

Изучение единичных взаимодействий антиген–антитело на поверхности кремния в биосенсорных устройствах на основе полевых транзисторов с каналом-нанопроводом

Д.Е. Преснов,^{1,*} Г.В. Преснова,² И.И. Циняйкин,¹ Г.В. Нибудин,¹ О.В. Снигирев,¹
А.С. Трифонов,¹ М.М. Уляшова,² В.А. Крупенин,¹ М.Ю. Рубцова^{2,†}

¹Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова
физический факультет, лаборатория «Криоэлектроника»
Россия, 119991, Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 2

²Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова
химический факультет, кафедра химической энзимологии
Россия, 119991, Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 3

(Поступила в редакцию 19.10.2024; после доработки 14.11.2024; подписана в печать 18.11.2024)

Для создания высокочувствительных биосенсоров на основе полевых транзисторов с кремниевым каналом-нанопроводом проведено изучение единичных взаимодействий антител с протат-специфическим антигеном (ПСА) на поверхности чистого кремния, модифицированного наночастицами золота диаметром 5 нм. Использован метод цифровой регистрации иммунных комплексов с помощью сканирующей электронной микроскопии, где в качестве визуализирующей метки антител использовались наночастицы золота диаметром 25 нм. Для расчета плотности наночастиц на поверхности кремния был разработан специальный алгоритм. Для исследования ковалентной иммобилизации антител применены различные методы химической модификации кремния с использованием силанов (3-глицидопропилтриметоксисилана (ГОПС), 3-меркаптопропилтриметоксисилана (ГОПС-SH) и 3-аминопропилтриэтоксисилана (АПТЭС)), бифункциональных реагентов и полиэтиленгликоля. Показано, что методы химической модификации с использованием ГОПС характеризуются более низким пределом обнаружения протат-специфического антигена (ПСА) — биомаркера опухолей предстательной железы. Изготовлены структуры биосенсоров на основе полевых транзисторов с каналами-нанопроводами, поверхности которых были модифицированы двумя различными методами с использованием ГОПС, и изучена их чувствительность к рН. Показано, что метод модификации с использованием ГОПС-SH характеризуется максимальным значением рН-чувствительности 70 мВ/рН и является наиболее перспективным при создании высокочувствительных биосенсоров для определения биомаркеров.

PACS: 87.85.fk, 62.23.Hj, 81.07.Gf, 85.30.Tv, 81.16.Nd, 82.47.Rs, 87.14.Lk УДК: 538.9, 538.915, 538.971, 621.382.323, 655.226, 53.082.9, 543.9, 571.27

Ключевые слова: биосенсор, сканирующая электронная микроскопия, полевой транзистор, кремниевый нанопровод, наночастицы золота, иммунные комплексы, цифровая регистрация.

DOI: [10.55959/MSU0579-9392.80.2520701](https://doi.org/10.55959/MSU0579-9392.80.2520701)

ВВЕДЕНИЕ

Для осуществления ранней диагностики различных патологий человека и развития современного здравоохранения в области персонализированной медицины необходимо создание новых высокочувствительных экспресс-методов определения низких концентраций биомаркеров (белков, нуклеиновых кислот и др.). Привлекательной технологией для этих целей являются биосенсоры на основе полевых транзисторов с каналом-нанопроводом (NWFET) [1]. Метод детектирования биологических объектов с помощью таких сенсоров основан на регистрации изменения проводимости крем-

ниевое канала-нанопровода транзистора в результате изменения электрического заряда при взаимодействии анализируемых объектов с распознающими специфичными биомолекулами, иммобилизованными на его поверхности. Биосенсоры такого типа характеризуются высоким значением отношения площади поверхности нанопровода к его объему, высокой чувствительностью к изменению заряда/электрического поля вблизи поверхности нанопровода, возможностью проведения измерений в широком диапазоне температур (вплоть до комнатной, что имеет решающее значение для изучения биологических объектов) [2–5]. Большим преимуществом биосенсоров на основе полупроводниковых нанопроводов является возможность определения с их помощью биомаркеров в режиме реального времени без использования дополнительных меток. Кроме того, технология их изготовления характеризуется высокой надежностью и вос-

* E-mail: denis.presnov@physics.msu.ru

† E-mail: myr@enz.chem.msu.ru

производимостью, а также совместимостью с промышленной кремниевой технологией, что позволяет размещать измерительную электронику в непосредственной близости от сенсора. В последнее время были разработаны различные биосенсорные устройства на основе NWFET для определения различных биомаркеров рака, острого инфаркта миокарда, бактериальных и вирусных инфекций и других заболеваний [6–10].

Для определения биомаркеров белковой природы в качестве распознающих элементов биосенсоров используют специфичные к определяемому соединению антитела. Пределы обнаружения биомаркеров с использованием таких иммуносенсоров на основе полупроводниковых нанопроводов и иммобилизованных на них антител находятся в диапазоне от наномолей до аттомолей [11–14]. Большой разброс в достигаемых значениях пределов обнаружения объясняется не только свойствами распознающих антител, но и количеством и ориентацией их активных центров относительно поверхности нанопровода. Поэтому особое внимание уделяется различным способам химической модификации поверхностей нанопроводов для увеличения плотности и равномерности заполнения их поверхности распознающими антителами, что позволяет увеличить чувствительность и даже преодолеть теоретический предел Нернста [15–17] для биосенсоров этого типа. Кроме того, химическая модификация поверхности, например с помощью полиэлектролитов, может способствовать увеличению длины дебаевского экранирования (λ_D) [18–20]. Эта величина определяет толщину двойного электрического слоя [21, 22], внутри которого возможна регистрация биомаркеров, поскольку область вне двойного электрического слоя является проводящей и экранирует любой зарядовый/полевой отклик.

Целью данной работы является изучение единичных взаимодействий антиген–антитело на поверхности химически модифицированного кремния и выбор метода, оптимального для модификации кремниевых нанопроводов. В предыдущих работах нами были показаны преимущества модификации кремния сферическими наночастицами золота (НЧЗ) небольшого диаметра (5 нм), на которых ковалентно иммобилизовали фрагменты антител с использованием их тиоловых групп [7, 23]. Для характеристики способности иммобилизованных антител образовывать иммунные комплексы использовали метод цифровой регистрации единичных взаимодействий антиген–антитело. Ранее для характеристики единичных взаимодействий антиген–антитело было предложено использовать метод атомно-силовой микроскопии, что позволило охарактеризовать сенсорный слой по плотности и равномерности заполнения поверхности распознающими антителами [24]. В данной работе для регистрации иммунных комплексов использовался более быстрый метод сканирующей электронной микроскопии (СЭМ), а в качестве визуализирующей метки антител — НЧЗ диаметром 25 нм.

