

Быстродействующие биологические сенсоры на основе однослойных углеродных нанотрубок, модифицированных специфичными аптамерами

К.Ф. Ахмадишина¹, И.И. Бобринецкий¹, И.А. Комаров¹, А.М. Маловичко¹,
В.К. Неволин¹, Г.Е. Фёдоров^{1,2}, А.В. Головин³, А.О. Залевский³, Р.Д. Айдарханов³

¹Национальный исследовательский университет «МИЭТ»

²Московский педагогический государственный университет

³Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова

Biological Sensors with Fast Response Based on Carbon Nanotubes Modified with Specific Aptamers

K.F. Akhmadishina¹, I.I. Bobrinetskiy¹, I.A. Komarov¹, A.M. Malovichko¹,
V.K. Nevolin¹, G.E. Fedorov^{1,2}, A.V. Golovin³, A.O. Zalevskiy³, R.D. Aidarkhanov³

¹National Research University of Electronic Technology, Moscow

²Moscow State Pedagogical University

³Lomonosov Moscow State University

Показана возможность создания быстродействующего биологического сенсора на основе композита однослойных углеродных нанотрубок и аптамеров для специфичного обнаружения белков. Изучено влияние на селективность и чувствительность сенсоров поверхностной модификации углеродных нанотрубок. Продемонстрировано, что карбоксилированные нанотрубки обладают большей селективностью к распознаванию специфичного аптамеру белка – тромбина.

Ключевые слова: углеродная нанотрубка; аптамер; тромбин; биосенсор; композит.

The possibility of the fast response biological sensor development based on composite of the single-wall carbon nanotubes and aptamers and purposed for specific detection of proteins has been shown. The effect of the surface modification of the single-wall carbon nanotubes on the sensor sensitivity has been investigated. It has been demonstrated that the carboxylated nanotubes have better sensitivity for thrombin detection.

Keywords: aptamer, biosensor, carbon nanotube, composite, thrombin.

Введение. Системы экспресс-диагностики различных заболеваний представляют интерес не только для исследователей в областях клинической диагностики, но и для разработчиков оборудования и устройств персонализированной медицины. Все больше распространяются персональные системы диагностики, которые встраиваются

в носимые комплексы и персональные вычислительные и телекоммуникационные устройства. В связи с этим требуется разработка компактных, высокочувствительных, энергоэффективных сенсорных структур, определяющих основные биологические параметры человека или нацеленных на определенный биологический агент.

Наиболее перспективным подходом, особенно с точки зрения улучшения селективности, является использование аптамеров – коротких одноцепочных олигонуклеотидов, имеющих высокое специфичное сродство к молекулам-мишеням. Работы по созданию биосенсоров на основе аптамеров получили широкое распространение с середины 2000-х гг. Разработаны подходы к созданию сенсоров на основе аптамеров, детектирующих такие вещества, как аденозинтрифосфат [1, 2], гамма-интерферон [3], охратоксин [4], тромбин [1, 2], теофиллин [5], токсин ботулизма [6] и кокаин [7].

При создании интегрированных сенсоров на основе аптамеров важной задачей является преобразование сигнала в электрическую форму и его передача на устройства обработки. Один из наиболее перспективных материалов, на котором возможна иммобилизация аптамеров и обеспечивается выполнение функции трансдьюсера, – это углеродные нанотрубки (УНТ). Сетки из перколированных УНТ сочетают возможность простой сборки и обработки, а также сродство с органическими материалами с возможностью использования ряда преимуществ неорганических материалов в сенсорных приложениях [8]. Углеродные наноматериалы применяются при создании сенсорных систем на гибких подложках [9, 10]. Использование гибких пластиковых подложек обеспечивает возможность интеграции сенсорных структур в новых областях биомедицины, таких как «умная кожа» или носимые системы мониторинга состояния человека [11]. УНТ благодаря своим малым размерам и геометрической структуре являются не только пассивными проводниками сигнала, но могут сами оказывать заметное влияние на отклик аптамеров. При этом важную роль играет поверхность углеродных нанотрубок и ее функциональное состояние.

