

ФЕДЕРАЛЬНОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ  
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР ВИРУСОЛОГИИ И  
БИОТЕХНОЛОГИИ «ВЕКТОР» ФЕДЕРАЛЬНОЙ СЛУЖБЫ ПО НАДЗОРУ В  
СФЕРЕ ЗАЩИТЫ ПРАВ ПОТРЕБИТЕЛЕЙ И БЛАГОПОЛУЧИЯ ЧЕЛОВЕКА

*на правах рукописи*

**Черемискина Анастасия Алексеевна**

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

Специальность 1.5.6 – Биотехнология

**ДИССЕРТАЦИЯ**

на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Научный руководитель:  
д.т.н. Генералов В.М.

Кольцово – 2023

**СОДЕРЖАНИЕ**

ВВЕДЕНИЕ .....	5
ГЛАВА 1 Литературный обзор .....	13
1.1 Методы детекции вирусов.....	13
1.2 Биосенсоры .....	22
1.3 Нанопроволочный биосенсор .....	24
1.3.1 Структура нанопроволочного биосенсора .....	24
1.3.2 Принцип действия и характеристики нанопроволочного биосенсора .....	27
1.4 Модификация поверхности нанопроволочного биосенсора .....	34
1.4.1 Очистка и активация поверхности .....	34
1.4.2 Иммобилизация рецепторов.....	42
1.5 Выводы по Главе 1 .....	47
ГЛАВА 2 Материалы и методы .....	49
2.1 Перечень основных химических реактивов, материалов и оборудования .....	49
2.2 Конструкция нанопроволочного сенсора .....	51
2.3 Методы .....	51
2.3.1 Подготовка вирусных частиц.....	51
2.3.1.1 Подготовка вирусоподобных частиц коронавируса SARS-CoV-2 .....	51
2.3.1.2 Подготовка вируса осповакцины (штамм Л-ИВП).....	52
2.3.2 Иммуноферментный анализ.....	52
2.3.3 Методы модификации поверхности.....	53
2.3.3.1 Очистка поверхности.....	53
2.3.3.2 Функционализация поверхности .....	54
2.3.3.3 Иммобилизация рецепторов .....	54

2.3.4 Детекция вирусов .....	55
2.3.4.1 Детекция вируса гриппа А (подтип А(Н1N1)pdm09).....	55
2.3.4.2 Детекция вирусоподобных частиц коронавируса SARS-CoV-2 .....	57
2.3.4.3 Детекция вируса осповакцины (штамм Л-ИВП) .....	58
2.3.5 Микроскопические методы анализа.....	59
2.3.5.1 Электронная микроскопия .....	59
2.3.5.2 Атомно-силовая микроскопия .....	59
ГЛАВА 3 Результаты и обсуждения .....	60
3.1 Модификация поверхности.....	60
3.1.1 Результаты очистки поверхности .....	60
3.1.2 Результаты функционализации поверхности.....	65
3.2 Электронная микроскопия вирусов.....	69
3.3 Специфическое взаимодействие антитело-антиген в растворе с низкой ионной силой .....	70
3.4 Результаты детекции вирусов .....	72
3.4.1 Результаты детекции вируса гриппа А (подтип А(Н1N1)pdm09).....	72
3.4.2 Результаты детекции вирусоподобных частиц коронавируса SARS-CoV-2 .....	77
3.4.3 Результаты детекции вируса осповакцины (штамм Л-ИВП) .....	80
ГЛАВА 4 Оптимизация конструкции биосенсора.....	84
4.1 Конструкция опытно-промышленного сенсора.....	84
4.2 Вольтамперные характеристики опытно-промышленных сенсоров.....	86
4.3 Исследование вольтамперных характеристик сенсора в процессе детекции вируса гриппа птиц .....	89
ЗАКЛЮЧЕНИЕ .....	95

ВЫВОДЫ .....	97
СПИСОК УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ И СОКРАЩЕНИЙ .....	98
ТЕРМИНЫ И ОПРЕДЕЛЕНИЯ .....	100
СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ .....	101
ПРИЛОЖЕНИЕ А. Результаты атомно-силовой микроскопии поверхности кремниевых пластин после этапов очистки и функционализации .....	125
ПРИЛОЖЕНИЕ Б. Вольтамперные характеристики сенсоров в процессе детекции вируса гриппа птиц подтип А(Н9N2).....	129
ПРИЛОЖЕНИЕ В. Патент на полезную модель №215954 «Биосенсор для индикации биологических частиц» .....	131
ПРИЛОЖЕНИЕ Г. Акт внедрения в опытно-промышленное производство нанопроволочного сенсора.....	132

## ВВЕДЕНИЕ

**Актуальность исследования.** Создание методов экспресс-детекции вирусов – актуальная задача медицины, вирусологии, биотехнологии и др. [1,2]. Они необходимы для проведения быстрых вирусологических исследований, с целью постановки диагноза заболевания, определения эффективности и коррекции лечения, обнаружения вирусной контаминации, проведения своевременных санитарно-эпидемиологических мероприятий, а также решают другие прикладные задачи.

В качестве примера методов экспресс-детекции вирусов можно привести иммунохроматографический анализ (ИХА) и петлевую изотермическую амплификацию (loop-mediated isothermal amplification – LAMP). Первый используется для обнаружения вирусных частиц и белков, второй – для выявления генетического материала вируса [3-9]. Эти методы просты в использовании, не требуют дорогостоящего оборудования и могут применяться как в специализированных лабораториях, так и на месте оказания медицинской помощи, при мониторинге большого количества проб и др. Перечисленные характеристики являются основными критериями, предъявляемыми к методам экспресс-детекции. Стоит отметить, что способ регистрации результата ИХА и LAMP при экспресс-анализе визуальный – по изменению окраски тестовой зоны или реакционной смеси. Это, в свою очередь, вносит элемент субъективности в оценку результата.

Перспективным направлением в решении задачи по созданию экспресс-метода детекции вирусов является использование нанопроволочных биосенсоров на основе кремниевого полевого транзистора (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 сигнал. Чувствительность

метода достигает  $\sim 10^3$  вирусных частиц в мл (ВЧ/мл), время анализа – нескольких минут [10,11].

Эффективность детекции вирусов с помощью биосенсора подтверждена многочисленными исследованиями [10-21]. На практике НП-биосенсора может выступать как альтернативы аналитическим системам на основе ИХА для определения вирусного антигена и стать дополнением для детекции продуктов LAMP.

Характеристики НП-биосенсоров зависят от его конструкции, качества технологии изготовления, свойств слоя рецептора и т.д. Совершенствование перечисленных факторов является важным направлением создания эффективного метода экспресс-детекции вирусов.

**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 70-80-е годы прошлого века [22,23]. Независимо от него разработки вела группа японских исследователей во главе с Matsuo T., результаты которых опубликованы в 1974 году [24]. В 1980 году Caras S. и Janata J. создали первый НП-биосенсор для детекции пенициллина путем иммобилизации фермента – пенициллиназы [25,26]. Разработанное устройство позволяло детектировать пенициллин в диапазоне концентраций от 0,1 мМ до 70 мМ в 0,02 М фосфатно-солевом буфере (ФСБ) [25,26].

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 технологии ее модификации [27-29]. Современная технология производства микроэлектроники позволяет уменьшить размеры чувствительного элемента НП-биосенсора до десятков 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 [30,31]. В работе Hu W. P. и

соавторов замена стандартных антител на аптамеры при обнаружении белка интерлейкина 6 (маркера тяжести заболевания COVID-19 у пациентов) позволила достичь минимальной концентрации достоверного обнаружения 2,1 пг/мл. Ширина сенсорного элемента составила 200 нм, длина – 2 мкм [32].

Тем не менее, остаются нерешенные вопросы, связанные с серийным производством НП-биосенсоров, сохранением и улучшением их свойств, подготовкой проб для проведения анализа и др. [33].

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

Для достижения цели поставлены следующие **задачи**:

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.

**Объект исследования.** НП-биосенсор для детекции вирусных частиц.

**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 ( $\text{pH}=5,9\pm 0,1$ ).
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 ( $\text{pH}=5,9\pm 0,1$ ).

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 на полезную модель №215954 от 25 августа 2022 г. (Приложение В).

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» (Приложение Г).

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 обсчета 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  $\text{NH}_2$ -группы силана молекулами 3,3'-дитиобис (сульфосукцинимидилпропионат), так и посредством электростатических сил между  $\text{NH}_2$ -группы силана и  $\text{COOH}$ -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».

**Соответствие паспорту научной специальности.** Диссертация соответствует научной специальности «1.5.6 – Биотехнология»: п. 9 «Медицинские биотехнологии. Создание лекарственных форм, комбинированных препаратов и биологически активных препаратов. Технологии производства вакцин. Средства диагностики вирусных, бактериальных и грибных болезней», п. 22 «Биокаталитические, биосинтетические и биосенсорные (включая нанобиосенсорные) технологии. Создание биоаналитических систем для медицинской диагностики и медицинского анализа. Диагностические средства

(биочипы, биосенсоры), биосовместимых материалов с применением клеточных, геномных и постгеномных технологий; создание банков биологических образцов».

**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 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 22<sup>nd</sup> и 2022 IEEE 23<sup>rd</sup> 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.).

**Публикации.** По материалам диссертационной работы опубликовано 6 научных статей в рецензируемых российских и зарубежных журналах, 3 из которых включены в перечень Высшей аттестационной комиссии, 10 тезисов в трудах научных конференций, патент на полезную модель.

**Связь работы с научными программами, темами.** Диссертационная работа обобщает результаты научных исследований, выполненных в рамках:

Государственного задания ГЗ 11/16 «Разработка биочипа на основе нанопроволочных полевых транзисторов для экспресс определения концентрации различных патогенов в исследуемых пробах» отраслевой научно-

исследовательской программы Роспотребнадзора на 2016-2020 гг. «Проблемно-ориентированные научные исследования в области эпидемиологического надзора за инфекционными и паразитарными болезнями»;

Государственного задания ГЗ-21/21 «Разработка биосенсора для экспресс-индикации социально значимых патогенов (коронавирус, вирус гриппа и др.)» отраслевой научно-исследовательской программы Роспотребнадзора на 2021-2025 гг.;

Договора № 059/20 «Разработка и оптимизация архитектуры сенсоров на основе однослойных углеродных нанотрубок» с лабораторией наноматериалов Сколковского института науки и технологий;

Гранта РФФИ № 18-29-02091 «Разработка методов диэлектрофоретического выделения и адресной доставки аналита в диагностических Lab-on-Chip системах на основе нанопроволочных сенсоров»;

Соглашения о научно-техническом сотрудничестве с ИФП СО РАН им. А.В. Ржанова «Разработка биочипов на основе полевых транзисторов для экспресс определения концентрации различных патогенов в исследуемой пробе»;

Договора №0698/22 «Разработка и изготовление опытных сенсоров на основе технологии кремний на изоляторе (КНИ), шифр «Надсмотр-1» с АО «НЗПП Восток».

**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.

**Благодарности.** Автор выражает благодарность научному руководителю д.т.н. Генералову В.М. за осуществление руководства, активную поддержку в планировании, проведении и интерпретации экспериментов.

Автор благодарит коллег, принимавших участие в экспериментальных и теоретических исследованиях, анализе и обсуждении полученных результатов, подготовке совместных публикаций. Среди них: Наумова О.В., Зайцева Э.Г. (ИФП СО РАН); Мальсагова К.А., Иванов Ю.Д. (ИБМХ); Щербаков Д.Н., Меркульева Ю.А., Рудометова Н.Б., Зыбкина А.В., Колосова И.В., Таранов О.С., Зайцев Б.Н., Буряк Г.А., Сафатов А.С., Мистюрин Ю.Н. (ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора); Глухов В.А. (АО «НЗПП Восток»).

## ГЛАВА 1 Литературный обзор

### 1.1 Методы детекции вирусов

Существуют разнообразные методы детекции вирусов. Одни из них направлены на обнаружение вирусных частиц и белков посредством специфической реакции антитело-антиген или непосредственной визуализации: серологические и микроскопические методы, соответственно. Другие – на выявление генетического материала: молекулярно-генетические методы. Среди последних широко применяются методы амплификации нуклеиновых кислот, такие как полимеразная цепная реакция (ПЦР), ПЦР с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР), ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ) и др. [4,34]. В научной и медицинской практиках также используются методы, косвенно указывающие на воздействие того или иного патогена на организм путем выявления специфических к вирусу антител (серологические методы), наблюдения клинической картины у лабораторных животных (биологические методы) и т.д. [34]. Основные методы детекции и их характеристики представлены в таблице 1, составленной по литературным данным.

Несмотря на большое разнообразие методов детекции вирусов, важным и актуальным направлением в медицине и науке является разработка экспресс-детекции [35-40]. Она необходима для проведения анализа вне лабораторных условий, на месте оказания медицинской помощи, мониторинга большого количества проб, быстрого получения качественного или полуколичественного результата [35]. Разработка ведется как на базе серологических, так и на базе молекулярно-генетических методов.

Таблица 1 – Методы прямой и непрямой детекции вирусов [4,34,41-49]

Методы	Примеры методов	Характеристика метода	Применение	Ссылка
1	2	3	4	5
Методы прямой детекции вирусов				
Молекулярно-генетические	Амплификация нуклеиновых кислот (ПЦР, ОТ-ПЦР, ПЦР-РВ и др.)	<ul style="list-style-type: none"> <li>– детекция генетического материала вируса,</li> <li>– высокая чувствительность <math>\sim 10^2</math>-<math>10^3</math> ВЧ/мл и менее,</li> <li>– селективность &gt;98%,</li> <li>– время анализа от 1 ч,</li> <li>– генетическая изменчивость вирусов может привести к ложным результатам,</li> <li>– дорогое оборудование (исключение – изотермическая амплификация)</li> </ul>	вирус гепатита В, вирус гепатита С; ВИЧ; вирус Эпштейна-Барр (в современной классификации – человеческий гаммагерпесвирус 4)	[34] [42] [43] [46]
	Гибридизация нуклеиновых кислот, секвенирование генома	<ul style="list-style-type: none"> <li>– детекция генетического материала вируса,</li> <li>– высокая чувствительность и селективность,</li> <li>– изучение генома вируса (секвенирование генома),</li> <li>– генетическая изменчивость вирусов может привести к ложным результатам (гибридизация нуклеиновых кислот),</li> <li>– дорогое оборудование</li> </ul>		
Серологические	ИФА, МФА, ИХА, ИБ	<ul style="list-style-type: none"> <li>– выявление вириона или вирусных антигенов,</li> <li>– чувствительность <math>\sim 10^5</math>-<math>10^6</math> ВЧ/мл,</li> <li>– селективность &gt;95%,</li> <li>– время анализа от 10 минут до 24 ч,</li> <li>– перекрестная реакция между близкородственными вирусами</li> </ul>	вирус гриппа; папилломавирус человека; ВИЧ; SARS-CoV-2	[4] [34] [41] [42] [45-48]
Микроскопические	ЭМ, КМ	<ul style="list-style-type: none"> <li>– выявление вириона,</li> <li>– чувствительность <math>\sim 10^6</math> ВЧ/мл</li> <li>– время анализа от 1 ч,</li> <li>– визуализация вирусных частиц,</li> <li>– обнаружение новых вирусов,</li> <li>– дорогое оборудование</li> </ul>	вирус кори; вирус бешенства; вирус простого герпеса; желудочно-кишечные инфекции	[34] [42]

Продолжение таблицы 1

1	2	3	4	5
Методы непрямо́й детекции вирусов				
Биологические и микробиологические	Изолирование и культивирование вируса на лабораторных животных, куриных эмбрионах, культурах клеток	<ul style="list-style-type: none"> <li>– наработка вируса,</li> <li>– исследование патогенеза вируса,</li> <li>– возможность выявления смеси вирусов и вирусов, которые ранее не обнаружены,</li> <li>– время анализа от 1 до 21 дня,</li> <li>– подбор условий культивирования,</li> <li>– большие материальные затраты,</li> <li>– необходимость применения дальнейших методов диагностики,</li> <li>– соблюдение биологической безопасности</li> </ul>	аденовирус; вирус простого герпеса второго типа; вирус гриппа; вирус гриппа птиц; вирус бешенства	[34] [42-49]
Серологические	ИФА, ИХА, ИБ	<ul style="list-style-type: none"> <li>– выявление антител, специфичных к вирусу,</li> <li>– время анализа от 10 минут до 24 ч,</li> <li>– перекрестная реакция между близкородственными вирусами</li> </ul>	вирус кори; вирус гепатита С; цитомегаловирус; ВИЧ	[34] [42-48]

Примечание: Методы прямой детекции вирусов направлены на выявление генетического материала вируса, его вириона или вирусного антигена. Методы непрямо́й детекции вирусов направлены на выявлении ответа организма на присутствие вируса, т.е. антител, клинической картины и т.д., являются косвенным доказательством перенесенного заболевания, в случаях персистентных инфекций считаются доказательными.

ПЦР – полимеразная цепная реакция; ОТ-ПЦР – полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией; ПЦР-РВ – полимеразная цепная реакция в режиме реального времени; ИФА – иммуноферментный анализ; МФА – иммунофлуоресцентный анализ; ИХА – иммунохроматографический анализ; ИБ – иммуноблоттинг; ЭМ – электронная микроскопия; КМ – криоэлектронная микроскопия; ВЧ/мл – количество вирусных частиц в мл.

Одним из примеров экспресс-методов обнаружения вирусов и их белков служит иммунохроматографический анализ с латеральным потоком (ИХА), который позволяет детектировать вирусные антигены [3,5]. Чувствительность аналитических систем на основе ИХА достигает  $\sim 10^5$ - $10^6$  ВЧ/мл, а время анализа – от 5 минут [50-52].

ИХА проводится на тест-полоске – мембране, например нитроцеллюлозной, с зонами для нанесения образца, тестовой и контрольной зонами (рисунок 1а). В зоне нанесения образца и тестовой зоне находятся меченные антитела и антитела захвата соответственно, которые специфически связываются с целевым антигеном. На контрольной зоне находятся иммобилизованные рецепторы (антитела, антиген, белки и т.д.), которые специфически связываются с мечеными антителами [1,52-54].

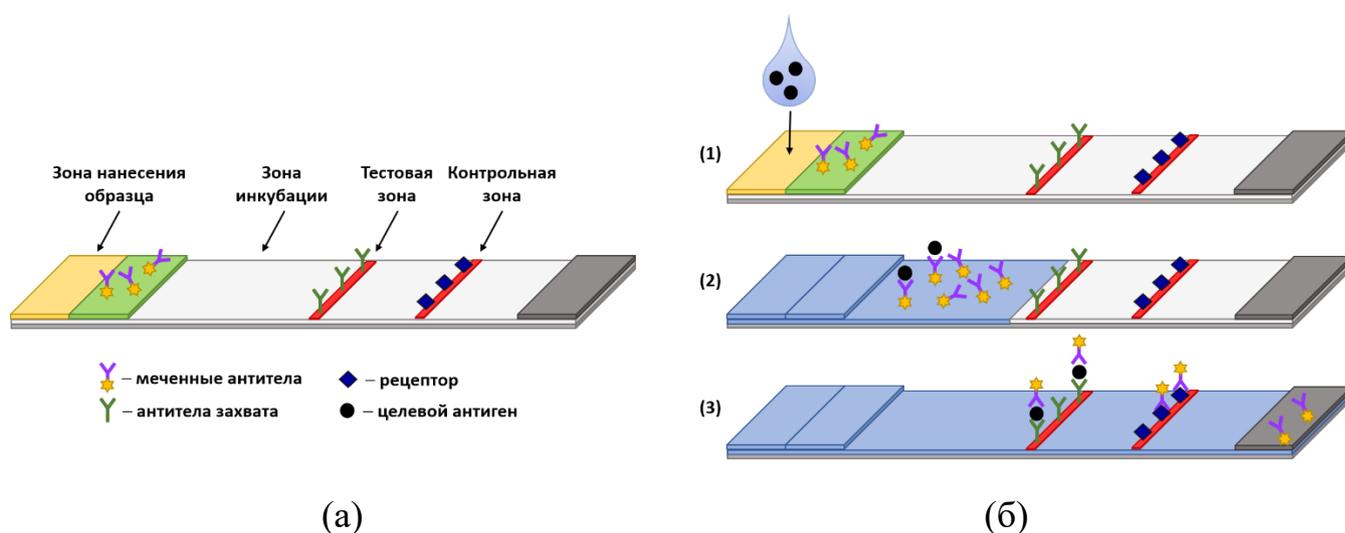


Рисунок 1 – (а) Схематичное изображение тест-полоски для проведения иммунохимического анализа с латеральным потоком; (б) Принцип действия иммунохимического анализа с латеральным потоком: (1) – нанесение образца; (2) – взаимодействие целевого антигена с мечеными антителами, ток жидкости; (3) – комплекс «меченное антитело-антиген» связывается с антителами захвата в тестовой зоне, меченные антитела без антигенов связываются с рецепторами в контрольной зоне [55,56]

Принцип действия ИХА аналогичен принципу, используемому в методе тонкослойной хроматографии (рисунок 1б). Нанесение анализируемого образца в обозначенное место приводит к специфическому связыванию целевого антигена с мечеными антителами и образованию комплекса «меченное антитело-антиген». Далее комплекс и не связавшиеся меченные антитела вместе с током жидкости

(латеральным потоком) движутся по мембране. В тестовой зоне комплекс взаимодействует с антителами захвата, что приводит к его накоплению в одном месте и, соответственно, увеличению окраски. Так, если концентрация целевого вируса выше порогового уровня чувствительности метода, то формируется ярко окрашенная полоса в тестовой зоне. Если концентрация аналита ниже порогового уровня, тестовая зона не окрашивается. Не связавшиеся меченные антитела движутся дальше до контрольной зоны, где специфически связываются с находящимися там рецепторами и окрашивают зону [53,54].

По данным Федеральной службы по надзору в сфере здравоохранения в России зарегистрированы тест-системы на основе ИХА для выявления антигена гепатита В (HBsAg), коронавируса (SARS-CoV-2), вируса иммунодефицита человека ВИЧ-1 и др. [50].

Проводятся работы с целью создания мультикомплексных аналитических систем, способных различать не только маркеры одной инфекции (вирусный антиген, специфические антитела), но и представителей разных семейств вирусов, сочетания вирусов и бактерий [57,58]. Например, в работе [1] представлена система на основе ИХА с латеральным потоком для специфической детекции и различия вирусных антигенов одного семейства для *Flavivirus*, *Filoviridae* и *Coronaviridae* при использовании моноклональных или перекрестно-реакционных антител, дифференцированно связывающихся с белком вируса, и конъюгированных на наночастицы красного и синего золота<sup>1</sup>. Мультикомплексная аналитическая система состояла из нескольких ИХА тест-полосок. Каждая тест-полоска включала в себя: контрольные зоны с иммобилизованными рецепторами и без каких-либо рецепторов, тестовые зоны с иммобилизованными специфичными антителами. Цвет тестовых зон варьировался от красного до синего. Как отмечают авторы, неподготовленный пользователь не справился с интерпретацией результата без использования дополнительного оборудования. Показано, что в зависимости от

---

<sup>1</sup> Диаметр наночастиц красного золота в работе составлял  $38,0 \pm 4$  нм, диаметр наночастиц синего золота  $13 \pm 3$  нм, длина  $26 \pm 5$  нм.

используемых антител предел чувствительности разработанного метода варьировался от 4 до 400 нг/мл.

Некоторые авторы к недостаткам экспресс-метода ИХА относят невысокую чувствительность и визуальный способ регистрации сигнала [2,5,59]. Стоит отметить, что визуальная регистрация сигнала по окраске тестовой зоны носит субъективный характер и может увеличивать вероятность интерпретации результата как ложноположительного или ложноотрицательного [51]. Проведенный в работе [39] анализ зарегистрированных ИХА экспресс-тестов детекции антигена SARS-CoV-2 показал, что их чувствительность составила  $\sim 10^5$  ВЧ/мл, в то время как среднее значение вирусной нагрузки у больных указано  $\sim 10^3$  ВЧ/мл. Таким образом, низкая чувствительность метода приводит к ложноотрицательным результатам.

Разрабатываются аналитические системы для экспресс-детекции вируса на базе молекулярно-генетических методов. Часто с этой целью используются методы изотермической амплификации нуклеиновых кислот, протекающие при постоянной температуре, что дает возможность исключить использование дорогостоящего оборудования и позволяет создать мобильное аналитическое устройство [40]. Примерами методов изотермической амплификации служат геликазозависимая амплификация (helicase-dependent amplification, HDA), усиление по скользящему кругу (rolling circle amplification, RCA), рекомбиназная полимеразная амплификация (recombinase Polymerase Amplification, RPA), амплификация на основе последовательности нуклеиновых кислот (nucleic acid sequence-based amplification, NASBA) и др. [40-43].

Одним из наиболее развивающихся методов изотермической амплификации считается петлевая изотермическая амплификация (loop-mediated isothermal amplification – LAMP) [40,43]. LAMP характеризуется высокой специфичностью ( $\leq 89\%$ ), чувствительностью ( $\sim 10^3$  ВЧ/мл), небольшим временем анализа (от 10 до 90 мин), протеканием в изотермических условиях ( $T=35-65$  °C) и низкой чувствительностью к ингибиторам реакции [9,40,60-65].

Амплификация осуществляется с использованием ДНК-полимеразы с цепь-вытесняющей активностью<sup>2</sup> (Bst-полимераза, Bst 2.0, Bst 2.0 WarmStart и др.) и набора минимум из двух пар праймеров: внешних (прямой «forward» – F3 и обратный «backward» – B3) и внутренних («forward inner primer» – FIP и «backward inner primer» – VIP) (рисунок 2) [7,63]. Реакция начинается с отжига одного из внутренних праймеров FIP (VIP) на 5' (3')-конце ДНК-матрицы соответственно. Формируется гантелеобразная структура («стволовая шпилька») – основа для следующей стадии амплификации. Далее синтез идет как с 3'-конца «стволовой шпильки», так и с гибридизовавшихся с ней внешних праймеров F3 (B3). Подробное описание принципа работы LAMP представлено в [7,66,67].

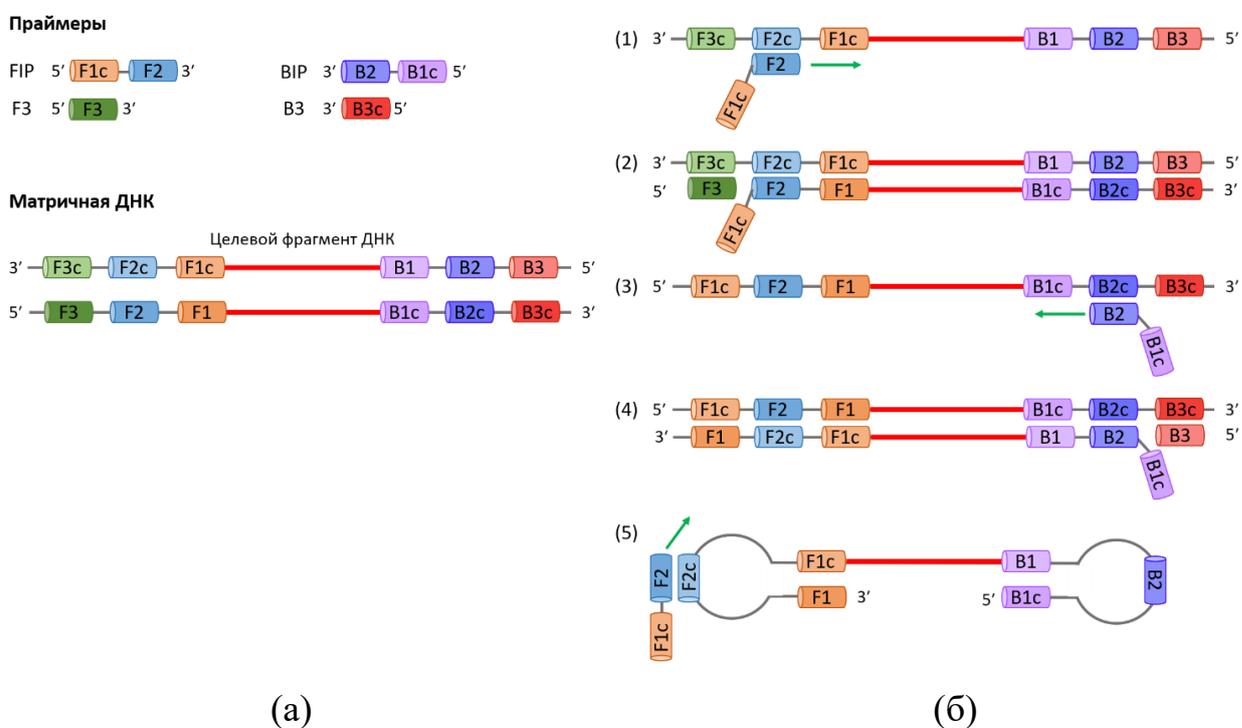


Рисунок 2 – (а) Схематичное изображение строения праймеров и матричной ДНК для проведения LAMP: F3 – внешний прямой праймер; B3 – внешний обратный праймер; FIP – внутренний прямой праймер; VIP – внутренний обратный праймер; F1, F2, F3, F1c, F2c, F3c, B1, B2, B3, B1c, B2c, B3c – специфические участки ДНК, фланкирующие целевой фрагмент; (б) Принцип работы LAMP: (1), (3) – отжиг внутреннего праймера (FIP или VIP); (2), (4) – синтез комплементарной цепи с помощью ДНК-полимеразы с последующим присоединением внешнего праймера (F3 или B3); (5) – формирование структуры «стволовая шпилька» [7,66,68]

<sup>2</sup> ДНК-полимераза с цепь-вытесняющей активностью – термостабильная полимеразы, способная синтезировать новую цепь ДНК, вытесняя при этом уже существующую цепь в 5'-3' направлении [46].

Продуктами LAMP являются сама «стволовая шпилька» и конкатемеры амплифицируемой последовательности [69,70]. Повышение чувствительности проводят путем введения еще одной пары «петлевых» праймеров («loop forward» – LF и «loop backward» – LB). В случаях выявления РНК-вирусов LAMP можно совмещать с обратной транскрипцией, добавляя ревертазу в реакционную смесь [7].

Регистрацию продуктов LAMP проводят гель-электрофорезом, фотометрией, визуальной оценкой изменения окраски/мутности реакционной смеси, гибридизацией нуклеиновых кислот с помощью устройства латерального потока [63,70]. Для экспресс-детекции предпочтительнее последние два способа [6,9].

Примером использования LAMP служит детекция вируса кори, представленная в работе [9]. В качестве анализируемых проб выступали мазки, взятые у пациентов с подозрением на корь. Наличие в них вируса подтверждали ПЦР-РВ. LAMP проводили с использованием 3 пар праймеров. Праймер FIP содержал биотиновую метку на 5'-конце. Также использовали зонд<sup>3</sup>, на 5'-конце которого находилась метка – флюоресцеин-5-изоцианат. На наночастицы золота иммобилизовали зонды и антитела к биотину (anti-biotin antibody). Синтезированные ампликоны гибридизовались с зондами и с током жидкости достигали тестовой и контрольной зон. В тестовой зоне находились иммобилизованные антитела, связывающиеся с флюоресцеин-5-изоцианатом (anti-FITC antibody), в контрольной зоне – биотин. Тестовая зона детектировала биотинилированные ампликоны, гибридизованные с комплексом «зонд-наночастицы золота-антитела к биотину». Установленный предел обнаружения разработанной системы составил ~9 копий/мкл, он может варьироваться в зависимости от температуры проведения амплификации. Время анализа – 40 минут [9].

---

<sup>3</sup> Зонд – последовательность нуклеиновых кислот, выступающая в качестве рецептора для детектирования целевого фрагмента ДНК.

В общем сложность использования LAMP заключается в подборе праймеров и условий реакции. При создании метода экспресс-детекции вирусов на основе LAMP к недостаткам можно отнести визуальный способ регистрации сигнала.

Перспективным направлением развития методов экспресс-детекции вирусов являются биосенсорные технологии [71-74]. Высокая чувствительность, работа в режиме реального времени, безметочная регистрация сигнала посредством специального устройства, возможность миниатюризации позволяют биосенсорам выступать в качестве самостоятельного экспресс-метода детекции вирусов или дополнения к LAMP [71,72,75].

Например, ведутся работы по созданию биосенсора на основе портативного поверхностного плазмонного резонанса (ППР) для экспресс-детекции энтеровируса человека 71 (EV71) [76]. Анализ основан на использовании золотых частиц с модифицированной рецепторами поверхностью. Связывание целевого антигена с рецепторами на поверхности золотых частиц смещает показатель преломления среды, что регистрирует детектор. Портативный биосенсор на основе ППР позволяет проводить не только качественный, но и количественный анализ в течение 6 минут. По результатам эксперимента чувствительность биосенсора составила 67 ВЧ/мл. Обсуждается применение биосенсора в лабораториях и на месте оказания медицинской помощи [76].

Большой интерес представляет совмещение биосенсоров и LAMP, поскольку в данном случае регистрацию сигнала можно проводить с помощью мобильных и простых устройств. Подобная система рассмотрена в работах [77]. В эксперименте использовали биосенсор на основе комбинации «мятого» графена<sup>4</sup> и полевого транзистора для детекции SARS-CoV-2. На первом этапе эксперимента проводили LAMP со специфичными для N-гена праймерами (T=65 °C). На втором этапе образцы вносили в ячейку биосенсора. Адсорбция олигонуклеотидов, например праймера, приводила к  $\pi$ - $\pi$  взаимодействию между ароматическим кольцом графена и открытыми основаниями олигонуклеотидов, и, тем самым, к смещению сигнала биосенсора. Поэтому положительные образцы, в которых наличие вируса

---

<sup>4</sup> «Мягкий» графен – 3D-форма графена [77-79].

подтверждено, вызывали небольшое смещение сигнала ( $<30$  мВ), в то время как отрицательные образцы сильно сдвигали сигнал относительно начального отсчета (в среднем на 77,64 мВ). Адсорбцию праймеров подтверждали атомно-силовой микроскопией (АСМ). Чувствительность прибора составила от 10 до  $10^4$  копий/мл [77]. В качестве контроля проводили ПЦР-РВ.

## 1.2 Биосенсоры

Биосенсор – высокочувствительное аналитическое устройство, которое использует специфические биохимические реакции с целью обнаружения биологических или химических соединений [80]. Он включает в себя элемент биораспознавания и преобразователь сигнала (трансдьюсер) (рисунок 3). Элементом биораспознавания служат рецепторы: антитела, нуклеиновые кислоты, белки, ферменты, аптамеры и т.д. В качестве преобразователя сигнала выступают нанопроволока, графен, углеродные нанотрубки, золотые подложки и т.д.

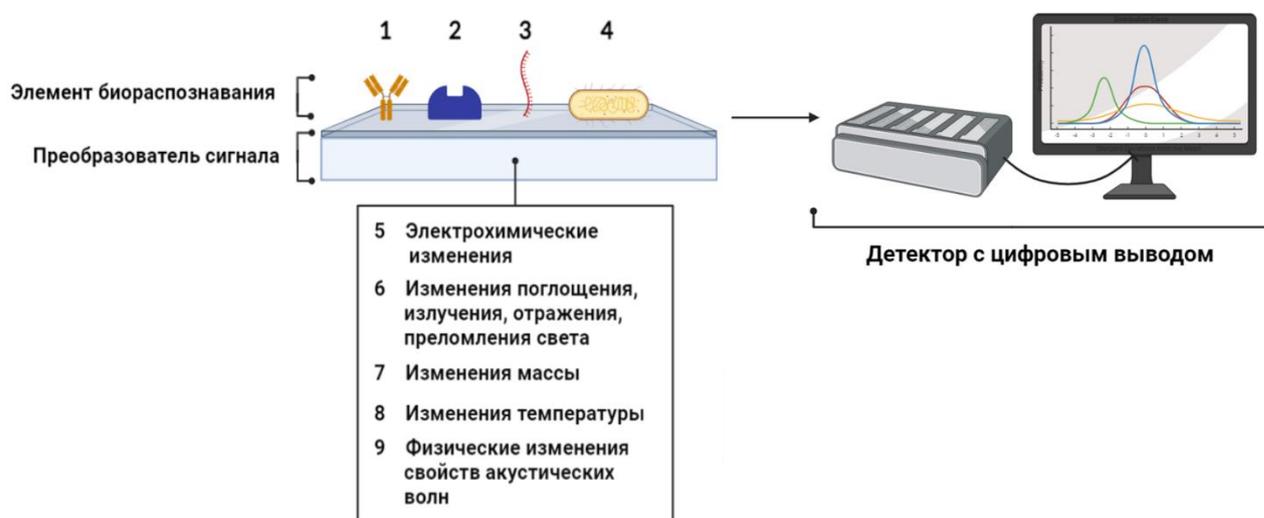


Рисунок 3 – Аналитическая система на основе биосенсора: 1 – антитело; 2 – фермент; 3 – аптамер или односпиральная ДНК; 4 – бактериальная клетка; 5, 6, 7, 8, 9 – физико-химические изменения, протекающие в процессе обнаружения целевых молекул [78,81]

Принцип действия биосенсора основан на специфическом взаимодействии между рецепторами и целевыми молекулами на поверхности трансдьюсера, которое вызывает его физико-химические изменения (проводимость, потенциал,

электрическую емкость и др.). Далее детектор регистрирует протекающие изменения и преобразует их в информационный сигнал [33,82-84].

Классификацию биосенсоров проводят по элементу биораспознавания или по типу преобразователя сигнала. В зависимости от используемого рецептора устройства разделяются на ферментативные биосенсоры, иммуносенсоры, аптасенсоры, ДНК-сенсоры, цельноклеточные биосенсоры. По типу преобразователя сигнала выделяют электрохимические, электрические, оптические, гравиметрические, тепловые и акустические (пьезокварцевые) биосенсоры [78,81,85].

Перспективными считаются электрические биосенсоры в сочетании с наноструктурами, выступающими в качестве сенсорного элемента трансдьюсера [78,85-88]. Наноструктурами могут быть кантовые точки, нанополоски, нанотрубки, нанопроволоки, нанослои и т.д. [78,88]. Эффективность использования подобного рода биосенсоров заключается в детектировании целевых молекул в режиме реального времени без использования меток [89]. Кроме того, аналитические системы на их основе портативные и не требуют больших материальных затрат на изготовление и проведение анализа [85,90].

