

ФУНДАМЕНТАЛЬНЫЕ ПРОБЛЕМЫ БИОСЕНСОРИКИ НА ОСНОВЕ НАНОГЕТЕРОСТРУКТУР

УДК 557.152.3, 538.975, 621.382.3

КНИ-НАНОПРОВОЛОЧНЫЙ ТРАНЗИСТОР ДЛЯ ДЕТЕКЦИИ МОЛЕКУЛ D-NFATc1*

Ю. Д. Иванов¹, Т. О. Плешакова¹, А. Ф. Козлов¹,
К. А. Мальсагова¹, Н. В. Крохин¹, А. Л. Кайшева¹,
И. Д. Шумов¹, В. П. Попов², О. В. Наумова², Б. И. Фомин²,
Д. А. Насимов², А. Л. Асеев², А. И. Арчаков¹

¹Институт биомедицинской химии им. В. Н. Ореховича РАН,
119121, Москва, ул. Погодинская, 10
E-mail: f17-1086@yandex.ru

²Институт физики полупроводников им. А. В. Ржанова СО РАН,
630090, г. Новосибирск, просп. Академика Лаврентьева, 13
E-mail: naumova@isp.nsc.ru

Метод нанопроволочной (НП) детекции является одним из быстродействующих и высокочувствительных методов. Нанопроволочный биосенсор на основе структур кремний на изоляторе (КНИ) использован для биоспецифической детекции в реальном времени без меток NFATc1-онкомаркера (D-NFATc1). Для этого КНИ-нанопроволоки модифицировались к NFATc1 аптамерами, применяемыми в качестве макромолекулярных зондов. Показано, что такой биосенсор позволяет достигать чувствительности порядка 10^{-15} М, сравнимой с чувствительностью, полученной на НП-биосенсоре с иммобилизованными антителами, используемыми в качестве макромолекулярных зондов. Результаты демонстрируют перспективность применённых в работе подходов формирования сенсорных элементов для высокочувствительной диагностики заболеваний.

Ключевые слова: аптамер, биосенсор, D-NFATc1, кремний на изоляторе, нанопроволоки.

Введение. Регистрация белковых маркеров с очень низким уровнем концентрации в биологической жидкости пациента (порядка 10^{-13} М и ниже) необходима для ранней диагностики заболеваний. Для этой цели в последнее время разрабатываются новые типы биосенсоров на базе нанотехнологий, например сенсор на основе атомно-силовой микроскопии [1–4], оптические нанобиосенсоры [5–8], нанопроволочные (НП) биосенсоры [9, 10]. Наибольший интерес для диагностики представляют НП-биосенсоры в связи с тем, что они относятся к классу "label-free" детекторов и позволяют проводить регистрацию макромолекул в режиме реального времени. Принцип действия НП-биосенсоров заключается в регистрации модуляции тока, протекающего через НП при адсорбции на её поверхность молекул аналита. Адсорбированные молекулы выступают в таких биосенсорах в виде виртуального затвора, а сама НП с омическими контактами на концах — в виде полевого

*Работа выполнена при поддержке Федеральной целевой научно-технической программы (грант № 14.512.11.0018).

нанотранзистора [11]. Высокая чувствительность НП сенсорного элемента определяется большим аспектным соотношением поверхность/объём [12]. Как обсуждается в работе [13], теоретический предел детекции НП-биосенсора может достигать уровня одна молекула на сенсорный элемент. К настоящему времени такая концентрационная чувствительность для НП-биосенсоров была получена для вирусов в [11].

