

Иванов Ю.Д.¹, Козлов А.Ф.¹, Галиуллин Р.А.¹, Иванова Н.Д.²,
Татур В.Ю.³, Зиборов В.С.⁴, Юшков Е.С.⁵, Плешакова Т.О.¹

Генерация и аккумуляция заряда в проточной системе для выявления белковых маркеров заболеваний

¹ ФГБНУ «Научно-исследовательский институт биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича», 119121, г. Москва, Россия, ул. Погодинская, д. 10

² ФГБОУ ВО «Московская Государственная Академия Ветеринарной Медицины и Биотехнологии — МВА им. К.И. Скрябина», 109472, г. Москва, Россия, ул. Академика Скрябина, д. 23

³ Фонд перспективных технологий и новаций, 115682, г. Москва, Россия

⁴ Объединенный институт высоких температур РАН, 125412, г. Москва, Россия, ул. Ижорская, д. 13, строение 2

⁵ Национальный исследовательский ядерный университет МИФИ, 115409, г. Москва, Россия, Каширское шоссе, д. 31

Вода является основной компонентой в организме человека, определяющей гемодинамику. В процессе движения воды наблюдается генерация заряда, обусловленная её электрокинетическими свойствами. В работе исследована временная зависимость генерации и аккумуляции заряда в воде, движущейся по проточной системе. Показано, что при определенных условиях, временная зависимость аккумуляции заряда имеет нелинейный характер — наблюдается скачкообразное изменение регистрируемой величины (эффект электрогидродинамического барьера стекания заряда, ЭБСЗ). Появление этих скачков зависит от расстояния (l) между срезом наконечника подающей трубки проточной системы и электродом заземления, вставленным в эту трубку. Эффект наблюдается при расстоянии l ~ 10 см и более. Этот эффект должен учитываться в фундаментальных исследованиях свойств воды, а также при разработке моделей, описывающих гемодинамику в организме в норме и патологии. Кроме того, полученные результаты следует использовать при разработке высокочувствительных аналитических систем, таких, как нанопроводные, на основе атомно-силового микроскопа (АСМ) и других диагностических систем, предназначенных для повышения эффективности раннего выявления патологического процесса. **Цель исследования:** мониторинг генерации и аккумуляции электрического заряда при движении воды как компоненты организма и основы растворов, используемых в аналитических системах. **Методика.** Исследован процесс генерации и аккумуляции заряда в воде при ее движении в проточной системе. В качестве такой системы использовалась проточная часть АСМ-фишинг системы, с помощью которой показана возможность высокой концентрационной чувствительности анализа при обнаружении белковых маркеров заболеваний. Измерения величины электрического заряда проводились с помощью электрометра, включенного в проточную систему подачи образца системы АСМ-фишинга [1, 2]. Основные элементы системы подачи — перистальтический насос, трубка для подачи воды, полипропиленовый наконечник к трубке и измерительная ячейка. К измерительной ячейке подключен электрометр, разработанный в ИБМХ. В процессе измерений деионизованная вода непрерывно подавалась в ячейку с помощью насоса. Скорость потока (~15 мкл/с) подобрана таким образом, чтобы на наконечнике (внутренний диаметр 0,4 мм) подающей трубки формировались капли. Для поддержания постоянного потенциала в резервуаре с исходной водой, в подающую трубку вставлен электрод заземления. Расстояние от электрода до среза наконечника трубки (l) варьировалось и составляло 5, 10 или 15 см. Эксперименты проводились при t = 35°C и влажности 49%. **Результаты:** показано, что в фишинг-системе, после прохождения деионизованной воды по подающей трубке этой системы, генерируется электрический заряд, который регистрируется при поступлении воды в измерительную ячейку. По результатам измерений наблюдается аккумуляция заряда. При постоянной скорости подачи воды наблюдается как линейное увеличение величины заряда в измерительной ячейке, так и скачкообразное. Появление этого эффекта зависит от расстояния между наконечником и электродом заземления в подающей трубке — эффект обнаруживается при величине этого расстояния, l ~ 10 см и более. Обнаруженная скачкообразная зависимость названа эффектом электрогидродинамического барьера стекания заряда (ЭБСЗ). **Заключение.** Обнаружено, что при движении воды в проточной системе, в процессе её непрерывной подачи, в измерительной ячейке накапливается заряд, поступающий с водой из наконечника подающей трубки. Установлена линейно-скачкообразная зависимость накопления заряда в ячейке (эффект ЭБСЗ). Величина скачка накопленного заряда (порядка нескольких нКл) зависит от расстояния между наконечником и электродом заземления, вставленного в подающую трубку. Этот эффект должен учитываться при проведении фундаментальных исследований, посвященных изучению физико-химических свойств воды, а также при создании уточненных моделей, описывающих гемодинамику в организме в норме и патологии. Кроме того, полученные результаты следует использовать при разработке высокочувствительных диагностических систем на основе молекулярных детекторов, включающих проточный способ подачи образца, и предназначенных для повышения эффективности раннего выявления патологического процесса.

Ключевые слова: проточная система подачи образца; фишинг белков; генерация заряда.