Выделяют пять типов электрических биосенсоров: амперометрические или вольтамперометрические, потенциометрические, кондуктометрические, импедансные и биосенсоры на основе полевых транзисторов (таблица 2). В общих чертах работа электрических биосенсоров заключается в модуляции тока, напряжения или их возмущения при захвате рецепторами целевой молекулы [77].

Таблица 2 – Электрические биосенсоры [13,14-16,18-21]

Тип электрического биосенсора	Принцип работы	Пример использования	Ссылка
1	2	3	4
Амперометрические/ вольтамперометрические	Измерение генерации или возмущения выходного окислительно-восстановительного тока, его плотности между фазами	Поверхностный антиген вируса гепатита В (0,25 нг/л)*	[16]
Потенциометрические	Измерение разности потенциалов (напряжения) между исследуемыми фазами	Белок NS1 (22 нг/л)* Миоглобин (21240 нг/л)*	[18] [16]

Продолжение таблицы 2

1	2	3	4
Кондуктометрические	Измерение активной, реактивной или комплексной проводимости (сопротивления, электропроводности) измерительной камеры, замкнутого объема, заполненного растворами	Простатспецифический антиген (0,25 нг/л)*	[16]
Импедансные	Измерение проводимости и электрической емкости среды, вызываемые метаболизмом микроорганизмов	ДНК вируса гепатита В ( $2,5 \times 10^{-6}$ М)* Интерферон $\gamma$ ( $0,021 \times 10^6$ нг/л)*	[21] [16]
Биосенсоры на основе полевых транзисторов	Измерение проводимости в результате адсорбции частиц	Вирус гриппа птиц ( $10^{-17}$ М)* Остеопонтин (~0,00105 нг/л)*	[13] [16]

Примечание: \* – предел чувствительности устройства в приведенном примере.

Наиболее распространенным для детекции биологических молекул является нанопроволочный биосенсор на основе полевого транзистора (НП-биосенсор) [91]. НП-биосенсор обладает высокой чувствительностью, скоростью анализа, низким энергопотреблением, возможностью создания мультикомплексной аналитической системы [92-95]. Он может применяться для обнаружения вирусных частиц, белков, нуклеиновых кислот [95,96]. Помимо детекции вирусов НП-биосенсоры применяются для обнаружения белковых маркеров заболеваний (тропонин I, онкомаркеров и т.д.), для анализа крови и детекции гормонов (кортизол), для мониторинга окружающей среды, качества пищевых продуктов и др. [86,97-102].

### 1.3 Нанопроволочный биосенсор

#### 1.3.1 Структура нанопроволочного биосенсора

НП-биосенсор изготавливается по технологии кремний на изоляторе (КНИ-технология). В настоящее время КНИ-технология достаточно хорошо освоена промышленностью. Преимущества данной технологии заключаются в стандартизированной процедуре изготовления сенсоров, в возможности создания устройства с высокими электрофизическими характеристиками. С помощью КНИ-

технологии возможно достижение минимальной энергоемкости сенсора и минимизации его размера [103-105]. Все перечисленное позволяет повысить уровень интеграции НП-биосенсоров на одном кристалле микросхемы и создать широкомасштабное производство [106,107]. Примеры внешнего вида микросхемы и топологии кристалла представлены на рисунке 4.

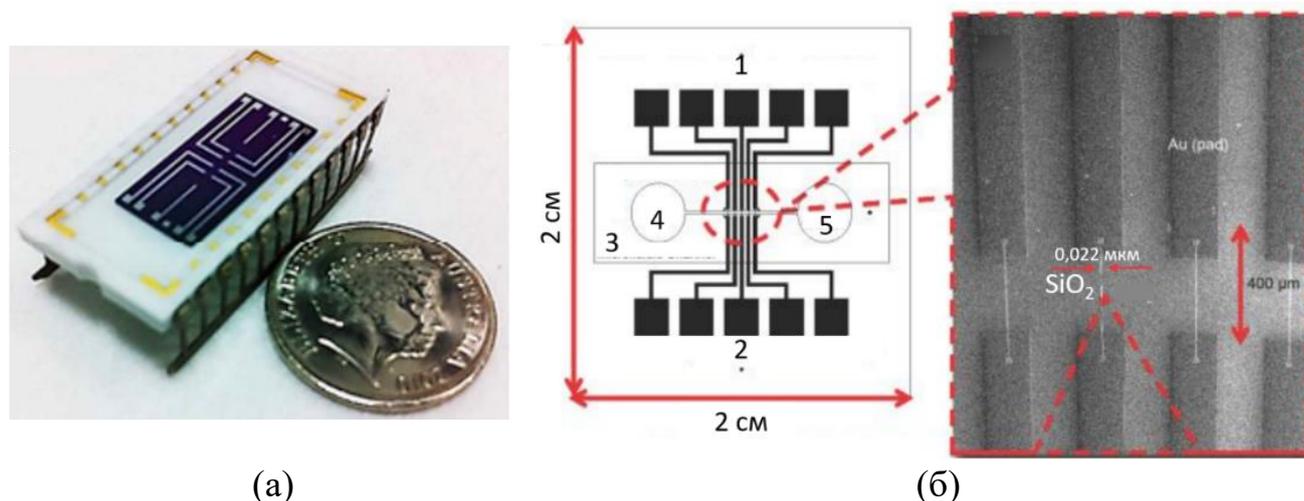


Рисунок 4 – (а) Пример внешнего вида микросхемы с интегрированным КНИ-кристаллом [108]; (б) Пример топологии кристалла микросхемы (2×2 см) с массивом из 5 НП-биосенсоров и микрофлюидной ячейкой: 1 – металлические контактные площадки, электроды истока; 2 – металлические контактные площадки, электроды стока; 3 – микрофлюидная ячейка; 4 – место внесения образца; 5 – место вывода образца; SiO<sub>2</sub> – нанопроволока, длина которой 400 мкм, ширина 0,022 мкм [17]

Структура НП-биосенсора включает в себя управляющий электрод, электрод затвора, электроды сток и исток, кремниевую нанопроволоку (НП) и электрод заземления [109]. Структура и электрическая принципиальная схема подключения НП-биосенсора представлена на рисунке 5.

Нанопроволока (NW, рисунок 5) – сенсорный элемент НП-биосенсора. Представляет собой полосу кремния и расположена между двумя электродами – сток и исток. Размер нанопроволоки (НП) варьируется от нескольких нм до мкм и оказывает влияние на чувствительность устройства [110]. Исследования показывают, что с уменьшением размера НП увеличивается чувствительность устройства [95,111]. Так, в работе [17] использовали НП-биосенсоры с шириной нанопроволоки 20 нм и 1 мкм и одинаковой длиной 400 мкм. Поверхность обоих устройств модифицировали ДНК-зондами, далее вносили 10 мкМ ДНК вируса

Денге. Относительное изменение проводимости НП шириной 1 мкм составило 0,07 нА, проводимости НП с шириной 20 нм – 0,86 нА. Адсорбция ДНК, обладающей электрическим полем, на поверхность НП с шириной 1 мкм вызывает изменение проводимости в области, расположенной близко к поверхности. В то время как внутренние участки НП остаются незадействованными. Уменьшение ширины НП до 20 нм приводит к тому, что внешнее электрическое поле оказывает влияние на все ее поперечное сечение [17]. Размеры НП выбираются в зависимости от размера определяемой частицы/молекулы.

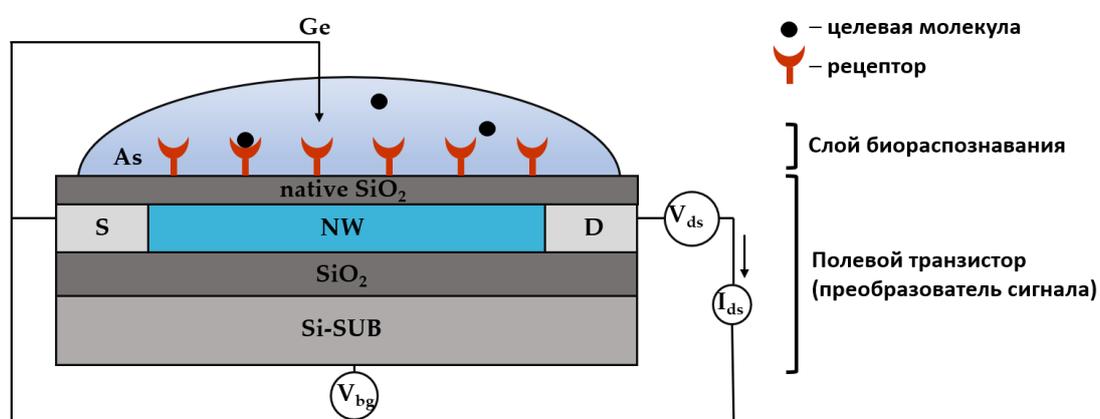


Рисунок 5 – Структура и электрическая принципиальная схема подключения НП-биосенсора: native SiO<sub>2</sub> – нативный слой SiO<sub>2</sub>; NW – кремниевая нанопроволока; SiO<sub>2</sub> – скрытый диэлектрик; Si-Sub – управляющий электрод или тыловой затвор; S – исток; D – сток; Ge – электрод заземления; V<sub>vd</sub> – источник постоянного напряжения в цепи исток-сток; I<sub>ds</sub> – регистрирующее устройство (амперметр); V<sub>bg</sub> – регулируемый источник напряжения на подзатворе; AS – анализируемая проба

В зависимости от примесей легирования областей НП-биосенсора различают два типа устройств: с *n*-типом проводимости (в случае легирования химическими элементами V группы) и *p*-типом проводимости (в случае легирования элементами III группы) [12]. В устройствах с *n*-типом проводимости модуляция тока вызвана движением электронов, в то время как с *p*-типом – «дырками»<sup>5</sup>.

Электроды истока и стока (S и D, рисунок 5) – сильнолегированные области кремния, из которых носители заряда уходят в НП и выходят из нее соответственно [112,113].

<sup>5</sup> Дырка — квазичастица, носитель положительного заряда, равного элементарному заряду, в полупроводниках.

В качестве управляющего электрода или тылового затвора используется кремниевая подложка (Si-Sub, рисунок 5). Подаваемое на тыловой затвор напряжение  $V_{bg}$  оказывает влияние на канал проводимости вблизи границы раздела скрытый диэлектрик ( $SiO_2$ )-нанопроволока [111,114].

Электродом затвора служит жидкая анализируемая проба (AS, рисунок 5) [115,116]. Частица из жидкой пробы, адсорбируемая на поверхность НП, оказывает влияние на проводимость канала [114].

Электрод заземления – необходимый элемент НП-биосенсора (Ge, рисунок 5). Он вводится непосредственно в анализируемую пробу по принципу «сверху» для исключения ее случайного электрического потенциала, создаваемого ионами и заряженными молекулами [10,13,28,117]. Данный способ применения сопровождается рядом проблем. Поскольку электрод изготавливается из платины и имеет высокую прочность<sup>6</sup>, при введении «сверху» он может приводить к повреждению элементов биосенсора [118]. Кроме того, подобное использование не обеспечивает надежного контакта электрода с анализируемой пробой при малых ее объемах.

Технологии производства НП-биосенсоров уделяют большое внимание, поскольку она определяет их качество [31,119].

### **1.3.2 Принцип действия и характеристики нанопроволочного биосенсора**

Принцип действия НП-биосенсора основан на регистрации модуляции тока, протекающего в цепи исток-сток в процессе адсорбции биологических молекул на поверхность НП [12].

В растворе молекулы находятся в сольватированном состоянии [120]. Например, отрицательно заряженная молекула стрептавидина или ДНК окружена положительно заряженными ионами или поляризованными молекулами растворителя [121]. При попадании на раздел фаз «нанопроволока-исследуемая жидкая проба» сольватная оболочка в месте соприкосновения трансформируется и

---

<sup>6</sup> Прочность – способность выдерживать приложенную нагрузку без разрушения или пластической деформации.

молекулы «открывают» собственные электрические заряды. Появление зарядов и связанных с ними электрических полей на разделе фаз вызывают изменение величины тока  $I_{ds}$ , протекающего в цепи исток-сток, и смещение вольтамперных характеристик  $I_{ds}(V_{bg})$  [114,122]. Сигнал биосенсора ( $R$ ) можно представить формулой:

$$R = \left| \frac{\Delta I_{ds}}{I_{ds}^0} \right| = \left| \frac{I_{ds} - I_{ds}^0}{I_{ds}^0} \right| \quad (1)$$

где  $I_{ds}$  – величина тока в цепи исток-сток НП-биосенсора после адсорбции частицы;  $I_{ds}^0$  – исходная величина тока в цепи исток-сток НП-биосенсора [30,114].

С целью селективного детектирования целевой молекулы поверхность НП-биосенсора модифицируют рецепторами. Протекающая специфическая реакция между рецептором и целевой молекулой приводит к изменению величины тока в цепи исток-сток. Доказательством этого служит работа [12]. В эксперименте поверхность НП-биосенсора модифицировали специфическими антителами против вируса гриппа А. Вирусные частицы визуализировали с помощью флуоресцентной метки, что позволяло контролировать ее местоположение и сопоставлять с сигналом биосенсора. В результате показано, что диффузия вирусной частицы вблизи поверхности НП не приводила к изменению  $I_{ds}$ . Только непосредственное взаимодействие вируса и модифицированной рецепторами поверхности вызывало уменьшение величины тока [12].

В этой же работе авторы определяли селективность НП-биосенсора путем модификации поверхности устройства антителами против вируса гриппа А (НП № 1) и антителами против аденовируса (НП № 2). Далее вносили пробы, содержащие вирус гриппа А, аденовирус или смесь обоих вирусов. Внесение пробы, содержащей аденовирус, на поверхность НП-биосенсора приводило к увеличению  $I_{ds}$  НП № 2 на протяжении  $16 \pm 6$  с и к короткому сигналу у НП № 1 на  $\sim 0,4 \pm 0,1$  с. Добавление вируса гриппа А приводило к уменьшению проводимости НП № 1 и к кратковременным изменениям проводимости НП № 2. Внесение смеси вирусов приводило к изменениям проводимости соответствующих НП. Авторы работы утверждают, что изменение проводимости на протяжении  $\sim 0,4$  с соответствует

диффузии вируса или его кратковременному неспецифическому взаимодействию с модифицированной поверхностью [12].

НП-биосенсор так же позволяет детектировать нуклеиновые кислоты посредством гибридизации целевого фрагмента с зондами. В работе [17] с помощью НП-биосенсора обнаруживали ДНК вируса Денге. Рецепторами выступали: 1 – зонд, полностью комплементарный целевому фрагменту ДНК, 2 – зонд, отличающийся по одному основанию, 3 – полностью не комплементарный зонд. В результате реакция, протекающая между зондом 1 и ДНК вируса, приводила к увеличению проводимости биосенсора на 0,52 нА. Реакция между зондом 2 и целевой молекулой изменяла проводимость на 0,13 нА, что в 4 раза ниже целевого сигнала. Изменение проводимости не наблюдалось у НП-биосенсора, рецептором которого служил не комплементарный зонд. Чувствительность прибора составила  $\sim 2 \times 10^{-15}$  М [17]. Представленный эксперимент показывает высокую чувствительность НП-биосенсора при детекции нуклеиновых кислот.

Отличительной характеристикой НП-биосенсоров от других методов экспресс-детекции вируса является его высокая чувствительность. Устройство позволяет обнаруживать целевые молекулы в концентрации  $10^{-17}$  М [10,11].

На чувствительность устройства влияют такие факторы, как ионная сила раствора, концентрация рецепторов, количество и расположение НП-биосенсоров на поверхности кристалла микросхемы.

#### *Влияние ионной силы раствора*

Как описано выше, в растворе молекулы находятся в сольватированном состоянии, то есть окружены противоионами. В результате возникает электростатическое экранирование (эффект экранирования) [27,31,119,121,123]. Эффект экранирования приводит к тому, что электрический потенциал, возникающий вследствие наличия зарядов у биологических молекул, с расстоянием спадает. Данное расстояние называется длиной Дебая ( $\lambda_D$ ):

$$\lambda_D = \left( \sum_j \frac{q_j^2 n_j}{\varepsilon_0 \varepsilon_r k T_j} \right)^{-1/2} \quad (2)$$

где:  $q$  – электрический заряд;  $n$  – концентрация частиц;  $T_j$  – температура частиц типа  $j$ ;  $k$  – постоянная Больцмана;  $\varepsilon_0$  – диэлектрическая проницаемость вакуума;  $\varepsilon_r$  – диэлектрическая проницаемость среды [124].

Эффект экранирования зависит от ионной силы раствора, влияние которой показано в работе [121]. В эксперименте поверхность НП-биосенсора с  $p$ -типом проводимости модифицировали биотином. После стабилизации значения величины тока в цепи исток-сток ( $I_{ds}$ ) в буфере с низкой ионной силой раствора – 0,01 М ФСБ ( $\lambda_D \sim 7,3$  нм) добавляли 10 нМ раствора стрептавидина в том же буфере. Специфическое взаимодействие биотин-стрептавидин приводило к уменьшению  $I_{ds}$ . Авторы утверждают, что в данных условиях большая часть стрептавидина не экранировалась на поверхности биосенсора. В то время как 10-кратное увеличение концентрации соли (0,1 М ФСБ,  $\lambda_D \sim 2,3$  нм) частично экранировало заряды белка, а 100-кратное увеличение (1 М ФСБ,  $\lambda_D \sim 0,7$  нм) полностью экранировало заряды стрептавидина. Это подтверждалось последовательным уменьшением значения  $I_{ds}$ . В качестве контроля проводили аналогичные замены буферов, не содержащих молекул стрептавидина. Контроль показал отсутствие влияния буфера на значения сигнала НП-биосенсора. Из эксперимента следует, что увеличение ионной силы раствора приводит к уменьшению  $\lambda_D$  и уменьшению чувствительность устройства [121].

Эффект экранирования оказывает влияние как на молекулы, находящиеся в растворе, так и на рецепторы, иммобилизованные на поверхности НП-биосенсора. Установлено, что в физиологических растворах  $\lambda_D \sim 0,7$  нм. Это намного меньше, чем у биологических молекул – антигена и полноразмерных антител, для которых  $\lambda_D$  составляет примерно 12 нм. Суммарный заряд в зоне специфического связывания антитело-антиген экранирован и слабо оказывает влияние на проводимость НП-биосенсора [31].

Из формулы (2) следует, что уменьшить влияние эффекта экранирования на чувствительность можно путем: уменьшения ионной силы, то есть количества заряженных частиц ( $q$ ,  $n$ ), за счет разбавления, опреснения пробы, депротонирования или увеличения рН раствора; использования растворителя с высоким значением  $\epsilon_r$ ; использования фрагментированных антител, нано-антител или аптамеров, что позволяет проводить специфическую реакцию ближе к поверхности НП-биосенсора [31]. Например, в последнее время все чаще в качестве рецепторов используются аптамеры – короткие синтетические одноцепочечные дезокси- или рибоолигонуклеотиды с уникальной пространственной структурой. Они способны распознавать и специфически связываться с широким спектром мишеней, включая вирусы, аминокислоты, белки, ферменты, пептиды, ионы металлов, небольшие химические вещества и даже клетки [10,30,125]. Использование аптамеров в качестве рецепторов для НП-биосенсора позволяет анализировать физиологические жидкости с большой ионной силой раствора (~20-50 мМ солевой раствор), например, сыворотка, кровь и т.д. [30,126,127]. В работе [128] представлен эксперимент по детекции пептида бета-амилоид-40, участвующего в болезни Альцгеймера, с использованием аптамера в качестве рецептора. Детекцию проводили в фосфатно-солевом буфере, ионная сила которого близка с ионной силой физиологических жидкостей. Показано, что в данных условиях НП-биосенсор позволяет детектировать пептид в диапазоне концентраций от  $10^{-13}$ - $10^{-5}$  г/л. Предел обнаружения составил  $10^{-15}$  М [128,129].

Большое значение для проводимости НП-биосенсоров имеет рН раствора. Во-первых, содержащиеся в растворе ионы  $H^+$  и  $OH^-$  оказывают влияние на состояние поверхности сенсорного элемента. Кремниевая поверхность НП-биосенсора покрыта тонким слоем  $SiO_2$  и может содержать различные функциональные группы: силанольные и силоксановые. В кислой среде ( $pH < 7$ ) происходит протонирование силанольных групп, депротонирование – в щелочной среде ( $pH > 7$ ) [130]. Данные эффекты могут оказывать влияние на проводимость НП-биосенсора и на эффективность модификации поверхности. Кислотность среды так же сказывается на проводимости НП-биосенсора, как это показано в

работах [131,132]. Повышение проводимости модифицированного силаном НП-биосенсора с *n*-типом проводимости увеличивается с понижением рН, что коррелирует с данными по зависимости дзета-потенциала SiO<sub>2</sub>, покрытого (3-аминопропил) триэтоксисиланом [131,132]. Во-вторых, рН раствора оказывает сильное влияние на состояние биологических молекул и изменение их суммарного заряда. Так, молекулы РНК гидролизуются в щелочной среде, молекулы ДНК – в кислой. Суммарный заряд белковых молекул зависит от кислотности среды и оказывает влияние на интенсивность сигнала биосенсора. В работе [12] проведен пример детекции вируса гриппа А в зависимости от значений рН. Показано, что дискретные изменения проводимости НП-биосенсора *p*-типа уменьшаются, а затем увеличиваются по модулю по мере увеличения рН от 5,5 до 8. Точка нулевого измерения, т.е. изоэлектрическая точка, возникает в диапазоне между рН=6,5-7,0. Авторы указывают, что повышенная (пониженная) проводимость *p*-типа НП-биосенсора при связывании вируса гриппа А в условиях рН<7 (рН>7) вызвана эффектом поля [12].

#### *Влияние количества рецепторов*

Влияние количества рецепторов на характеристики НП-биосенсора заключается в следующем: по мере увеличения плотности рецепторов увеличивается чувствительность устройства, а также ускоряется диффузия целевых молекул к сенсорной поверхности и скорость реакции специфического связывания [12,133].

Важно также расположение рецепторов. В процессе модификации они адсорбируются хаотично по всей поверхности кристалла. В результате возникает конкуренция за связывание целевой молекулы с необходимой поверхностью НП или оставшейся поверхностью кристалла микросхемы [11,119]. При связывании частицы с рецепторами, находящимися не на поверхности НП, она «выводится» из эксперимента и устройство не детектирует ее. Для избегания подобной ситуации важно создать методы модификации, позволяющие иммобилизовать рецепторы на поверхности непосредственно нанопроволоки.

*Влияние количества и расположения НП-биосенсоров на поверхности кристалла микросхемы*

Адсорбция рецепторов и целевых молекул носит хаотичный и вероятностный характер [95,117,134]. Это показано на результатах, представленных в работе [117]. В эксперименте проводили детекцию вируса гриппа птиц H5N2. Поверхность НП-биосенсора модифицировали моноклональными антителами (МКА), специфичными к вирусу гриппа птиц H5N2. Добавление анализируемой пробы с концентрацией вируса  $10^7$  ВЧ/мл приводило к резкому изменению проводимости устройства. НП-биосенсор также реагировал на сильно разбавленную пробу с концентрацией  $10^4$  ВЧ/мл. Однако время от добавления пробы до появления сигнала составляло 40 мин. Данная реакция устройства показывает вероятностный характер адсорбции целевых молекул на сенсорный элемент. Увеличить вероятность попадания молекулы на НП-биосенсор можно путем увеличения площади сенсорной поверхности [135]. Это осуществляют путем увеличения количества НП-биосенсоров на одном кристалле микросхемы и использования оптимальных размеров НП [31,57].

Увеличить вероятность попадания целевой молекулы на поверхность нанопроволоки можно с помощью диэлектрофореза. Диэлектрофорез (ДЭФ) – перемещение микрочастиц в переменном электрическом поле, вызванное взаимодействием между индуцированным диполем частиц и внешним электрическим полем [136,137]. Неоднородное переменное электрическое поле создается в пространстве между двумя электродами. Помещенные туда частицы могут двигаться как к электродам – положительный ДЭФ, так и от них – отрицательный ДЭФ. Совмещение электродов ДЭФ и НП-биосенсора представлено в работе [11]. В работе показано, что устройство позволяет детектировать частицы в диапазоне концентраций  $10^{-18}$ - $10^{-14}$  М, а также для определения заряда биологических частиц.

## 1.4 Модификация поверхности нанопроволочного биосенсора

Специфическое обнаружение целевых молекул с помощью НП-биосенсора требует, чтобы его поверхность обладала достаточным сродством к ним. Данное условие достигается путем проведения модификации поверхности, заключающейся в удалении загрязнений с поверхности кристалла, активации центров связывания и иммобилизации рецепторов. От качества процедур зависит работоспособность, чувствительность, селективность, электрические свойства НП-биосенсора, и, следовательно, достоверность результатов детекции [138,139].

### 1.4.1 Очистка и активация поверхности

Поверхность НП-биосенсора покрыта пленкой оксида кремния  $\text{SiO}_x$ , где  $0 < x \leq 2$ . В обычных условиях (наличие кислорода и водяных паров) образуется слой нативного оксида толщиной 0,5-1,6 нм [107,140]. Оксидная пленка определяет тип поверхностных функциональных групп (ФГ) нанопроволоки. Для нее характерны поверхностные ОН-группы, способные отдавать протон, то есть брэнстедовские центры связывания. Выделяют пять видов ФГ кремниевой НП (рисунок 6) [141]:

1. Изолированные силанольные группы ( $\equiv\text{Si-OH}$ ) – свободные, отдельно стоящие ОН-группы;
2. Вициальные силанольные группы ( $=\text{Si-OH}\dots\text{OH-Si}=\text{}$ ) – соседние ОН-группы, связанные между собой водородными связями;
3. Силанольные группы ( $\equiv\text{Si-OH}\dots\text{H}_2\text{O}$ ) – ОН-группа, связанная водородными связями с молекулой воды;
4. Геминальные силанольные группы ( $=\text{Si}-(\text{OH})_2$ ) – две ОН-группы, связанные с одним атомом Si;
5. Силоксановые группы ( $\equiv\text{Si-O-Si}\equiv$ ) – дегидратированные оксиды.

Соотношение силанольных и силоксановых групп влияет на гидрофобность и гидрофильность поверхности: увеличение силоксановых групп приводит к увеличению гидрофобности НП и наоборот [107].

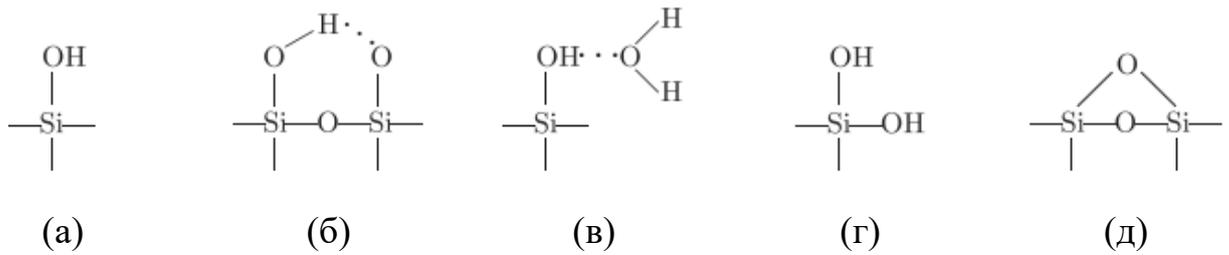


Рисунок 6 – Основные OH-группы на поверхности  $\text{SiO}_x$ : (а) – изолированные силанольные группы; (б) – вициальные силанольные группы; (в) – силанольные группы; (г) – геминальные силанольные группы; (д) – силоксановые группы

Среди выделенных групп наибольшей реакционной способностью обладают изолированные силанольные группы ( $\equiv\text{Si-OH}$ ), выступающие в качестве активных центров связывания (АЦС). Это объясняется тем фактом, что OH-фрагмент силанольных групп проявляет слабокислотный характер и способен легко вступать в реакции взаимодействия [141,142]. Однако образование водородных связей  $\equiv\text{Si-OH}$  групп между друг другом, водой или адсорбированными посторонними молекулами приводит к уменьшению реакционной способности группы в результате уменьшения полярности связи в OH-фрагменте.

Адсорбируемые посторонние молекулы – загрязнения, возникают в результате изготовления и хранения биосенсора [143-145]. К ним относятся ионы, металлические частицы, неорганические и органические соединения. Примером органических загрязнений служат остатки фоторезисторов, различных видов жиров и смазок, неорганических – соли, кислоты, используемые при создании сенсора. Атомные загрязнения включают в себя металлические пленки (Au, Ag, Cu) или частицы (Si, Fe, Ni), полученные при электрохимическом воздействии [146]. Посторонние ионы могут появляться на поверхности в результате создания *p-n* переходов (легирования). Так, при плазменно-иммерсионной ионной имплантации, источником которой служит сложный газ ( $\text{B}_2\text{H}_6$ ,  $\text{BF}_3$ , PH и т.д.), разбавленный гелием или водородом, происходит внедрение и осаждение каждого из используемых ионов [147]. Помимо ионов плазмы источником загрязнения являются распыление от держателя пластины и стенки камеры. В общем, источниками загрязнений могут выступать: технический и обслуживающий персонал, техническая среда, используемые материалы и реактивы,

технологическое оборудование [144,146]. Влияние некоторых видов загрязнений представлено в таблице 3.

Таблица 3 – Влияние некоторых загрязнений на характеристики сенсора [144]

Вид загрязнения	Влияние на характеристики сенсора
Молекулярные	– снижение адгезии пленок – формирование вредных продуктов разложения
Ионные	– ухудшение качества сенсора – уменьшение напряжения пробоя подзатворного диэлектрика
Атомные	– создание поверхностной проводимости – уменьшение времени жизни не основных носителей заряда

В зависимости от типа взаимодействия загрязнений с поверхностью НП-биосенсора различают физические и химические загрязнения. Физические загрязнения (пыль, металлические частицы, органические пленки и т.д.) возникают за счет образования слабых Ван-дер-Ваальсовых взаимодействий между поверхностью кристалла и частицами/молекулами. Химические загрязнения (оксидные и сульфидные пленки, ионы, атомы металлов и т.д.) связаны с поверхностью путем ионного, ковалентного, водородного взаимодействия. Такие загрязнения локализованы и не могут перемещаться по поверхности.

Присутствие загрязнений на поверхности биосенсора приводит к дефектообразованию, утечки токов, короткому замыканию. Загрязнения препятствуют созданию равномерного слоя рецепторов – важной части биосенсора [148]. По этой причине первым этапом подготовки устройства является очистка и активация его поверхности.

Основные требования, предъявляемые к данному этапу, это: минимизация шероховатости поверхности, минимизация количества загрязнений, сохранение работоспособности элементов сенсора, увеличение АЦС [144,146,149].

Классификация методов и их примеры представлены на рисунке 7.



Рисунок 7 – Классификация методов очистки поверхности НП-биосенсора: жидкостная очистка – очистка поверхности с помощью жидких растворов и их паров; сухая очистка – очистка поверхности, протекающая в газовой фазе или в вакууме; физическая очистка – удаление с поверхности физических загрязнений; химическая очистка – удаление с поверхности химических загрязнений [144]

Среди большого количества методов наиболее экономичными и доступными, благодаря простоте технологии процесса, возможности использования особо чистых химических реагентов и растворителей, являются методы жидкостной очистки [107,140]. Растворы способны удалять загрязнения в труднодоступных местах, что увеличивает качество очистки [150].

Физическая жидкостная очистка (ФЖО) заключается в промывании поверхности биосенсора водой или органическими растворителями, такими как трихлорэтилен, хлористый метилен, хладон, толуол, ксилол, метиловый, этиловый или изопропиловый спирты, ацетон и другие [144,151,152]. В процессе обработки происходит растворение загрязнений без протекания химических реакций [153]. Для улучшения качества ФЖО комбинируют с ультразвуковым воздействием.

Активация поверхности происходит за счет увеличения количества реакционных  $\equiv\text{Si-OH}$ -групп и является сопутствующим процессом при удалении загрязнений. Обработка поверхности биосенсора метанолом (этанолом) приводит

к растворению загрязнений и к переходу от силоксановых групп к силанольным [154]:



Основные достоинства ФЖО заключаются в простоте использования метода и сохранении рабочих элементов биосенсора. Недостатком считается обратная адсорбция загрязнений. Для устранения повторного осаждения частиц необходимо непрерывно заменять растворители, что приводит к увеличению расхода реактивов, временных и материальных затрат.

Химическая жидкостная очистка (ХЖО) проводится с помощью растворов, обладающих большим редокс-потенциалом (кислоты, основания и их смеси). Подобные растворы вступают в окислительно-восстановительную реакцию со связанными с поверхностью соединениями и переводят их в легкоудаляемые продукты реакции [144].

Раствор «пиранья» – смесь серной кислоты ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) и перекиси водорода ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), является сильным окислителем, благодаря образованию атомарного кислорода при взаимодействии  $\text{H}_2\text{SO}_4$  и  $\text{H}_2\text{O}_2$  [155,156]. Образующийся атомарный кислород взаимодействует с органическими соединениями, приводя к реакции дегидратации. Реакция протекает бурно с выделением тепла.

Очистку поверхности НП-биосенсора проводят раствором с различным соотношением  $\text{H}_2\text{SO}_4$  и  $\text{H}_2\text{O}_2$  [148,157-160]. Например, в работе [148] использовали  $\text{H}_2\text{SO}_4$  и  $\text{H}_2\text{O}_2$  в соотношении 3:1 для удаления остатка фоторезистора и очистки поверхности от загрязнений [153]. Контроль качества очистки проводили путем иммобилизации ДНК-рецептора, модифицированного флуоресцентной меткой. Данный подход выбран, исходя из того факта, что наличие загрязнений влияет на иммобилизацию рецепторов. В результате, образец, очищенный с помощью раствора «пиранья», демонстрировал четкие флуоресцентные изображения. Интенсивность флюоресценции сигнала контрольного и очищенного образца составили  $4,2 \pm 0,2$  и  $45,8 \pm 1,5$  соответственно. Это показало эффективность применения раствора «пиранья» для очистки поверхности НП-биосенсора.

Фтороводородная кислота (HF) – сильный окислитель, применяется для удаления различного рода загрязнений и частичного или полного травления слоя оксида кремния [161,162]. С целью сохранения оксидного слоя кремния и минимизации шероховатости поверхности НП-биосенсора применяются разбавленные растворы HF [163]. Например, 1%-ный водный раствор HF ( $t=150$  с), 0,02%-ный спиртовой раствор HF ( $t=30$  с) [164-166]. Полное травление слоя SiO<sub>2</sub> проводят путем последовательного воздействия HF и NH<sub>4</sub>F. В работе [162] оксидный слой удаляли с помощью 1%-ного раствора HF ( $t=50$  с,  $T=25$  °C) и NH<sub>4</sub>F ( $t=50$  с,  $T=25$  °C). В результате на поверхности НП-биосенсора образовывались гидридные ФГ ( $\equiv\text{Si-H}$ ), необходимые для дальнейших этапов подготовки НП-биосенсора. Для предотвращения образования нового оксидного слоя проводили пассивацию поверхности. Качество проведенной процедуры оценивали с помощью просвечивающей электронной микроскопии поперечного сечения контрольной и обработанной поверхности НП-биосенсора. Обработанная поверхность НП-биосенсора получилась однородной и не содержала слоя SiO<sub>2</sub> как на поверхности, так и на боковых частях. Контрольная поверхность НП-биосенсора была покрыта тонким слоем SiO<sub>2</sub> (~5 нм). Полученные результаты свидетельствовали об эффективном удалении оксидного слоя.

Помимо перечисленных кислот с целью очистки поверхности НП-биосенсора применяются смеси: 36% HCl:30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>=4:1 ( $t=10$  мин,  $T=120$  °C), 36% HCl:30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>:H<sub>2</sub>O=1:1:6 ( $t=10$  мин,  $T=80-90$  °C), 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>:H<sub>2</sub>O=1:5 ( $t=10$  мин,  $T=80$  °C) [167].

Примерами использования основных растворов являются раствор с различным соотношением гидроксида тетраметиламмония (C<sub>4</sub>H<sub>13</sub>NO) (C=2,38-20%), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> и H<sub>2</sub>O ( $t=10$  мин,  $T=80$  °C), NH<sub>4</sub>OH:H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>:H<sub>2</sub>O=x:1:5, где  $x \leq 1$  ( $t=10$  мин,  $T=80$  °C) [167]. В работе [168] поверхность обрабатывали 5%-ным щелочным моющим средством Hellmanex III с использованием ультразвуковой механической очистки ( $t=15$  мин,  $T=25$  °C). Затем очищали и активировали поверхность раствором NH<sub>4</sub>OH:H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>:H<sub>2</sub>O=1:1:5 ( $t=30$  мин,  $T=65$  °C), промывали водой и сушили в атмосфере азота. Контроль качества очистки определяли по значению

угла смачивания. Значения угла смачивания контрольной и очищенной поверхностей составили  $47,05 \pm 2,48^\circ$  и  $30,88 \pm 6,49^\circ$  соответственно. Уменьшение значений угла смачивания свидетельствует о том, что свойства поверхности изменились с гидрофобной на гидрофильную. Это связано с удалением органических загрязнителей и образования ОН-группы и/или  $\equiv\text{Si-OH}$ .

В работе [167] приведено сравнение очищающей способности кислот и оснований. Показано, что использование оснований обладает большей эффективностью, чем растворы кислот. Авторы исследования объясняли полученный результат влиянием рН раствора на дзета-потенциал адсорбирующихся частиц.

