

На правах рукописи

Черемискина Анастасия Алексеевна

**МОДИФИКАЦИЯ ПОВЕРХНОСТИ КРЕМНИЕВОГО
НАНОПРОВОЛОЧНОГО ПОЛЕВОГО ТРАНЗИСТОРА ДЛЯ
ИНДИКАЦИИ ВИРУСНЫХ ЧАСТИЦ В РЕАЛЬНОМ
ВРЕМЕНИ**

1.5.6 – Биотехнология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Кольцово – 2023

Работа выполнена в Федеральном бюджетном учреждении науки «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека

Научный руководитель: **Генералов Владимир Михайлович**
доктор технических наук, ведущий научный сотрудник ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора

Официальные оппоненты: **Уткин Денис Валерьевич**
доктор биологических наук, профессор кафедры микробиологии и физиологии растений биологического факультета ФГБОУ ВО «Саратовский национальный исследовательский государственный университет им. Н.Г. Чернышевского»

Дмитриенко Елена Владимировна
кандидат химических наук, старший научный сотрудник, заведующий лабораторией биомедицинской химии ФГБУН Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН

Ведущая организация: ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр «Красноярский научный центр Сибирского отделения Российской академии наук»

Защита состоится 15 марта 2024 г. в 9-00 часов на заседании диссертационного совета 64.1.001.1 при ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора по адресу: 630559, р.п. Кольцово, Новосибирская область, тел. (383) 363-47-10.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора <http://www.vector.nsc.ru>.

Автореферат разослан «__» _____ 20__ г.

И.о. ученого секретаря
диссертационного совета,
доктор биологических наук,
доцент

Т.Н. Ильичева

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования. Создание методов экспресс-детекции вирусов – актуальная задача биотехнологии, вирусологии, медицины и др. Они необходимы для проведения анализа в лабораторных помещениях и вне их с целью определения наличия или отсутствия вируса в пробе. Ввиду этого методы должны удовлетворять ряду условий: мобильность используемых устройств, простота проведения анализа, минимальные материальные и временные затраты. Примерами методов экспресс-детекции служат иммунохроматографический анализ (ИХА) и петлевая изотермическая амплификация (LAMP). Первый метод используется для обнаружения вирусных частиц и белков, второй – для выявления генетического материала вируса. Стоит отметить, что способ регистрации результата ИХА и LAMP при экспресс-анализе визуальный – по изменению окраски тестовой зоны или реакционной смеси. Некоторые авторы относят это к недостаткам.

Перспективным направлением в экспресс-детекции вирусов является использование нанопроволочного биосенсора на основе кремниевых полевых транзисторов (НП-биосенсор). Его ключевое отличие заключается в электрической регистрации сигнала в режиме реального времени без использования меток. Нанесение образца приводит к специфической реакции целевой молекулы с рецепторами, находящимися на поверхности НП-биосенсора, что вызывает изменение его проводимости. Детектор с цифровым выходом преобразует изменения в информационный электрический сигнал. Чувствительность метода достигает $\sim 10^3$ ВЧ/мл, время анализа – несколько минут. Эффективность обнаружения вирусов с помощью НП-биосенсора подтверждена многочисленными исследованиями. На практике биосенсор может быть использован для определения вирусного антигена или стать дополнением для детекции продуктов LAMP.

Степень изученности темы исследования. Идея использования сенсоров на основе полевых транзисторов с целью детекции ионов и биологических сигналов внеклеточных ионных импульсов предложена Bergveld P. в 1970-1972 гг. В 1980 году Caras S. и Janata J. создали первый НП-биосенсор для детекции пенициллина путем иммобилизации фермента – пенициллиназы. Разработанное устройство позволяло детектировать пенициллин в

диапазоне концентраций от 0,1 мМ до 70 мМ в 0,02 М фосфатно-солевом буфере (ФСБ). В настоящее время достигнут значительный прогресс в разработке НП-биосенсоров. Созданы различные варианты: конструкции на основе углеродных нанотрубок, графена, оксида цинка, графита; подготовки поверхности и т.д. Современная технология производства микроэлектроники позволяет уменьшить размеры сенсорного элемента НП-биосенсора до нанометров, тем самым увеличить количество биосенсоров на одном кристалле и чувствительность метода детекции на его основе. Ведутся работы в направлении использования фрагментированных антител и аптамеров, что необходимо для анализа физиологических проб. Замена стандартных антител на аптамеры при обнаружении интерлейкина 6 – маркера тяжести заболевания COVID-19 у пациентов, позволила достичь концентрации достоверного обнаружения 2,1 пг/мл. Ширина нанопроволоки (НП) составила 200 нм, длина – 2 мкм.

Тем не менее, остаются нерешенные вопросы, связанные с серийным производством НП-биосенсоров, сохранением и улучшением свойств, подготовкой и анализом проб и т.д.

Цель исследования – исследование методов модификации поверхности НП-биосенсора для создания способа экспресс-детекции вирусов.

Задачи исследования:

1. Разработка подхода очистки поверхности НП-биосенсора от адсорбированных загрязнений.
2. Разработка подхода иммобилизации антител на поверхность НП-биосенсора путем физической адсорбции и ковалентного связывания.
3. Исследование качества модификации поверхности НП-биосенсора путем детекции специфической реакции антитело-антиген.
4. Оптимизация топологии НП-биосенсора.

Научная новизна

1. Комплекс «антитело-вирус гриппа А» обладает отрицательным эффективным зарядом на поверхности раздела фаз «нанопроволока-исследуемая проба» в 1 мМ калий-фосфатном буфере ($\text{pH}=7,4\pm 0,1$). Комплекс «антитело-вирусоподобные частицы коронавируса» обладает отрицательным эффективным зарядом на

поверхности раздела фаз «нанопроволока-исследуемая проба» в дистиллированной воде ($pH=5,9\pm 0,1$).

2. Поликлональные антитела, специфичные к вирусу осповакцины (штамм Л-ИВП), имеют эффективный заряд, близкий к нейтральному, на поверхности раздела фаз «нанопроволока-исследуемая проба» в деионизованной воде ($pH=5,9\pm 0,1$).

3. Новая топология НП-биосенсора, включающая в себя два интегрированных электрода заземления на поверхности кристалла микросхемы.

Научно-практическая значимость

1. Совместно с АО «НЗПП Восток» разработана новая конструкция НП-биосенсора с интегрированными электродами заземления. Устройство исключает использование выносного электрода заземления, тем самым устраняя ряд проблем: возможность выведения из строя элементов НП-биосенсора, неплотного контакта пробы с электродом. В результате процедура детекции вирусных частиц становится проще и быстрее. Патент РФ на полезную модель №215954 от 25 августа 2022 г.

2. Изготовленные на АО «НЗПП Восток» опытно-промышленные сенсоры имеют перспективы для внедрения в практику как медицинское изделие. Акт внедрения в опытно-промышленное производство технологии изготовления сенсора на АО «НЗПП Восток».

3. Показана возможность использования НП-биосенсора в научных экспериментах для исследования эффективных электрических зарядов биологических молекул. Это может помочь изучить фундаментальный механизм взаимодействия вирусных частиц и клетки.