Для цитирования: Иванов Ю.Д., Козлов А.Ф., Галиуллин Р.А., Иванова Н.Д., Татур В.Ю., Зиборов В.С. Юшков Е.С., Плешакова Т.О. Генерация и аккумуляция заряда в проточной системе для выявления белковых маркеров заболеваний. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2018; 62(1): 109–116.
DOI: 10.25557/0031-2991.2018.01.109-116

Для корреспонденции: Иванов Юрий Дмитриевич, доктор биол. наук, проф., зав. лаб. нанобиотехнологии, e-mail: yurii.ivanov@rambler.ru

Финансирование. Исследование выполнено при финансовой поддержке гранта Российского научного фонда (проект №14-25-00132). Изготовление системы измерения заряда — электрометра, выполнено при поддержке Программы фундаментальных научных исследований государственных академий наук на 2013—2020 годы.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 15.05.2017

Ivanov Yu.D.¹, Kozlov A.F.¹, Galiullin R.A.¹, Ivanova N.D.²,
Tatur V.Yu.³, Ziborov V.S.⁴, Yushkov E.S.⁵, Pleshakova T.O.¹

Generation and accumulation of charge in a flow system for detecting protein markers of diseases

¹ V.N. Orekhovich Institute of Biomedical Chemistry, Pogodinskaya Str. 10, Moscow, Russia

² K.I. Skryabin Moscow State Academy of Veterinary Medicine and Biotechnologies, Akademika Skryabina Str. 23, Moscow 109472, Russia

³ Foundation for Advanced Technologies and Innovations, Shipilovskaya Str. 64, Bld. 1, Moscow 115682, Russia

⁴ Joint Institute for High Temperatures, Izhorskaya Str. 13, Bld. 2, Moscow 125412, Russia

⁵ National Research Nuclear University, Kashirskoe Shosse 31, Moscow 105409, Russia

Water is the main component of the human body, which determines hemodynamics. Electrokinetic properties of moving water provide generation of a charge. This work focuses on time dependence of charge generation and accumulation in water passing through a flow-based system. It was shown that under certain conditions, the time dependence of charge accumulation was nonlinear; the recorded value changed in a stepwise manner (effect of electrodynamic barrier for the charge run-off, EBCRO). Emergence of these stepwise changes depends on the distance between the tip of the input pipe and the ground electrode inserted in this pipe. This effect was observed at a distance of 1–10 cm and more. The discovered effect should be taken into account in developing flow-based, highly sensitive analytic systems, such as nanowire, atomic-force microscope (AFM) based, and other systems designed to improve early detection of pathological processes. **Aim:** To monitor electric charge generation and accumulation in moving water as a main component of the body and a vehicle of solutions used in analytical systems. **Methods:** The process of charge generation and accumulation was studied in water during its motion in a flow system. In the experiments, the flow-based part of an AFM-based fishing system was used since this system provides a high concentration sensitivity in detecting protein markers of diseases. Electric charge values were measured using an electrometer incorporated in the flow system that feeds samples into the AFM-fishing system. The major elements of the sample feeding system included a peristaltic pump, a pipe for sample delivery from a tapered tip, and a measuring cell connected to an electrometer developed at the Institute of Biomedical Chemistry. During the measurements, deionized water was continuously pumped into the cell. The flow rate (~15 mL/s) was selected so that drops form on the tip nozzle (inner diameter, 0.4 mm) of the inlet pipe. To maintain a constant potential in the stock solution, a ground electrode was inserted into the inlet pipe. The distance between the electrode inside the pipe and the tip varied and was 5, 10, or 15 cm. Experiments were conducted at $t = 35^{\circ}\text{C}$ and 49% humidity. **Results.** In the fishing system, after the deionized water has passed through the feeding pipe of this system through the tip, an electric charge is generated and recorded when the water enters the measuring cell. According to results of measurements charge accumulation is observed. At a constant rate of water supply, accumulation of the charge in the measuring cell can be either linear or stepwise. Emergence of this effect depends on the distance between the tip and the ground electrode in the input pipe: the effect was detected at a distance of 1–10 cm and more. The discovered stepwise dependence was named the effect of electrodynamic barrier for the charge run-off (EBCRO). **Conclusion.** In the process of water motion during its continuous pumping through the flow-based system, a charge accumulates in the measuring cell; this charge is delivered with the water from the tip of the feeding pipe. A linear-stepwise dependence of charge accumulation in the cell (EBCRO effect) is determined. Magnitude of the stepwise change in this charge (approximately several nC) depends on the distance between the tip and the ground electrode inserted into the inlet pipe. This effect should be taken into account in both basic research focusing on physicochemical properties of water and applied research focusing on development of the models describing hemodynamics in the body. In addition, the obtained results might be used in developing highly sensitive diagnostic systems, such as nanowire, AFM-based, and other fishing systems to enhance early detection of pathological process.

Keywords: flow-based system, protein fishing, charge generation.