На практике совмещают использование кислот и оснований. Классическим примером считается метод RCA Standart Clean и его модификации [167,169]. Оригинальная методика RCA Standart Clean [169] осуществляется следующим образом. Сначала поверхность обрабатывают  $\text{NH}_4\text{OH}:\text{H}_2\text{O}_2:\text{H}_2\text{O}=1:1:5$  ( $t=10$  мин,  $T=80^\circ\text{C}$ ), затем  $37\%\text{HCl}:30\%\text{H}_2\text{O}_2:\text{H}_2\text{O}=1:1:6$  ( $T=75-80^\circ\text{C}$ ). После каждого раствора поверхность промывают деионизированной водой. Преобразования метода заключаются в изменении состава и соотношения компонентов растворов, температуры и времени. Например, раствор  $\text{NH}_4\text{OH}:\text{H}_2\text{O}_2:\text{H}_2\text{O}=1:8:64$  ( $t=10$  мин,  $T=65^\circ\text{C}$ ) с последующей обработкой раствором  $\text{HF}:\text{H}_2\text{O}=1:15$  или  $\text{H}_2\text{SO}_4:\text{H}_2\text{O}_2=10:1$  ( $T=120^\circ\text{C}$ ) и  $\text{NH}_4\text{OH}:\text{H}_2\text{O}_2:\text{H}_2\text{O}=1:4:20$  ( $T=60^\circ\text{C}$ ) [146,170].

В ряде работ описано совмещение ФЖО и ХЖО. Например, в работе [171] первичную очистку проводили с помощью ультразвуковой ванны в воде (70 Вт, 40 кГц). Далее поверхность обрабатывали смесью ацетона и этанола (1:1) ( $t=10$  мин) и  $96\%\text{H}_2\text{SO}_4:30\%\text{H}_2\text{O}_2=3:1$  ( $t=10$  мин). Промывали водой, сушили в атмосфере азота и обрабатывали в течение 2 часов в УФ-озоновом очистителе.

Несмотря на то, что растворы ХЖО характеризуются высокой очищающей способностью, они обладают рядом недостатков. Во-первых, при работе с сильными окислителями необходимо строго соблюдать технику безопасности. Во-вторых, в результате их использования образуются опасные отходы, которые необходимо утилизировать [146]. Это приводит к проблемам при переходе к

крупномасштабным производствам. В-третьих, растворы способны растворять рабочие элементы НП-биосенсора или приводить к их коррозии. Например, использование раствора «пираньи» может привести к вытравливанию металлов (Al, Ag, Ni) [148,153]. В-четвертых, стоит учитывать скорость травления оксидного слоя при использовании кислот и оснований, что также оказывает влияние на шероховатость поверхности [167]. Скорость травления оксида кремния 49%-ным HF составляет ~1,7 нм/с (T=25 °C), 2%-ным водным раствором HF ~0,095 нм/с, раствором NH<sub>4</sub>OH:H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>:H<sub>2</sub>O=0,5:1:5 (t=10 мин, T=80 °C) ~0,3 нм/мин, раствором C<sub>4</sub>H<sub>13</sub>NO:H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>=9:1 (t=10 мин, T=80 °C) ~0,28 нм/мин [142,153,167].

Сухие методы очистки осуществляются путем термообработки, ионного, газового и плазмохимического травления. Они обладают высокой очищающей способностью и минимизируют шероховатость поверхности [146]. В них не используются жидкие растворители, что приводит к снижению образования опасных химических отходов [150].

Термообработка способствует удалению сорбированной воды и разложению загрязнений. Она осуществляется в различном диапазоне температур. При T=100-350 °C происходит полное удаление воды и образование силанольных групп [107]. При длительном нагревании возможен переход силанольных групп в силоксановые. Этот процесс обратим при длительном кипячении в воде:



Стоит учитывать, что высокие температуры могут привести к поломке НП-биосенсора.

Плазмохимическое травление – удаление загрязнений путем использования химически активных частиц, образующихся в плазме газового разряда. Применяются плазмы галогенсодержащих углеводородов (CHF<sub>3</sub>, CF<sub>4</sub>, C<sub>2</sub>F<sub>6</sub>, C<sub>4</sub>F<sub>8</sub>), кислородная плазма, аргоновые и водородные [150,153,172,173].

Примером газового травления служит использование безводного фтористого водорода или аналогичных галогенводородных газов, разбавленных инертными газами, с небольшим количеством водяного пара, совместное использование газообразного хлора и УФ-излучение [174].

Жидкостную и сухую обработки можно совмещать [175-177]. Например, в работе [32] последовательно обрабатывали поверхность кристалла этанолом и деионизованной водой, высушивали в атмосфере азота и далее помещали в кислородно-плазменный очиститель при мощности  $P=18$  Вт в течение 10 минут. Удаление остатков плазмы проводили путем промывания этанолом и деионизованной водой. Остатки воды высушивали 10 минут при  $T=120$  °С. Для окончательного разложения загрязнений и формирования силанольных групп повторно использовали кислородно-плазменный очиститель. Анализ поверхности проводили методом АСМ и рентгеновской фотоэлектронной спектроскопии (РФС) до и после проведения очистки. Результаты АСМ показали наличие средней шероховатости 0,10 нм и среднеквадратичной шероховатости 0,13 нм. Полученные данные характеризуют поверхность как однородную. Спектры РФС применялись для оценки элементарного и атомного состава поверхности биосенсора. В результате получено наличие основных пиков, соответствующих кислороду и углероду.

Применение сухих методов очистки может быть ограничено из-за больших затрат на обеспечение аппаратурой плазменной обработки, ионного и газового травления. В процессе сухой очистки могут происходить повреждение поверхности НП-биосенсора и рабочих элементов микросхемы, появление дополнительного заряда [149]. Следует учитывать температурный предел кремниевого кристалла, выше которого он приходит в негодность. С помощью газового травления плохо удаляются металлические частицы [174].

#### **1.4.2 Иммобилизация рецепторов**

Существует несколько вариантов иммобилизации рецепторов на поверхности НП-биосенсора: физическая адсорбция, включение в полимерную матрицу, аффинная иммобилизация, ковалентное связывание.

Главные требования, предъявляемые ко второму этапу модификации поверхности биосенсора, заключаются в создании однородного монослоя

рецепторов непосредственно вблизи НП и сохранения активности используемого биологического материала [174,178,179].

Физическая адсорбция – самый простой вариант иммобилизации биологического материала на поверхности НП-биосенсора, не требующий проведения дополнительной подготовки поверхности для создания рецепторного слоя [165,178,180]. Вследствие этого сохраняется биологическая активность рецепторов. Физическая адсорбция возможна, благодаря образованию между рецептором и поверхностью НП-биосенсора электростатических или Ван-дер-Ваальсовых взаимодействий.

В условиях, когда  $pH > 3,5$ , поверхность биосенсора обладает отрицательным электрическим зарядом, следовательно, на ней может адсорбироваться полимер с положительным зарядом – поликатион [130,181,182]. Последующее осаждение полиэлектролитов (ПЭ) с чередующимися зарядами приводит к образованию многослойного ПЭ, стабилизированного сильными многовалентными электростатическими силами.

Недостатком метода является нестабильность образующегося рецепторного слоя, хаотичное распределение рецепторов по всей поверхности кристалла микросхемы [183,184]. Также при физической адсорбции невозможно контролировать нормальную ориентацию биологического материала по отношению к определяемому аналиту [184].

Включение в полимерную матрицу обеспечивает ориентационную иммобилизацию рецепторов за счет их внедрения в полимер, обладающий различными функциональными группами ( $-COOH$ ,  $-NH_2$  и др.). Наличие таких групп помогает надежно удерживать рецепторы по отношению к поверхности НП-биосенсора и аналиту. Примером включения в полимерную матрицу служит использование фотополимеризации. В статье [185] использовали линейные фотополимеры фталоцианинато-полисилоксана для включения иммуноглобулина G (IgG). Полимерные слои готовили путем нанесения гомогенной смеси мономеров фталоцианинато-полисилоксана и рецептора на поверхность устройства. Образование полимерного слоя происходило под воздействием УФ-излучения.

Способ оказывает слабое денатурирующее воздействие на рецепторы по сравнению с химическим иницированием полимеризации [185].

Применение полимерной матрицы продлевает биологическую активность рецепторного слоя. Некоторые биологические материалы (например, ферменты) при непосредственном взаимодействии с твердой поверхностью могут терять свою активность. Избежать такой ситуации помогает их включение в матрицу полимера [150,186]. Сложность использования заключается в строгом соблюдении экспериментальных условий при создании полимера, удельного размера пор, состава и сорбции полимера [187].

Аффинная иммобилизация основана на высокоспецифическом связывании реагентов (комплементарные сайты ДНК, генетически модифицированные полипептиды, отдельные аминокислоты и аптамеры) с рецепторами, при этом происходит процесс их фиксации на поверхности [180,184]. Метод универсальный и очень специфичный, не приводит к деградации рецепторного слоя [188], однако является трудоемким и дорогим.

Ковалентное связывание осуществляется посредством использования вспомогательных химических соединений – кросс-линкеров. Эти молекулы участвуют в образовании промежуточного слоя между поверхностью НП-биосенсора и рецепторами. Исходя из этого, кросс-линкеры должны обладать двумя ФГ – «голова-хвост». «Голова» кросс-линкеров способна взаимодействовать с ФГ поверхности кремния, «хвостовая» ФГ необходима для образования связи с рецептором (рисунок 8).

Выбор «хвостовой» ФГ зависит от используемого рецептора. Например, для иммобилизации антител или других белков подходит  $\text{NH}_2$ -группа [138,191].

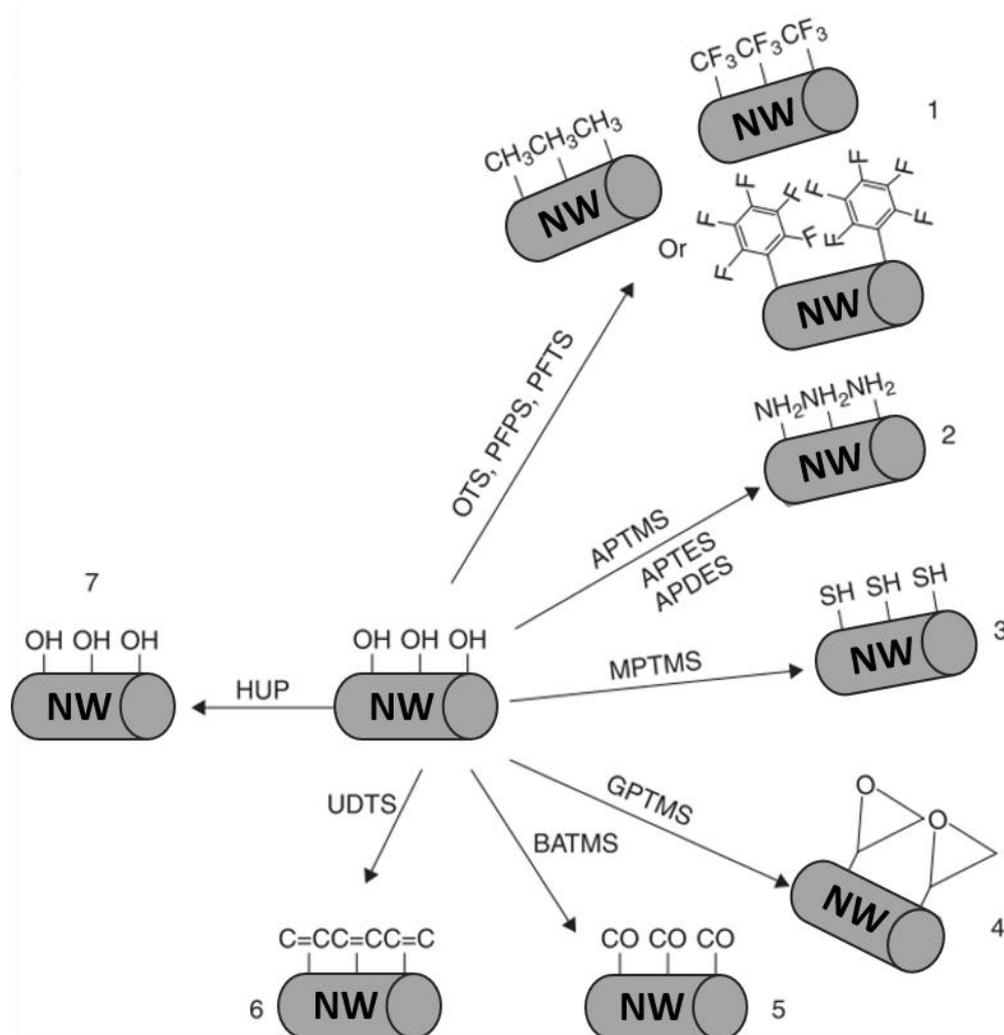


Рисунок 8 – Примеры кросс-линкеров и образующиеся «хвостовые» функциональные группы: NW – кремниевая нанопроволока; OTS – октадецилтрихлорсилан ( $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{17}\text{SiCl}_3$ ); PFTS – 1H, 1H, 2H, 2H-перфтороктилтриэтоксисилан ( $\text{C}_{14}\text{H}_{19}\text{F}_{13}\text{O}_3\text{Si}$ ); PFPS – перфторфенилтрихлорсилан ( $\text{C}_6\text{F}_5\text{SiCl}_3$ ); APTMS – (3-аминопропил) триметоксисилан ( $\text{H}_2\text{N}(\text{CH}_2)_3\text{Si}(\text{OCH}_3)_3$ ); APTES – (3-аминопропил) триэтоксисилан ( $\text{H}_2\text{N}(\text{CH}_2)_3\text{Si}(\text{OC}_2\text{H}_5)_3$ ); APDES – 3-аминопропилдиэтоксиметилсилан ( $\text{H}_2\text{N}(\text{CH}_2)_3\text{SiCH}_3(\text{OC}_2\text{H}_5)_3$ ); MPTMS – (3-меркаптопропил) триметоксисилан ( $\text{HS}(\text{CH}_2)_3\text{Si}(\text{OCH}_3)_3$ ); GPTMS – (3-глицидоксипропил) триметоксисилан ( $\text{C}_9\text{H}_{20}\text{O}_5\text{Si}$ ); BATMS – 3-(триметоксисилил) бутиловый альдегид ( $\text{HCO}(\text{CH}_2)_3\text{Si}(\text{OCH}_3)_3$ ); UDTs – 10-ундецилтрихлорсилан ( $\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_2)_9\text{SiCl}_3$ ); HUP – 11-гидроксиундецилфосфонат ( $\text{HO}(\text{CH}_2)_{11}\text{PO}(\text{OH})_2$ ) [189,190]

В качестве кросс-линкеров широко применяются силаны – органические соединения кремния [139]. Они могут ковалентно связываться с поверхностью НП-биосенсора посредством переноса протона с OH-группы поверхности на уходящую группу силана. В результате образуются стабильные силоксановые группы [138,189]. Стоит учитывать, что молекулы кросс-линкера могут вступать в реакцию

олигомеризации и, тем самым, образовывать неупорядоченный слой [181,192]. Данные проблемы решают с помощью сильного электрического поля, под действием которого молекулы поляризуются [193]. Другое решение заключается в подборе оптимальных условий проведения процедуры. В работе [189] авторы исследовали условия силанизации с помощью (3-аминопропил) триэтоксисилана (АПТЭС). В эксперименте использовали 1%-, 10%- и 33%-ный АПТЭС, время экспозиции 1 ч, 24 ч, и 72 ч, температура варьировалась от 25 °С до 75 °С. Результаты оценивали с помощью АСМ. Анализ данных показал, что использование любой концентрации раствора АПТЭС в течение 1 часа показывает подходящие для дальнейшего использования результаты [189].

Для устранения олигомеризации могут использоваться (3-аминопропил) метилдиэтоксисилан и (3-аминопропил) диметилэтоксисилан как заменители классического кросс-линкера – (3-аминопропил) триэтоксисилана [188,192]. Данные соединения обладают таким количеством алкокси-групп, которое помогает избежать образования нескольких молекулярных слоев на поверхности.

Другой метод получения нормально ориентированного монослоя к поверхности кристалла – применение электрического поля на поляризованные под воздействием ультрафиолетового излучения молекулы силана [193].

Создание слоя кросс-линкера осуществляют посредством реакции этерификации. В литературе представлено мало примеров использования подобной реакции, поскольку в результате образуется недостаточно стабильная –Si-O-CO– связь [138]. Одним из примеров служит прикрепление биотинил-п-нитрофенилового эфира к поверхности кремния [194]. Необходимым условием является присутствие основания для протекания реакции. В данном случае в качестве основания и катализатора выступал 4-(диметиламино)пиридин.

В случае полного удаления оксида кремния с поверхности и образования связи Si-H проводится реакция гидроксирования. Кросс-линкерами выступают непредельные углеводороды (алкены, алкины) [138,195].

В случае, когда биологический материал не может непосредственно взаимодействовать с первым слоем кросс-линкера, формируется второй слой. Для

этого используются короткие бифункциональные соединения, например, 3,3'-дителиобис (сульфосукцинимидилпропионат) (DTSSP) и его производные, N-гидроксисукцинимид (NHS) и др. [96,184,192].

После формирования слоя кросс-линкера (функционализации поверхности) осуществляется непосредственно иммобилизация рецепторов.

Преимущества ковалентного связывания заключаются в обеспечении надежной ориентированной фиксации рецепторов с увеличением срока хранения биосенсора [150]. Недостатки ковалентного связывания заключаются в возможности изменения конформации рецепторов (например, антител), образования неравномерного слоя молекул кросс-линкера, а в некоторых случаях удалении рецепторного слоя от поверхности НП [181,184,196].

Ранее затрагивался вопрос об необходимости иммобилизации рецепторов непосредственно на поверхности нанопроволоки. Это достигается, в том числе, созданием слоя кросс-линкера в необходимом месте. В работе [197] в процессе изготовления НП-сенсора исходную поверхность кремниевого кристалла сначала модифицировали АПТЭС, и только после этого проводили процедуры фотолитографии и изготовления элементов устройства. Данный подход позволяет прикреплять молекулы кросс-линкера только на нужные участки НП-биосенсора.

## 1.5 Выводы по Главе 1

НП-биосенсоры – перспективные устройства для применения в медицине, вирусологии, биотехнологии, экологических исследованиях и т.д. Внедрение в практику НП-биосенсоров позволит быстро и точно детектировать вирусы, целевые белки, химические элементы и т.д., тем самым существенно сократить сроки проведения анализов и получения результатов. Использование НП-биосенсоров в исследованиях по выявлению и идентификации вирусов в образцах позволит проводить экстренные санитарно-эпидемиологические мероприятия, своевременно корректировать схемы лечения, контролировать процессы распространения вируса при изучении патогенеза вирусного заболевания и т.д.

Проведенный анализ литературных данных выявил проблемы использования НП-биосенсоров для детекции биологических молекул, в частности, вирусов. Эти проблемы связаны с необходимостью правильного выбора конструкции устройства, оценки возможности использования той или иной методики модификации поверхности НП-биосенсора и подготовки анализируемых проб, а также оптимизации самой процедуры проведения анализа.

Исходя из этого, выдвинуты следующие задачи диссертационной работы:

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.

## ГЛАВА 2 Материалы и методы

### 2.1 Перечень основных химических реактивов, материалов и оборудования

Работу проводили с использованием широкого спектра химических реактивов, материалов и оборудования, основные из которых представлены в таблице 4.

Таблица 4 – Перечень основных химических реактивов, материалов и оборудования

№	Наименование	Производитель	Примечание
1	2	3	4
Химические реактивы			
1	Фтороводородная кислота (HF)	АО «Сибреахим», Россия	ТУ 2612-007-56853252-2010, ОСЧ
2	Серная кислота (H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )	PanReac AppliChem, Испания	95-98 % (USP-NF, BP, Ph/ Eur.)
3	Гидроксид аммония (NH <sub>4</sub> OH)	Sigma Aldrich, США	
4	Перекись водорода (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	Sigma Aldrich, США	
5	Этанол (C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> OH)	Реахим, Россия	96 %-й
6	Глутаровый альдегид (C <sub>5</sub> H <sub>8</sub> O <sub>2</sub> , ГА)	PanReac AppliChem, Испания	
7	(3-аминопропил) триэтоксисилан (C <sub>9</sub> H <sub>23</sub> NO <sub>3</sub> Si, АПТЭС)	Sigma Aldrich, США	
8	3,3'-дитиобис (сульфосукцинимидилпропионат) (ДТССП)	Pierce, США	
9	Фосфатно-солевой буфер (ФСБ)	ООО «Росмедбио», Россия	
10	β-пропиолактоном	Merk, США	
Биологический материал			
1	Моноклональные антитела, специфичные к спайковому белку (S) SARS-CoV-2	ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора	1 мкг/мкл
2	Поликлональные антитела, специфичные к вирусу осповакцины (штамм Л-ИВП)	ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора	Титр в ИФА против антигена осповакцины 1:50000
3	Сыворотка крови хорька, содержащая поликлональные антитела против вируса гриппа птиц А(Н9N2)	ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора	Титр в ИФА против антигена 1:2048
4	Антитела вируса гриппа А (подтип А (H1N1) pdm09)	ООО «Предприятие по производству диагностических препаратов», Россия	ТУ 938941-005-4429427-2008 Титр гемагглютининов препарата 160ГАЕ/0,1 мл

Продолжение таблицы 4

1	2	3	4
5	Вирус гриппа А (подтип А (H1N1) pdm09)	ООО «Предприятие по производству диагностических препаратов», Россия	ТУ 938824-004-4428427-2008 Физический титр – $10^{10}$ ВЧ/мл
6	Вирусоподобные частицы SARS-CoV-2	Отдел биоинженерии ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора	Физический титр – $10^{10}$ ВЧ/мл
7	Вирус осповакцины, штамм Л-ИВП	Государственная коллекция возбудителей вирусных инфекций и риккетсиозов ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора	Физический титр – $10^9$ ВЧ/мл
8	Инактивированный вирус гриппа птиц А(H9N2)	Государственная коллекция возбудителей вирусных инфекций и риккетсиозов ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора	9,8 Ig ЭНВ50/мл
Оборудование			
1	Кремниевые нанопроволочные сенсоры <i>n</i> -типа проводимости	ИФП СО РАН, Россия и АО «НЗПП Восток», Россия	
2	Электронный микроскоп JEM-1400	JEOL, Япония	
3	Оптический микроскоп МЕТАМ РН-41	ЛОМО, Россия	
4	Оптический микроскоп Axiovert 200, AxioImager. A1	Zeiss, Германия	
5	Атомно-силовой микроскоп Р47SolverBio	NT-MDT, Россия	
6	Инвертированный биологический микроскоп «Olympus CKX53»	Olympus Corp., Япония	
7	Амперметр РХIe 4163	National Instruments, США	Относительная погрешность измерения величины тока – 0,10% + 100 пА Технические характеристики представлены в [198]
8	Постоянный источник напряжения РХI 4135	National Instruments, США	Относительная погрешность измерения напряжения – 0,022%+1 мВ Технические характеристики представлены в [199]

## 2.2 Конструкция нанопроволочного сенсора

В экспериментах использовали нанопроволочные сенсоры на основе кремниевого полевого транзистора (НП-сенсоры)<sup>7</sup> с *n*-типом проводимости, изготовленные в ИФП СО РАН и АО «НЗПП Восток». Топологии кристаллов микросхем представлены на рисунке 9.

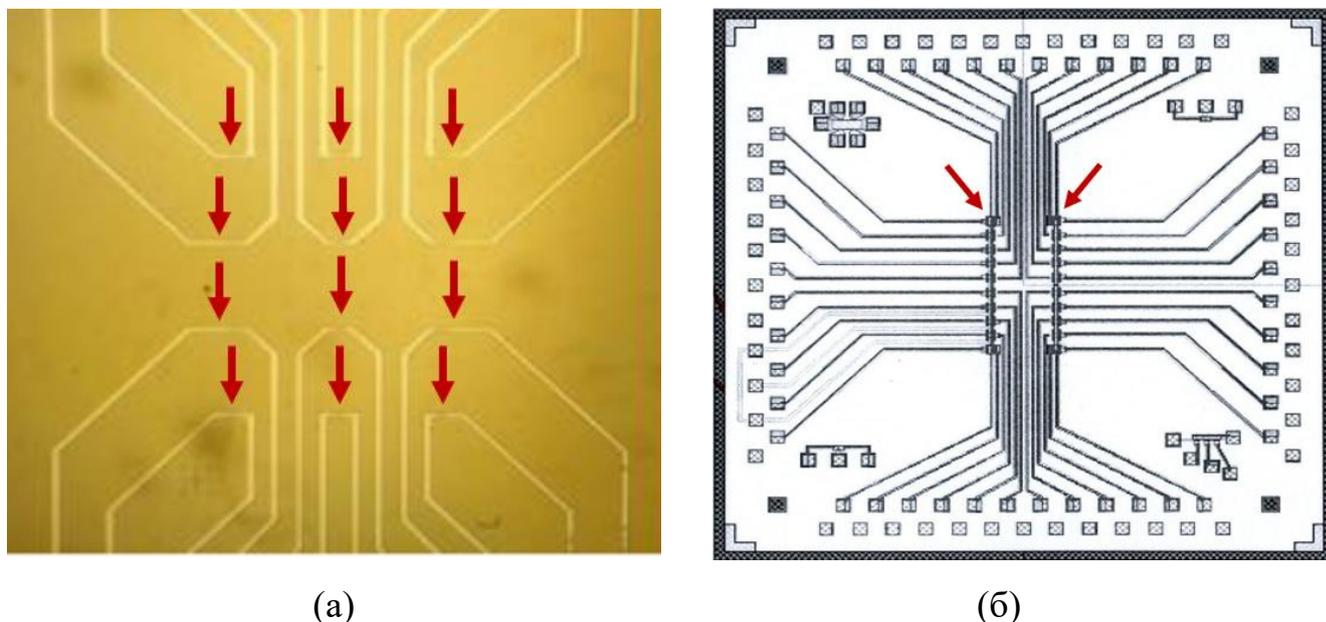


Рисунок 9 – Топология кристалла микросхемы: (а) – изготовленной АО «НЗПП Восток»; (б) – изготовленной в ИФП СО РАН<sup>8</sup>. НП-сенсоры указаны стрелками

НП-сенсоры изготовлены по КНИ-технологии и обладают схожими электрическими характеристиками. Размеры нанопроволок составляли: ширина  $W=3$  мкм<sup>9</sup>, длина  $L=10$  мкм для НП-сенсора.

## 2.3 Методы

### 2.3.1 Подготовка вирусных частиц

#### 2.3.1.1 Подготовка вирусоподобных частиц коронавируса SARS-CoV-2

Очистку и концентрирование вирусоподобных частиц (ВПЧ) коронавируса SARS-CoV-2<sup>10</sup> из культуральной жидкости проводили ультрацентрифугированием.

<sup>7</sup> НП-сенсор – устройство, в котором сенсорный элемент не содержит биологического материала.

<sup>8</sup> Топология предоставлена заведующим лабораторией Технологии кремниевой микроэлектроники ИФП им А.В. Ржанова СО РАН Наумовой О.В.

<sup>9</sup> Относительная погрешность размеров нанопроволок при изготовлении не превышает 10% (представленных в диссертационной работе).

<sup>10</sup> Вирусоподобные частицы коронавируса произведены и предоставлены сотрудниками ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора Щербаковым Д.Н., Зыбкиной А.В.

В центрифужный стакан вносили 12-14 мл 20%-ной сахарозы, сверху добавляли культуральную жидкость, содержащую ВПЧ. Центрифугировали при 25000 g в течение 4 ч, T=4-8 °C. Осадок растворяли в ФСБ. Полученную суспензию хранили при T=-80 °C.

Для проведения экспериментов ВПЧ методом диализа переводили в раствор с низкой ионной силой (0,1 мМ NaCl).

### **2.3.1.2 Подготовка вируса осповакцины (штамм Л-ИВП)**

Вирус осповакцины (ВОВ)<sup>11</sup> инактивировали β-пропиолактоном. К 1 мл суспензии вируса добавляли 30 мкл 2%-ого раствора β-пропиолактона и инкубировали при температуре 37 °C в течение 2 ч. Далее методом диализа переводили вирус в раствор с низкой ионной силой. Наличие вирусных частиц проверяли с помощью электронной микроскопии.

### **2.3.2 Иммуноферментный анализ**

В лунках полистирольного планшета сорбировали 100 мкл вируса в рабочем разведении в буфере ФСБ-Т (фосфатно-солевой буфер, 1% TWEEN-20) в течение 16-20 ч. Места неспецифического связывания блокировали 1%-ым раствором казеина в ФСБ-Т в течение 1 ч при T=37 °C. Далее добавляли специфические антитела в нескольких разведениях и оставляли на 1 ч при T=37 °C. Специфическое связывание антигена и антитела определяли добавлением антивидовых антител, меченных пероксидазой хрена в рабочем разведении (t=1 ч, T=37 °C). Проявление иммунной реакции осуществляли жидким субстратом на основе 3,3',5,5'-тетраметилбензидин. Останавливали реакцию добавлением 1 N HCl. Оптическую плотность (ОП) раствора в лунке определяли на мультимодальном ридере Thermo Scientific Varioskan LUX (Thermo Scientific, США) при длине волны  $\lambda = 450$  нм.

---

<sup>11</sup> Суспензия вируса осповакцины (штамм Л-ИВП) предоставлена сотрудником ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора Колосовой И.В.

### 2.3.3 Методы модификации поверхности

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

#### 2.3.3.1 Очистка поверхности

##### *Физическая жидкостная очистка*

Поверхность кремниевых пластин обрабатывали 96%-м раствором этанола в течение 30 мин при комнатной температуре [148]. Далее остатки спирта удаляли с помощью дистиллированной воды и проводили термообработку при  $T=150\text{ }^{\circ}\text{C}$  для удаления остатков воды и формирования АЦС.

##### *Химическая жидкостная очистка*

Химическую жидкостную очистку проводили с использованием нескольких растворов с большим редокс-потенциалом. Условия ХЖО представлены в таблице 5 [146,148,164-166,200,201].

Таблица 5 – Растворы, применяемые для химической жидкостной очистки поверхности

Название метода	Состав раствора	Условия эксперимента
1-ХЖО	$\text{HF}:\text{H}_2\text{O} = 1:50$	40 с, $25\text{ }^{\circ}\text{C}$
2-ХЖО	$\text{H}_2\text{O}_2:\text{H}_2\text{O} = 1:3$	10 мин, $25\text{ }^{\circ}\text{C}$
3-ХЖО	$\text{H}_2\text{SO}_4:\text{H}_2\text{O}_2 = 10:3$	7 мин, $30\text{ }^{\circ}\text{C}$
4-ХЖО	$\text{NH}_4\text{OH}:\text{H}_2\text{O}_2:\text{H}_2\text{O} = 1:4:20$	15 мин, $25\text{ }^{\circ}\text{C}$
5-ХЖО	$\text{NH}_4\text{OH}:\text{H}_2\text{O}_2:\text{H}_2\text{O} = 1:4:20;$ $\text{H}_2\text{SO}_4:\text{H}_2\text{O}_2 = 10:1$	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.

Исследуемый раствор ( $V=10$  мкл) наносили на поверхность кристалла в условиях, представленных в таблице 5. Далее его удаляли и поверхность промывали большим количеством дистиллированной воды.

### 2.3.3.2 Функционализация поверхности

Функционализацию поверхности молекулами кросс-линкера проводили в условиях, представленных в таблице 6.

Таблица 6 – Условия модификации поверхности НП-биосенсора молекулами кросс-линкера

Название метода	Состав раствора	Условия эксперимента
1-М	25% АПТЭС в этаноле	5 ч, 25 °С
2-М	1% ГА в ФСБ	4 ч, 25 °С
3-М	2,5% ГА в ФСБ	4 ч, 25 °С

Примечание: 1-М – метод №1 модификации поверхности НП-биосенсора; 2-М – метод №2 модификации поверхности НП-биосенсора; 3-М – метод №3 модификации поверхности НП-биосенсора; АПТЭС – (3-аминопропил) триэтоксисилан; ГА – глутаровый альдегид.

1-М: поверхность кремниевой пластины, предварительно очищенную от загрязнений, функционализировали в парах 25%-го спиртового раствора (3-аминопропил) триэтоксисилана ( $t=5$  ч,  $T=25$  °С) [189,192]. Далее поверхность промывали этанолом.

2-М, 3-М: на очищенную поверхность кремниевой пластины наносили 10 мкл раствора глутарового альдегида (ГА) в одной из исследуемых концентрациях (таблица 6). После поверхность промывали буфером ФСБ.

### 2.3.3.3 Иммобилизация рецепторов

#### *Физическая адсорбция*

На очищенную поверхность кристалла микросхемы наносили 10 мкл антител [208-210]. 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.

Эффективность метода физической адсорбции оценивали путем детекции вируса осповакцины (описано в «2.3.4.3 Детекция вируса осповакцины (штамм Л-ИВП)» и «3.4.3 Результаты детекции вируса осповакцины (штамм Л-ИВП)»).

*Ковалентное связывание*

На очищенной поверхности кристалла микросхемы создавали слой кросс-линкера в парах АПТЭС ( $t=20$  ч,  $T=25$  °С) [189]. Не прореагировавшие молекулы кросс-линкера удаляли путем промывания этанолом. Активацию  $\text{NH}_2$ -групп АПТЭС проводили с помощью 0,12 мМ ДТССП в 50 мМ калий-фосфатного буфера (КФБ) [201,206,207]. Далее на поверхность НП-биосенсоров наносили антитела в КФБ или деионизованной воде.

Эффективность ковалентного связывания оценивали путем детекции вируса гриппа А (описано в «2.3.4.1 Детекция вируса гриппа А (подтип А(Н1N1)pdm09)» и «3.4.1 Результаты детекции вируса гриппа А (подтип А(Н1N1)pdm09)»).

*Электростатическое связывание*

На очищенной поверхности кристалла микросхемы создавали слой кросс-линкера в парах 25%-го спиртового раствора АПТЭС ( $t=5$  ч,  $T=25$  °С) [171,189,202,203]. Не прореагировавшие молекулы кросс-линкера удаляли путем промывания этанолом. Далее наносили антитела и выдерживали при  $t=2$  ч,  $T=4$  °С.

Эффективность ковалентного связывания оценивали путем детекции вирусоподобных частиц коронавируса (описано в «2.3.4.2 Детекция вирусоподобных частиц коронавируса SARS-CoV-2» и «3.4.2 Результаты детекции вирусоподобных частиц коронавируса SARS-CoV-2»).

**2.3.4 Детекция вирусов****2.3.4.1 Детекция вируса гриппа А (подтип А(Н1N1)pdm09)**

В эксперименте использовали сенсор с  $n$ -типом проводимости, топология которого представлена на рисунке 9а. Используемая аналитическая система представлена на рисунке 10.

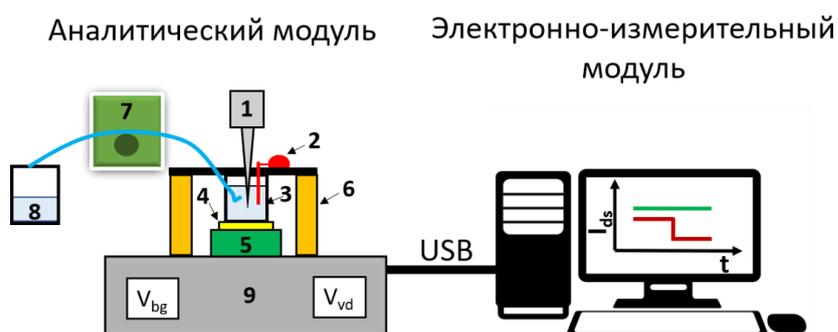


Рисунок 10 – Схема аналитической системы: 1 – мешалка; 2 – электрод заземления; 3 – измерительная ячейка; 4 – НП-биосенсор; 5 – держатель микросхем; 6 – держатель измерительной ячейки; 7 – перистальтический насос; 8 – контейнер для отходов; 9 – десятиканальная система сбора и хранения данных [204]

### *Подготовка поверхности*

Очистку поверхности от адсорбированных загрязнений проводили последовательным использованием изопропанола и раствора  $\text{HF}:\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}=1:50$ . Слой кросс-линкера создавали в парах АПТЭС в течение 20 ч при комнатной температуре [204]. Не прореагировавшие молекулы кросс-линкера удаляли путем промывания этанолом. Активацию  $\text{NH}_2$ -групп АПТЭС проводили с помощью 0,12 мМ ДТССП в 50 мМ калий-фосфатного буфера (КФБ) [201,206,207]. Далее на поверхность НП-биосенсоров наносили антитела против гриппа А в КФБ (рабочий НП-биосенсор) и антитела против вируса гепатита В (контрольный НП-биосенсор).

### *Процедура измерения*

Непосредственно перед детекцией готовили серию разведений раствора вируса (концентрации  $10^3$ - $10^{10}$  ВЧ/мл) в 1 мМ КФБ. Анализируемый раствор ( $V=7$  мкл) вносили в измерительную ячейку (3, рисунок 10), содержащую 100 мкл 1 мМ КФБ. Контрольным экспериментом выступала детекция буферного раствора, не содержащего вирусные частицы.

Измерения проводили в режиме реального времени с использованием 10-канальной системы сбора данных и специализированного программного обеспечения (ООО «Агама+», Россия). Регистрацию сигнала биосенсора, а именно временные зависимости величины тока нанопроволоки 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.

### 2.3.4.2 Детекция вирусоподобных частиц коронавируса SARS-CoV-2

В эксперименте использовали сенсор с *n*-типом проводимости, топология которого представлена на рисунке 9б. Аналитическая система представлена на рисунке 11.

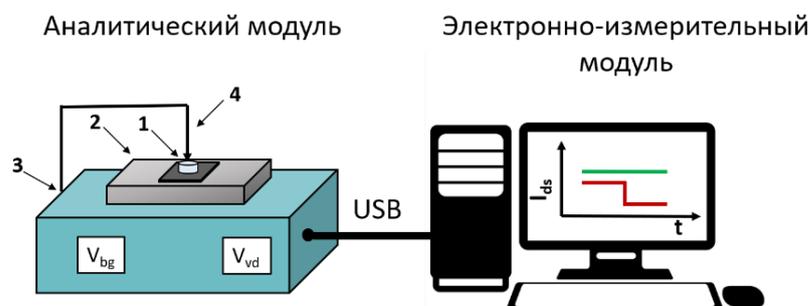


Рисунок 11 – Схема аналитической системы: 1 – анализируемая проба, 2 – микросхема, 3 – система сбора и хранения данных, 4 – электрод заземления

#### *Подготовка поверхности*

Поверхность биосенсора очищали 96%-ным раствором этанола [148,206]. После создавали слой кросс-линкера в парах АПТЭС ( $t=5$  ч,  $T=20$  °C) [189]. Далее поверхность разделяли на две части для получения двух независимых результатов. На первую часть наносили МКА, специфичные к S-белку коронавируса SARS-CoV-2<sup>12</sup>, выдерживали при  $t=2$  ч,  $T=4$  °C (эксперимент). Не связавшиеся МКА удаляли дистиллированной водой. Вторая часть выступала в качестве контроля и ее поверхность содержала только слой кросс-линкера без антител (контроль).

