

## Модификация поверхности КНИ-сенсоров для детекции РНК-биомаркеров

© О.В. Наумова<sup>1</sup>, Б.И. Фомин<sup>1</sup>, Е.В. Дмитриенко<sup>2</sup>, И.А. Пышная<sup>2</sup>, Д.В. Пышный<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Институт физики полупроводников им. А.В. Ржанова Сибирского отделения Российской академии наук, 630090 Новосибирск, Россия

<sup>2</sup> Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук, 630090 Новосибирск, Россия

E-mail: naumova@isp.nsc.ru

Поступила в Редакцию 26 сентября 2019 г.

В окончательной редакции 25 октября 2019 г.

Принята к публикации 4 ноября 2019 г.

Предложен новый тип модификации поверхности многоканальных сенсоров на основе кремния-на-изоляторе, включающий использование бифункционального реагента карбонилдимидазола для формирования интерфейсного слоя вместо модифицированных силанов и зондов для специфической детекции фрагментов матричной рибонуклеиновой кислоты тропонина (аналита) в качестве маркера инфаркта миокарда. Исследовано влияние пассивации активированной карбонилдимидазолом поверхности сенсоров глицином и аминоктанолом на заключительном этапе модификации на отклик сенсоров и уровень фонового сигнала. Показано, что при пикомолярной концентрации аналита в растворе предложенный тип модификации поверхности с обработкой в глицине обеспечивает высокоспецифичный отклик  $\sim 60\%$ . За увеличение отклика и специфичности сенсоров при детекции аналита после пассивации глицином и аминоктанолом ответственны разные механизмы.

**Ключевые слова:** биосенсор, кремний-на-изоляторе, модификация поверхности.

DOI: 10.21883/FTP.2020.04.49147.9271

### 1. Введение

Нанопроволочные сенсоры являются высокочувствительными аналитическими приборами, предназначенными для качественного и количественного анализа биологических и химических веществ [1,2]. Одним из интенсивно развивающихся направлений использования (целевых назначений) таких устройств в настоящее время является создание на их основе электронных детекторов нуклеотидных маркеров социально значимых заболеваний, например, рака легких [3], рака груди [4], инфаркта миокарда, и др.

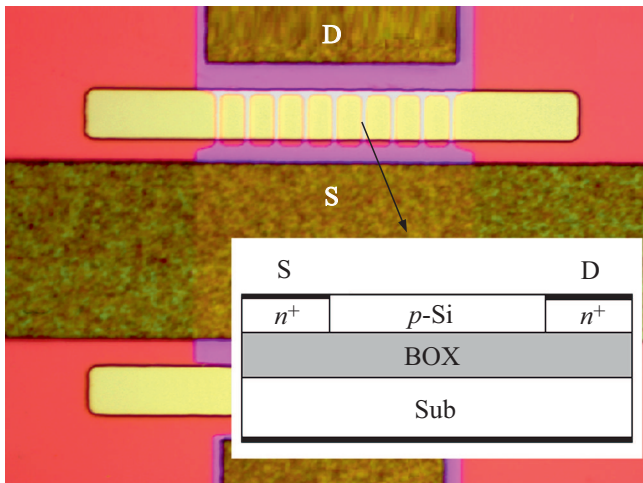
Среди различного вида нанопроволочных сенсоров особое место занимают многоканальные сенсоры на основе пленок кремния-на-изоляторе (КНИ). Использование КНИ обусловлено возможностью массового производства диагностических Lab-on-Chip систем в рамках промышленной кремниевой технологии. Многоканальность сенсорных элементов обеспечивает увеличение эффективной площади, соответственно, вероятности детекции аналита и верификацию результатов.

Принцип действия прибора основан на модуляции проводимости сенсорного элемента при адсорбции на его поверхность частиц любой природы (бактерий, вирусов, белков, ДНК, РНК и др.) [1–6]. Биосенсором такой прибор становится после формирования на его поверхности специального рецепторного слоя (или слоя зондов), способного с высокой селективностью и специфичностью распознавать частицы аналита в

тестируемом растворе, таким образом, модификация и контроль состояния поверхности сенсоров являются одними из ключевых проблем и задач при изготовлении таких приборов.

