

УДК [681.586.72: 621.382.3] – 022.532

ПОДГОТОВКА ПОВЕРХНОСТИ КРЕМНИЕВЫХ НАНОПРОВОЛОЧНЫХ СЕНСОРОВ ДЛЯ БИОХИМИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКИ (Обзор)

А. Е. Кузнецов; Е. В. Кузнецов; Е. Н. Рыбачек канд. техн. наук
ФГУ НПК "Технологический центр" МИЭТ, Москва, Россия

Рассмотрены современные достижения в области биохимической диагностики и проблемы, возникающие при создании биосенсоров на основе кремниевых нанопроволочных структур (Si-NWFET). Показано, что с помощью химической модификации поверхности кремния можно добиться высокой селективности связывания различных видов биомолекул с поверхностью чувствительного элемента сенсора, что позволяет интегрировать нанопроволочные кремниевые массивы в сложные микросистемы для комплексной диагностики биохимических процессов и построения систем "лаборатория на чипе".

Ключевые слова: биосенсор, биохимическая диагностика, кремниевые нанопроволоки, чувствительность, селективность, функционализация поверхности.

С развитием нанотехнологии появилась возможность создания датчиков, в которых используются уникальные свойства наноразмерных структур. Биосенсорные системы, основанные на массиве наноразмерных чувствительных элементов, могут обеспечить быстрый, дешевый и высокопроизводительный анализ биологических процессов. Основными достоинствами этих сенсоров является их высокая чувствительность и селективность при определении большого количества химических веществ. В статье [1] основное внимание было уделено исследованию способов увеличения чувствительности биосенсоров на основе полевого транзистора (Si-NWFET). В этом обзоре сделана попытка показать некоторые способы подготовки поверхности чувствительного элемента сенсора (функционализации поверхности кремниевой нанопроволоки) для получения наибольшей избирательности (селективности) к определенному виду анализируемых биомолекул.

На сегодняшний день найдено и исследовано множество молекул — биомаркеров для медицинской диагностики, своевременное обнаружение которых может значительно улучшить диагностику заболеваний. Теоретические расчеты показывают, что для обнаружения большего количества маркеров необходимо значительно увеличивать чувствительность сенсорных систем [2]. Для диагностики сложных заболеваний особенно важным становится комплексное обнаружение специфических маркеров, которые могут быть соотнесены с различными стадиями заболевания. Определение начальных стадий тяжелых заболеваний, таких как рак, является актуальной задачей современной медицинской диагностики. Поэтому создание сверхчувстви-

тельных сенсорных массивов, в которых каждая отдельная наноструктура функционализована рецептором на определенный маркер позволит при помощи одного биочипа быстро проводить комплексную диагностику заболевания.

Принцип работы нанопроволочного сенсора основан на изменении проводимости проволоки, зависящей от заряда на ее поверхности. Биологические молекулы, такие как нуклеиновые кислоты и белки, как правило, имеют заряд в водном растворе. При их осаждении на поверхность нанопроволоки изменяется проводимость структуры, которая может быть преобразована в выходной электрический сигнал. Селективность осаждения необходимых молекул достигается за счет молекул — рецепторов, предварительно иммобилизованных через линкер на рабочей поверхности сенсора. Линкер представляет собой молекулу, содержащую группу, взаимодействующую с поверхностью кремния на одном конце восстановленного углеродного скелета и группу для присоединения рецептора на другом. Если поверхность сенсора, функционализированную рецепторами, поместить в раствор с макромолекулами, которые имеют отрицательный (положительный) заряд в водном растворе, произойдет специфическое связывание макромолекул с рецепторами. Это взаимодействие приводит к увеличению или уменьшению начального заряда на поверхности и, соответственно, к изменению проводимости нанопроволоки. Такая система детектирования позволяет в реальном времени изучать процесс взаимодействия, следя за изменением проводимости, отображаемой на дисплее компьютера. Однако стоит отдельно отметить, что чувствительность системы значительно снижается, если во время

© Кузнецов А. Е., Кузнецов Е. В., Рыбачек Е. Н., 2010

функционализации рецепторами рабочей поверхности сенсора происходит побочная функционализация окружающей сенсор поверхности.