For citation: Ivanov Yu.D., Kozlov A.F., Galiullin R.A., Ivanova N.D., Tatur V.Yu., Ziborov V.S., Pleshakova T.O. Generation and accumulation of charge in a flow system for detecting protein markers of diseases. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2018; 62(1): 109–116. (In Russian). DOI: 10.25557/0031-2991.2018.01.109-116

For correspondence: Yuri D. Ivanov, Doctor of Biological Sciences, Head of Laboratory, Institute of Biomedical Chemistry; 10 Pogodinskaya Str., Moscow, 119121, Russian Federation, e-mail: yurii.ivanov@rambler.ru

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Funding. The study was supported by Russian Science Foundation (Grant No. 14-25-00132). The fabrication of charge measurement system (electrometer) was carried out in IBMC by Galiullin R.A. with the support of the Program for Basic Research of State Academies of Sciences for 2013—2020.

Information about authors

Ivanov Yu.D., <http://orcid.org/0000-0001-5041-1914>

Pleshakova T.O., <http://orcid.org/0000-0003-3217-9095>

Received 15.05.2017

Введение

Изучение фундаментальных свойств воды является важной задачей, так как она представлена в организме как основной компонент. Физико-химические свойства воды определяют гемодинамику, которая, в свою очередь, определяется электрокинетическими свойствами воды. Поэтому изучение электрокинетических свойств воды необходимы для разработки новых моделей, описывающих гемодинамику в норме и патологии. В то же время, изучение электрокинетических свойств воды важно при проектировании новых сверхвысокочувствительных диагностических и протеомных аналитических систем, в своей основе использующих фишинг-технологии для выявления белковых маркеров заболеваний на ранней стадии патологического процесса [1—6]. Проточные системы, а также системы с импульсным вводом раствора с помощью пипеток получили широкое распространение в нанопроводных биосенсорах [6—9] и системах АСМ-фишинга [2, 4, 5], которые применялись для выявления белковых маркеров, ассоциированных с онкологическими и инфекционными заболеваниями с чувствительностью на уровне концентрации белка 10^{-15} — 10^{-17} М. В связи с развитием таких проточных аналитических систем на основе молекулярных детекторов и новых высокочувствительных систем регистрации заряда, появилась возможность использования их для изучения электрокинетических свойств воды. Поэтому в нашей работе мы использовали проточную часть этих систем для исследования генерации заряда в движущейся воде.

Известно, что при движении жидкости генерируется электрический заряд за счет существования двойного электрического слоя, возникающего на поверхности раздела фаз [<http://www.xumuk.ru/colloidchem/53.html>]. Как показано нами ранее [1], при инъекции жидкости через наконечник пипетки генерируется электрический заряд в капле этой жидкости. Нами также было показано [3], что при непрерывном введении жидкости в измерительную ячейку с помощью перистальтического насоса (проточный режим подачи) и использовании подающей трубки с наконечником от пипетки также генери-

руется электрический заряд, что может приводить к повышению эффективности фишинга белковых маркеров. Этот эффект ранее наблюдался нами в системе для АСМ-фишинга белков при низкой концентрации [1, 3]. Было сделано предположение, что возникновение заряда в растворе облегчает обнаружение белка при сверхнизкой концентрации, вплоть до 10^{-17} М, что важно при разработке систем для ранней диагностики заболеваний [1, 2]. Механизм генерации заряда при движении жидкости, как правило, связывают с трибоэлектрическим эффектом, но до конца он не ясен [10]. В работе [10] обсуждается, что при однократном импульсном вводе в ячейку воды через наконечник пипетки может быть полное, а может быть и частичное вытекание заряда из пипетки и вопрос этот требует пояснения.

В представленной работе рассмотрены генерация заряда и его истечение через наконечник с потоком воды в измерительную ячейку. Исследования проведены в проточной системе подачи образца, которая используется в фишинг-технологии для обнаружения белков в растворах при низкой концентрации [1, 4, 5]. Подробно установка для высокочувствительного АСМ-фишинга белков описана ранее [1, 2]. Коротко, АСМ-фишинг система включает резервуар с раствором белка, проточную часть для подачи раствора к АСМ-чипу, на который происходит вылавливание этого белка для последующего подсчета количества выловленных белковых молекул, с помощью атомно-силового микроскопа (АСМ). Измерения были проведены при $t = 35^\circ\text{C}$, соответствующей области температур, используемой в экспериментах по высокочувствительному АСМ-фишингу белковых маркеров, ассоциированных с онкологическими и инфекционными заболеваниями. Эта область температур также интересна при мониторинге изменения активности белков в условиях, близких к нативным и в других работах по функциональной протеомике, а также при работах с клеточными культурами. Показано, что при определенных условиях, временная зависимость аккумуляции заряда в водной среде в измерительной системе, использующей фишинг-технологии, имеет нелинейный характер — наблюдается скачкообразное изменение регистрируемой величины. Эффект

появления этих скачков зависит от расстояния (1) между наконечником подающей трубки и электродом заземления, вставленным в эту трубку. Эффект наблюдается при расстоянии 1–10 см и более. Этот эффект следует учитывать при проведении фундаментальных исследований в области электрокинетических свойств воды, при создании современных моделей гемодинамики в норме и патологии, а также при разработке высокочувствительных аналитических систем на основе молекулярных детекторов, таких, как нанопроводные, АСМ и другие фишинг-системы, предназначенные для повышения эффективности раннего выявления патологического процесса.