Методология и методы исследования. В работе использованы методы физической и химической жидкостной очистки поверхности биосенсора; методы физической адсорбции и ковалентного связывания антител; биологические методы подготовки вирусных частиц. Отобраны наиболее подходящие методы подготовки для данного типа биосенсора. Для обобщения результатов экспериментов использованы стандартные методы численного анализа и статистической обработки. Теоретическую методологию работы составили сведения о фундаментальном физико-химическом взаимодействии веществ на разделе двух фаз,

свойствах вирусов, белков, специфическом взаимодействии антител с вирусными частицами, характеристиках полевого транзистора.

Основные положения, выносимые на защиту. В результате выполненной работы установлено:

1. Создание слоя рецепторов возможно как при ковалентном связывании рецепторов с модифицированной (3-аминопропил) триэтоксисиланом поверхностью посредством активации NH_2 -группы силана молекулами 3,3'-дителиобис (сульфосукцинимидилпропионат), так и посредством электростатических сил между NH_2 -группы силана и COOH -группой антител.

2. Чувствительность НП-биосенсора достигает 10^3 ВЧ/мл в условиях эксперимента: объем анализируемой пробы 10 мкл, иммобилизация рецепторов посредством электростатического взаимодействия между антителами и (3-аминопропил) триэтоксисиланом. Чувствительность зависит от количества НП-биосенсоров на одном кристалле микросхемы, технологии производства и вероятности адсорбции целевой молекулы на поверхность сенсорного элемента.

3. НП-биосенсор позволяет определять знак эффективного заряда биологической молекулы на поверхности раздела фаз «нанопроволока-исследуемая проба». Комплексы «моноклональные антитела-вирус гриппа А», «моноклональное антитело-вирусоподобные частицы коронавируса SARS-CoV-2», обладают отрицательным эффективным зарядом на поверхности раздела фаз «нанопроволока-исследуемая проба» в условиях эксперимента. Поликлональные антитела, специфичные к вирусу осповакцины, обладают эффективным зарядом, близким к нейтральному, на поверхности раздела фаз «нанопроволока-исследуемая проба».

Достоверность научных положений, выводов и рекомендаций подтверждается общепризнанными законами и положениями химии, физики, вирусологии; публикациями в рецензируемых изданиях, патентом и обсуждением полученных результатов на российских и международных конференциях; экспериментальными результатами, их теоретическими оценками и литературными данными, которые совпадают между собой.

Апробация результатов. Результаты работы представлены на различных российских и международных конференциях: VI Международная конференция молодых ученых: биофизиков,

биотехнологов, молекулярных биологов и вирусологов «OpenBio – 2019» (р.п. Кольцово, 2019 г.); XXVII, XXVIII, XXIX Конференции «Аэрозоли Сибири» (г. Томск, 2020-2022 гг.); XIV Всероссийская научная конференция молодых ученых «Наука. Технологии. Инновации» (г. Новосибирск, 2020 г.); 2021 IEEE 22nd и 2022 IEEE 23rd International Conference of Young Professionals in Electron Devices and Materials (EDM) (Altai Republic, 2021-2022 гг.); III Всероссийская конференция молодых ученых «Вирусные инфекции – от диагностики к клинике», посвященная 55-летию со дня основания НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева (г. Санкт-Петербург, 2022 г.).

По материалам диссертационной работы опубликовано 6 научных статьи в рецензируемых российских и зарубежных журналах, 10 тезисов в трудах научных конференций, патент на полезную модель.

Структура и объем диссертации. Диссертационная работа состоит из введения, 4 глав, заключения, выводов и списка используемой литературы, включающего 221 источник. Работа изложена на 132 страницах, содержит 34 рисунка, 10 таблиц, 4 приложения.

Личный вклад автора. Обсуждение топологии НП-биосенсора с интегрированными электродами заземления, планирование и проведение экспериментов по определению наиболее подходящих методов подготовки поверхности НП-биосенсора, подготовка антител и вирусных частиц, интерпретация полученных результатов, подготовка материалов к публикации в отечественных и зарубежных изданиях выполнены автором лично или при его участии. Автором лично представлены полученные результаты на международных и российских конференциях. Автору принадлежит идея разработки топологии НП-сенсора с заземляющим электродом. Автор выполнил более 75 % от всего объема представленной работы.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Модификация поверхности нанопроволочного биосенсора

Модификация поверхности важная часть создания НП-биосенсора, которая заключается в формировании слоя рецептора. Как правило, она состоит из двух этапов: 1 – очистка поверхности от адсорбированных загрязнений, 2 – иммобилизация рецепторов.

Исследование методов модификации поверхности проводили как на поверхности НП-биосенсоров, так и на кремниевых пластинах, идентичных материалу кристалла, на которых изготавливались НП-биосенсоры.

Очистка поверхности. Физическая жидкостная очистка (ФЖО) заключалась в обработке поверхности 96 %-м раствором этанола (C_2H_5OH) в течение 30 мин при комнатной температуре с последующим промыванием в дистиллированной воде. Для удаления остатков воды и формирования активных центров связывания проводили термообработку при $T=150\text{ }^\circ\text{C}$.

Химическую жидкостную очистку (ХЖО) проводили с использованием нескольких растворов с большим редокс-потенциалом. Исследуемый раствор ($V=10$ мкл) наносили на поверхность пластин в условиях, представленных в таблице 1. Далее его удаляли и поверхность промывали большим количеством дистиллированной воды.

Таблица 1 – Растворы, применяемые для химической жидкостной очистки поверхности

Название метода	Состав раствора	Условия
1-ХЖО	$HF:H_2O = 1:50$	40 с, $25\text{ }^\circ\text{C}$
2-ХЖО	$H_2O_2:H_2O = 1:3$	10 мин, $25\text{ }^\circ\text{C}$
3-ХЖО	$H_2SO_4:H_2O_2 = 10:3$	7 мин, $30\text{ }^\circ\text{C}$
4-ХЖО	$NH_4OH:H_2O_2:H_2O = 1:4:20$	15 мин, $25\text{ }^\circ\text{C}$
5-ХЖО	$NH_4OH:H_2O_2:H_2O = 1:4:20$; $H_2SO_4:H_2O_2 = 10:1$	10 мин, $50\text{ }^\circ\text{C}$; 5 мин, $30\text{ }^\circ\text{C}$

Примечание: 1-ЖХО – метод №1 жидкостной химической обработки; 2-ЖХО – метод №2 жидкостной химической обработки; 3-ЖХО – метод №3 жидкостной химической обработки; 4-ЖХО – метод №4 жидкостной химической обработки; 5-ЖХО – метод №5 жидкостной химической обработки.

Функционализация поверхности. Иммуобилизация рецепторов методами ковалентного или электростатического связывания заключается в функционализации поверхности НП-биосенсора (создании слоя кросс-линкера) для связывания рецепторов с ней. В работе исследовали функционализацию поверхности кремниевой пластины наиболее распространенными

кросс-линкерами: (3-аминопропил) триэтоксисиланом (АПТЭС) и глutarовым альдегидом (ГА).