В настоящее время проводится большое число исследований, направленных на изучение химической модификации поверхности кремния для последующего использования в биологических целях [3, 4]. Первоначально для иммобилизации биомолекул на кремневых поверхностях выращивался тонкий слой (толщиной приблизительно около 1 нм) оксида. В качестве линкера использовали алкосиланы, которые состоят из восстановленной углеводородной цепи и содержат на одном конце интересующую функциональную группу (амин или тиол), а на другом — группу типа $\text{Si}(\text{OCH}_3)_3$. Эта группа при нагревании соединяется с поверхностным слоем оксида кремния. Подобная схема модификации обладает рядом недостатков. Окисленная поверхность кремния является аморфной, и отношение количества $\text{Si}-\text{O}-\text{Si}$ или $\text{Si}-\text{OH}$ сильно зависит от истории получения образца. При нагревании силаны реагируют не только с поверхностью оксида, но и между собой, что ведет к усложнению контроля реакции. Подобные недостатки в химии поверхности ведут к невозможности и плохой гомогенности получаемого модифицированного слоя. Еще одним недостатком является постепенное разрушение модифицированной поверхности при нормальных условиях. Так как реакция катализируется аминами, поверхности оксида и кристаллического кремния чувствительны к индуцируемой аминами деградации в присутствии воды. В подобной схеме функционализации окисленной поверхности кремния используют метоксисиланы или хлорсиланы. Моносиланы создают довольно бедные слои на поверхности, а использование полифункциональных силанов приводит к трудно контролируемой поверхностной полимеризации, сильно влияющей на гомогенность и воспроизводимость получаемых слоев.

Относительно недавно было показано, что органические молекулы, содержащие одну или несколько винильных (алкеновых) $\text{C}=\text{C}$ групп, могут напрямую взаимодействовать с восстановленной водородом поверхностью кремния, образуя $\text{Si}-\text{C}$ связь [5]. Для активации радикальной реакции требуется оторвать атом водорода с поверхности. Первоначально для данной реакции использовалась термическая активация, недостатком которой является тот факт, что для достижения приемлемых результатов требуются довольно высокие температуры, при этом время протекания самой реакции довольно велико. Использование химического инициатора — реа-

гента, который бы отрывал атом водорода с поверхности, образуя радикал на поверхности для присоединения по алкеновой группе, позволяет избежать недостатков термической активации. В качестве подобных инициаторов могут быть использованы атомарный хлор или диацильные пероксиды. Исследования нескольких научных групп показали, что реакцию можно инициировать с помощью УФ-излучения, например в присутствии ртутной лампы с длиной волны 254 нм [6]. Стоит отметить, что при проведении реакции реактор нужно изолировать от любого присутствия воды и кислорода, пропуская через него сухой азот или аргон. Как правило, для завершения реакции при использовании УФ-излучения достаточно двух часов. Одним из преимуществ данного метода является возможность использования специальных УФ-масок, которые позволяют функционализировать массивы наносенсоров различными химическими группами.

При помещении чувствительного элемента в анализируемый раствор, обладающий ионной силой, происходит экранирование зарядов, что негативно влияет на чувствительность. В связи с этим определяемая заряженная молекула должна находиться как можно ближе к кремниевой поверхности, т. е. длина линкера должна быть минимально возможной. С другой стороны стабильность всех модифицированных поверхностей зависит напрямую от того могут ли молекулы воды попадать в кремнийорганические слои. При попадании молекул воды в непосредственную близость к $\text{Si}-\text{C}$ -связи происходит гидролиз, и слои начинают отрываться от поверхности. Поэтому главная роль углеводородных цепей в линкерах заключается в создании гидрофобного окружения, которое блокирует проникновение воды к поверхности. Для достижения высокой стабильности функционализированной поверхности сенсора в водных растворах требуется создание плотной упаковки молекулярных слоев. Еще одним важным моментом является выбор защитных групп при функционализации. Как правило, для последующей химической иммобилизации рецепторов линкеры содержат амино-, гидроксил-, карбоксил- или альдегидогруппы. Эти группы могут напрямую взаимодействовать с поверхностью кремния, поэтому необходимо модифицировать их специальными защитными группами, не позволяющими им взаимодействовать с поверхностью. После реакции взаимодействия линкера с поверхностью защитную группу удаляют, и на активированную функциональную группу линкера сажают рецептор. Выбор защитных групп сильно влияет на конечную стабильность модифицированной по-