Методика

Химические реактивы. Деионизованная вода (удельное сопротивление, 18 МОм*см) была получена на установке Millipore Simplicity UV (Франция).

Методика измерения заряда в измерительной ячейке. Схема установки для измерения заряда приведена на рис. 1. Измерения величины электрического заряда проводились [2] с помощью электрометра, включенного в проточную систему подачи образца для АСМ-фишинга. Основные элементы системы подачи образца — перистальтический насос, трубка для подачи воды с наконечником и измерительная ячейка. В процессе измерений вода из полипропиленового резервуара (1) ($V = 50$ мл) через наконечник (5) непрерывно подавалась в ячейку (6) с помощью насоса (3) (Ismatech (IDEX)). Для подачи воды использовалась стерильная силиконовая трубка (4)

(длина 40 см, внутренний диаметр 2 мм) с полипропиленовым наконечником (5) (внутренний диаметр 0,4 мм). В качестве наконечника использовался стандартный одноразовый наконечник к автоматической пипетке (1–10 мкл). Скорость потока (~15 мкл/с) была подобрана таким образом, чтобы на наконечнике подающей трубки формировались капли. Рассчитанный объем капли составил ~15 мкл. Для поддержания потенциала в резервуаре (1) с водой, из которого вода поступала в подающую трубку, на постоянном уровне земли в подающую трубку был вставлен электрод заземления E_g . Расстояние от электрода в трубке до крайней точки выходного отверстия наконечника варьировалось и составляло 5, 10 или 15 см. Ячейка (6) из нержавеющей стали являлась внутренним цилиндром в системе, сопряженной с электрометром (7). В целом, измерительная система была аналогична системе, используемой ранее [3]. Регистрировался заряд в ячейке с помощью электрической системы (7) — электрометра, разработанного в ИБМХ. Точность регистрации заряда составляла 0,1 нКл. Температура воды устанавливалась с помощью шейкера, в который был помещен резервуар (1) для подачи воды. Эксперименты проводились при 35°C. Длительность предварительного выдерживания системы в условиях эксперимента составляла не менее 2 ч, длительность одного измерения — 7 мин. Экспериментальная серия для каждого набора условий состояла не менее чем из 3 повторов.

Схема эксперимента следующая. Система заполняется водой из резервуара (1) и промывается объемом воды ~10 мл. После промывки подающая система остается заполненной водой, из измерительной ячейки вода удаляется с помощью пипетки. Проводятся контрольные измерения базовой линии сигнала для незаполненной ячейки (3 повтора). Далее включается насос, и вода по каплям поступает в ячейку. С момента включения насоса начинается отсчет времени эксперимента и запись показаний измерительной системы с дисплея электрометра. Запись осуществляется каждые 15 с в течение 7 мин. После окончания измерений в рамках одного эксперимента показания сбрасываются. Полученные данные представлены в виде зависимости величины заряда, поступающего в измерительную ячейку, от времени измерений $\Delta q(t)$.

Результаты и обсуждение

Измерения проводились при трех положениях заземляющего электрода, вставленного в подающую трубку системы: на расстоянии 15 см, 10 см и 5 см относительно среза наконечника на конце трубки (см. условия измерений в разделе «Методика»).

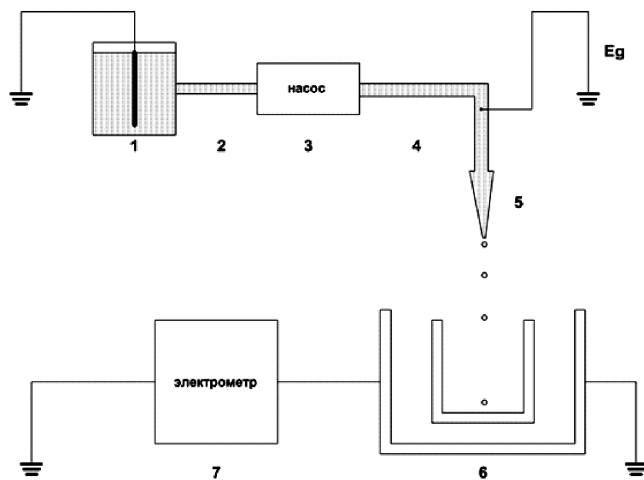


Рис. 1. Схема установки для измерений. 1 — резервуар с исходной водой; 2 — силиконовая трубка (входящий участок); 3 — перистальтический насос; 4 — силиконовая трубка (исходящий участок); 5 — наконечник; 6 — измерительная ячейка с подключенным электрометром; 7 — электрометр, E_g — электрод заземления, устанавливаемый от среза наконечника на расстоянии 5, 10 или 15 см.

На рис. 2 представлены результаты измерений для положения электрода $l = 15$ см — типичные временные зависимости величины заряда $\Delta q(t)$.