Модификация поверхности сенсоров является многостадийным процессом и включает в себя: 1) очистку и активацию поверхности, 2) создание переходного слоя между твердотельным сенсором и слоем рецепторов (зондов), 3) формирование слоя зондов, предназначенных для селективного и специфичного выявления аналита, 4) пассивацию поверхности для блокирования остаточных, непрореагировавших с зондами активных связей и 5) непосредственно, захват аналита. Одними из основных требований к процессу модификации поверхности являются минимизация толщины слоев (общая толщина модифицирующих слоев не должна превышать дебаевскую длину экранирования в растворе) и минимизация плотности непрореагировавших с зондами связей, которые определяют уровень фонового сигнала (из-за неспецифичного взаимодействия).

Как правило, для создания интерфейсных слоев используются функционализированные силаны [7]. Проблемами силанольных покрытий являются: 1) увеличение их плотности из-за относительно большого размера молекул (0.4 нм и больше) и 2) однородность и воспроизводимость слоев из-за взаимодействия молекул между собой [8]. Для пассивации поверхности используют обработки в глицине, аминоктанолу, а также введение белковых



**Рис. 1.** Оптическое изображение фрагмента кристалла с многоканальными КНИ-сенсорами. На вставке — схематическое изображение сечения отдельного сенсорного элемента.

молекул, например, BSA [9]. Однако эти молекулы легко поляризуются в растворах. Поэтому уровень фонового сигнала и специфичность взаимодействия между зондом и аналитом, соответственно, будут определяться типом интерфейсного слоя и самим аналитом.

Цель данной работы — модификация поверхности КНИ-сенсоров для детекции РНК-маркеров инфаркта миокарда. Для этой цели в качестве маркеров были использованы фрагменты матричных РНК тропонина (MTN), присутствие которых в крови наблюдается при инфаркте миокарда, и биочипы на основе многоканальных КНИ-сенсоров с короткими олигонуклеотидными зондами тропонина (PTN), комплементарными к MTN (т.е. специфичность взаимодействия

зонд—аналит определялась гибридизацией комплементарных пар РТН—МТН). При модификации поверхности сенсоров в качестве интерфейсного слоя вместо аminosиланов были использованы ультракороткие (~ 0.25 нм) молекулы CDI. Два типа обработок — в глицине и аминоэтаноле были использованы для пассивации поверхности.

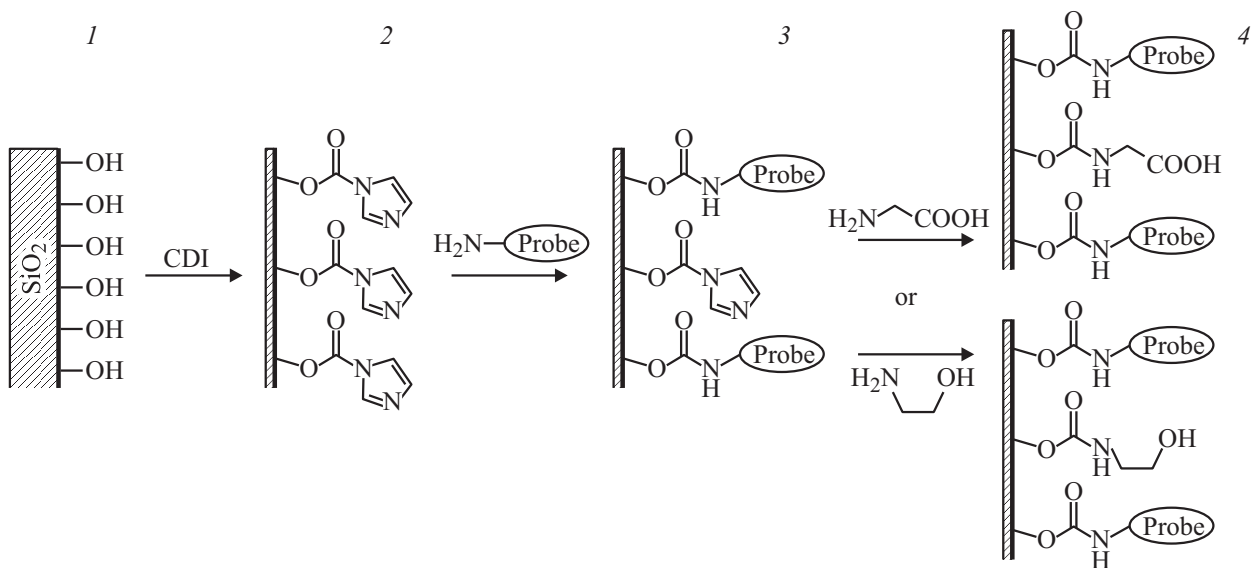
Задачами работы были изучение 1) специфичности детекции MTN и 2) влияния типа пассивирующих обработок на отклик сенсоров и уровень фонового сигнала при детекции MTN.

