

УДК 621.382; 353-083; 53-088

## ИНДИКАЦИЯ БЕЛКА VP40 ВИРУСА ЭБОЛА С ПОМОЩЬЮ НАНОПРОВОЛОЧНОГО КНИ-БИОСЕНСОРА

© В. М. Генералов<sup>1</sup>, О. В. Наумова<sup>2</sup>, Б. И. Фомин<sup>2</sup>, С. А. Пьянков<sup>1</sup>,  
И. В. Хлистун<sup>1</sup>, А. С. Сафатов<sup>1</sup>, Б. Н. Зайцев<sup>1</sup>, Э. Г. Зайцева<sup>2</sup>,  
А. Л. Асеев<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Федеральное бюджетное учреждение науки «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека,  
630559, Новосибирская область, р. п. Кольцово

<sup>2</sup> Институт физики полупроводников им. А. В. Ржанова СО РАН,  
630090, г. Новосибирск, просп. Академика Лаврентьева, 13  
E-mail: general@vector.nsc.ru

КНИ-биосенсоры без модификации поверхности использованы для индикации белка VP40 вируса Эбола путём выявления его иммунных комплексов со специфичными моноклональными антителами (МКА). Показано, что реакция специфичного взаимодействия VP40 и МКА даёт более выраженный отклик сенсоров, чем прямая адсорбция VP40 или антител на их поверхность. Образование комплексов антиген — антитело ведёт к накоплению отрицательного заряда на поверхности сенсоров. Индикация белка и комплексов белок — антитело осуществляется в реальном масштабе времени (~200–300 с на пробу).

*Ключевые слова:* биосенсор, кремний-на-изоляторе (КНИ), нанопроволока, индикация, вирус Эбола, белок VP40.

DOI: 10.15372/AUT20190613

**Введение.** В настоящее время актуальна разработка систем экспресс-индикации различных форм патогенов, характеризующихся простотой, достоверностью и универсальностью, с возможностью получения оперативных данных в реальном масштабе времени.

Нанопроволочные (НП) биосенсоры на основе плёнок кремний-на-изоляторе (НП КНИ-биосенсоры) являются перспективными устройствами, сочетающими в себе высокую чувствительность, избирательность, доступность, возможность миниатюризации и регистрации в режиме реального времени [1–4]. Они позволяют проводить качественный и количественный анализы биологических веществ в минимальных количествах вплоть до обнаружения единичных молекул, вирионов, клеток и микроорганизмов [3–7]. Принцип их действия основан на регистрации модуляции тока, протекающего через нанопроволочный сенсор, при изменении потенциала на его поверхности. Изменение потенциала вызывает адсорбцию аналита, который адсорбирован на поверхность сенсора или находится от неё в пределах длины экранирования Дебая ( $L_D$ ) (рис. 1, а) [8, 9]. В растворах с концентрацией солей 1–100 ммоль значение  $L_D$  варьируется в пределах 1–10 нм. Для селективного выделения аналита из раствора требуется модификация поверхности сенсоров, которая включает в себя создание слоя специфичных рецепторов и переходного слоя сенсор/рецептор. Однако результатом модификации может быть уменьшение чувствительности сенсоров, поскольку увеличивается расстояние от его поверхности до частиц аналита.

Целью данной работы является исследование возможности индикации белка VP40 вируса Эбола и его иммунных комплексов со специфичными антителами в реальном масштабе времени с помощью НП КНИ-сенсоров. Для обеспечения максимальной чувствительности адсорбция аналита осуществлялась непосредственно на поверхность сенсора (без

