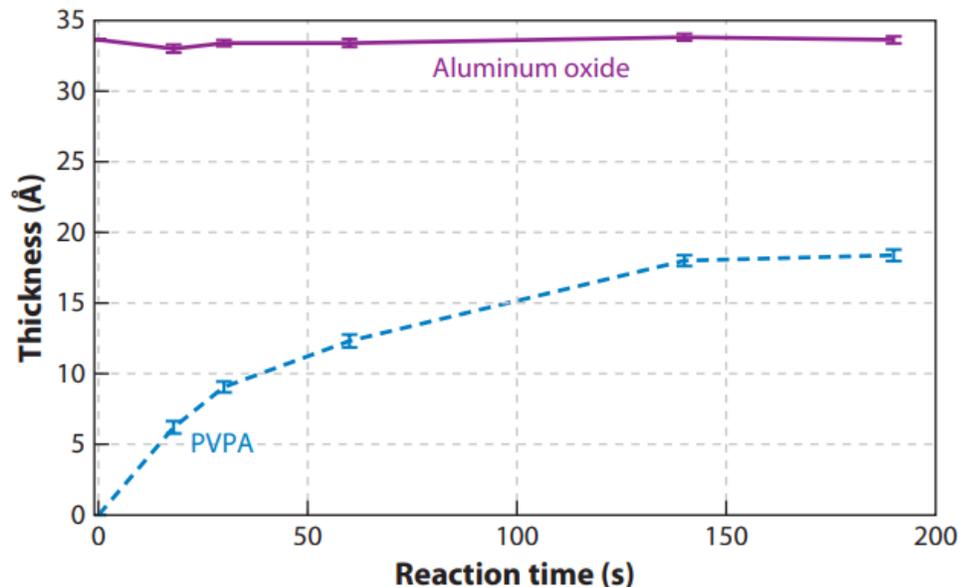


Время жизни молекул при изучении FRET (D – изолированный донор, D-A – донор + акцептор при различных расстояниях друг от друга, соединение с помощью молекулы ДНК)



Модификации поверхности ZMW

- Ультразвуковая очистка и очистка в кислородной плазме уменьшают адгезию
- Bovine Serum Albumin (BSA) – пассивирует поверхность, но может вымываться и слипаться с флуоресцентными молекулами

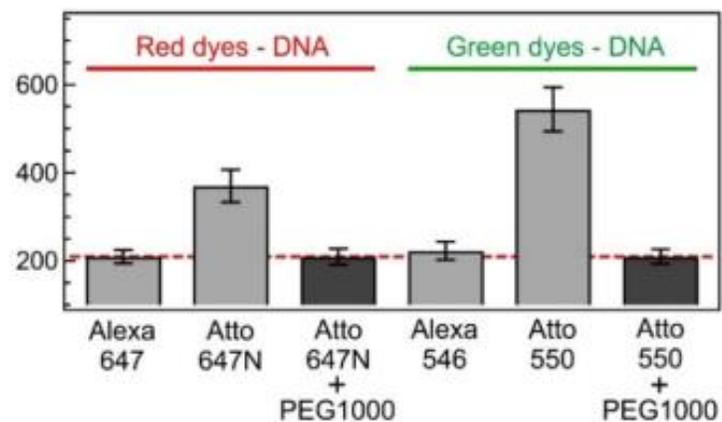


- Polyvinyl Phosphonic Acid (PVPA) – отлично пассивирует поверхность алюминия, отношение адсорбции на поверхности пассивированного алюминия/кварца = <1:400 [1], [12]

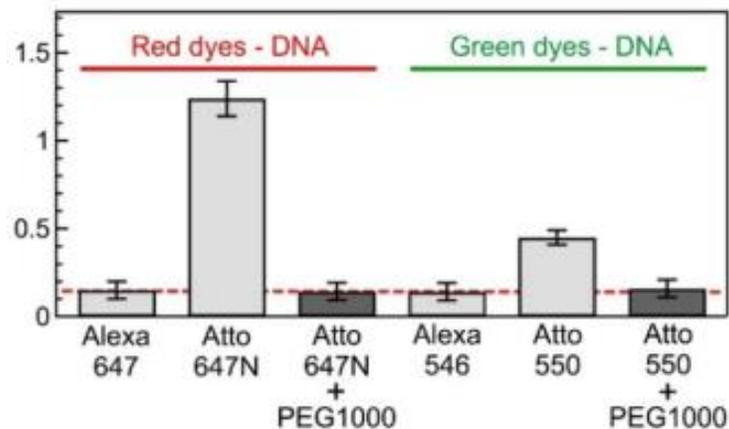
Зависимость толщины слоя оксида алюминия и PVPA от времени проведения реакции

Модификации поверхности ZMW

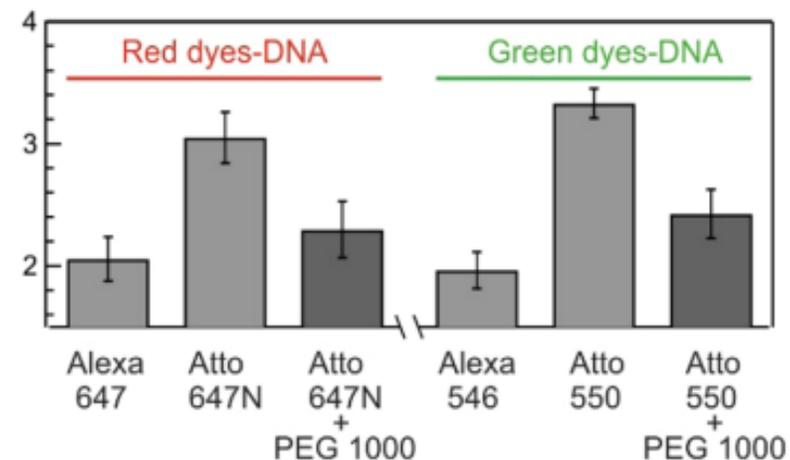
Время “диффузии”
молекул в ZMW, мкс [12]