## 2. Эксперимент

Многоканальные КНИ-сенсоры были изготовлены на основе пленок КНИ (Smart-Cut)*p*-типа проводимости с конструктивными параметрами: толщина отсеченного слоя кремния  $t_{si} = 30$  нм, толщина скрытого диэлектрика  $t_{box} = 200$  нм. Концентрация акцепторов в пленке КНИ составляла  $2 \cdot 10^{16} \text{ см}^{-3}$ . Оптическое и схематическое изображение сенсора показано на рис. 1. Сенсорные элементы представляли собой полоски кремния-изоляторе шириной 1 мкм, имеющие контактные области стока-истока на концах. Подложка структур КНИ использовалась в качестве управляющего электрода, позволяющего целенаправленно изменять режим проводимости сенсорного элемента [10,11].

Чип с набором многоканальных сенсоров был поделен на две части. На одной из них проводилась модификация поверхности сенсоров с нанесением зондов (тестовые сенсоры), на другой — сенсоры были без зондов (использовали как референсные).

На рис. 2 схематично показаны основные этапы модификации поверхности сенсоров.



**Рис. 2.** Схематическое изображение модификации поверхности сенсоров на стадиях: 1) активации, 2) формирования интерфейсного слоя CDI, 3) формирования — специфичного слоя зондов, 4) пассивации глицином или аминоэтанолом.

**Таблица 1.** Фрагмент матричной РНК тропонина как маркер инфаркта миокарда и комплементарные к нему олигонуклеотидные зонды

Аналит	MTN	FAM-2'-OMe-(CAGAAGAAGATGAAGAAGAAGAGGAAGCAAAGGAG)
Зонды	PTN	d(CTCTTCTCCTTCGTTTCCTC)-NH <sub>2</sub>

В табл. 1 показаны используемый аналит (фрагмент матричной РНК тропонина) и комплементарный к нему олигонуклеотидный зонд.

Измерялись временные зависимости тока сенсоров  $I_{ds}(t)$  при последовательном нанесении на их поверхность капельным способом растворов 1 мМ фосфатного буфера (РВ), рН 7 или РВ с концентрацией MTN в диапазоне  $10^{-12}$ – $10^{-6}$  М. При измерениях использовался подпороговый режим работы сенсоров, обеспечивающий максимальный отклик к заряду, адсорбируемому на поверхность [10,11]. Более детально способ нанесения растворов и измерений описан в работе [3]. Отклик сенсоров на адсорбцию заряда из растворов с аналитом определялся как

$$\text{Resp.} = (I_{ds}^o - I_{ds})/I_{ds}^o \quad (1)$$

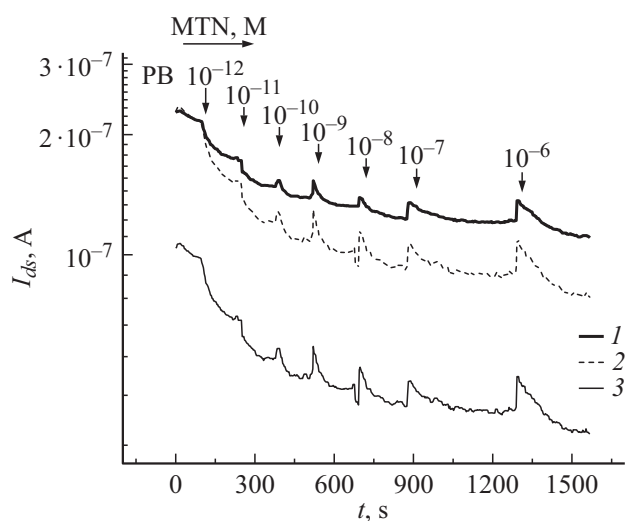
или в дифференциальной моде как

$$\text{Resp.}(\text{dif}) = (I_{ds}(\text{test}) - I_{ds}(\text{ref}))/I_{ds}(\text{ref}). \quad (2)$$