верхности: чем меньше размер защитной группы, тем меньше она ингибирует процесс упаковки углеродных цепей линкера. В органической химии в качестве защиты часто используется трифенилметильная группа. Использование данного реагента для посадки линкера на поверхность кремния приводит к значительному понижению плотности слоев из-за стерических затруднений, вызванных бензольными кольцами защитной группы [7]. Поэтому для защиты аминогрупп рекомендуется использовать трет-бутоксикарбонильную группу (t-BOC), используя для ее снятия трифторуксусную кислоту (TFA), а для защиты карбоксильных групп — образование сложных — метиловых или этиловых эфиров [8, 9] с использованием жесткого кислотного или щелочного гидролиза для их снятия. На рисунке приведена схема химической функционализации поверхности кремния молекулами ДНК. Вначале

более плотную упаковку. Добавление даже незначительного количества таких реагентов значительно улучшают стабильность поверхности. По-видимому, небольшие молекулы могут эффективно упаковываться между линкерами, повышая общую плотность гидрофобного слоя.

Далее приведено несколько примеров использования функционализированных поверхностей кремниевых нанопроволок для биохимической диагностики.

В 2001 г. была опубликована первая научная работа по электрическому определению белков в растворе с использованием наноструктур [10]. Чувствительную часть сенсора модифицировали рецептором-биотином, который обладает высоким сродством к стрептавидину. Когда нанопроволку с биотином опускали в раствор, содержащий стрептавидин, происходило быстрое увеличение проводимости до определенного постоянного значения, которое не менялось после

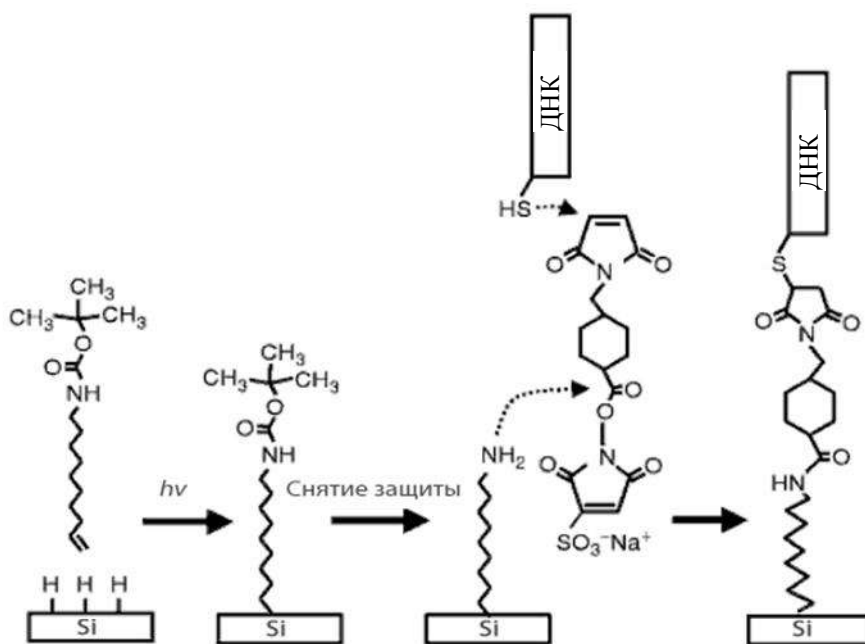


Схема химической функционализации поверхности кремния молекулами ДНК

под действием УФ-излучения происходит присоединение к поверхности молекулы линкера, на второй стадии происходит снятие защитной группы и активация аминогруппы для последующего присоединения молекулы ДНК через второй бифункциональный линкер.