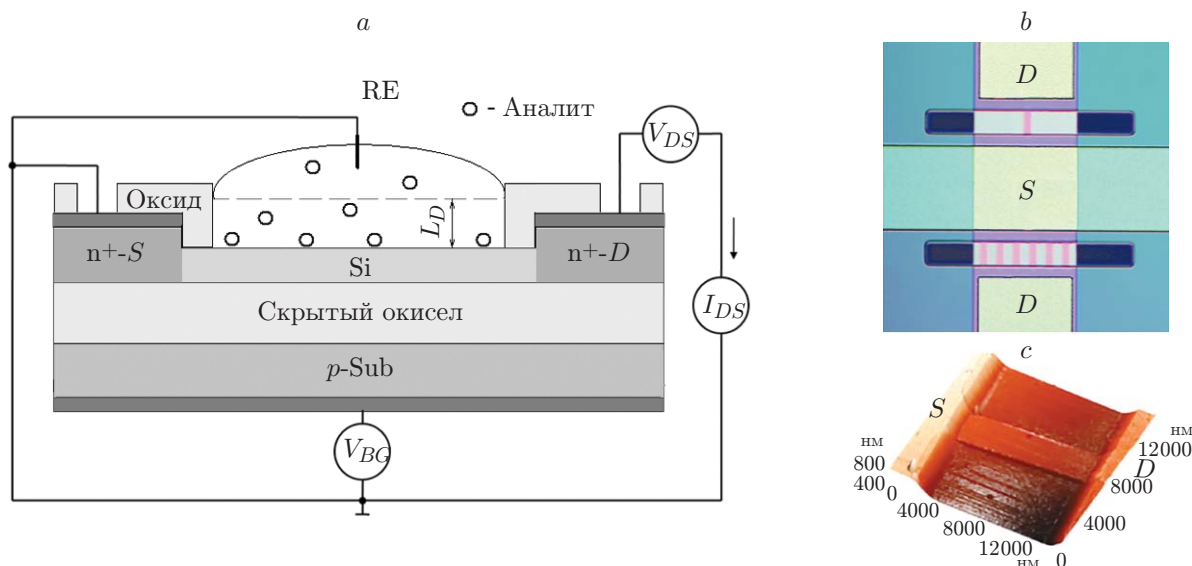


Рис. 1. Биосенсор: *a* — схематическое изображение *n*-канального КНИ-сенсора в измерительной ячейке; *b* — оптическое изображение одно- и многоканальных сенсоров на кристалле с общей контактной *S*-шиной; *c* — АСМ-изображение фрагмента сенсорного элемента между контактными областями истока *S* и стока *D*

модифицирующих слоёв). Для верификации результатов использовались как одноканальные, так и многоканальные сенсоры. Результаты исследований показали перспективность такого подхода для индикации комплексов антиген — антитело в режиме реального времени и для индикации зарядового состояния комплексов и их компонентов в исследуемых растворах (величина заряда нами не определена).

**Материалы и методы.** В качестве сенсоров использовались одно- и многоканальные НП КНИ-транзисторы. Основные операции, проводимые при их изготовлении, описаны в [10, 11]. Схематическое и оптическое изображения сенсоров, полученные с помощью атомно-силового микроскопа (АСМ), показаны на рис. 1. Отсечённый слой структур КНИ (Smart-Cut) имел проводимость *p*-типа с концентрацией акцепторов  $2 \cdot 10^{16} \text{ см}^{-3}$ . Толщина слоя кремния (Si) равна 28–30 нм, толщина скрытого диэлектрика — 200 нм. Ширина канала сенсорного элемента, расположенного между контактными областями истока *S* и стока *D*, составляла 3 мкм, длина — 10 мкм. Во время измерений напряжение между стоком и истоком сенсора  $V_{DS} = 0,15 \text{ В}$ . Подложка структур КНИ использовалась в качестве управляющего электрода (или затвора *BG*) для индуцирования электронного канала проводимости и выбора режима рабочей точки сенсора в подпороговой области  $I_{DS}(V_{BG})$  зависимостей [12]. Референсный электрод (RE), помещённый во время измерений в вирусную суспензию и суспензию антител, был заземлён.

В работе использовались: рекомбинантный полноразмерный аналог белка VP40 вируса Эбола диаметром  $\sim 2 \text{ нм}$ , молярная масса 45 кДа, исходная концентрация 100 мкг/мл в водном растворе с консервантом ProClin 300; специфичные моноклональные антитела (МКА, молярная масса 180 кДа) к антигенной детерминанте VP40 и специфичные поликлональные *c*-антитела в сыворотке крови иммунизированного кролика VP40 с исходной концентрацией 9 мг/мл и 15 мг/мл соответственно; натрий-фосфатный буфер (PBS)  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0,05 М +  $\text{NaCl}$  0,15 М, pH 7,4 в концентрации 1 ммоль. Белок получен от штамма-продуцента *Escherichia coli* C600/pQE30-VP40EV. После наработки белок прошёл хромато-