Среднее количество
молекул в ZMW



Уменьшение времени
жизни флуоресценции



Пропускание света через субволновые апертуры

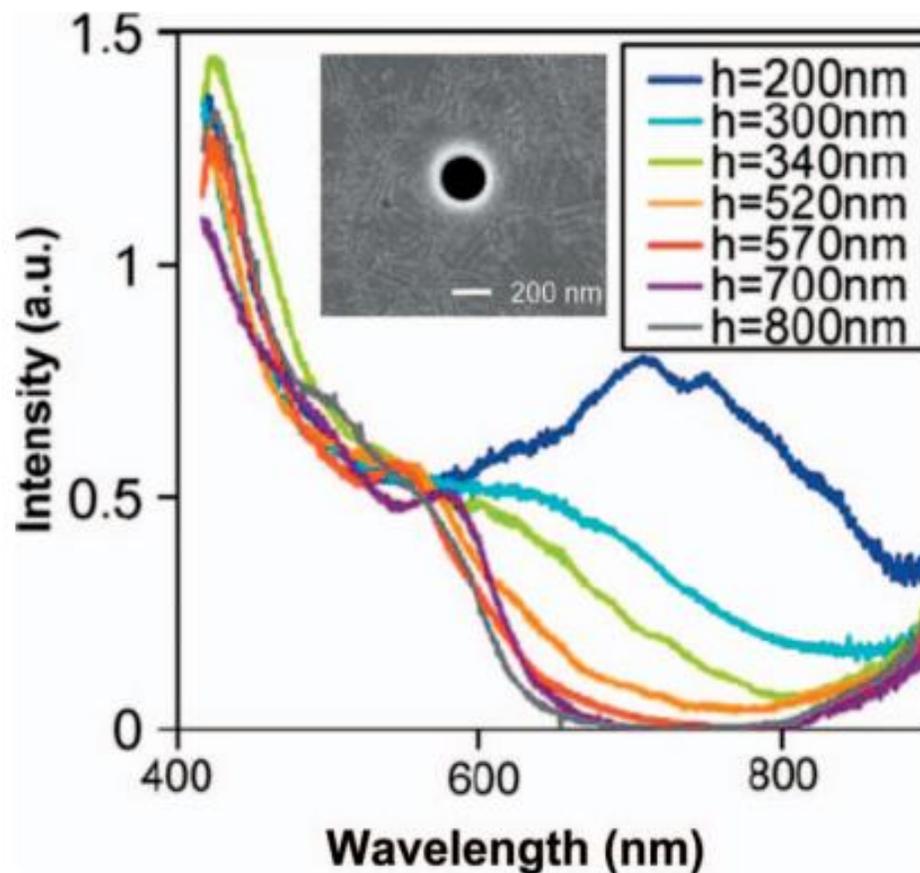
Теория Бете

$$T_{Be} = \frac{64 (kr)^4}{27\pi^2}$$

Следующий порядок
(теория Баукампа)

$$T_{Bo} = T_{Be}(1 + C),$$

где $C \propto \left(\frac{r}{\lambda}\right)^2$

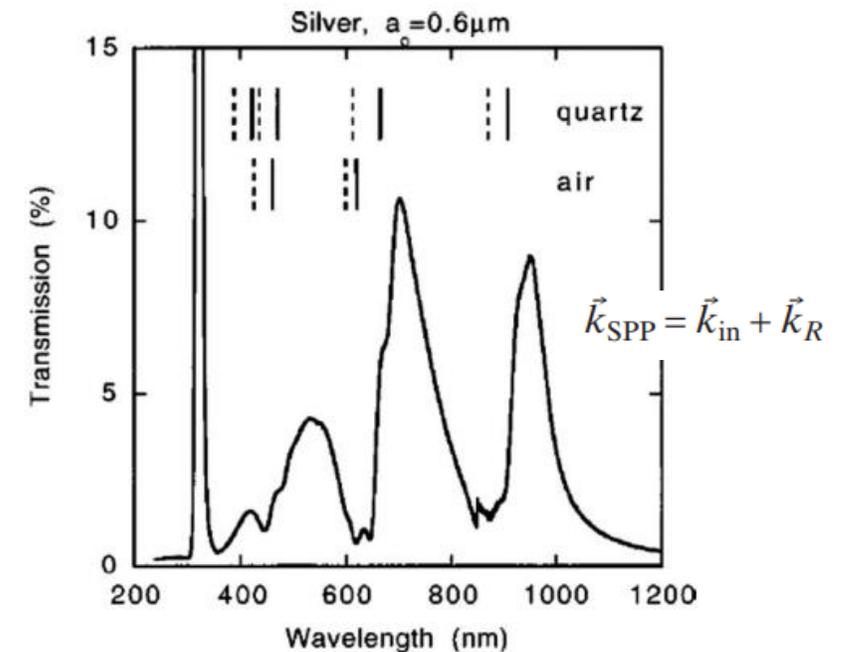


Спектр прошедшего
света для отверстия
диаметром $d = 270$ нм,
 h – толщина слоя.
(Вверху) изображение
наноотверстия в SEM
[13]