Метод 1-М. Поверхность кремниевой пластины, предварительно очищенную от загрязнений, функционализировали в парах 25 %-го спиртового раствора АПТЭС ($t=5$ ч, $T=25$ °С). Далее поверхность промывали этанолом.

Методы 2-М, 3-М. На очищенную поверхность кремниевой пластины наносили 10 мкл: 2-М – 1 %-го раствора ГА в ФСБ ($t=4$ ч, $T=25$ °С), 3-М – 2,5 %-го раствора ГА в ФСБ ($t=4$ ч, $T=25$ °С). После поверхность промывали ФСБ.

Результаты. На рисунке 1 представлены результаты атомно-силовой микроскопии (АСМ) поверхности пластин после проведения этапов очистки и функционализации. Результаты представлены в виде диаграммы.

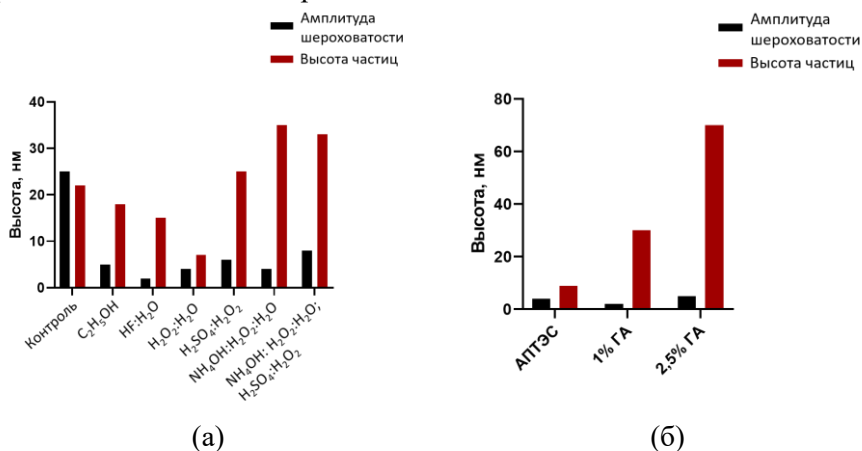


Рисунок 1 – Результаты атомно-силовой микроскопии поверхности кремниевых пластин: (а) – после этапа очистки; (б) – после этапа функционализации поверхности молекулами кросс-линкера

Как видно из рисунка 1а, использование методов ХЖО и ФЖО приводит к уменьшению шероховатости и сокращению числа посторонних частиц по сравнению с необработанной поверхностью. Выбор наиболее эффективного метода очистки основывали на критериях: минимизация шероховатости поверхности, минимизация количества и высоты посторонних частиц, сохранение рабочих элементов устройства. Исходя из этого, можно выделить метод ХФО с использованием раствора $H_2O_2:H_2O$. Однако использование

этанола (C_2H_5OH) для очистки поверхности НП-биосенсора не уступает по своим характеристикам растворам ХЖО. Кроме того, спирт выступает в качестве мягкого очищающего раствора и не влияет на состояние рабочих элементов биосенсора.

Важным фактором при проведении ковалентного связывания считается создание однородного монослоя молекул кросс-линкера. Данное условие достигается при использовании паров АПТЭС (рисунок 16). В результате на поверхности встречаются частицы высотой до 9 нм, что, возможно, вызвано олигомеризацией молекул АПТЭС посредством C_2H_5O -групп. Использование ГА приводила к образованию отдельно расположенных областей с высотой до 70 нм. Данные характеристики не подходят для дальнейших работ. По этой причине для иммобилизации антител применяли 25 %-й спиртовой раствор АПТЭС.

По результатам эксперимента установлено: 1 – очистку поверхности можно проводить «мягким» очищающим раствором C_2H_5OH ; 2 – в качестве кросс-линкера можно использовать 25 %-й спиртовой раствор АПТЭС.

Дальнейшие исследования этапов модификации проводили на примере детекции различных моделей вирусных частиц.

Детекция вирусных частиц

Исследование качества модификации поверхности НП-биосенсора осуществляли посредством детекции специфической реакции антитело-антиген, что позволяло подтвердить сохранение биологической активности и иммобилизацию рецепторов.

Детекция вируса гриппа А (генотип А(Н1N1)pdm09). Очистку поверхности осуществляли последовательным использованием изопропанола и раствора $HF:C_2H_5OH=1:50$. Иммобилизацию антител проводили методом ковалентного связывания. На поверхности НП-биосенсора создавали слой кросс-линкера в парах АПТЭС ($t=20$ ч, $T=25$ °С). Не прореагировавшие молекулы кросс-линкера удаляли путем промывания этанолом. Активацию NH_2 -групп АПТЭС проводили с помощью 0,12 мМ 3,3'-дितिобис (сульфосукцинимидилпропионат) в 50 мМ калий-фосфатного буфера (КФБ). Далее на поверхность НП-биосенсоров наносили антитела, специфичные к вирусу гриппа А (рабочий НП-биосенсор), или антитела, специфичные к вирусу гепатита В (контрольный НП-биосенсор).

Непосредственно перед экспериментом готовили растворы вируса гриппа А с различной концентрацией (от 10^3 до 10^{10} ВЧ/мл) в буфере (1 мМ КФБ, рН=7,4). Далее 7 мкл анализируемого раствора вносили в измерительную ячейку, содержащую 100 мкл 1 мМ КФБ. Для улучшения качества сигнала в раствор вводили платиновый электрод заземления.

Регистрацию сигнала биосенсора, а именно временные зависимости величины тока в цепи исток-сток (I_{ds}), проводили в режиме реального времени при $V_{bg}=55$ В, $V_{ds}=0,1$ В. Измерения проводили 3 раза.

Показателем эффективной иммобилизации антител является смещение кривых вольтамперной характеристики (ВАХ) (кривые 2, 3) по сравнению с кривыми ВАХ без антител (кривая 1) (рисунок 2).

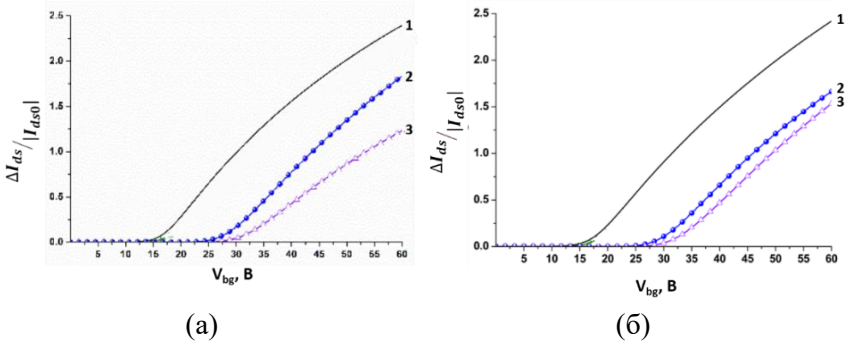


Рисунок 2 – Вольтамперные характеристики НП-биосенсоров до и после иммобилизации антител: (а) специфичных к вирусу гриппа А (рабочий НП-биосенсор), (б) специфичных к вирусу гепатита В (контрольный НП-биосенсор): 1 – кривые ВАХ, полученные после функционализации поверхности в парах АПТЭС; 2 – кривые ВАХ после иммобилизации антител (в деионизованной воде); 3 – кривые ВАХ после иммобилизации антител (в 1 мМ калий-фосфатном буфере). Условия эксперимента: $V_{bg}=0-60$ В, $V_{ds}=0,1$ В

Измеренные ВАХ в жидких средах после иммобилизации смещались на $\sim 10-15$ В относительно контрольной кривой 1. Возможно, на сдвиг ВАХ в жидких средах оказывали влияние используемые буферные растворы (КФБ или деионизованная вода), которые могли давать дополнительные отрицательные заряды. Для

исключения подобной возможности в измерительную ячейку вводили выносной электрод заземления.