Расчётное количество моноклональных антител и белка VP40 в 1 мкл пробы

| VP40, шт.        | Проба МКА:PBS | МКА, шт.          |
|------------------|---------------|-------------------|
| $3,7 \cdot 10^7$ | $10^{-15}$    | $3 \cdot 10^{-2}$ |
|                  | $10^{-12}$    | $3 \cdot 10^1$    |
|                  | $10^{-9}$     | $3 \cdot 10^4$    |
|                  | $10^{-6}$     | $3 \cdot 10^7$    |
|                  | $10^{-3}$     | $3 \cdot 10^{10}$ |

графическую очистку на колонке Ni-NTA. Уровень чистоты составлял 99 %. Пробы поликлональных *s*-антител в сыворотке крови также получены разбавлением в PBS в  $10^{15}$ – $10^6$  раз. Весь реализуемый в работе биологический материал (белок, штамм-продуцент, плазмида, гибридома, моноклональные и поликлональные антитела) и пробы на его основе приготовлены во ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора.

Для удаления органических загрязнений и естественного окисла поверхность сенсоров последовательно обрабатывалась в перекисно-аммиачном растворе, в слабом растворе плавиковой кислоты и промывалась в деионизованной воде.

В экспериментах осуществлялась адсорбция белков VP40, моноклональных и *s*-антител на поверхность НП КНИ-сенсора последовательным накоплением. Для приготовления проб антитела и белок VP40 разбавлялись PBS. Расчётное число молекул белка и моноклональных антител в пробах приведено в таблице.

Пробы наносились капельным способом на поверхность биосенсора площадью  $\sim 3 \text{ мм}^2$ . Объём капли составлял 1 мкл. Регистрация тока  $I_{DS}(t)$ , протекающего через сенсорный элемент, проводилась с использованием системы сбора данных NI 6363 (National Instrument, США).

**Результаты и обсуждение.** На рис. 2 показаны временные  $I_{DS}(t)$  зависимости тока сенсора, полученные до и после добавления на его поверхность анализируемых проб: белка VP40, МКА и *s*-антител. Также указан отклик сенсоров на пробу — изменение

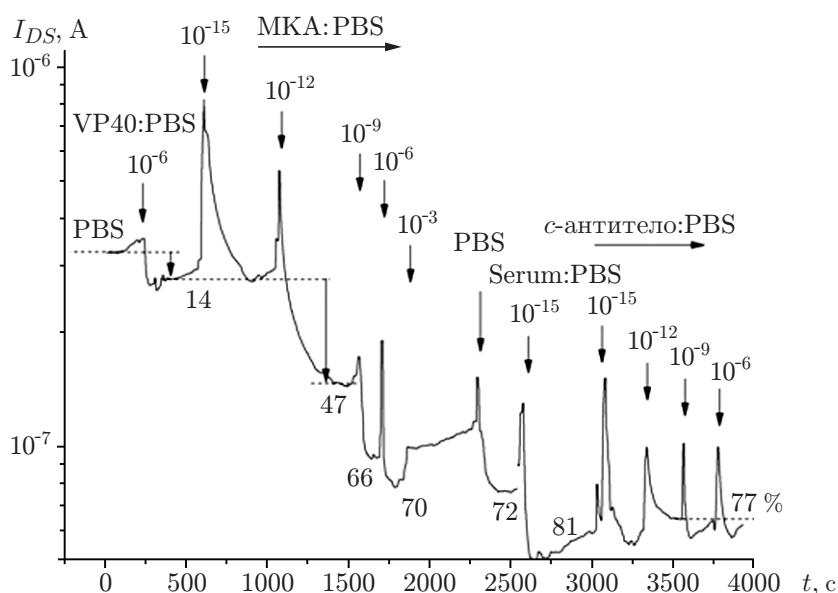


Рис. 2. Зависимости  $I_{DS}(t)$  сенсора, измеренные при последовательном нанесении на его поверхность 1 ммоль PBS, целевого белка VP40, проб с МКА, проб с сывороткой крови и *s*-антителами