Что касается белков, то экспериментально достигнутый предел детектирования DL составляет уровень $\sim 10^{-15}$ М, например, для пар антитело/лептин [14], авидин/биотин [15] или anti-AFP/AFP (AFP — альфа-фетопроtein) [10]. Такая чувствительность получена при использовании антител, иммобилизованных на поверхности НП-биосенсора в качестве молекул-зондов. В то же время антитела ограничивают количество белковых маркеров, которые могут быть использованы в диагностических целях. Это связано с высокой стоимостью производства антител, невысокой стабильностью и зачастую невысокой аффинностью*. В последнее время появился новый класс синтетических молекул — аптамеры, которые могут быть применены в качестве биоспецифических молекул-зондов к таким мишеням, как белки, аминокислоты, лекарства и другие биомолекулы. Аптамеры имеют следующие основные преимущества: лучшая константа аффинности, высокая стабильность при комнатной температуре, возможность химической модификации концевых групп, небольшой период их разработки. Благодаря преимуществам аптамеры начинают находить применение в протеомике, диагностике и терапии [16–18]. Естественно, представляет интерес использование аптамеров в качестве молекул-зондов в нанопроволочных биосенсорах, получивших название аптасенсоров. Нанопроволочные аптасенсоры изготовлены с помощью нанотрубок [19] и полианилиновых проволок [20]. Чувствительность биосенсоров на основе нанотрубок составляет $\sim 10^{-12}$ М. В случае полианилиновых биосенсоров достигнут предел 10^{-15} М на примере IgE. В то же время наиболее привлекательна в плане производства НП-детекторов стандартная кремниевая технология, которая развивается уже на протяжении нескольких десятков лет. Так, в работе [21] применялся биосенсор на базе кремниевых НП с иммобилизованным антитромбин-аптамером для регистрации тромбина. Однако чувствительность детекции была невысока — на уровне $3 \cdot 10^{-10}$ М. Кремниевые НП были созданы с помощью так называемой технологии «снизу вверх» с использованием Au как катализатора при эпитаксиальном росте проволок из паровой фазы (Au-catalyst-assisted chemical vapor process). В [10] на примере белков AFP и поверхностного антигена вирусного гепатита В (HBsAg) показано, что применение альтернативного метода производства монокристаллических Si-нанопроволок «сверху вниз» с использованием электронной литографии и плазмохимического травления позволяет более технологично проводить формирование НП-сенсорных элементов и достигать чувствительности детекции на уровне 10^{-14} – 10^{-15} М. В данной работе мы применили этот метод формирования КНИ-НП для изготовления биосенсора, модифицированного аптамерами к белку NFATc1 (ядерному фактору активированных Т-клеток, кодируемому геном в составе 18-й хромосомы), и сравнения чувствительности полученного аптасенсора с биосенсором, в котором в качестве зондов-молекул используются антитела. Показано, что такой КНИ-НП биосенсор позволяет достигать концентрационной чувствительности на уровне 10^{-15} М как для аптамеров, так и для антител, выполняющих роль зондов-молекул.

Выбор белка NFATc1 обусловлен его диагностическим значением. В [22] отмечалось, что NFATc1 — это транскрипционный фактор, экспрессия которого повышается в раковых клетках и тканях лёгких.

Цель предлагаемой работы — показать возможность использования КНИ-нанопроволочного аптасенсора для высокочувствительной ($\sim 10^{-15}$ М) регистрации D-NFATc1 в ре-

* Аффинность — термодинамическая характеристика, описывающая прочность связывания макромолекул.

жиме реального времени. Совместимость технологии формирования КНИ-НП со стандартной Si-технологией, возможность масштабирования КНИ-НП (создание массива сенсорных элементов) позволят в дальнейшем проводить с их помощью высокочувствительную диагностику.

1. Материалы и методы. 1.1. *Химические вещества.* Дитиобис-сукцинимидилпропионат (Ditiobis-succinimidylpropionat, DSP) приобретён у фирмы "Pierce", калий-фосфатный буфер (КР, KH_2PO_4), диметилсульфоксид (Dimethylsulfoxide, DMSO) и 3-аминопропилтриэтоксисилан (3-aminopropyltriethoxysilane, APTES) — у фирмы "Sigma-Aldrich" (США). Деионизованная вода получена при использовании системы очистки "Milli-Q" ("Millipore", США).

1.2. *Белки и аптамер.* ДНК-связывающий фрагмент ядерного фактора активированных Т-клеток NFATc1, моноклональные антитела против NFATc1 и олигонуклеотиды предоставлены Институтом молекулярной биологии РАН. Использовался олигонуклеотид с последовательностью [23]

AAATGGAAAATACACTTTTGTGTATTTTCCATTTTTTTTTTTTTTTT-NH₂.

Последовательность контрольного олигонуклеотида (олиг-1) имела вид

NH₂-TTTTTTTTTTTTTTTAGTCGACCAGTTTACCAGAACATCTGC.

Применялись моноклональные антитела против anti-GST производства "Abnova".