Как видно из рисунка, общее изменение величины заряда за время наблюдения (7 мин) составляет порядка 1—2 нКл, т.е. наблюдается аккумуляция заряда. Характер изменения величины заряда различен: (1) линейный рост (рис. 2, кривая 2); (2) линейно-скачкообразный рост, т.е. резкие изменения величины на фоне роста величины заряда (рис. 2, кривые 4—7); (3) незначительные изменения в величине (рис. 2, кривая 1), (4) незначительные изменения в величине с последующим скачком заряда (рис. 2, кривая 3).

На рис. 2 приведены примеры:

- случай (1) — кривая 2 — в диапазоне 0—7 мин измерений наблюдается линейный рост величины в измерительной ячейке с $\Delta q \sim 0,1$ нКл/мин.

- случай (2) — кривая 5 — наблюдается плавный рост величины в диапазоне 0—5 минут измерений с $\Delta q/\Delta t \sim 0,1$ нКл/мин, после чего регистрируется резкий рост величины заряда на 1,3 нКл за 15 с ($\Delta q/\Delta t \sim 5,2$ нКл/мин). Кривые 6 и 7 также являются примерами линейно-скачкообразного роста величины заряда — наблюдается резкое изменение величины с градиентом 1 нКл за 1,5—0,25 мин, т.е. ($\Delta q/\Delta t \sim 0,7—4$ нКл/мин), с дальнейшим снижением скорости накопления заряда более чем в 2 раза.

- случай (3) — кривая 1 — изменения в величине заряда незначительны (рис. 2).

- случай (4) для демонстрации выявленной зависимости рассмотрим кривую 3 (рис. 2). В диапазоне 0—5 мин измерений не наблюдается изменения величины заряда в ячейке, далее регистрируется скачкообразный рост на величину с градиентом $\Delta q \sim 0,9$ нКл за 30 секунд ($\Delta q/\Delta t \sim 1,8$ нКл/мин).

Результаты экспериментов, полученные при условии положения электрода $l = 10$ см, аналогичны результатам, рассмотренным выше для $l = 15$ см (данные не представлены).

Результаты экспериментов, полученные при условии положения электрода $l = 5$ см, отличаются от результатов, полученных при $l = 15$ см и $l = 10$ см (данные не представлены). В этой экспериментальной серии типичным случаем являлось незначительное линейное увеличение величины (Δq) 0—0,3 нКл за 7 минут ($\Delta q/\Delta t = 0,04$ нКл/мин) без проявления скачков величины. Т.е. аккумуляция заряда в измерительной ячейке при $l = 5$ см не наблюдалась.

Ранее в литературе достаточно подробно изучалось движение воды и водных растворов, растворов полимерных сфер и белков относительно полимерных поверхностей. Как правило, в таких системах полимерные поверхности заряжены отрицательно — дзе-

та-потенциал таких поверхностей (полиметилметакрилат, тефлон, полистирол, полиэтилен, полипропилен) отрицательный и составляет (-10) — (-100) мВ. В частности, исследование, проведенное с указанными выше материалами, показало, что генерация заряда при контакте фаз и дзета-потенциал поверхности полимеров связаны между собой преимущественно линейной зависимостью [11]. Отрицательный дзета-потенциал органических полимеров связывают с присутствием гидроксильных ионов в слое Штерна, которые аккумулируются предпочтительно на границе раздела воды и гидрофобной поверхности. Обычно адсорбированный слой воды на поверхности представляется многослойной моделью, где имеются прочно связанные и слабо связанные слои ионов. В слабо связанных слоях предполагается нахождение подвижных протонов. Причина возникновения электрокинетических явлений лежит в нарушении электронейтральности диэлектрического слоя (ДЭС) в электрическом поле. При наложении разности потенциалов происходит разрыв ДЭС по плоскости скольжения. Это подтверждается исследованиям электроосмоса, в которых показано, что в электрическом поле, приложенном вдоль капилляра, наблюдается движение протонов, захваченных из слабо связанного слоя, к отрицательному электроду. Аналогичное движение подвижных протонов предполагается также под влиянием не только электрического поля, но и градиента давления, то есть при гидродинамическом градиенте [<http://www.xumuk.ru/colloidchem/53.html>].

В данной работе обнаруженная нелинейность накопления заряда в ячейке также может быть связана с накоплением образующегося заряда в конечной части подающей системы — узком наконечнике из полимера. Согласно полученным данным, после движения воды в трубке и истечения ее из наконечника, в изме-

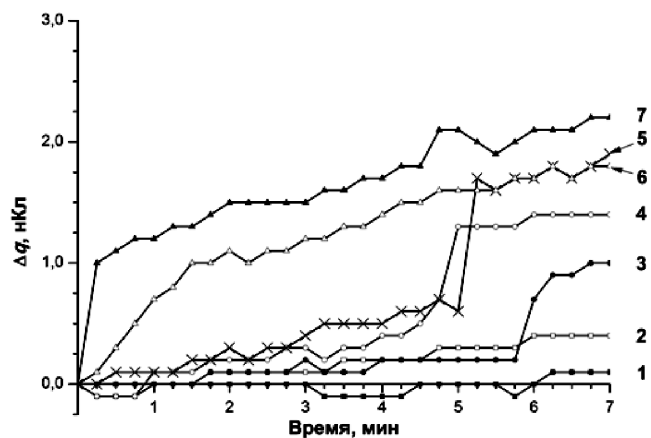


Рис. 2. Типичные зависимости $\Delta q(t)$, полученные для положения электрода $l = 15$ см. Кривые 1—7 — данные, полученные в разных экспериментальных сериях.