Перед экспериментом готовили серию разведений пробы ВПЧ (концентрации  $10^{-18}$ - $10^{-13}$  М) в дистиллированной воде.

#### *Процедура измерения*

На подготовленную поверхность наносили с последующим удалением 10 мкл дистиллированной воды и приготовленных проб вирусной суспензии с концентрациями от  $10^{-18}$  М до  $10^{-13}$  М (приблизительно от  $10^2$  ВЧ/мл до  $10^7$

<sup>12</sup> Моноклональные антитела предоставлены сотрудниками ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора Щербаковым Д.Н., Меркулевой Ю.А.

ВЧ/мл)<sup>13</sup>. 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. Перед началом внесения вирусной суспензии устанавливали рабочую точку НП-биосенсора в линейной области вольтамперной характеристики (ВАХ). Это, в свою очередь, обеспечивает линейную зависимость величины тока от количества вирусных частиц. Регистрацию тока проводили 4 раза.

### 2.3.4.3 Детекция вируса осповакцины (штамм Л-ИВП)

В эксперименте использовали сенсор с  $n$ -типом проводимости, топология которого представлена на рисунке 9б. Аналитическая система представлена на рисунке 11.

#### *Подготовка поверхности*

Поверхность очищали с помощью 96%-го этанола и дистиллированной воды. Далее проводили физическую адсорбцию ПКА, специфичных к вирусу осповакцины (описано в «2.3.3.3 Иммобилизация рецепторов») [208-210].

Перед началом эксперимента готовили серию последовательных разведений пробы вируса в деионизованной воде.

#### *Процедура измерения*

В качестве контроля определяли влияние суспензии ВОВ на  $I_{ds}$  НП-биосенсора без иммобилизованных ПКА. Как и в предыдущих экспериментах, для улучшения качества сигнала в анализируемую пробу вводили платиновый электрод заземления «сверху».

На поверхность НП-биосенсора, содержащую ПКА, вносили различное разведение пробы ВОВ:  $DI=10^{-15}$ - $10^{-1}$ , где  $DI$  – деионизованная вода. Напряжение между стоком и истоком устанавливали  $V_{ds}=0,15$  В. Сигнал биосенсора на внесение

---

<sup>13</sup> Для пересчета использовали формулу:  $n = (N \times 10^3) / N_a$ , где  $n$  – количество молей, моль, М;  $N$  – число вирусных частиц в мл, ВЧ/мл;  $N_a$  – число Авогадро ( $6,02 \times 10^{23}$ ), моль<sup>-1</sup>.

суспензий антител, вируса и их специфическое связывание отслеживали путем регистрации  $I_{ds}(t)$  с помощью системы сбора данных NI 6363. Аналогично вышеописанному эксперименту, перед детекцией вирусных частиц устанавливали рабочую точку биосенсора в линейной области вольтамперной характеристики.

### **2.3.5 Микроскопические методы анализа**

Анализ проводили в отделе микроскопических исследований ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора.

#### **2.3.5.1 Электронная микроскопия**

Исследование вирусных суспензий проводили с помощью электронного микроскопа JEM-1400 (JEOL, Япония) с цифровой камерой «Jeol» и цифровой камерой бокового вывода с программным пакетом iTEM (SIS, Германия). Образцы подготавливали по методике негативного контрастирования. Сетку для электронной микроскопии с опорной формваровой пленкой последовательно помещали на каплю исследуемого образца  $t=1$  мин и на каплю контрастера (2% водный раствор уранилацетата)  $t=15$  сек. Далее сетку с образцом высушивали на фильтровальной бумаге и изучали с помощью электронного микроскопа при ускоряющем напряжении 80 кВ.

#### **2.3.5.2 Атомно-силовая микроскопия**

Состояние поверхности кремниевых пластин анализировали с помощью атомно-силового микроскопа P47SolverBio (NT-MDT, Россия). В эксперименте использовали кантилевер NA\_HR Etalon (Cantilever number 2 rectangular) (NT-MDT, Россия).

## ГЛАВА 3 Результаты и обсуждения

### 3.1 Модификация поверхности

Создание НП-биосенсора заключается в формировании на его поверхности рецепторного слоя. Как правило, эта процедура состоит из двух этапов: 1 – очистка поверхности от адсорбированных загрязнений, 2 – иммобилизация рецепторов. Схематично процедура представлена на рисунке 12.

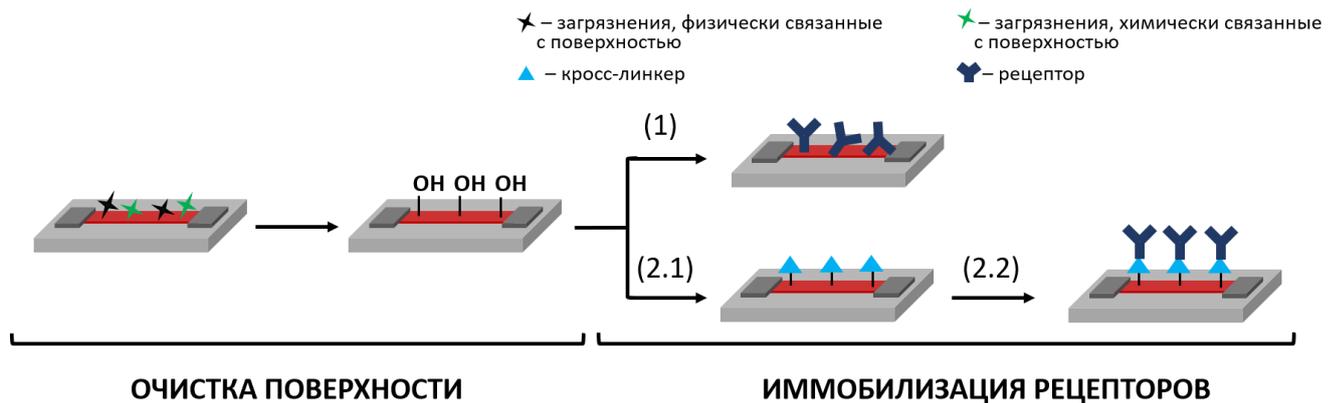


Рисунок 12 – Схема модификации поверхности НП-биосенсора: (1) – очистка и активация поверхности; (2) – иммобилизация рецептора методом физической адсорбции; (3) – иммобилизация рецептора методом ковалентного связывания

В работе исследовали методы физической и химической жидкостной очистки поверхности НП-биосенсора, методы ковалентного связывания рецепторов с поверхностью и их физической адсорбции. Выбор растворов основывался на литературных данных.

Анализ поверхности кристалла осуществляли с помощью АСМ на приборе Р47SolverBio (NT-MDT, Россия) и оптической микроскопии на приборе МЕТАМ РН-41 (ЛОМО, Россия). Эффективность проведенных этапов модификации поверхности НП-биосенсора определяли путем детектирования специфического взаимодействия антитело-антиген.

#### 3.1.1 Результаты очистки поверхности

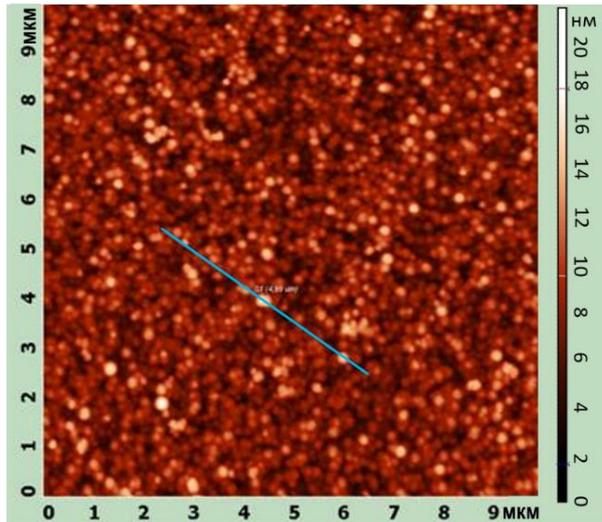
Изготовление и хранение НП-сенсоров сопровождается адсорбцией посторонних частиц на поверхность. Их наличие приводит к ухудшению рабочих

характеристик устройства, дефектообразованию, сокращению АЦС и сказывается на формировании рецепторного слоя [211]. Подобное влияние может оказывать слой естественного оксида кремния, толщину и однородность которого сложно контролировать. Ввиду этого, важно подобрать методы очистки, позволяющие удалять различного рода загрязнения с поверхности НП-биосенсора. Помимо степени очистки необходимо уделять внимание воздействию того или иного раствора на состояние поверхности НП-биосенсора. Например, раствор плавиковой кислоты, используемый для удаления посторонних частиц и поверхностного слоя оксида кремния, способен растворять другие элементы биосенсора, тем самым выводя его из строя. Следовательно, основными требованиями, предъявляемыми к методам очистки, являются сохранение рабочих элементов микросхемы, минимизация размера и количества посторонних частиц, относительная однородность поверхности.

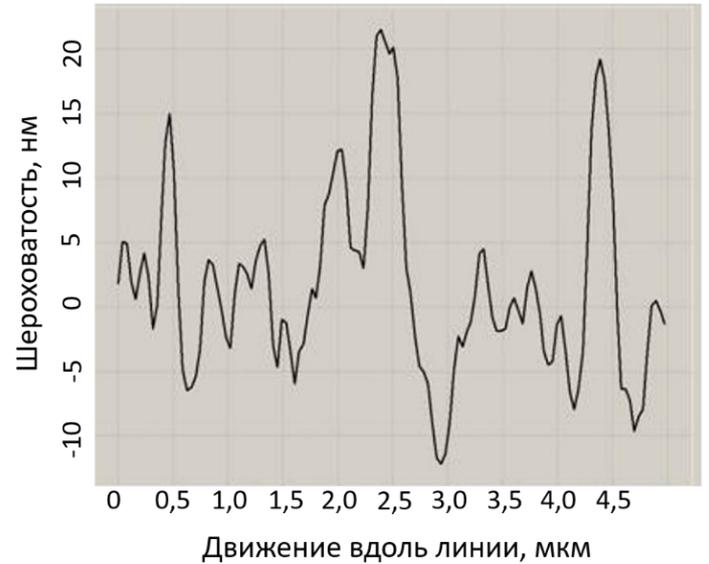
Выбор методов жидкостной обработки поверхности НП-сенсора, используемых в данной диссертационной работе, основан на ряде причин:

- простота использования, что приводит к снижению материальных и временных затрат при изготовлении биосенсора;
- растворы способны проникать в труднодоступные места на кристалле (например, микротрещины), увеличивая тем самым степень очистки.

На рисунке 13 представлены результаты АСМ поверхности до жидкостной обработки одного из образцов кремниевой пластины, выступающего в качестве контроля. Размер исследуемой области составляет  $10 \times 10$  мкм. Белые пятна (высокий уровень сигнала) на фотографии возникают в результате присутствия на поверхности посторонних частиц. В данном случае на образце находятся частицы размером  $\geq 18$  нм. Профиль сечения вдоль линии (рисунок 13б) показал наличие шероховатости с амплитудой  $\sim 25$  нм и частиц размером до  $\sim 22$  нм.



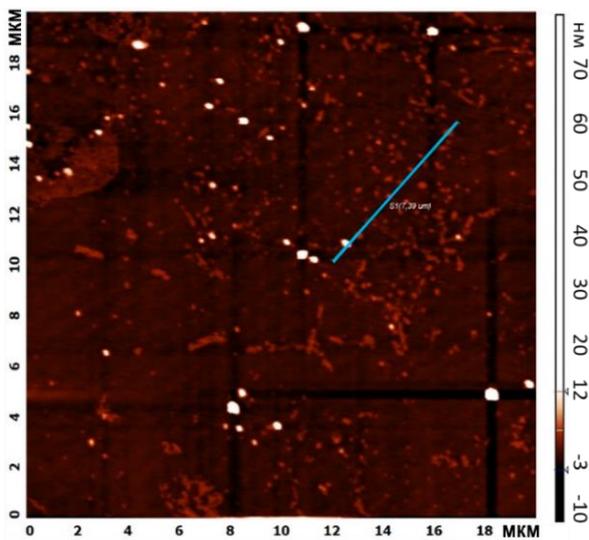
(a)



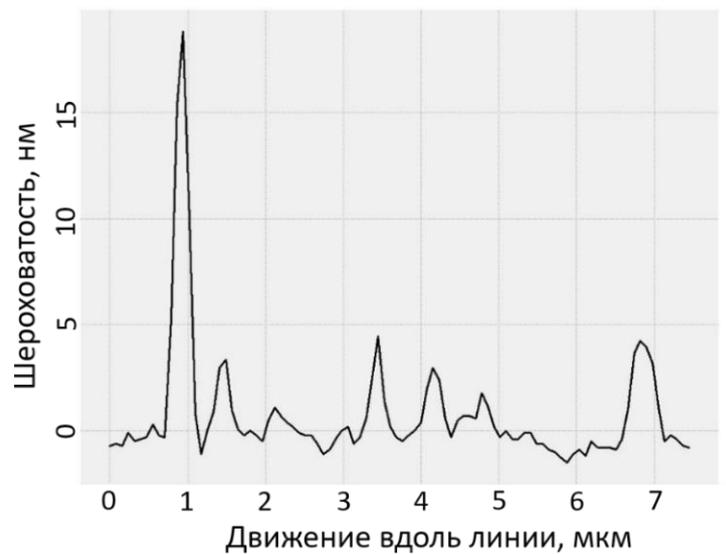
(б)

Рисунок 13 – (а) Результаты атомно-силовой микроскопии поверхности кремниевой пластины до жидкостной обработки. (б) Профиль сечения по высоте вдоль линии (синяя линия на рисунке 13а)<sup>14</sup>

Результаты АСМ поверхности кремниевой пластины после физической жидкостной обработки представлены на рисунке 14



(a)



(б)

Рисунок 14 – (а) Результаты атомно-силовой микроскопии поверхности кремниевой пластины после обработки 96%-ным этанолом. (б) Профиль сечения по высоте вдоль линии (синяя линия на рисунке 14а)

<sup>14</sup> Все представленные в диссертации фотографии атомно-силовой микроскопии предоставлены сотрудником ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора Зайцевым Б.Н.

. Размер анализируемой области  $18 \times 18$  мкм (рисунок 14). На фотографии присутствуют единичные частицы высотой  $\geq 12$  нм. Поверхность относительно однородная. Черные полосы на фотографии, расположенные параллельно осям, являются результатами редактирования файла и не относятся к шероховатости. Анализ профиля сечения вдоль линии (рисунок 14б) показал наличие шероховатости с амплитудой  $\sim 5$  нм и частиц размером до  $\sim 18$  нм.

Результаты АСМ поверхности кремниевых пластин, обработанных методами ХЖО, представлены в таблице 7.

Таблица 7 – Результаты атомно-силовой микроскопии поверхности пластин после химической жидкостной обработки

Метод ХЖО	Амплитуда шероховатости, нм	Размер посторонних частиц, нм
1-ХЖО	$\sim 2$	до 15
2-ХЖО	$\sim 4$	до 7
3-ХЖО	$\sim 6$	до 25
4-ХЖО	$\sim 4$	до 35
5-ХЖО	$\sim 8$	до 33

Все методы ХЖО показали хорошие результаты по важному параметру – амплитуда шероховатости поверхности. Однако из данных, представленных в Приложении А «Результаты атомно-силовой микроскопии поверхности кремниевых пластин после этапов очистки и функционализации» и таблице 7, видно, что везде на поверхности присутствуют частицы, высота которых варьируется в диапазоне 7-35 нм. Исходя из анализа результатов размеров посторонних частиц, полученных методом АСМ, можно сделать заключение, что наиболее подходящим способом очистки поверхности является метод 2-ХЖО. Результаты одного из исследуемых образцов, обработанного по методу 2-ХЖО (таблица 5) представлены на рисунке 15. Фотографии поверхности остальных пластин после ХЖО представлены в Приложении А.

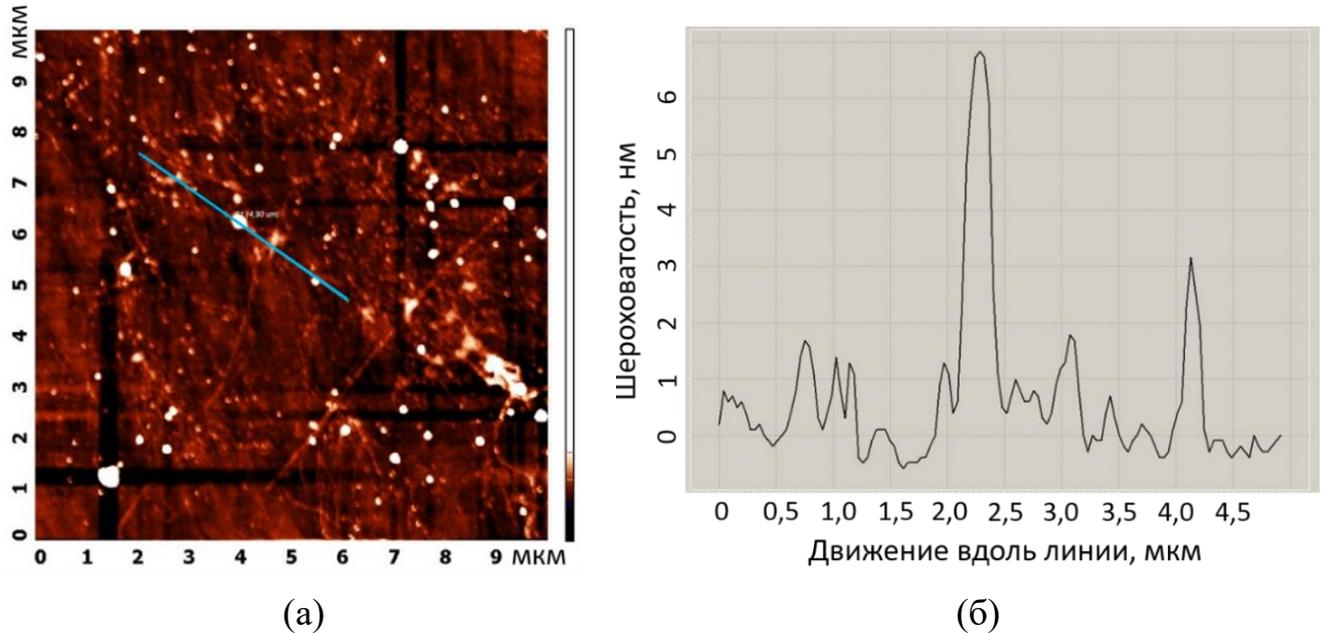


Рисунок 15 – (а) Результаты атомно-силовой микроскопии поверхности кремниевой пластины после обработки  $\text{H}_2\text{O}_2:\text{H}_2\text{O} = 1:3$ ,  $t=10$  мин,  $T=25$  °С (2-ЖХО). (б) Профиль сечения по высоте вдоль линии (синяя линия на рисунке 15а)

Как видно из рисунка 15, на поверхности после химической жидкостной обработки по методу 2-ХЖО присутствуют посторонние частицы размером до  $\sim 7$  нм, шероховатость поверхности небольшая и составляет  $\sim 4$  нм.

Как следует из представленных результатов, использование методов ХЖО и ФЖО приводит к уменьшению шероховатости и сокращению числа посторонних частиц по сравнению с необработанной поверхностью. Наилучший эффект показал метод 2-ХЖО ( $\text{H}_2\text{O}_2:\text{H}_2\text{O} = 1:3$ ,  $t=10$  мин,  $T=25$  °С).

Эффективность методов ХЖО по сравнению с ФЖО связана с механизмом удаления загрязнений с поверхности. ФЖО основана на процессе физического растворения адсорбированных загрязнений, то есть на переходе веществ в раствор без химических изменений. Используемый раствор этанола способен растворять органические соединения, смывать механические частицы, при этом не вступать во взаимодействие с поверхностью НП-биосенсора. Растворы, применяемые в методах ХЖО, обладают большим редокс-потенциалом и вступают в химические реакции, в частности окислительно-восстановительные, тем самым переводя загрязнения в легкоудаляемые соединения. Кроме того, они способны вступать во взаимодействие с поверхностным слоем оксида кремния, растворяя его.

Стоит учитывать наличие соединительных контактов между кристаллом и корпусом микросхемы при выборе метода очистки. В данной работе соединение осуществлялось с использованием алюминиевых проводов. Исходя из химических свойств алюминия, возможно протекание реакции окисления при применении методов ХЖО. Поскольку нельзя гарантировать отсутствие взаимодействия растворов с алюминиевыми контактами, использование кислот и оснований может привести к поломке НП-биосенсора.

Аналогичные выводы получены при исследовании растворов «пираньи», деионизованной воды, изопропанола и смеси этанола и ацетона (1:1) [148]. По результатам экспериментов установлено, что эффективной заменой сильного окислителя – раствора «пиранья», подходит смесь этанола и ацетона в качестве мягкой очистки поверхности [148]. Так же показано, что использование этанола и ацетона позволяет успешно проводить дальнейшую процедуру иммобилизации рецепторов.

Физическая жидкостная обработка поверхности показывает аналогичные результаты шероховатости поверхности в сравнении с химической жидкостной обработкой. Однако она меньше оказывает разрушающего влияния на составные элементы биосенсора и имеет свои преимущества для очистки поверхности от загрязнений.

### **3.1.2 Результаты функционализации поверхности**

Иммобилизация рецепторов на поверхности является важным этапом создания НП-биосенсора, от которого зависит его селективность и чувствительность. В литературе описаны различные методы, позволяющие создать рецепторный слой. Основные требования, предъявляемые к ним, заключаются в формировании однородного монослоя с минимальной толщиной.

Физическая адсорбция рецепторов – самый простой из используемых методов иммобилизации, основанный на естественной адсорбции рецепторов на поверхность НП-биосенсора. Молекула рецептора удерживается на поверхности за счет электростатических и/или Ван-дер-Ваальсовых взаимодействий.

Использование данного метода позволяет сохранить биологическую активность рецепторов, поскольку они не вступают в химические взаимодействия, минимизировать влияние эффекта экранирования. Также этот метод удобен при введении биосенсоров в массовое производство, поскольку рецепторы можно хранить в удобной форме (в буферах для хранения, лиофилизированной форме). Однако применение физической адсорбции приводит к созданию неоднородного слоя, в котором рецепторы не ориентированы в нужном направлении.

Иммобилизация рецепторов методом ковалентного связывания заключается в связывании рецепторов с поверхностью НП-биосенсора посредством промежуточного соединения – кросс-линкера. В результате образуется ориентированный слой рецепторов.

В диссертационной работе исследовали методы физической адсорбции рецепторов и их ковалентного связывания.

Исследование эффективности метода физической адсорбции антител проводили путем детекции специфической реакции «антитело-антиген», результаты представлены в разделе «3.4.3 Результаты детекции вируса осповакцины (штамм Л-ИВП)».

Качество метода ковалентного связывания зависит от правильности выбора кросс-линкера. Например, при использовании антител IgG необходимо ориентировать их Fab-фрагментами от поверхности кристалла микросхемы, то есть связывать с молекулами кросс-линкера Fc-фрагменты иммуноглобулина. Поскольку на концах Fc-фрагментов находится кислотная функциональная группа COOH-группа, то одна из ФГ кросс-линкера должна вступать во взаимодействие с COOH-группой антитела. Например, аминогруппа ( $-\text{NH}_2$ ), кислотная группа ( $-\text{COOH}$ ), галогены ( $-\text{Hal}$ ), гидроксильная группа ( $-\text{OH}$ ) и т.п. В зависимости от метода очистки кремниевая поверхность кристалла может содержать OH-группу или H-группу. Следовательно, вторая ФГ кросс-линкера должна реагировать с ними, например, алкоксильная группа ( $-\text{OR}$ , где R – органический заместитель), непредельные углеводороды ( $>\text{C}=\text{C}<$ ,  $-\text{C}\equiv\text{C}-$ ) и т.п. Исходя из этих условий, в качестве кросс-линкера при иммобилизации антител используются такие

соединения, как силаны, амины, карбоксильные соединения, непредельные углеводороды (алкены, алкины), тиолы, альдегиды, гидроксилы [149].

В работе для иммобилизации антител методом ковалентного связывания исследовали функционализацию поверхности кремниевой пластины двумя наиболее распространенными кросс-линкерами: (3-аминопропил) триэтоксисиланом и глутаровым альдегидом. Результаты АСМ представлены в таблице 8.

Таблица 8 – Результаты атомно-силовой микроскопии поверхности кремниевых платин после функционализации кросс-линкером

Кросс-линкер	Амплитуда шероховатости, нм	Размер посторонних частиц, нм
25%-ный АРТЭС в этаноле	~4	до 9
1%-ный ГА в ФСБ	~2	до 30
2,5%-ный ГА в ФСБ	~5	до 70

Для исследуемых пластин наилучший результат показало использование паров 25%-ного АПТЭС в этаноле. АСМ поверхности после функционализации представлена на рисунке 16. Контроль (очищенная поверхность кристалла до функционализации) представлен на рисунке 14.

При сравнении полученного результата с контролем видно образование слоя кросс-линкера [168]. На поверхности встречаются участки с высотой до 9 нм. В то время как по литературным данным, высота монослоя молекул АПТЭС составляет 0,9-1,2 нм [131,166]. Возможно, наблюдаемые высоты вызваны олигомеризацией молекул АПТЭС посредством взаимодействия  $C_2H_5O$ -групп.

Предполагалось, что использование ГА, обладающего двумя функциональными группами, должно уменьшать олигомеризацию. Однако при использовании ГА на поверхности наблюдаются частицы высотой до 70 нм (Приложение А). Вероятно, молекулы ГА вступили в реакции олигомеризации. Подобное состояние поверхности не подходит под критерии, предъявляемые этапу иммобилизации. По этой причине в дальнейших работах использовали метод ковалентного связывания посредством АПТЭС.

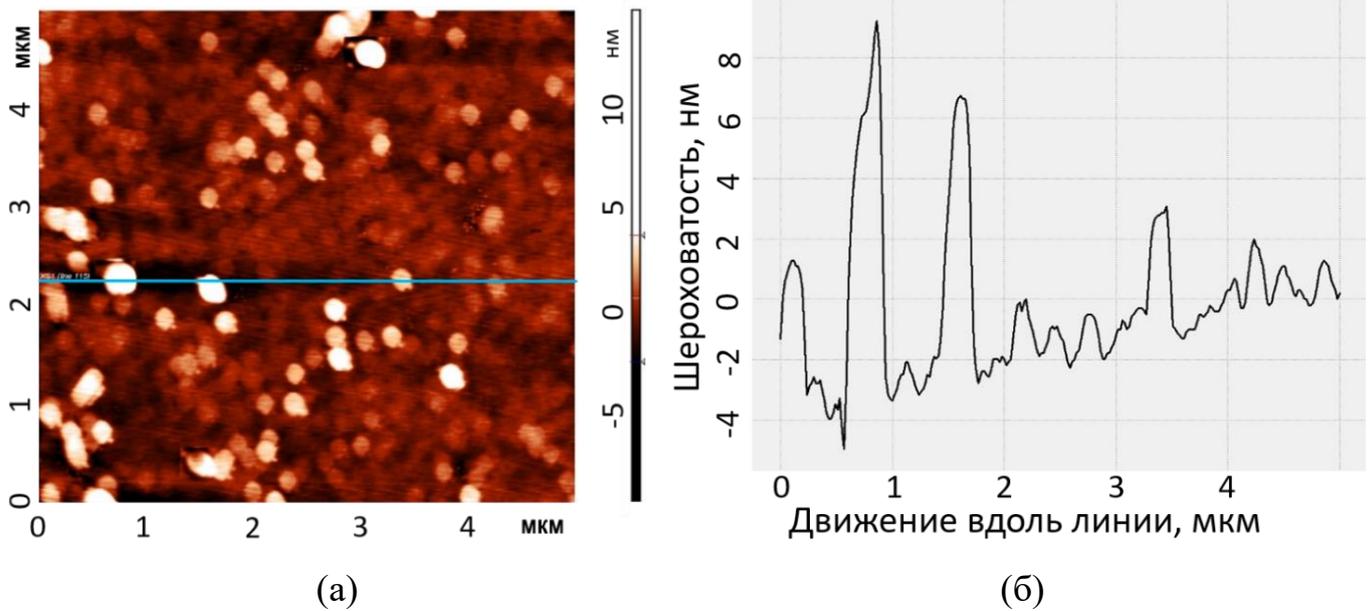
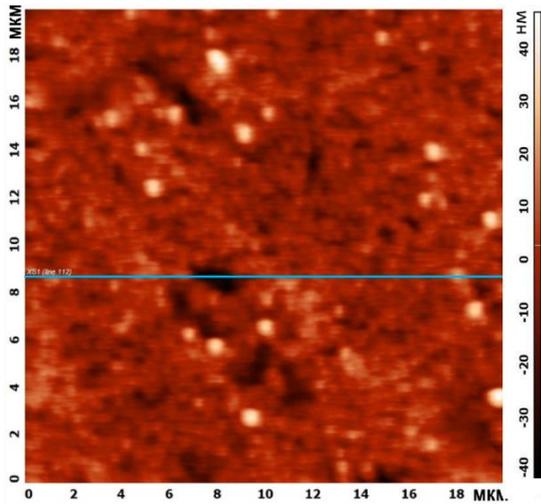


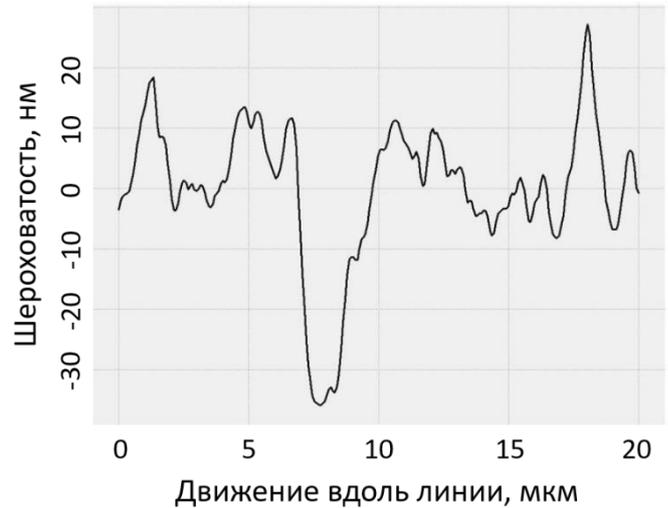
Рисунок 16 – (а) Результаты атомно-силовой микроскопии поверхности кремниевой пластины после функционализации в парах 25%-ного раствора АПТЭС в этаноле. (б) Профиль сечения по высоте вдоль линии (синяя линия на рисунке 16а)

Проводили электростатическое связывание функционализированной поверхности с моноклональными антителами, специфичными к S-белку коронавируса SARS-CoV-2, и анализировали методом АСМ. Результаты представлены на рисунке 17. Контроль представлен на рисунке 16.

Как видно из рисунка 16, в целом поверхность однородна. Имеются единичные частицы высотой до 25 нм, средняя высота составляет 20 нм. Вероятно, произошло взаимодействие антител между собой. При сравнении с контролем (рисунок 16) можно говорить об иммобилизации антител. В данном случае не проводилась активация АПТЭС или антител, поэтому взаимодействие между Fc-фрагментом антител и  $\text{NH}_2$ -группой АПТЭС – электростатическое [171,202,203,213]. Эффективность иммобилизации по описанному методу определяли путем детектирования ВПЧ коронавируса SARS-CoV-2 (описано в «3.4.2 Результаты детекции вирусоподобных частиц коронавируса SARS-CoV-2»).



(a)



(б)

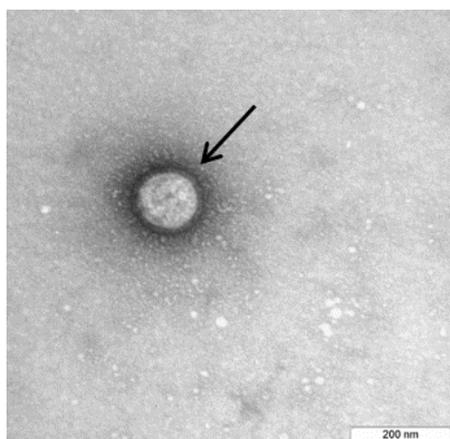
Рисунок 17 – (а) Результаты атомно-силовой микроскопии поверхности кремниевой пластины с иммобилизованными моноклональными антителами, специфичными к S-белку коронавируса. (б) Профиль сечения по высоте вдоль линии (синяя линия на рисунке 17а)

### 3.2 Электронная микроскопия вирусов

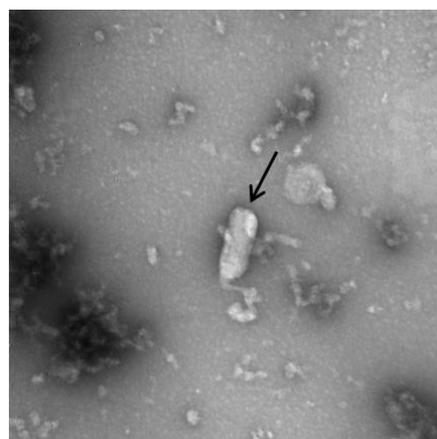
Наличие вирусных частиц в исходных суспензиях подтверждали методом электронной микроскопии с негативным контрастированием 2%-ным водным раствором уранилацетата. В работе использовали микроскоп JEM-1400 (JEOL, Япония) с цифровой камерой «Jeol» и цифровой камерой бокового вывода с программным пакетом iTEM (SIS, Германия).

На рисунке 18а представлен результат микроскопии вируса гриппа А (подтип А(Н1N1)рdm09). На электронной фотографии наблюдаются частицы шарообразной формы, морфологически идентифицированные как вирус гриппа [213]. Физический титр вируса гриппа А составил  $10^{10}$  ВЧ/мл.

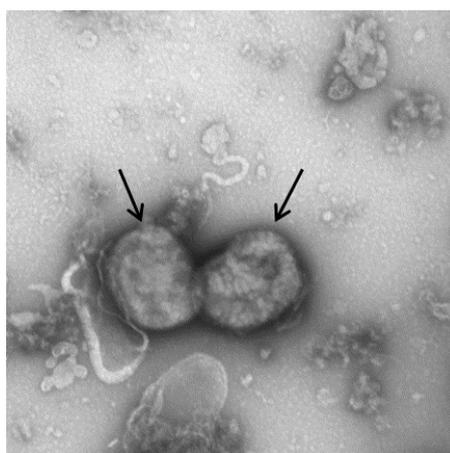
На рисунке 18б представлен результат микроскопии ВПЧ коронавируса SARS-CoV-2. Поскольку сборка ВПЧ выполнена на основе рекомбинантного вируса везикулярного стоматита с удаленным геном поверхностного гликопротеина, то ВПЧ обладали пулеобразной формой [214]. Физический титр ВПЧ составил  $10^{10}$  ВЧ/мл. Помимо вирусных частиц в пробе присутствовали посторонние белки, прошедшие через сахарозный слой при выделении из культуральной жидкости.



(a)



(б)



(в)

Рисунок 18 – (а) Электронная фотография вируса гриппа А (подтип А(Н1N1)рdm09)<sup>15</sup>. (б) Электронная фотография вирусоподобных частиц коронавируса SARS-CoV-2. (в) Электронная фотография вируса осповакцины штамм (Л-ИВП)

На рисунке 18в представлен результат микроскопии вируса осповакцины. На электронной фотографии наблюдаются две частицы размером  $280 \times 200$  нм, морфологически идентифицированные как вирус осповакцины [215,220]. Физический титр составил  $10^9$  ВЧ/мл.

### 3.3 Специфическое взаимодействие антитело-антиген в растворе с низкой ионной силой

Из литературных данных известно, что ионная сила раствора влияет на сигнал НП-биосенсора при детекции специфической реакции. Эксперименты по

<sup>15</sup> Все представленные в диссертации фотографии электронной микроскопии предоставлены сотрудником ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора Тарановым О.С.

детекции ВПЧ коронавируса SAR-CoV-2 и ВОВ проводили в растворе с низкой ионной силой (0,1 мМ NaCl или деионизованной воде). Однако смена ионной силы раствора может привести к изменениям конформации белков и стать причиной отсутствия специфического взаимодействия. Подтверждение сохранения специфического взаимодействия антитело-антиген в растворе с низкой ионной силой проводили методом твердофазного ИФА в соответствующих условиях. Один из результатов ИФА представлен на рисунке 19.