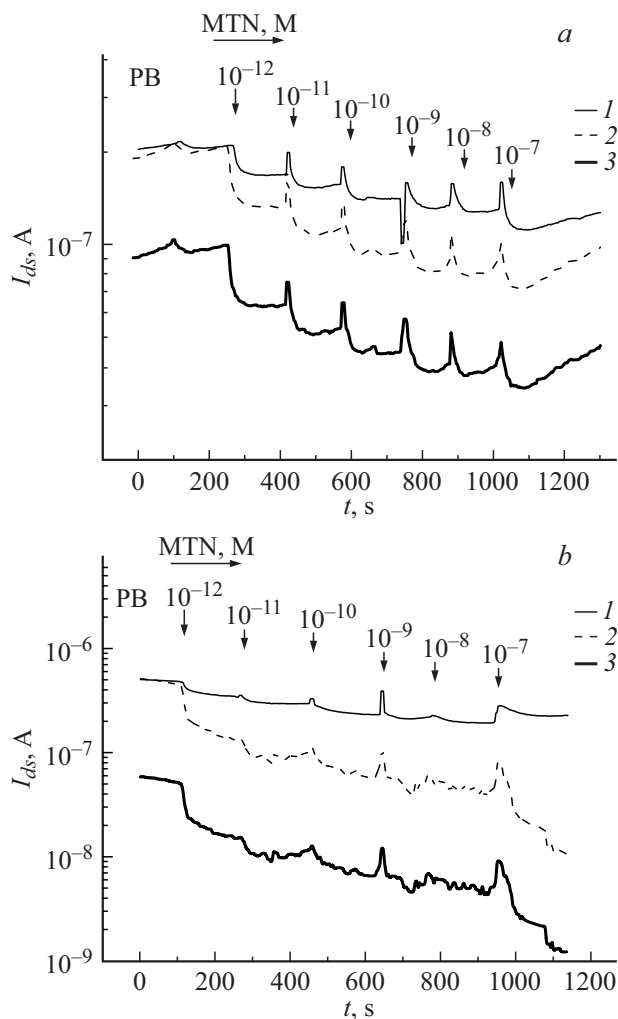
Здесь  $I_{ds}^o$  — значение тока сенсора в РВ до добавления аналита в раствор,  $I_{ds}(\text{test})$  и  $I_{ds}(\text{ref})$  — значение тока тестового и референсного сенсоров соответственно.

### 3. Результаты и обсуждение

На рис. 3 и 4 показаны типичные временные зависимости тока сенсоров с неактивированной и пас-



**Рис. 3.**  $I_{ds}(t)$  зависимости для тестового (1) и референсного сенсоров (2, 3) в исходном 1-мМ буферном растворе и в РВ с разной концентрацией MTN. 2 — зависимость 3, приведенная к уровню сигнала тестового сенсора в РВ. Сенсоры без пассивации поверхности.



**Рис. 4.**  $I_{ds}(t)$  зависимости для референсного (1) и тестового сенсоров (2, 3) в исходном 1-мМ буферном растворе и в РВ с разной концентрацией MTN. 2 — зависимость 3, приведенная к уровню сигнала референсного сенсора в РВ. Пассивация в аминотаноле — а, глицине — б.

сированной поверхностью, соответственно, в буферных растворах и при детекции ими MTN в 1 мМ РВ, рН 7. Для сравнения показаны также  $I_{ds}(t)$  зависимости, приведенные к одному уровню (исходному значению тока  $I_{ds}^o$  в РВ, до взаимодействия с MTN).

Видно, что независимо от типа пассивирующей обработки увеличение концентрации MTN приводит к уменьшению тока сенсоров, что типично при адсорбции отрицательно-заряженных частиц на их поверхность. Однако 1) соотношения исходных (в РВ до добавления