Материалы и методы. В качестве гибких подложек использовались пленки полиэтиленафталата (Teijin DuPont Films, Япония) размером 10 × 10 мм, толщиной 125 мкм. По краям подложек методом магнетронного распыления (Emitech K575X, Quorum Technologies, Великобритания) через маску формировались палладиевые электроды толщиной 200 нм. Электроды наносились после формирования пленки нанотрубок на поверхности подложки. При этом ширина маски определяла рабочую область сенсорной структуры, которая составила 4 × 10 мм. В качестве рабочего слоя использовались два типа углеродных нанотрубок: чистые и карбоксилированные.

Чистые однослойные углеродные нанотрубки 99,5 масс.% (ОСНТ) предоставлены Институтом проблем химической физики РАН. Углеродные нанотрубки в концентрации 0,02 мг/мл помещались в 0,5 масс.% раствор поверхностно-активного вещества (ПАВ) цетилтриметиламмония бромида (Helicon, Россия) и диспергировались в ультразвуковой ванне Branson B300 (Branson Ultrasonics, США) в течение 24 ч для создания коллоидного раствора при температуре ниже температуры мицеллообразования цетилтриметиламмония бромида.

Карбоксилированные углеродные нанотрубки (Sigma-Aldrich part. №652490) имели следующие параметры: чистота >90% углерода (содержание ОСНТ >60%), диаметр ~ 1,2–1,4 нм, длина ~ 0,5–1,5 мкм, 1–3 ат. % –СООН групп. Диспергирование карбоксилированных углеродных нанотрубок проводилось в течение 24 ч в растворе *N*-метилпирролидона.

Наличие ПАВ (в случае с чистыми углеродными нанотрубками) и длительное время диспергирования необходимы для того, чтобы получить в растворе одиночные на-

нотрубки или, как минимум, пучки минимального размера. Типичная длина нанотрубок, по данным атомно-силовой микроскопии (Solver-Pro, ЗАО «НТ-МДТ», Россия), составляет порядка 1000 нм. В пучках длина достигает 5 мкм при диаметре пучков ~10 нм.

Для создания сеток УНТ раствор наносился на поверхность полимерной подложки и распределялся по всей поверхности, после чего подложка подвергалась естественному высыханию. Далее подложка отмывалась в кипящем 2-пропаноле в течение 5 мин для удаления остатков ПАВ, затем проводилась сушка при температуре менее 110–120 °С. Этот процесс повторялся итеративно (5–6 раз) до формирования пленки необходимой проводимости. После формирования палладиевых электродов структура отжигалась при температуре 110–120 °С для улучшения контакта. Таким образом сформированы структуры с сопротивлением порядка единиц мегаом в случае чистых углеродных нанотрубок и от 4,3 до 8 кОм в случае карбоксилированных углеродных нанотрубок.

Топография поверхности исследовалась с помощью сканирующего зондового микроскопа Solver P47 (ЗАО «НТ-МДТ»). Результаты визуализации поверхности приведены на рис.1. Сенсорные свойства измерялись на 16-канальном измерителе параметров газовых датчиков ИПС-16 (ЗАО «Практик-НЦ», Россия).

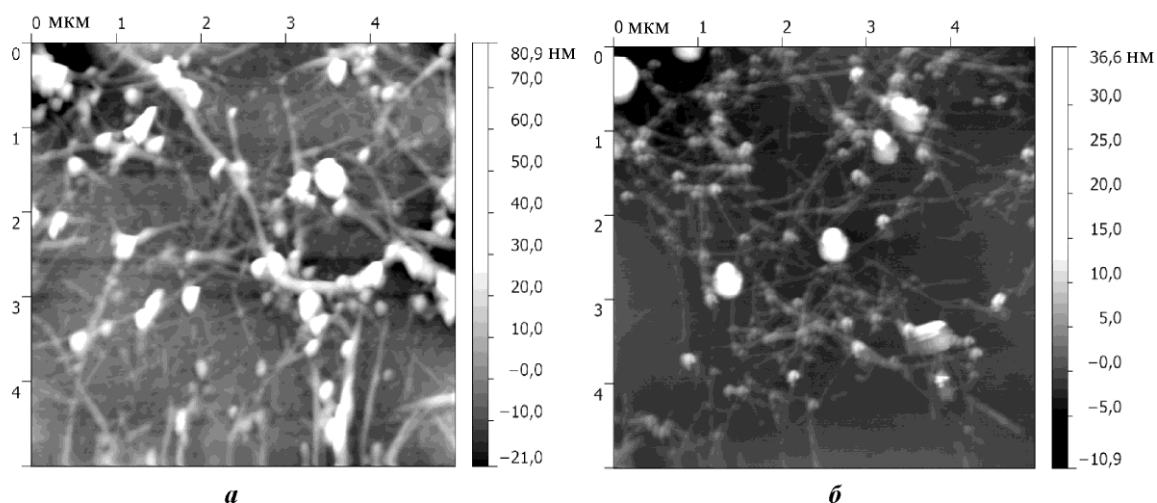


Рис.1. Топография чувствительного проводящего слоя, модифицированного аптамерами, на основе чистых (а) и карбоксилированных (б) углеродных нанотрубок