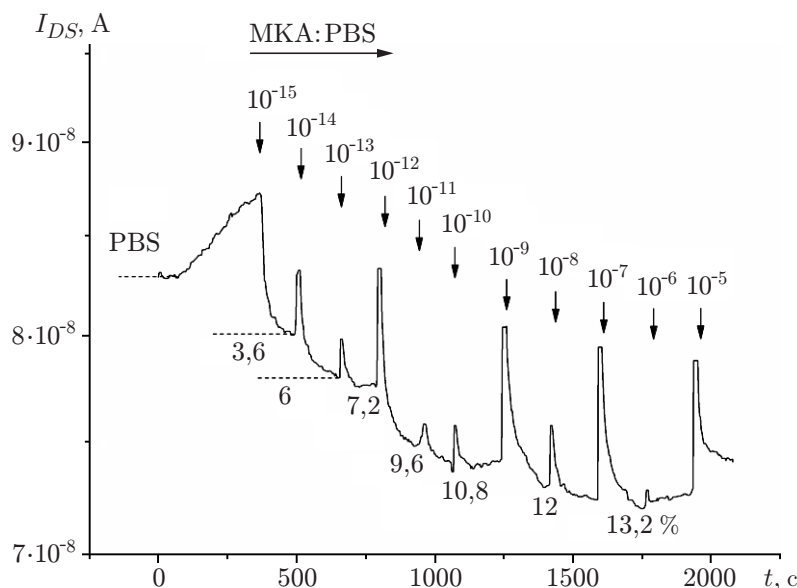


Рис. 3. Зависимости  $I_{DS}(t)$  сенсора, измеренные при последовательном нанесении на его поверхность 1 ммоль PBS и проб с МКА (сигнал усреднён по 6 сенсорам)

$I_{DS}$  относительно его значения в PBS. Видно, что последовательное нанесение VP40 и антител приводит к уменьшению тока сенсора. Отклик сенсора для пробы  $10^{-6}$  VP40 составляет порядка 14 %. Добавление МКА приводит к более существенному изменению  $I_{DS}$ . Для пробы  $10^{-6}$  МКА, когда концентрации VP40 и МКА становятся сравнимы с  $N_{VP40} \approx N_{MKA} \approx 3 \cdot 10^7$ /мкл (см. таблицу), отклик сенсора достигает уже  $\sim 70$  %.

Уменьшение тока  $I_{DS}$  сенсоров при нанесении проб означает накопление отрицательного заряда на их поверхности. Такой заряд может быть связан как с формированием комплексов антиген — антитело в результате специфичного взаимодействия VP40 и МКА, так и взаимодействием МКА и сенсора с увеличением концентрации МКА в пробах.

На рис. 3 показан отклик сенсоров на пробы с МКА. Видно, что увеличение концентрации антител в пробах  $10^{-15}$  —  $10^{-6}$  МКА вызывает отклик сенсоров в пределах  $\sim 13$  %, что сравнимо с откликом сенсора на  $10^{-6}$  VP40 (см. рис. 2). Это позволяет заключить, что увеличение отклика сенсора, наблюдаемое на рис. 2 при последовательном нанесении проб с VP40 и МКА, связано с формированием комплексов антиген — антитело. В пробах  $10^{-6}$  МКА бóльшая часть связей на поверхности сенсора задействована именно на специфическую реакцию VP40 и МКА. Действительно, неспецифичное взаимодействие МКА и сенсора легко разрушить, например, промыванием в PBS. Как показали исследования, после нанесения пробы  $10^{-3}$  с концентрацией МКА, существенно превышающей концентрацию VP40, при последующем промывании в PBS отклик сенсора составляет  $\sim 72$  %, т. е. практически восстанавливается до уровня в пробе  $10^{-6}$  МКА ( $\sim 70$  %) с  $N_{VP40} \approx N_{MKA}$ . Кроме того, нанесение проб с сывороткой крови, содержащей более 100 различных белков, и повышение в широком диапазоне концентраций специфичных с-антител приводят к незначительному (с 70–72 % до 77–81 %) увеличению отклика сенсоров. Поэтому изменение  $I_{DS}$  сенсора в интервале 2500–4000 с на рис. 2 означает отсутствие фактически свободных связей на поверхности сенсора с адсорбированными VP40.

Сыворотка крови с с-антителами при взаимодействии с VP40 должна также вызвать существенное изменение сигнала сенсора  $I_{DS}(t)$ , так как она содержит более 100 различных и, важно подчеркнуть, специфичных белков. Внесение сыворотки после накопления

значительного количества МКА на сенсоре и незначительная его реакция на временном интервале 2500–4000 с (см. рис. 2) означает практически отсутствие свободных связей между белками сыворотки крови и белком вируса Эбола VP40.