1.3. *Изготовление сенсоров.* В качестве сенсоров были использованы КНИ-НП транзисторы, изготовленные при помощи электронной литографии и плазмохимического травления [24, 25]. Структуры КНИ имели *n*-тип проводимости с концентрацией носителей заряда $\sim(6 \cdot 10^{16}) \text{ см}^{-3}$. Толщина скрытого окисла (Buried Oxide, BOX) структур КНИ составляла 300 нм, толщина отсечённого слоя Si (толщина НП соответственно) 32 нм, ширина КНИ-НП 90 нм, длина $L = 10$ мкм, число транзисторов на кристалле 12. Области стока—истока созданы методом нанесения слоёв поли-Si (250 нм) с последующим легированием фосфором. Сформированные таким образом n^+ -омические контакты определяли режим обогащения КНИ-НП с *n*-типом проводимости в процессе измерений. Нанопроволоки на основе кремния на изоляторе были попарно сгруппированы. Для измерений в электролитических растворах на поверхность кристалла с набором КНИ-НП транзисторов нанесён защитный teos-окисел. Схема биосенсора описана в [10]. Микрожидкостная кювета биосенсора имела объём 500 мкл, её дном был наночип (корпусированный кристалл с набором КНИ-НП транзисторов) с диаметром чувствительной зоны 2 мм. Кювета снабжена мешалкой. Скорость перемешивания раствора составляла 3000 оборот./мин.

1.4. *Модификация поверхности сенсора.* Нанопроволочный чип вначале промывался в растворе $\text{H}_2\text{O}_2:\text{H}_2\text{O} = 1:4$ для удаления с поверхности нанопроволок органических загрязнений, а затем помещался в раствор, содержащий HF и CH_3OH (1:50), на 30 с для удаления естественного окисла и стабилизации поверхности. После этого поверхность НП-чипа обрабатывалась в озонаторе для формирования гидроксильных групп [26]. Слой APTES на поверхности НП формировался при экспонировании чипа в парах APTES в течение 20 ч при комнатной температуре по процедуре, аналогичной [27], в соответствии с которой толщина слоя должна составлять 0,9–1,2 нм.

Олигонуклеотиды и антитела против NFATc1 были ковалентно иммобилизованы на аminosилановую поверхность разных НП с помощью DSP подобно процедуре, описанной в работе [28]. Для этой цели растворы ($v = 3$ нл), содержащие аптамеры, контрольные олигонуклеотиды (0,8 мкМ) или антитела (1 мкМ) в КР-буфере (50 мМ, pH = 7,4) нано-

сились на активированную с помощью DSP поверхность отдельных нанопроволок. Прецизионное нанесение растворов осуществлялось с помощью раскапывательной системы "PiezoArray" (фирма "PerkinElmer"). Инкубационные растворы выдерживались на НП в течение 30 мин при $T = 15\text{ }^{\circ}\text{C}$ и 80 %-ной влажности. После этого поверхность НП-чипа промывалась в бидистиллированной воде в течение 30 мин. Схема модификации поверхности с помощью APTEs, функционализации поверхности с помощью антител и аптамеров и детекции белков приведена на рис. 1.

1.5. *Электрические измерения* проводились с помощью пикоамперметра модели 6487 фирмы "Keithley". Во время измерений подложка структур КНИ была использована в качестве управляющего электрода (затвора транзистора). Зависимости тока стока—истока