Задачами работы являлись оптимизация алгоритма математической обработки СЭМ-изображений для определения НЧЗ на поверхности носителя; сравнительное изучение различных методов химической модификации кремния с использованием силанов, бифункциональных реагентов и полиэлектролита для увеличения плотности и равномерности распределения иммобилизованных НЧЗ; выбор метода химической модификации, перспективного для создания высокочувствительных биосенсоров на основе полевых транзисторов с каналами-нанопроводами. В качестве модельного антигена использовали простат-специфический антиген (ПСА), который является биомаркером рака предстательной железы у мужчин.

1. ОПТИМИЗАЦИЯ АЛГОРИТМА МАТЕМАТИЧЕСКОЙ ОБРАБОТКИ СЭМ-ИЗОБРАЖЕНИЙ ДЛЯ ЦИФРОВОЙ РЕГИСТРАЦИИ ЕДИНИЧНЫХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ АНТИГЕН–АНТИТЕЛО

Схема изучения единичных взаимодействий антиген–антитело на поверхности кремниевых чипов представлена на рис. 1. Выявление антигена проводили в формате сэндвич-иммуноанализа, в котором моноклональные антитела одного типа иммобилизуются на поверхности кремния с иммобилизованными НЧЗ диаметром 5 нм [7], а антитела второго клона, меченые НЧЗ диаметром 25 нм, используются для выявления антигена на носителе. Для получения половинных фрагментов иммуноглобулинов G-типа, состоящих из одной тяжелой и одной легкой цепи, использовали 2-меркаптоэтиламин [25]. Данные фрагменты имеют свободные тиоловые группы для взаимодействия с НЧЗ на поверхности кремния. Сферические НЧЗ со средним диаметром 25 нм получали восстановлением золотохлористоводородной кислоты (ЗХВК) цитратом натрия [26], сферические НЧЗ со средним диаметром 5 нм — восстановлением ЗХВК боргидридом натрия в присутствии натриевой соли этилендиамина тетрауксусной кислоты (ЭДТА) [27].

Цифровую регистрацию НЧЗ диаметром 25 нм на поверхности кремниевых чипов проводили с использованием растрового сканирующего электронного микроскопа Supra-40 (Carl Zeiss) со встроенным в колонну микроскопа детектором вторичных электронов «InLens». Для подавления шумов при сохранении изображения использовали режим усреднения по линиям с коэффициентом 2, что обеспечило достаточно высокую скорость сканирования: время получения одного изображения составило 11 с. Количество НЧЗ в кадре подсчитывали с использованием программы Gwyddion. При определении количества регистрируемых единичных комплексов антиген–антитело полагали, что их число равно числу регистрируемых НЧЗ.

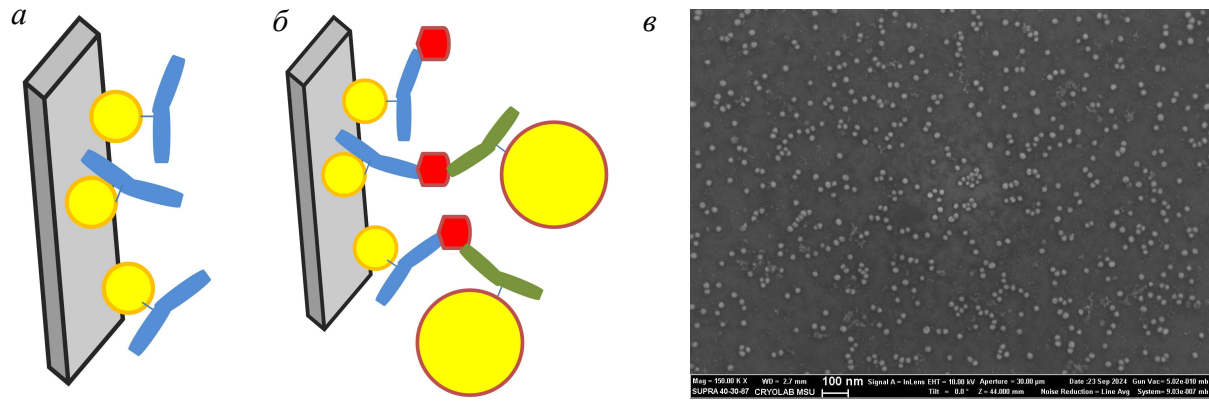


Рис. 1. Схема экспериментального изучения единичных взаимодействий антител с ПСА на поверхности кремния с использованием наночастиц золота диаметром 5 и 25 нм: *а* — антитела к ПСА иммобилизованы ковалентно на кремнии, модифицированном наночастицами золота диаметром 5 нм; *б* — схема визуализации иммунных комплексов ПСА с фрагментами антител с использованием конъюгата вторых антител к ПСА с наночастицами золота диаметром 25 нм; *в* — пример СЭМ-изображения поверхности кремния с иммунными комплексами, мечеными наночастицами золота

Применение для иммобилизации НЧЗ диаметром 5 нм с последующим выявлением иммунных комплексов с наночастицами большего диаметра создавало определенные трудности при обработке полученных изображений и подсчете частиц. В предварительных экспериментах было установлено, что, в зависимости от концентрации использованных антител, соотношение НЧЗ разного размера на поверхности изменяется. При этом для цифровой регистрации количества образовавшихся иммунных комплексов нужно определить только крупные наночастицы. Для количественной обработки СЭМ-изображений был разработан специальный алгоритм действий. После получения изображений сначала выделяли все объекты и определяли их размеры (латеральный размер и максимальную высоту). Затем строили зависимость максимальной высоты от латерального размера выделенных частиц (рис. 2). Из приведенной гистограммы видно, что

