

Иванов Ю.Д.^{1,3}, Мальсагова К.А.¹, Плешакова Т.О.¹, Шумов И.Д.¹, Кайшева А.Л.¹,
Попов В.П.², Наумова О.В.², Фомин Б.И.², Насимов Д.А.², Латышев А.В.²,
Асеев А.Л.², Татур В.Ю.³, Иванова Н.Д.⁴, Коновалова Г.М.⁵, Арчаков А.И.¹

Регистрация белка в сыворотке крови с помощью биосенсора на базе полевого нанотранзистора

- ¹ — Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Институт биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича», Москва
² — ФГБУН «Институт физики полупроводников им. А.В. Ржанова» Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск
³ — Общество с ограниченной ответственностью «ЦАМАКС», Москва
⁴ — Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии — МВА им. К.И. Скрябина, Москва
⁵ — Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования Сочинский государственный университет, Сочи

Разработан метод детекции белка *D-NFATc1*, связанного с онкологическими заболеваниями, в сыворотке крови с помощью нанопроводного биосенсора (НПБ) на основе полевых нанотранзисторов. Полевой нанотранзистор был создан на базе структур «кремний-на-изоляторе». Для биоспецифической детекции определяемого белка поверхность нанопроволок (НП) была модифицирована аптамерами против определяемого белка. Использование НП с шириной 3 мкм позволило получить стабильные сток-затворные характеристики (СЗХ) и зарегистрировать *D-NFATc1* в сыворотке крови при концентрации $2,5 \times 10^{-14}$ М в режиме измерения СЗХ. Сбор данных в режиме снятия СЗХ НП производился с помощью высокоскоростной системы сбора данных под управлением ПО ТУРБО НБС.

Ключевые слова: полевой транзистор; детекция белка; биосенсор

Для цитирования: Иванов Ю.Д., Мальсагова К.А., Плешакова Т.О., Шумов И.Д., Кайшева А.Л., Попов В.П., Наумова О.В., Фомин Б.И., Насимов Д.А., Латышев А.В., Асеев А.Л., Татур В.Ю., Иванова Н.Д., Коновалова Г.М., Арчаков А.И. Регистрация белка в сыворотке крови с помощью биосенсора на базе полевого нанотранзистора. Патологическая физиология и экспериментальная терапия. 2016; 60(1): 94–98.

Работа была выполнена при поддержке ФЦП «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2014–2020 годы» (соглашение № 14.576.21.0074, уникальный идентификатор проекта — RFMEFI57614X0074).

Ivanov Yu.D.^{1,3}, Malsagova K.A.¹, Pleshakova T.O.¹, Shumov I.D.¹, Kaysheva A.L.¹,
Popov V.P.², Naumova O.V.², Fomin B.I.², Nasimov D.A.², Latyshev A.V.²,
Aseev A.L.², Tatur V.Yu.³, Ivanova N.D.⁴, Konovalova G.M.⁵, Archakov A.I.¹

Registration of the protein in the serum with a field-effect nanotransistor biosensor

- ¹ — Institute of Biomedical Chemistry, Moscow, Russia
² — Institute of Semiconductor Physics, SB RAS, Novosibirsk, Russia
³ — TSAMAX Ltd., Moscow, Russia
⁴ — Skryabin Moscow State Academy of Veterinary Medicine and Biotechnology, Moscow, Russia
⁵ — Sochi State University, Sochi, Russia

A method for detection of cancer-associated protein *D-NFATc1* in serum using nanowire (NW) biosensor based on field-effect nanotransistor is developed. Field-effect nanotransistor was fabricated on the basis of «silicon-on-insulator» structures. For the biospecific detection of target protein, the NW surface was modified with aptamers against the target protein. Using the 3 μm-NW enabled to obtain stable source-drain characteristics and to register *D-NFATc1* in serum at concentration of 2.5×10^{-14} M in the mode of drain-source current vs. gate voltage characteristics measurements. Data collection in the mode of drain-source current vs. gate voltage characteristics measurements was carried out with the use of high-speed data collection system running TURBO NBS software.

Keywords: the field transistor; detection of albumen; biologysensor

For citation: Ivanov Yu.D., Malsagova K.A., Pleshakova T.O., Shumov I.D., Kaysheva A.L., Popov V.P., Naumova O.V., Fomin B.I., Nasimov D.A., Latyshev A.V., Aseev A.L., Tatur V.Yu., Ivanova N.D.,

Konovalova G.M., Archakov A.I. Registration of the protein in the serum with a field-effect nanotransistor biosensor. *Patologicheskaya fiziologiya i eksperimentalnaya terapiya*. 2016; 60(1): 94–98. (in Russian)

For correspondence: Ivanov Yu.D., e-mail: yurii.ivanov@rambler.ru

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Funding. The study had no sponsorship.