Сборка сенсорного устройства. Для создания биологического сенсора проведена иммобилизация аптамера на поверхности углеродных нанотрубок. Иммобилизация 5'-аминомодифицированного тромбинового аптамера (15-ТВА) производства ООО «Апто-фарм» (Россия) на углеродные нанотрубки осуществлялась с помощью частично гидрофобного агента Tween 20, гидроксильные группы которого активированы с помощью CDI (CDI-Tween). Последующим замещением имидазольной группировки аминогруппой из аминоклинкера добивались образования ковалентного конъюгата аптамер-5'-Tween. Подобный подход описан в работе [12]. Для нанесения и иммобилизации на нанотрубках CDI-Tween приготовлен раствор в деионизованной воде концентрацией 0,05 мг/мл. Структуры с ОСНТ помещались в пробирки типа Эппендорф емкостью 1,5 мл, затем оставшийся объем заполнялся раствором CDI-Tween, после чего запаянные пробирки перемешивались в течение 4 ч при комнатной температуре в магнитной мешалке. Размещение подложек в отдельных пробирках позволило избежать повреждения металлических контактов и сеток нанотрубок при перемешивании.

На следующем этапе проводилось нанесение аптамера и удаление непрореагировавших CDI-групп после промывки в течение 2 ч в 0,1 М растворе этаноламина. Оставшийся этаноламин троекратно отмывался в деионизованной воде, после чего сенсоры просушивались, а затем на подложки в течение 12 ч наносился 15-ТВА (для нанесения был приготовлен 100-пМ раствор аптамера).

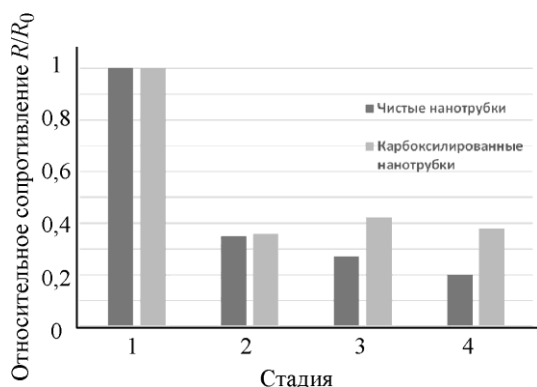


Рис.2. Изменение сопротивления сенсорных структур во время сборки: 1 – стадия нанесения ОСНТ и напыления контактов; 2 – стадия нанесения CDI-Tween; 3 – стадия нанесения аптамера; 4 – стадия обработки этаноламином

После каждой из стадий нанесения CDI-Tween, аптамера и отмывки измерялось сопротивление структуры (после просушивания). В случае чистых углеродных нанотрубок на всех стадиях, кроме последней, сопротивление понижалось (рис.2). Падение сопротивления на первых двух стадиях может быть связано с увеличением экранирования углеродных нанотрубок CDI-Tween и ДНК. Обработка этаноламином снимает часть ароматических CDI-групп, увеличивая доступность трубок для растворителя. В случае предлагаемой сенсорной структуры следует рассматривать два механизма рассеяния носителей заряда, вносящих свой вклад в сопротивление структуры: сопротивление тела нанотрубки

и контактное сопротивление между нанотрубками. В работе [13] основной вклад вносится телом одной нанотрубки, тогда как область контакта с электродами изолирована от действия раствора. В случае предлагаемой конструкции ОСНТ на пленках полиэтиленнафталата доминирует контактное сопротивление между самими нанотрубками. Таким образом, уменьшение сопротивления может быть связано с уменьшением потенциального барьера между нанотрубками за счет уменьшения локальной работы выхода при наличии линкера и ДНК.