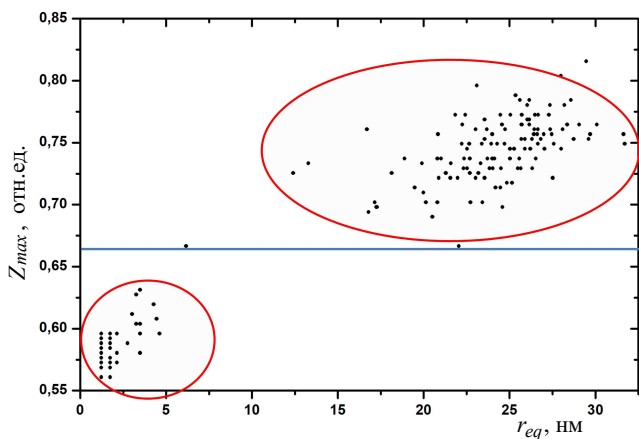


Рис. 2. Зависимость максимальной высоты от латерального размера наночастиц золота для определения оценочного порогового значения

все объекты разделились на две группы, соответствующие по размерам крупным и мелким частицам. Далее оценивали пороговое значение размера для выделения более крупных объектов и повторно выделяли объекты, размер которых превышает оценочное пороговое значение. По зависимости максимальной высоты от латерального размера выделенных частиц (рис. 3) определяли уточненное пороговое значение.

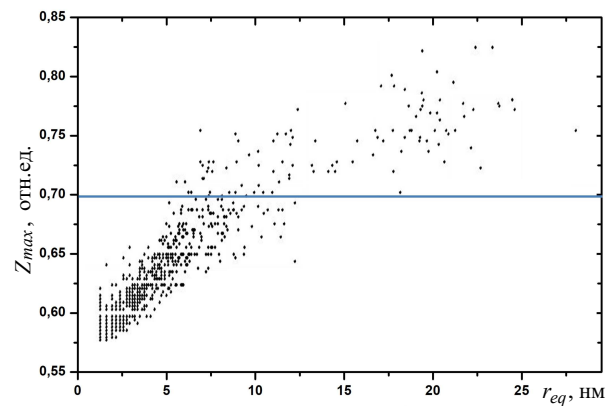


Рис. 3. Зависимость максимальной высоты от латерального размера выделенных частиц для определения уточненного порогового значения

Таким образом, был разработан алгоритм обработки СЭМ-изображений для цифровой регистрации количества НЧЗ диаметром 25 нм (рис. 4). Алгоритм включает в себя:

1. выделение всех объектов в кадре изображения (на рис. 4, *а* красным цветом выделены как крупные, так и мелкие НЧЗ);
2. определение оценочного порогового значения высоты, ниже которой объекты не учитываются;

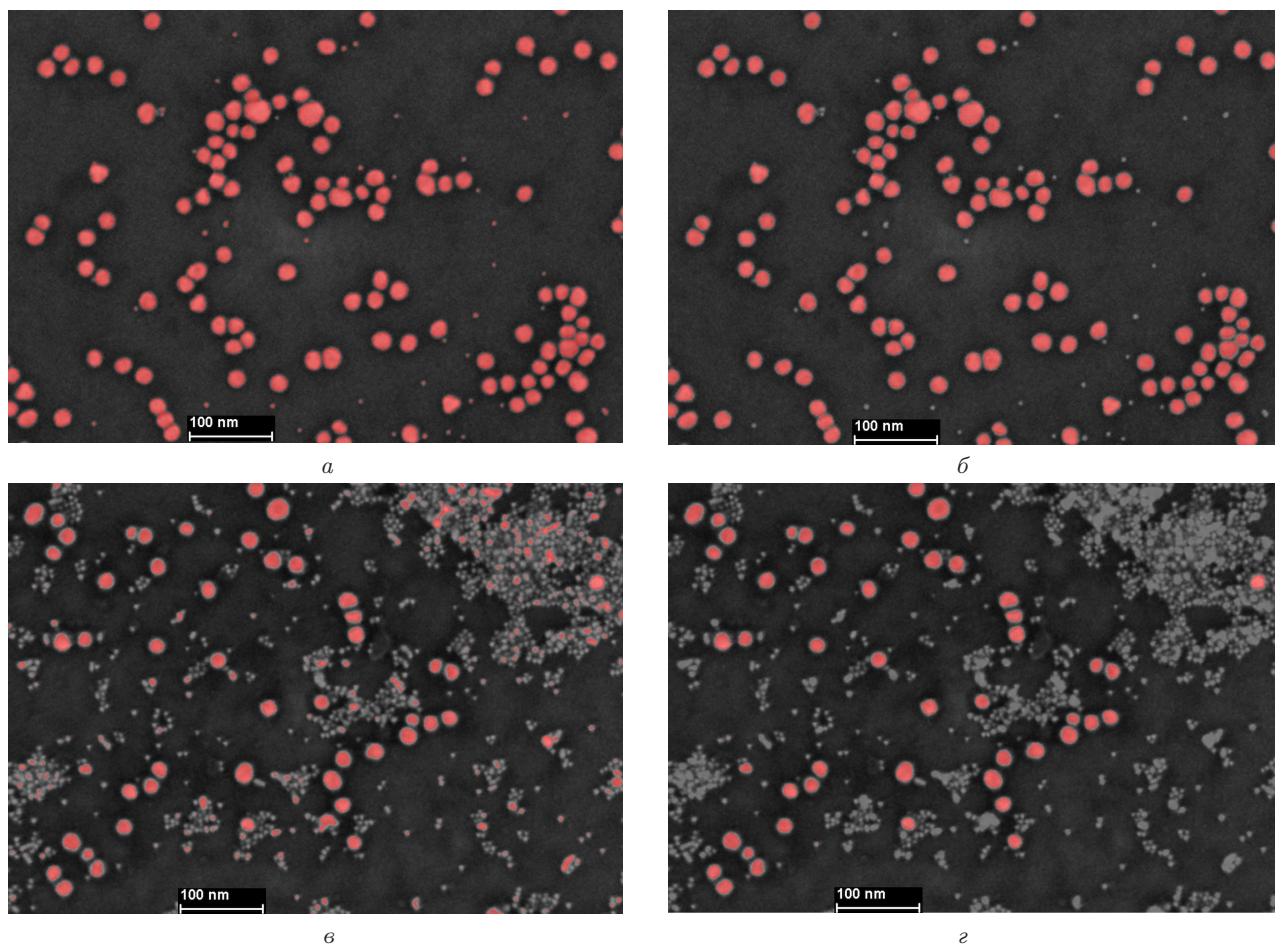


Рис. 4. СЭМ-изображения поверхности кремния с результатами выявления иммунных комплексов в процессе количественной обработки результатов анализа: *а* — выделение всех объектов, *б* — выделение объектов после определения порогового значения, *в* — выделение объектов после учета порогового значения, *г* — выделение объектов после удаления мешающих объектов

3. построение зависимости максимальной высоты от латерального размера выделенных НЧЗ;
4. выбор уточненного порогового значения для отсекания всех объектов небольшого размера, в том числе мелких НЧЗ (на рис. 4, *б* красным цветом выделены только крупные НЧЗ, мелкие НЧЗ размером ниже порогового значения исключены из рассмотрения);
5. выделение и подсчет НЧЗ диаметром 25 нм (рис. 4, *г*).