Еще одним приемом повышения стабильности функционализированных поверхностей является использование смешанных слоев, в которых молекулы линкера смешиваются с подходящими молекулами (например, dodecene), которые имеют

добавления буферного раствора. Такой результат был объяснен тем, что стрептавидин имеет отрицательный заряд при значениях pH, в которых проводился эксперимент, и очень медленной диссоциацией комплекса биотин—стрептавидин. Эта работа наглядно показала, что используя полупроводниковые нанопроволоки можно опеределить белки, которые потенциально являются биологическими маркерами происходящих в организме процессов. Кроме того, модифицированные антителами полупроводниковые сенсоры

могут использоваться для обнаружения единичных молекул вирусов. При связывании вируса с антителом происходит отклонение проводимости от базового значения, когда комплекс антитело—вирус распадается, значение проводимости возвращается к начальной величине [11]. Чувствительность таких сенсоров может достигать порядков 10^{-18} М, что эквивалентно 50 частицам вируса influenza-A на миллилитр. Методом флюоресцентных меток было доказано, что при диффузии вируса вблизи поверхности проводимость проволоки не изменяется, а скачок проводимости происходит только после связывания вирусной частицы с антителом на поверхности сенсора. Аналогично, если вирусная частица отваливается, то значение проводимости быстро возвращается к первоначальной величине. Таким образом, для получения сигнала требуется взаимодействие частицы вируса с поверхностью нанопроволоки. Селективность сенсора по отношению к различным вирусам является важным преимуществом при создании комплексных высокочувствительных приборов для медицины.

Селективность к определенной последовательности ДНК является первым шагом на пути создания микроэлектронных приборов для определения генетических заболеваний. Молекулы ДНК заряжены в водном растворе, следовательно, они могут быть селективно определены при помощи нанопроволочных сенсоров, если на его поверхности иммобилизован соответствующий рецептор. Основываясь на принципе комплементарного взаимодействия, можно селективно определять заданные последовательности ДНК: при взаимодействии с рецептором на поверхности отрицательно заряженный полианион будет увеличивать проводимость нанопроволки. Синтезированные одиночные нуклеотидные последовательности не заряжены, и, следовательно, при низкой ионной силе раствора, в которой чувствительность проволок выше, имеют большую стабильность и аффинность, чем аналогичные ДНК рецепторы. Чувствительность нанопроволок, модифицированных для детектирования ДНК, составляет как минимум 10 фМ [12], что превосходит большинство альтернативных оптических методов. Более того, наносенсоры имеют стабильную воспроизводимость, необходимую для создания систем из сенсоров для биологических и генетических исследований.

Изучение и открытие органических молекул, которые специфически связываются с белками, являются основным направлением в фармакологии и генетических исследованиях по изучению

сложных путей метаболизма. Наглядным примером применения полупроводниковых наносенсоров в этой важной области может служить исследование процессов ингибирования на тирозинкиназе. Тирозинкиназа — это белок — медиатор трансдукции сигнала в клетке млекопитающих посредством фосфорилирования основания тирозина мишени-белка с использованием АТФ. Проблемы в регуляции процессов фосфорилирования связывают с определенными заболеваниями, в том числе и с раком. Для изучения ингибирования тирозинкиназы небольшими молекулами на поверхности наносенсора проводилась химическая иммобилизация киназы—Ab1. Затем исследовалась ее возможность связываться с АТФ и конкурентное ингибирование АТФ с органической молекулой (например лекарственным препаратом Gleevec TM) [13]. Процесс связывания отрицательно заряженного АТФ с Ab1 или его ингибирование, можно детектировать в реальном времени, определяя численно повышение или понижение величины проводимости нанопроволочного сенсора. При повышении концентрации АТФ в растворе наблюдается обратимое увеличение проводимости — отрицательно заряженные молекулы АТФ образуют комплекс с тирозинкиназой. При добавлении в раствор ингибитора проводимость понижается, что напрямую связано с процессом конкурентного ингибирования АТФ с небольшими органическими молекулами. Данное исследование показывает потенциальную возможность использования сенсорных систем для диагностики медицинских препаратов в режиме реального времени.

Заключение

Главным преимуществом интегрирования нанопроволочных кремниевых массивов в сложные микросистемы для комплексной диагностики биохимических процессов и построения систем "лаборатория на чипе" является возможность прямого детектирования, основанная на электрическом сигнале, что позволяет осуществлять процесс регистрации в реальном времени без потерь на химические взаимодействия для выявления аналитического сигнала.

Все эти свойства вместе с ультравысокой чувствительностью и дешевизной позволяют говорить о революционных подходах в медицинской диагностике и биохимическом анализе.