В случае карбоксилированных углеродных нанотрубок при нанесении аптамера сопротивление структуры повышается, что может быть связано с иным механизмом иммобилизации на данном типе нанотрубок. Предполагается, что в случае карбоксилированных углеродных нанотрубок вклад в иммобилизацию аптамера обеспечивается как линкером CDI-Tween, так и за счет присутствия на нанотрубке –COOH групп, на которых иммобилизуются аптамеры. Однако очевидно, что структура –COOH – аптамер вносит отрицательный заряд, увеличивая сопротивление всей структуры. Также следует учитывать общую гидрофильность карбоксилированных ОСНТ, что, в частности, может приводить к выстраиванию аптамеров в контактных областях нанотрубок.

Для обеспечения максимального отклика сенсора требуется изолировать область контакта водного раствора детектируемого вещества от места контакта нанотрубок и электродов [14]. В случае предлагаемой конструкции сенсора процедура изоляции является достаточно простым процессом: на поверхность пленки нанотрубок устанавливается полимерный цилиндр диаметром 2,5 – 3 мм и вся остальная поверхность вне его заливается полимером, формируя структуру типа «стакан» (рис.3). Такая конструкция обеспечивает следующие свойства: контакт раствора будет осуществлен только с поверхностью нанотрубок и площадь контакта будет фиксирована и определена диаметром цилиндра. Таким образом, паразитными утечками тока через раствор можно пренебречь.

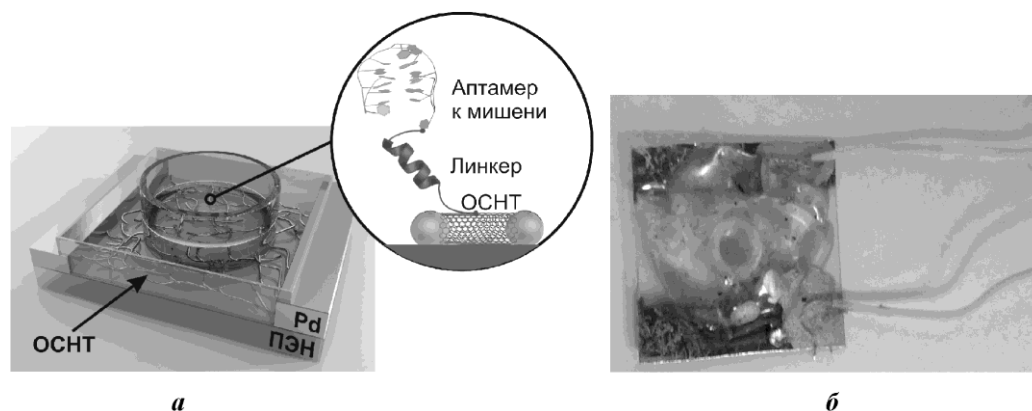


Рис.3. Измерительная система для проверки чувствительности сенсора к тромбину: *а* – 3D-модель конструкции сенсора (на вставке – модель модифицированной нанотрубки в составе сенсора); *б* – вид сенсора в сборе

Влияние типа нанотрубок на топографию и проводимость сенсорной структуры. При сравнении сеток карбоксилированных углеродных нанотрубок и некарбоксилированных ОСНТ, использовавшихся в работе [12], можно отметить, что сетки на основе карбоксилированных УНТ получаются более перколированными (см. рис.1), а также на них остается меньшее количество примесей (остатки цетилметиламмония бромид, аморфного углерода и т.д.). Конечное сопротивление готовых сенсорных структур при использовании карбоксилированных углеродных нанотрубок уменьшается на 3 порядка (до 3–8 кОм) по сравнению с чистыми углеродными нанотрубками, сопротивление готовой структуры которых составляет 2 – 8 МОм.

Данные эффекты связаны с лучшей перколяцией сетки углеродных нанотрубок, меньшим диаметром пучков и малым количеством нежелательных примесей.

Влияние функциоанализации углеродных нанотрубок на чувствительность сенсора. В общем случае механизм реакции системы нанотрубка–аптамер следующий. Проводимость нанотрубки зависит от того, образует ли 15-ТВА комплекс с поверхностью нанотрубки. В отсутствие тромбина аптамер 15-ТВА находится в равновесии между состоянием в комплексе с нанотрубкой и состоянием с квадруплексной структурой, но при возможности образовать комплекс с тромбином конформационное равновесие смещается в сторону квадруплексной структуры, которая имеет значительно меньше контактов с нанотрубкой. Именно столь значимое конформационное изменение, вероятнее всего, и приводит к изменению проводимости трубки.