При обработке результатов полагали, что число образовавшихся иммунных комплексов будет равно числу НЧЗ за вычетом числа наночастиц, связавшихся неспецифично на контрольной зоне такой же площади с иммобилизованными антителами, неспецифичными к ПСА.

Для определения результатов образования единичных иммунных комплексов определяли количество НЧЗ диаметром 25 нм в кадре и затем определяли величину плотности частиц на 1 мкм^2 . Количество НЧЗ, наблюдаемых в кадре, зависело от увеличения электронного микроскопа и, соответственно, размера кадра. При большом размере кад-

ра получались более точные значения числа частиц, однако разрешение изображения с увеличением размера кадра падало, что уменьшало разрешение отдельных частиц. Поэтому были выбраны три различных увеличения, которые позволяли наиболее точно определить среднюю плотность посаженных частиц. При использовании увеличений 150 КХ, 75 КХ, 35 КХ площадь кадра, соответственно, составляла величину $2,8 \text{ мкм}^2$, $11,3 \text{ мкм}^2$, $52,0 \text{ мкм}^2$. Было определено, что оптимальным увеличением для подсчета частиц является увеличение 75 КХ, а для получения хорошей воспроизводимости (коэффициент вариации не более 10%) достаточно усреднить значения, рассчитанные для трех фрагментов одной зоны носителя.

2. ХИМИЧЕСКАЯ МОДИФИКАЦИЯ КРЕМНИЯ ДЛЯ КОВАЛЕНТНОЙ ИММОБИЛИЗАЦИИ СПЕЦИФИЧНЫХ АНТИТЕЛ

Для обеспечения ковалентной иммобилизации НЧЗ диаметром 5 нм в работе исследованы различ-

ные методы химической модификации кремниевых чипов, включающие использование силанов 3-глицидопропилтриметоксисилана (ГОПС) и 3-аминопропилтриэтоксисилана (АПТЭС), бифункциональных реагентов (меркаптоянтарной кислоты и меркаптоэтиламина) и модифицированного тиоловыми группами полиэтиленгликоля (ПЭГ). Для модификации кремния использовали два метода с ГОПС и три метода с АПТЭС. Исследованные методы химической модификации кремния включали:

1. двухстадийную модификацию с ГОПС и меркаптоэтиламиноном;
2. модификацию с использованием 3-меркаптопропилтриметоксисилана (ГОПС-SH);
3. двухстадийную модификацию с АПТЭС и меркаптоянтарной кислотой;
4. двухстадийную модификацию с АПТЭС и модифицированным полиэтиленгликолем СООН-ПЭГ-SH в присутствии карбодимида;
5. двухстадийную модификацию с АПТЭС и модифицированным полиэтиленгликолем СНО-ПЭГ-SH в присутствии боргидрида натрия. (табл. 1).

Во всех методах связывание ГОПС или АПТЭС с поверхностью кремния осуществлялось через силановые группы модифицирующего реагента, для связывания НЧЗ использовали силан с введенной тиоловой группой (метод 2), либо использовали дополнительные реагенты, имеющие тиоловые группы (методы 1, 3-5 с использованием меркаптоэтиламина, меркаптоянтарной кислоты, ПЭГ с SH-группами).

После химической модификации на поверхности кремния иммобилизовали НЧЗ диаметром 5 нм, а на них иммобилизовали фрагменты антител к ПСА. Для уменьшения неспецифической сорбции конъюгата антител с НЧЗ 25 нм поверхность наночастиц диаметром 5 нм обрабатывали цистеином. Далее последовательно инкубировали чипы в растворах с антигеном и конъюгатом антител с НЧЗ диаметром 25 нм и после отмывки проводили цифровую регистрацию иммунных комплексов методом СЭМ. Эффективность химической модификации кремния оценивали по нескольким параметрам: рассчитывали среднюю плотность НЧЗ диаметрами 5 и 25 нм, определяли наличие неравномерности в распределении наночастиц на поверхности, их локальную агломерацию, а также величину неспецифического связывания.

3. СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ ЦИФРОВОЙ СЭМ-РЕГИСТРАЦИИ ИММУННЫХ КОМПЛЕКСОВ НА МОДИФИЦИРОВАННОМ КРЕМНИИ

При обработке результатов взаимодействий ПСА с антителами на поверхности кремния определяли плотности иммобилизованных наночастиц диаметром 5 нм и наночастиц диаметром 25 нм, использованных в качестве метки иммунных комплексов на носителе. Полученные результаты представлены на рис. 5. Все использованные методы модификации можно разбить на несколько групп:

- а) методы, характеризующиеся большим количеством иммобилизованных на кремнии мелких НЧЗ диаметром 5 нм (методы 5, 4, 3);
- б) методы, характеризующиеся большим количеством НЧЗ диаметром 25 нм в составе иммунных комплексов (методы 2, 1, 5).

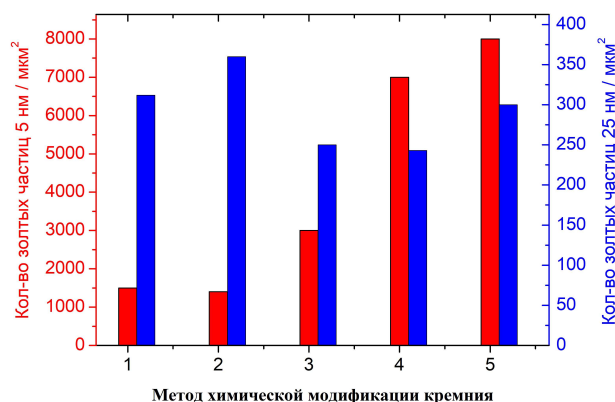
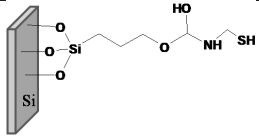
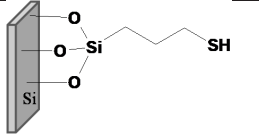
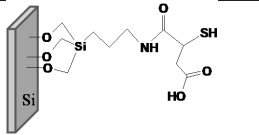
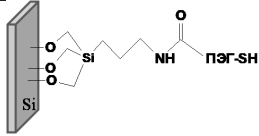
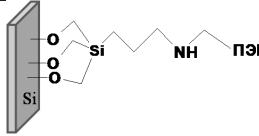