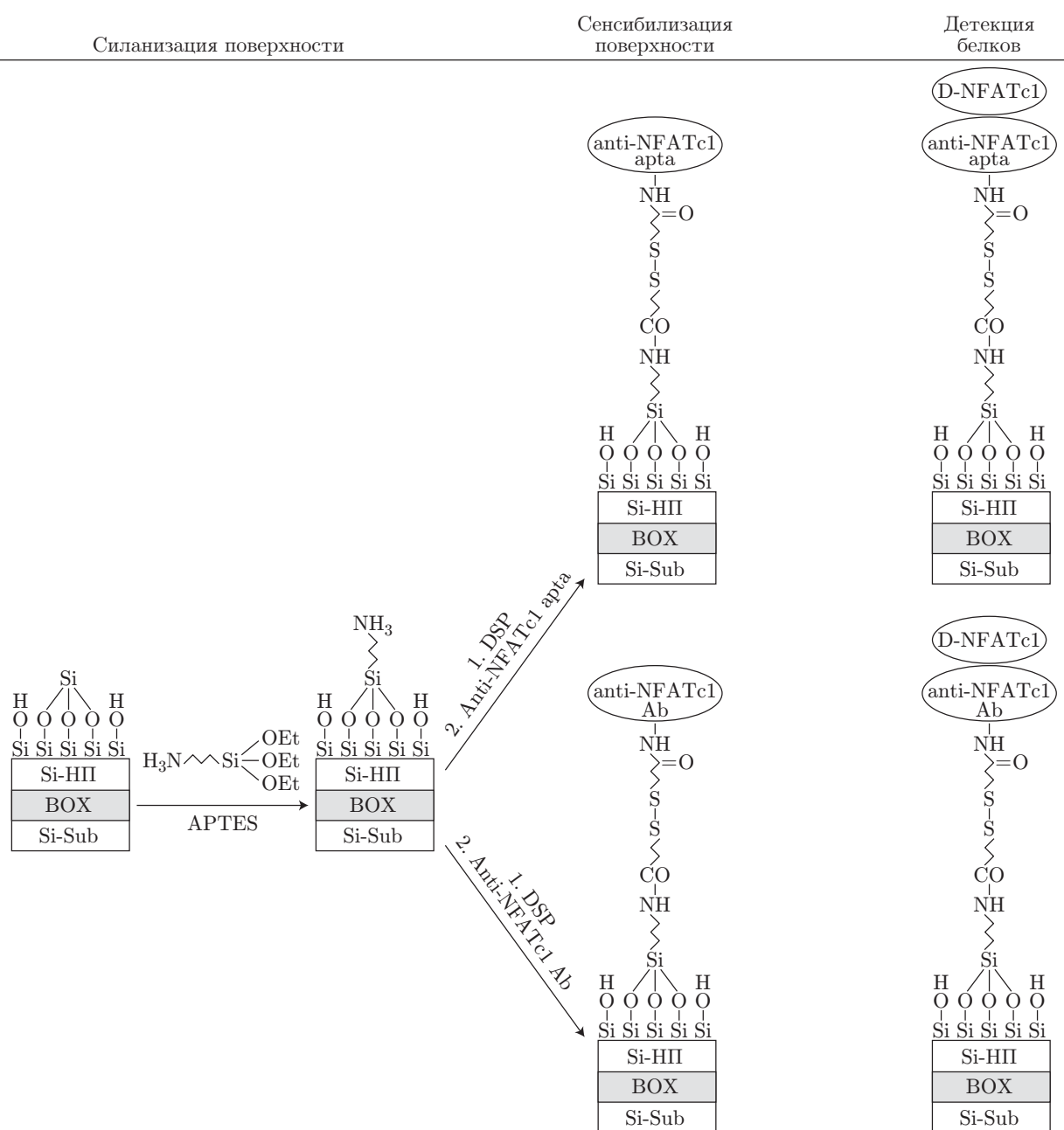


Рис. 1. Схема химической модификации и функционализации нанопроволок антителами (anti-NFATc1 Ab) и аптамерами (anti-NFATc1 apta)

от напряжения на затворе $I_{ds}(V_g)$ для КНИ-НП в экспериментах в калий-фосфатном буферном растворе ($\text{pH} = 7,4$) получены при $V_g = 0-100$ В и $V_{ds} = 0,15$ В. Для регистрации белка с помощью НП-биосенсора белковый раствор объёмом 50 мкл (D-NFATc1 в 1 мМ КР, $\text{pH} = 7,4$) добавлялся в измерительную кювету, содержащую 100 мкл буферного раствора. Временные зависимости тока $I_{ds}(t)$ измерялись при $V_g = +90$ В и $V_{ds} = 0,2$ В. В целях повышения временной стабильности работы нанопроволочного биосенсора применялся дополнительный Pt-электрод, погруженный в раствор в измерительной ячейке на расстоянии 5 мм от поверхности НП. Напряжение, подаваемое на Pt-электрод, составляло +4 В.