рительной ячейке накапливается положительный электрический заряд. Наши данные согласуются с данными [10], полученными в условиях инъекции воды с помощью пипетки в однократном режиме инъекции. В [10] также регистрировался положительный заряд ~0,1 нКл и отмечается, что наконечник пипетки заряжается отрицательно при положительном заряде капли воды.

Результаты наших экспериментов по мониторингу генерации заряда в непрерывном режиме подачи воды позволяют сделать следующие выводы: 1 — при движении воды по трубке происходит генерация зарядов и его разделение — положительный заряд с каплей воды поступает в измерительную ячейку (рис. 2); 2 — часть образующегося заряда стекает в противоположном направлении на землю (обратный ток), предположительно, двумя путями: (а) через электрод заземления E_g и (б) в резервуар (1) с водой, из которого вода поступала в подающую трубку, которая заземлена (рис. 1). Первый путь (а) предпочтительней, так как электрод E_g располагается ближе к срезу наконечника, чем заземленный резервуар (1) с водой, из которого вода поступала в подающую трубку. Поэтому примем условное утверждение, что это обратный ток идет через E_g .

Рассмотрим далее модель накопления заряда на срезе наконечника. Скорость генерации и накопления заряда на срезе наконечника без учета истекания заряда в измерительную ячейку упрощенно можно представить в виде следующего выражения:

$$\frac{dq}{dt} = \frac{dq_1}{dt} - I_1, \tag{1}$$

где первый член в уравнении (1) $\frac{dq_1}{dt}$ определяет генерацию заряда за счет возникающих при движении потока жидкости, со скоростью v , электрокинетических явлений, обусловленных существованием двойного электрического слоя. Второй член уравнения (1) I_1 — «обратный ток», описывающий стекание заряда со среза носика пипетки, под действием разности потенциалов между срезом наконечника и заземляемым электродом E_g , который можно выразить следующим образом:

$$I_1 = \frac{\Delta\phi}{R},$$

где $\Delta\phi$ (q_1) — это разность потенциалов, создаваемая генерируемыми зарядами q_1 , относительно заземленного электрода, а $R = R(l)$ — это электрическое сопротивление воды между срезом наконечника и заземленным электродом, l — это расстояние между срезом наконечника и заземленным электродом.

Как видно из уравнения (1), общий заряд на срезе наконечника, зависит линейно от времени и уменьшается с увеличением сопротивления среды (R). При уменьшении расстояния l , величина R снижается и, следовательно, практически весь генерируемый заряд может стекать на электрод E_g . Это мы наблюдали в случае экспериментов при $l = 5$ см, когда аккумуляции заряда практически не регистрируется ($\Delta q = 0,3$ нКл за 7 мин). При увеличении l до 10 см и 15 см, сопротивление R возрастает в 2 и более раза, что может приводить к тому, что скорость генерации заряда $\frac{dq}{dt}$ приобретает положительный наклон за

счет превышения первого члена уравнения (1) над вторым, отличного от нуля. Такой случай наблюдается при регистрации аккумуляции заряда в измерительной ячейке (характер зависимости (1) — линейный рост величины заряда, кривая 2 на рис. 2).

В то же время, в нашей работе получено, что при $l = 10$ см и $l = 15$ см в ряде случаев регистрировалась не только линейная временная зависимость накопления заряда, но наблюдался и линейно-скачкообразный рост величины заряда (кривые 3, 4, 5). Можно предположить, что в таком случае наблюдался макроскопический эффект, обусловленный электрогидродинамическим барьером для стекания заряда в измерительную ячейку, но позже увеличенное количество заряда попадает в ячейку и регистрируется скачок величины. Это может быть связано с тем, что заряд q_1 , образующийся в воде при ее движении, который концентрируется в области среза наконечника, может полностью не стекать в измерительную ячейку, а задерживаться. Согласно полученным экспериментальным данным, можно предположить, что характерный размер такого «облака» заряда составляет ~10—15 см, так как при меньшем расстоянии $l = 5$ см, заряд стекает на электрод заземления и не наблюдается его аккумуляции в измерительной ячейке.

В то же время остается вопрос о причине возникновения скачка в величине регистрируемого в измерительной ячейке заряда. Вероятно, возникновение скачков обусловлено реализацией переходов между орто- и пара-состояниями молекул воды. Известно, что эти состояния определяют сложную гетероструктуру воды и ее аномальные свойства, такие, например, как скачки электропроводности или вязкости, в процессе истечения воды из наконечника [12, 13], эффекты микроволнового излучения при ее возбуждении [14—18]. Удержание заряда вблизи среза наконечника в виде «облака» заряда, а также стекание через электрод заземления («обратный ток»), вероятно, также связаны со сложной гетероструктурной организацией воды. При нарушении этой организа-

ции, например, при гидродинамических воздействиях на воду со стороны перистальтического насоса, возникают изменения структуры воды и, соответственно, проводимости, которые и наблюдаются при регистрации заряда в измерительной ячейке.