Актуальность разработки быстродействующих высокочувствительных биосенсоров нового поколения обусловлена необходимостью обнаружения белковых маркеров заболеваний человека в биологических жидкостях при сверхнизких концентрациях ($<10^{-13}$ М), когда патологический процесс находится на ранней стадии развития [1]. Одним из основных факторов, определяющих высокую чувствительность новых диагностических устройств, является использование миниатюрных сенсорных элементов, размеры которых соизмеримы с размерами молекул определяемых белков [2]. К такому типу устройств относятся нанопроводные биосенсоры (НПБ) на базе полевых нанотранзисторов, позволяющие детектировать белки не только с высокой чувствительностью, но и с высоким быстродействием без использования дополнительных меток [3, 4]. Теоретический предел чувствительности НПБ находится на уровне единичных молекул [5].

Специфичность анализа с помощью НПБ достигается за счет использования молекул-зондов, иммобилизованных на поверхность нанопровода (НП). Как правило, в качестве молекул-зондов используются антитела, например [6, 7], или аптамеры [8, 9]. Предпочтительность использования аптамеров (синтетических олигонуклеотидных структур) обусловлена их стабильностью в условиях хранения и анализа, а также низкой стоимостью аптамеров по сравнению с антителами. Ранее нами было экспериментально показано, что белок может быть обнаружен в буферном растворе при концентрации 10^{-15} М с помощью апта-сенсора на основе КНИ-структур [8, 9]. В производстве НП на базе КНИ используется стандартная КМОП-технология, что в перспективе может стать одним из определяющих факторов при серийном производстве НПБ для нужд медицинской диагностики.

Цель исследования — разработка высокочувствительных НПБ с высоким быстродействием (порядка 1 мс на измерение) для детекции белков в сыворотке крови по СЗХ. Поскольку надежность результатов анализа при помощи НПБ в многокомпонентном растворе зависит не только от стабильности молекул-зондов, но и от стабильности свойств самого НП сенсора в биологической жидкости. В настоящей работе были использованы НП сенсоры с шириной 3 мкм, позволяющие получить стабильный сигнал СЗХ при определении белка в сыворотке крови. НПБ включает в себя систему сбора данных (ССД) на базе пикоамперметров под управлением ПО

ТУРБО НБС (Per. № 2015612969 от 27.02.2015 г.). Высокое быстродействие необходимо при массовом скрининге пациентов. Высокое быстродействие нанопроволочного молекулярного детектора (НПБ) было достигнуто за счет использования ПО ТУРБО НБС.

В проведенных нами экспериментах наблюдалась хорошая стабильность СЗХ НП, что позволило использовать его для регистрации белка в сыворотке в реальном времени с высокой чувствительностью и высоким быстродействием. Высокое быстродействие НПБ под управлением ПО ТУРБО НБС достигнуто благодаря тому, что обращение к считывающим сигнал пикоамперметрам осуществляется с помощью стандартных команд SCPI, минуя дополнительные программные оболочки. Также снижается число обращений к прибору за счет предварительного накопления данных в буфере обмена пикоамперметра. Определяемым белком, так же как и в [8, 9], является белок D-NFATc1 — ДНК-связывающий домен ядерного фактора активированных Т-клеток, кодируемый геном в составе 18 хромосомы человека. Необходимость обнаружения этого белка в сыворотке крови обусловлена его диагностическим значением: D-NFATc1 является транскрипционным фактором, экспрессия которого повышается в раковых клетках [10]. Результаты исследований показали, что НПБ позволяет обнаружить D-NFATc1 в сыворотке крови при концентрации $2,5 \times 10^{-14}$ М.