Разработанные сенсорные структуры подключались к измерителю ИПС-16. Рабочие напряжения выбирались по вольт-амперной характеристике структур с условием ограничения протекающего тока до 100 нА и составили от 0,1 до 0,5 В для различных структур.

Для измерения ответа сенсоров подготовлены 4 мкМ растворы человеческого тромбина и альбумина в деионизованной воде. Перед экспонированием на сенсор наносилось 2,5 мкл деионизованной воды, после выхода сигнала на плато добавлялось 2,5 мкл раствора белка, при этом концентрация уменьшалась до 2 мкМ. После достижения сигналом экстремума и стабилизации на новом значении добавлялось 2,5 мкл 6 М раствора гуанидина для разрушения комплекса аптамер–белок. Затем из «стакана» удалялось 5 мкл жидкости и добавлялось еще 5 мкл гуанидина. После удаления всего раствора содержимое «стакана» трехкратно промывалось 7,5 мкл деионизованной во-

ды. Сушка дна «стакана» с пленкой ОСНТ проводилась при помощи струи воздуха до стабилизации сопротивления. Затем процесс повторялся для следующего белка.

Результаты изменения сопротивления в процессе проведения эксперимента приведены на рис.4. Необходимо отметить основное и принципиальное отличие в отклике сенсорных структур на различные белки. В случае структуры на основе чистых углеродных нанотрубок сопротивление уменьшается при экспонировании как тромбином, так и альбумином. Однако значительно различается величина отклика данных структур. Сигнал при экспонировании тромбином очень сильный и ярко выраженный, так как при этом сопротивление уменьшается на 55%, тогда как при экспонировании альбумином сопротивление падает значительно меньше, чем для тромбина (16 % от исходного значения).

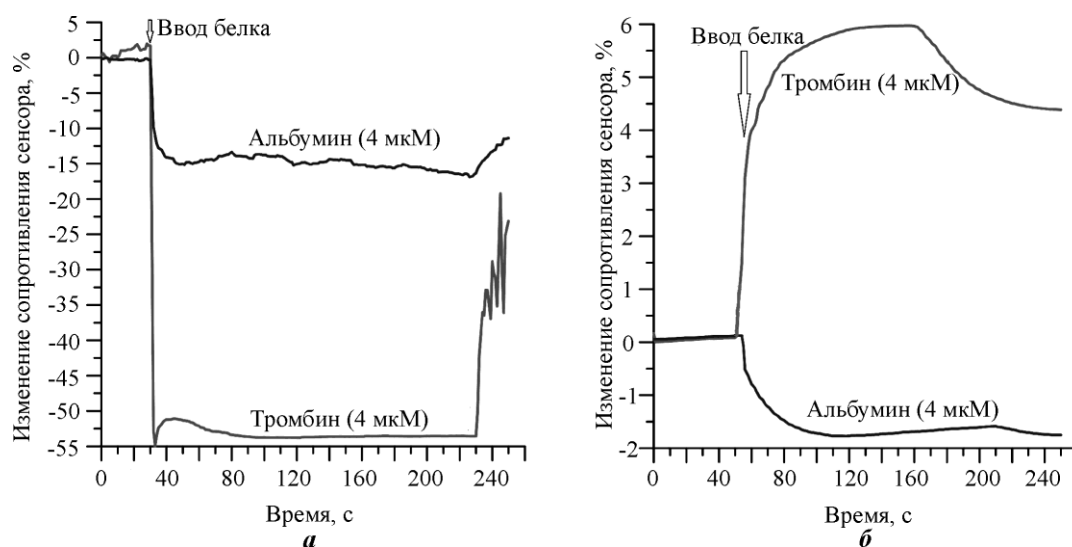


Рис.4. Отклик биосенсоров на основе чистых (а) и карбоксилированных (б) углеродных нанотрубок на экспонирование тромбином и альбумином

В случае сенсоров на основе карбоксилированных УНТ при экспонировании тромбином сопротивление структур увеличивается, в то время как при экспонировании альбумином сопротивление уменьшается, что говорит о лучшей селективности структур на основе карбоксилированных УНТ. Первоначальный сигнал при экспонировании тромбином в случае сенсоров на карбоксилированных нанотрубках составляет 6%. Экспонирование альбумином изменяет отклик на 2%.