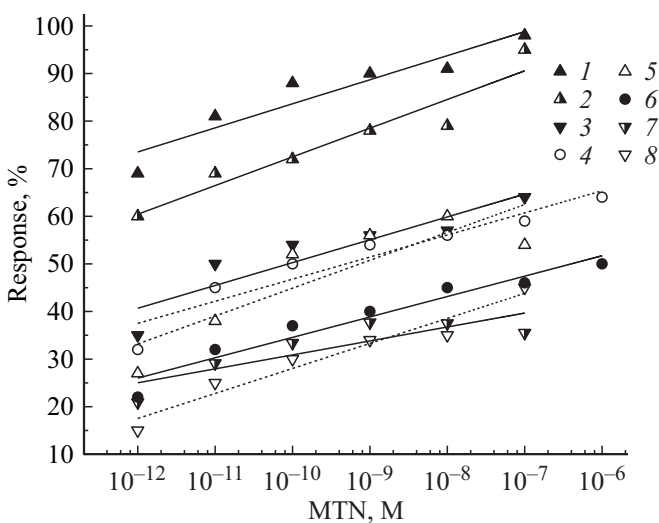
**Таблица 2.** Соотношение исходных (в 1 мМ РВ без аналита) значений токов тестовых и референсных сенсоров с различным типом пассивирующих обработок

Тип обработки	Без обработки	Аминосилан	Глицин
$I_{ds}^o(\text{test}):I_{ds}^o(\text{ref})$	2 : 1	1 : 2	1 : 8.7

МНТ в раствор) значений токов  $I_{ds}^o$  и 2) изменения  $I_{ds}$  в растворах с МНТ для тестовых и референсных сенсоров различны для случаев пассивированной и непассивированной поверхности. В случае непассивированной поверхности значение тока в РВ  $I_{ds}^o$  для тестовых сенсоров больше, чем для референсных,  $I_{ds}^o(\text{test}) > I_{ds}^o(\text{ref})$  (рис. 3). Для сенсоров с пассивированной поверхностью имеет место обратное соотношение  $I_{ds}^o(\text{test}) < I_{ds}^o(\text{ref})$  (рис. 4). Соотношения токов  $I_{ds}^o$  для сенсоров с различным типом пассивации поверхности приведены в табл. 2.

На рис. 5 показаны отклик сенсоров с разным типом модификации поверхности на детекцию МТН, определенный относительно исходного значения  $I_{ds}^o$  в РВ, и отклик тестовых сенсоров в дифференциальной моде как изменение тока тестовых сенсоров  $I_{ds}$  относительно тока  $I_{ds}$  референсных сенсоров при одинаковом (приведенном) значении  $I_{ds}^o$ .

Видно, что в случае непассивированной поверхности отклик референсных сенсоров больше, чем для тестовых. Для пассивированной поверхности отклик референсных сенсоров, определяющий уровень фонового сигнала от неспецифического взаимодействия сенсор–аналит, явно меньше отклика тестовых сенсоров. Для



**Рис. 5.** Resp. — (1, 3–6, 8) и Resp.(diff) — (2, 7) для тестовых (закрашенные и полужакрашенные символы) и референсных (незакрашенные символы) сенсоров без пассивации (4, 6) и с пассивацией поверхности в глицине (1, 2, 5) и аминоэтаноле (3, 7, 8).

пико-мольной концентрации МТН в растворе отклик тестовых и референсных сенсоров составляет соответственно ~ 70 и 30% после обработок в глицине и ~ 35 и 15% после обработок в аминоэтаноле. В дифференциальной моде отклик сенсоров составляет ~ 60 и 20% после обработок в глицине и аминоэтаноле соответственно и увеличивается с увеличением концентрации МТН. Таким образом, в случае непассивированной поверхности наблюдается ложноотрицательный результат:  $\text{Resp.}(\text{test}) < \text{Resp.}(\text{ref})$ . Пассивация поверхности независимо от ее типа позволяет выделять сигнал от специфического взаимодействия (гибридизации) ФТН и МТН.

Хорошо известно, что в растворах с pH 7 проводимость *n*-канальных сенсоров блокируется отрицательным зарядом электролита. Поэтому соотношения  $I_{ds}^o(\text{test}) > I_{ds}^o(\text{ref})$  и  $\text{Resp.}(\text{test}) < \text{Resp.}(\text{ref})$  для сенсоров с непассивированной поверхностью означает, что СДИ-модифицированные сенсоры (без зондов и без пассивации поверхности) более чувствительны к отрицательному заряду в электролите, чем сенсоры, в которых часть связей на поверхности занята зондами. Это может быть результатом того, что отрицательный заряд, распределенный по длине зонда или (после гибридации) комплекса зонд–аналит, пространственно удален от поверхности сенсора и частично экранирован зарядом подвижных ионов РВ, т.е. модификация специфичными зондами уменьшает чувствительность сенсорных элементов, однако повышает их специфичность.