Причины пропускания света

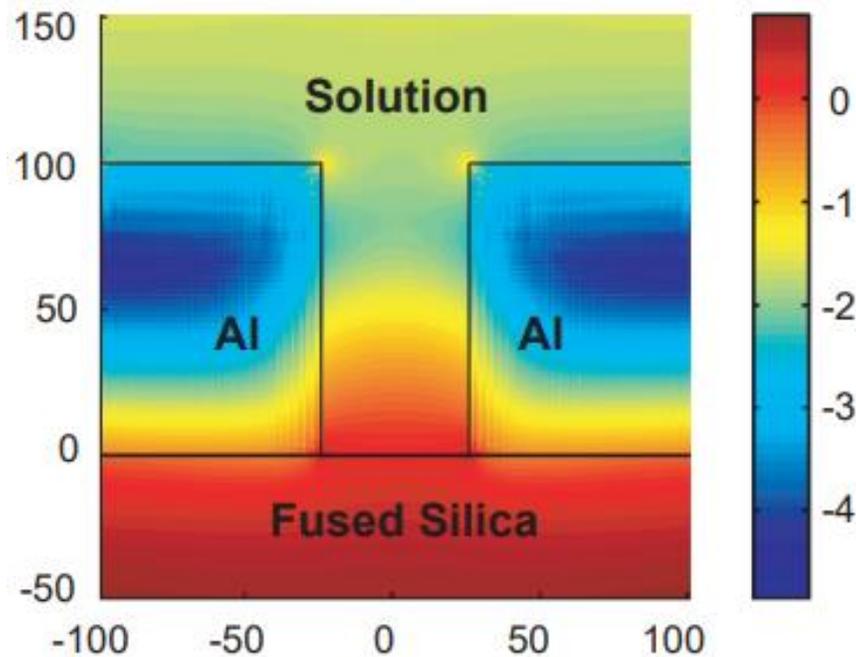
- Пропускание через щель (с учетом дифракции)
- Неидеальность металла
- Связывание с локализованными поверхностными плазмонами на краях отверстия (LSP) [1], [13]
- Extraordinary Optical Transmission (EOT), характерное для матриц ZMW с малыми расстояниями между отверстиями [13], [14]

Спектр пропускания света через матрицу ZMW: $d = 150$ нм, $h = 200$ нм



Распределение поля внутри ZMW

Численное решение задачи нахождения поля внутри ZMW: $d = 50$ нм, $h = 100$ нм [3]



Эффективный объем наблюдения:

$$V_{eff} = \frac{\pi d^2}{4} \frac{(\int S(z) dz)^2}{\int S(z)^2 dz}$$

$S(z) = I_{ex}(z) \cdot p(z) \cdot Q(z)$ –
эффективный профиль наблюдения

$I(z) = e^{-\frac{z}{\Lambda}}$ – интенсивность

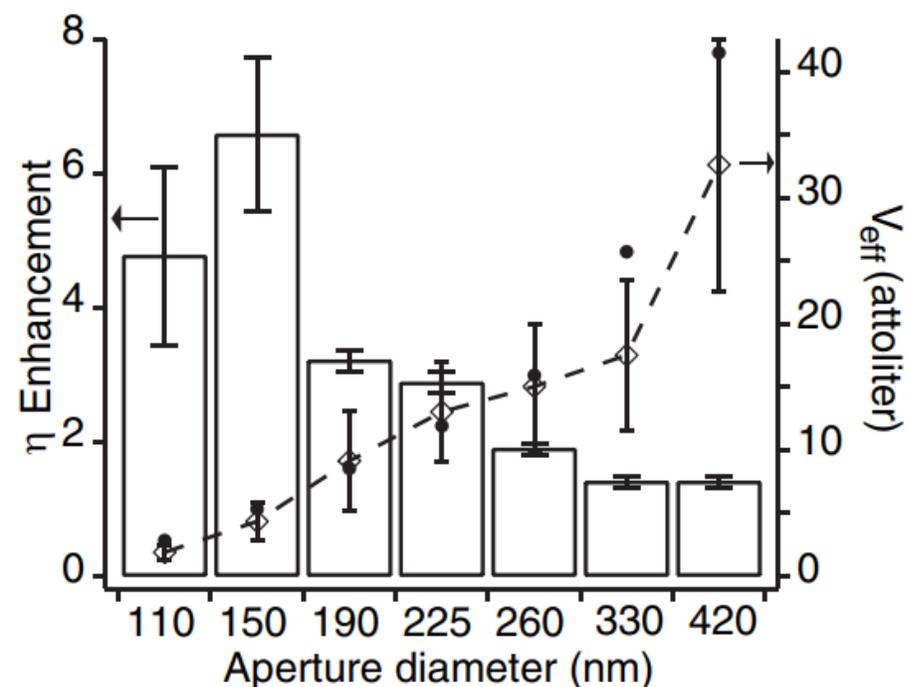
$$\frac{1}{\Lambda} = 2 \sqrt{\left(\frac{1}{\lambda_c}\right)^2 - \left(\frac{1}{\lambda_m}\right)^2}$$

$\lambda_c \sim 1.7d$
Длина волны отсечки

Усиление флуоресценции

- Уменьшение времени жизни: эффект Парселла и нерадиационные потери в металл – задержка насыщения [4], [5]
- Surface Plasmon Resonance (SPR) [11]
- Усиление возбуждающего поля внутри ZMW [4], [5]

Увеличение количества детектируемых фотонов/с, приходящихся на одну молекулу, при использовании ZMW [5]