Результаты эксперимента по детекции вируса гриппа А представлены на рисунке 3а в виде сенсограмм – зависимости безразмерной величины тока $R = \frac{\Delta I_{ds}}{|I_{ds0}|}$, выраженной в относительных единицах, от времени.

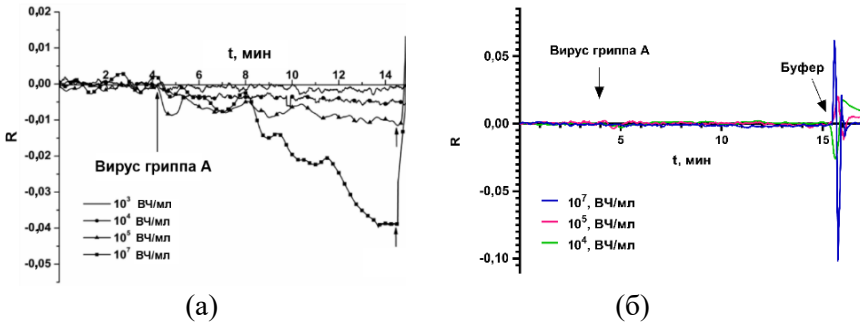


Рисунок 3 – Сенсограммы, полученные при детекции вируса гриппа А с помощью: (а) – рабочего НП-биосенсора, на поверхности которого иммобилизованы антитела, специфичные к вирусу гриппа А; (б) – контрольного НП-биосенсора, на поверхности которого иммобилизованы антитела, специфичные к вирусу гепатита В: Вирус гриппа А – момент внесения вирусной суспензии; 10^3 - 10^7 ВЧ/мл – концентрация вирусных частиц в пробе; Буфер – момент промывки поверхности КФБ. Условия эксперимента: $V_{bg}=55$ В, $V_{ds}=0,1$ В

НП-биосенсор, на поверхности которого иммобилизованы антитела против вируса гриппа А (рисунок 3а), хорошо реагировал на внесение пробы с концентрацией $\sim 10^4$ ВЧ/мл вирусных частиц. Обобщение изменений I_{ds} показали уменьшение величины тока при внесении суспензии вируса гриппа А. Подобное поведение биосенсора с n -типом проводимости связано с нахождением отрицательного электрического заряда на поверхности НП. Можно предположить, что образующийся специфический комплекс «антитело-антиген», обладает отрицательным эффективным электрическим зарядом на поверхности раздела фаз «нанопроволока-исследуемая проба» в условиях эксперимента.

НП-биосенсор, на поверхности которого иммобилизованы антитела против вируса гепатита В (рисунок 3б), не реагировал на внесение вирусной пробы (концентрации 10^4 - 10^7 ВЧ/мл).

Следовательно, проведенная процедура модификации поверхности позволяет получать специфический сигнал при детекции целевых молекул.

Также проводили измерение влияния буфера на величину тока НП-биосенсора. В результате зафиксирован только шум, следовательно, буфер не вносит вклад в измерения при детекции вирусных частиц.

Детекция вирусоподобных частиц коронавируса SARS-CoV-2. Поверхность НП-биосенсора очищали 96 %-м раствором этанола. Затем создавали слой кросс-линкера в парах 25 %-го спиртового раствора АПТЭС ($t=5$ ч, $T=20$ °С). Далее поверхность разделили на две части для получения двух независимых результатов. На первую часть наносили моноклональные антитела (МКА), специфичные к S-белку коронавируса SARS-CoV-2, и выдерживали при $t=2$ ч и $T=4$ °С (эксперимент). Не связавшиеся антитела удаляли промыванием дистиллированной водой. В данном случае взаимодействие молекул кросс-линкера и антител – электростатическое. Вторая часть выступала в качестве контроля и ее поверхность содержала только слой кросс-линкера без антител (контроль).

На подготовленную поверхность наносили с последующим удалением 10 мкл дистиллированной воды и приготовленных проб ($V=10$ мкл), содержащих вирусоподобные частицы (ВПЧ) коронавируса, с концентрациями вирусных частиц от 10^{-18} М до 10^{-13} М ($\sim 10^2$ - 10^7 ВЧ/мл). Для улучшения качества сигнала в анализируемую пробу вводили платиновый электрод заземления «сверху». Сигнал биосенсора на внесение суспензии ВПЧ коронавируса отслеживали через регистрацию временной зависимости величины тока биосенсора $I_{ds}(t)$ с помощью стандартной системы сбора данных NI 6363. Регистрацию тока проводили 4 раза.

Результат детекции ВПЧ коронавируса представлен в виде временной зависимости величины тока $I_{ds}(t)$, измеренной в режиме реального времени. Реакция двух независимых НП-биосенсоров (экспериментального и контрольного) на внесение вирусной суспензии представлена на рисунке 4. Красная линия соответствует экспериментальному НП-биосенсору с иммобилизованными МКА против S-белка коронавируса, черная линия – контрольному НП-биосенсору без антител.

Как видно из рисунка 4, НП-биосенсор с иммобилизованными антителами (красная линия) реагировал на внесение пробы вируса с концентрацией 10^3 - 10^7 ВЧ/мл уменьшением значений величины тока I_{ds} , в то время как значения I_{ds} контрольного НП-биосенсора (черная линия) изменялись в пределах шума.

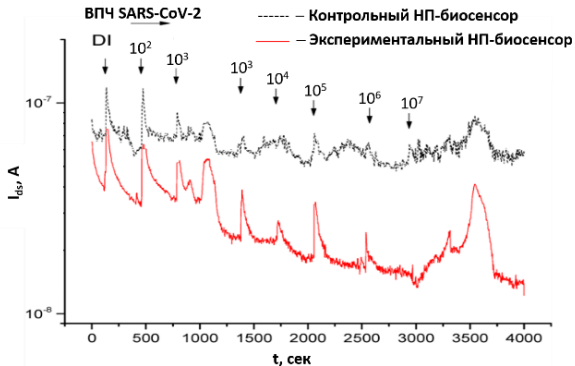


Рисунок 4 – Временная зависимость величины тока двух НП-биосенсоров, полученная после добавления на их поверхность вирусоподобных частиц коронавируса в количестве: (а) – 10^2 - 10^7 ВЧ/мл; (б) – 10^7 ВЧ/мл. DI – момент внесения деионизированной воды. Условия эксперимента: $V_{ds}=0,15$ В

Полученный сигнал экспериментального НП-биосенсора и отсутствие сигнала контрольного НП-биосенсора подтверждает успешную иммобилизацию антител на поверхности первого НП-биосенсора посредством электростатического взаимодействия АПТЭС и антител. Кроме того, отсутствие изменения I_{ds} контрольного НП-биосенсора показывает, что ВПЧ или буфер не оказывают влияние на величину тока устройства.