Методика

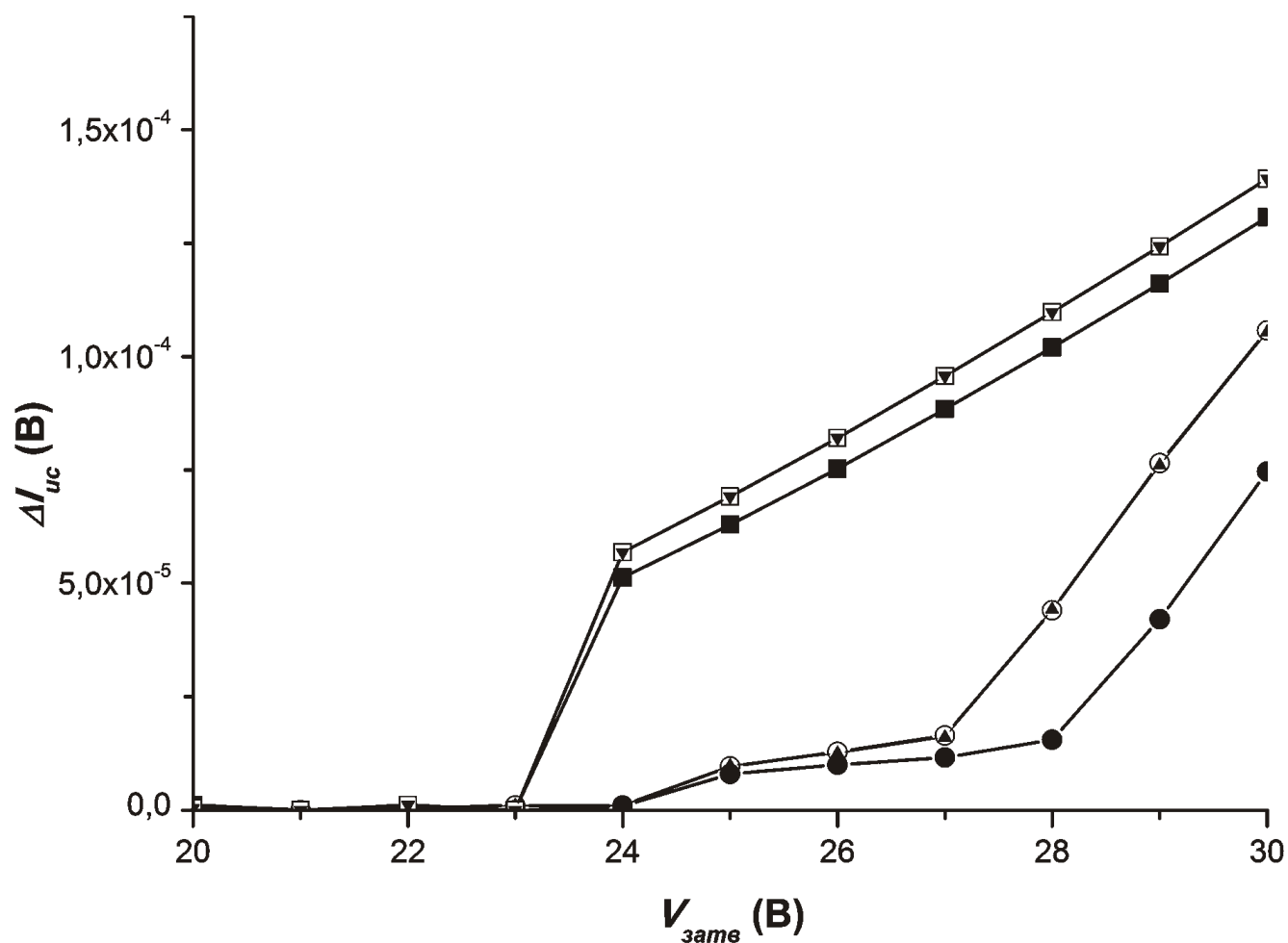
Дитиобис (сукцинимидил пропонат) (DSP) был получен из Pierce (США). Дигидрофосфат калия ($\text{K}_2\text{H}_2\text{P}_2\text{O}_7$), диметилсульфоксид (DMSO) и 3-аминопропилтриэтоксисилан (APTES) были получены из Sigma-Aldrich (США). Метанол (CH_3OH) был получен из Sigma (США). Пероксид водорода (H_2O_2 , 30% водный раствор), гидроксид калия (KOH) и плавиковая кислота (HF) были получены из Реахим (Россия). Деионизованная вода была получена при помощи системы очистки Milli-Q (Millipore, США).

ДНК-связывающий фрагмент ядерного фактора активированных Т-клеток (D-NFATc1) был любезно предоставлен А.Ю. Рубиной (ИМБ РАН, Москва).

Изготовление НП сенсоров. Конструкция и характеристики НП сенсоров подробно описаны в [7]. Коротко: использованы КНИ-структуры с n-типом проводимости. Толщина отсеченного слоя Si составляла 32 нм, скрытого окисла (buried oxide, BOX) — 300 нм. Ширина НП составляла 3 мкм, толщина 32 нм, длина 10 мкм, число НП на кристалле 12. Схема НПБ детально описана в [7, 8].