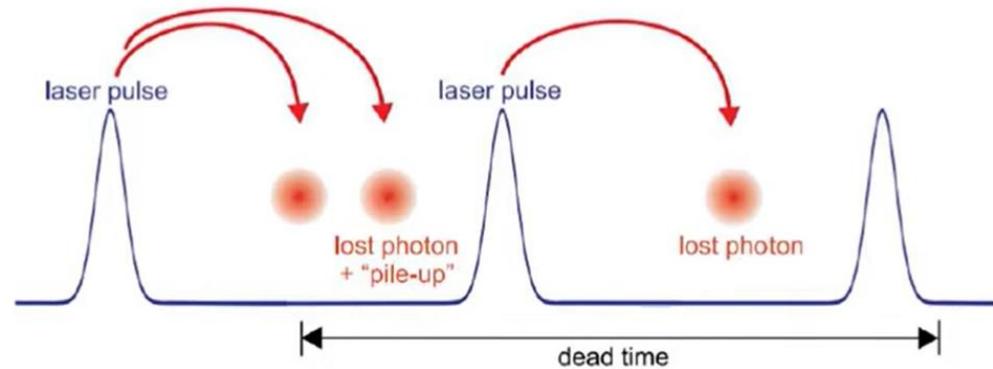
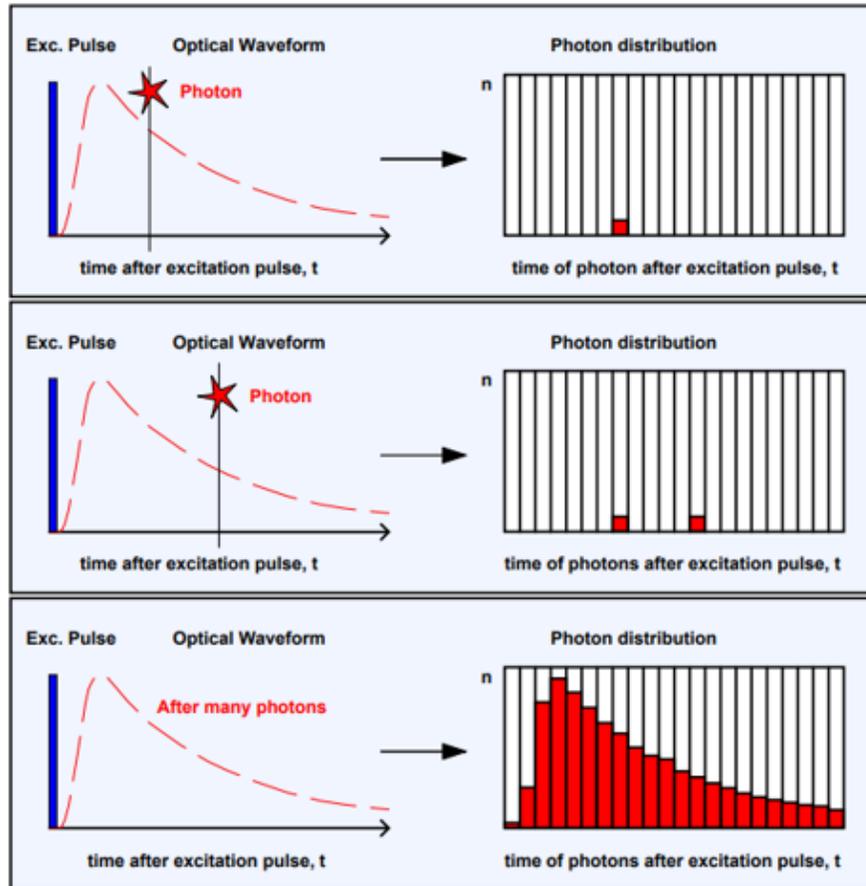
Усиление флуоресценции

- Дробовой шум возбуждающего излучения и флуоресценции, фликкер-шум источника
- Шум детектора: темновой ток, шум считывания и шум усилителя сигнала – в зависимости от используемых детекторов
- Фоновый шум
 - Рассеяние света источников излучения
 - Флуоресценция молекул, находящихся вне объема детектирования

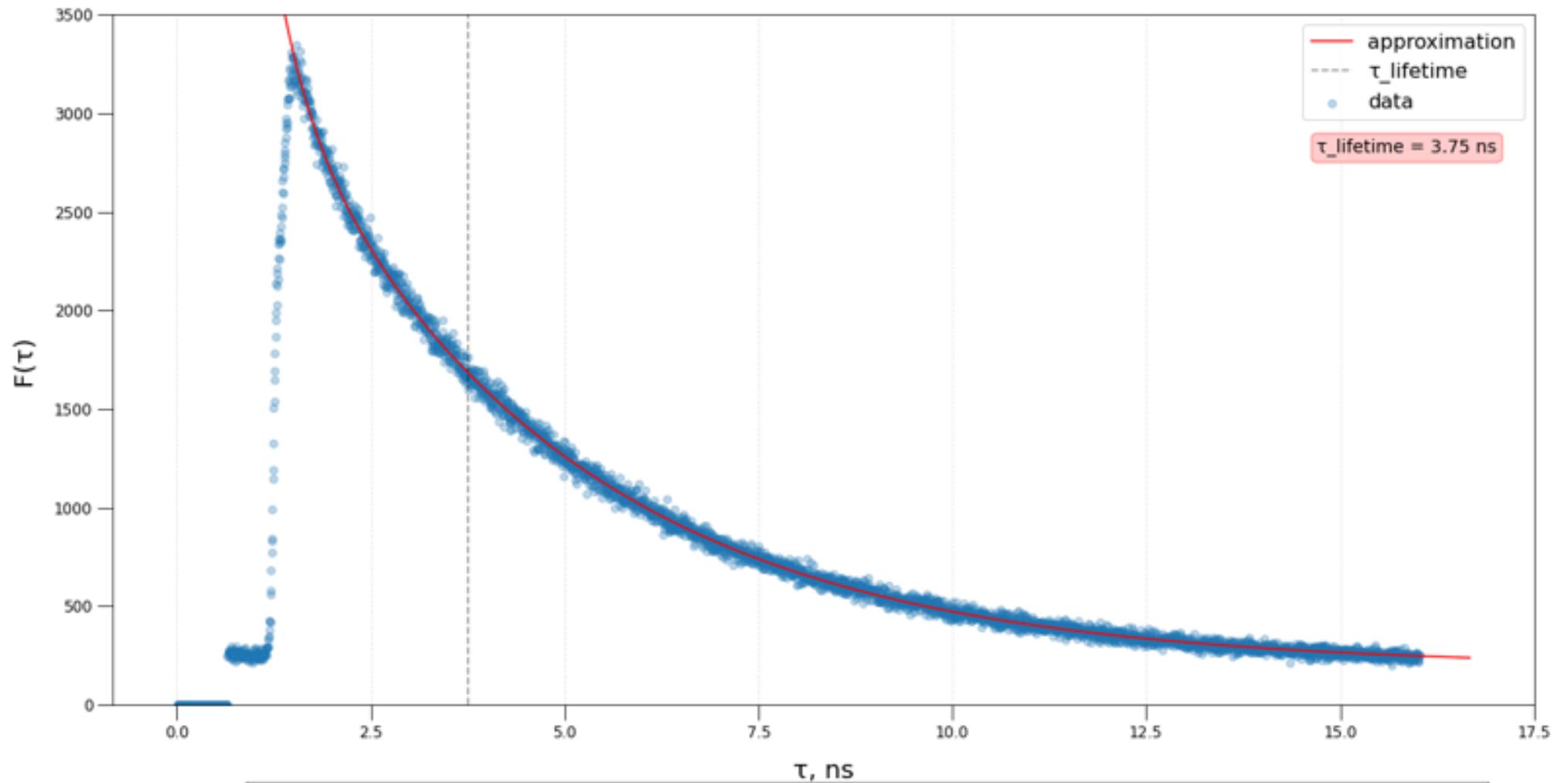
Преимущества ZMW при одномолекулярном анализе