2. Результаты. Для селективной биоспецифической детекции D-NFATc1 КНИ-НП были функционализированы аптамерами и антителами против NFATc1. Для этого соответствующая пара нанопроволок модифицирована посредством ковалентной иммобилизации этих зондов на поверхность нанопроволок стандартной процедурой с использованием DSP согласно разд. 1. Для учёта неспецифической сорбции D-NFATc1 другая пара нанопроволок, расположенная на том же чипе, модифицировалась контрольным олигонуклеотидом (олиг-1) и anti-GST, не имеющими специфического взаимодействия с D-NFATc1.

3. Биоспецифическая детекция D-NFATc1 с помощью КНИ-НП, модифицированных антителами. Детекция D-NFATc1 была проведена в кювете нанопроволочного биосенсора. Мониторинг временных зависимостей тока $I_{ds}(t)$ для КНИ-НП транзистора, модифицированного антителами к NFATc1, осуществлялся при фиксированном напряжении на затворе (подложке структур КНИ) V_g и при подаче положительного напряжения на дополнительный Pt-электрод, погруженный в раствор в измерительной ячейке. Таким образом, в режиме реального времени, в котором обычно проводится детекция белков в целях диагностики. Для того чтобы избежать проблемы с дебаевским экранированием, были выбраны буферные растворы с низкой концентрацией соли 1 мМ КР ($\text{pH} = 7,4$). При такой концентрации соли в буферном растворе длина Дебая λ_D составляет порядка 5 нм, что достаточно для регистрации образования белковых комплексов на поверхности наночипа.

На рис. 2 представлены временные зависимости тока (до и после добавления в кювету НП-биосенсора молекул D-NFATc1), полученные как разностный сигнал для НП, иммобилизованной anti-NFAT, и НП, иммобилизованной anti-GST. В данной работе были использованы молекулы D-NFATc1 — домен глобулярного белка NFATc1 (молекулярный вес 24 кДа) с расчётной изоэлектрической точкой $\text{pI} = 4,7$ [29]. В условиях эксперимента этот белок имеет эффективный отрицательный заряд. Адсорбция отрицательно заряженных молекул на поверхности Si-НП n -типа проводимости должна приводить к уменьшению его проводимости. Из рисунка видно, что при добавлении раствора D-NFATc1 наблюдается снижение проводимости НП с иммобилизованными антителами, обусловленное адсорбцией отрицательно заряженных молекул на её поверхности, а также что уменьшение абсолютной величины сигнала биосенсора происходит при концентрации добавляемого белка в диапазоне $10^{-14}-10^{-15}$ М. Минимальная детектируемая концентрация молекул D-NFATc1 составила $2,5 \cdot 10^{-15}$ М.

После замены раствора D-NFATc1 буферным раствором фосфата калия также не наблюдается существенного изменения уровня сигнала. Это означает, что диссоциация комплексов D-NFATc1/anti-NFAT очень медленная.

4. Биоспецифическая детекция D-NFATc1 с помощью КНИ-НП, модифицированных аптамерами (anti-NFAT apta), была проведена в тех же условиях, что и детекция белков КНИ-НП, модифицированных антителами.

На рис. 2 также представлена временная зависимость тока до и после добавления молекул D-NFATc1 в кювету НП-биосенсора с иммобилизованными аптамерами против NFATc1. Эта зависимость получена как разностный сигнал между I_{ds} для НП с иммобилизованным аптамером к NFATc1 и НП с иммобилизованным контрольным олигом-1.

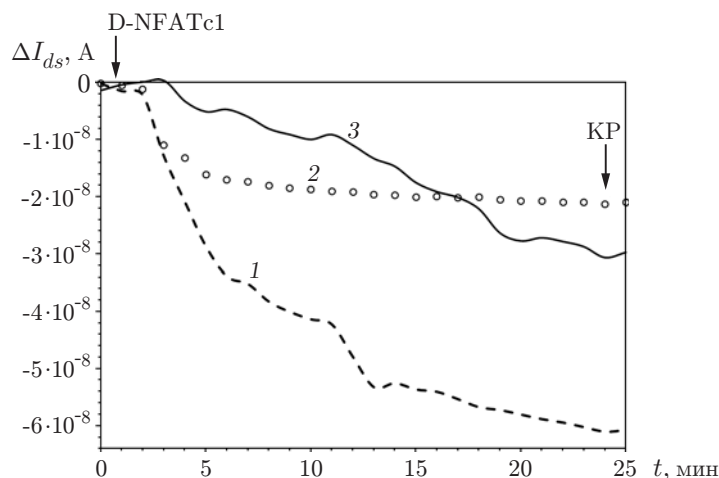


Рис. 2. Временные зависимости $\Delta I_{ds}(t)$ при биоспецифической детекции D-NFATc1: модификация НП антителами (кривые 1, 2) или аптамерами (кривая 3). Концентрация D-NFATc1 в растворе $C_{D-NFATc1}$: $2,5 \cdot 10^{-14}$ М (кривая 1) и $2,5 \cdot 10^{-15}$ М (кривые 2, 3)