Целевым назначением пассивирующих обработок является уменьшение фонового сигнала от неспецифического взаимодействия сенсор–аналит и тем самым выделение правильного сигнала от специфического взаимодействия зонд–аналит. Как видно из рис. 5, после обработки аминоэтанолом действительно наблюдается уменьшение отклика референсных и увеличение отклика тестовых сенсоров по сравнению со случаем непассивированной поверхности, т.е. результат такой обработки может быть объяснен блокированием аминоэтанолом неспецифического взаимодействия с МТН. Однако обработка глицином практически не изменяет отклик к неспецифическому взаимодействию референсных сенсоров с МТН, но при этом обеспечивает максимальный отклик тестовых сенсоров. Это позволяет заключить, что причины (механизмы) увеличения отклика тестовых сенсоров (и их специфичности соответственно) для обработок в аминоэтаноле и глицине различны.

Как отмечалось выше, проводимость сенсоров блокируется отрицательным зарядом на их поверхности. Пассивирующие обработки приводят к соотношению  $I_{ds}^o(\text{test}) < I_{ds}^o(\text{ref})$  в КРВ. Это означает, что в РВ (до введения МТН) эффективный отрицательный заряд на поверхности тестовых сенсоров с зондами по абсолютной величине больше, чем на поверхности референсных сенсоров  $|Q_{\text{эф}}^-(\text{test})| > |Q_{\text{эф}}^-(\text{ref})|$  (т.е. пассивирую-

шие обработки позволяют „выявлять“ отрицательный заряд зондов. При этом соотношение  $I_{ds}^o(\text{test})/I_{ds}^o(\text{ref})$  меньше ( $|Q_{\text{eff}}^-(\text{test})|/|Q_{\text{eff}}^-(\text{ref})|$  соответственно больше) после обработок в глицине, чем после обработок в аминоэтаноле (см. табл. 2). В РВ возможны только перезарядка и экранирование иммобилизованных на поверхность сенсоров комплексов (в частности, зондов и CDI-глицин или CDI-аминоэтанол) подвижными ионами электролита. Плотность зондов на поверхности тестовых сенсоров (в условиях эксперимента) одинакова. Поэтому полученные соотношения логично объяснить эффектом экранирования отрицательного заряда комплексов CDI-глицин или CDI-аминоэтанол подвижными положительными ионами электролита, причем более эффективным для комплексов CDI-глицин. Это действительно возможно, поскольку глицин является легко поляризуемой молекулой и имеет более отрицательную COOH-группу по сравнению с OH-группой аминоэтанола. В этом случае увеличение отклика глицин-модифицированных сенсоров, по сравнению с модификацией аминоэтанолом, объясняется эффектом частичного экранирования отрицательного заряда глицин-модифицированной поверхности и, соответственно, уменьшением кулоновского отталкивания для отрицательно заряженных MTN при их взаимодействии с FTN.

#### 4. Заключение

Предложен новый тип модификации поверхности КНИ-сенсоров для специфической детекции РНК-маркеров инфаркта миокарда, который включает использование CDI-интерфейсного слоя вместо силанольного и FTN-зондов для специфической детекции фрагментов матричной РНК тропонина в качестве маркеров инфаркта миокарда.

Показано, что КНИ-сенсоры, полученные с помощью оптической литографии с шириной сенсорного элемента 1 мкм, способны уверенно детектировать пикомольный уровень концентрации MTN в 1 мМ РВ, pH 7. При этом отклик сенсоров в дифференциальной моде составляет ~ 60 и 20% после пассивирующих обработок в глицине и аминоэтаноле соответственно.

Получено, что использование сенсоров с CDI-модифицированной поверхностью (без пассивации) в качестве референсных при детекции MTN может приводить к ложноотрицательному результату, когда отклик референсных сенсоров на неспецифическое взаимодействие больше, чем отклик тестовых сенсоров на специфическое взаимодействие зонд—аналит.

Обработка глицином CDI-модифицированной поверхности сенсоров более эффективна для специфической детекции РНК-маркеров, чем обработка аминоэтанолом.