Уменьшение I_{ds} при взаимодействии антител и антигена на поверхности НП-биосенсора связано с возникновением отрицательного электрического заряда на НП. Можно сделать вывод о том, что комплекс «антитело-антиген» обладает отрицательным эффективным зарядом на поверхности раздела фаз.

Детекция вируса осповакцины (штамм Л-ИВП). Поверхность НП-биосенсора очищали с помощью 96 %-го этанола и дистиллированной воды. Иммобилизацию рецепторов – поликлональных антител (ПКА), специфичных к вирусу осповакцины, проводили методом физической адсорбции. На

подготовленную поверхность НП-биосенсора наносили 10 мкл антител. Предварительно антитела разбавляли дистиллированной водой для уменьшения ионной силы раствора. Далее выдерживали суспензию в течение ~15 минут для естественной адсорбции молекул и стабилизации сигнала устройства. Напряжение между стоком и истоком устанавливали $V_{ds}=0,15$ В. После стабилизации сигнала на поверхность НП-биосенсора, содержащую ПКА, вносили различное разведение пробы ВОВ: $DI=10^{-15}-10^{-1}$, где ВОВ – вирус осповакцины, DI – деионизованная вода. Напряжение между стоком и истоком устанавливали $V_{ds}=0,15$ В. Сигнал биосенсора на внесение суспензий антител, вируса и их специфическое связывание отслеживали путем регистрации $I_{ds}(t)$ с помощью системы сбора данных NI 6363.

В качестве контроля определяли влияние частиц ВОВ на величину тока биосенсора. Результаты измерения I_{ds} двух независимых НП-биосенсоров представлены на рисунке 5.

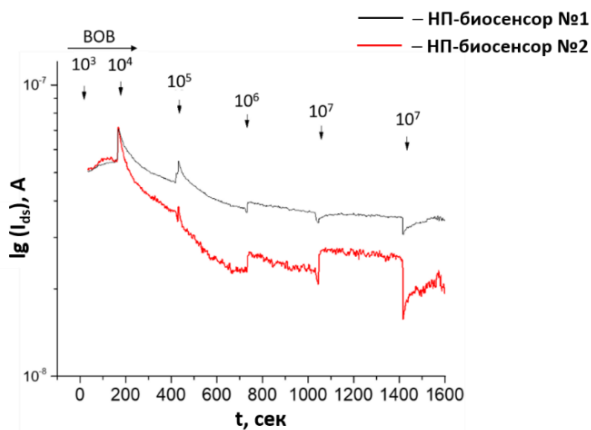


Рисунок 5 – Временные зависимости $I_{ds}(t)$ двух НП-биосенсоров, полученные после добавления на поверхность сенсора суспензии ВОВ разной концентрации: 10^3 - 10^7 – концентрация ВОВ, ВЧ/мл

Рабочая точка выбрана таким образом, чтобы начальные значения I_{ds} НП-биосенсоров совпадали. Дальнейшие показания I_{ds} биосенсоров отличались друг от друга, что, вероятно, связано с чувствительностью устройств. Однако сохранялась тенденция уменьшения величины тока обоих НП-биосенсоров. Как видно из рисунка 5, происходят незначительные изменения величины тока, которые не превышают $1/3 I_{ds}$. Уменьшение величины тока связано с

адсорбцией белков, содержащихся в анализируемой пробе: вирусные частицы, вирусные белки, посторонние белки. Можно сказать, что содержащиеся в пробе частицы обладали отрицательным эффективным зарядом на поверхности раздела фаз «нанопроволока-исследуемая проба».

Результаты детекции ВОВ специфическими ПКА с использованием НП-биосенсора представлены на рисунке 6. Каждая точка на рисунке является результатом усреднения по 12-ти НП-биосенсорам.

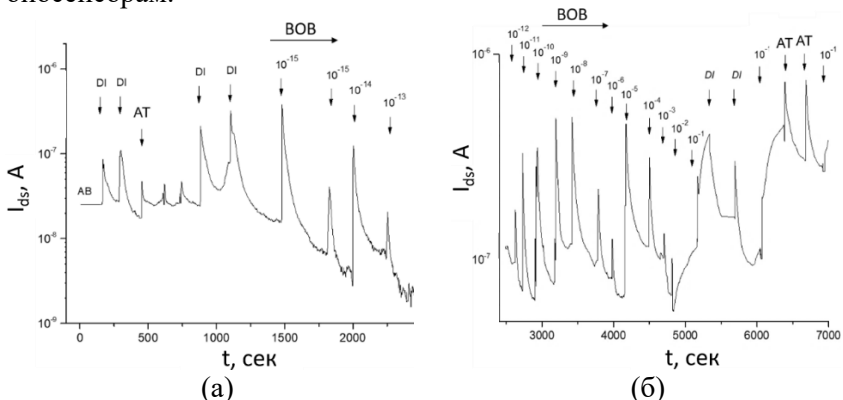


Рисунок 6 – Временная зависимость величины тока НП-биосенсора, полученная при детекции вируса осповакцины специфическими поликлональными антителами: DI – момент внесения на поверхность деионизованной воды; AT – внесение поликлональных антител; 10^{-15} - 10^{-1} – внесение суспензии вирусных частиц в различном разбавлении (BOV:DI= 10^{-15} - 10^{-1}). Электрические характеристики: (а) – $V_{bg} = 54$ В; (б) – $V_{bg} = 60$ В, деионизованная вода

Из рисунка 6 видно, что внесение деионизованной воды (DI) и разбавленных поликлональных антител, специфичных к ВОВ, практически не изменяло значения I_{ds} биосенсора. Можно говорить о том, что ПКА на поверхности раздела фаз обладают эффективным зарядом, близким к нейтральному.

Внесение разбавленной пробы вируса ВОВ:DI= 10^{-15} - 10^{-9} раз на временном участке 1500-2000 с приводило к уменьшению I_{ds} , что вызвано возникновением отрицательного заряда. Внесение пробы в разведении ВОВ:DI= 10^{-15} раз вызывает изменение тока $\sim 1/2 I_{ds}$, что несколько больше, чем при адсорбции вируса на чистую поверхность (рисунок 5). Численные оценки показали, что вероятность наличия

вирусных частиц (исходная концентрация 10^9 ВЧ/мл) в данном разведении крайне мала. Однако в пробе могут содержаться вирусные белки, которые могут вступать в реакции взаимодействия с антителами и изменять показатели I_{ds} . Не исключено, что на сигнал биосенсора сказывается адсорбция фоновых частиц и посторонних белков, находящихся в анализируемой пробе. Внесение вирусной суспензии в $ВОВ:DI=10^{-12}-10^{-2}$ раз приводит к немономонному изменению значений I_{ds} , что связано с возникновением разного электрического заряда на поверхности НП. Действительно, накопление белков и вирусных частиц, содержащихся в пробе, на поверхности НП в интервале 5000-7000 с приводит к увеличению I_{ds} . Такое поведение биосенсора характерно при воздействии на него положительного электрического заряда. В диапазоне 2500-5000 с сложно утверждать, что изменение I_{ds} биосенсора связано с образованием комплекса «антитело-антиген», поскольку посторонние белки так же оказывают влияние.