Из рисунка видно, что при добавлении раствора D-NFATc1 с концентрацией $2,5 \cdot 10^{-15}$ М наблюдается уменьшение проводимости нанопроволоки. Экспериментально выявлено, что концентрация D-NFATc1 10^{-16} М не приводит к изменению сигнала для КНИ-НП с иммобилизованным аптамером к NFATc1.

Таким образом, минимальная концентрация молекул D-NFATc1, которая была зарегистрирована с помощью НП-биосенсора с иммобилизованными аптамерами составила $2,5 \cdot 10^{-15}$ М.

Заключение. Полученные результаты показали, что используемый в данной работе КНИ-НП аптасенсор позволяет проводить детекцию D-NFATc1 в реальном времени без меток. Предел концентрационной чувствительности для 90 нм КНИ-НП с иммобилизованными аптамерами составил $2,5 \cdot 10^{-15}$ М (такой же порядок, как и для НП с иммобилизованными антителами). Учитывая, что аптамеры имеют перед антителами существенное преимущество в стабильности и стоимости производства, аптасенсоры могут заменить биосенсоры на основе антител для быстрого белкового скрининга и экспресс-диагностики заболеваний.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ivanov Y. D., Bukharina N. S., Frantsuzov P. A. et al. AFM study of cytochrome CYP102A1 oligomeric state // *Soft Matter*. 2012. **8**, N 17. P. 4602–4608.
2. Ivanov Yu. D., Frantsuzov P. A., Zollner A. et al. Atomic force microscopy study of protein-protein interactions in the cytochrome CYP11A1 (P450scs)-containing steroid hydroxylase system // *Nanoscale Res. Lett.* 2011. **6**, N 1. P. 54–67.
3. Ivanov Yu. D., Frantsuzov P. A., Bykov V. A. et al. Comparative interactions of PdR by usual and ultrafine atomic force microscopy // *Anal. Meth.* 2010. **2**, N 6. P. 688–693.
4. Ivanov Y. D., Archakov A. I. Application of AFM and optical biosensor for investigation of complexes formed in P450-containing monooxygenase systems // *Biochim. et Biophys. Acta*. 2011. **1814**, N 1. P. 102–110.