Рис. 5. Зависимость плотности наночастиц золота, регистрируемых на кремнии, от способа иммобилизации. Синий цвет — плотность наночастиц диаметром 25 нм, красный цвет — плотность наночастиц диаметром 5 нм

Для разработки высокочувствительных биосенсоров на основе полевых транзисторов с каналом-нанопроводом принципиальное значение имеет обеспечение высокой плотности иммунных комплексов на поверхности носителя. Полученные результаты показывают, что методы модификации кремния с использованием АПТЭС и бифункциональных реагентов характеризовались максимальным количеством иммобилизованных небольших НЧЗ. Однако количество образовавшихся иммунных комплексов на кремнии, модифицированном данными методами, было небольшим, за исключением метода 5, из чего можно заключить, что только небольшая часть антител была способна взаимодействовать с антигеном. При этом методы модификации с использованием ГОПС (методы 1, 2) обеспечивали хорошую плотность выявляемых НЧЗ диаметром 25 нм и, соответственно, количество образовавшихся иммунных комплексов.

Таблица 1. Методы химической модификации поверхности кремния, исследованные в работе

Метод химической модификации	Схема модификации
1 ГОПС с меркаптоэтиламином	
2 ГОПС-SH	
3 АПТЭС с меркаптоянтарной кислотой	
4 АПТЭС с COOH-ПЭГ-SH	
5 АПТЭС с CON-ПЭГ-SH	

Анализ всех исследованных методов химической модификации кремния показывает, что не всегда большое число иммобилизованных мелких НЧЗ позволяет получить большое число молекул антител с доступными активными центрами для взаимодействия с антигеном. Важным фактором является равномерность распределения наночастиц на поверхности и отсутствие их конгломератов. Максимальной плотностью иммунных комплексов на поверхности кремния характеризовались методы модификации кремния с использованием ГОПС-SH (метод 2) и ГОПС с меркаптоэтиламином (метод 1). Для оценки применимости выбранных методов модификации кремния для определения ПСА в формате сэндвич-иммуноанализа были получены концентрационные зависимости определения ПСА в буферном растворе. Для этого были изготовлены кремниевые чипы, модифицированные ГОПС-SH и ГОПС с меркаптоэтиламином. Далее на кремнии были иммобилизованы НЧЗ диаметром 5 нм и на них — фрагменты антител к ПСА. После взаимодействия антител на кремнии, модифицированном НЧЗ диаметром 5 нм, со стандартными растворами ПСА с разной концентрацией и инкубацией с раствором конъюгата антител с НЧЗ диаметром 25 нм были определены значения плотности наночастиц на носителе методом СЭМ. Полученные концентрационные зависимости представлены на рис. 6.

Выбранные методы модификации кремния позволили получить концентрационные зависимости в широком диапазоне концентраций ПСА от 1 до

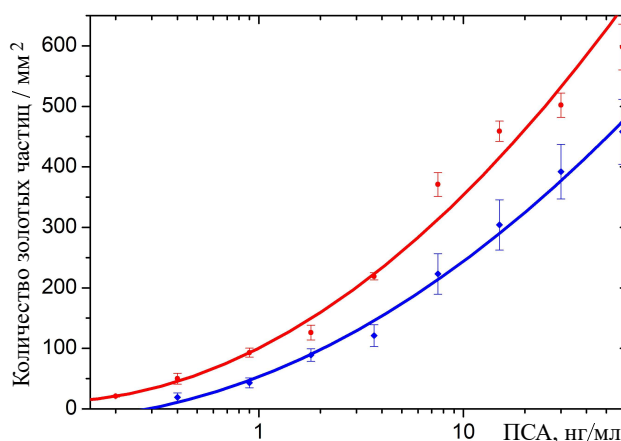


Рис. 6. Концентрационные зависимости определения простат-специфического антигена на кремниевых чипах: красная кривая — фрагменты антител к ПСА иммобилизованы на кремнии, модифицированном ГОПС-SH через наночастицы золота диаметром 5 нм; синяя кривая — фрагменты антител к ПСА иммобилизованы на кремнии, модифицированном ГОПС и меркаптоэтиламином через наночастицы золота диаметром 5 нм

100 нг/мл, что составляет два порядка величины. Предел обнаружения ПСА составил 0.8 нг/мл для метода модификации 1 и 0.3 нг/мл для метода модификации 2.

4. ОПРЕДЕЛЕНИЕ рН-ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ ПОЛЕВЫХ ТРАНЗИСТОРОВ С КАНАЛАМИ, ХИМИЧЕСКИ МОДИФИЦИРОВАННЫМИ ДВУМЯ РАЗЛИЧНЫМИ МЕТОДАМИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ГОПС

Для оценки применимости двух выбранных методов химической модификации кремния на основе ГОПС было проведено сравнительное изучение рН-чувствительности биосенсоров, каналы которых были модифицированы с использованием этих методов. Для изготовления экспериментальных структур транзисторов использовались стандартные пластины КНИ фирмы Soitec, созданные по технологии UNIBOND® с толщиной верхнего слоя кремния 110 нм и изолирующего промежуточного слоя термического оксида SiO₂ 200 нм. Толщина поддерживающей кремниевой подложки составляла 750 мкм. Ориентация кремния — $\langle 100 \rangle$, легирование — *p*-типа/бор, удельное сопротивление — 8.5–11.5 Ом·см. Процесс изготовления экспериментальных образцов проводился с использованием как оптической, так и электронной литографии. Электронная литография применялась при формировании элементов наноструктуры транзистора и близлежащих областей, оптическая — для формирования контактных площадок и диэлектрических слоев. Все этапы были подробно описаны в предыдущих работах [20, 22, 28], ниже кратко перечислены основные этапы.