Изменение значений I_{ds} во всем временном диапазоне эксперимента связано с тремя процессами адсорбции/десорбции: 1 – посторонних белков, 2 – вирусных частиц, 3 – комплекса «антитело-антиген».

После эксперимента поверхность НП проанализировали с помощью АСМ (рисунок 7). На поверхности наблюдается единичный объект на поверхности НП с размером, характерным для ВОВ.

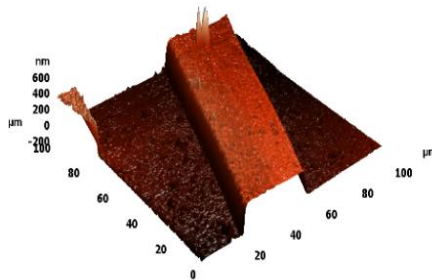


Рисунок 7 – Атомно-силовая микроскопия поверхности НП-биосенсора после детекции вируса осповакцины

Результаты детекции вирусных частиц подтверждают успешное проведение этапов модификации поверхности НП-биосенсора. Показано, что биосенсор реагирует на образование

комплексов «антитело-антиген» как при физической адсорбции антител, так и при их ковалентном и электростатическом связывании. Ковалентное связывание рецепторов приводит к образованию селективного сигнала НП-биосенсора. В то время как сигнал при физической адсорбции отображает наличие посторонних белков. Оставшиеся незакрытые участки НП могут реагировать на присутствие нецелевых белков. Возможно, метод физической адсорбции можно применять в качестве стадии подготовки экспресс-метода при изменении порядка добавления проб для установления общего и специфического сигнала биосенсора.

Конструкция опытно-промышленного сенсора

Проведенный анализ литературных и экспериментальных данных показал, что использование выносного электрода заземления по принципу «сверху» вызывает ряд проблем. Для их решения разработана новая конструкция НП-биосенсора, особенность которой заключалась в интегрировании двух электродов заземления непосредственно на поверхность кристалла микросхемы. Топология и электрическая принципиальная схема подключения НП-сенсора представлены на рисунке 8. В рамках выполненного исследования изготовлена партия микросхем, согласно договору № 0698/22 с АО «Новосибирский завод полупроводниковых прибор «Восток»

После изготовления партии микросхем в качестве контроля измеряли величину тока в цепи исток-сток I_{ds} (А) для десяти НП-сенсоров, расположенных на одном кристалле микросхемы, в зависимости от напряжения, подаваемого на подзатвор ($V_{bg}=0-30$ В) в режиме холостого хода. Относительная погрешность измерения величины тока $0,10\%+100$ пА, напряжения – $0,022\%+1$ мВ.

В случае, когда на подзатвор не подавали напряжение ($V_{bg}=0$ В), сенсоры № 3, 5-10 не проводили электрический ток ($I_{ds}\leq 10^{-9}$ А), остальные сенсоры, наоборот, проводили ток ($I_{ds}>10^{-9}$ А). Увеличение величины подаваемого напряжения должно приводить к увеличению I_{ds} в цепи исток-сток. В эксперименте увеличение напряжения до $V_{bg}=10$ В вызывало возрастание токов сенсоров № 1, 2 и 4 в 10 раз, и не влияло на изменение токов сенсоров № 6, 8-10. Стоит отметить, что повторное измерение при $V_{bg}=10$ В не приводило к изменению I_{ds} указанных сенсоров, в то время как I_{ds} сенсоров № 3, 5 при этом возрастали. Дальнейшее увеличение $V_{bg}\geq 20$ В приводило к изменению I_{ds} до $1\times 10^{-6}-2\times 10^{-6}$ А.

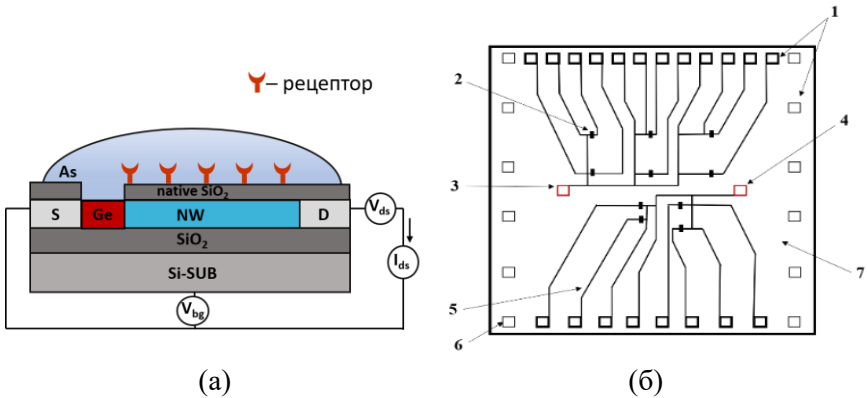


Рисунок 8 – (а) Электрическая принципиальная схема подключения НП-сensors: native SiO_2 – нативный слой SiO_2 ; NW – кремниевая нанопроволока; SiO_2 – скрытый диэлектрик; Si-SUB – управляющий электрод или тыловой затвор; S – исток; D – сток; Ge – электрод заземления; V_{vd} – источник постоянного напряжения в цепи исток-сток; I_{ds} – регистрирующее устройство (амперметр); V_{bg} – регулируемый источник напряжения на подзатворе; AS – анализируемая проба. (б) Топология кристалла микросхемы: 1 – типовые контактные площадки; 2 – нанопроволока; 3, 4 – электроды заземления; 5 – сток; 6 – управляющий электрод (контактная площадка подзатвора); 7 – кристалл микросхемы

Исследование вольтамперных характеристик сенсора в процессе детекции вируса гриппа птиц

После процедуры контроля входных параметров НП-сensors проводили детекцию вируса гриппа птиц. В эксперименте использовали инактивированный вирус гриппа птиц подтипа A(H9N2) и сыворотку, содержащую ПКА специфичные к вирусу.

Схема эксперимента состояла в следующем: поверхность НП-биосенсора обработали дистиллированной водой и высушили. Далее нанесли 8 мкл сыворотки и 8 мкл суспензии вируса. На каждом этапе проводили измерения I_{ds} в диапазоне напряжений $V_{bg}=0-10$ В.

В совокупности полученных данных присутствуют отрицательные значения I_{ds} , которые наблюдаются при внесении сыворотки (НП-сensors № 1-9, $V_{bg}=0-2$ В) и вируса (НП-сensors № 1, 3, 5-9, $V_{bg}=0-5$ В; НП-сensors № 2 и 4 во всем диапазоне напряжения). Возможно, полученные данные обусловлены током утечки. Результаты ВАХ представлены на рисунке 9.