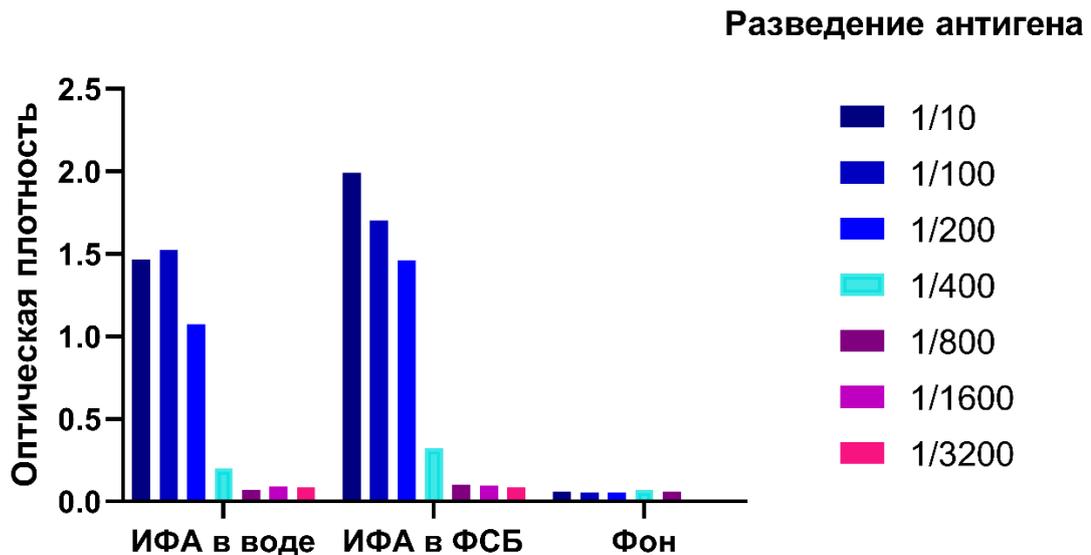


Рисунок 19 – Взаимодействие поликлональных антител, специфичных к вирусу осповакцины (штамм Л-ИВП), и вирусом осповакцины в твердофазном иммуоферментном анализе в деионизованной воде (ИФА в воде) и фосфатно-солевом буфере (ИФА в ФСБ)

Результаты ИФА показали сохранение специфического взаимодействия между антителами и антигеном в растворе с низкой ионной силой (рН~6), однако оно слабее, чем при протекании той же реакции в буфере ФСБ (рН~7). Следовательно, возможные конформационные изменения в структуре белков, связанные с изменением ионной силы раствора и рН, не оказывают значительного влияния на протекание специфического взаимодействия антитело-антиген в деионизованной воде. При разведении антител от 1/1600 значения ОП в реакции ИФА в ФСБ и в воде имеют схожие значения, следовательно, при больших разведениях антител реакция ниже чувствительности прибора.

Следовательно, специфическое связывание антитело-антиген сохранено при проведении реакции в растворе с низкой ионной силой, несмотря на возможные конформационные изменения в белках.

### **3.4 Результаты детекции вирусов**

Исследование качества модификации поверхности НП-биосенсора осуществляли посредством детекции специфической реакции антитело-антиген [153]. Детекцию вируса гриппа А проводили совместно с Институтом биомедицинской химии (г. Москва), детекции ВПЧ коронавируса SARS-CoV-2 и вируса осповакцины проводили с Институтом физики полупроводников им. Ржанова СО РАН (г. Новосибирск).

#### **3.4.1 Результаты детекции вируса гриппа А (подтип А(Н1N1)pdm09)**

Подготовку поверхности НП-биосенсора осуществляли как описано в «2.3.4.1 Детекция вируса гриппа А (подтип А(Н1N1)pdm09)».

В данном случае иммобилизацию антител проводили путем ковалентного связывания. С этой целью слой кросс-линкера АПТЭС активировали с помощью ДТССП. Эффективность процесса иммобилизации антител осуществляли путем сравнения вольтамперных характеристик (ВАХ) до и после ее проведения. Кривые представлены на рисунке 20.

Показателем эффективной иммобилизации антител является смещение кривых ВАХ (кривые 2, 3) по сравнению с кривыми ВАХ без антител (кривая 1) на рисунке 20 [28]. Измеренные ВАХ в жидких средах после иммобилизации смещались на ~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.

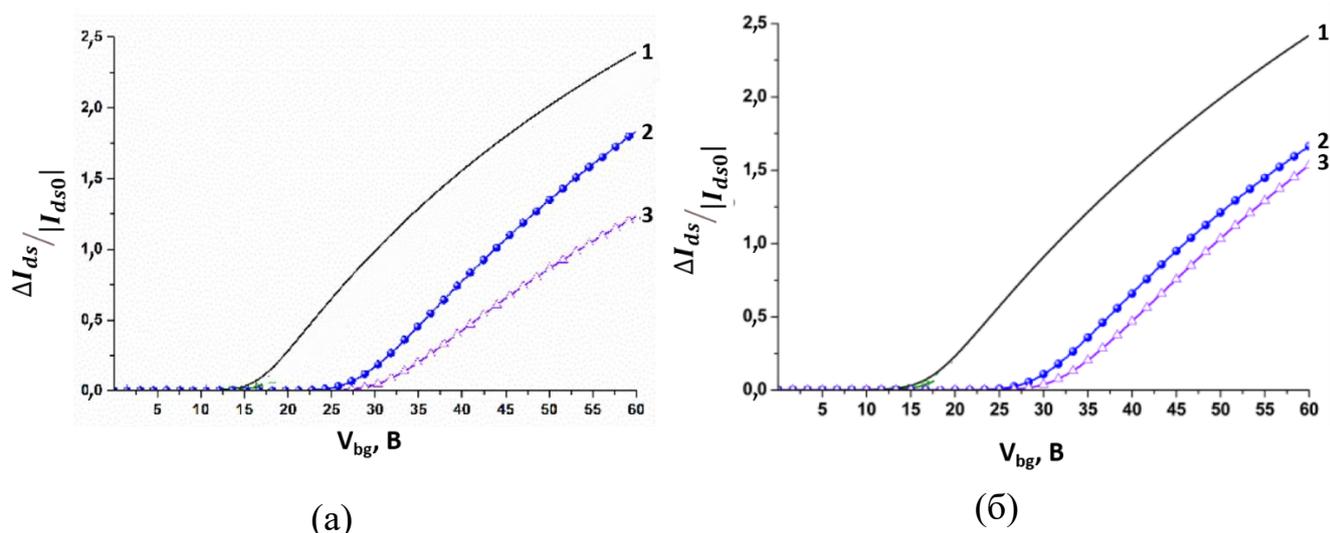


Рисунок 20 – Вольтамперные характеристики НП-биосенсоров до и после иммобилизации антител: (а) специфичных к вирусу гриппа А (рабочий НП-биосенсор), (б) специфичных к вирусу гепатита В (контрольный НП-биосенсор): 1 – кривые ВАХ, полученные после функционализации поверхности АПТЭС; 2 – кривые ВАХ после 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 (по рекомендации системы сбора и хранения данных и производителя микросхем)

С помощью ВАХ выбрана рабочая точка биосенсора:  $V_{bg}=55$  В. Данное значение снижает риск смещения сигнала в область закрытия, где  $I_{ds} \sim 10^{-10}$  А.

Эффективность модификации так же оценивали путем детекции вирусных частиц, что позволяло подтвердить сохранение биологической активности антител и их иммобилизацию.

Результаты эксперимента по детекции вируса гриппа А представлены в виде сенсограмм – зависимости безразмерной величины тока  $\Delta I_{ds}/|I_{ds0}|$ , выраженной в относительных единицах, от времени [131]:

$$R = \frac{\Delta I_{ds}}{|I_{ds}|} = \frac{\Delta I_{ds}p}{|I_{ds0}p|} - \frac{\Delta I_{ds}k}{|I_{ds0}k|} \quad (5)$$

где  $I_{ds}p$  – величина тока рабочего НП-биосенсора после добавления анализируемого раствора, (А);  $I_{ds}k$  – величина тока контрольного НП-биосенсора после добавления анализируемого раствора, (А);  $I_{ds0}p$  – величина тока рабочего НП-биосенсора в начальный отрезок времени измерений до внесения исследуемого образца, (А);  $I_{ds0}k$  – величина тока контрольного НП-биосенсора в начальный отрезок времени измерений до внесения исследуемого образца, (А). В качестве рабочего НП-биосенсора (р) использованы устройства с иммобилизованными

антителами против вируса гриппа А. В качестве контрольного НП-биосенсора (к) использованы устройства с иммобилизованными антителами против вируса гепатита В.

На рисунке 21 представлены сенсограммы, полученные при детекции вируса гриппа А в концентрациях  $10^3$ ,  $10^4$ ,  $10^5$ ,  $10^7$ ,  $10^9$ ,  $10^{10}$  ВЧ/мл.

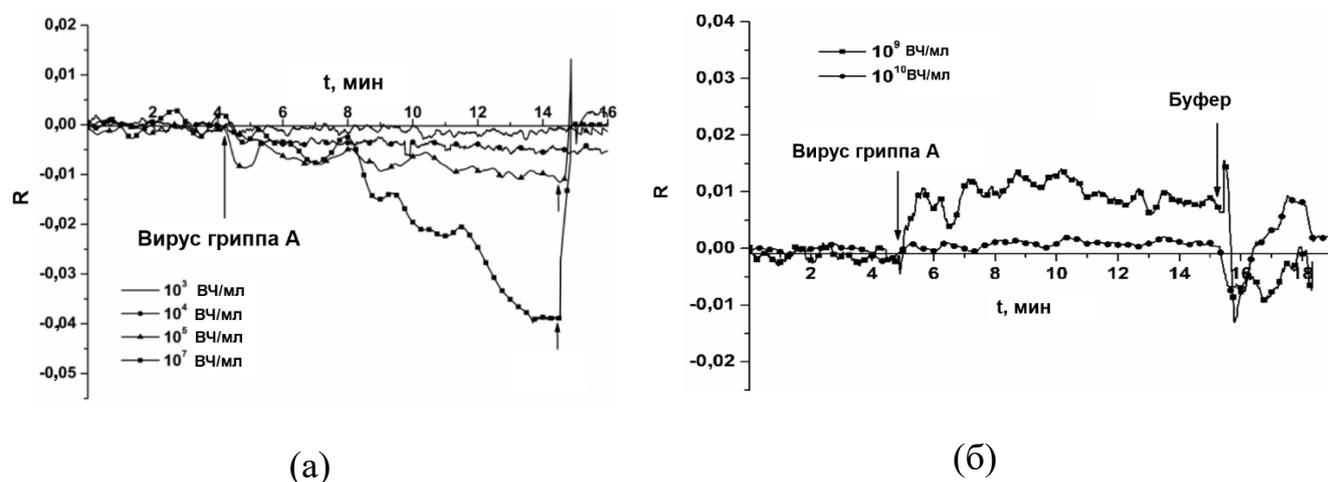


Рисунок 21 – Сенсограммы, полученные при детекции вируса гриппа А при различных концентрациях вирусных частиц: (а) – концентрации вирусных частиц в суспензии  $10^3$ ,  $10^4$ ,  $10^5$ ,  $10^7$  ВЧ/мл; (б) – концентрации вирусных частиц в суспензии  $10^9$ ,  $10^{10}$  ВЧ/мл; вирус гриппа А – момент внесения вирусной суспензии; буфер – момент промывки поверхности 1 мМ калий-фосфатным буфером, рН 7,4. Условия:  $V_{bg}=55$  В,  $V_{ds}=0,1$  В; объем КФБ в измерительной ячейке 100 мкл<sup>16</sup>

Кривые на рисунке 21 показывают уменьшение величины тока биосенсоров с иммобилизованными на их поверхности антителами против вируса гриппа А. Полученный результат согласуется с литературными данными [12]. Добавление вирусной суспензии с концентрацией  $\sim 10^3$  ВЧ/мл не приводило к изменению величины тока. НП-биосенсор хорошо реагировал на внесение пробы с концентрацией  $10^4$ - $10^7$  ВЧ/мл ( $\sim 10^{-16}$ - $10^{-13}$  М)<sup>17</sup>. 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

<sup>16</sup> Сенсограммы предоставлены сотрудниками ИБМХ Мальсаговой К.А., Ивановым Ю.Д.

<sup>17</sup> Для пересчета использовали формулу:  $n = N \times 10^3 / N_a$ , где *n* – количество молей, М; *N* – число вирусных частиц в мл, ВЧ/мл;  $N_a$  – число Авогадро ( $6,02 \times 10^{23}$ ), моль<sup>-1</sup>.

отрицательным эффективным электрическим зарядом<sup>18</sup> на поверхности раздела фаз «нанопроволока-исследуемая проба» в условиях эксперимента.

Стоит отметить, что увеличение количества вирусных частиц на поверхности НП-биосенсора приводило к уменьшению интенсивности изменения  $I_{ds}$ . Это связано с сокращением числа активных центров связывания, то есть с уменьшением количества свободных антител на поверхности НП [117]. Кроме того, увеличение количества вируса приводило к увеличению значения  $I_{ds}$  и насыщению поверхности биосенсора (рисунок 21б). Возможно, это связано с электростатическим взаимодействием белков, образованием агрегатов вирусных частиц и перераспределении электронной плотности в них. Теоретический расчет показал, что на нанопроволоку площадью  $S_{NW} \sim 3 \times 10^{-11} \text{ м}^2$  максимально может адсорбироваться антигена, площадь которого  $S_{AG} \sim 3 \times 10^{-14} \text{ м}^2$ , в количестве  $N$  штук, (рисунок 18а) [213]:

$$N = \frac{S_{NW}}{S_{AG}} \sim 1 \times 10^3, \text{ шт} \quad (6)$$

На сенсограммах так же наблюдается флуктуация токов. Она может возникать в результате адсорбции/десорбции одиночных вирусных частиц, поскольку реакция антитело-антиген является обратимой, несмотря на достаточно высокие значения константы связывания ( $K_D = 10^5 - 10^{12} \text{ М}^{-1}$ ).

На рисунке 22 представлены сенсограммы, полученные при взаимодействии вируса гриппа А с иммобилизованными антителами, специфичными к вирусу гепатита В. Из рисунка видно, что внесение пробы вируса в различных концентрациях ( $10^4 - 10^7 \text{ ВЧ/мл}$ ) не вызывает изменение сигнала биосенсора. Следовательно, проведенная процедура модификации поверхности позволяет получать специфический сигнал при детекции целевых молекул.

---

<sup>18</sup> Эффективный заряд – заряд, которым обладают биологические молекулы в совокупности с их окружением (сольватная оболочка и т.д.).

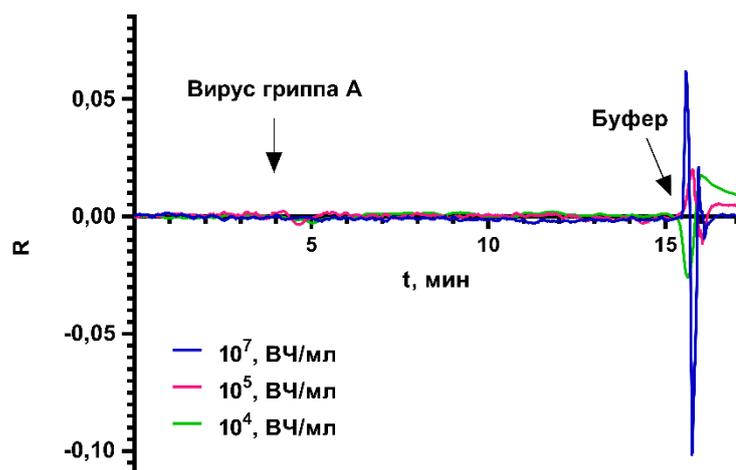


Рисунок 22 – Сенсограммы, полученные при детекции вируса гриппа А на НП-биосенсорах с иммобилизованными антителами, против вируса гепатита В: концентрации вирусных частиц в суспензии  $10^4$ ,  $10^5$ ,  $10^7$  ВЧ/мл; вирус гриппа А – момент внесения пробы вируса гриппа А; буфер – момент промывки поверхности 1 мМ калий-фосфатный буфером, рН 7,4. Условия:  $V_{bg}=55$  В,  $V_{ds}=0,1$  В; объем 1 мМ КФБ в измерительной ячейке 100

Так же проводили измерение влияния 1 мМ калий-фосфатного буфера на величину тока НП-биосенсора (рисунок 23). В результате зафиксирован только шум, следовательно, буфер не вносит вклад в изменение проводимости при детекции вирусных частиц.

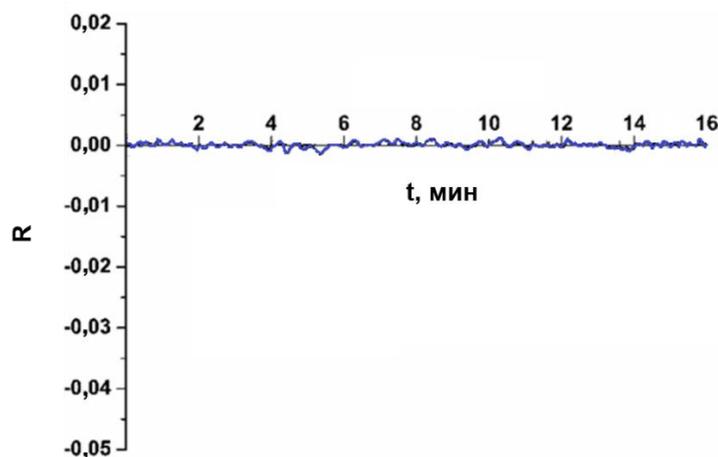


Рисунок 23 – Сенсограммы, полученные при внесении чистого буфера (толстая синяя линия)

По представленным результатам можно сделать вывод о том, что использование ковалентного связывания позволяет специфически детектировать

целевую молекулу. Используемая аналитическая система чувствительна на внесение анализируемой пробы с концентрацией вирусных частиц  $10^4$  ВЧ/мл.

### **3.4.2 Результаты детекции вирусоподобных частиц коронавируса**

#### **SARS-CoV-2**

В предыдущем эксперименте по детекции вируса гриппа А необходимой частью аналитической системы являлась измерительная ячейка. Для экспресс-детекции подобная ячейка может быть неудобной и усложняет процесс анализа. По этой причине исследовали возможность проводить эксперимент путем нанесения капли образца на подготовленную поверхность НП-биосенсора (рисунок 11).

Модификацию поверхности проводили, как описано в «2.3.4.2 Детекция вирусоподобных частиц коронавируса SARS-CoV-2». Данный эксперимент направлен на упрощение процедуры подготовки поверхности НП-биосенсора. С этой целью иммобилизацию рецепторов проводили посредством электростатического взаимодействия между  $\text{NH}_2$ -группой АПТЭС, прикрепленному к поверхности нанопроволоки, и  $\text{COOH}$ -группой антител [171,202,203]. Эффективность проведенных процедур оценивали путем детекции ВПЧ коронавируса и сравнении полученных результатов с контролем.

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 24. Красная линия соответствует экспериментальному НП-биосенсору с иммобилизованными моноклональными антителами против S-белка коронавируса, черная линия – контрольному НП-биосенсору без антител.

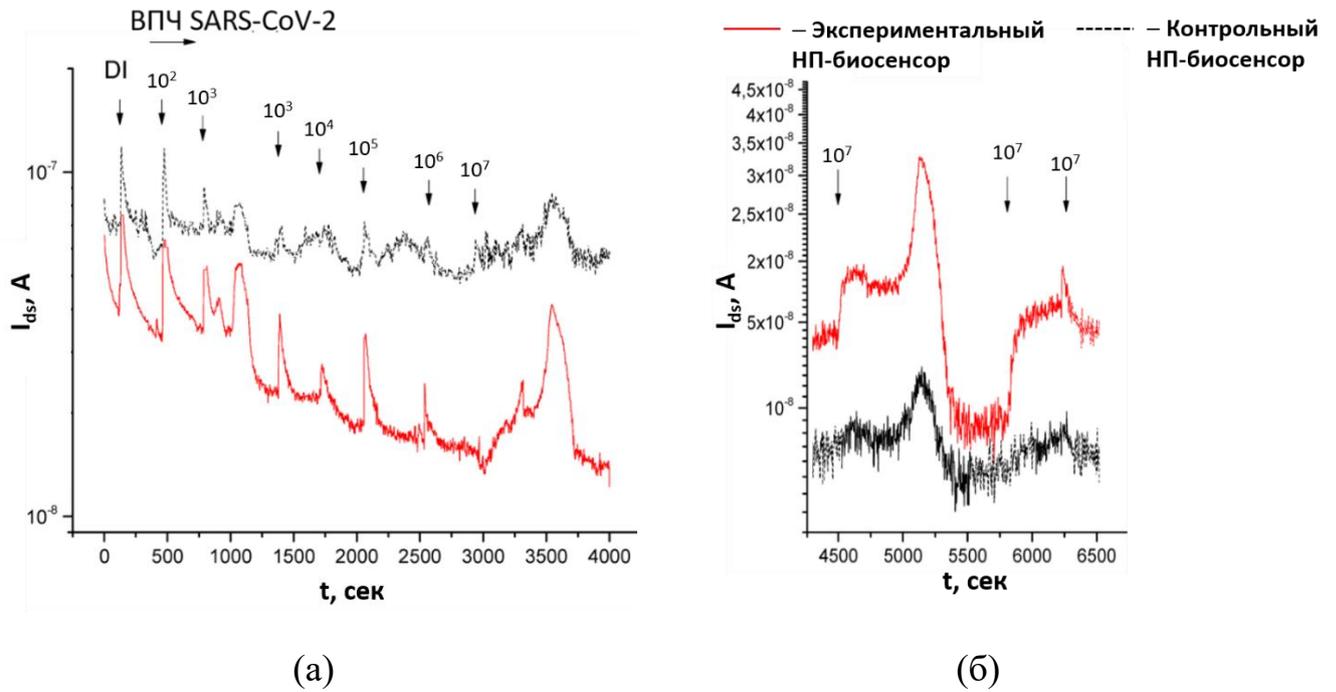


Рисунок 24 – Временная зависимость величины тока двух НП-биосенсоров, полученная после добавления на их поверхность вирусоподобных частиц коронавируса в количестве: (а) –  $10^2$ - $10^7$  ВЧ/мл; (б) –  $10^7$  ВЧ/мл. DI – момент внесения деионизованной воды. Красная линия (эксперимент) – изменение величины тока первого НП-биосенсора в ответ на специфическую реакцию антитело-антиген на его поверхности. Черная линия (контроль) – изменение величины тока в ответ на вероятное присутствие вирусоподобных частиц коронавируса на поверхности второго НП-биосенсора. Условия эксперимента:  $V_{ds}=0,15$  В, деионизованная вода<sup>19</sup>

Как видно из рисунка 24а, НП-биосенсор с иммобилизованными антителами (красная линия) реагировал на внесение пробы вируса, в то время как  $I_{ds}$  контрольного НП-биосенсора изменялась в пределах шума. Это свидетельствует о том, что на поверхности экспериментального НП-биосенсора присутствуют иммобилизованные антитела. К тому же, антитела сохранили свою активность. Пики в момент внесения пробы на рисунке 24 относятся к реакции биосенсора на поднесенную пипетку и не являются сигналом детекции.

Внесение пробы вируса ( $10^3$ - $10^7$  ВЧ/мл) приводит к уменьшению величины тока экспериментального НП-биосенсора (красная линия). Подобное поведение устройства с *n*-типом проводимости возможно при действии на него

<sup>19</sup> Представленные зависимости  $I_{ds}(t)$  предоставлены сотрудником ИФП им. А.В. Ржанова СО РАН Наумовой О.В.

отрицательного заряда. Можно сделать вывод о том, что комплекс «антитело-антиген» обладает отрицательным эффективным зарядом на поверхности раздела фаз. Полученные данные по детекции ВПЧ коронавируса согласуются с работами других исследователей [28,216]. Так, в работе [216] проводили детекцию спайкового белка SARS-CoV-2 с помощью антител и НП-биосенсора *n*-типа. В результате получено, что добавление антитела и антигена вместе изменяют поверхность НП-биосенсора, что приводит к большему снижению проводимости, чем добавление только антигена на поверхность биосенсора (как указывают авторы, спайковый белок SARS-CoV-2 обладает отрицательным зарядом).

Контрольный НП-биосенсор (черная линия) не изменял свои значения  $I_{ds}$ .

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.

Как в случае детекции вируса гриппа А, избыток ВПЧ на поверхности биосенсора приводил к насыщению нанопроволоки, что вызывало увеличение величины тока (красная линия) на рисунке 24б.

Как видно из проведенного анализа, использование небольшого объема анализируемой пробы возможно для проведения экспресс-детекции вируса. В эксперименте по детекции ВПЧ НП-биосенсор реагировал на внесение пробы с концентрацией  $10^3$  ВЧ/мл, в то время как при детекции вируса гриппа А устройство реагировало на внесение пробы с концентрацией  $10^4$  ВЧ/мл. Одной из причин этого может быть количество НП-биосенсоров на одном кристалле (рисунок 9): чем больше количество НП-биосенсоров, тем выше вероятность попадания целевой молекулы на сенсорный элемент и, следовательно, выше достоверность детекции целевой частицы.

### 3.4.3 Результаты детекции вируса осповакцины (штамм Л-ИВП)

Физическая адсорбция – один из методов иммобилизации рецепторов, проведение которого не требует больших временных затрат. Тем самым его можно считать перспективным для экспресс-детекции вирусов с помощью НП-биосенсора.

В литературных данных чаще встречаются работы, в которых иммобилизацию рецепторов проводят методом ковалентного связывания. Однако использование метода физической адсорбции дает возможность упростить подготовку НП-биосенсора к работе, сократить материальные затраты, а также увеличить срок годности используемых реагентов. По этой причине в эксперименте по детекции ВОВ исследовали возможность использования метода физической адсорбции для иммобилизации антител.

В качестве контроля определяли влияние вирусных частиц на величину тока биосенсора. Результаты измерения  $I_{ds}$  двух НП-биосенсоров представлены на рисунке 25.

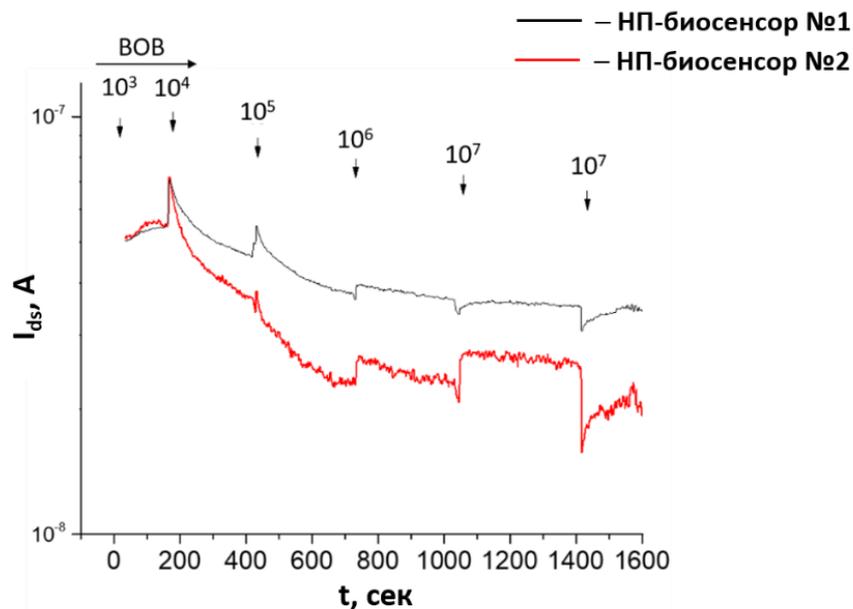


Рисунок 25 – Временные зависимости величины тока двух НП-биосенсоров, полученные после добавления на поверхность НП-сенсора суспензии вируса осповакцины:  $10^3$ - $10^7$  – концентрация вируса, ВЧ/мл

Рабочая точка выбрана таким образом, чтобы начальные значения  $I_{ds}$  двух независимых НП-биосенсоров совпадали (рисунок 25). 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 25, 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. В общем 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 26. Каждая точка на рисунке является результатом усреднения по 12-ти НП-биосенсорам.

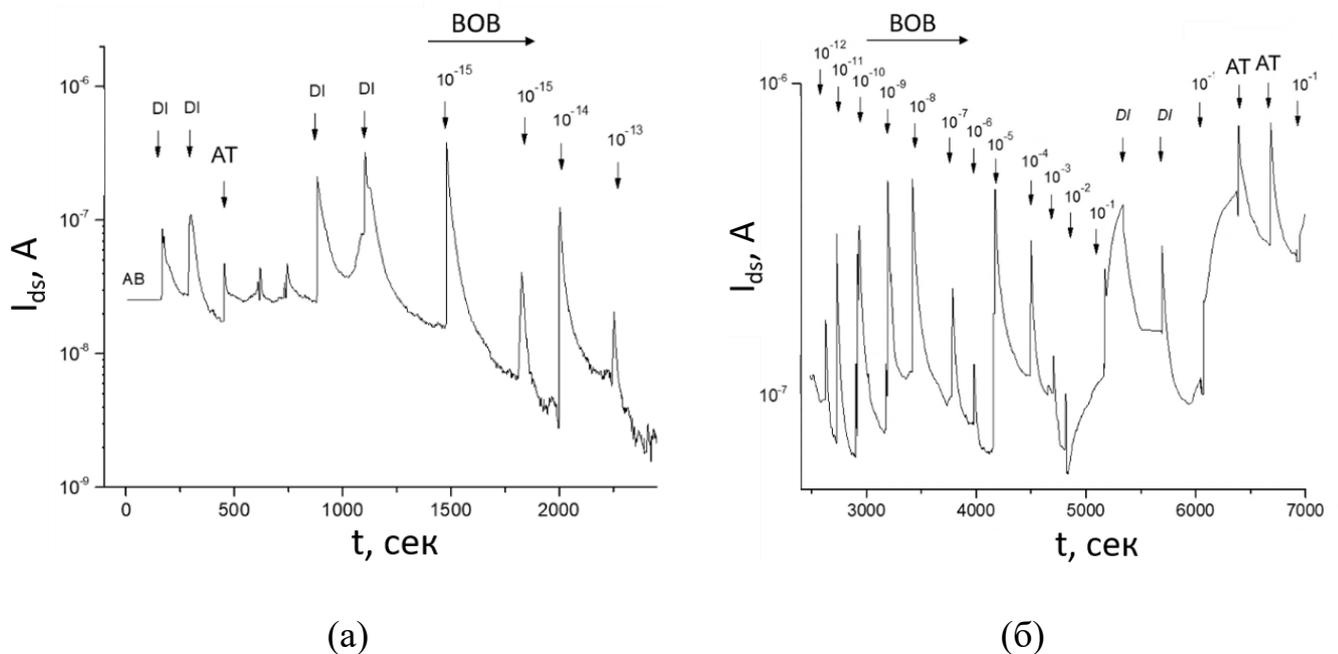


Рисунок 26 – Временная зависимость величины тока НП-биосенсора, полученная при детекции вируса осповакцины специфическими поликлональными антителами: DI – момент внесения на поверхность деионизованной воды; AT – внесение поликлональных антител;  $10^{-15}$ - $10^{-1}$  – внесение суспензии вирусных частиц в различном разбавлении (ВОВ:DI= $10^{-15}$ - $10^{-1}$ ). Электрические характеристики: (а) –  $V_{bg}=54$  В; (б) –  $V_{bg}=60$  В, деионизованная вода

Из рисунка 26 видно, что внесение деионизованной воды (DI) и разбавленного раствора ПКА практически не изменяло значения  $I_{ds}$  биосенсора. Можно говорить о том, что антитела на поверхности раздела фаз обладают эффективным зарядом, близким к нейтральному [216]. Начальное напряжение на

подзатворе биосенсора  $V_{bg}=54$  В соответствует режиму работы на линейном и чувствительном участке вольтамперной характеристики.

Внесении 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 величины тока  $\sim 1/2 I_{ds}$ , что несколько больше чем при адсорбции вируса на чистую поверхность (рисунок 25). 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 вступают в реакции взаимодействия с антителами и изменяют 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 немонотонному изменению значений  $I_{ds}$ , что связано с возникновением разного электрического заряда на поверхности нанопроволоки. 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 анализировали с помощью АСМ. Результаты представлены на рисунке 27.

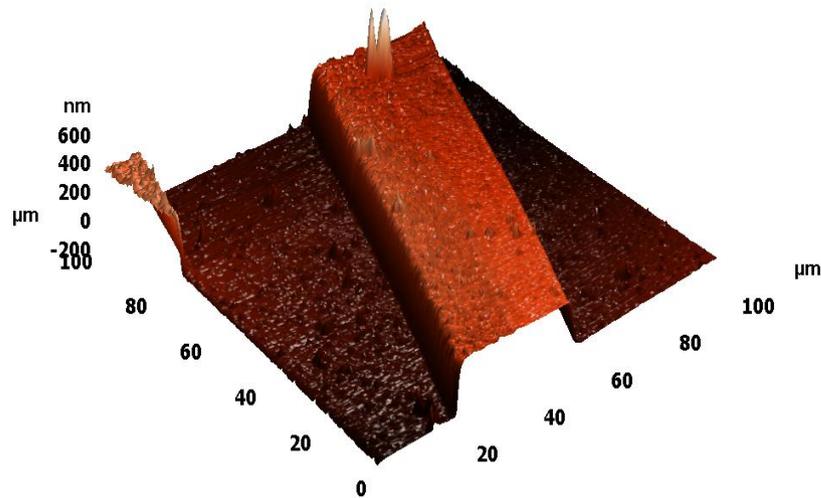


Рисунок 27 – Атомно-силовая микроскопия поверхности НП-биосенсора после детекции вируса осповакцины

На рисунке 27 наблюдается единственный объект на поверхности НП с размером, характерным для вируса осповакцины [220].

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 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 нанопроволоки 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 сигнала биосенсора и специфического.

По результатам проведенных экспериментов показано, что чувствительность биосенсора составляет  $\sim 10^3$  ВЧ/мл. Использование НП-биосенсора позволяет установить знак эффективного электрического заряда 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.

## ГЛАВА 4 Оптимизация конструкции биосенсора

### 4.1 Конструкция опытно-промышленного сенсора

Сигнал НП-биосенсора зависит от его электрических характеристик, наличия загрязнения поверхности (ионы, белки, молекулы), возникновения случайного и нежелательного электростатического потенциала в анализируемой пробе и др. Влияние перечисленных факторов контролируется посредством совершенствования технологии производства, метрологических методов контроля, использования электрода заземления.

Проведенный анализ литературных и экспериментальных данных показал, что введение электрода в жидкую пробу осуществляется «сверху» [10,13,28,115,117]. Подобное применение не удобно и может привести к поломке рабочих элементов НП-биосенсора, особенно при использовании небольшого объема анализируемой жидкой пробы. В диссертационной работе разработана конструкция опытно-промышленного НП-сенсор с *n*-типом проводимости (Патент на полезную модель №215954, Приложение В), направленная на упрощение использования электрода заземления. В рамках выполненного исследования изготовлена опытная партия микросхем, согласно договору № 0698/22 с АО «НЗПП Восток» (рисунок 28).

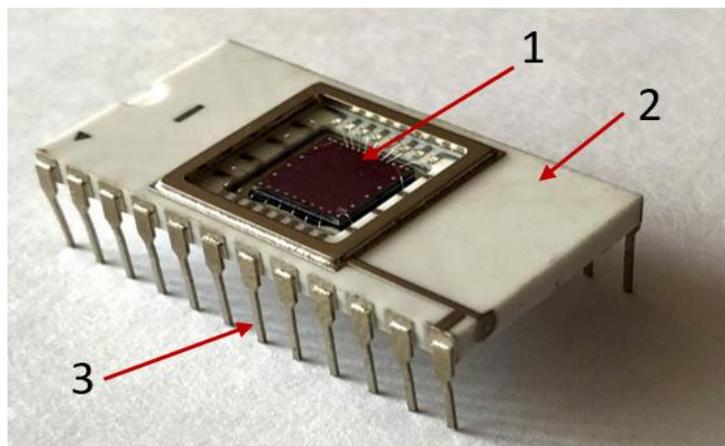


Рисунок 28 – Внешний вид микросхемы: 1 – кристалл микросхемы, на поверхности которой находится массив из 10 НП-сенсоров; 2 – корпус микросхемы; 3 – ножки микросхемы

Особенность разработанной конструкции заключается в интегрировании двух электродов заземления непосредственно на поверхность кристалла микросхемы. Топология и электрическая принципиальная схема подключения НП-сенсора представлены на рисунке 29.

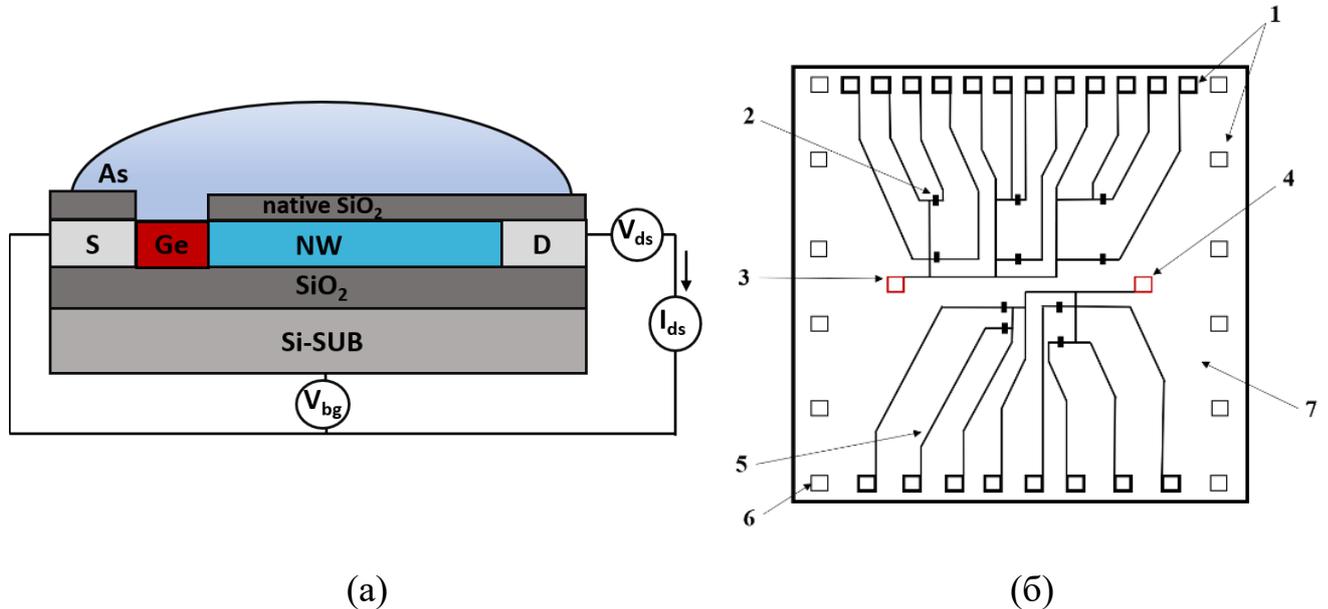


Рисунок 29 – (а) Электрическая принципиальная схема подключения НП-сенсора: native  $\text{SiO}_2$  – нативный слой  $\text{SiO}_2$ ; NW – кремниевая нанопроволока;  $\text{SiO}_2$  – скрытый диэлектрик; Si-SUB – управляющий электрод или тыловой затвор; S – исток; D – сток; Ge – электрод заземления;  $V_{vd}$  – 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

Кристалл микросхемы изготовлен по КНИ-технологии. На кристалле сформирован массив из десяти НП-сенсоров (2, рисунок 29б), которые представляют собой полоски кремния, легированные фосфором. Ширина НП составляет  $W=3$  мкм, длина  $L=10$  мкм, высота  $H=20-30$  нм. НП-сенсоры подключены одним выводом к электроду истока (S, рисунок 29а) и электроду заземления (3,4, рисунок 29б). Другим выводом НП-сенсоры подключены к индивидуальным контактными площадкам, выполняющим функцию стока (5, рисунок 29б).