Различие в механизмах чувствительности могут быть связаны с изменением соотношения вклада во взаимодействие с белком контактов и тела нанотрубок. Изначально, как было показано, сетки карбоксилированных ОСНТ обладали лучшими параметрами проводимости за счет уменьшения роли контактного сопротивления. Таким образом, основной вклад в реакцию при взаимодействии аптамера с белком тромбина вносит сопротивление тела нанотрубок. Так как в пленке присутствуют более 2/3 полупроводниковых нанотрубок, обладающих *p*-типом проводимости [15], то внесение аптамера, несущего отрицательный заряд, будет смещать энергетические уровни в нанотрубке, увеличивая концентрацию основных носителей. При связывании с тромбином аптамер частично отходит от тела нанотрубки, уменьшая свой зарядовый вклад, что приводит к увеличению сопротивления всей системы.

Также следует отметить характер восстановления сенсора под действием гуанидина. Только в случае тромбина на чистых нанотрубках наблюдается шум, определяемый

динамическими процессами связывания/распада комплекса белка и аптамера в процессе отмывки. При этом альбумин монотонно удаляется, что свидетельствует о преобладании неспецифических связей между ним и нанотрубками.

При введении одинаковой концентрации тромбина время отклика сенсора с чистыми нанотрубками составляет 5 с, тогда как для карбоксилированных – 20–30 с. Различие времени отклика также может быть объяснено превалированием в модели контактных областей или тела нанотрубок. В случае преобладания контактного сопротивления процессы изменения происходят значительно быстрее по сравнению с процессами, требующими покрытия всего тела нанотрубки.

Заключение. Разработанный конструктивно-технологический базис для сборки сенсорных структур на основе модифицированных аптамерами УНТ на гибкой пленке полиэтиленнафталата демонстрирует возможность регистрации сигнала от тромбина при иммобилизации структур специфическими аптамерами. Предложенная методика позволяет сформировать сенсорные структуры из пленок УНТ разных типов на поверхности гибкой пленки полиэтиленнафталата. Использование карбоксилированных углеродных нанотрубок дает возможность повышать селективность сенсора к тромбину. Время отклика подобного сенсора не превышает 10 с.

Авторы выражают признательность А.В. Крестинину за содействие в предоставлении однослойных углеродных нанотрубок.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект №14-19-01308, МИЭТ), гранта Президента Российской Федерации (грант № МД-170.2014.8), Минобрнауки России (соглашение № 14.575.21.0066, идентификатор проекта RFMEFI57514X0066 и соглашение № 14.586.21.0003, идентификатор проекта RFMEFI58614X0003).

Литература

1. Nutiu R., Li Y. Structure-switching signaling aptamers // J. Am. Chem. Soc. – 2003. – Vol. 125. – P. 4771–4778, doi:10.1021/ja028962o.
2. Li N., Ho C.-M. Aptamer-based optical probes with separated molecular recognition and signal transduction modules // J. Am. Chem. Soc. – 2008. – Vol. 130. – P. 2380–2381, doi:10.1021/ja076787b.
3. Development of an aptamer beacon for detection of interferon-gamma / N. Tuleuova, C. N. Jones, J. Yan et al. // Anal. Chem. – 2010. – Vol. 82. – P. 1851–1857, doi: 10.1021/ac9025237.
4. Cruz-Aguado J. A., Penner G. Fluorescence polarization based displacement assay for the determination of small molecules with aptamers // Anal. Chem. – 2008. – Vol. 80. – P. 8853–8855, doi: 10.1021/ac8017058.
5. Chavez J. L., Lyon W., Kelley-Loughnane N., Stone M. O. Theophylline detection using an aptamer and DNA-gold nanoparticle conjugates // Biosens. Bioelectron. – 2010. – Vol. 26. – P. 23–28, doi: 10.1016/j.bios.2010.04.049.
6. Wei Fang, Ho Chih-Ming. Aptamer-based electrochemical biosensor for Botulinum neurotoxin // Analytical and Bioanalytical Chemistry. – 2009. – Vol. 393. – P. 1943–1948.
7. Liu J., Lu Y. Fast colorimetric sensing of adenosine and cocaine based on a general sensor design involving aptamers and nanoparticles // Angew. Chem. Int. Ed. – 2005. – Vol. 45. – P. 90–94, doi: 10.1002/anie.200502589.
8. Flexible room-temperature NO₂ gas sensors based on carbon nanotubes/reduced graphene hybrid films / H.Y. Jeong, D.-S. Lee, H.K. Choi et al. // Appl. Phys. Lett. – 2010. – Vol. 96. – P. 213105–213107.
9. All-printed infrared sensor based on multiwalled carbon nanotubes / A. Gohier, A. Dhar, L. Gorintin et al. // Appl. Phys. Lett. – 2011. – Vol. 98. – P. 063103–063105.
10. Flexible graphene-based chemical sensors on paper substrates / G. Yang, C. Lee, J. Kim et al. // Phys. Chem. Chem. Phys. – 2013. – Vol. 15. – P. 1798–1801.
11. Flexible glucose sensor using CVD-grown graphene-based field effect transistor / Y.H. Kwak, D.S. Choi, Y.N. Kim et al. // Biosensors and Bioelectronics. – 2012. – Vol. 37. – № 1. – P. 82–87.