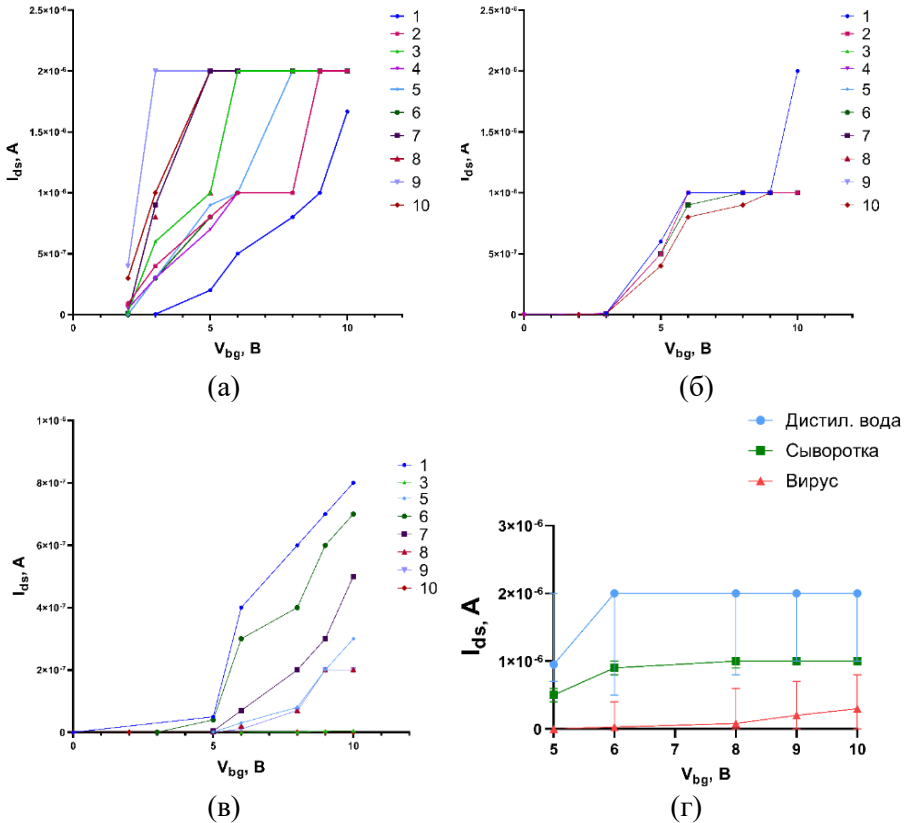


Рисунок 9 – Вольтамперные характеристики десяти НП-сенсоров после внесения: (а) – дистиллированной воды, (б) – сыворотки, содержащей специфические поликлональные антитела, (в) – суспензии инактивированного вируса гриппа птиц.

(г) – Вольтамперные характеристики после исключения отрицательных значений величины тока: точки – медианы значений I_{ds} НП-сенсоров; вертикальные линии – 95 % доверительные интервалы. Относительная погрешность измерения тока 0,10 % + 100 пА, напряжения 0,022 % + 1 мВ

Как видно из рисунка 9а-в, все кривые имеют стандартную тенденцию изменение I_{ds} при соответствующих изменениях V_{bg} , но не совпадают друг с другом. Наиболее близкие значения I_{ds} всех десяти НП-сенсоров наблюдается при внесении на их поверхность

сыворотки (рисунок 9б). Добавление вирусной суспензии приводит к тому, что НП-сенсоры № 3, 10 практически не проводят электрический ток, а НП-сенсоры № 2, 4 показывают отрицательные значения I_{ds} (рисунок 9в). Также из рисунка 9в видно, что кривые не совпадают друг с другом. Возможно, это связано с вероятностью адсорбции вирусных частиц на поверхности НП-сенсоров.

Обобщенные по всем НП-сенсорам ВАХ для трех случаев показывают, что последовательное внесение сыворотки и вируса приводило к смещению соответствующих кривых вправо относительно кривой ВАХ после нанесения дистиллированной воды. Данное явление показало эффективность проведения иммобилизации антител и детекции вируса. Так, физическая адсорбция ПКА приводила к сдвигу кривой на ~ 1 В относительно ВАХ воды, предполагаемая адсорбция комплекса антитело-антиген на ~ 5 В. Помимо смещения, наблюдалось уменьшение значений тока в результате обеднения канала проводимости, что так же указывало на адсорбцию биологических молекул на поверхность сенсоров.

Для проведения статистического анализа изменений I_{ds} НП-сенсоров при внесении дистиллированной воды, сыворотки и вируса потребовалось исключение данных НП-сенсоров № 2-4, которые показывали отрицательные значения величины тока в процессе измерений. ВАХ, кривые которой построены по медианам значений I_{ds} НП-сенсоров после исключения отрицательных значений величин тока, представлены на рисунке 9г. Достоверные изменения величин тока выявлены при внесении вируса на поверхности НП-сенсоров с внесенной ранее сывороткой, относительно дистиллированной воды.

По результатам проведенной работы можно сделать вывод, что НП-сенсоры не демонстрировали повторяемость и воспроизводимость по величине тока в режиме холостого хода. Возможно, причина заключается в технологии производства. Несмотря на это, они позволяют эффективно проводить детекцию целевых молекул.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В диссертационной работе получены экспериментальные данные, которые могут быть использованы для разработки методики детекции вирусов. Рассмотрены наиболее простые методы подготовки поверхности устройства, направленные на снижение материальных и временных затрат при изготовлении НП-

биосенсора. В результате выявлены условия очистки, иммобилизации рецепторов, отвечающие необходимым критериям. Для удаления адсорбированных частиц подходит физическая жидкостная обработка 96 %-м раствором этанола. Иммобилизацию рецепторов можно проводить как физической сорбцией, так и ковалентным связыванием. Однако необходимо учитывать состояние поверхности для проведения физической сорбции антител, а также последовательность внесения пробы и рецепторов.

По результатам проведенных экспериментов показано, что чувствительность биосенсора составляет $\sim 10^3$ - 10^4 ВЧ/мл. Использование НП-биосенсора позволяет так же установить электрические заряды биологических молекул на разделе фаз «нанопроволока-исследуемая проба». Данные заряды возникают в результате перераспределения электронной плотности в молекулах из-за адсорбции на твердую поверхность и протекающих при этом процессах.

Остаются открытыми вопросы, направленные на улучшение работы. К ним относятся оптимизация топологии кристалла, направленная, например, на увеличение количества НП-сенсоров на одном кристалле, создания мобильного регистрирующего прибора, создание мультикомплексного анализа.

Все задачи выполнены, цель достигнута.

ВЫВОДЫ

1. Очистка поверхности НП-биосенсора от адсорбированных загрязнений 96 %-м этанолом позволяет устранять адсорбированные загрязнения и сохраняет все конструктивные элементы устройства.

2. Иммобилизация антител на поверхности НП-биосенсора показала:

– физическая адсорбция поликлональных антител, специфичных к вирусу осповакцины, на очищенную поверхность нанопроволочного биосенсора обеспечивает детекцию суммарного сигнала от комплекса «антитело-антиген» и фоновых частиц;

– ковалентное связывание антител с поверхностью нанопроволочного биосенсора позволяет регистрировать специфичный сигнал от комплекса «антитело-антиген». Чувствительность устройства оценивается $\sim 10^3$ ВЧ/мл.