НП-сенсор подключается к постоянному источнику напряжения  $V_{ds}$  – напряжение в цепи исток-сток ( $V_{ds}$ , рисунок 29а). С его помощью выбирается режим работы устройства. Типовое значение регулируемого напряжения на подзатворе для НП-биосенсора в режиме с максимальной чувствительностью находится в диапазоне  $V_{bg}=0-30$  В ( $V_{bg}$ , рисунок 29а).

#### 4.2 Вольтамперные характеристики опытно-промышленных сенсоров

После изготовления партии опытно-промышленных микросхем измеряли вольтамперные характеристики совместно с представителями АО «НЗПП Восток», согласно договору № 0698/22. 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 [217]. Выбор верхней границы  $V_{bg}$  основывался на том факте, что  $V_{bg}>30$  В приводит к электрическому пробоему НП-сенсора. Анализ зависимости показателей  $I_{ds}$  и  $V_{bg}$  необходим для установления работоспособности изготовленного сенсора, выбора режима работы и оценки качества микросхемы.

Тестирование осуществляли с помощью амперметра (National Instruments PXIe 4163, США) и постоянного источника напряжения (National Instruments PXI 4135, США). Относительная погрешность измерения величины тока  $0,10\%+100$  пА, напряжения –  $0,022\%+1$  мВ. Результаты представлены в таблице 9.

В случае, когда на подзатвор не подавали напряжение ( $V_{bg}=0$  В), НП-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 величины токов сенсоров № 1, № 2 и № 4 в 10 раз и не влияло на изменение величины 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  $0,1-1\times 10^{-6}$  А всех НП-сенсоров.

На рисунке 30 представлены вольтамперные характеристики исследуемых НП-сенсоров. Кривые десяти сенсоров сдвинуты друг относительно друга, но общий вид зависимости сохраняется [130].

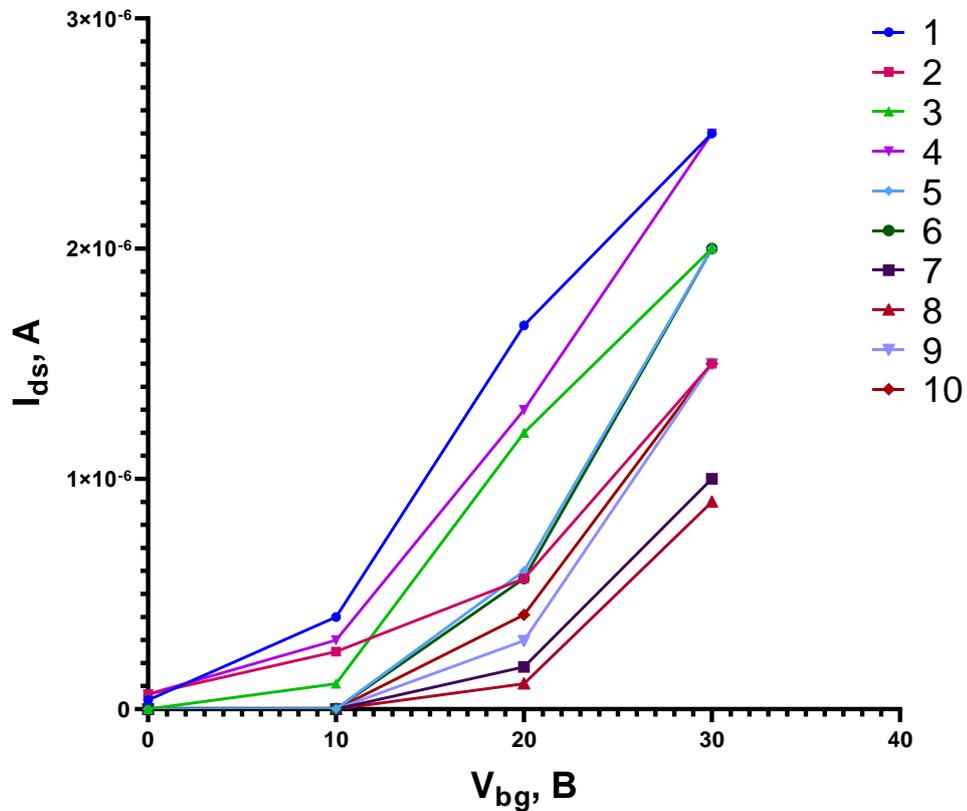


Рисунок 30 – Экспериментальные вольтамперные характеристики НП-сенсоров: 1-10 – номер НП-сенсора на кристалле микросхемы

С целью моделирования нелинейной зависимости переменных  $I_{ds}$  и  $V_{bg}$  проводили регрессионный анализ. Для каждого НП-сенсора рассчитали полиномиальную регрессию с 1-го по 3-й порядки. Результаты степени соответствия ( $R^2$ ) регрессий с исходными данными представлены в таблице 10. Как видно из таблицы, наибольшее значение  $R^2$  получены при расчете полинома 3-го порядка. Можно предположить, что зависимость между  $I_{ds}$  и  $V_{bg}$  описывается многочленом 3-й степени. По значениям  $R^2$  также проводили разделение исследуемых НП-сенсоров на три кластера:  $R^2 > 0,9$  (НП-сенсоры № 5-8),  $R^2 = 0,8-0,9$  (НП-сенсоры № 9, № 10),  $R^2 = 0,7$  (НП-сенсоры № 1-4).

Таблица 9 – Величина тока в цепи исток-сток десяти НП-сенсоров в зависимости от напряжения на подзатворе. Относительная погрешность измерения величины тока  $0,10\%+100$  пА, напряжения –  $0,022\%+1$  мВ

$V_{bg}$ , В	Номер НП-сенсора. Величина тока в цепи исток-сток $I_{ds}$ , А										Медиана $I_{ds}$	95% ДИ $I_{ds}$	р-значение
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10			
0	$4 \times 10^{-8}$	$6 \times 10^{-8}$	$9 \times 10^{-11}$	$6 \times 10^{-8}$	$3 \times 10^{-10}$	$3 \times 10^{-10}$	$9 \times 10^{-10}$	$3 \times 10^{-10}$	$9 \times 10^{-10}$	$4 \times 10^{-10}$	$6,5 \times 10^{-10}$	$3 \times 10^{-10} \div 6 \times 10^{-10}$	0,625
	$4 \times 10^{-8}$	$7 \times 10^{-8}$	$4 \times 10^{-11}$	$7 \times 10^{-8}$	$5 \times 10^{-10}$	$2 \times 10^{-11}$	$9 \times 10^{-10}$	$3 \times 10^{-10}$	$8 \times 10^{-10}$	$3 \times 10^{-10}$	$6,5 \times 10^{-10}$	$4 \times 10^{-11} \div 7 \times 10^{-8}$	
10	$2 \times 10^{-7}$	$2 \times 10^{-7}$	$2 \times 10^{-11}$	$2 \times 10^{-7}$	$3 \times 10^{-10}$	$3 \times 10^{-10}$	$1 \times 10^{-9}$	$5 \times 10^{-10}$	$7 \times 10^{-10}$	$3 \times 10^{-10}$	$8,5 \times 10^{-10}$	$3 \times 10^{-10} \div 2 \times 10^{-7}$	0,019
	$6 \times 10^{-7}$	$3 \times 10^{-7}$	$2 \times 10^{-7}$	$4 \times 10^{-7}$	$2 \times 10^{-9}$	$7 \times 10^{-10}$	$9 \times 10^{-10}$	$4 \times 10^{-10}$	$7 \times 10^{-10}$	$5 \times 10^{-10}$	$1,5 \times 10^{-9}$	$5 \times 10^{-10} \div 4 \times 10^{-7}$	
20	$2 \times 10^{-6}$	$5 \times 10^{-7}$	$1 \times 10^{-6}$	$1 \times 10^{-6}$	$7 \times 10^{-7}$	$6 \times 10^{-7}$	$5 \times 10^{-8}$	$3 \times 10^{-8}$	$9 \times 10^{-8}$	$3 \times 10^{-7}$	$5,5 \times 10^{-7}$	$5 \times 10^{-8} \div 1 \times 10^{-6}$	0,004
	$2 \times 10^{-6}$	$8 \times 10^{-7}$	$2 \times 10^{-6}$	$2 \times 10^{-6}$	$1 \times 10^{-6}$	$1 \times 10^{-6}$	$5 \times 10^{-7}$	$3 \times 10^{-7}$	$8 \times 10^{-7}$	$9 \times 10^{-7}$	$9,5 \times 10^{-7}$	$5 \times 10^{-7} \div 2 \times 10^{-6}$	
30	$2 \times 10^{-6}$	$1 \times 10^{-6}$	$2 \times 10^{-6}$	$2 \times 10^{-6}$	$2 \times 10^{-6}$	$2 \times 10^{-6}$	$1 \times 10^{-6}$	$8 \times 10^{-7}$	$1 \times 10^{-6}$	$1 \times 10^{-6}$	$1,5 \times 10^{-6}$	$1 \times 10^{-6} \div 2 \times 10^{-6}$	0,031
	$3 \times 10^{-6}$	$2 \times 10^{-6}$	$2 \times 10^{-6}$	$3 \times 10^{-6}$	$2 \times 10^{-6}$	$2 \times 10^{-6}$	$1 \times 10^{-6}$	$1 \times 10^{-6}$	$2 \times 10^{-6}$	$2 \times 10^{-6}$	$2 \times 10^{-6}$	$1 \times 10^{-6} \div 3 \times 10^{-6}$	

Примечание: Статистическую значимость (р-значение) значений  $I_{ds}$  в двух повторах рассчитывали с использованием Т-критерия Вилкоксона в программе GraphPad Prism 8.0.2. ДИ – доверительный интервал.

Таблица 10 – Степень соответствия полиномиальной регрессии n-го порядка с исходными данными величины тока в цепи исток-сток и напряжения на подзатворе

Порядок полинома	$R^2$									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Первый порядок (прямая линия)	0,833	0,685	0,780	0,796	0,735	0,725	0,627	0,601	0,552	0,595
Второй порядок (квадратичный)	0,842	0,796	0,811	0,851	0,926	0,928	0,885	0,908	0,766	0,769
Третий порядок (кубический)	0,865	0,805	0,840	0,855	0,927	0,929	0,901	0,939	0,777	0,771

Анализ результатов тестирования величины токов в цепи исток-сток показал, что НП-сенсоры не демонстрировали воспроизводимость<sup>20</sup> исходных характеристик (таблица 9, рисунок 30). Вывод подтверждался результатами измеренных величин токов для сенсоров № 2, № 3-6, № 9, № 10 при различном напряжении, подаваемом на подзатвор.

Повторяемость<sup>21</sup> значений  $I_{ds}$  десяти НП-сенсоров оценивали в двух повторах в одном режиме напряжения с помощью непараметрического статистического теста – Т-критерия Вилкоксона. Результаты представлены в таблице 9. Рассчитанные р-значения показывают достоверное различие между значениями  $I_{ds}$  десяти НП-сенсоров в двух повторах при  $V_{bg}=10$  В ( $p=0,020$ ), 20 В ( $p=0,004$ ) и 30 В ( $p=0,031$ ). Это свидетельствует об отсутствии повторяемости изготовленных НП-сенсоров.

### **4.3 Исследование вольтамперных характеристик сенсора в процессе детекции вируса гриппа птиц**

После процедуры контроля входных параметров опытно-промышленного НП-сенсора проводили детекцию вируса гриппа птиц. В эксперименте использовали инактивированный вирус гриппа птиц подтипа А(Н9N2)<sup>22</sup> и сыворотку, содержащую поликлональные антитела (ПКА) специфичные к вирусу.

#### *Процедура измерения*

На первом этапе детекции поверхность кристалла микросхемы обрабатывали дистиллированной водой. Для этого вносили 8 мкл воды. Проводили измерение  $I_{ds}$  в диапазоне  $V_{bg}=2-10$  В.

Далее методом физической адсорбции иммобилизовали ПКА путем добавления 8 мкл сыворотки на поверхность. Так же измеряли  $I_{ds}$  в диапазоне  $V_{bg}=0-10$  В.

---

<sup>20</sup> Воспроизводимость – близость друг к другу отдельных значений в серии результатов параллельных измерений.

<sup>21</sup> Повторяемость (сходимость результатов измерений) – близость друг к другу результатов измерений одной и той же величины, выполненных повторно одними и теми же средствами, одним и тем же методом в одинаковых условиях и с одинаковой тщательностью.

<sup>22</sup> Сыворотку, содержащую специфические ПКА против вируса гриппа птиц, и инактивированный вирус гриппа птиц А(Н9N2) предоставил сотрудник ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора Марченко В.Ю.

После проводили детекцию вируса гриппа птиц. Для этого на поверхность кристалла микросхемы, содержащую сыворотку, добавили 8 мкл суспензии вируса. Осуществляли экспозицию в течение 10 минут для естественной адсорбции образовавшегося комплекса антитело-антиген, белков и выполняли регистрацию  $I_{ds}$  при  $V_{bg}=0-10$  В.

### *Результаты измерения*

Результаты измерения зависимости  $I_{ds}$  от  $V_{bg}$  представлены в Приложении Б «Вольтамперные характеристики сенсоров в процессе детекции вируса гриппа птиц» (таблицы Б1, Б2, Б3). В совокупности полученных данных присутствуют отрицательные значения  $I_{ds}$ , которые наблюдаются при внесении сыворотки у НП-сенсоров № 1-9 при  $V_{bg}=0-2$  В (таблица Б1). Внесение инактивированного вируса так же вызывает отрицательные значения  $I_{ds}$  у НП-сенсоров № 1, 3, 5-9 при  $V_{bg}=0-5$  В, у НП-сенсоров № 2 и 4 во всем диапазоне напряжения (таблица Б2). Возможно, полученные значения обусловлены током утечки [130].

По данным таблиц Б1-Б3 построены ВАХ десяти НП-сенсоров за исключением сенсоров, обладающих отрицательными показаниями  $I_{ds}$  (рисунок 31а-в).

ВАХ сенсоров после внесения дистиллированной воды на их поверхность, представлены на рисунке 31а. Кривые имеют стандартную тенденцию изменения  $I_{ds}$  при соответствующем изменении  $V_{bg}$ , но не совпадают друг с другом. Из рисунка видно, что при достижении значения  $2 \times 10^{-6}$  А величина тока НП-сенсоров № 2-10 не изменяется при увеличении напряжения. Это говорит о том, что устройства находились в режиме насыщения, то есть канал проводимости (нанопроволока) содержит максимальное количество носителей заряда (электронов). При этом насыщение у разных НП-биосенсоров происходило при разном напряжении, подаваемом на подзатвор.

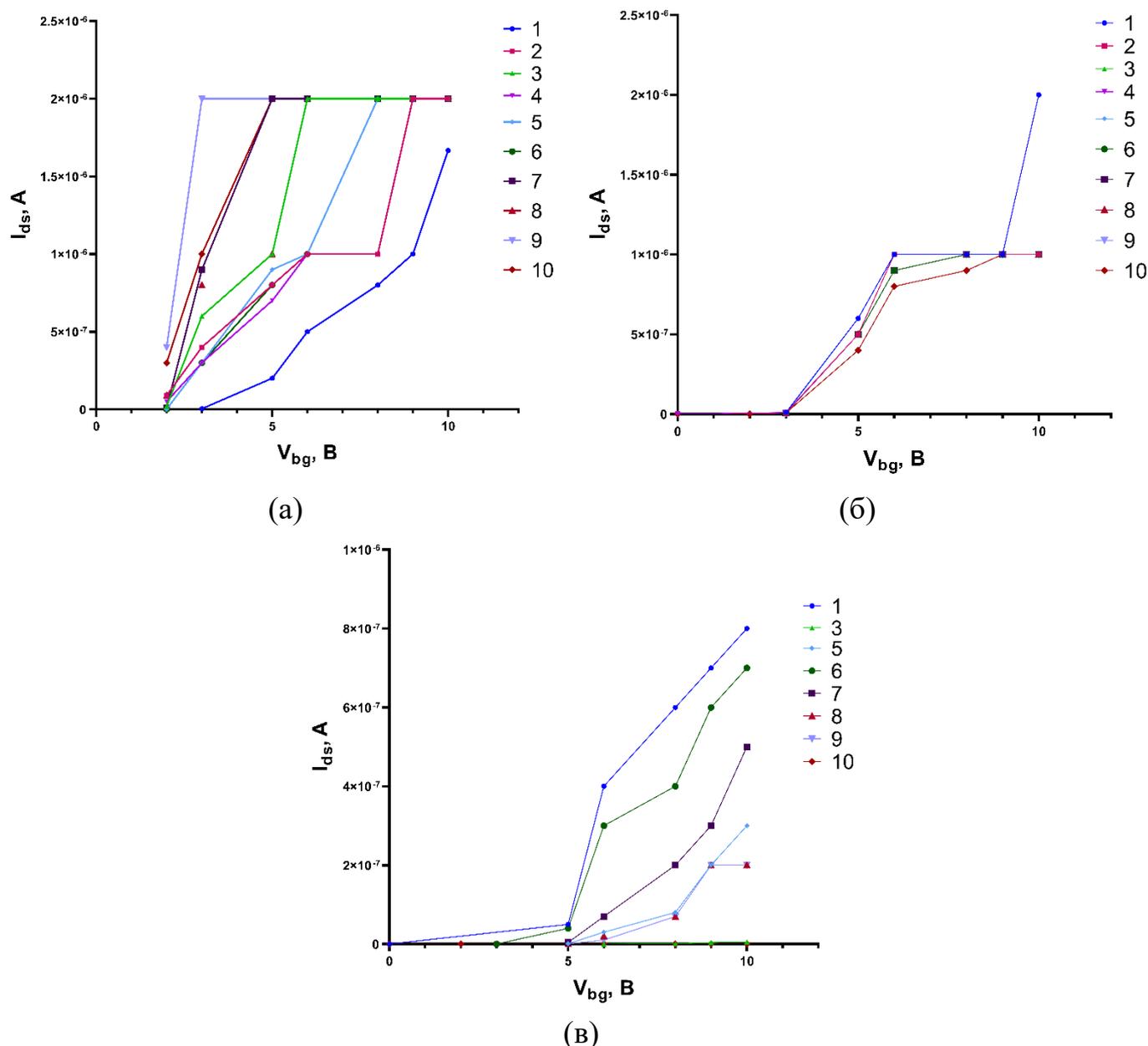


Рисунок 31 – Вольтамперные характеристики десяти НП-сенсоров после внесения: (а) – дистиллированной воды, (б) – сыворотки, содержащей специфические поликлональные антитела, (в) – суспензии инактивированного вируса гриппа птиц. Относительная погрешность измерения величины тока  $0,10\%+100$  пА, напряжения –  $0,022\%+1$  мВ

На рисунке 31б представлены ВАХ НП-сенсоров, полученные после внесения на поверхность сыворотки, содержащей специфические ПКА. В данном случае значения  $I_{ds}$  десяти сенсоров больше приближены друг к другу чем в представленных на рисунках 31а, в. Большинство устройств изменяли  $I_{ds}$  в диапазоне от 0 до  $1 \times 10^{-6}$  А. Исключением являлся НП-сенсор № 1, который при

$V_{bg}=10$  В имел  $I_{ds}=2\times 10^{-6}$  А. В общем показатели значений  $I_{ds}$  меньше полученных после обработки поверхности дистиллированной водой.

ВАХ детекции вируса представлены на рисунке 31в. НП-сенсоры № 2, 4 во всем диапазоне напряжений показывали отрицательные  $I_{ds}$ . По этой причине они не представлены на рисунке. НП-сенсоры № 3, 10 практически не проводят ток (находились в режиме закрытия) при  $V_{bg}=0-10$  В, при этом у одного из устройств наблюдались отрицательные значения  $I_{ds}$ . Остальные устройства показывали изменения  $I_{ds}$  от 0 до  $8\times 10^{-7}$  А, что на порядок ниже, чем после внесения сыворотки на поверхность биосенсора.

Обобщенные значения ВАХ по всем НП-сенсорам для трех случаев представлены на рисунке 32.

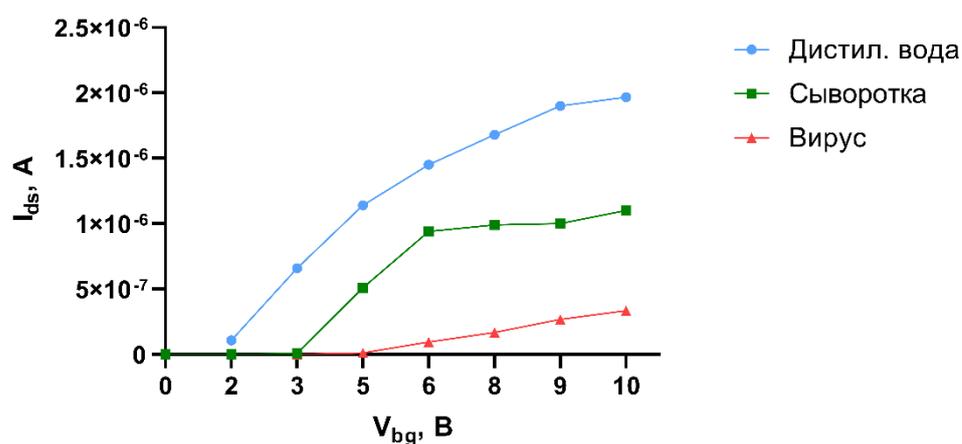


Рисунок 32 – Вольтамперные характеристики, кривые которой построены по усредненным значениям  $I_{ds}$  по десяти НП-сенсорам в различных условиях. Относительная погрешность измерения величины тока  $0,10\%+100$  пА, напряжения –  $0,022\%+1$  мВ

На ВАХ наблюдается смещение всех кривых относительно друг друга. Смещение ВАХ на  $\sim 1$  В, полученных после внесения сыворотки, по отношению к ВАХ после внесения дистиллированной воды показывает адсорбцию белков на поверхность всех десяти НП-биосенсоров. Внесение вируса на поверхность НП-биосенсора, содержащую антитела, так же приводило к смещению ВАХ ( $\sim 2$  В) влево. Подобная реакция биосенсора представлена в работе [117,218]. В представленном эксперименте добавление вируса гриппа птиц приводило к смещениям ВАХ, что авторы обозначили как действие отрицательного

электрического заряда на поверхность НП-биосенсора [218]. По смещению ВАХ можно судить о протекании специфической реакции антитело-антиген [28,117]. Помимо смещения кривых друг относительно друга наблюдалось уменьшение значений величины 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. Вольтамперные характеристики, кривые которой построены по медианам значений  $I_{ds}$  НП-сенсоров после исключения отрицательных значений величин тока, представлены на рисунке 33.

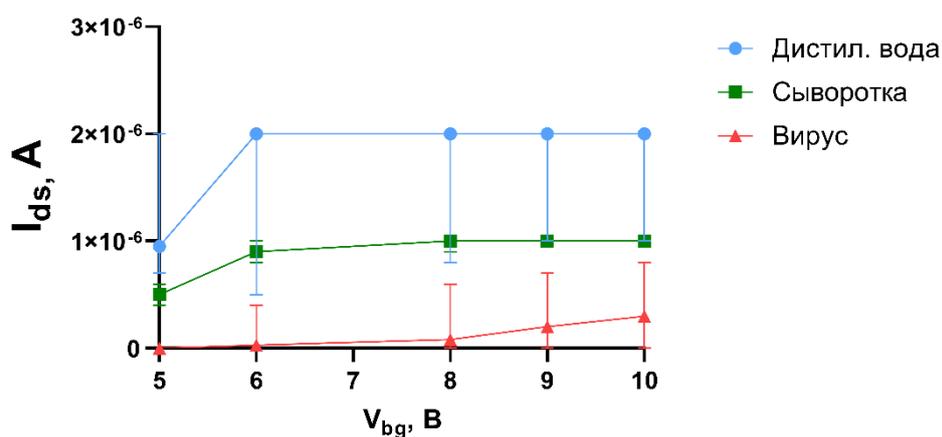


Рисунок 33 – Вольтамперные характеристики после исключения отрицательных значений величины тока: точки – медианы значений  $I_{ds}$  НП-сенсоров; вертикальные линии – 95% доверительные интервалы. Относительная погрешность измерения величины тока  $0,10\%+100$  пА, напряжения –  $0,022\%+1$  мВ

Результаты сравнения величин тока при  $V_{bg}=5-10$  В представлены на рисунке 34. Достоверные изменения величин тока выявлены при внесении вируса на поверхности НП-сенсоров, с внесенной ранее сывороткой, относительно дистиллированной воды.

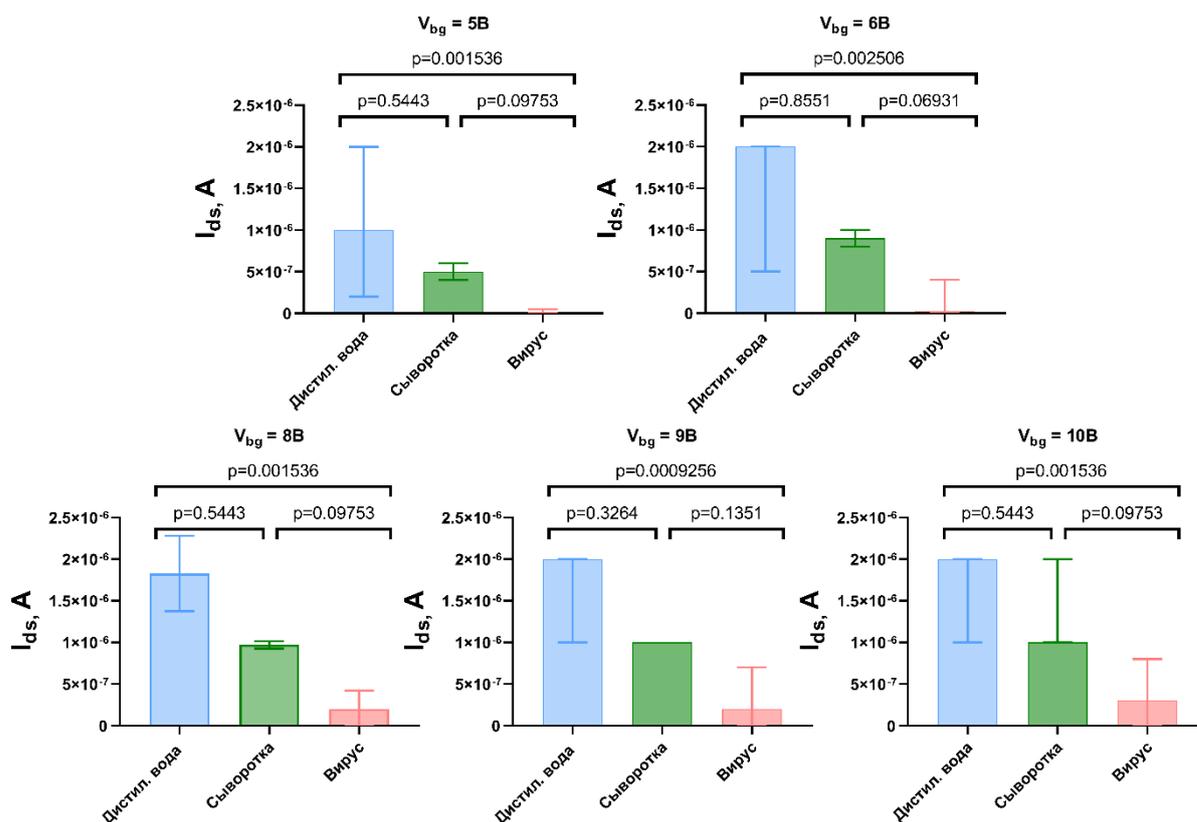


Рисунок 34 – Значения  $I_{ds}$  НП-сенсоров при различных напряжениях на подзатворе после внесения дистиллированной воды, сыворотки и вируса: вершины гистограмм – медиана значений  $I_{ds}$ ; вертикальные линии – 95% доверительные интервалы. Достоверность различий определена в тесте Фридмана с опостриорным тестом множественных сравнений Дана, значения  $p$  представлены над гистограммами

По результатам проведенной работы можно сделать вывод, что изготовленные НП-сенсоры не демонстрировали повторяемость и воспроизводимость по величине тока в режиме холостого хода. Возможно, причина заключается в технологии производства [219]. Однако, по значениям ВАХ можно выбрать рабочие точки (значения  $V_{bg}$ ), при которых все НП-сенсоры на одном кристалле будут реагировать на внесение биологических молекул. В данном случае –  $V_{bg} > 10 В$  (рисунок 30). Исследование влияния биологических молекул на проводимость изготовленных устройств показывает возможность их применения для детекции вирусов.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Создание и усовершенствование методов экспресс-детекции вирусов является важным направлением в медицине и науке. Современные достижения в области электроники и биологии позволили создать перспективное аналитическое устройство – нанопроволочный биосенсор на основе кремниевого полевого транзистора. С его помощью можно проводить анализ в режиме реального времени с высокой чувствительностью и селективностью [13]. Помимо того, что биосенсоры могут применяться в исследовательской и медицинской практике, они так же вносят фундаментальный вклад в изучение биологического материала [12].

В диссертационной работе получены экспериментальные данные, которые могут быть использованы для разработки методики детекции вирусов. Анализ литературных и экспериментальных данных выявил ряд проблем в использовании и подготовке НП-биосенсора. Например, использование электрода заземления. Так, электрод заземления в основном вводится в пробу «сверху». Подобное применение неудобно, может привести к появлению царапин на поверхности кристалла биосенсора, повреждению рабочих элементов. В некоторых случаях это не может обеспечивать надежного контакта с пробой. В работе создана новая конструкция НП-сенсоров, которая устраняет перечисленные недостатки использования выносного электрода заземления. Другой проблемой является подбор условий создания рецепторного слоя при определенных условиях, которые требуют индивидуального решения [213].

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. Анализируемая проба помимо

целевых молекул содержит фоновые частицы, посторонние белки, оказывающие влияние на сигнал биосенсора. Возможно, для того чтобы учесть посторонний шум, можно последовательно добавить на поверхность кристалла анализируемую пробу и суспензию рецепторов.

Эксперименты детекции вирусных частиц показали, что НП-биосенсор селективно детектирует целевые частицы с чувствительностью  $\sim 10^3$ - $10^4$  ВЧ/мл.

В работе установлен фундаментальный результат – комплексы «антитело-антиген» (вирус гриппа А, вирусоподобные частицы коронавируса) обладают отрицательным эффективным зарядом на поверхности раздела фаз «нанопроволока-исследуемая проба» в условиях эксперимента. Стоит отметить, что под эффективным зарядом в диссертационной работе понимается заряд, которым обладают биологические молекулы совместно с их окружением, например сольватной оболочкой, которое так же вносит вклад в создание электрического поля на поверхности раздела фаз.

Помимо детекции вирусных частиц и их белков биосенсор можно использовать для детекции других биологических маркеров заболеваний. Например, сердечного тропонина I, белковых маркеров рака. Так же на базе НП-биосенсоров можно создавать ДНК-чипы.

Остаются открытыми вопросы, направленные на улучшение работы. К ним относятся оптимизация топологии кристалла, направленная, например, на увеличение количества НП-сенсоров на одном кристалле, создание 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». «Антитело-вирус гриппа А» обладает отрицательным эффективным зарядом в 1 мМ калий-фосфатном буфере (рН=7,4±0,1), «антитело-вирусоподобные частицы коронавируса» обладает отрицательным эффективным зарядом в дистиллированной воде (рН=5,9±0,1), поликлональные антитела, специфичные к вирусу осповакцины (штамм Л-ИВП), имеют эффективный заряд, близкий к нейтральному в деионизованной воде (рН=5,9±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 УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ И СОКРАЩЕНИЙ

АО «НЗПП Восток» – Акционерное Общество «Новосибирский завод полупроводниковых приборов Восток»

АПТЭС – (3-аминопропил) триэтоксисилан

АСМ – атомно-силовая микроскопия

АЦС – активные центры связывания

ВАХ – вольтамперные характеристики

ВОВ – вирус осповакцины

ВПЧ – вирусоподобные частицы

ВЧ/мл – количество вирусных частиц в 1 мл (концентрация)

ГА – глутаровый альдегид

ГАЕ – единица гемагглютининов;

ГАЕ/0,1 мл – количество вируса, необходимое для агглютинации равного объема 0,5% суспензии куриных эритроцитов

ДТССП – 3,3'-дитиобис (сульфосукцинимидилпропионат)

ИБМХ – Научно-исследовательский институт биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича

ИФА – иммуноферментный анализ

ИФП СО РАН – Институт физики полупроводником им. А.В. Ржанова Сибирского отделения Российской академии наук

ИХА – иммунохроматографический анализ

КНИ-технология – технология кремний на изоляторе

МКА – моноклональные антитела

НП – нанопроволока

НП-биосенсор – нанопроволочный биосенсор на основе кремниевого полевого транзистора

ПКА – поликлональные антитела

ПЦР – полимеразная цепная реакция

ФСБ – фосфатно-солевой буфер

ФСБ-Т – фосфатно-солевой буфер с добавлением TWEEN-20

ФГ – функциональная группа

ФЖО – физическая жидкостная очистка

ХЖО – химическая жидкостная очистка

1-ЖХО – метод №1 жидкостной химической обработки с использованием раствора  $\text{HF}:\text{H}_2\text{O}=1:50$  ( $t=40$  с,  $T=25$  °C)

2-ЖХО – метод №2 жидкостной химической обработки с использованием раствора  $\text{H}_2\text{O}_2:\text{H}_2\text{O}=1:3$  ( $t=10$  мин,  $T=25$  °C)

3-ЖХО – метод №3 жидкостной химической обработки с использованием раствора  $\text{H}_2\text{SO}_4:\text{H}_2\text{O}_2=10:3$  ( $t=7$  мин,  $T=30$  °C)

4-ЖХО – метод №4 жидкостной химической обработки с использованием раствора раствора  $\text{NH}_4\text{OH}:\text{H}_2\text{O}_2:\text{H}_2\text{O}=1:4:20$  ( $t=15$  мин,  $T=25$  °C)

5-ЖХО – метод №5 жидкостной химической обработки с последовательным использованием растворов  $\text{NH}_4\text{OH}:\text{H}_2\text{O}_2:\text{H}_2\text{O}=1:4:20$  ( $t=10$  мин,  $T=50$  °C) и  $\text{H}_2\text{SO}_4:\text{H}_2\text{O}_2=10:1$  ( $t=5$  мин,  $T=30$  °C)

1-М – метод №1 модификации поверхности НП-биосенсора в парах 25%-го (3-аминопропил) триэтоксисилана в этаноле ( $t=5$  ч,  $T=25$  °C)

2-М – метод №2 модификации поверхности НП-биосенсора с использованием раствора 1% ГА в ФСБ ( $t=4$  ч,  $T=25$  °C)

3-М – метод №3 модификации поверхности НП-биосенсора с использованием раствора 2,5% ГА в ФСБ ( $t=4$  ч,  $T=25$  °C)

LAMP (loop-mediated isothermal amplification) – петлевая изотермическая реакция

DI – деионизованная вода

R – сигнал биосенсора

$I_{ds}$  – сила тока в цепи сток-исток НП-биосенсора

$V_{vd}$  – источник постоянного напряжения в цепи исток-сток

$V_{bg}$  – регулируемый источник напряжения на подзатворе

$\lambda_D$  – длина Дебая

## ТЕРМИНЫ И ОПРЕДЕЛЕНИЯ

Аналитическая система – совокупность устройств, объединенных в одно, с целью детектирования целевых молекул

Биосенсор – высокочувствительное аналитическое устройство, которое использует специфические биохимические реакции с целью обнаружения биологических или химических соединений

Воспроизводимость – близость друг к другу отдельных значений в серии результатов параллельных измерений

Исток (source) – электрод транзистора, из которого основные носители заряда входят в нанопроволоку

Модификация поверхности – один из этапов создания биосенсора, который включает в себя очистку поверхности от адсорбированных загрязнений и иммобилизацию рецепторов

Повторяемость (сходимость результатов измерений) – близость друг к другу результатов измерений одной и той же величины, выполненных повторно одними и теми же средствами, одним и тем же методом в одинаковых условиях и с одинаковой тщательностью

Сенсор – устройство (прибор, узел), в котором сенсорный элемент не содержит биологический материал

Сток (drain) – электрод транзистора, в который основные носители заряда уходят из нанопроволоки

Функционализация поверхности – одна из стадий иммобилизации рецепторов в методах ковалентного и аффинного связывания, включения в полимерную матрицу, заключающаяся в создании вспомогательного слоя (молекул кросс-линкера, полимера и т.д.), с целью дальнейшего присоединения рецепторов

Центр связывания или активный центр – реакционная функциональная группа или участки поверхности с избыточной энергией, необходимые для образования новых связей

Эффективный заряд – заряд, которым обладают биологические молекулы в совокупности с их окружением (сольватной оболочкой и т.д.)

**СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ**

1. de Puig, H. Multiplexed rapid antigen tests developed using multicolored nanoparticles and cross-reactive antibody pairs: Implications for pandemic preparedness / H. de Puig, I. Bosch, N. Salcedo [et al.] // *Nano Today*. - 2022. - V. 47. - Paper 101669.
2. Sanchez-Purra, M. Surface-enhanced Raman spectroscopy-based sandwich immunoassays for multiplexed detection of Zika and Dengue viral biomarkers / M. Sanchez-Purra, M. Carre-Camps, H. de Puig [et al.] // *ACS infectious diseases*. - 2017. - V. 3, N 10. - P. 767–776.
3. Calderaro, A. Respiratory tract infections and laboratory diagnostic methods: A review with a focus on syndromic panel-based assays / A. Calderaro, M. Buttrini, B. Farina [et al.] // *Microorganisms*. - 2022. - V. 10, N 9. - Paper 1856.
4. Peeling, R. W. Diagnostics for COVID-19: moving from pandemic response to control / R. W. Peeling, D. L. Heymann, Y. Y. Teo [et al.] // *The Lancet*. - 2022. - V. 399, N 10326. - P. 757-768.
5. Tsao, Y. T. Differential markers of bacterial and viral infections in children for point-of-care testing / Y. T. Tsao, Y. H. Tsai, W. T. Liao [et al.] // *Trends in molecular medicine*. - 2020. - V. 26, N 12. - P. 1118-1132.
6. Хафизов, К. Ф. Экспресс-диагностика новой коронавирусной инфекции с помощью реакции петлевой изотермической амплификации / К. Ф. Хафизов, В. В. Петров, К. В. Красовитов [и др.] // *Вопросы вирусологии*. - 2021. - Т. 66, № 1. - С. 17-28.
7. Зубик, А. Н. Изотермическая петлевая амплификация LAMP в формате микроустройств (Обзор) / А. Н. Зубик, Г. Е. Рудницкая, А. А. Евстапов // *Научное приборостроение*. - 2021. - Т. 31, № 1. - С. 3-43.
8. Jung, J. H. Integration of reverse transcriptase loop-mediated isothermal amplification with an immunochromatographic strip on a centrifugal microdevice for influenza A virus identification / J. H. Jung, B. H. Park, S. J. Oh [et al.] // *Lab on a Chip*. - 2015. - V. 15, N 3. - P. 718-725.
9. Xu, C. Rapid detection of measles virus using reverse transcription loop-mediated isothermal amplification coupled with a disposable lateral flow device / C. Xu,

Y. Feng, Y. Chen [et al.] // Diagnostic microbiology and infectious disease. - 2016. - V. 85, N 2. - P. 168-173.

10. De Moraes, A. C. M. Recent trends in field-effect transistors-based immunosensors / A. C. M. De Moraes, L. T. Kubota // Chemosensors. - 2016. - V. 4, N 4. - Paper. 20.

11. Naumova, O. Sensors with dielectrophoretic concentration of viruses and proteins / O. Naumova, V. Generalov, D. Shcherbakov [et al.] // Biosensors. - 2022. - V. 12, N 11. - Paper 992.

12. Patolsky, F. Electrical detection of single viruses / F. Patolsky, G. Zheng, O. Hayden [et al.] // Proceedings of the National Academy of Sciences. - 2004. - V. 101, N 39. - P. 14017-14022.

13. Sadighbayan, D. Biosensing based on field-effect transistors (FET): Recent progress and challenges / D. Sadighbayan, M. Hasanzadeh, E. Ghafar-Zadeh // TrAC Trends in Analytical Chemistry. - 2020. - V. 133. - Paper 116067.

14. Luo, X. Electrical biosensors and the label free detection of protein disease biomarkers / X. Luo, J. J. Davis // Chemical Society Reviews. - 2013. - V. 42, N 13. - P. 5944-5962.

15. Borgmann, S. Amperometric biosensors / S. Borgmann, A. Schulte, S. Neugebauer [et al.] // Advances in electrochemical science and engineering: Bioelectrochemistry. - 2011. - V. 13. - P. 1-83.

16. Биосенсорные технологии в диагностике инфекционных болезней / Д. В. Уткин, В. Г. Германчук, А. Н. Спицын [и др.]; под редакцией академика РАН, профессора В. В. Кутырева. – Тверь : ООО «Из-во «Трида», 2014. - 112 с.

17. Nuzaihan, M. Electrical detection of dengue virus (DENV) DNA oligomer using silicon nanowire biosensor with novel molecular gate control / M. Nuzaihan, U. Hashim, M. M. Arshad [et al.] // Biosensors and Bioelectronics. - 2016. - V. 83. - P. 106-114.

18. Junior, B. B. Electrochemical aptasensor for NS1 detection: Towards a fast dengue biosensor / B. B. Junior, M. R. Batistuti, A. S. Pereira [et al.] // Talanta. - 2021. - V. 233. - Paper 122527.

19. Štukovnik, Z. Recent developments in electrochemical-impedimetric biosensors for virus detection / Z. Štukovnik, U. Bren // *Int. J. Mol. Sci.* - 2022. - V. 23. – Paper 15922.
20. Yao, C. Y. Biosensors for hepatitis B virus detection / C. Y. Yao, W. L. Fu // *World Journal of Gastroenterology: WJG.* - 2014. - V. 20. - Paper 12485.
21. Hassen, W. M. An impedimetric DNA sensor based on functionalized magnetic nanoparticles for HIV and HBV detection / W. M. Hassen, C. Chaix, A. Abdelghani [et al.] // *Sensors and actuators B: Chemical.* - 2008. - V. 134. - P. 755-760.
22. Bergveld, P. Development of an ion-sensitive solid-state device for neurophysiological measurements / P. Bergveld // *IEEE Transactions on biomedical engineering.* - 1970. - N 1. - P. 70-71.
23. Bergveld, P. Development, operation, and application of the ion-sensitive field-effect transistor as a tool for electrophysiology / P. Bergveld // *IEEE Transactions on Biomedical Engineering.* - 1972. - N 5. - P. 342-351.
24. Matsuo, T. An integrated field-effect electrode for biopotential recording / T. Matsuo, K. D. Wise // *IEEE Transactions on Biomedical Engineering.* - 1974. - N 6. - P. 485-487.
25. Caras, S. Field effect transistor sensitive to penicillin / S. Caras, J. Janata // *Analytical chemistry.* - 1980. - V. 52, N 12. - P. 1935-1937.
26. Evtugyn, G. Introduction and overview of history / G. Evtugyn // *Biosensors: Essentials.* - 2014. - P. 1-20.
27. Poghossian, A. Label-free sensing of biomolecules with field-effect devices for clinical applications / A. Poghossian, M. J. Schöning // *Electroanalysis.* - 2014. - V. 26, N 6. - P. 1197-1213.
28. Seo, G. Rapid detection of COVID-19 causative virus (SARS-CoV-2) in human nasopharyngeal swab specimens using field-effect transistor-based biosensor / G. Seo, G. Lee, M. J. Kim [et al.] // *ACS nano.* - 2020. - V. 14, N 4. - P. 5135-5142.
29. Zong, X. ZnO nanorod-based FET biosensor for continuous glucose monitoring / X. Zong, R. Zhu // *Sensors and Actuators B: Chemical.* - 2018. - V. 255. - P. 2448-2453.

30. Farrow, T. An aptamer-functionalised schottky-field effect transistor for the detection of proteins / T. Farrow, S. Laumier, I. Sandall [et al.] // *Biosensors*. - 2022. - V. 12, N 5. - Paper 347.
31. Thriveni, G. Advancement and challenges of biosensing using field effect transistors / G. Thriveni, K. Ghosh // *Biosensors*. - 2022. - V. 12, N 8. - Paper 647.
32. Hu, W. P. Detection of Interleukin 6 by using silicon nanowire field-effect transistors / W. P. Hu, Y. M. Wu, C. A. Vu [et al.] // *Sensors*. - 2023. - V. 23, N 2. - Paper 625.
33. Saylan, Y. An alternative medical diagnosis method: biosensors for virus detection / Y. Saylan, Ö. Erdem, S. Ünal [et al.] // *Biosensors*. - 2019. - V. 9, N 2. - Paper 625.
34. Fenner, F. Laboratory diagnosis of viral diseases / F. Fenner, P. A. Bachmann, E. P. J. Gibbs [et al.] // *Veterinary virology*. - 1987. - Paper 237.
35. Afzal, A. Gravimetric viral diagnostics: QCM based biosensors for early detection of viruses / A. Afzal, A. Mujahid, R. Schirhagl [et al.] // *Chemosensors*. - 2017. - V. 5, N 1. - Paper 7.
36. Das, S. Laboratory diagnosis of respiratory tract infections in children—the state of the art / S. Das, S. Dunbar, Y. W. Tang // *Frontiers in microbiology*. - 2018. - V. 9. - Paper 2478.
37. Bamford, D. *Encyclopedia of virology* / D. Bamford, M. Zuckerman. - Academic Press, 2021. - 4103 p.
38. Li, Z. Development and clinical application of a rapid IgM-IgG combined antibody test for SARS-CoV-2 infection diagnosis / Z. Li, Y. Yi, X. Luo [et al.] // *Journal of medical virology*. - 2020. - V. 92, N 9. - P. 1518-1524.
39. Scohy, A. Low performance of rapid antigen detection test as frontline testing for COVID-19 diagnosis / A. Scohy, A. Anantharajah, M. Bodeus [et al.] // *Journal of Clinical Virology*. - 2020. - V. 129. - Paper 104455.
40. Craw, P. Isothermal nucleic acid amplification technologies for point-of-care diagnostics: a critical review / P. Craw, W. Balachandran // *Lab on a Chip*. - 2012. - V. 12. - P. 2469-2486.

41. Министерство Здравоохранения Российской Федерации. Временные методические рекомендации. Профилактика, диагностика и лечение новой коронавирусной инфекции (COVID-19). Версия 15 (22.02.2022). - URL: [https://static-0.minzdrav.gov.ru/system/attachments/attaches/000/059/392/original/%D0%92%D0%9C%D0%A0\\_COVID-19\\_V15.pdf](https://static-0.minzdrav.gov.ru/system/attachments/attaches/000/059/392/original/%D0%92%D0%9C%D0%A0_COVID-19_V15.pdf) (дата обращения 10.03.2022).
42. Burrell, C. J. Laboratory diagnosis of virus diseases / C. J. Burrell, C. R. Howard, F. A. Murphy // Fenner and White's Medical Virology. - 2017. - Paper 135.
43. Cassedy, A. Virus detection: A review of the current and emerging molecular and immunological methods / A. Cassedy, A. Parle-McDermott, R. O'Kennedy // Frontiers in Molecular Biosciences. - 2021. - Paper 76.
44. Harvey, R. A. Lippincott's illustrated reviews microbiology / R. A. Harvey , P. C. Champe, B. D. Fisher. - Philadelphia, Pennsylvania : Lippincott Williams & Wilkins, 2007. - 438 p.
45. Loeffelholz, M. J. Laboratory diagnosis of emerging human coronavirus infections—the state of the art / M. J. Loeffelholz, Y. W. Tang // Emerging microbes & infections. - 2020. - V. 9, N 1. - P. 747-756.
46. Murray, P. R. The clinician and the microbiology laboratory / P. R. Murray // Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases. - 2015. - Paper 191.
47. Peaper, D. R. Laboratory diagnosis of viral infection / D. R. Peaper, M. L. Landry // Handbook of clinical neurology. - 2014. - V. 123. - P. 123-147.
48. Ryu, W. S. Diagnosis and methods / W. S. Ryu // Molecular virology of human pathogenic viruses. - 2017. - Paper 47.
49. Dilnessa, T. Cell culture, cytopathic effect and immunofluorescence diagnosis of viral infection / T. Dilnessa, H. Zeleke // J. Microbiol. Mod. Tech. - 2017. - V. 2. - P. 102-110.
50. Федеральная служба по надзору в сфере здравоохранения : [официальный сайт] / Федеральная служба по надзору в сфере здравоохранения. -

Москва - URL: [https://roszdravnadzor.gov.ru/services/mi\\_search](https://roszdravnadzor.gov.ru/services/mi_search) (дата обращения: 17.02.2023).

51. Lambert-Niclot, S. Evaluation of a rapid diagnostic assay for detection of SARS-CoV-2 antigen in nasopharyngeal swabs / S. Lambert-Niclot, A. Cuffel, S. Le Pape [et al.] // *Journal of clinical microbiology*. - 2020. - V. 58, N 8. - Paper e00977-20.

52. Hsiao, W. W. W. Recent advances in novel lateral flow technologies for detection of COVID-19 / W. W. W. Hsiao, T. N. Le, D. M. Pham [et al.] // *Biosensors*. - 2021. - V. 11, N 9. - Paper 295.

53. Иммунохроматографический метод / А. Н. Притыченко, Н. И. Жуковская, П. А. Красочко [и др.]. - Витебск : УО ВГАБМ, 2010 - 14 с.

54. Tsuboi, I. Immunochromatography—application example and POCT type genetic testing / I. Tsuboi, K. Iinuma // *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*. - 2021. - V. 69, N 10. - P. 984-988.

55. Mark, D. Microfluidic lab-on-a-chip platforms: requirements, characteristics and applications / D. Mark, S. Haeberle, G. Roth [et al.] // *Microfluidics based microsystems: fundamentals and applications*. - 2010. - P. 305-376.

56. Huang, L. Development of Ic-ELISA and colloidal gold lateral flow immunoassay for the determination of cypermethrin in agricultural samples / L. Huang, F. Zhang, F. Li [et al.] // *Biosensors*. - 2022. - V. 12. - P. 1058.

57. Akkapinyo, C. Development of a multiplex immunochromatographic strip test and ultrasensitive electrochemical immunosensor for hepatitis B virus screening / C. Akkapinyo, P. Khownarumit, D. Waraho-Zhmayev [et al.] // *Analytica chimica acta*. - 2020. - V. 1095. - P. 162-171.

58. Withers, K. A field evaluation of a rapid dual immunoassay for human immunodeficiency virus and syphilis antibodies, Hanoi, Vietnam / K. Withers, C. Bristow, M. Nguyen [et al.] // *International journal of STD & AIDS*. - 2019. - V. 30, N 2. - P. 173-180.

59. Lim, H. Fabrication, flow control, and applications of microfluidic paper-based analytical devices / H. Lim, A. T. Jafry, J. Lee // *Molecules*. - 2019. - V. 24, N 16. - Paper 2869.

60. Basu, A. Performance of Abbott ID Now COVID-19 rapid nucleic acid amplification test using nasopharyngeal swabs transported in viral transport media and dry nasal swabs in a New York City academic institution / A. Basu, T. Zinger, K. Inglima [et al.] // *Journal of clinical microbiology*. - 2020. - V. 58, N 8. - Paper e01136-20.
61. Cui, L. Detection of severe fever with thrombocytopenia syndrome virus by reverse transcription–cross-priming amplification coupled with vertical flow visualization / L. Cui, Y. Ge, X. Qi [et al.] // *Journal of clinical microbiology*. - 2012. - V. 50, N 12. - P. 3881-3885.
62. Zhang, Y. Rapid molecular detection of SARS-CoV-2 (COVID-19) virus RNA using colorimetric LAMP / Y. Zhang, N. Odiwuor, J. Xiong [et al.] // *MedRxiv*. - 2020. - Paper 2020.02. 26.20028373.
63. Макарова, Ю. А. Изотермическая петлевая амплификация: эффективный метод экспресс-диагностики в онкологии / Ю. А. Макарова, А. А. Зотиков, Г. А. Белякова [и др.] // *Онкоурология*. - 2018. - № 2. - С. 88-99.
64. Миронова, Л. В. Петлевая изотермическая амплификация ДНК: принцип метода и перспективы применения в молекулярной диагностике холеры (обзор литературы) / Л. В. Миронова, Р. В. Адельшин, С. Ф. Бикетов [и др.] // *Клиническая лабораторная диагностика*. - 2017. - Т. 62, № 2. - С. 120-124.
65. Das, D. LAMP-based point-of-care biosensors for rapid pathogen detection / D. Das, C. W. Lin, H. S. Chuang // *Biosensors*. - 2022. - V. 12. - N 12. - Paper 1068.
66. Zhang, X. Evolution of the probe-based loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assays in pathogen detection / X. Zhang, Y. Zhao, Y. Zeng [et al.] // *Diagnostics*. - 2023. - V. 13. - Paper 1530.
67. Zheng, Z. Advances in molecular diagnosis of malaria / Z. Zheng, Z. Cheng // *Advances in clinical chemistry*. - 2017. - V. 80. - P. 155-192.
68. Hansen, S. Point-of-care or point-of-need diagnostic tests: time to change outbreak investigation and pathogen detection / S. Hansen, A. Abd El Wahed // *Tropical Medicine and Infectious Disease*. - 2020. - V. 5. - Paper 151.
69. Карташов, М. Ю. Перспективы применения петлевой изотермической амплификации в диагностике опасных инфекционных болезней, вызванных

вирусами I группы патогенности / М. Ю. Карташов, Е. В. Чуб, Т. П. Микрюкова [и др.] // Проблемы особо опасных инфекций. - 2020. - № 2. - С. 22-30.

70. Pumford, E. A. Developments in integrating nucleic acid isothermal amplification and detection systems for point-of-care diagnostics / E. A. Pumford, J. Lu, I. Spaczai [et al.] // Biosensors and Bioelectronics. - 2020. - V. 170. - Paper 112674.

71. Krishna, V. D. Giant magnetoresistance-based biosensor for detection of influenza A virus / V. D. Krishna, K. Wu, A. M. Perez [et al.] // Frontiers in microbiology. - 2016. - V. 7. - Paper 400.

72. Wong, C. L. A phase-intensity surface plasmon resonance biosensor for avian influenza A (H5N1) detection / C. L. Wong, M. Chua, H. Mittman [et al.] // Sensors. - 2017. - V. 17, N 10. - Paper 2363.

73. Khater, M. Biosensors for plant pathogen detection / M. Khater, A. De La Escosura-Muñiz, A. Merkoçi // Biosensors and Bioelectronics. - 2017. - V. 93. - P. 72-86.

74. Navakul, K. A novel method for dengue virus detection and antibody screening using a graphene-polymer based electrochemical biosensor / K. Navakul, C. Warakulwit, P. T. Yenchitsomanus [et al.] // Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine. - 2017. - V. 13, N 2. - P. 549-557.

75. Hwang, M. T. Ultrasensitive detection of nucleic acids using deformed graphene channel field effect biosensors / M. T. Hwang, M. Heiranian, Y. Kim [et al.] // Nature Communications. - 2020. - V. 11, N 1. - Paper 1543.

76. Prabowo, B. A. Rapid detection and quantification of Enterovirus 71 by a portable surface plasmon resonance biosensor / B. A. Prabowo, R. Y. Wang, M. K. Secario [et al.] // Biosensors and Bioelectronics. - 2017. - V. 92. - P. 186-191.

77. Park, I. Detection of SARS-CoV-2 virus amplification using a crumpled graphene field-effect transistor biosensor / I. Park, J. Lim, S. You [et al.] // ACS sensor. - 2021. - V. 6, N 12. - P. 4461-4470.

78. Naresh, V. A review on biosensors and recent development of nanostructured materials-enabled biosensors / V. Naresh, N. Lee // Sensors. - 2021. - V. 21, N 4. - Paper 1109.

79. Wang, M. C. Heterogeneous, three-dimensional texturing of graphene / M. C. Wang, S. Chun, R. S. Han et al. // *Nano letters*. - 2015. - V. 15, N 3. - P. 1829-1835.
80. International Union of Pure and Applied Chemistry. Compendium of Chemical Terminology. Gold Book. Version 2.3.3. 2014-02-24. - Текст электронный. - URL:  
<https://citeseerx.ist.psu.edu/document?repid=rep1&type=pdf&doi=2913a72bc437f531d6824c38e1042d7f0d31c7d5> (дата обращения: 02.03.2023).
81. *Nanomaterials and environmental biotechnology* / editors I. Bhushan, V. K. Singh, D. K. Tripathi. - Cham : Springer, 2020. – 432 p.
82. Nguyen, H. H. Immobilized enzymes in biosensor applications / H. H. Nguyen, S. H. Lee, U. J. Lee [et al.] // *Materials*. - 2019. - V. 12, N 1. - Paper 121.
83. Samson, R. Biosensors: frontiers in rapid detection of COVID-19 / R. Samson, G. R. Navale, M. S. Dharne // *3 Biotech*. - 2020. - V. 10, N 9. - Paper 385.
84. Sobhanie, E. Recent trends and advancements in electrochemiluminescence biosensors for human virus detection / E. Sobhanie, F. Salehnia, G. Xu [et al.] // *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. - 2022. - Paper 116727.
85. Chalklen, T. Biosensors based on mechanical and electrical detection techniques / T. Chalklen, Q. Jing, S. Kar-Narayan // *Sensors*. - 2020. - V. 20, N 19. - Paper 5605.
86. Chircov, C. Biosensors-on-chip: An up-to-date review / C. Chircov, A. C. Birca, A. M. Grumezescu [et al.] // *Molecules*. - 2020. - V. 25, N 24. - Paper 6013.
87. Rohilla, D. An overview of advanced nanomaterials for sensor applications / D. Rohilla, S. Chaudhary, A. Umar // *Engineered Science*. - 2021. - V. 16. - P. 47-70.
88. Zhao, Z. Advancements in electrochemical biosensing for respiratory virus detection: A review / Z. Zhao, C. Huang, Z. Huang [et al.] // *TRAC Trends in Analytical Chemistry*. - 2021. - V. 139. - Paper 116253.
89. Wang, J. Electrochemical biosensors: towards point-of-care cancer diagnostics / J. Wang // *Biosensors and Bioelectronics*. - 2006. - V. 21, N 10. - P. 1887-1892.

90. Bacher, G. Electrical biosensors for virus detection / G. Bacher, S. Bhand, S. Deshpande // *Advanced Biosensors for Virus Detection* / editors R. Khan, A. Parihar, A. Kaushik, A. Kumar. - Academic Press, 2022. - P. 241-259.
91. Li, H. Application of silicon nanowire field effect transistor (SiNW-FET) biosensor with high sensitivity / H. Li, D. Li, H. Chen [et al.] // *Sensors*. - 2023. - V. 23, N 15. - P. 6808.
92. Chen, K. I. Silicon nanowire field-effect transistor-based biosensors for biomedical diagnosis and cellular recording investigation / K. I. Chen, B. R. Li, Y. T. Chen // *Nano today*. - 2011. - V. 6, N 2. - P. 131-154.
93. He, B. Nanowire sensors for multiplexed detection of biomolecules / B. He, T. J. Morrow, C. D. Keating // *Current opinion in chemical biology*. - 2008. - V. 12, N 5. - P. 522-528.
94. Tran, D. P. Toward intraoperative detection of disseminated tumor cells in lymph nodes with silicon nanowire field effect transistors / D. P. Tran, M. A. Winter, B. Wolfrum [et al.] // *ACS nano*. - 2016. - V. 10, N 2. - P. 2357-2364.
95. Tran, D. P. CMOS-compatible silicon nanowire field-effect transistor biosensor: Technology development toward commercialization / D. P. Tran, T. T. T. Pham, B. Wolfrum [et al.] // *Materials*. - 2018. - V. 11, N 5. - Paper 785.
96. Ivanov, Y. D. Detection of marker miRNAs in plasma using SOI-NW biosensor / Y. D. Ivanov, T. O. Pleshakova, K. A. Malsagova [et al.] // *Sensors and Actuators B: Chemical*. - 2018. - V. 261. - P. 566-571.
97. Cheng, S. Label-free detection of tumor markers using field effect transistor (FET)-based biosensors for lung cancer diagnosis / S. Cheng, S. Hideshima, S. Kuroiwa [et al.] // *Sensors and Actuators B: Chemical*. - 2015. - V. 212. - P. 329-334.
98. Jiang, S. Gas sensors for volatile compounds analysis in muscle foods: A review / S. Jiang, Y. Liu // *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. - 2020. - V. 126. - Paper 115877.
99. Kong, T. CMOS-compatible, label-free silicon-nanowire biosensors to detect cardiac troponin I for acute myocardial infarction diagnosis / T. Kong, R. Su, B. Zhang [et al.] // *Biosensors and Bioelectronics*. - 2012. - V. 34, N 1. - P. 267-272.

100. Makowski, M. S. Molecular analysis of blood with micro-/nanoscale field-effect-transistor biosensors / M. S. Makowski, A. Ivanisevic // *Small*. - 2011. - V. 7, N 14. - P. 1863-1875.

101. Ramnani, P. Carbon nanomaterial-based electrochemical biosensors for label-free sensing of environmental pollutants / P. Ramnani, N. M. Saucedo, A. Mulchandani // *Chemosphere*. - 2016. - V. 143. - P. 85-98.

102. Wang, B. Wearable aptamer-field-effect transistor sensing system for noninvasive cortisol monitoring / B. Wang, C. Zhao, Z. Wang [et al.] // *Science advances*. - 2022. - V. 8, N 1. - Paper eabk0967.

103. Попов, В. П. Свойства структур и приборов на кремний-на-изоляторе / В. П. Попов, А. И. Антонова, А. А. Французов [и др.] // *Физика и техника полупроводников*. - 2001. - Т. 35, № 9. - С. 1075-1083.

104. Naumova, O. V. SOI nanowires as sensors for charge detection / O. V. Naumova, B. I. Fomin, D. A. Nasimov [et al.] // *Semiconductor science and technology*. - 2010. - V. 25, N 5. - Paper 055004.

105. Pirro, L. Electrical characterization and modeling of advanced SOI substrates. *Micro and nanotechnologies / L. Pirro / Microelectronics. Université Grenoble Alpes*, 2015. - P. 177.

106. Наумова, О. В. Наноразмерные структуры Si/SiO<sub>2</sub> и сенсоры на их основе : специальность 01.04.10 «Физика полупроводников» : диссертация на соискание ученой степени доктора физико-математических наук / Наумова Ольга Викторовна ; Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт физики полупроводников им. А.В. Ржанова Сибирского отделения Российской академии наук. - Новосибирск, 2012 - 323 с.

107. Орлов, А. М. Физические основы технологии полупроводниковых приборов и интегральных схем: учебное пособие / А. М. Орлов, Б. М. Костишко, А. А. Скворцов. - Ульяновск : УлГУ, 2014. - 423 с.

108. Tran, D. P. Complementary metal oxide semiconductor compatible silicon nanowires-on-a-chip: Fabrication and preclinical validation for the detection of a cancer

prognostic protein marker in serum / D. P. Tran, B. Wolfrum, R. Stockmann [et al.] // Analytical chemistry. - 2015. - V. 87, N 3. - P. 1662-1668.

109. Kaisti, M. Detection principles of biological and chemical FET sensors / M. Kaisti // Biosensors and Bioelectronics. - 2017. - V. 98. - P. 437-448.

110. Wu, C. C. Silicon nanowires length and numbers dependence on sensitivity of the field-effect transistor sensor for hepatitis B virus surface antigen detection / C. C. Wu // Biosensors. - 2022. - V. 12, N 2. - Paper 115.

111. Elfström, N. Surface charge sensitivity of silicon nanowires: Size dependence / N. Elfström, R. Juhasz, I. Sychugov [et al.] // Nano Letters. - 2007. - V. 7, N 9. - P. 2608-2612.

112. Léonard, F. Electrical contacts to one-and two-dimensional nanomaterials / F. Léonard, A. A. Talin // Nature nanotechnology. - 2011. - V. 6, N 12. - P. 773-783.

113. Shen, M. Y. Silicon nanowire field-effect-transistor based biosensors: From sensitive to ultra-sensitive / M. Y. Shen, B. R. Li, Y. K. Li // Biosensors and Bioelectronics. - 2014. - V. 60. - P. 101-111.

114. Наумова, О. В. Оптимизация отклика нанопроволочных биосенсоров / О. В. Наумова, Б. И. Фомин // Автометрия. - 2016. - Т. 52, № 5. - С. 21-25.

115. Bergveld, P. Thirty years of ISFETOLOGY: What happened in the past 30 years and what may happen in the next 30 years / P. Bergveld // Sensors and Actuators B: Chemical. - 2003. - V. 88, N 1. - P. 1-20.

116. Dzyadevych, S. V. Biosensors based on enzyme field-effect transistors for determination of some substrates and inhibitors / S. V. Dzyadevych, A. P. Soldatkin, Y. I. Korpan [et al.] // Analytical and Bioanalytical Chemistry. - 2003. - V. 377. - P. 496-506.

117. Chiang, P. L. Nanowire transistor-based ultrasensitive virus detection with reversible surface functionalization / P. L. Chiang, T. C. Chou, T. H. Wu [et al.] // Chemistry—An Asian Journal. - 2012. - V. 7, N 9. - P. 2073-2079.

118. Химическая энциклопедия : в 5 т. / главный редактор И. Л. Кнунянц. - М. : Советская энциклопедия. - 1990. - Т. 2. — 493 с.

119. Stern, E. Label-free immunodetection with CMOS-compatible semiconducting nanowires / E. Stern, J. F. Klemic, D. A. Routenberg [et al.] // *Nature*. - 2007. - V. 445, N 7127. - P. 519-522.
120. Wang, D. Electrolytic gated organic field-effect transistors for application in biosensors – A Review / D. Wang, V. Noël, B. Piro // *Electronics*. - 2016. - V. 5, N 1. - Paper 9.
121. Stern, E. Importance of the Debye screening length on nanowire field effect transistor sensors / E. Stern, R. Wagner, F. J. Sigworth [et al.] // *Nano letters*. - 2007. - V. 7, N 11. - P. 3405-3409.
122. Syu, Y. C. Field-effect transistor biosensing: Devices and clinical applications / Y. C. Syu, W. E. Hsu, C. T. Lin // *ECS Journal of Solid State Science and Technology*. - 2018. - V. 7, N 7. - Paper Q3196.
123. Gaddam, P. Electrostatic screening length in concentrated salt solutions / P. Gaddam, W. Ducker // *Langmuir*. - 2019. - V. 35, N 17. - P. 5719-5727.
124. Фейнман, Р. Фейнмановские лекции по физике : в 10 т. Т. 5. Электричество и магнетизм / Р. Фейнман, Р. Лейтон, М. Сэндс : - Москва : Мир, 1977. - 300 с.
125. Lee, J. O. Aptamers as molecular recognition elements for electrical nanobiosensors / J. O. Lee, H. M. So, E. K. Jeon [et al.] // *Analytical and bioanalytical chemistry*. - 2008. - V. 390. - P. 1023-1032.
126. Cantor, C. R. Biophysical chemistry : in 3 parts. Part I. The Conformation of Biological Macromolecules / C.R. Cantor, P. R. Schimmel. - San Francisco : W. H. Freeman and Company, 1980. - 398 p.
127. Vu, C. A. Predicting future prospects of aptamers in field-effect transistor biosensors / C. A. Vu, W. Y. Chen // *Molecules*. - 2020. - V. 25, N 3. - Paper 680.
128. Kutovyi, Y. Amyloid-beta peptide detection via aptamer-functionalized nanowire sensors exploiting single-trap phenomena / Y. Kutovyi, H. Hlukhova, N. Boichuk [et al.] // *Biosensors and Bioelectronics*. - 2020. - V. 154. - Paper 112053.

129. Wang, J. Aptamer-functionalized field-effect transistor biosensors for disease diagnosis and environmental monitoring / J. Wang, D. Chen, W. Huang [et al.] // *Exploration*. - 2023. - Paper 20210027.

130. Bulgakova, A. Solution pH effect on drain-gate characteristics of SOI FET biosensor / A. Bulgakova, A. Berdyugin, O. Naumova [et al.] // *Electronics*. - 2023. - V. 12, N 3. - Paper 777.

131. Мальсагова, К. А. Высококочувствительная детекция низкокопийных белков с использованием нанопроволочного биосенсора : специальность 03.01.04 «Биохимия» : диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук / Мальсагова Кристина Ахмедовна ; Федеральное государственное бюджетное научное учреждение "Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича" (ИБМХ). - Москва, 2019. - 132 с.

132. Knopfmacher, O. Nernst limit in dual-gated Si-nanowire FET sensors / O. Knopfmacher, A. Tarasov, W. Fu [et al.] // *Nano letters*. - 2010. - V. 10. - P. 2268-2274.

133. Duan, X. Quantification of the affinities and kinetics of protein interactions using silicon nanowire biosensors / X. Duan, Y. Li, N. K. Rajan [et al.] // *Nature nanotechnology*. - 2012. - V. 7, N 6. - P. 401-407.

134. Squires, T. M. Making it stick: convection, reaction and diffusion in surface-based biosensors / T. M. Squires, R. J. Messinger, S. R. Manalis // *Nature biotechnology*. - 2008. - V. 26, N 4. - P. 417-426.

135. Dmitrienko, E. Surface modification of SOI-FET sensors for label-free and specific detection of short RNA analyte / E. Dmitrienko, O. Naumova, V. Fomin [et al.] // *Nanomedicine*. - 2016. - V. 11, N 16. - P. 2073-2082.

136. Евстрапов, А. А. Физические методы управления движением и разделением микрочастиц в жидких средах. I. Диэлектрофорез, фотофорез, оптофорез, оптический пинцет / А. А. Евстрапов // *Научное приборостроение*. - 2005. - Т. 15, № 1. - С. 3-20.

137. Генералов, В. М. Диэлектрофорез в диагностике инфекционных и неинфекционных заболеваний / В. М. Генералов, М. В. Кручинина, А. Г. Дурыманов [и др.]. - Новосибирск : Церис, 2011. - 172 с.

138. Ahoulou, S. Functionalization and characterization of silicon nanowires for sensing applications: A review / S. Ahoulou, E. Perret, J. M. Nedelec // *Nanomaterials*. - 2021. - V. 11, N 4. - Paper 999.

139. Streifer, J. A. Covalent functionalization and biomolecular recognition properties of DNA-modified silicon nanowires / J. A. Streifer, H. Kim, B. M. Nichols [et al.] // *Nanotechnology*. - 2005. - V. 16, N 9. - Paper 1868.

140. Калинин, И. П. Влияние химической подготовки поверхности кремния на качество и структуру эпитаксиальных пленок карбида кремния, синтезированных методом замещения атомов / И. П. Калинин, С. А. Кукушкин, А. В. Осипов // *Физика и техника полупроводников*. - 2018. - Т. 52, № 6. - С. 656-663.

141. Лисичкин, Г. В. Химия привитых поверхностных соединений / Г. В. Лисичкин, А. Ю. Фадеев, А. А. Сердан [и др.] / под редакцией Г.В. Лисичкина. - Москва : Физматлит, 2003. - 566 с.

142. Никонов, А. М. Подготовка поверхности нанопроволочных кремниевых полевых транзисторов как этап создания биосенсора: обзор / А. М. Никонов, О. В. Наумова, В. М. Генералов [и др.] // *Поверхность. Рентгеновские, синхротронные и нейтронные исследования*. - 2020. - № 4. - С. 24-34.

143. Соколов, П. А. Разработка способов фиксации ДНК на различных поверхностях и исследование свойств сформированных структур : специальность 02.00.06 «Высокомолекулярные соединения» : диссертация на соискание ученой степени кандидата физико-математических наук / Соколов Петр Александрович ; Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Санкт-Петербургский государственный университет». - Санкт-Петербург, 2014. - 171 с.

144. Суворов, А. Л. Технологии производства и методы исследования структур «кремний на изоляторе» (КНИ) / А. Л. Суворов, Б. Ю. Богданович, А. Г. Залужный [и др.]. - М. : МИЭТ, 2004. - 407 с.

145. Данилина, Т. И. Технология кремниевой наноэлектроники: Учебное пособие / Т. И. Данилина, В. А. Кагадей, Е. В. Анищенко. – Томск : В-Спектр, 2011. - 263 с.

146. Шангереева, Б. А. Способ очистки поверхности кремниевых пластин для изготовления мощных транзисторов / Б. А. Шангереева, А. И. Муртазалиев, Ю. П. Шангереев // Инновационная наука. - 2015. - № 11-2. - С. 133-135.

147. Qin, S. An evaluation of contamination from plasma immersion ion implantation on silicon device characteristics / S. Qin, C. Chan // Journal of electronic materials. - 1994. - V. 23. - P. 337-340.

148. Wu, C. C. Label-free biosensing of a gene mutation using a silicon nanowire field-effect transistor / C. C. Wu, F. H. Ko, Y. S. Yang [et al.] // Biosensors and bioelectronics. - 2009. - V. 25, N 4. - P. 820-825.

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

150. Goddard, J. M. Polymer surface modification for the attachment of bioactive compounds / J. M. Goddard, J. H. Hotchkiss // Progress in polymer science. - 2007. - V. 32, N 7. - P. 698-725.

151. Сарач, О. Б. Конспект лекций по дисциплине Основы технологии электронной компонентной базы / О. Б. Сарач. - Москва : НИУ «МЭИ», 2012. - 250 с.

152. Шмаков, М. Школа производства ГПИС. Очистка поверхности пластин и подложек / М. Шмаков, В. Паршин, А. Смирнов // Технологии в электронной промышленности. - 2008. - № 5. - С. 76-80.

153. Williams, K. R. Etch rates for micromachining processing-Part II / K. R. Williams, K. Gupta, M. Wasilik // Journal of microelectromechanical systems. - 2003. - V. 12, N 6. - P. 761-778.

154. Способ и устройство для обнаружения и регулирования эндотелиального фактора роста сосудов путем создания петли гомеостазас использованием биодатчика с полуантителами / Й. Шачар, Т. Чен, В. Ву [и др.] : Заявка на изобретение RU 2012155739 А, заявл. 22.06.2011; опубл. 27.07.2014, Бюл. № 21.

155. Chalmpes, N. Biomass waste carbonization in piranha solution: A route to hypergolic carbons? / N. Chalmpes, M. Baikousi, T. Giouis [et al.] // *Micro. – MDPI*, 2022. - V. 2, N 1. - P. 137-153.

156. Zhang, B. Lessons learned from the explosion that occurred during the synthesis of diaminomethanesulfonic acid: Discussion and preventative strategies / B. Zhang, L. Zhang, H. Wang [et al.] // *ACS Chemical Health & Safety*. - 2021. - V. 28, N 4. - P. 244-249.

157. Han, S. W. Mutiscale substrates based on hydrogel-incorporated silicon nanowires for protein patterning and microarray-based immunoassays / S. W. Han, S. Lee, J. Hong [et al.] // *Biosensors and Bioelectronics*. - 2013. - V. 45. - P. 129-135.

158. Sanzari, I. Poly (N-isopropylacrylamide) based thin microgel films for use in cell culture applications / I. Sanzari, E. Buratti, R. Huang [et al.] // *Scientific reports*. - 2020. - V. 10, - N 1. - P. 1-14.

159. Sun, Y. Surface modification of silicon wafer by grafting zwitterionic polymers to improve its antifouling property / Y. Sun, C. Chen, H. Xu [et al.] // *Applied Surface Science*. - 2017. - V. 419. - P. 642-649.