- Возможность использования высоких концентраций аналита (до мМ)
- Уменьшение фонового шума
- Существенно малый детектируемый объем (менее 10^{-18} л)
- Усиление флуоресценции молекул, находящихся внутри ZMW (эффект Парселла, связывание с поверхностными плазмонами) [4], [5]
- Способность одновременного контроля большого числа параллельных реакций (использование матриц ZMW)
- Возможность интеграции в различные оптические системы

Time-Correlated Single-Photon Counting (TCSPS)



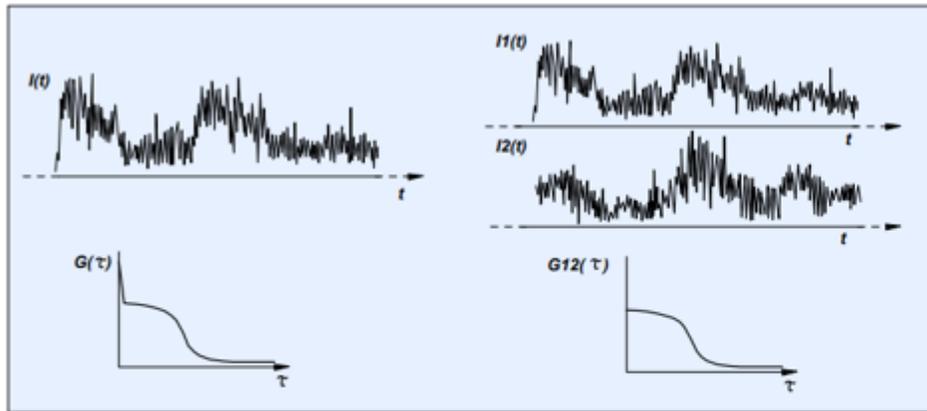
Пример эффекта накопления фотонов ("pile-up")
с малыми временами задержки



Гистограмма количества фотонов в зависимости от времени задержки и аппроксимированная кривая.

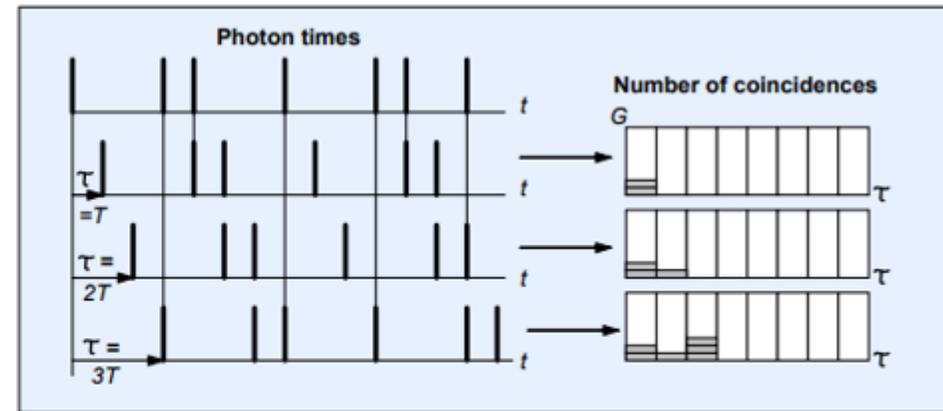
$$\text{Аппроксимируемая модель: } I(t) = I_0 e^{-\frac{t}{\tau}}$$

Fluorescence Correlation Spectroscopy (FCS)