Таким образом, в воде при движении по трубке проточной системы генерируется заряд. Далее вода, несущая заряд, попадает в наконечник. В наконечнике на заряд воды оказывают влияние следующие факторы: электростатические силы со стороны поверхности наконечника; электрические силы со стороны заземленных электродов; гидродинамическая сила потока, формируемого перистальтическим насосом и необходимого для движения воды. При превышении электрогидродинамического барьера для истекания заряда за счет гидродинамической силы, способствующей выталкиванию заряда с капель, над электростатической силой, происходит быстрый сброс этого заряда с порцией капель, а далее следует накопление следующей порции заряда в наконечнике. Процесс истекания заряда прерывается из-за ограничения электропропускной способности этой системы (эффект электрогидродинамического барьера стекания заряда (ЭБСЗ)). Эффект ЭБСЗ определяется балансом нескольких факторов, важнейшим из которых является стекание заряда на электрод заземления, что подтверждается тем, что скачкообразное накопление заряда не наблюдается при установке электрода, вставленного в подводящую трубку, на расстоянии 5 см от выходного отверстия наконечника подающей системы. При таком расположении электрода, вероятно, накопление образующегося заряда не происходит из-за высокой вероятности стекания «облака» заряда через электрод заземления.

Как уже отмечалось нами ранее в [1, 3], генерация заряда сопровождается процессом фишинга низкокопийных белков (10^{-15} — 10^{-17} М). В растворах с низкой концентрацией белка, количество образующихся заряженных частиц по порядку величины находится в том же диапазоне, что и количество белковых молекул в растворе. При этом увеличение отношения «количество заряда/количество белковых молекул» коррелирует с вероятностью вылавливания этих молекул с помощью АСМ-чипа, что в конечном итоге влияет на эффективность обнаружения белков. Результаты, полученные в данной работе, показывают нелинейность временной функции величины образующегося заряда в проточной системе, разработанной для АСМ-фишинга белков. Обнаруженный эффект, по-видимому, должен учитываться и в других высокочувствительных аналитических системах, в том числе в диагностических устройствах на основе нанопроводного детектора, а также в других системах, в которых предусмотрено использование инжекторной сис-

темы подачи растворов образцов. Обнаруженный эффект интересен также для развития теории, описывающей электрокинетические свойства воды, которые, в свою очередь, определяют гемодинамику в норме и патологии.

Заключение

Обнаружено, что при движении воды в проточной системе, в процессе её непрерывной подачи, в измерительной ячейке накапливается заряд, поступающий с водой из наконечника подающей трубки. Установлена линейно-скачкообразная зависимость накопления заряда в ячейке (эффект ЭБСЗ). Величина скачка накопленного заряда (порядка нескольких нКл) зависит от расстояния между наконечником и электродом заземления, вставленного в подающую трубку. Этот эффект должен учитываться при проведении фундаментальных исследований, посвященных изучению физико-химических свойств воды, а также при создании уточненных моделей, описывающих гемодинамику в организме в норме и патологии. Кроме того, полученные результаты следует использовать при разработке высокочувствительных диагностических систем на основе молекулярных детекторов, включающих проточный способ подачи образца, и предназначенных для повышения эффективности раннего выявления патологического процесса.

References

1. Ivanov Y.D., Pleshakova T.O., Malsagova K.A., Kozlov A.F., Kaysheva A.L., Kopylov A.T., Izotov A.A., Andreeva E.Yu., Kanashenko S.L., Usanov S.A., Archakov A.I. Highly sensitive protein detection by combination of atomic force microscopy fishing with charge generation and mass spectrometry analysis. *The FEBS Journal*. 2014; 281(20): 4705-17.
2. Ivanov Yu.D., Pleshakova T.O., Malsagova K.A., Kaysheva A.L., Kopylov A.T., Izotov A.A., Tatur V.Yu., Vesnin S.G., Ivanova N.D., Ziborov V.S., Archakov A.I. AFM-based protein fishing in the pulsed electric field. *Biochemistry (Moscow) Supplement Series B: Biomedical Chemistry*. 2015; 9(2): 121-9.
3. Pleshakova T.O., Malsagova K.A., Kozlov A.F., Kanashenko S.L., Ivanova N.D., Sadovskaya T.A., Archakov A.I., Ivanov Yu.D. Highly sensitive AFM-fishing of albumin. *Patogenez*. 2016; 3: 30-6. (in Russian)
4. Archakov A.I., Ivanov Y.D., Lisitsa A.V., Zgoda V.G. Biospecific irreversible fishing coupled with atomic force microscopy for detection of extremely low-abundant proteins. *Proteomics*. 2009; 9(5): 1326-43.
5. Pleshakova T.O., Shumov I.D., Ivanov Yu.D., Malsagova K.A., Kaysheva A.L., Archakov A.I., AFM-Based Technologies as the Way Towards the Reverse Avogadro Number. *Biochemistry (Moscow) Supplement Series B: Biomedical Chemistry*. 2015; 9(3): 244-57.