Модификация поверхности НП. Поверхность НП сенсоров была обработана по процедуре, подробно описанной нами ранее [7, 8]. Олигонуклеотиды против D-NFATc1 были ковалентно иммобилизованы на силанизированную поверхность рабочих НП с использованием DSP [7, 8].

Приготовление растворов D-NFATc1 в сыворотке. Для приготовления растворов белка в биоматериале использовались образцы сыворотки крови здорового человека, обедненные от 14 мажорных белков с помощью хроматографической колонки Multiple Affinity Removal Column (Hu-14) с размерами 4,6 x 50 мм (Agilent, США) согласно инструкции производителя (<http://www.chem.agilent.com/Library/applications/5991-3207EN.pdf>). Образец сыворотки разбавлялся в 100 раз калий-фосфатным буфером (КФБ, 1 мМ, pH 7,4). Далее, к 90 мкл буферного раствора сыворотки было добавлено 10 мкл раствора D-NFATc1 (10^8 М, 50 мМ КФБ, pH 7,4). Таким образом, был приготовлен сток-раствор белка в буферном растворе сы-



Зависимости СЗХ НП $\Delta I_{ис}(V_{затв})$, полученные при детекции D-NFATc1 в растворах сыворотки крови с помощью НПБ для рабочих НП с иммобилизованными аптамерами против D-NFATc1 (\circ , \blacktriangle , \bullet — растворы сыворотки в КФБ с $C_{D-NFATc1} = 0$, $C_{D-NFATc1} = 2,5 \times 10^{-15}$ М, $C_{D-NFATc1} = 2,5 \times 10^{-14}$ М соответственно) и для контрольных НП без иммобилизованных аптамеров (\square , ∇ , \blacksquare — растворы сыворотки в КФБ с $C_{D-NFATc1} = 0$, $C_{D-NFATc1} = 2,5 \times 10^{-15}$ М, $C_{D-NFATc1} = 2,5 \times 10^{-14}$ М соответственно). Условия эксперимента: $V_{затв}$ от 0 до +30 В, $V_{ис} = +0,15$ В, $V = 200$ мкл.

воротки (10^9 М D-NFATc1, 1 мМ КФБ, рН 7,4). На основе сток-раствора белка, с помощью последовательного десятикратного разбавления раствором сыворотки, готовились растворы D-NFATc1 для анализа с концентрациями от 10^{13} М до 10^{15} М. Каждый промежуточный раствор выдерживался на шейкере в течение 30 мин при 10°C . Растворы белка готовились непосредственно перед применением. Контрольные эксперименты проводились с использованием раствора сыворотки, не содержащего определяемый белок.

Электрические измерения. Электрические измерения СЗХ полевых нанотранзисторов НПБ проводились с помощью высокоскоростной системы сбора и обработки данных (ССД) под управлением ПО ТУРБО НБС (рег. №2015612969 от 27.02.2015 г.). ССД включала в себя пикоамперметры Keithley 6487 и Keithley 6485 (Keithley, США). Сбор данных в режиме снятия сток-затворных характеристик (СЗХ) и обработка результатов протеомных измерений, полученных с помощью НПБ, осуществлялись в высокопроизводительном режиме (время одного измерения порядка 1 мс с шагом измерения 1 В) при помощи ПО ТУРБО НБС. Во время измерений подложка структур КНИ была использована в качестве управляющего электрода (затвора транзистора). Зависимости тока стока-истока от напряжения на затворе (СЗХ) $\Delta I_{uc}(V_{затв})$ для НП были получены в КФБ (1 мМ, рН 7,4) при $V_{затв}$ от 0 до +30 В и $V_{uc} = 0,15$ В. Для регистрации белка раствор D-NFATc1 (50 мкл в 1 мМ КФБ, рН 7,4) добавлялся в кювету НПБ, содержащую 150 мкл буферного раствора, после чего также снимались СЗХ НП. Для учета неспецифической адсорбции D-NFATc1 на поверхность НП, на поверхности НП сенсора, помимо рабочих НП, присутствовала пара контрольных НП без иммобилизованных аптамеров. В экспериментах использовался буфер с низкой концентрацией соли (1 мМ) для исключения влияния Дебаевского экранирования. При такой концентрации буферных солей радиус Дебая (λ_D) составляет порядка 5 нм, что достаточно, чтобы регистрировать образование белковых комплексов на поверхности НП-структур. Поскольку D-NFATc1 имеет расчетную изоэлектрическую точку $pI = 4,7$ (ExpASy: SIB Bioinformatics Resource Portal), то в условиях эксперимента ($pH = 7,4$) этот белок имеет эффективный отрицательный заряд, и адсорбция отрицательно заряженных молекул на поверхность НП n-типа должна приводить к уменьшению проводимости НП и сдвигу СЗХ вправо.