**Заключение.** Исследования показали, что НП КНИ-сенсоры на основе полевых транзисторов могут использоваться для высокочувствительной индикации взаимодействия вируса Эбола с антителами в реальном масштабе времени и специфичности их реакции. Реакция специфичного взаимодействия VP40 и МКА (образование комплекса антиген — антитело) даёт более выраженный отклик биосенсора, чем прямая адсорбция VP40 или антител на поверхность сенсора. Отклик сенсоров для проб  $10^{-6}$  VP40 и  $10^{-6}$  МКА не превышает 14 %. Максимальное значение отклика биосенсора с адсорбированным на поверхность белком VP40 на специфическое взаимодействие с моноклональными антителами достигается при условии  $N_{VP40} \approx N_{MKA}$  и составляет для тех же проб порядка 70 %.

Индикация белков с помощью НП КНИ-сенсоров в исследуемых пробах осуществляется в реальном масштабе времени и составляет 200–300 с на пробу. Для сравнения аналогичная индикация инфекционных агентов с помощью полимеразной цепной реакции проводится десятки минут без учёта подготовительных работ [13]. Взаимодействие VP40 и МКА обладает высокой специфичностью. Поэтому КНИ-биосенсоры на основе таких комплексов могут применяться для индикации вирусов не только в научных целях, но и в практической медицине, а также для решения задач в области эпидемиологии.

**Финансирование.** Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 18-29-02091). Пробоподготовка проводилась в рамках Государственного задания 11/16 отраслевой научно-исследовательской программы Роспотребнадзора на 2016–2020 гг. «Проблемно-ориентированные научные исследования в области эпидемиологического надзора за инфекционными и паразитарными болезнями».

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. **Chen K. I., Li B. R., Chen Y. T.** Silicon nanowire field-effect transistor-based biosensors for biomedical diagnosis and cellular recording investigation // *Nano Today*. 2011. **6**, N 2. P. 131–154.
2. **Yang F., Zhang G.-J.** Silicon nanowire-transistor biosensor for study of molecule-molecule interactions // *Rev. Anal. Chem.* 2014. **33**, N 2. P. 95–110.
3. **Иванов Ю. Д., Мальсагова К. А., Плешакова Т. О. и др.** Регистрация белка в сыворотке крови с помощью биосенсора на базе полевого нанотранзистора // *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2016. **60**, № 1. С. 94–98.
4. **Мальсагова К. А., Иванов Ю. Д., Плешакова Т. О. и др.** КНИ-нанопроволочный биосенсор для детекции белка D-NFAT 1 // *Биомедицинская химия*. 2015. **61**, № 4. С. 462–467.
5. **Patolsky F., Zheng G., Hayden O. et al.** Electrical detection of single viruses // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2004. **101**. P. 14017–14022.
6. **Chou W.-C., Hu W.-P., Yang Y.-S. et al.** Neutralized chimeric DNA probe for the improvement of GC-rich RNA detection specificity on the nanowire field-effect transistor // *Sci. Rep.* 2019. **9**. Paper 11056. DOI: 10.1038/s41598-019-47522-9.
7. **Lee J. H., Chae E. J., Park S. J., Choi J. W.** Label-free detection of  $\gamma$  aminobutyric acid based on silicon nanowire biosensor // *Nano Convergence*. 2019. **6**. Paper 13. DOI: 10.1186/s40580-019-0184-3.
8. **Неизвестный И. Г.** Полупроводниковые нанопроволочные сенсоры // *Микроэлектроника*. 2009. **38**, № 4. С. 243–259.
9. **Parka J., Nguyena H. H., Woubite A., Kima M.** Applications of field-effect transistor (FET)-type biosensors // *Appl. Sci. Convergence Technol.* 2014. **23**, N 2. С. 61–71.

10. **Naumova O. V., Fomin B. I., Nasimov D. A. et al.** SOI nanowires as sensors for charge detection // *Semicond. Sci. Technol.* 2010. **25**, N 5. 055004.
11. **Наумова О. В., Фомин Б. И., Сафронов Л. Н. и др.** Кремниевые нанопроволочные транзисторы для электронных биосенсоров // *Автометрия.* 2009. **45**, № 4. С. 6–11.
12. **Наумова О. В., Фомин Б. И.** Оптимизация отклика нанопроволочных биосенсоров // *Автометрия.* 2016. **52**, № 5. С. 21–25.
13. **Cherpilloda P., Schibler M., Vieillea G. et al.** Ebola virus disease diagnosis by real-time RT-PCR: A comparative study of 11 different procedures // *Journ. Clinical Virology.* 2016. **77**. P. 9–14.

*Поступила в редакцию 09.07.2019*

*После доработки 10.10.2019*

*Принята к публикации 01.11.2019*

---