На первом этапе на поверхности кремниевого слоя пластины КНИ с помощью электронной литографии вакуумного напыления алюминия формировалась маска для последующего переноса рисунка структуры в кремниевый слой. Незакрытые маской участки кремниевого слоя удалялись до нижележащего слоя SiO₂ с помощью анизотропного реактивно ионного травления (РИТ) во фторсодержащей плазме. Затем происходило увеличение толщины диэлектрика на всей поверхности образца, за исключением центральной его части для дополнительной изоляции металлических контактных площадок от проводящей кремниевой подложки, для минимизации паразитных токов утечки между транспортными контактами образца и управляющим затвором-подложкой. Утолщение производилось двумя последовательными напылениями слоев SiO₂ толщиной по 200 нм на поверхность образца, за исключением центральных областей размером ~ 150 мкм². На следующем этапе происходило изготовление контактных площадок к кремниевому слою: в центральной части чипа размером ~ 100 мкм² с помощью электронной литографии экспонировался рисунок контактных площадок, а на больших площадях применялась оптическая литография через специально изготовленные кварцевые шаблоны. В качестве материала использовались металлические пленки из титана, нанесенного методом

магнетронного напыления. Изготовленный образец (рис. 7) вклеивался в специальный керамический держатель, контакты которого соединялись с помощью ультразвуковой пайки тонкой алюминиевой проволокой (~ 25 мкм) с незакрытыми диэлектриком участками контактных площадок на чипе. Изоляция открытых проводов и контактов от жидкостной среды проводилась с помощью силиконового герметика. Рабочие области оставались незакрытыми.

Сигналы откликов нанопроводов измерялись в режиме реального времени путем помещения аликвоты 0.1 М фосфатного буферного раствора с разным значением рН объемом 50–100 мкл на открытую поверхность чипа (рис. 7, б). В этот раствор погружался AgCl электрод сравнения, который одновременно служил дополнительным затвором транзистора и использовался для подстройки его рабочей точки. Измерения проводились при низких транспортных токах транзисторов и малых напряжениях смещения, что исключало нагрев нанопровода и обеспечивало его максимальную чувствительность, которая обычно реализуется в подпороговой области полевого транзистора [17].

Для измерения чувствительности нанопровода к изменениям рН устанавливалась оптимальная рабочая точка транзистора: $V_{sd} = 100$ мВ, $V_g = 5 - 6$ В, $V_{ref} = 450 - 600$ мВ. Чувствительность к рН определялась как dV_{ref}/dpH .

На рис. 8, а, б представлены полученные зависимости токовых откликов транзисторов с кремниевыми нанопроводами, модифицированными двумя методами с использованием ГОПС с иммобилизованными фрагментами антител к ПСА, от значения рН буферного раствора. При тестировании нанопровода, модифицированного ГОПС и меркаптоэтиламином, в буферном растворе с рН = 7.0 напряжение на электроде сравнения в начальный момент времени составляло $V_{ref} = 450$ мВ (рис. 8, а). Начальный уровень тока транзистора был равен величине ~ 7.3 нА, напряжение на электроде сравнения составляло 450 мВ. При уменьшении рН буферного раствора до значения 4.5 ток через транзистор возрастал до уровня ~ 15.6 нА, а напряжение на электроде сравнения понижалось до значения $V_{ref} = 300$ мВ. Таким образом, изменение рН буферного раствора на величину в 2.5 единицы соответствовало изменению напряжения на электроде сравнения на 150 мВ, что соответствует величине чувствительности нанопровода к рН — 60 мВ/рН.

Аналогичные измерения были проведены для транзистора с нанопроводом, модифицированным ГОПС-SH и НЧЗ с иммобилизованными фрагментами антител (рис. 8, б). При изменении рН буферного раствора от 7.0 до 5.0 (на 2 единицы величины) напряжение на электроде сравнения изменилось на 140 мВ, что соответствует величине чувствительности нанопровода к рН, равной 70 мВ/рН.

Таким образом, метод модификации кремния с использованием ГОПС-SH является более чувствительным в отношении регистрации протонов

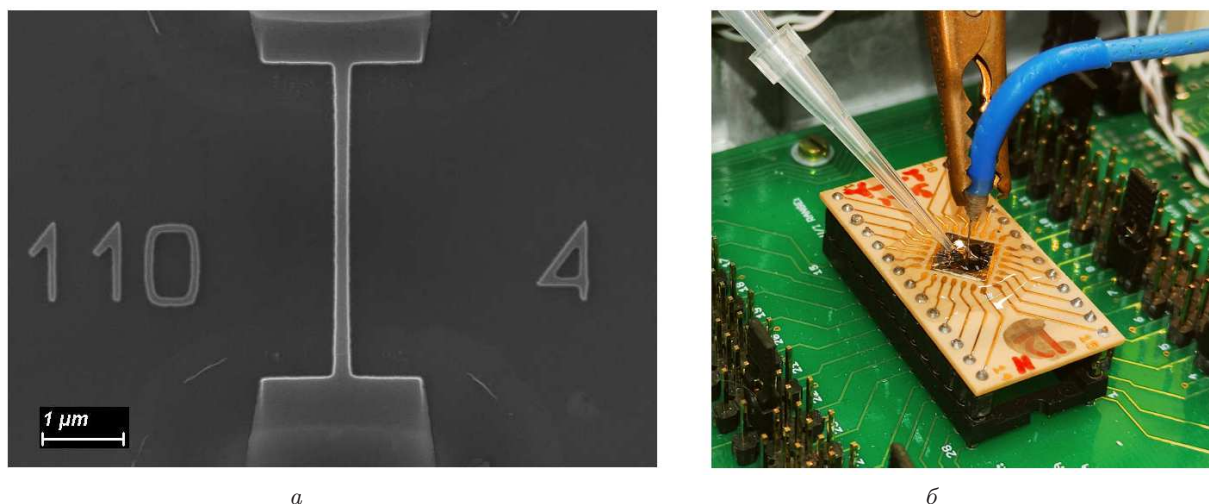


Рис. 7. Изображение в электронном микроскопе изготовленного нанопровода (а) и фотография измерительной ячейки (б)