ЛИТЕРАТУРА

1. Кузнецов Е. В., Рыбачек Е. Н. Биосенсоры на кремниевых нанопроволочных полевых транзисторах// Оборонный комплекс — научно-техническому прогрессу России. — М.: ФГУП "ВИМИ", 2010. № 3. С. 85—90.
2. Omenn G. S. The HUPO Plasma Proteome Project Pilot Phase: Technology Platforms// Reference Specimens, Data-Base. Working Summary March. 2004.
- 3 Hamers R. J. Interfacing Biological Molecules with Group IV Semiconductors for Bioelectronic Sensing// In. Bioelectronics: from theory to applications (I. Willner, E. Katz Edts) Ltd. New M.
4. Swihart T. Silicon Nanoparticles for biophotonics in Nanotechnology// In. Biology and medicine: methods, devices, and applications (T. Vo-Dinh Edts) Boca Raton, FL, CRC Press, 2007.
5. Buriak J. M. Organometallic Chemistry on Silicon and Germanium Surfaces// Chemical Reviews, 2002. V. 102. No. 5. P. 1272.
6. Yang W., Butler J. E., Russell J. N., Hamers R. J. and Jr. Direct electrical detection of antigen-antibody binding on diamond and silicon substrates using electrical impedance spectroscopy// Analyst, 2007. V. 132. P. 296—306.
7. Pike A. R., Lie L. H., Eagling R. A., Ryder L. C., Patole S. N., Connolly B. A., Horrocks B. R., Houlton A. DNA On Silicon Devices: On-Chip Synthesis, Hybridization, and Charge Transfer// J. Angew. Chem., Int. Ed. 2002. V. 41. P. 615—617.
8. Strother T., Hamers R. J., Smith L. M. Covalent attachment of oligodeoxyribonucleotides to amine-modified Si (001) surfaces// J. Nucleic Acids Res. 2000. V. 28. P. 3535—3541.
9. Cai W., Peck J., van der Weide D., Hamers R. J. Direct electrical detection of hybridization at DNA-modified silicon surfaces// J. Biosens. Bioelectron., 2004. V. 19. P. 1013—1019.
10. Cui Y., Wei Q., Park H., Lieber C. M. Nanowire nanosensors for highly sensitive and selective detection of biological and chemical species// J. of Science. 2001. V. 293. P. 1289—1292.
11. Patolsky F., Zheng G. F., Hayden O., Lakadamyali M., Zhuang X. W., Lieber C. M. Electrical detection of single viruses// J. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2004. V. 101. P. 14017—14022.
12. Wang W. U., Chen C., Lin K. H., Fang Y., Lieber C. M. Label-free detection of small-molecule-protein interaction by using nanowire nanosensor// J. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2005. V. 102. P. 3208—3212.
13. Cattani-Scholz A., Pedone D., Dubey M., Nepl S., Nickel B., Feulner P., Schwartz J., Abstreiter G., Tornow M. Organophosphonate-Based PNA Functionalization of Silicon Nanowires for Label-Free DNA Detection// J. ACS Nano. 2008. V. 2 (8). P. 1653—1660.

FUNCTIONALIZATION METHODS OF SILICON NANOWIRE SURFACE FOR BIOCHEMICAL DIAGNOSTICS

A. E. Kuznetsov, E. V. Kuznetsov, E. N. Rybachek
SMC "Technological center", MIET, Moscow, Russia

Current achievement in biochemical diagnostics and actual issues appearing with creation based silicon-nanowire (Si-NWFET) biosensors are described. The ways of chemical modification of silicon-nanowire surface providing high selective biomolecule binding with sensing element are discussed. These functionalization methods with modern technical feasibility of integration Si-NWFET in micro bioassays could create novel devices for complex diagnostics in medicine.

Keywords: biosensor, biochemical diagnostic, Si-NWFET, sensitivity, selectivity, surface functionalization.

Кузнецов Александр Евгеньевич, стажер.

E-mail: KEV @ tcen.ru

Кузнецов Евгений Васильевич, нач. лаборатории.

Тел. 8-499-720-87-79. E-mail: KEV @ tcen.ru

Рыбачек Елена Николаевна, ст. научный сотрудник.

Тел. 8-499-720-87-79. E-mail: REN@ tcen.ru

Статья поступила в редакцию в мае 2010 г.