Обработки аминоэтанолом подавляют неспецифическое взаимодействие, обработки глицином не влияют на уровень фонового сигнала. Увеличение отклика сенсоров и

специфичности взаимодействия с сенсорными элементами после обработок в глицине качественно объяснено эффектом экранирования отрицательно заряженной глицинмодифицированной поверхности и уменьшением кулоновского отталкивания для отрицательно заряженных MTN при их специфичном взаимодействии с FTN.

#### Финансирование работы

Работа выполнена при поддержке интеграционного проекта РАН № 306-2018-0004 (в части модификации поверхности сенсоров для детекции РНК-биомаркеров) и, частично, проекта № 0306-2019-0011 (при изготовлении и активации поверхности сенсоров).

#### Конфликт интересов

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

#### Список литературы

- [1] M. Labib, M.V. Berezovski. *Biosensors and Bioelectronics*, **68**, 83 (2015).
- [2] N. Lu, A. Gao, P. Dai, S. Song, C. Fan, Y. Wang, T. Li. *Small*, **10** (10), 2022 (2014).
- [3] E. Dmitrienko, O. Naumova, B. Fomin, M. Kupryushkin, A. Volkova, N. Amirkhanov, D. Semenov, I. Pyshnaya, D. Pyshnyi. *Nanomedicine*, **11**, 2073 (2016).
- [4] Yu.D. Ivanov, T.O. Pleshakova, K.A. Malsagova, A.F. Kozlov, A.L. Kaysheva, I.D. Shumov, R.A. Galiullin, L.K. Kurbatov, V.P. Popov, O.V. Naumova, B.I. Fomin, D.A. Nasimov, A.L. Aseev, A.A. Alferov, N.E. Kushlinsky, A.V. Lisitsa, A.I. Archakov. *Sensors Actuators B: Chem.*, **261**, 566 (2018).
- [5] B. Veigas, E. Fortunato, P.V. Baptista. *Sensors*, **15**, 10380 (2015).
- [6] F. Yang, G.-J. Zhang. *Rev. Anal. Chem.*, **33** (2), 95 (2014).
- [7] T. Goda, Y. Miyahara. *Current Phys. Chem.*, **1** (4), 276 (2011).
- [8] A.Y. Fadeev, T.J. McCarthy. *Langmuir*, **16**, 7268 (2000).
- [9] S. Taylor, S. Smith, B. Windle, A. Guiseppi-Elie. *Nucleic Acids Research*, **31** (16), e87 (2003).
- [10] O.V. Naumova, B.I. Fomin, D.A. Nasimov, N.V. Dudchenko, S.F. Devyatova, E.D. Zhanaev, V.P. Popov, A.V. Latyshev, A.L. Aseev, Yu.D. Ivanov. *Semicond. Sci. Technol.*, **25** (5), 055004 (2010).
- [11] О.В. Наумова, Б.И. Фомин. *Автометрия*, **52** (5), 1 (2016).

Редактор Г.А. Оганесян

## Surface modification of SOI sensors for detection of RNA biomarkers

O.V. Naumova<sup>1</sup>, B.I. Fomin<sup>1</sup>, E.V. Dmitrienko<sup>2</sup>,  
I.A. Pyshnay<sup>2</sup>, D.V. Pyshnyi<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Rzhanov Institute of Semiconductor Physics  
of Siberian Branch of Russian Academy Sciences,  
630090 Novosibirsk, Russia

<sup>2</sup> Institute of Chemical Biology  
and Fundamental Medicine  
of Siberian Branch of Russian Academy Sciences,  
630090 Novosibirsk, Russia

**Abstract** A new type of surface modification of multichannel silicon-on insulator based sensors was proposed, including the use of a bifunctional reagent carbonyldiimidazole for the formation of a interface layer instead of modified silanes, and troponine probes for specific detection of fragments of the troponin template RNA (analyte) as a marker of a heart attack myocardium. Impact of glycine and aminoethanol passivation of carbonyldiimidazole-activated surface of sensors at the final stage of modification (before applying the analyte) on the response of the sensors and the background signal level was studied. It was shown that at a picomolar concentration of an analyte, the proposed type of surface modification with treatment in glycine provides a highly specific response of ~ 60%. Different mechanisms are responsible for the increase in response and specificity of the sensors at detection of the analyte after passivation with glycine and aminoethanol.