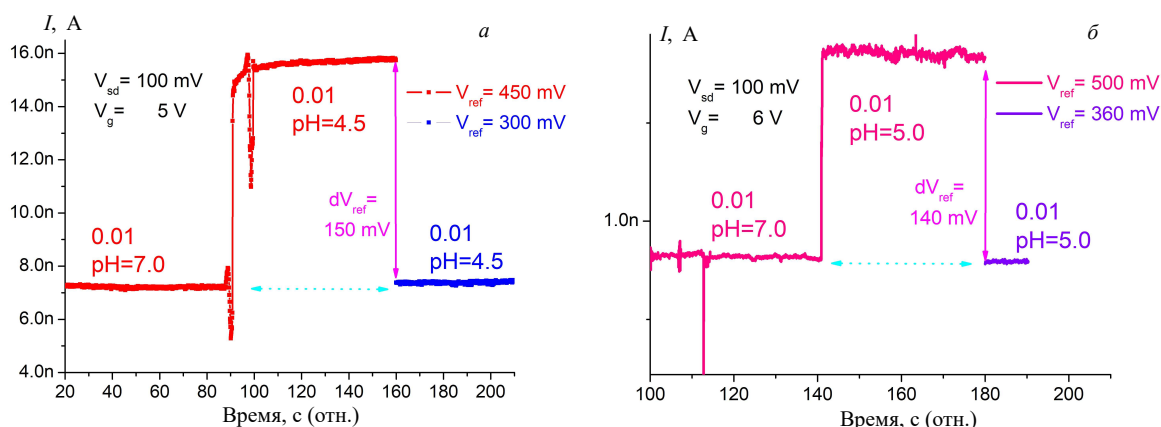


Рис. 8. Зависимость токового отклика полевого транзистора с каналом-нанопроводом от значения pH буферного раствора: а — нанопровод на основе кремния, модифицированного ГОПС и меркаптоэтиламиноом, золотыми наночастицами и фрагментами антител к ПСА, б — нанопровод на основе кремния, модифицированного ГОПС-SH, золотыми наночастицами и фрагментами антител к ПСА

и перспективным для использования в биосенсорах на основе полевых транзисторов с каналом-нанопроводом.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Применение биосенсоров в клинической медицине для персонализированной ранней диагностики различных патологий требует высокой чувствительности определения биомаркеров при обеспечении высокой надежности и воспроизводимости результатов измерений. Для создания новых подходов повышения чувствительности иммуносенсоров на основе транзисторов с каналом-нанопроводом проведено изучение различных методов химической модификации поверхности кремния с использованием силанов, бифункциональных реагентов и полимеров для ковалентной иммобилизации

наночастиц золота. Для регистрации результатов единичных взаимодействий антиген-антитело на поверхности кремниевых нанопроводов использован анализ СЭМ-изображений сэндвич-иммунокомплексов, меченных НЧЗ диаметром 25 нм, что позволило повысить специфичность их определения по сравнению с методом атомно-силовой микроскопии.

Метод СЭМ впервые применен для цифровой регистрации индивидуальных взаимодействий антиген-антитело на поверхности кремния с использованием наночастиц золота в качестве метки. Особенностью данного исследования является одновременное использование НЧЗ для двух целей: частиц диаметром 5 нм для иммобилизации фрагментов специфичных антител в качестве распознающих элементов биосенсора и частиц диаметром 25 нм в качестве метки иммунных комплексов. Разрешающая способность электронного микроскопа составляет величину порядка 1 нм, что позволило

надежно регистрировать сферические НЧЗ разного диаметра на поверхности кремния и различать наночастицы диаметром 5 и 25 нм и реализовать качественно новые возможности СЭМ для изучения механизмов единичных взаимодействий. В процессе работы предложен специальный алгоритм расчетов для определения плотности наночастиц на поверхности носителя.

Оптимизация метода химической модификации кремния с использованием силанов и мембраноподобных соединений позволила обеспечить высокую плотность размещения наночастиц при сохранении активности и доступности антител для взаимодействия с антигеном. Показано, что модификация кремниевой поверхности с ГОПС позволяет определить ПСА — биомаркер опухолей предстательной железы с низким пределом обнаружения. Методы химической модификации поверхности кремниевого нанопровода с ГОПС были использованы в тех-

нологии изготовления полевых транзисторов с каналом-нанопроводом и определения их рН-чувствительности. Метод модификации кремния с ГОПС-SH характеризуется максимальным значением рН-чувствительности 70 мВ/рН и является перспективным для создания высокочувствительных биосенсоров для определения биомаркеров. Использование методов, обеспечивающих ковалентную иммобилизацию наночастиц на кремниевом нанопроводе и ковалентную иммобилизацию антител на поверхности наночастиц, позволяет создавать биосенсоры, пригодные для многоразового использования.

Работа выполнена при поддержке Программы развития МГУ (проект № 24-Ш06-07). В работе использовалось оборудование Учебно-методического центра литографии и микроскопии МГУ им. М.В. Ломоносова.