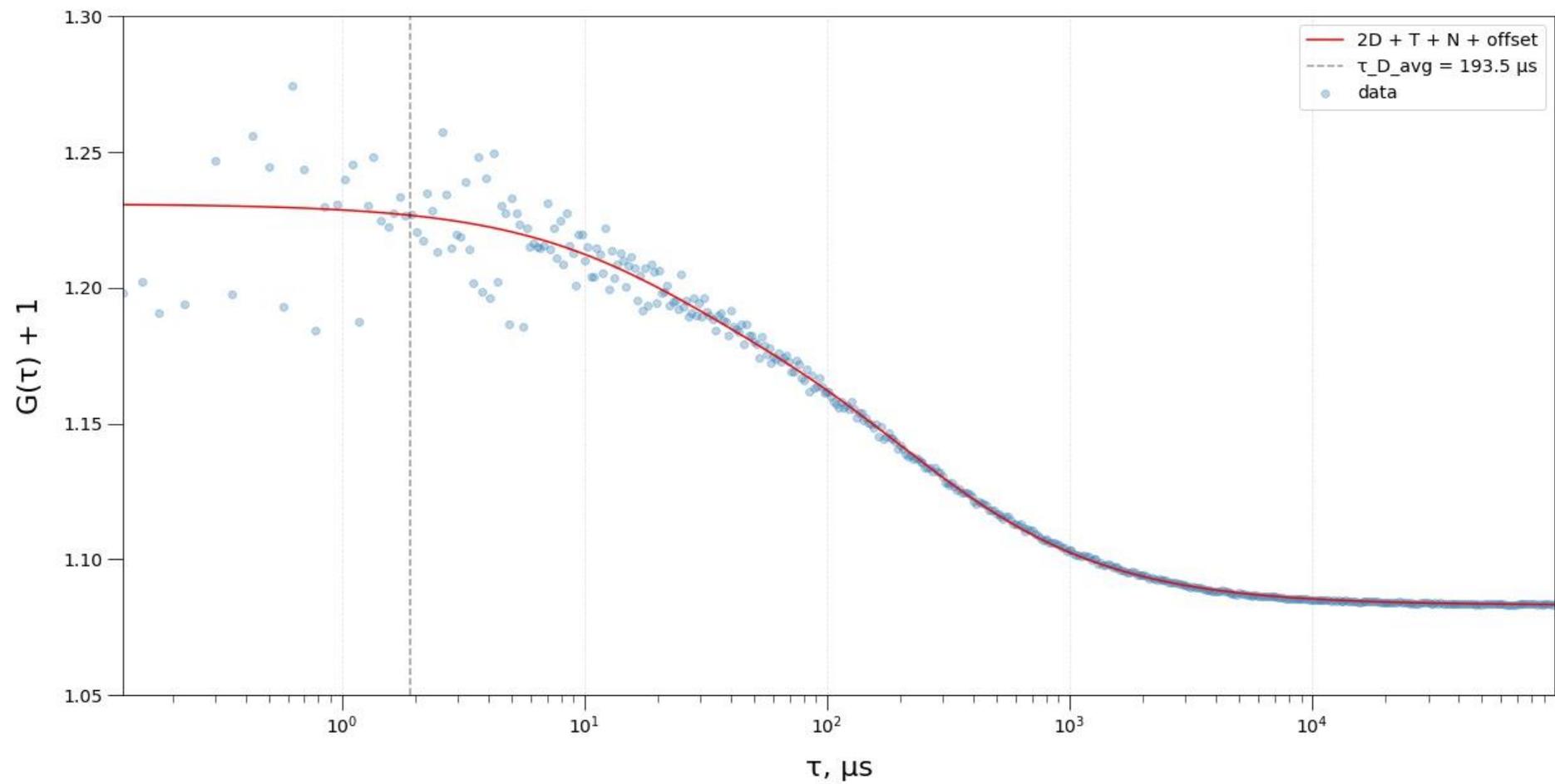
$$G(\tau) = \frac{\langle I(t)I(t + \tau) \rangle}{\langle I(t) \rangle^2}$$

Автокорреляционная (слева) и кросскорреляционная (справа) функции. Выше представлена формула для расчета автокорреляционной функции



$$G(\tau) = \frac{\sum N(t)N(t + \tau)}{N_p^2} n_\tau$$

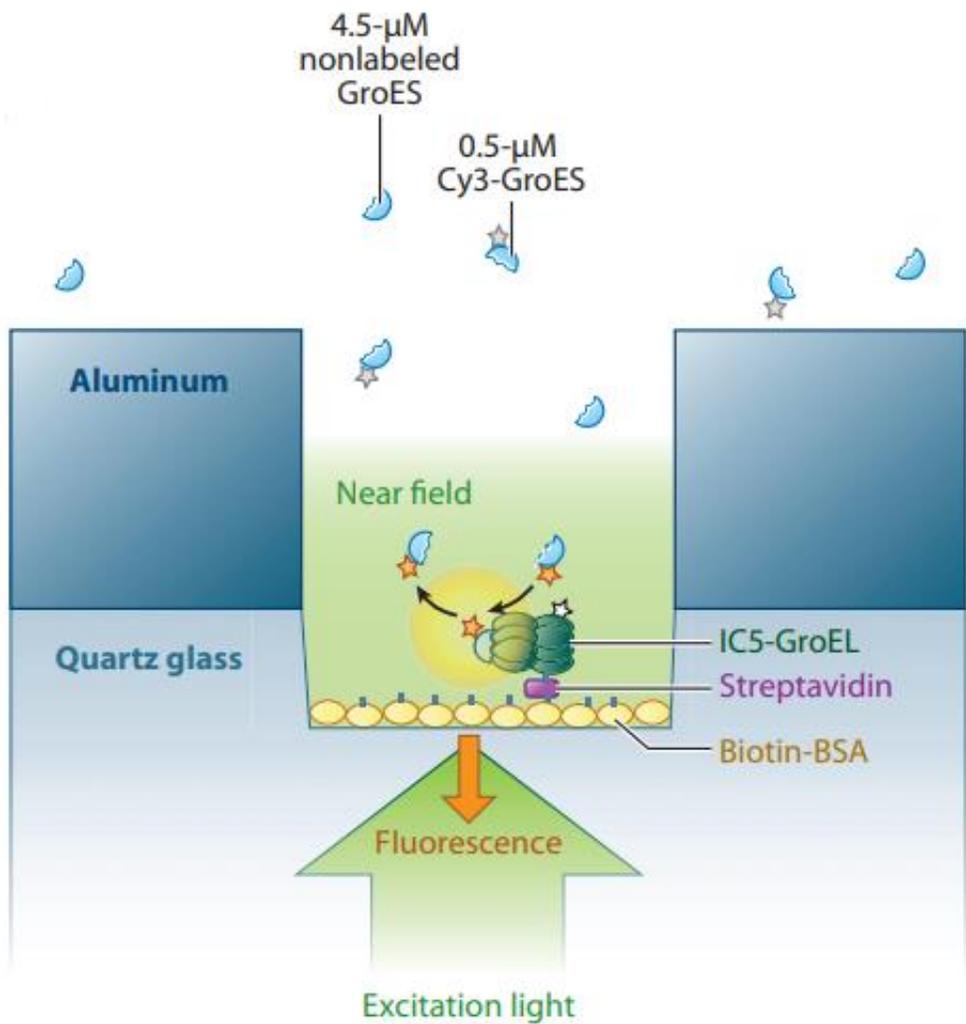
Способ расчета автокорреляционной функции в случае данных с помеченным временем