3. Исследование качества модификации поверхности НП-биосенсора путем детекции специфической реакции антитело-антиген позволило установить знак эффективного заряда биологических молекул на поверхности раздела фаз «нанопроволока-исследуемая жидкая проба». Комплекс «антитело-вирус гриппа А» обладает отрицательным эффективным зарядом в 1 мМ калий-фосфатном буфере ($\text{pH}=7,4\pm 0,1$), комплекс «антитело-вирусоподобные частицы коронавируса» обладает отрицательным эффективным зарядом в дистиллированной воде ($\text{pH}=5,9\pm 0,1$), поликлональные антитела, специфичные к вирусу осповакцины (штамм Л-ИВП), имеют эффективный заряд, близкий к нейтральному в деионизованной воде ($\text{pH}=5,9\pm 0,1$).

4. Интегрированные электроды заземления на поверхности кристалла микросхемы обеспечивают надежный электрический контакт с жидкой анализируемой пробой, упрощают процедуру подготовки нанопроволочного биосенсора к работе.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи

1. Генералов В.М., Наумова О.В., Пьянков С.А., Колосова И.В., Сафатов А.С., Зайцев Б.Н., Зайцева Э.Г., Буряк Г.А., **Черемискина А.А.** и др. Индикация вируса осповакцины с помощью нанопроволочного КНИ-биосенсора // Автометрия. – 2021. – Т. 57, № 1. – С. 42-49.

2. Malsagova K.A., Pleshakova T.O., Kozlov A.F., Galiullin R.A., Popov V.P., Tikhonenko F.V., Glukhov A.V., Ziborov V.S., Shumov I.D., Petrov O.F., Generalov V.M., **Cheremiskina A.A.** et al. Detection of influenza virus using a SOI-nanoribbon chip, based on an n-type field-effect transistor // Biosensors. – 2021. – V. 11, № 4. – Paper 119.

3. **Черемискина А.А.**, Наумова О.В., Дурьманов А.Г. и др. Экспресс индикация вируса гриппа с помощью биосенсора на основе кремниевого нанопроволочного полевого транзистора // Оптика атмосфер и океана. – 2021. – Т. 34, № 6. – С. 463-465.

4. **Черемискина А.А.**, Генералов В.М., Сафатов А.С. и др. Подготовка поверхности подложки кремниевых нанопроволочных полевых транзисторов для создания биосенсора // Технологии живых систем. – 2021. – Т. 18, № 2. – С. 62-70.

5. Naumova O., Generalov V., Shcherbakov D., Zaitseva E., Zhivodkov Y., Kozhukhov A., Latyshev A., Aseev A., Safatov A., Buryak G., **Cheremiskina A.** et al. SOI-FET Sensors with dielectrophoretic concentration of viruses and proteins // Biosensors. – 2022. – V. 12, № 11. – Paper 992.

6. Generalov V., **Cheremiskina A.**, Glukhov A. et al. Investigation of Limitations in the Detection of Antibody+Antigen Complexes Using the Silicon-on-Insulator Field-Effect Transistor Biosensor // Sensors. – 2023. – V. 23. – Paper. 7490.

Тезисы

1. **Черемискина А.А.** Подготовка поверхности нанопроволочных кремниевых полевых транзисторов как этап создания биосенсора // VI Международная конференция молодых ученых: биофизиков, биотехнологов, молекулярных биологов и вирусологов – 2019: Сб. тез. / АНО «Иннов. центр Кольцово». – Новосибирск : ИПЦ НГУ, 2019. – С. 218-220.

2. Safatov A., Generalov V., Generalov K., Buryak G., **Cheremiskina A.** et al. How to increase the sensitivity of a biosensor based on a nanowire field-effect transistor to virions bioaerosol samples // 7th Virtual Edition ESA - European Symposium on Aerobiology. – Spain, 2020. – P. 95.

3. Generalov V., Naumova O., Shcherbakov D., Safatov A., Zaitsev B., Zaitseva E., Buryak G., Shcheglov D., **Cheremiskina A.**, et al. Indication of the Coronavirus Model Using a Nanowire Biosensor // Proceedings. 2020. – P. 1-10. Presented at the 1st International Electronic Conference on Biosensors, 2–17 November 2020.

4. **Черемискина А.А.**, Сафатов А.С., Генералов В.М. и др. Пути повышения чувствительности биосенсора на основе нанопроволочного полевого транзистора для выявления вирусных патогенов в пробах атмосферного аэрозоля // Аэрозоли Сибири. XXVII Конференция: Тезисы докладов. – Томск : Изд-во ИОА СО РАН, 2020. – С. 85.

5. **Черемискина А.А.**, Генералов В.М., Сафатов А.С. Этапы подготовки поверхности нанопроволочного кремниевого полевого транзистора // XIV Всероссийская научная конференция молодых ученых «НАУКА. ТЕХНОЛОГИИ. ИННОВАЦИИ» // Сборник научных трудов в 9 ч. / под ред. А.В. Гадюкиной. – Новосибирск : Изд-во НГТУ, 2020. – 6 ч. – С. 178-182.

6. **Cheremiskina A.**, Generalov V., Safarov A. et al. Laboratory Preparation of Biosensor Based on Silicon Nanowire Field-Effect Transistor for Virus Indication // 2021 IEEE 22nd International Conference of Young Professionals in Electron Devices and Materials (EDM). Altai Republic, June 30 - July 4, 2021. 4 p.

7. **Черемискина А.А.**, Генералов В.М., Рудометова Н.Б. и др. Визуализация вирусных частиц в переменном электрическом поле // Аэрозоли Сибири. XXVIII Конференция: Тезисы докладов. – Томск : Изд-во ИОА СО РАН, 2021. – С. 58.

8. **Черемискина А.А.**, Наумова О.В., Генералов В.М. и др. Биосенсоры на основе КНИ-транзистора для экспресс-индикации вирусных частиц // Вирусные инфекции – от диагностики к клинике: сборник тезисов Всероссийской конференции молодых ученых, посвященной 55-летию со дня основания НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева. – СПб. : ПОЛИТЕХ-ПРЕСС, 2022. – С. 81.

9. **Cheremiskina A.A.**, Generalov V.M., Merkulova Iu.A. et al. Detection of Viral Particles Using a Biosensor // 2022 IEEE 23rd International Conference of Young Professionals in Electron Devices and Materials (EDM). Altai Republic, June 30 - July 4, 2022. – P. 530-533.

10. **Черемискина А.А.**, Генералов В.М., Глухов А.В. и др. Система детекции вирусных частиц на основе биосенсора // Аэрозоли Сибири. XXIX Конференция: Тезисы докладов. – Томск : Изд-во ИОА СО РАН, 2022. – С. 66.

Патент

1. Генералов В.М., **Черемискина А.А.**, Глухов А.В., Грабежова В.К. Биосенсор для индикации биологических частиц: полезная модель к патенту RU 215954 U1 Рос. Федерация. заявл. 25.08.2022 № 2022122941; опубл. 11.01.2023, Бюл. № 2.