- [1] *Sadighbayan D., Hasanzadeh M., Ghafar-Zadeh E.* // *Trends in Analytical Chemistry*. **133**. 116067 (2020).
- [2] *Salfi J., Savelyev I.G., Blumin M.* et al. // *Nat. Nanotech.* **5**. 737 (2010).
- [3] *Clement N., Nishiguchi K., Dufreche J.F.* et al. // *Appl. Phys. Lett.* **98**. 014104 (2011).
- [4] *Wang Z., Lee S., Koo K.-i., Kim K.* // *IEEE Trans. NanoBioscience*. **15**. 186 (2016).
- [5] *Panahi A., Sadighbayan D., Forouhi S., Ghafar-Zadeh E.* // *Biosensors*. **11**. 103 (2021).
- [6] *Malsagova K.A., Ivanov Yu.D., Pleshakova T.O.* et al. // *Analytical Methods*. **7**. 8078 (2015).
- [7] *Presnova G., Presnov D., Krupenin V.* et al. // *Biosensors and Bioelectronics*. **88**. 283 (2017).
- [8] *Zhao W., Hu J., Liu J.* et al. // *Microsyst. Nanoeng.* **8**. 57 (2022).
- [9] *Seo G., Lee G., Kim M.J.* et al. // *ACS Nano*. **14**. 5135 (2020).
- [10] *Kim K., Park C., Kwon D.* et al. // *Biosensors and Bioelectronics*. **77**. 695 (2016).
- [11] *Espinosa F.M., Uhlig M.R., Garcia R.* // *Micromachines*. **13**. 97 (2022).
- [12] *Hu Q., Chen S., Solomon P., Zhang Z.* // *Science Advances*. **7**. eabj6711 (2021).
- [13] *Wasfi A., Awwad F., Gelovani J.G.* et al. // *Nanomaterials*. **12**. 2638 (2022).
- [14] *Abidin W.A.B.Z., Nor N.M.M., Arshad M.K.M.* et al. // *Current Nanoscience*. **18**. 139 (2022).
- [15] *Zafar S., D'Emic C., Jagtiani A.* et al. // *ACS Nano*. **12**. 6577 (2018).
- [16] *Kesler V., Murmann B., Soh H.T.* // *Nano*. **14**. 16194 (2020).
- [17] *Presnov D.E., Bozhev I.V., Miakonkikh A.V.* et al. // *J. Appl. Phys.* **123**. 054503 (2018).
- [18] *Gao N., Zhou W., Jiang X.* et al. // *Nano Lett.* **15**. 2143 (2015).
- [19] *Kesler V., Boris Murmann B., Soh H.T.* // *ACS Nano*. **14**, N 12. 16194 (2020).
- [20] *Li J., Zhang Y., To S.* et al. // *ACS Nano*. **5**. 6661 (2011).
- [21] *Presnova G.V., Presnov D.E., Ulyashova M.M.* et al. // *Polymers*. **16**, N 3. 332 (2024).
- [22] *Stern E., Wagner R., Sigworth R.J.* et al. // *Nano Lett.* **7**. 3405 (2007).
- [23] *Presnova G.V., Tcinyaykin I.I., Bozhev I.V.* et al. // *Proceedings of SPIE*. **11022**. 110220Z (2019).
- [24] *Archakov A.I., Ivanov Yu.D., Lisitsa A.V., Zgoda V.G.* // *Proteomics*. **7**. 4 (2007).
- [25] *Karyakin A.A., Presnova G.V., Rubtsova M.Yu., Egorov A.M.* // *Anal. Chem.* **72**. 3805 (2000).
- [26] *Frens G.* // *Nature Physical Science*. **241**. 20 (1973).
- [27] *Bogatyrev V.A., Dykman L.A., Schegolev S.Yu.* Patent **2013374** Russian Federation. (1994).
- [28] *Циняйкин И.И., Преснова Г.В., Божьев И.В.* и др. *Вестн. Моск. ун-та. Физ. Астрон.* № 6, 106. (20220). (*Tsiniyaikin I.I., Presnova G.V., Bozhev I.V.* et al. // *Moscow Univ. Phys. Bull.* **75**, N 6, 645 (2020)).

Study of single antigen-antibody interactions on the silicon surface in biosensors based on field-effect transistors with a nanowire channel

D.E. Presnov^{1,a}, G.V. Presnova², I.I. Tsinyaikin¹, G.V. Nibudin¹, O.V. Snigirev¹, A.S. Trifonov¹, M.M. Ulyashova², V.A. Krupenin¹, M.Yu. Rubtsova^{2,b}

¹*Cryoelectronics laboratory, Faculty of Physics, Lomonosov Moscow State University Moscow 119991, Russia*

²*Enzymology Division, Faculty of Chemistry, Lomonosov Moscow State University Moscow 119991, Russia*

E-mail: ^a denis.presnov@physics.msu.ru, ^b myr@enz.chem.msu.ru

Here we report a study of single interactions of antibodies with prostate-specific antigen (PSA) on the surface of pure silicon modified with 5 nm gold nanoparticles to create highly sensitive biosensors based on field-effect transistors with a silicon nanowire channel (FET). The method of digital registration of immune complexes by the scanning electron microscopy technique with gold nanoparticles 25 nm in diameter as a visualizing label of antibodies was used. A special algorithm was developed to calculate the density of nanoparticles on the silicon surface. To study the covalent immobilization of antibodies, different methods of chemical modification of silicon using (3-glycidoxypyltrimethoxysilane (GOPS), 3-mercaptopropyltrimethoxysilane (GOPS-SH), and 3-aminopropyltriethoxysilane (APTES), bifunctional reagents and polyethyleneglycol were used. It was shown that chemical modification methods using GOPS are characterized by a lower detection limit of PSA, a biomarker of prostate tumors. The structures of biosensors based on field-effect transistors with nanowires channels, with surfaces, modified by two different methods using GOPS, were fabricated, and their sensitivity to pH was studied. It was shown that the modification method using GOPS-SH is characterized by a maximum pH sensitivity of 70 mV/pH and is the most promising for the creation of highly sensitive biosensors for determination of biomarkers.

PACS: 87.85.fk, 62.23.Hj, 81.07.Gf, 85.30.Tv, 81.16.Nd, 82.47.Rs, 87.14.Lk.

Keywords: biosensor, Scanning Electron Microscopy, field-effect transistors, silicon nanowire, gold nanoparticles, immune complexes, digital registration.

Received 19 October 2024.

English version: *Moscow University Physics Bulletin.* 2025. **80**, No. . Pp. .

Сведения об авторах

1. Преснов Денис Евгеньевич — канд. физ.-мат. наук, ст. науч. сотрудник; тел.: (495) 939-30-14, e-mail: denis.presnov@physics.msu.ru.
2. Преснова Галина Васильевна — канд. хим. наук, ст. науч. сотрудник; тел.: (495) 939-29-68, e-mail: gkovba@enzyme.chem.msu.ru.
3. Циняйкин Илья Иванович — мл. науч. сотрудник; тел.: (495) 939-39-88, e-mail: ii.tcinyaykin@physics.msu.ru.
4. Нибудин Глеб Витальевич — студент, тел.: (495) 939-33-43, e-mail: nibudin.gv21@physics.msu.ru.
5. Снигирев Олег Васильевич — доктор физ.-мат. наук, профессор, зав. кафедрой; тел.: (495) 939-59-34, e-mail: oleg.snigirev@phys.msu.ru.
6. Трифонов Артем Сергеевич — канд. физ.-мат. наук, ст. науч. сотрудник; тел.: (495) 939-30-14, e-mail: trifonov.artem@physics.msu.ru.
7. Уляшова Мария Морисовна — канд. хим. наук, науч. сотрудник; тел.: (495) 939-29-68, e-mail: mmu@enzyme.chem.msu.ru.
8. Крупенин Владимир Александрович — доктор физ.-мат. наук, вед. науч. сотрудник; тел.: (495) 939-30-14, e-mail: krupenin@physics.msu.ru.
9. Рубцова Майя Юрьевна — канд. хим. наук, вед. науч. сотрудник; тел.: (495) 939-27-27, e-mail: myr@enz.chem.msu.ru.