6. Patolsky, F., Zheng, G., Hayden, O., Lakadamyali, M., Zhuang, X., Lieber, C. M. Electrical detection of single viruses. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2004; 101: 14017-122.
7. Malsagova K.A., Ivanov Y.D., Pleshakova T.O., Kaysheva A.L., Shumov I.D., Kozlov A.F., Archakov A.I., Popov V.P., Fomin B.I., Latyshev A.V., A SOI-nanowire biosensor for the multiple detection of D-NFATc1 protein in the serum. *Analytical Methods*. 2015; 7(19): 8078-85.
8. Malsagova K.A., Ivanov Y.D., Pleshakova T.O., Kozlov A.F., Krokhin N.V., Kaysheva A.L., Shumov I.D., Popov V.P., Naumova O.V., Fomin B.I., Nasimov D.A. SOI-nanowire biosensor for detection of D-NFATc1 protein. *Biochemistry (Moscow) Supplement Series B: Biomedical Chemistry*. 2014; 8(3): 220-5.
9. Ivanov Yu. D., Pleshakova T. O., Kozlov A. F., Malsagova K.A., Krohin N.V., Shumyantseva V.V., Shumov I.D., Popov V.P., Naumova O.V., Fomin B.I., Nasimov D.A., Aseev A.L., Archakov A.I. SOI nanowire for the high-sensitive detection of HBsAg and α -fetoprotein. *Lab on a Chip*. 2012; 12(23): 5104-11.
10. Dongwhi Choi, Horim Lee, Do Jin Im, In Seok Kang, Geunbae Lim, Dong Sung Kim, Kwan Hyoung Kang. Spontaneous electrical charging of droplets by conventional pipetting. *Scientific Reports*. 2013; 3(2037): 1-7.
11. McCarty L.S., Whitesides G.M. Electrostatic charging due to separation of ions at interfaces: contact electrification of ionic electrets. *Angew. Chem. Int. Ed*. 2008; 47: 2188-207.
12. Pershin, S. Conversion of ortho-para H₂O isomers in water and a jump in erythrocyte fluidity through a microcapillary at a temperature of 36.6 ± 0.3 °C. *Phys. Wave Phenom*. 2009; 17: 241-50.
13. Kholmanskiy A.S. Two types of anomalous thermodynamics of water. Apriori. Series: *Estestvennye I tekhnicheskie nauki*. 2015; 1: 1-17. (in Russian)
14. Ivanov Yu.D., Malsagova K.A., Tatur V.Yu., Vesnin S.G., Ivanova N.D., Ziborov V.S.. Microwave radiation of water in analytical systems. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya Terapiya*. 2015; 59(4): 78-81. (in Russian)
15. Ivanov Yu.D., Malsagova K.A., Tatur V.Yu., Vesnin S.G., Ivanova N.D., Ziborov V.S. Microwave radiation of albumin solution with external excitation. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya Terapiya*. 2016; 60(3): 101-4. (in Russian)
16. Ivanov Y.D., Kozlov A.F., Malsagova K.A., Pleshakova T.O., Vesnin S.G., Tatur V.Yu., Ivanova N.D., Ziborov V.S. Monitoring of microwave emission of HRP system during the enzyme functioning. *Biochemistry and Biophysics Reports*. 2016; 7: 20-5.
17. Ivanov Y.D., Malsagova K.A., Izotov A.A., Pleshakova T.O., Tatur V.Yu., Vesnin S.G., Ivanova N.D., Usanov S.A., Archakov A.I. Detection of microwave radiation of cytochrome CYP102 A1 solution during the enzyme reaction. *Biochemistry and Biophysics Reports*. 2016; (5): 285-9.
18. Ivanov Yu.D., Malsagova K.A., Pleshakova T.O., Vesnin S.G., Tatur V.Yu., Yarygin K.N. Monitoring of brightness temperature of suspension of follicular thyroid carcinoma cells in SHF range by radiothermometry. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya Terapiya*. 2017; 61(2): 101-7. (in Russian)

Сведения об авторах:

Козлов Андрей Федорович, ведущий инженер лаборатории нанобиотехнологии ИБМХ

Галиуллин Р.А., ведущий программист, ИБМХ

Иванова Нина Дмитриевна, преподаватель ФГБОУ ВО МГАВМиБ

Татур Вадим Юрьевич, исполнительный директор, Фонд перспективных технологий и новаций

Зиборов Вадим Серафимович, канд. физ.-мат. наук, ст. науч. сотр. лаб. ударно-волновых воздействий ОИВТ РАН

Юшков Евгений Семенович, канд. техн. наук, доцент НИЯУ (МИФИ)

Плешакова Татьяна Олеговна, канд. хим. наук, ст. науч. сотр. лаб. нанобиотехнологии ИБМХ