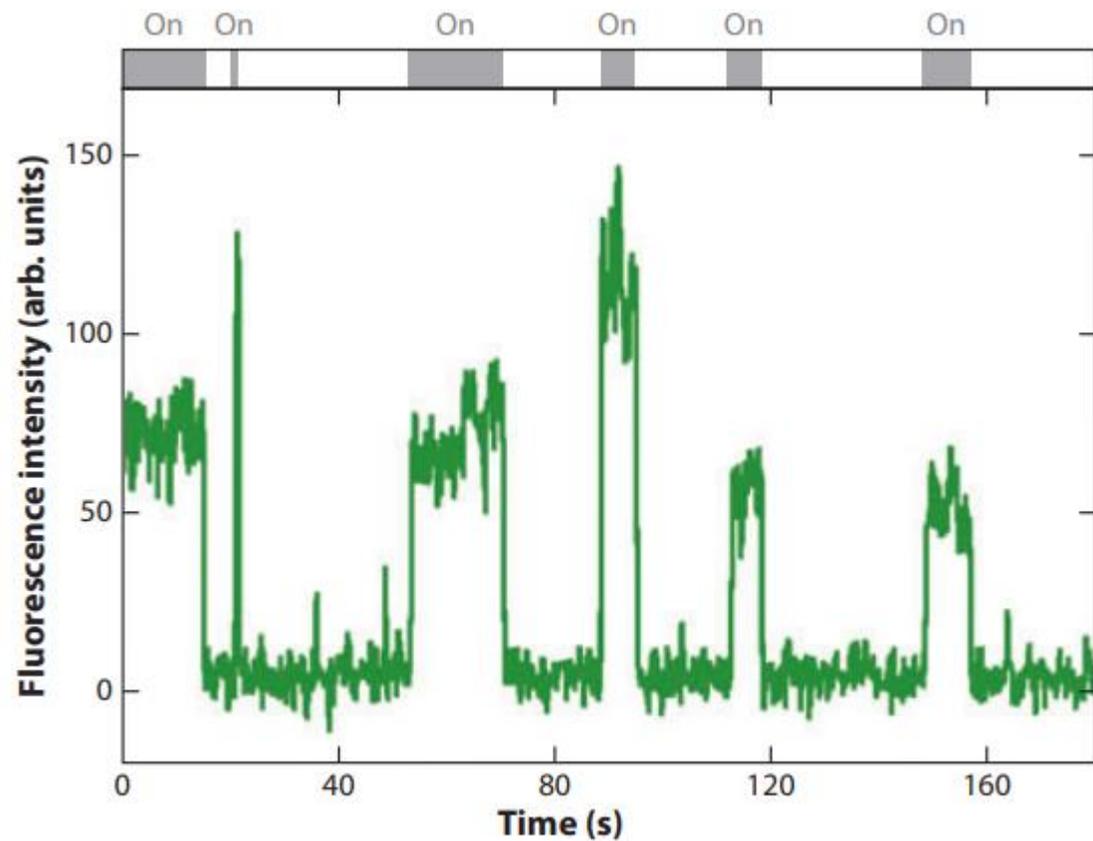
Автокорреляционная функция свободной диффузии молекул флуоресцеина и аппроксимированная модель (красная линия)

Применения ZMW

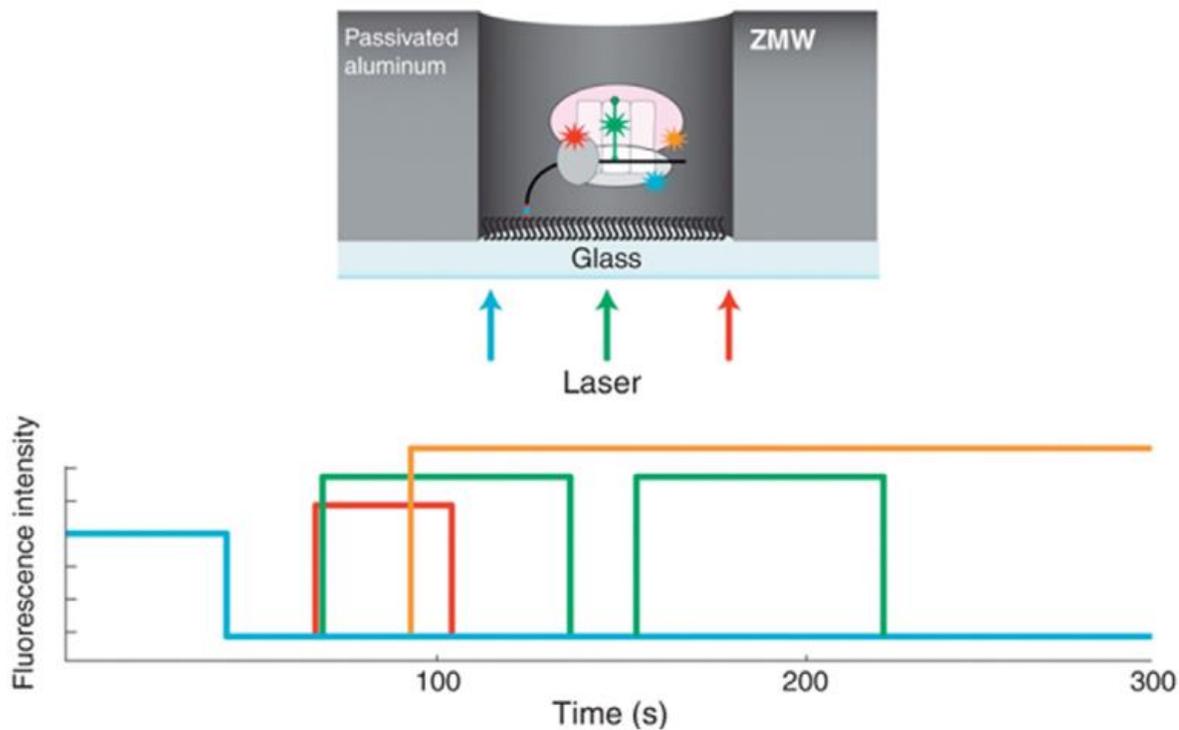
- Изучение свободной диффузии молекул аналита
- Визуализация белок-белкового взаимодействия в реальном времени
- Наблюдение работы ферментов в реальном времени
- Изучении диффузии через мембрану (липидный слой)
- Исследование диффузии через клеточную мембрану *in vivo*