5. **Archakov A. I., Ivanov Y. D.** Optical biosensor and scanning probe microscopy studies of cytochrome P450 interactions with redox partners and phospholipid layers // *Methods in Enzymology*. 2002. **357**, Pt. C. P. 94–103.
6. **Armani A. M., Kulkarni R. P., Fraser S. E. et al.** Label-free, single-molecule detection with optical microcavities // *Science*. 2007. **317**, N 5839. P. 783–787.
7. **Sim H. R., Warkb A. W., Lee H. J.** Attomolar detection of protein biomarkers using bio-functionalized gold nanorods with surface plasmon resonance // *Analyst*. 2010. **135**, N 10. P. 2528–2532.
8. **Rodríguez-Lorenzo L., de la Rica R., Álvarez-Puebla R. A. et al.** Plasmonic nano-sensors with inverse sensitivity by means of enzyme-guided crystal growth // *Nature Materials*. 2012. **6**, N 11. P. 604–607.
9. **Zheng G., Patolsky F., Cui Y. et al.** Multiplexed electrical detection of cancer markers with nanowire sensor arrays // *Nature Biotechnol.* 2005. **23**, N 10. P. 1294–1301.
10. **Ivanov Yu. D., Pleshakova T. O., Kozlov A. F. et al.** SOI nanowire for the high-sensitive detection of HBsAg and α -fetoprotein // *Lab on a Chip*. 2012. **12**, N 23. P. 5104–5111.
11. **Patolsky F., Zheng G. F., Hayden O. et al.** Electrical detection of single viruses // *Proc. of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2004. **101**, N 39. P. 14017–14022.
12. **Elfstrom N., Juhasz R., Sychugov I. et al.** Surface charge sensitivity of silicon nanowires: size dependence // *Nano Lett.* 2007. **7**, N 9. P. 2608–2612.
13. **Hahm J., Lieber C. M.** Direct ultrasensitive electrical detection of DNA and DNA sequence variations using nanowire nanosensors // *Nano Lett.* 2004. **4**, N 1. P. 51–54.
14. **Pui T.-S., Agarwal A., Ye F. et al.** Ultra-sensitive detection of adipocytokines secreted from adipocytes with CMOS-compatible silicon nanowire arrays // *Nanoscale*. 2009. **1**, N 1. P. 159–163.
15. **Carrara S., Sacchetto D., Doucey M. A. et al.** Memristive-biosensors: A new detection method by using nanofabricated memristors // *Sens. Actuators B*. 2012. **171–172**, N 1. P. 449–457.
16. **Brody E. N., Gold L.** The use of aptamers in large arrays for molecular diagnostics // *Mol. Diagn.* 1999. **4**, N 4. P. 381–388.
17. **Lai R. Y., Plaxco K. W., Heeger A. J.** Aptamer-based electrochemical detection of picomolar platelet-derived growth factor directly in blood serum // *Anal. Chem.* 2007. **79**, N 1. P. 229–233.
18. **Ng E. W., Shima D. T., Calais P. et al.** Pegaptanib, a targeted anti-VEGF aptamer for ocular vascular disease // *Nat. Rev. Drug Discov.* 2006. **5**, N 2. P. 123–132.
19. **An T., Kim K. S., Hahn S. K., Lim G. B.** Real-time, step-wise, electrical detection of protein molecules using dielectrophoretically aligned SWNT-film FET aptasensors // *Lab on a Chip*. 2010. **10**, N 16. P. 2052–2056.
20. **Luo X., Lee I., Huang J. et al.** Ultrasensitive protein detection using an aptamer — functionalized single polyaniline nanowire // *Chem. Commun.* 2011. **47**, N 22. P. 6368–6370.
21. **Kim K. S., Lee H.-S., Yang L.-A. et al.** The fabrication, characterization and application of aptamer — functionalized Si-nanowire FET biosensors // *Nanotechnol.* 2009. **20**, N 23. 235501.
22. **Yiu G. K., Kaunisto A., Chin Y. R., Toker A.** NFAT promotes carcinoma invasive migration through gliptican-6 // *Biochem. Journ.* 2001. **440**, N 1. P. 157–166.
23. **Jolma A., Kivioja T., Toivonen J. et al.** Multiplexed massively parallel SELEX for characterization of human transcription factor binding specificities // *Genome Res.* 2010. **20**, N 6. P. 861–873.
24. **Naumova O. V., Fomin B. I., Nasimov D. A. et al.** SOI nanowires as sensors for charge detection // *Semiconductor Sci. and Technol.* 2010. **25**, N 5. 055004.

25. **Наумова О. В., Фомин Б. И., Сафронов Л. Н. и др.** Кремниевые нанопроволочные транзисторы для электронных биосенсоров // *Автометрия*. 2009. **45**, № 4. С. 6–11.
26. **Lee M.-H., Lee D.-H., Jung S.-W. et al.** Measurements of serum C-reactive protein levels in patients with gastric cancer and quantification using silicon nanowire arrays // *Nanomed.-nanotechnol. Biol. and Med.* 2010. **6**, N 1. P. 78–83.
27. **Yamada K., Yoshii S., Kumagai S. et al.** High-density and highly surface selective adsorption of protein–nanoparticle complexes by controlling electrostatic interaction // *Jap. Journ. Appl. Phys.* 2006. **45**, N 5a. P. 4259–4264.
28. **Ivanov Yu. D., Danichev V. V., Pleshakova T. O. et al.** Irreversible chemical AFM based fishing for detection of low-copied proteins // *Biomed. Chem.* 2013. **7**, N 1. P. 46–61.
29. **ExPASy:** SIB Bioinformatics Resource Portal. URL: <http://www.expasy.org> (дата обращения: 2.07.2013).

Поступила в редакцию 2 июля 2013 г.