Результаты и обсуждение

В экспериментах использовались НП сенсоры шириной 3 мкм, что обеспечивало стабильность СЗХ в течение не менее 1 часа. На рисунке представлены полученные зависимости $\Delta I_{uc}(V_{затв})$, полученные при концентрациях D-NFATc1 в сыворотке от $2,5 \times 10^{16}$ до $2,5 \times 10^{14}$ М. Из рисунка видно, что при концентрации $C_{D-NFATc1} = 2,5 \times 10^{14}$ М наблюдается сдвиг СЗХ вправо, т.е. проводимость НП уменьшается. При $C_{D-NFATc1} = 2,5 \times 10^{15}$ М и менее, как и в случае добавления в кювету раствора сыворотки без определяемого белка, сдвиг СЗХ не наблюдался. Таким образом, минимальная детектируемая концентрация молекул D-NFATc1 в сыворотке составила $2,5 \times 10^{14}$ М.

Результаты экспериментов по обнаружению D-NFATc1 путем измерения СЗХ НП показали, что белок может быть зарегистрирован с высокой чувствительностью без использования дополнительных меток. Учитывая, что аптамеры имеют ряд преимуществ перед антителами, то аптасенсоры могут заменить биосенсоры на основе антител для быстрого белкового скрининга и экспресс-диагностики заболеваний. Использование НП сенсоров шириной 3 мкм позволяет достигать высокой стабильности СЗХ при пределе обнаружения белка D-NFATc1 в сыворотке крови порядка 10^{14} М.

References

1. Rissin D.M., Kan Ch.W., Campbell T.G. et al. *Nature Biotech.* 2010; 28: 595-9.
2. Ivanov Y.D., Bukharina N.S., Frantsuzov P.A. et al. *Soft Matter.* 2012; 8: 4602-8.
3. Patolsky F., Zheng G. F., Hayden O. et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2004; V. 101: 14017-22.
4. Zheng G., Patolsky F., Cui Y. et al. *Nature Biotech.* 2005; V. 23: 1294-301.
5. Hahn J., Lieber C.M. *Nano Lett.* 2004; V. 4: 51-4.
6. Pui T.-S., Agarwal A., Ye F. et al. *Nanoscale.* 2009; V. 1: 159-63.
7. Ivanov Yu.D., Pleshakova T.O., Kozlov A.F. et al. *Lab Chip.* 2012; V. 12: 5104-11.
8. Maksagova K.A., Ivanov Yu. D., Pleshakova T. O. et al. *Biomeditsinskaya Khimiya.* 2015; V. 61: 462-7. (In Russian)
9. Ivanov Yu.D., Pleshakova T.O., Kozlov A.F. et al. *Avtometriya.* 2013; V. 49: 119-26. (In Russian)
10. Yiu G.K., Kaunisto A., Chin Y.R., Toker A. *Biochem. J.* 2001; V. 440: 157-66.

Поступила 20.11.15

Сведения об авторах:

Мальсагова Кристина Ахмедовна — аспирант ИБМХ

Плешакова Татьяна Олеговна — кандидат химических наук, старший научный сотрудник ИБМХ

Шумов Иван Дмитриевич — кандидат биологических наук, младший научный сотрудник ИБМХ

Кайшева Анна Леонидовна — кандидат биологических наук, научный сотрудник ИБМХ

Попов Владимир Павлович — доктор физико-математических наук, заведующий лабораторией ИФП СО РАН

Наумова Ольга Викторовна — доктор физико-математических наук, заведующий лабораторией ИФП СО РАН

Фомин Борис Иванович — кандидат физико-математических наук, ведущий научный сотрудник ИФП СО РАН

Насимов Дмитрий Александрович — научный сотрудник ИФП СО РАН

Латышев Александр Васильевич — член-корреспондент РАН, доктор физико-математических наук, директор ИФП СО РАН

Арчаков Александр Иванович — академик РАН, доктор биологических наук, профессор, научный руководитель ИБМХ

Асеев Александр Леонидович — академик РАН, доктор физико-математических наук, профессор, вице-президент РАН

Татур Вадим Юрьевич — научный консультант ООО «ЦАМАКС»

Коновалова Галина Михайловна — проректор по научной и инновационной деятельности, Сочинский Государственный Университет

Иванова Нина Дмитриевна — преподаватель МВА им. К.И. Скрябина

Иванов Юрий Дмитриевич — доктор биологических наук, профессор, заведующий лабораторией ИБМХ, заместитель генерального директора ООО «ЦАМАКС»