160. Wu, H. X. Protein-resistance performance of amphiphilic copolymer brushes consisting of fluorinated polymers and polyacrylamide grafted from silicon surfaces / H. X. Wu, L. Tan, M. Y. Yang [et al.] // *Rsc Advances*. - 2015. - V. 5, N 16. - P. 12329-12337.

161. Ishizaka, A. Low temperature surface cleaning of silicon and its application to silicon MBE / A. Ishizaka, Y. Shiraki // *Journal of the Electrochemical Society*. - 1986. - V. 133, N 4. - Paper 666.

162. Zhang, G. J. Highly sensitive measurements of PNA-DNA hybridization using oxide-etched silicon nanowire biosensors / G. J. Zhang, J. H. Chua, R. E. Chee [et al.] // *Biosensors and Bioelectronics*. - 2008. - V. 23, N 11. - P. 1701-1707.

163. Калугин, В. В. Исследование и разработка процессов подготовки поверхности кремниевых пластин при изготовлении структур кремний на изоляторе : специальность 05.27.06 «Технология и оборудование для производства полупроводников, материалов и приборов электронной техники» : диссертация на

соискание ученой степени кандидата технических наук / Калугин Виктор Владимирович ; Московский государственный институт электронной техники (технический университет). - Москва, 2001. - 187 с.

164. Gao, Z. Silicon nanowire arrays for label-free detection of DNA / Z. Gao, A. Agarwal, A. D. Trigg [et al.] // *Analytical chemistry*. - 2007. - V. 79, N 9. - P. 3291-3297.

165. Pividori, M. I. Electrochemical genosensor design: immobilisation of oligonucleotides onto transducer surfaces and detection methods / M. I. Pividori, A. Merkoci, S. Alegret // *Biosensors and Bioelectronics*. - 2000. - V. 15, N 5-6. - P. 291-303.

166. Ivanov, Y. D. SOI nanowire for the high-sensitive detection of HBsAg and  $\alpha$ -fetoprotein / Y. D. Ivanov, T. O. Pleshakova, A. F. Kozlov [et al.] // *Lab on a Chip*. - 2012. - V. 12, N 23. - P. 5104-5111.

167. Itano, M. Particle removal from silicon wafer surface in wet cleaning process / M. Itano, F.W. Kern, M. Miyashita [et al.] // *IEEE Transactions on semiconductor manufacturing*. - 1993. - V. 6, N 3. - P. 258-267.

168. Min, T. Z. M. M. M. Biosensors based on ion-sensitive field-effect transistors for HLA and MICA antibody detection in kidney transplantation / T. Z. M. M. Min, S. Phanabamrung, W. Chaisriratanakul [et al.] // *Molecules*. - 2022. - V. 27, N 19. - Paper 6697.

169. Kern, W. The evolution of silicon wafer cleaning technology / W. Kern // *Journal of The Electrochemical Society*. -1990. - V. 137, № 6. - P. 1887-1892.

170. Celler, G. K. Etching of silicon by the RCA standard clean 1 / G. K. Celler, D. L. Barr, J. M. Rosamilia // *Electrochemical and Solid-State Letters*. - 1999. - V. 3., N 1. - Paper 47.

171. Aissaoui, N. Silane layers on silicon surfaces: mechanism of interaction, stability, and influence on protein adsorption / N. Aissaoui, L. Bergaoui, J. Landoulsi [et al.] // *Langmuir*. - 2012. - V. 28, N 1. - P. 656-665.

172. Kroesen, G. M. W. Investigations of the surface chemistry of silicon substrates etched in a rf-biased inductively coupled fluorocarbon plasma using Fourier-transform infrared ellipsometry / G. M. W. Kroesen, H.- J. Lee, H. Moriguchi [et al.] //

Journal of Vacuum Science & Technology A: Vacuum, Surfaces, and Films. - 1998. - V. 16, N 1. - P. 225-232.

173. Shirafuji, T. Silicon surfaces treated by CF<sub>4</sub>, CF<sub>4</sub>/H<sub>2</sub>, and CF<sub>4</sub>/O<sub>2</sub> RF plasmas: Study by in situ fourier transform infrared ellipsometry / T. Shirafuji, W. W. Stoffels, H. Moriguchi [et al.] // Journal of Vacuum Science and Technology A. - 1997. - V. 15, N 2. - P. 209-21512.

174. Laermer, F. Method of anisotropically etching silicon / F. Laermer, A. Schilp A. : пат. 5501893 CIIIA. - 1996.

175. Chou, W. C. Neutralized chimeric DNA probe for the improvement of GC-rich RNA detection specificity on the nanowire field-effect transistor / W. C. Chou, W. P. Hu, Y. S. Yang [et al.] // Scientific reports. - 2019. - V. 9, N 1. - P. 1-10.

176. Vu, C. A. Signal enhancement of silicon nanowire field-effect transistor immunosensors by RNA aptamer / C. A. Vu, W. P. Hu, Y. S. Yang [et al.] // ACS omega. - 2019. - V. 4, N 12. - P. 14765-14771.

177. Vu, C. A. Improved biomarker quantification of silicon nanowire field-effect transistor immunosensors with signal enhancement by RNA aptamer: Amyloid beta as a case study / C. A. Vu, W. Y. Chen, Y. S. Yang [et al.] // Sensors and Actuators B: Chemical. - 2021. - V. 329. - Paper 129150.

178. Bhardwaj, T. A review on immobilization techniques of biosensors / T. Bhardwaj // Int. J. Eng. Res. - 2014. - V. 3, N 5. - Paper 137732367.

179. Prieto-Simon, B. Biomolecule immobilization in biosensor development: tailored strategies based on affinity interactions / B. Prieto-Simon, M. Campas, J. L. Marty // Protein and peptide letters. - 2008. - V. 15, N 8. - P. 757-763.

180. Kozitsina, A. N. Sensors based on bio and biomimetic receptors in medical diagnostic, environment, and food analysis / A. N. Kozitsina, T. S. Svalova, N. N. Malysheva [et al.] // Biosensors. - 2018. - V. 8, N 2. - Paper 35.

181. De Smet, L. Organic surface modification of silicon nanowire-based sensor devices / L. De Smet, D. Ullien, M. Mescher [et al.] // Nanowires-Implementations and Applications. - 2011. - P. 267-288.

182. Vu, X. T. Fabrication and application of a microfluidic-embedded silicon nanowire biosensor chip / X. T. Vu, R. Stockmann, B. Wolfrum [et al.] // *physica status solidi (a)*. - 2010. - V. 207, N 4. - P. 850-857.
183. Kusnezow, W. Solid supports for microarray immunoassays / W. Kusnezow, J. D. Hoheisel // *Journal of molecular recognition*. - 2003. - V. 16, N 4. - P. 165-176.
184. Welch, N. G. Orientation and characterization of immobilized antibodies for improved immunoassays / N. G. Welch, J. A. Scoble, B. W. Muir [et al.] // *Biointerphases*. - 2017. - V. 12, N 2. - Paper 02D301.
185. Hartmann, A. One-step immobilization of immunoglobulin G and potential of the method for application in immunosensors / A. Hartmann, D. Bock, S. Seeger // *Sensors and Actuators B: Chemical*. - 1995. - V. 28, N 2. - P. 143-149.
186. Moskovitz, Y. Mean-field model of immobilized enzymes embedded in a grafted polymer layer / Y. Moskovitz, S. Srebnik // *Biophysical journal*. - 2005. - V. 89, N 1. - P. 22-31.
187. Du, L. A novel biomimetic olfactory cell-based biosensor with DNA-directed site-specific immobilization of cells on a microelectrode array / L. Du, L. Zou, Q. Wang [et al.] // *Sensors and Actuators B: Chemical*. - 2015. - V. 217. - P. 186-192.
188. Яковлев, А. А. Кросс-линкеры и их использование для исследования межмолекулярных взаимодействий / А. А. Яковлев // *Нейрохимия*. - 2009. - Т. 26, № 2. - С. 149-155.
189. Coffinier, Y. Surface modification of semiconducting silicon nanowires for biosensing applications / Y. Coffinier, R. Boukherroub // *Semiconducting silicon nanowires for biomedical applications*. - Woodhead Publishing, 2014. - P. 26-61.
190. Shi, J. Semiconductor Nanowire-Based Cellular and Subcellular Interfaces / J. Shi, C. Sun, E. Liang [et al.] // *Advanced Functional Materials*. - 2022. - V. 32, N 11. - Paper 2107997.
191. Sapsford, K. E. Real-time analysis of protein adsorption to a variety of thin films / K. E. Sapsford, F. S. Ligler // *Biosensors and Bioelectronics*. - 2004. - V. 19, N 9. - P. 1045-1055.

192. Saengdee, P. Surface modification of silicon dioxide, silicon nitride and titanium oxynitride for lactate dehydrogenase immobilization / P. Saengdee, W. Chaisriratanakul, W. Bunjongpru [et al.] // Biosensors and Bioelectronics. - 2015. - V. 67. - P. 134-138.

193. Lin, M. C. Control and detection of organosilane polarization on nanowire field-effect transistors / M. C. Lin, C. J. Chu, L. C. Tsai [et al.] // Nano Letters. - 2007. - V. 7, N 12. - P. 3656-3661.

194. Hahm, J. Direct ultrasensitive electrical detection of DNA and DNA sequence variations using nanowire nanosensors / J. Hahm, C. M. Lieber // Nano letters. - 2004. - V. 4, N 1. - P. 51-54.

195. Linford, M. R. Alkyl monolayers on silicon prepared from 1-alkenes and hydrogen-terminated silicon / M. R. Linford, P. Fenter, P. M. Eisenberger [et al.] // Journal of the American Chemical Society. - 1995. - V. 117, N 11. - P. 3145-3155.

196. Larsen, B. A. Mono and dialkoxysilane surface modification of superparamagnetic iron oxide nanoparticles for application as magnetic resonance imaging contrast agents / B. A. Larsen, K. M. Hurst, W. R. Ashurst [et al.] // Journal of Materials Research. - 2012. - V. 27, N 14. - P. 1846-1852.

197. Shirai, K. Extended nanofluidic immunochemical reaction with femtoliter sample volumes / K. Shirai, K. Mawatari, T. Kitamori // Small. - 2014. - V. 10, N 8. - P. 1514-1522.

198. PXIe-4163 Specifications. – Текст : электронный. URL: <https://www.ni.com/ru-ru/shop/model/pxie-4163.html> (дата обращения 6.03.2023)

199. PXIe-4135 Specifications. – Текст : электронный. URL: <https://www.ni.com/ru-ru/shop/model/pxie-4135.html> (дата обращения 6.03.2023)

200. Zida, S. I. Fabrication and characterization of an aptamer-based N-type silicon nanowire FET biosensor for VEGF detection / S. I. Zida, C. C. Yang, Y. L. Khung [et al.] // Journal of Medical and Biological Engineering. - 2020. - V. 40. - P. 601-609.

201. Malsagova, K. A. Nanowire aptamer-sensitized biosensor chips with gas plasma-treated surface for the detection of hepatitis C virus core antigen / K. A.

Malsagova, T. O. Pleshakova, R. A. Galiullin [et al.] // *Coatings*. - 2020. - V. 10, N. 8. - Paper 753.

202. Vashist, S. K. Immobilization of antibodies and enzymes on 3-aminopropyltriethoxysilane-functionalized bioanalytical platforms for biosensors and diagnostics / S. K. Vashist, E. Lam, S. Hrapovic [et al.] // *Chemical reviews*. - 2014. - V. 114. - P. 11083-11130.

203. Vashist, S. K. Surface plasmon resonance-based immunoassay for human fetuin A / S. K. Vashist, E. M. Schneider, J. H. T. Luong // *Analyst*. - 2014. - V. 139. - P. 2237-2242.

204. Malsagova, K. A. Detection of influenza virus using a SOI-nanoribbon chip, based on an N-type field-effect transistor / K. A. Malsagova, T. O. Pleshakova, A. F. Kozlov [et al.] // *Biosensors*. - 2021. - V. 11, N 4. - Paper 119

205. Malsagova, K. A. Optical monitoring of the production quality of silicon nanoribbon chips intended for the detection of ASD-associated oligonucleotides / K. A. Malsagova, T. O. Pleshakova, V. P. Popov [et al.] // *Micromachines*. - 2021. - V. 12. - Paper 147.

206. Ivanov, Y. D. Ultrasensitive detection of 2, 4-dinitrophenol using nanowire biosensor / Y. D. Ivanov, K. A. Malsagova, T. O. Pleshakova [et al.] // *Journal of Nanotechnology*. - 2018. - V. 5. - P. 1-6.

207. Malsagova, K. A. Highly sensitive detection of CA 125 protein with the use of an n-type nanowire biosensor / K. A. Malsagova, T. O. Pleshakova R. A., Galiullin [et al.] // *Biosensors*. - 2020. - V. 10. - Paper. 210.

208. Figueroa, J. Antibody immobilization using pneumatic spray: Comparison with the avidin–biotin bridge immobilization method / J. Figueroa, S. Magaña, D. V. Lim [et al.] // *Journal of immunological methods*. - 2012. - V. 386, N 1-2. - P. 1-9.

209. Nanduri, V. Phage as a molecular recognition element in biosensors immobilized by physical adsorption / V. Nanduri, I. B. Sorokulova, A. M. Samoylov [et al.] // *Biosensors and Bioelectronics*. - 2007. - V. 22, N 6. - P. 986-992.

210. Steen Redeker, E. Protein engineering for directed immobilization / E. Steen Redeker, D. T. Ta, D. Cortens // *Bioconjugate chemistry*. - 2013. - V. 24, N 11. - P. 1761-1777.
211. Naumova, O. V. Modification and characterization of the surface of SOI nanowire sensors / O. V. Naumova, B. I. Fomin, N. F. Malyarenko [et al.] // *Journal of Nano Research*. - 2012. - V. 18. - P. 139-147.
212. Sypabekova, M. 3-Aminopropyltriethoxysilane (APTES) deposition methods on oxide surfaces in solution and vapor phases for biosensing applications / M. Sypabekova, A. Hagemann, D. Rho [et al.] // *Biosensors*. - 2022. - V. 13. - Paper. 36.
213. Fujiyoshi, Y. Fine structure of influenza A virus observed by electron cryo-microscopy / Y. Fujiyoshi, N. P. Kume, K. Sakata [et al.] // *The EMBO journal*. - 1994. - V. 13. - P. 318-326.
214. Barge, A. Vesicular stomatitis virus M protein may be inside the ribonucleocapsid coil / A. Barge, Y. Gaudin, P. Coulon [et al.] // *Journal of virology*. - 1993. - V. 67, N 12. - P. 7246-7253
215. Petersen, B. W. Orthopoxviruses: vaccinia (smallpox vaccine), variola (smallpox), monkeypox, and cowpox / B. W. Petersen, I. K. Damon, J. E. Bennett [et al.] // *Mandell, Douglas, and Bennett's principles and practice of infectious diseases*. - Philadelphia : Elsevier, 2014.
216. Wasfi, A. COVID-19 Detection via silicon nanowire field-effect transistor: setup and modeling of its function / A. Wasfi, F. Awwad, J. G. Gelovani [et al.] // *Nanomaterials*. - 2022. - V. 12, N 15. - Paper 2638.
217. Reza, S. Noise in silicon nanowires / S. Reza, G. Bosman, M. S. Islam [et al.] // *IEEE transactions on nanotechnology*. - 2006. - V. 5, N 5. - P. 523-529.
218. Choi, S. Experimental extraction of stern-layer capacitance in biosensor detection using silicon nanowire field-effect transistors / S. Choi, H. S. Mo, J. Kim [et al.] // *Current Applied Physics*. - 2020. - T. 20, N 6. - C. 828-833.
219. Bereyhi, M. J. Nanofabrication meets open science / M. J. Bereyhi, T. J. Kippenberg // *Nature Nanotechnology*. - 2021. - V. 16, N 8. - P. 850-852.

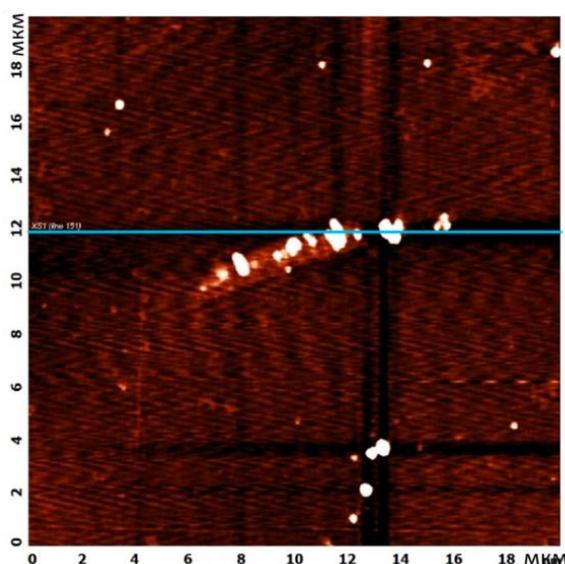
220. Malkin, A. J. Structure of intracellular mature vaccinia virus visualized by in situ atomic force microscopy / A. J. Malkin, A. McPherson, P. D. Gershon // Journal of virology. - 2003. - V. 77. - P. 6332-6340.

221. 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 / V. Generalov, A. Cheremiskina, A. Glukhov [et al.] // Sensors. - 2023. - V. 23. - Paper. 7490.

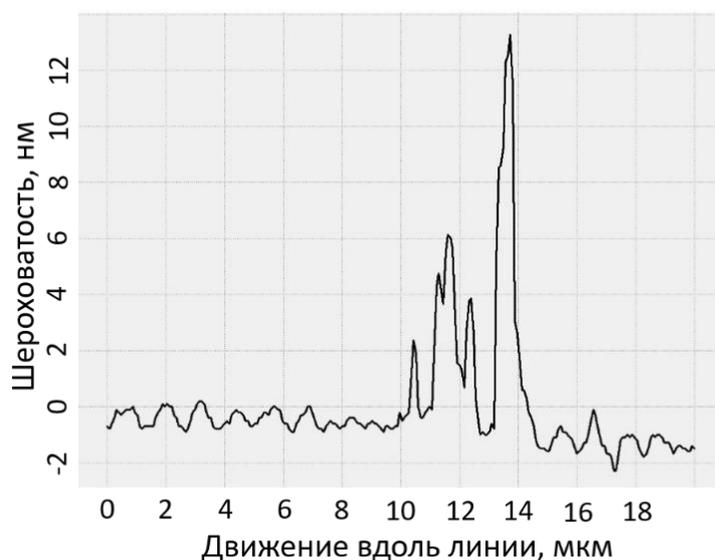
## ПРИЛОЖЕНИЕ А

### Результаты атомно-силовой микроскопии поверхности кремниевых пластин после этапов очистки и функционализации

Результаты атомно-силовой микроскопии поверхности кремниевой пластины (область анализа  $18 \times 18$  мкм) после химической жидкостной обработки методом 1-ХЖО ( $\text{HF}:\text{H}_2\text{O}=1:50$ ,  $t=40$  с,  $T=25$  °С) представлены на рисунке А1. На поверхности присутствуют редкие частицы высотой до 15 нм. На остальной поверхности наблюдается рябь, которая возникает в результате акустических колебаний зонда в процессе сканирования. Высота волн  $\sim 2$  нм. Их присутствие в кадре говорит об отсутствии на поверхности крупной грязи (размер более 100 нм).



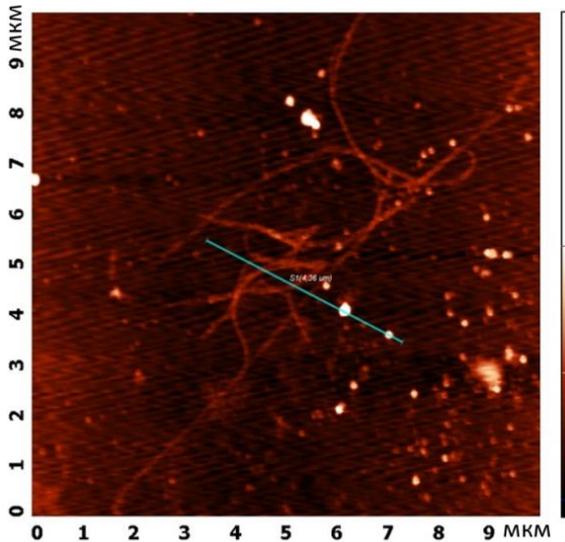
(a)



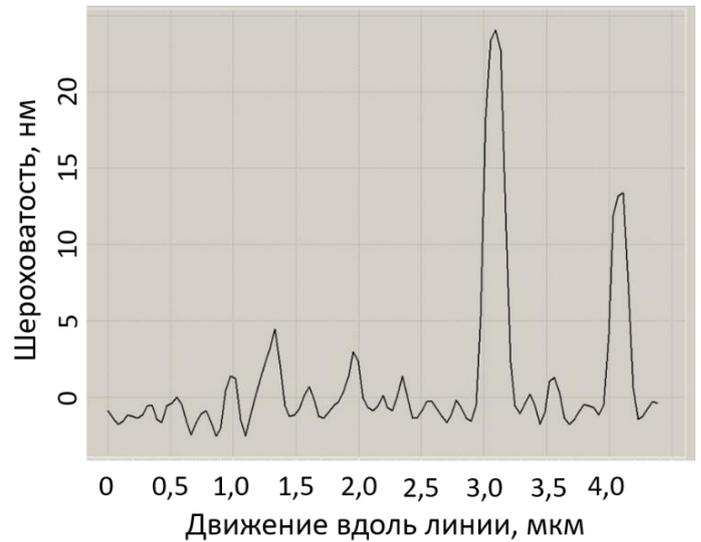
(б)

Рисунок А1 – (а) Результаты атомно-силовой микроскопии поверхности кремниевой пластины после метода 1-ХЖО химической жидкостной обработки. (б) Профиль сечения по высоте вдоль линии (синяя линия на рисунке А1а)

Анализ поверхности пластины после 3-ХЖО ( $\text{H}_2\text{SO}_4:\text{H}_2\text{O}_2=10:3$ ,  $t=7$  мин,  $T=30$  °С) показал наличие филаментозных структур толщиной  $\sim 5$  нм и наночастицы высотой до 20 нм (рисунок А2). Также показано наличие царапин.



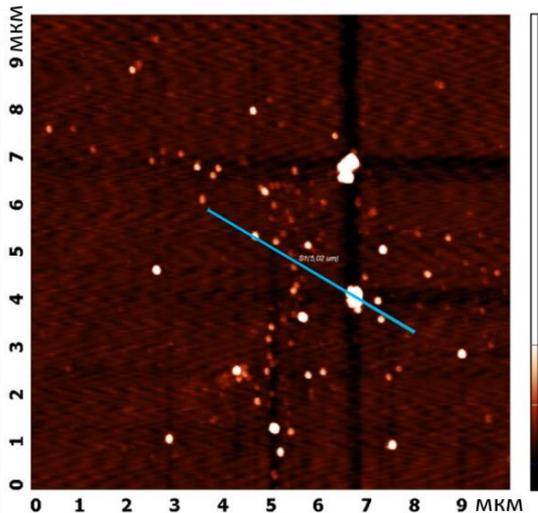
(а)



(б)

Рисунок А2 – (а) Результаты атомно-силовой микроскопии поверхности кремниевой пластины после метода 3-ХЖО химической жидкостной обработки. (б) Профиль сечения по высоте вдоль линии (синяя линия на рисунке А2а)

Результаты АСМ поверхности (анализируемая область  $9 \times 9$  мкм) после ХЖО методом 4-ХЖО ( $\text{NH}_4\text{OH}:\text{H}_2\text{O}_2:\text{H}_2\text{O}=1:4:20$ ,  $t=15$  мин,  $T=25$  °С) представлены на рисунке А3. На фотографии присутствуют частицы размером до 30 нм, шероховатость с амплитудой  $\sim 5$  нм. Также можно наблюдать наличие черных полос параллельно осям и рябь, что не относится к характеристикам поверхности пластины.



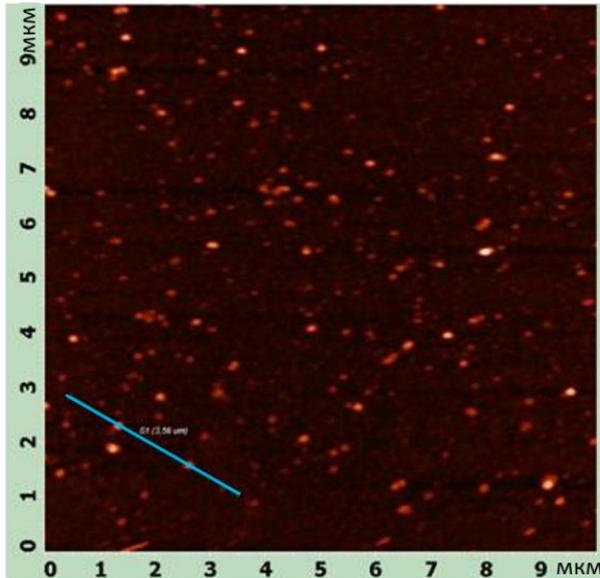
(а)



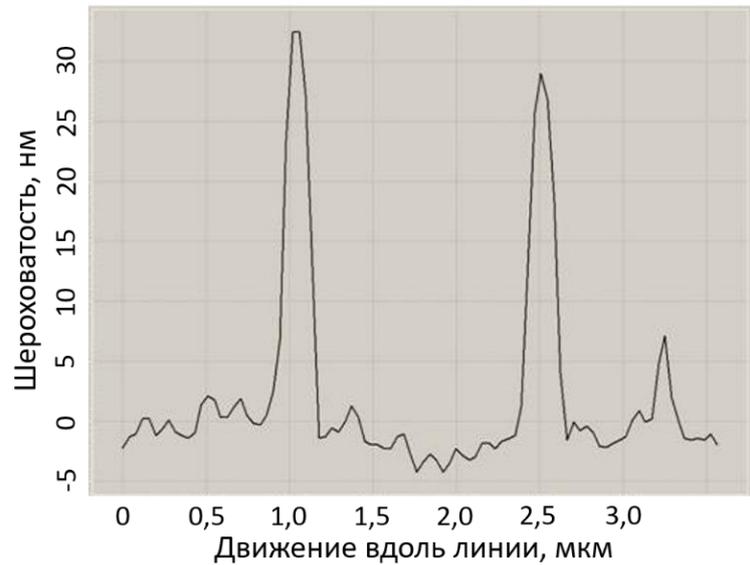
(б)

Рисунок А3 – (а) Результаты атомно-силовой микроскопии поверхности кремниевой пластины после метода 4-ХЖО химической жидкостной обработки. (б) Профиль сечения по высоте вдоль линии (синяя линия на рисунке А3а)

Анализ пластины после ХЖО методом 5-ХЖО ( $\text{NH}_4\text{OH}:\text{H}_2\text{O}_2:\text{H}_2\text{O}=1:4:20$ ,  $t=10$  мин,  $T=50$  °C;  $\text{H}_2\text{SO}_4:\text{H}_2\text{O}_2=10:1$ ,  $t=5$  мин,  $T=30$  °C) показал значительную неоднородность поверхности и наличие большого количества посторонних частиц размером около 30 нм (рисунок А4).



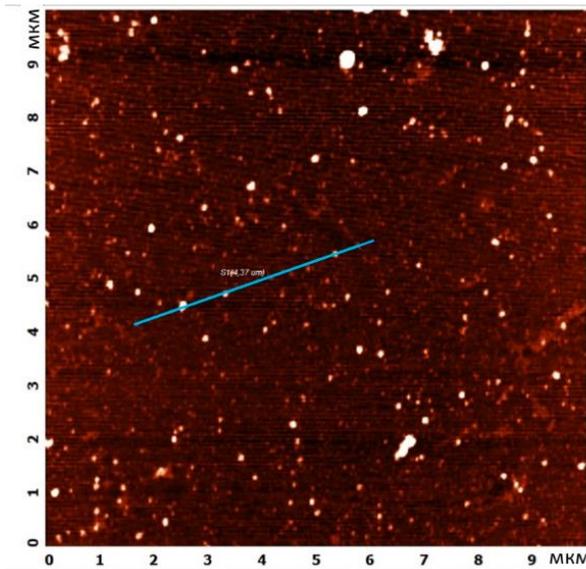
(а)



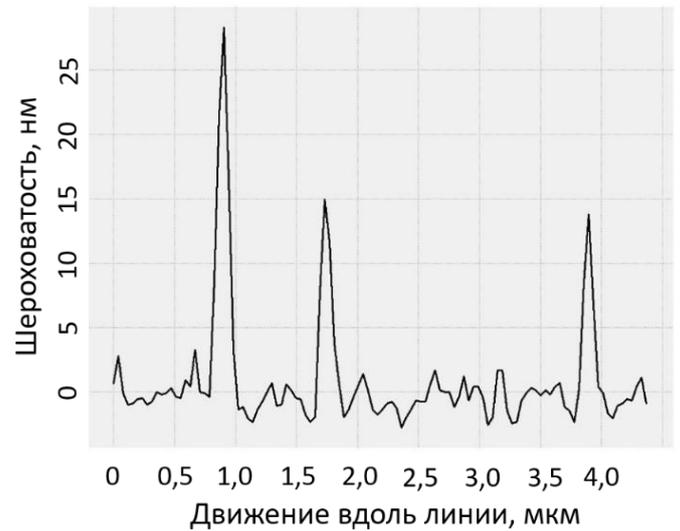
(б)

Рисунок А4 – (а) Результаты атомно-силовой микроскопии поверхности кремниевой пластины после метода 5-ХЖО химической жидкостной обработки. (б) Профиль сечения по высоте вдоль линии (синяя линия на рисунке А4а)

На рисунке А5 представлены результаты АСМ поверхности пластины, функционализированные 1%-м раствором ГА в ФСБ. Как видно из рисунка, на поверхности наблюдается большое количество частиц с высотой 15-25 нм и шероховатость с амплитудой 3 нм.



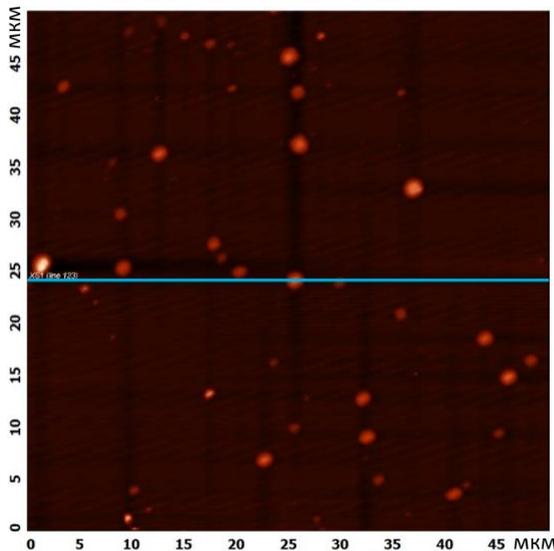
(а)



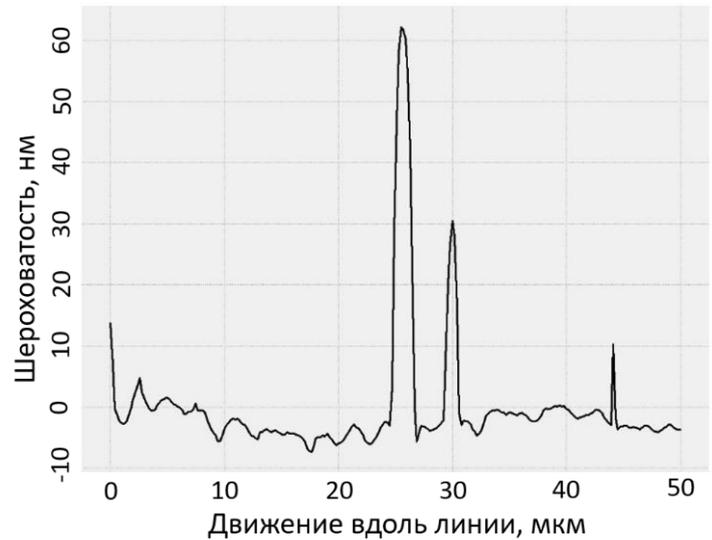
(б)

Рисунок А5 – (а) Результаты атомно-силовой микроскопии поверхности кремниевой пластины, модифицированной 1% ГА. (б) Профиль сечения по высоте вдоль линии (синяя линия на рисунке А5а)

Результаты функционализации поверхности 2,5%-м раствором ГА в ФСБ представлены на рисунке А6. На поверхности наблюдаются частицы высотой около 70 нм, шероховатость с амплитудой 5 нм.



(а)



(б)

Рисунок А6 – (а) Результаты атомно-силовой микроскопии поверхности кремниевой пластины, модифицированной 2,5% ГА. (б) Профиль сечения по высоте вдоль линии (синяя линия на рисунке А6а)



Таблица Б3 – Величина тока в цепи исток-сток десяти НП-сенсоров в зависимости от напряжения  $V_{bg}$  после внесения вируса гриппа птиц подтип А(Н9N2). Относительная погрешность измерения величины тока  $0,10\%+100$  пА, напряжения –  $0,022\%+1$  мВ

№	$V_{bg}$ , В	Номер НП-сенсора. Величина тока $I_{ds}$ в цепи исток-сток, А									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	0	$-2 \times 10^{-11}$	$-3 \times 10^{-11}$	$-3 \times 10^{-11}$	$-5 \times 10^{-12}$	$-3 \times 10^{-11}$	$-2 \times 10^{-11}$	$-9 \times 10^{-11}$	$-9 \times 10^{-11}$	$-5 \times 10^{-10}$	$5 \times 10^{-11}$
2	2	$-2 \times 10^{-10}$	$-5 \times 10^{-11}$	$-5 \times 10^{-11}$	$-1 \times 10^{-11}$	$-3 \times 10^{-7}$	$-2 \times 10^{-10}$	$-1 \times 10^{-10}$	$-9 \times 10^{-11}$	$-1 \times 10^{-10}$	$3 \times 10^{-11}$
3	3	$-4 \times 10^{-12}$	$-4 \times 10^{-11}$	$-4 \times 10^{-11}$	$-2 \times 10^{-11}$	$-2 \times 10^{-10}$	$1 \times 10^{-10}$	$-6 \times 10^{-11}$	$-9 \times 10^{-11}$	$-1 \times 10^{-10}$	$4 \times 10^{-11}$
4	5	$5 \times 10^{-8}$	$-4 \times 10^{-11}$	$-1 \times 10^{-11}$	$-4 \times 10^{-11}$	$1 \times 10^{-9}$	$4 \times 10^{-8}$	$4 \times 10^{-9}$	$1 \times 10^{-9}$	$9 \times 10^{-10}$	$2 \times 10^{-11}$
5	6	$4 \times 10^{-7}$	$-2 \times 10^{-11}$	$2 \times 10^{-10}$	$-4 \times 10^{-11}$	$3 \times 10^{-8}$	$3 \times 10^{-7}$	$7 \times 10^{-8}$	$2 \times 10^{-8}$	$1 \times 10^{-8}$	$3 \times 10^{-11}$
6	8	$6 \times 10^{-7}$	$-4 \times 10^{-11}$	$1 \times 10^{-9}$	$-2 \times 10^{-11}$	$8 \times 10^{-8}$	$4 \times 10^{-7}$	$2 \times 10^{-7}$	$7 \times 10^{-8}$	$7 \times 10^{-8}$	$3 \times 10^{-11}$
7	9	$7 \times 10^{-7}$	$-7 \times 10^{-11}$	$4 \times 10^{-9}$	$-4 \times 10^{-11}$	$2 \times 10^{-7}$	$6 \times 10^{-7}$	$3 \times 10^{-7}$	$2 \times 10^{-7}$	$2 \times 10^{-7}$	$3 \times 10^{-11}$
8	10	$8 \times 10^{-7}$	$-5 \times 10^{-11}$	$5 \times 10^{-9}$	$-3 \times 10^{-11}$	$3 \times 10^{-7}$	$7 \times 10^{-7}$	$5 \times 10^{-7}$	$2 \times 10^{-7}$	$2 \times 10^{-7}$	$2 \times 10^{-11}$

## ПРИЛОЖЕНИЕ В

## Патент на полезную модель №215954 «Биосенсор для индикации биологических частиц»



## ПРИЛОЖЕНИЕ Г

## Акт внедрения в опытно-промышленное производство нанопроволочного сенсора



**АКЦИОНЕРНОЕ ОБЩЕСТВО  
«НОВОСИБИРСКИЙ ЗАВОД  
ПОЛУПРОВОДНИКОВЫХ ПРИБОРОВ  
ВОСТОК»**

АО «НЗПП Восток», 630082, область Новосибирская,  
город Новосибирск, улица Дачная, 60  
тел. (383) 226-29-00, факс: (383) 225-84-79,  
e-mail: [office@nzpp.ru](mailto:office@nzpp.ru), сайт: [www.nzpp.ru](http://www.nzpp.ru)  
ИНН 5402546039, КПП 540201001,  
ОГРН 1115476167180, ОКПО 07617658,  
ОКВЭД 26.11.3.

№ 04 / 202-110 от 01.09.2013  
На № \_\_\_\_\_ от \_\_\_\_\_

### АКТ ВНЕДРЕНИЯ

в опытно-промышленное производство нанопроволочного сенсора

В ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора в рамках государственного задания от 14.01.2021 г. № 141-00102-21-02 по теме ГЗ-21/21 «Разработка биосенсора для экспресс-индикации социально значимых патогенов» разработан биосенсор, на который получен патент на полезную модель №215954 «Биосенсор для индикации биологических частиц», авторы: Генералов В.М., Черемискина А.А., Глухов А.В. и Грабежова В.К., патентообладатель: ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора.

Основные конструкционные идеи сенсора предложены Черемискиной Анастасией Алексеевной. Конструкция предусматривает два заземляющих электрода непосредственно на поверхности кристалла сенсора. Указанное решение существенным образом упрощает эксплуатацию сенсора.

По заказу правообладателя ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора АО «Новосибирский завод полупроводниковых приборов Восток» разработал технологию и выпустил опытно-промышленную партию биосенсоров, предназначенных для детекции биологических частиц «вирусов, белков, ДНК и биологических молекул. Указанные биосенсоры использованы в лабораторной практике ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора.

Заместитель генерального директора по  
научной работе АО «НЗПП Восток», К.Т.Н.



А.В. Глухов