Взаимодействие белков GroEL-GroES



Сигнал флуоресценции в зависимости от времени.
Можно наблюдать связывание белков при увеличении времени флуоресценции молекулы.



Мультиплексное детектирование, позволяющее изучать динамику биологических процессов

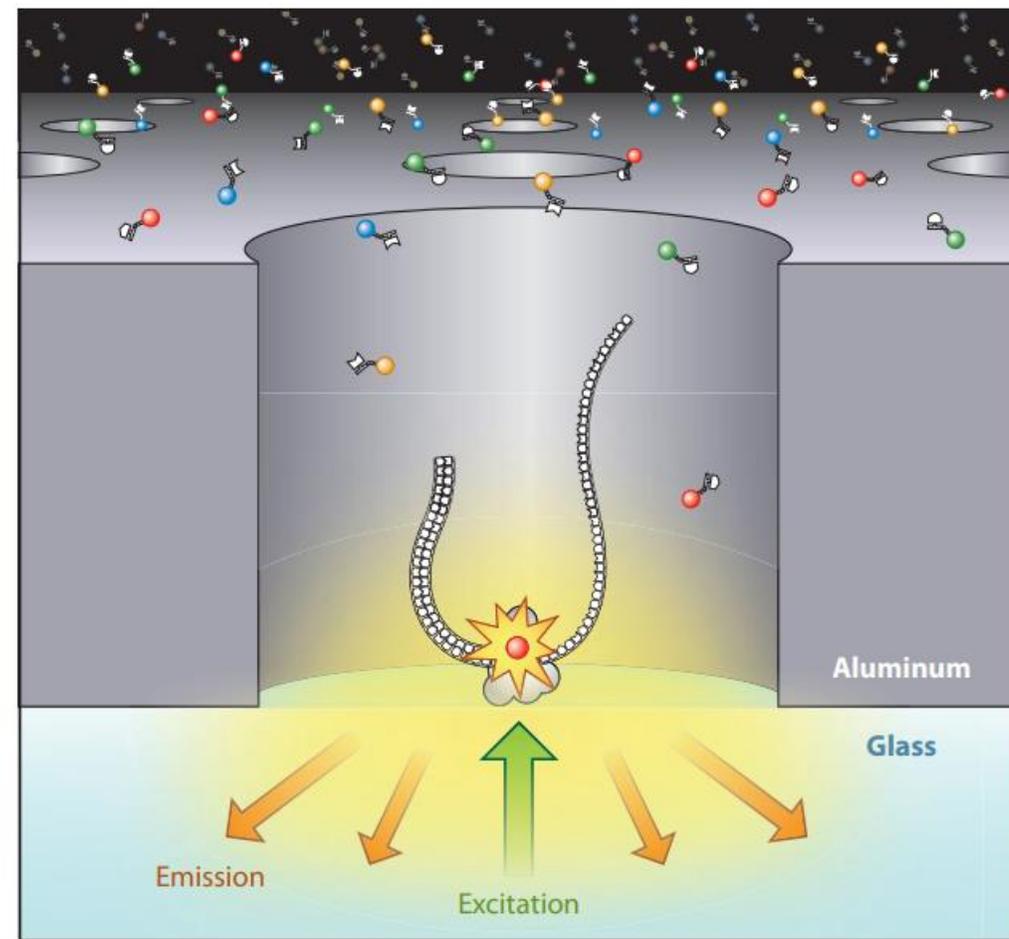


Схема секвенирования молекул ДНК с использованием ZMW

ИСТОЧНИКИ

- [1] DOI: [10.1146/annurev-biophys-050511-102338](https://doi.org/10.1146/annurev-biophys-050511-102338)
- [2] Joseph W. Haus, Fundamentals and Applications of Nanophotonics
- [3] DOI: [10.1126/science.1079700](https://doi.org/10.1126/science.1079700)
- [4] doi:[10.1364/OPEX.13.007035](https://doi.org/10.1364/OPEX.13.007035)
- [5] doi:[10.1103/PhysRevLett.95.117401](https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.95.117401)
- [6] doi: [10.1088/1361-6463/aab8be](https://doi.org/10.1088/1361-6463/aab8be)
- [7] doi:[10.1116/1.571227](https://doi.org/10.1116/1.571227)
- [8] DOI: [10.3791/61154](https://doi.org/10.3791/61154)
- [9] <https://arxiv.org/pdf/2010.00276.pdf>
- [10] <https://sci-hub.wf/10.1002/cphc.201402651>
- [11] https://link.springer.com/referenceworkentry/10.1007/978-3-642-16712-6_499
- [12] <https://www.pnas.org/doi/10.1073/pnas.0710982105>
- [13] <https://www.nature.com/articles/s41598-020-61856-9>
- [14] <https://sci-hub.wf/10.1038/35570>

Спасибо за внимание!