12. Гибкие биологические сенсоры на основе пленок углеродных нанотрубок / **К.Ф. Ахмадишина, И.И. Бобринецкий, И.А. Комаров и др.** // Российские нанотехнологии. – 2013. – Т.8. – № 11–12. – С. 35–40.
13. Single-walled carbon nanotube biosensors using aptamers as molecular recognition elements / **H.-M. So, K. Won, Y.H. Kim et al.** // J. of the American Chemical Society. – 2005. – Vol. 127. – № 34. – P. 11906–11907.
14. **An T., Kim K.S., Hahn S.K., Lim G.** Real-time, step-wise, electrical detection of protein molecules using dielectrophoretically aligned SWNT-film FET aptasensors // Lab Chip. – 2010. – Vol. 10. – P. 2052–2056.
15. **Othman Sideka, Quadria S.A., Shahid Kabira, Muhammad Hassan Bin Afzal.** Application of carbon nanotube in wireless sensor network to monitor carbon dioxide // J. of Experimental Nanoscience. – 2013. – Vol. 8. – Is. 2. – P. 154–161.

Статья поступила
30 сентября 2014 г.

Ахмадишина Карина Фаизовна – студент МИЭТ. *Область научных интересов:* зондовая микроскопия, проводящие покрытия на основе углеродных нанотрубок.

Бобринецкий Иван Иванович – доктор технических наук, ведущий научный сотрудник Научно-образовательного центра «Зондовая микроскопия и нанотехнология» МИЭТ. *Область научных интересов:* зондовая микроскопия, нанотехнология, био- и нанoeлектроника.

Комаров Иван Александрович – кандидат технических наук, ведущий инженер Научно-образовательного центра «Зондовая микроскопия и нанотехнология» МИЭТ. *Область научных интересов:* зондовая микроскопия, химические и биологические сенсоры, проводящие покрытия на основе углеродных нанотрубок, гибкая электроника. **E-mail:** vkn@nanotube.ru

Маловичко Антон Михайлович – студент МИЭТ. *Область научных интересов:* зондовая микроскопия, химические и биологические сенсоры.

Неволин Владимир Кириллович – доктор физико-математических наук, профессор кафедры квантовой физики и нанoeлектроники, руководитель Научно-образовательного центра «Зондовая микроскопия и нанотехнология» МИЭТ. *Область научных интересов:* нанотехнологии, зондовая микроскопия.

Фёдоров Георгий Евгениевич – кандидат физико-математических наук, старший научный сотрудник лаборатории квантовых детекторов физического факультета Московского педагогического государственного университета. *Область научных интересов:* синтез углеродных нанотрубок и наноструктур.

Головин Андрей Викторович – доктор химических наук, старший преподаватель факультета биоинженерии и информатики МГУ им. М.В. Ломоносова. *Область научных интересов:* химия и компьютерное моделирование биоструктур, в частности коротких последовательностей ДНК и РНК, биосенсоры.

Залевский Артур Олегович – студент МГУ им. М.В. Ломоносова. *Область научных интересов:* компьютерное моделирование биоструктур.

Айдарханов Руслан Дауренович – студент МГУ им. М.В. Ломоносова. *Область научных интересов:* моделирование биоструктур, разработка биосенсоров.